

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
2. lékařská fakulta

Ovlivnění imunologických parametrů po radikálních operacích a
experimentální konsolidační léčbě karcinomu ovarií

Disertační práce

Praha 2015

MUDr. Tomáš Brtnický

Univerzita Karlova v Praze
2. lékařská fakulta

Studijní program: Postgraduální doktorské studium v biomedicíně
Studijní obor: Experimentální chirurgie



MUDr. Tomáš Brtnický

Ovlivnění imunologických parametrů po radikálních operacích a experimentální konsolidační léčbě karcinomu ovarii

Effect of radical surgery and experimental consolidatory treatment on immunological parameters of ovarian cancer patients

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Lukáš Rob, CSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne 18.5.2015.

MUDr. Tomáš Brtnický

Identifikační záznam:

BRTNICKÝ, Tomáš. Ovlivnění imunologických parametrů po radikálních operacích a experimentální konsolidační léčbě karcinomu ovárií [Effect of radical surgery and experimental consolidatory treatment on immunological parameters of ovarian cancer patients]. Praha, 2015. 96 s., Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta,
Gynekologicko-porodnická klinika. Školitel Rob, Lukáš.

Seznam zkratek

ALL	akutní lymfoblastická leukemie
APC	antigen prezentující buňka
BER	base excision repair
CD	cluster of differentiation
DC	dendritic cell
EOC	epiteliální ovariální karcinom
FasL	Fas ligand
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
HGSC	high-grade serózní karcinom ovaria
HSP	heat shock protein
IDS	Interval debulking surgery
IFN γ	interferon gama
IL	interleukin
LGSC	low-grade serózní karcinom ovaria
MHC	major histocompatibility complex
NAC	neoadjuvantní chemoterapie
PARP1	(poly(ADP-ribózo)polymeráza-1) enzym
PFS	progression-free survival
PSA	prostatický specifický antigen
RAG	gen pro rekombinaci T a B buněčných receptorů
ROMA	risk of ovarian malignancy algorithm
SSB	single-strand break
STIC	serous tubal intraepithelial carcinoma
TAA	tumor associated antigen
Tc	cytotoxický T lymfocyt
TCR	T cell receptor
TGF- β	transforming growth factor beta
Th	pomocný T lymfocyt (helper)
Treg	regulační CD4 ⁺ T lymfocyt
TSA	tumor specific antigen
UVA	ultrafialové záření typu A
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Abstrakt	3
2 Úvod do problematiky	5
2.1 Úvod – obecné informace o karcinomu ovaria	8
2.2 Nová etiopatogeneze karcinomu ovaria	22
2.3 Úloha imunitního systému v obraně proti nádorům	24
2.3.1 Imunitní reakce při nádorovém onemocnění	25
2.3.2 Úloha jednotlivých složek imunity v obraně proti nádorům	25
2.3.3 Editace nádoru imunitním systémem	26
2.3.4 Mechanizmy úniku nádorových buněk před imunitním systémem	27
2.3.5 Imunoterapie nádorových onemocnění	27
2.4 Základní vlastnosti nádorových buněk	35
2.4.1 Nádorové antigeny	36
2.4.2 Autokrinní stimulační a schopnost neodpovídat na protirůstové signály	35
2.4.3 Proliferace nádorových buněk	35
2.4.4 Schopnost inhibice apoptózy	35
2.4.5 Schopnost invazivního růstu a metastazování	36
2.5 Základní vlastnosti imunokompetentních buněk	36
2.5.1 Subpopulace dendritických buněk	36
2.5.2 Subpopulace T lymfocytů	36
2.6 Cílená léčba karcinomu ovaria	38
2.6.1 Úloha adekvátní chirurgické léčby	38
2.6.2 Konvenční chemoterapie	40
2.6.3 Konsolidační léčba	41
2.6.4 Inhibitory angiogeneze	42
2.6.5 PARP inhibitory	43
2.6.6 Perzonalizovaná medicína - nové postupy	44
3 Hypotézy a cíle práce	48
3.1 Klinický význam monitorace T-regulačních lymfocytů v periferní krvi u pacientek s ovariálním karcinomem	48
3.2 Dynamika imunitního infiltrátu v závislosti na stádiu ovariálního karcinomu. Postupná změna imunitní reakce od efektorových Th17 lymfocytů k regulačním T lymfocytům	49
3.3 Lidské nádorové buňky usmrcené antracykliny indukují tumor-specifickou imunitní odpověď	50
4 Materiál a metodika	52
5 Výsledky a diskuze	53
5.1 Klinický význam monitorace T-regulačních lymfocytů v periferní krvi u pacientek s ovariálním karcinomem	53
5.2 Dynamika imunitního infiltrátu v závislosti na stádiu ovariálního karcinomu. Postupná změna imunitní reakce od efektorových Th17 lymfocytů k regulačním T lymfocytům	60

5.3 Lidské nádorové buňky usmrcené antracykliny indukují tumor-specifickou imunitní odpověď	71
6 Závěr	85
6.1 Klinický význam monitorace T-regulačních lymfocytů v periferní krvi u pacientek s ovariálním karcinomem	85
6.2 Srovnání účinku jednotlivých chemoterapeutik v metronomických dávkách (cyklofosamid, etoposid) na množství T- regulačních lymfocytů	86
7 Poděkování	87
8 Seznam citované literatury	88
9 Seznam vlastních publikací	96
9.1 GAUK	96
9.2 Publikace s IF ve vztahu k disertační práci	96
9.3 Publikace bez IF v recenzovaném časopise ve vztahu k disertační práci	96

Abstrakt

Incidence ovariálního karcinomu je v ČR jednou z nejvyšších v EU. Pětileté přežití všech stádií je přibližně 40%. Mortalita je i přes intenzivní snahu o časnější diagnostiku a moderní terapii celosvětově stále vysoká. Po ukončení chemoterapie se dosahuje kompletní klinické odpovědi u časných stádií (stadium I. a II.) v téměř 100 %, ale ve 20 až 40 % nelze bohužel zcela eliminovat všechny nádorové buňky rezistentní na chemoterapii a téměř u třetiny žen se objeví recidiva onemocnění. U pozdních stádií (stadium III. a IV.) se dosahuje ve více než 70 % případů kompletní klinické remise, ale do 2 let recidivuje z této skupiny více než 50 % žen. Recidiva onemocnění je důsledkem aktivace chemorezistentních klonů maligních buněk. Tato populace buněk, které nejsou detekovatelné běžnými vyšetřovacími metodami, je označována jako minimální reziduální nemoc. Problematika byla rozdělena do třech oblastí. V první jsme monitorovali množství T-regulačních lymfocytů v periferní krvi u pacientek s ovariálním karcinomem. V druhé jsme sledovali dynamiku imunitního infiltrátu v závislosti na stádiu onemocnění. Ve třetí jsme testovali různé typy cytostatik v jejich schopnosti indukovat tumorspecifickou imunitní odpověď. U řady zhoubných nádorů bylo prokázáno, že jsou zmnožené regulační CD4+CD25+ T lymfocyty v nádorové tkáni i periferní krvi (Treg). Treg se podílejí na kontrole protinádorové imunity ve smyslu její suprese. U některých nádorů bylo zjištěno, že procento Treg buněk v periferní krvi koreluje s prognózou pacientů. Jednou z možností experimentální konsolidační terapie je podávání nízkých (metronomických) dávek etopozidu nebo cyklofosfamidu perorálně. Metronomické dávky nemají přímý cytotoxický efekt na chemorezistentní nádorové buňky, ale z mnoha experimentálních studií na zvířatech bylo zjištěno, že cyklofosfamid má pozitivní efekt ve smyslu zastavení růstu nádoru a jeho regresi, případně oddálení recidivy onemocnění. V této studii jsme potvrdili výbornou prognózu pacientek ve stádiu onemocnění FIGO I/II a velmi dobré klinické výsledky u pacientek ve stádiu IIIC bez pooperačního nádorového rezidua. Neshledali jsme žádný rozdíl v parametru PFS u pacientek s pooperačním nádorovým reziduem mezi skupinami pacientek s konsolidační terapií a bez konsolidační terapie. Pacientky v časném stádiu měly signifikantně rychlejší kinetiku růstu Treg v periferní krvi, což se promítlo jako vyšší sklon křivky růstu počtu Treg (slope of the Tregs trend line). Slope of the Tregs trend line se ukázal jako signifikantní prediktor časně recidivy onemocnění. U pozdních recidiv jsme tento jev neprokázali. Ve druhé části výzkumu jsme zjistili, že se Treg vyskytující v nádoru významně liší v různých stádiích onemocnění. V pokročilých stádiích dochází k chemotaxi Treg z periferní krve do nádorové tkáně a intratumorózně lokalizované Treg se významně podílejí na zvýšení imunopresivního mikroprostředí uvnitř nádoru. Ve třetí části výzkumu jsme zjistili,

že nádorové buňky usmrčené antracykliny indukují imunogenní smrt významněji v porovnání s buňkami usmrčenými UVA zářením, ale i v porovnání s buňkami usmrčenými jinými cytostatiky.

Klíčová slova: karcinom ovaria, T-regulační lymfocyty, konsolidační (metronomická) terapie

The incidence of ovarian carcinoma in the Czech Republic is one of the highest in the EU. The five year survival rate of all stages is approximately 40%. The mortality still remains high globally, despite the efforts of diagnostic procedures and modern treatment. After ending the course of chemotherapy, a completely successful clinical response can be achieved in the early stages (stage I. a II.) in almost 100% of patients. However in 20-40 % it is unfortunately impossible to completely eliminate all tumour cells resistant to chemotherapy and almost a third of women have relapses. Today in the late stages (III. a IV.) more than 70 % of cases result in complete clinical remission; however within 2 years more than 50 % of women from this group suffer from relapses. The relaps of disease results from the activation of a chemoresistant clone of malignant cells. Those cell populations that aren't detectable using investigation methods are marked as minimal residual disease. The issue has been divided into three areas. In the first we monitored the amount of regulatory T-cells in peripheral blood of patients with ovarian cancer. In the second we monitored the dynamics of the immune infiltrate, depending on the stage of the disease. In the third, we tested various types of cytostatics in their ability to induce tumor-specific immune response. In some series of malignant tumours multiple peripheral CD4+CD25+ T lymphocytes (Treg) were found. Treg play a suppressive role in the control of antitumour immunity. In some tumours the percentage of Treg cells in peripheral blood were found to correlate with the patients' prognosis. One of the experimental procedure in consolidatory treatment is usage of peroral low etoposid or cyclophosphamide dosages. Low (metronomic) dosages don't have a direct cytotoxic effect on chemoresistant tumour cells but from many experimental animal studies cyclofosfamide was found to have a positive effect on this low doses treatment in stopping growing tumours and their regression - eventually removing disease relapse. In this study we confirmed that the patients with stages I/II of the disease had an excellent prognosis and very good outcome in stage IIIC patients with no residual tumor after surgery. There was no difference in the PFS of patients with residual tumor after surgery, irrespective of the consolidation therapy received. Patients with the early relapse had significantly faster kinetics of the rise of Tregs in the peripheral blood, which translated into the higher slope of Tregs

trend line. The slope of the Tregs trend line was a significant predictor of an early relapse. The slope of Tregs trend line does not have any predictive value for late relapses. In the second part of the research we found out that Tregs in the tumor varies significantly in different stages of the disease. In advanced stages, chemotaxis of Tregs occurs from peripheral blood in tumor tissue and these Tregs contribute significantly to increase the immunosuppressive microenvironment within the tumor. In the third part of the research we found out that tumor cells killed by anthracycline induced immunogenic death significantly more than the tumor cells killed by UVA radiation or killed by the other types cytostatics.

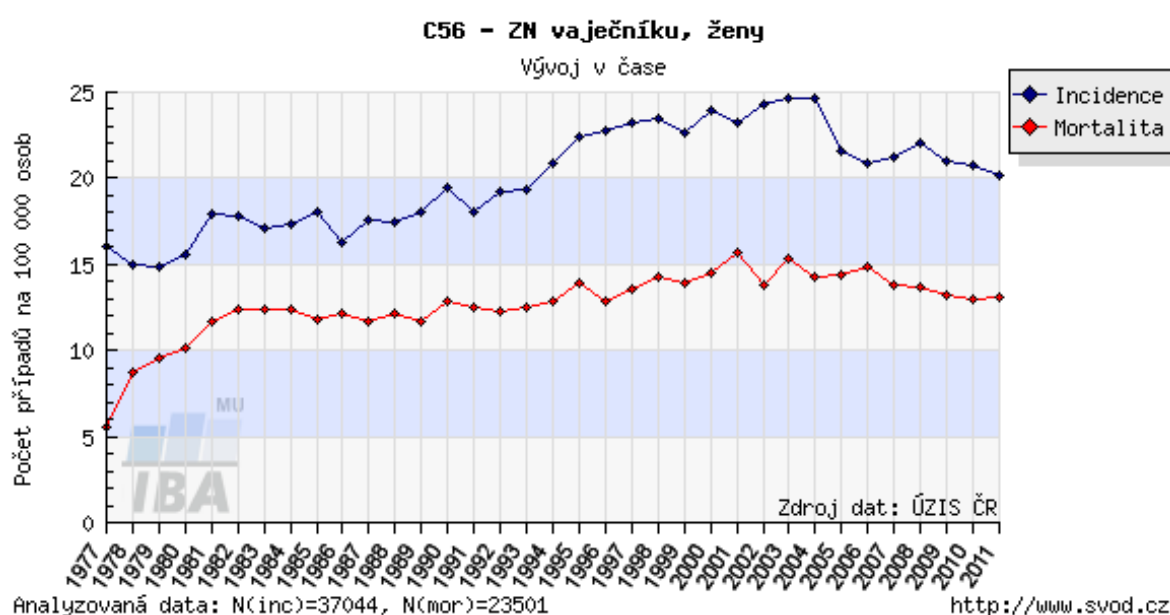
Keywords: ovarian cancer, Regulatory T cells, Metronomic chemotherapy

2 Úvod do problematiky

2.1 Úvod – obecné informace o karcinomu ovaria

Incidence zhoubných nádorů vaječníků je v České republice jednou z nejvyšších v zemích Evropské unie. V roce 2004 byla incidence 24.6/100 000 žen, tj. v absolutních počtech 1290 nových onemocnění. Ve stejném roce byla mortalita 14.2/100 000, v absolutních číslech 745 úmrtí. Incidence začíná lehce klesat. V roce 2011 byla incidence 20.2/100 000 žen, v absolutních počtech bylo hlášeno 1080 nových onemocnění. Mortalita (v roce 2011) byla 13.1/100 000 žen, tedy zemřelo 702 žen (zdroj dat: ÚZIS ČR).

obr. č. 1

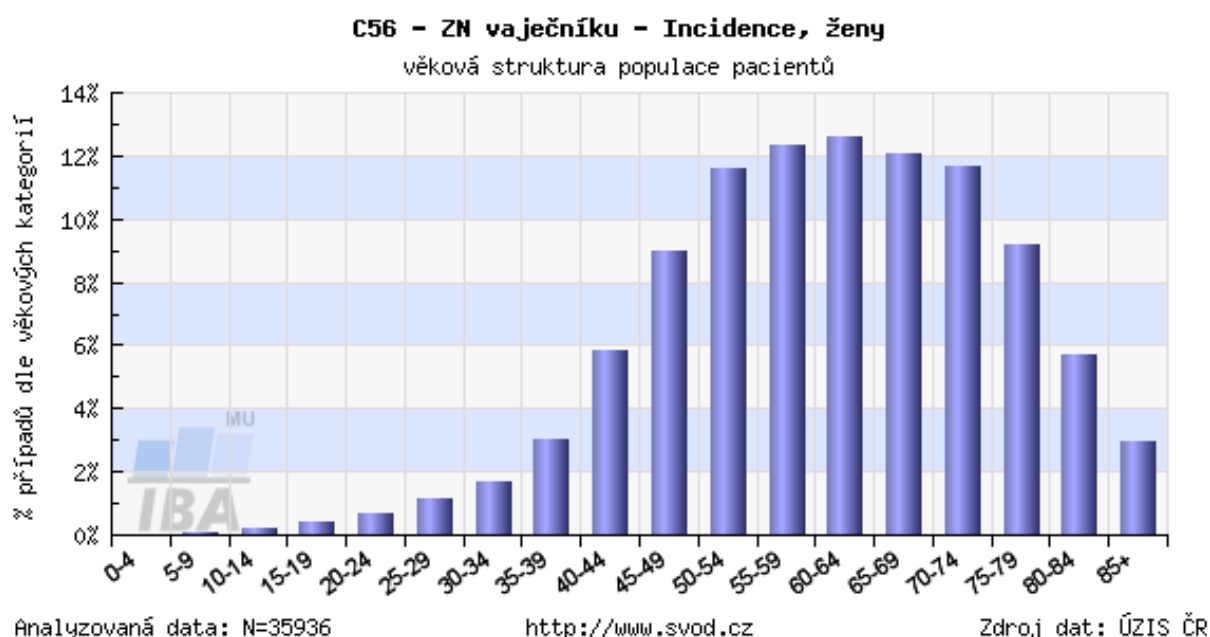


Pětileté přežití všech stádií je asi 40% [72]. Mortalita je i přes usilovnou snahu o časnější diagnostiku celosvětově stále vysoká. Jedním z hlavním důvodů takto neuspokojivých léčebných výsledků je pozdní diagnostika. V současné době se 75 - 80 % karcinomů ovarii diagnostikuje v pozdních stádiích, tj. ve stadiu III. a IV. (FIGO klasifikace). Jako standardní léčba se v klinické praxi používá radikální operace a následně kombinovaná chemoterapie. Po ukončení chemoterapie je dosaženo kompletní klinické odpovědi u časných stádií (stadium I. a II.) v téměř 100 %, ale ve 20 až 40 % nelze bohužel zcela eliminovat všechny nádorové buňky rezistentní na chemoterapii a téměř u třetiny žen se objeví recidiva onemocnění. U pozdních stádií (stadium III. a IV.) je dosahováno ve více než 70 % případů kompletní klinické remise, ale do 2 let recidivuje z této skupiny více než 50 % žen. Histopatologicky se karcinomy vaječníků rozdělují na nádory epiteliální a neepiteliální. Ve vlastní práci jsme se

věnovali nádorům epiteliálním, které tvoří ve střední Evropě cca 90% všech zhoubných nádorů ovarii. Hranice mezi benigními a maligními nádory není ostrá. U nádorů ovarii se vyskytuje skupina nádorů s tzv. hraniční malignitou (borderline). Patolog při vyšetření histologického preparátu hodnotí stratifikaci buněk, mitotickou aktivitu, jaderné atypie, stavbu epitelu a invazi do stromatu.

Průměrný věk pacientky s epiteliálním ovariálním karcinomem v době diagnózy v ČR je 57 let.

obr. č. 2



WHO histologická klasifikace epiteliálních zhoubných nádorů vaječníků (85-90% všech ZN)

Serózní nádory (cca 50%)

Adenokarcinom	8441/3
Povrchový papilární adenokarcinom	8461/3
Adenokarcinofibrom (maligní adenofibrom)	9014/3

Mucinózní nádory (cca 7-10%)

Adenokarcinom	8480/3
Adenokarcinofibrom (maligní adenofibrom)	9015/3
Mucinózní cystický nádor s pseudomyxoma peritonei	8480/3

Endometroidní nádory zahrnující varianty saquamózní diferenciaci (cca 30%)

Adenokarcinom blíže neurčený	8380/3
------------------------------	--------

Adenokarcinofibrom (maligní adenofibrom)	8381/3
Maligní mülleriánský smíšený nádor (karcinosarkom)	8950/3
Adenosarkom	8933/3
Endometroidní stromální sarkom (low grade)	8931/3
Nediferencovaný ovariální sarkom	8805/3
Nádory z jasných buněk (cca 10%)	
Adenokarcinom	8310/3
Adenokarcinofibrom (maligní adenofibrom)	8313/3
Nádory z přechodných buněk (méně než 1%)	
Nádory z přechodných buněk (non-Brenner type)	8120/3
Maligní Brennerův nádor	9000/3
Spinocelulární nádory (méně než 0,1% raritní)	
Spinocelulární karcinom	8070/3
Smíšené epiteliální nádory - specifické komponenty (méně než 0,1% raritní)	
Maligní	8323/3
Nediferencované a neklasifikovatelné nádory (méně než 1%)	
Nediferencovaný karcinom	8020/3
Adenokarcinom blíže neurčený	8140/3

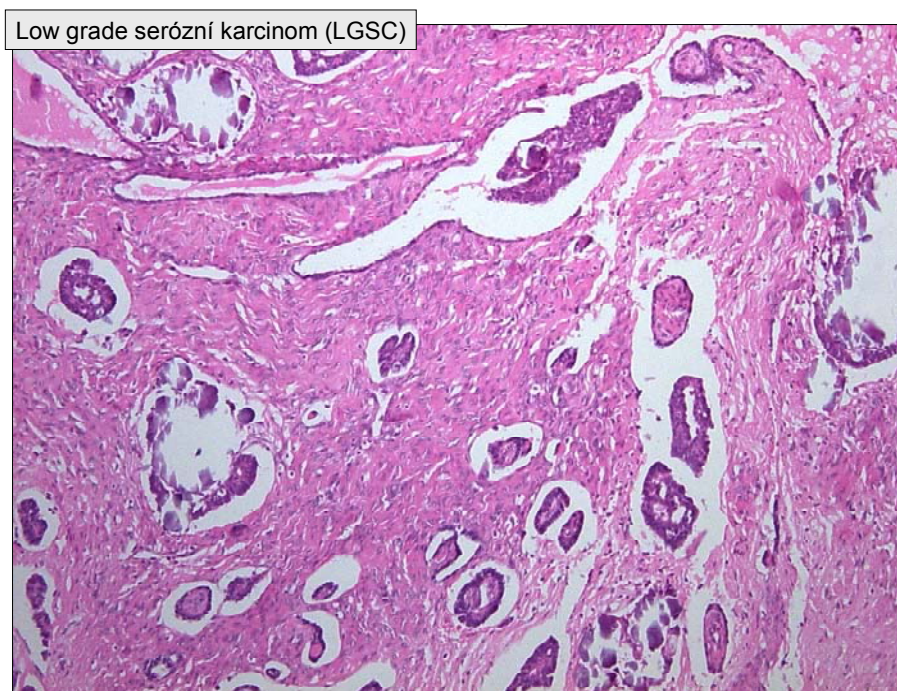
Serózní nádory (cca 50%)

Podle nejnovější klasifikace se zhoubné serózní karcinomy dělí na low-grade a high-grade.

Low-grade serózní karcinom (obr. č. 3)

Jedná se o invazivní karcinom vykazující znaky low-grade (dříve označovaný grade 1) cytologických atypií. V porovnání s high-grade serózními karcinomy se nevyskytují příliš často, pouze v cca 5% všech serózních karcinomů [50]. Pacientky s low-grade serózním karcinomem (dále pouze LGSC) onemocní o přibližně o 10 let dříve v porovnání s pacientkami s high-grade karcinomem (dále pouze HGSC). Většina z nich se diagnostikuje v pokročilých stádiích onemocnění. Nádorové masy jsou obvykle cystického charakteru, ale často obsahují ztlustělá septa a nodulární komponenty. Většinou jsou postižena obě ovaria. Ve srovnání s HGSC podléhají méně často výrazným nekrotickým změnám, naopak častěji lze vidět rozsáhlé nádorové kalcifikace. Morfologicky vykazují buňky LGSC ve srovnání s HGSC mírnější jaderné atypie a tvoří více uniformní populace nádorových buněk. Imunohistochemický profil je téměř identický se serózním borderline tumorem. Ki-67

proliferační index je nižší ve srovnání s HGSC. Prognóza pacientek je nejvíce závislá na úspěšnosti primárního chirurgického výkonu. Biologická povaha nádoru, zejména ohraničený růst v iniciálních stádiích, umožňuje ve vyšším procentu pacientek úspěšný debulking v porovnání s HGSC. Při nulovém makroskopickém pooperačním reziduu přežívá 5 let 85% [28] a 10 let 50% pacientek [35]. Při nádorovém reziduu nad 2 cm se však prognóza pacientek prudce zhoršuje [14]. LGSC nejsou v porovnání s HGSC tak citlivé k chemoterapii platinovým derivátem, což zdůrazňuje význam maximálního chirurgického debulkingu této skupiny pacientek.

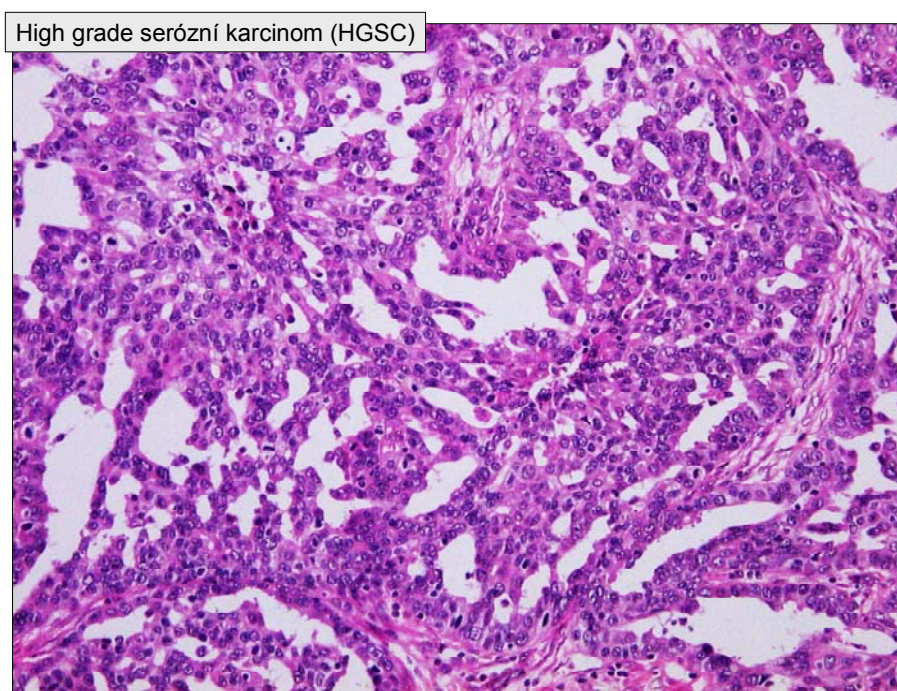


Obr. č. 3 (histopatologický preparát, převzato se svolením autora, MUDr. Petr Škapa, Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol)

High-grade serozní karcinom (obr. č. 4)

Karcinom vykazující známky high-grade cytologických atypií. V USA a v zemích západní Evropy každoročně klesá incidence high-grade serozního karcinomu (dále jen HGSC). Tento trend ještě akceleroval po roce 2002. Hlavní příčinou je masivní užívání hormonální antikoncepce (viz. kap. etiologie a rizikové faktory). Průměrný věk pacientek s HGSC je 63 let. Příznaky onemocnění jsou nespecifické a diagnostika je ve většině případů pozdní. HGSC mají tendenci k rychlé diseminaci po břišní dutině a nespecifické gastrointestinální obtíže či astites jsou příznakem generalizace onemocnění. Nádor často postihuje obě ovaria, roste

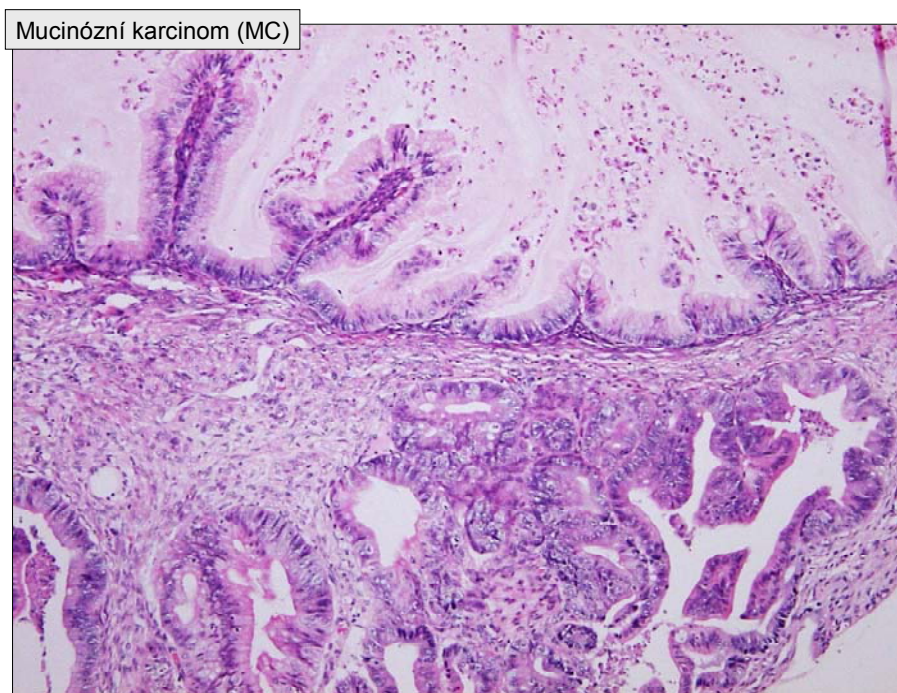
exofyticky a strukturu má smíšenou solidně-cystickou. V cystické části jsou přítomny výrazně prokrvené papilace. Morfologicky jsou přítomny nádorové buňky s velkým jádrem, mitózy jsou časté a atypické. 15-20% HGSC ovariálních karcinomů je způsobeno hereditární predispozicí. Nejčastější příčinou je mutace tumor supresorového genu BRCA1 a BRCA2. Riziko vzniku HGSC u BRCA1 mutace se blíží 50% a průměrný věk diagnózy je mezi 49-53 lety věku. Riziko vzniku HGSC u BRCA2 mutace je nižší, pohybuje se mezi 11-37% a průměrný věk zjištění diagnózy se pohybuje mezi 55-58 lety [52]. Prakticky všechny BRCA indukované nádory představují high-grade serózní histopatologii [58]. Prognostických markerů je u HGSC relativně málo a zatím se nepoužívají rutinně v klinické praxi. Bylo zjištěno, že přítomnost tumor infiltrujících lymfocytů, především CD3+ nebo CD8+ T-lymfocytů je příznivým prognostickým faktorem. Naopak zvýšené množství T-regulačních lymfocytů v nádorové tkáni je nepříznivým prognostickým faktorem, jelikož T-regulační lymfocyty se významně podílí na imunosupresivním mikroprostředí nádoru v pokročilém stadiu onemocnění [22]. V současnosti byl akceptován nový pohled na patogenezi HGSC (viz. kapitola 2.2).



Obr. č. 4 (histopatologický preparát, převzato se svolením autora, MUDr. Petr Škapa, Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol)

Mucinózní karcinom (obr. č. 5)

Jedná se o maligní epiteliální nádor složený z nádorových buněk gastrointestinálního typu obsahující intracytoplasmaticky uložený mucin. Mucinózní karcinom tvoří 3-4% všech primární ovarialních karcinomů. Průměrný věk stanovení diagnózy je 45 let. Příznaky onemocnění jsou nespecifické, nejčastěji se vyskytuje pocit nadmutí a bolesti břicha. Pokročilá stádia primárního mucinózního karcinomu jsou v porovnání s HGSC výrazně méně častá [98]. Histopatolog často v preparátu nachází architekturu nádoru a cytologické atypie od benigních, přes borderline až k čistým okrskům mucinózního karcinomu. Mitotická aktivita nádorových buněk je většinou vysoká. Mucinózní karcinomy se typicky vyvíjejí z borderline buněk nádoru, které atypicky proliferují. Byly popsány případy vzniku mucinózní karcinomu z teratomu nebo z Brennerova národu. Mucinózní karcinomy vzniklé na podkladě teratomu vykazují známky low-grade mucinózní neoplazie.



Obr. č. 5 (histopatologický preparát, převzato se svolením autora, MUDr. Petr Škapa, Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol)

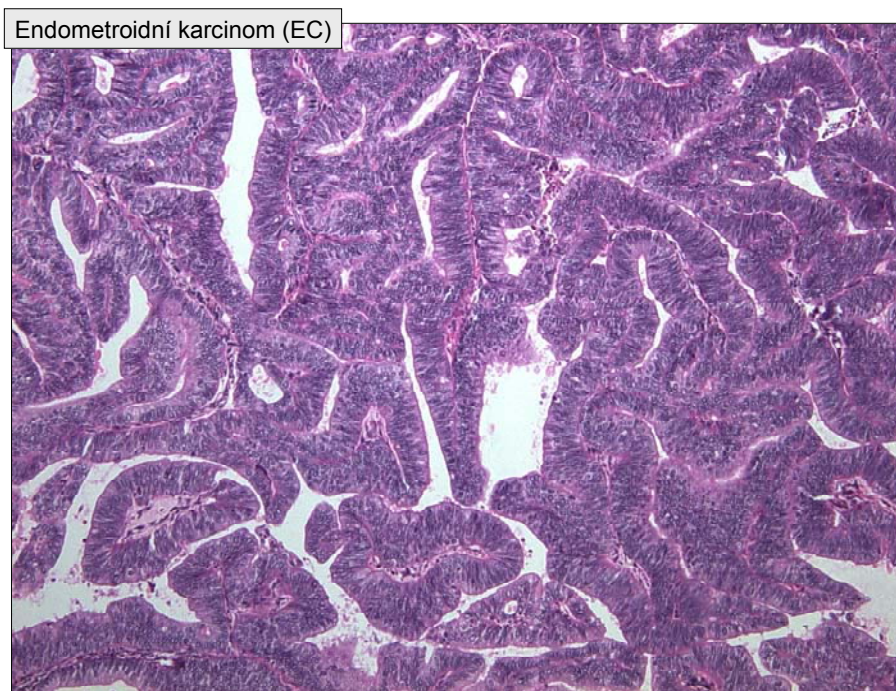
Při diagnóze mucinózního karcinomu je třeba vždy vyloučit event. metastatický původ v ovariu a primární tumor v oblasti GIT, zejména appendixu. Tyto nádory jsou totiž podobné low-grade mucinózním karcinomům vznikající z appendixu, které mohou vést k rozvoji pseudomyxoma peritonei [59, 92]. Nejčastější genetickou alterací nacházející se v buňkách

mucinózního karcinomu je mutace KRAS [15]. Zmnožení HER2 receptoru je zastiženo v 15-20% případů [1]. Většina invazivních mucinózních karcinomů postihuje pouze jedno ovarium a je diagnostikována v časných stádiích (nečastěji stadium I podle FIGO klasifikace). V těchto případech je prognóza pacientek příznivá. Naproti tomu pokročilá stadia mucinózního karcinomu, která jsou méně častá, jsou méně citlivá k chemoterapii, ve srovnání s HGSC. Prognóza pacientek s pokročilým stádiem onemocnění je špatná [98].

Endometroidní karcinom (obr. č. 6)

Maligní epiteliální nádor podobající se endometroidnímu karcinomu děložního těla. Endometroidní karcinom tvoří 10-15% všech ovariálních karcinomů, jedná se tedy o druhý nejčastější epiteliální zhoubný nádor ovaria. Nejčastěji se diagnostikuje v páté a šesté dekádě života. Starší publikace uvádějí, že více než 42% těchto nádorů vzniká na podkladě endometriozy [18, 63]. Poslední práce ale udávají, že převážná část těchto karcinomů je asociována s endometriozou [53]. V 15-20% případů koexistuje s primárním endometroidním karcinomem endometria [41, 48, 97]. Pacientky, u kterých vznikne endometroidní karcinom ovaria na základě endometriozy, jsou v průměru o 5-10 let mladší v porovnání s pacientkami, které endometriozou netrpí [85]. Průměrný věk pacientek v době diagnózy je 58 let [85]. Většina pacientek je diagnostikována ve časném stadiu onemocnění (Ia podle FIGO klasifikace), ale jsou až v 17% bilaterální (stadium Ib). Hodnoty CA125 v séru jsou zvýšené ve více než 80% případů [46, 54]. Průměrná velikost nádoru v době diagnózy je cca 15 cm. Nádor je tvořen smíšenou cysticko-solidní hmotou, cystická část je většinou vyplněna krví případně sekretem připomínající "čokoládovou" Sampsonovu endometroidní cystu. Grading endometroidního karcinomu ovaria je totožný s gradingem endometroidního karcinomu endometria. Většina endometroidních karcinomů ovaria je dobře diferencovaných a vykazují známky low-grade jaderných atypií. Méně diferencované endometroidní karcinomy jsou převážně solidní struktury, často se zde vyskytují intratumorózní hemoragie a nekrózy. V případě špatně diferencovaných endometroidních karcinomů může být odlišení od HGSC obtížné, v těchto případech je nutné doplnění imunohistochemických metod. Low-grade endometroidní karcinomy vznikají nejčastěji na podkladě endometriozy. Histogeneze high-grade endometroidního karcinomu doposud objasněna nebyla, i když i zde je asociace s endometriozou. U stadia I (dle FIGO klasifikace) je pětileté přežití kolem 78%, u stadia II 63%, u stadia III 24% a u stadia IV je to 6%. Jak již bylo výše zmíněno, endometroidní karcinom ovaria se vyskytuje v 15-20% případů současně s endometroidním karcinomem endometria. Obvykle jsou oba nádory dobře diferencované a mají velmi podobné

histopatologické charakteristiky. V klinické praxi je často obtížné odlišit duplicitu nádoru od metastatického origa. Kriteria rozlišující metastatický endometroidní nádor od nádorové duplicity jsou založena pouze na histopatologických odlišnostech. Pouze v případě nálezu low-grade endometroidního karcinomu endometria, který je asociován s hyperplasií a minimální invazí do myometria, může být endometroidní karcinom ovaria považován jako primární. V těchto případech je prognóza pacientek příznivá, pěti leté přežití je 70-92% a medián přežití je 10 let a více [84, 85].

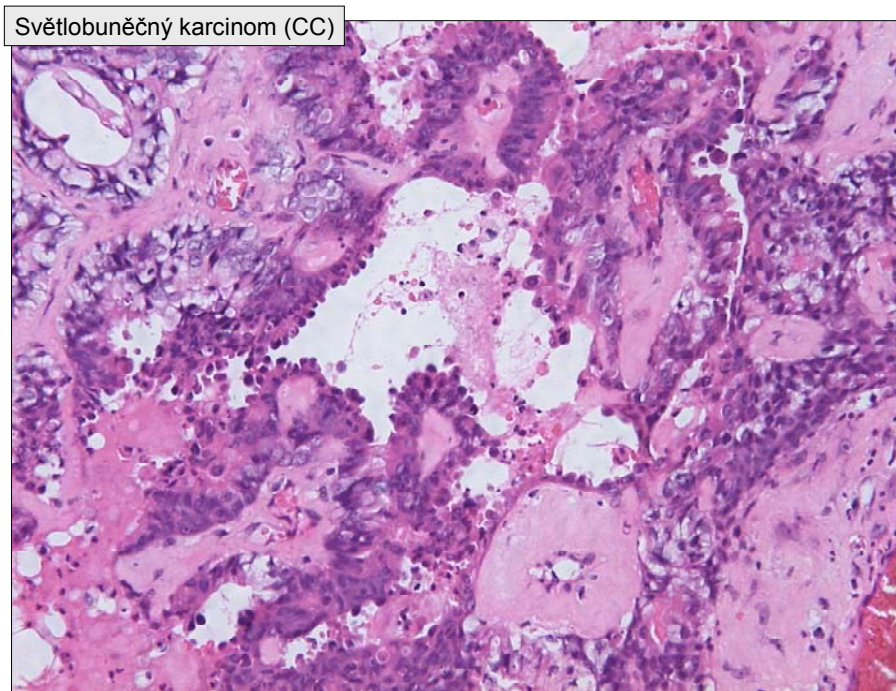


Obr. č. 6 (histopatologický preparát, převzato se svolením autora, MUDr. Petr Škapa, Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol)

Clear cell karcinom (obr. č. 7)

Maligní nádor složený převážně z jasných buněk. Průměrný věk pacientek je 55 let [38]. V 50-70% případů vzniká též na podkladě endometriozy [24, 64]. Jedná se o epiteliální ovariální karcinom asociovaný s nejvyšším rizikem vzniku paraneoplastické hyperkalcemie [79] a venózního tromboembolizmu [20]. Nádory jsou typicky unilaterální s průměrnou velikostí 15 cm v době diagnózy. Tvoří jak pouze solidní, tak i smíšené solidně-cystické tumory. V současnosti jsou všechny clear cell karcinomy považovány za high-grade. Hereditární clear cell karcinomy jsou nejčastěji asociovány s Lynchovým syndromem [44]. Souvislost s BRCA1 a BRCA2 mutacemi nebyla prokázána. Nejdůležitějším prognostickým faktorem je

stadium v době diagnózy. Stadium I (dle FIGO klasifikace) má velmi dobrou prognózu. Naproti tomu stadium pokročilejší má prognózu nepříznivou, zejména pokud má pacientka pooperační nádorové reziduum. Nepříznivá prognóza pacientek s nádorovým reziduem je dána nízkou citlivostí k chemoterapii založené na platinovém derivátu [38, 87].



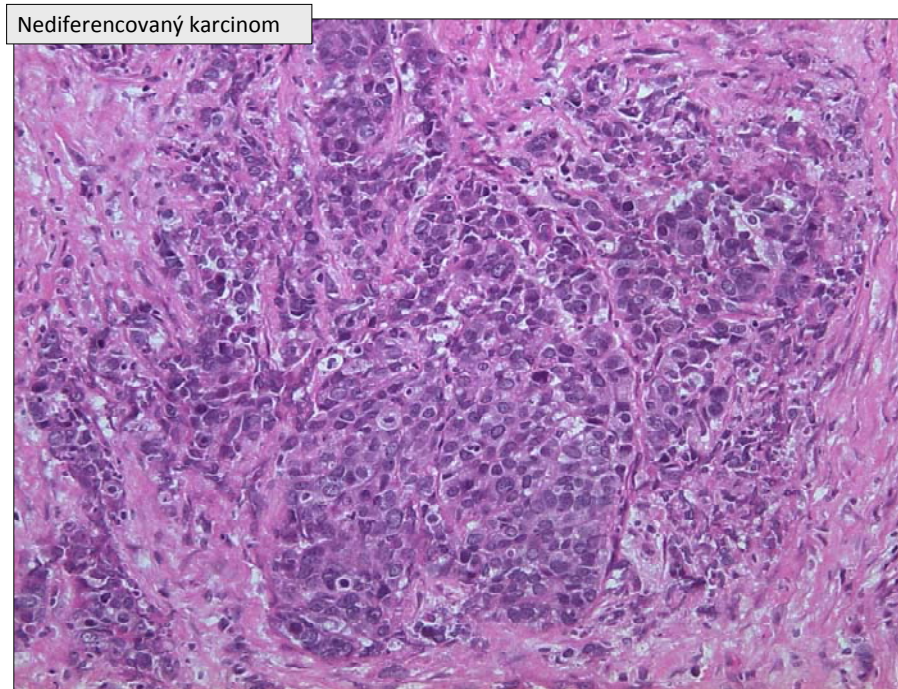
Obr. č. 7 (histopatologický preparát, převzato se svolením autora, MUDr. Petr Škapa, Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol)

Seromucinózní karcinom

Karcinom složený zejména ze serózní komponenty a mucinózní komponenty endocervikálního typu. Ložiska clear cell, endometrioidní nebo skvamozní diferenciaci nejsou u tohoto karcinomu vzácná. Synonymum pro tento typ karcinomu je mucinózní karcinom endocervikálního typu nebo smíšený epiteliální karcinom Mülleriánského typu. Tento nádor se nevyskytuje příliš často, a proto jsou epidemiologická data velmi omezená. Průměrný věk pacientek je 45 let. Průměrná velikost tumoru v době diagnózy je 12 cm a více jak polovině případů se vyskytuje oboustranně. Prognóza u pacientek ve stadiu I (FIGO klasifikace) je příznivá, ale pacientky s pokročilým stádiem onemocnění mají prognózu špatnou [81].

Nediferencovaný karcinom (obr. č. 8)

Maligní epiteliální nádor, který nevykazuje žádnou formu diferenciaci. Vyskytuje se asi v 5-15%. V době diagnózy je ve většině případů diseminovaný a v polovině případů oboustranný. Jedná se o vysoce agresivní typ nádoru se špatnou prognózou.



Obr. č. 8 (histopatologický preparát, převzato se svolením autora, MUDr. Petr Škapa, Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol)

Maligní Brennerův nádor

Ovariální karcinom z přechodných buněk, který se velmi podobá invazivnímu uroteliálnímu karcinomu. Vzácnou variantou je skvamózní subtyp nádoru. Maligní Brennerův nádor tvoří méně než 5% všech Brennerových tumorů [33, 60]. Nejčastěji se vyskytuje benigní varianta, méně často borderline. Nádor se nejčastěji diagnostikuje u žen kolem 50 let věku. Někdy se může nádor projevit abnormálním vaginálním krvácením [74]. V době diagnózy jsou tumory poměrně velké, v průměru 16-20 cm. Mohou být solidní i cystické struktury a obvykle obsahují i benigní komponentu Brennerova nádoru. Benigní komponenta je často fibrózní struktury s kalcifikacemi. Přibližně 80% případů je diagnostikováno ve stadiu I (FIGO klasifikace) a ve 12% případů se vyskytuje oboustranně [4]. Pacientky ve stadiu Ia přežívají pět let od stanovení diagnózy v 88% případů. U nádorů s extraovariálním šířením jsou terapeutické výsledky podobné jako u pokročilých ovariálních karcinomů jiných

histopatologických skupin. Ovšem dostupná data o těchto pacientkách, jsou vzhledem k jejich malému počtu, velmi omezená [4].

Etiologie a rizikové faktory

Příčina vzniku EOC (epiteliální ovariální karcinom) není většinou známa. Rozšiřující se znalosti v oblasti etiopatogeneze ukazují, že více než 10% EOC je geneticky vázáno. V případě high-grade serózního karcinomu ovaria se podle posledních dat předpokládá souvislost s hereditární zátěží zejména mutacemi BRCA1 a BRCA2 ve více než 20% případů. Narozdíl od sporadických karcinomů mají pacientky s geneticky vázaným nádorem mutace genů i v normálních (nenádorových) buňkách. Velká část těchto nádorů, přibližně 60-70%, se řadí do skupiny tzv. "breast/ovarian cancer syndrom". V běžné populaci je výskyt mutací BRCA1 1:280. Riziko vzniku HGSC u BRCA1 mutace se blíží 50% a průměrný věk diagnózy je mezi 49-53 lety věku. Riziko vzniku HGSC u BRCA2 mutace je nižší, pohybuje se mezi 11-37% a průměrný věk zjištění diagnózy se pohybuje mezi 55-58 lety. Většinu BRCA indukovaných nádorů představují high-grade serózní nádory [58]. Geneticky vázané karcinomy ovaria jsou zpravidla více agresivní, vykazují výraznější cytologické abnormality a vyšší výskyt aneuploidity ve srovnání se sporadickými karcinomy. Naproti tomu, jsou ale více chemosenzitivní než sporadické karcinomy. V současnosti se hledají modalita léčby, které budou specifičtěji působit na tuto podskupinu (viz. PARP inhibitory, kapitola 2.6.5.). Hlavními rizikovými faktory pro vznik EOC jsou radiace, životní prostředí a dietní návyky. Naopak nejsilnějším protektivním faktorem je dlouhodobé užívání hormonální antikoncepce. Ze studií bylo zjištěno, že dalšími nejdůležitějšími protektivními faktory jsou vyšší parita, pozdější nástup menarche a dřívější nástup menopauzy [37, 66, 67, 86]. Všechny tyto faktory se spolupodílí na redukci počtu menstruačních cyklů a výraznému snížení celkového počtu ovulací během života ženy. Užívání hormonální antikoncepce po dobu jednoho roku snižuje riziko vzniku ovariálního karcinomu přibližně o 4,5%, po 10 letech užívání se toto riziko snižuje až na 50%. Delší užívání než 10 let, ale k další redukci rizika vzniku ovariálního karcinomu nevede. Výše zmíněná protekce trvá po vysazení hormonální antikoncepce minimálně 20 let. Z epidemiologických studií se předpokládá, že užívání hormonální antikoncepce zabránilo v celosvětovém měřítku vzniku přes 200 tis. případů ovariálního karcinomu za posledních několik dekad [8].

Skríning

Prozatím žádná efektivní screeningová metoda pro karcinom ovaria neexistuje. Pokus o zařazení nádorového markeru CA125 do screeningového algoritmu selhal, protože se jedná o marker vysoce nespecifický, a to zvláště u žen v období premenopauzy. Hladina CA125 se v séru zvyšuje u velkého počtu zcela nezhoubných nálezů jako jsou benigní cysty, endometrioza, zánět, děložní myomatóza a těhotenství. Další nádorový marker HE4 (Human Epididymal Protein-4) je protein produkovaný tkání nadvarlat, epitelem respiračního a reprodukčního traktu. Zvýšen je u karcinomů ovaria. V porovnání s markerem CA125 se významně méně elevuje při benigních gynekologických onemocněních a vykazuje vyšší senzitivitu i v časných stádiích onemocnění. Na druhou stranu se HE4 významně elevuje při chronických onemocněních ledvin, fibróze ledvin a karcinomu plic. Lepších výsledků je dosahováno kombinací obou markerů, tedy CA125 a HE4 (zejména při využití tzn. ROMA indexu). ROMA (zkratka z risk of ovarian malignancy algorithm) byl vyvinut jako matematická metoda k odhadu rizika epitelálního karcinomu ovaria. Odhad vypočítává nejen z hodnoty CA125 a HE4, ale bere v úvahu i menopauzální statut pacientky, ultrazvukový nález není zohledněn. Výsledkem ROMA indexu je pravděpodobnost nálezu karcinomu ovaria během chirurgického výkonu, vyjádřená číselně (v procentech). Avšak ani kombinace výše zmíněných nádorových markerů nespĺňuje kriteria screeningové metody a její užití k plošnému screeningu je nereálné. Ultrazvuk, především ultrazvuk vaginální, má specifitu vyšší jen v případě, že vyšetření provádí zkušený odborník, který má k dispozici kvalitní ultrazvukový přístroj s barevným dopplerem. Vzhledem k malému počtu ultrazvukových specialistů a nákladnosti vyšetření není ani expertní ultrazvuk pro plošný screening populace dostupnou metodou. Ultrasonografické vyšetření zachytí zejména low-grade nádory, které tvoří ohraničenou rezistenci a teprve později diseminují. Jedná se zejména o LGSC, endometroidní karcinom a mucinózní karcinom.

Diagnostika

Při preventivním gynekologickém vyšetření je odhaleno pouze 10-15% ovariálních karcinomů. Záchyt onemocnění výrazně zvyšuje gynekolog dobře trénovaný v ultrazvukové diagnostice. Při podezření na ovariální malignitu je na místě odběr nádorových markerů, zejména CA125, příp. HE4. Ostatní nádorové markery, např. CA19-9 a CEA mají význam zejména v diferenciální diagnostice nádorů gastrointestinálního traktu. Další vyšetřovací metodou je expertní ultrazvukové vyšetření s využitím barevného doppleru, výpočetní tomografie a RTG hrudníku. Jako doplňková vyšetření se individuálně provádí vylučovací

urografie, rektoskopie, kolonoskopie a ultrazvuk jater. Při gynekologickém vyšetření je s výhodou využít vyšetření v polosedě, kdy lze palpovat infiltrované omentum nádorem.

TNM a FIGO klasifikace

Pravidla klasifikace

- Onemocnění musí být histologicky ověřené, aby případy mohly být rozděleny podle histologického typu. V soulase s FIGO se doporučuje zjednodušená verze WHO histologické klasifikace (International Histological Classification of Tumours No 9, WHO, Geneva, 1973). V současnosti byly provedeny změny v klasifikaci u stadia III, kde současná data ukazují na prognostické rozdíly mezi N1 (IIIA v recentní klasifikaci) a metastázami mimo pánev, které jsou závažnější (stadium IIIB a C). Dále by měl být uveden stupeň diferenciaci.

- Pro stanovení T,N a M kategorií jsou nutná následující vyšetření:
T-kategorie: Klinické vyšetření, zobrazovací vyšetření laparoskopie, a/nebo chirurgická explorace

N-kategorie: Klinické vyšetření a zobrazovací vyšetření laparoskopie, a/nebo chirurgická explorace.

M-kategorie: Klinické vyšetření a zobrazovací vyšetření, laparoskopie a/nebo chirurgická explorace

Regionální mízní uzliny: regionálními mízními uzlinami jsou uzliny hypogastrické (obturatorní), společné ilické, zevní ilické, laterální sakrální, paraaortální uzliny a uzliny tříselné.

TNM klinická klasifikace ZN ovarii

T - primární nádor

TNM kategorie	FIGO stadia	
TX		Primární nádor nelze posoudit
T0		Žádné známky primárního nádoru
T1	I	Nádor ohraničený na vaječníky
T1a	IA	Nádor ohraničen na jeden vaječník, pouzdro intaktní, žádný nádor na povrchu vaječníku, v ascitu nebo peritoneálním výplachu nejsou maligní buňky
T1b	IB	Nádor ohraničen na oba vaječníky, pouzdro intaktní, žádné známky nádoru na povrchu vaječníků, v ascitu nebo peritoneálním výplachu nejsou maligní buňky

T1c	IC	Nádor ohraničen na jeden nebo oba vaječníky s rupturou pouzdra, nádorem na povrchu ovaria nebo maligní buňky v ascitu či peritoneálním výplachu
T2	II	Nádor postihuje jedno či obě ovaria, šíří se v pánvi
T2a	IIA	Šíří se na dělohu a/nebo tubu (tuby) nebo implantáty na děloze nebo tubě (tubách), v ascitu nebo peritoneálním výplachu nejsou maligní buňky
T2b	IIB	Šíří se na jiné pánevní tkáně, v ascitu nebo peritoneálním výplachu nejsou maligní buňky
T2c	IIC	Šíří se v pánvi (2a nebo 2b) s maligními buňkami v ascitu nebo peritoneálním výplachu
T3 a/nebo N1	III	Nádor postihuje jedno nebo obě ovaria, s mikroskopicky prokázanými peritoneálními metastázami mimo pánev a/nebo metastázy v regionálních mízních uzlinách
N1	IIIA1	Metastázy pouze v retroperitoneálních lymfatických uzlinách
N1a	IIIA1i	Metastázy v lymfatických uzlinách velikosti do 10 mm v největším rozměru
N1b	IIIA1ii	Metastázy v lymfatických uzlinách velikosti nad 10 mm v největším rozměru
T3a	IIIA2	Mikroskopické peritoneální metastázy mimo pánev
T3b	IIIB	Makroskopické peritoneální metastázy mimo pánev 2 cm nebo méně v největším průměru
T3c a/nebo N1IIIC		Peritoneální metastázy mimo pánev větší než 2 cm v největším průměru a/nebo metastázy v regionálních mízních uzlinách
M1	IV	Vzdálené metastázy (mimo peritoneální metastázy)

Poznámka: metastázy v pouzdru jater je T3/stadium III, metastázy v jaterním parenchymu M1/stadium IV. Pleurální výpotek musí mít pro M1/stadium IV pozitivní cytologii.

N - Regionální mízní uzliny

NX	Regionální mízní uzliny nejde posoudit
N0	Regionální mízní uzliny bez metastáz
N1	Metastázy v regionálních mízních uzlinách

M - Vzdálené metastázy

MX	Přítomnost vzdálených metastáz nelze určit
M0	Bez vzdálených metastáz
M1	Vzdálené metastázy

pTNM: Patologická klasifikace

Kategorie pT, pN a pM odpovídají kategoriím T, N a M

pN0 Histologické vyšetření preparátu z pánevní lymfadenektomie musí osahovat 10 nebo více lymfatických uzlin.

G - Histopatologický grading

GX	Stupeň diferenciacie nelze posoudit
GB	Hraniční /borderline/ malignita
G1	Dobře diferencovaný (low-grade)
G2	Středně diferencovaný (high-grade)
G3-4	Špatně diferencovaný nebo nediferencovaný (high-grade)

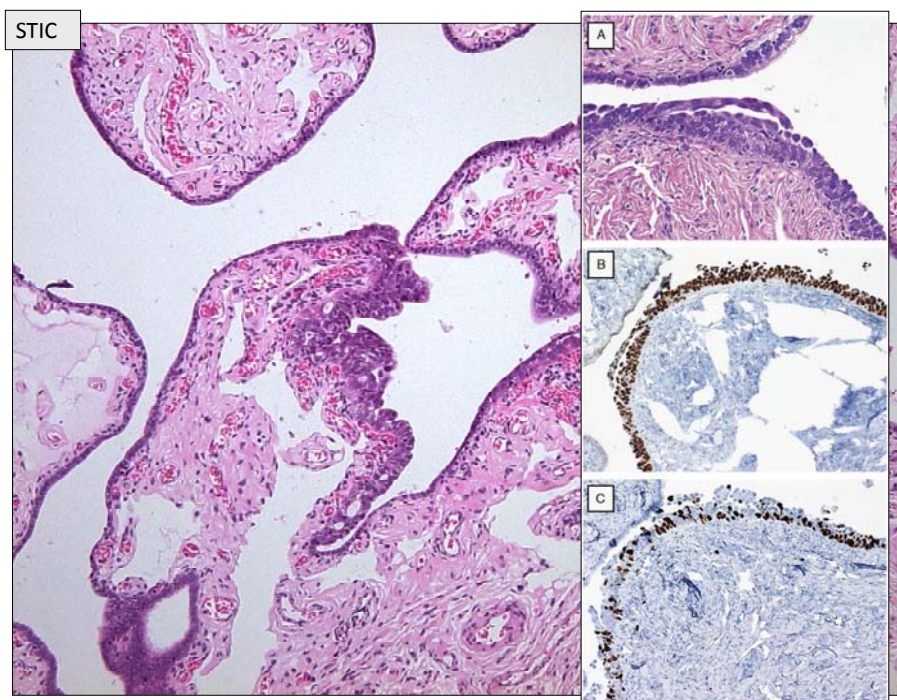
2.2 Nová etiopatogeneze karcinomu ovaria

Ještě v nedávné době byly všechny serózní karcinomy ovaria považovány za nádory primárně vzniklé pouze v ovariu. Toto dogma bylo vyvráceno hlubším pochopením vlastní etiopatogeneze vzniku serózních karcinomů ovaria. Vzhledem k recentním zjištěním byly serózní karcinomy ovaria rozděleny na dvě samostatné onkologické malignity, a to na low-grade a high-grade serózní karcinom ovaria. Toto rozdělení je založeno na dualistickém modelu epiteliálního ovariálního karcinomu, který rozděluje epiteliální karcinomy na dvě odlišné kategorie označené jako typ I a typ II [82]. Jako typ I je označován low-grade serózní karcinom, který se vyznačuje vyšší frekvencí KRAS a BRAF mutací. Jako typ II je označován high-grade serózní karcinom, který je charakterizován větší genetickou nestabilitou, množstvím chromozomálních abnormalit a téměř vždy přítomností mutací TP53 [53], (viz. tab. níže).

	Typ II	Typ I			
	HGSC	LGSC	MC	LGEC	CCC
Frekvence výskytu	70%	<5%	3%	10%	10%
Genetická predispozice	BRCA 1 BRCA 2	?	?	HNPCC	?
Prekurzorová léze	STIC	SBT	Mucinózní cystadenom / MBT	Atypická endometrioza	Atypická endometrioza
Molekulární změny	BRCA 1/2 TP53	BRAF KRAS	KRAS	PTEN β-catenin ARID1A	HNF-1β ARID1A
Charakter diseminace	časný rozsev v břišní dutině	rozsev v břišní dutině	většinou pouze ovarium	většinou pouze pánevní orgány	většinou pouze pánevní orgány
Citlivost na chemoterapii	vysoká	střední	nízká	střední	nízká
Prognóza	špatná	střední	dobrá	dobrá	střední

Tato nádorová onemocnění rozdělená do výše zmíněných dvou kategorií mají rozdílné etiopatologické mechanismy vzniku. Prekurzorem low-grade serózního karcinomu je borderline serózní tumor/atypicky proliferující tumor. High-grade serózní karcinomy se obvykle vyznačují rychlým růstem, vysokou agresivitou s rychlou diseminací v dutině břišní a jsou diagnostikovány v pokročilých stádiích onemocnění.

Bylo zjištěno, že většina serózních epiteliálních nádorů vzniká primárně z metaplasticky změněného povrchového epitelu tubárních fimbrií. Následně dochází k rozvoji neinvazivních intraepiteliálních lézí, okrsky těchto buněk se nazývají serózní tubární intraepiteliální karcinomové buňky (dále jen STIC, obr. č. 9). Tyto buňky již mají charakteristiky buněk high-grade serózního ovariálního karcinomu (HGSC) a vykazují přítomnost TP53 mutace a expresi proteinu p53. Zvýšená proliferace je ukazatelem genetické nestability [57, 76].

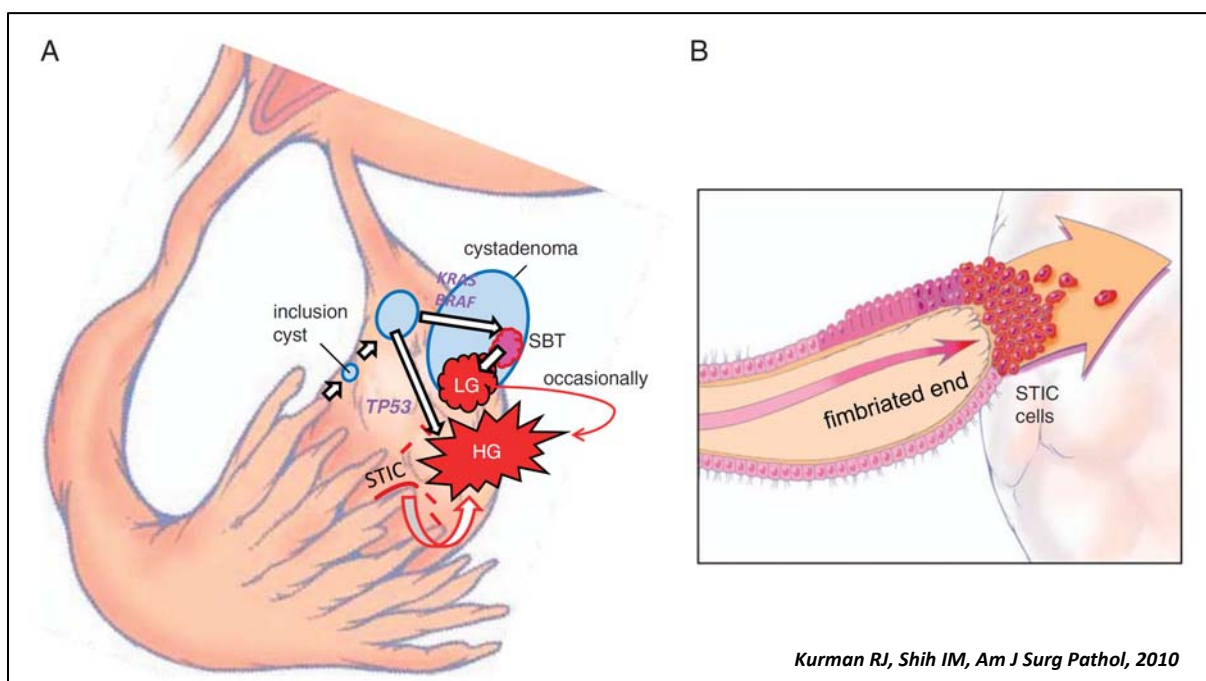


Obr. č. 9 (histopatologický preparát, převzato se svolením autora, MUDr. Petr Škapa, Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol)

Bylo zjištěno, že STIC jsou přítomny na fimbriích tuby u více než 60% pacientek s HGSC [45, 70]. U 20% pacientek s HGSC je tuba kompletně obliterovaná tumorem. V přibližně 15-30% případech HGSC je tuba bez nálezu invazivního nádoru i bez nálezu STIC. V těchto

případech se zdá velmi pravděpodobná etiopatogeneze nádoru v místě ovulačního traumatu, případně vznikem z kortikální inkluzní cysty. V tomto případě je metaplastický epitel zavzat do inkluzní cysty. Tuto teorii posiluje fakt, že většina kortikálních inkluzních cyst jsou morfologicky a imunohistochemicky identické s epitelem tuby. Toto zjištění vede k závěru, že kortikální inkluzní cysty vznikají z implantovaných tubárních epiteliálních buněk, které se na povrch ovaria implantují v průběhu ovulace [3, 21]. Přítomnost aneuploidity v buňkách inkluzních cyst tuto teorii ještě posiluje [69].

Obr. č. 10



2.3 Úloha imunitního systému v obraně proti nádorům

K transformaci normální buňky na buňku nádorovou může dojít mnoha různými způsoby. Jedním z možných mechanismů maligní transformace je vyvolaná mutace v tzv. onkogenech nebo anti-onkogenech. V nemutované podobě tyto geny kódují různé signální proteiny, transkripční faktory, proteiny regulující buněčnou adhezivitu nebo apoptózu. V mutované podobě mít abnormálně zvýšenou aktivitu (produkty onkogenů) nebo naopak aktivitu abnormálně sníženou (produkty anti-onkogenů) [36]. Výše zmiňované abnormality mohou vést ve svém důsledku k nekontrolovatelnému dělení, úniku z přirozené tkáňové lokalizace, diseminaci do jiných tkání a k agresivnímu růstu. Imunitní systém hraje důležitou úlohu v

kontrole růstu nádorových buněk, a to zejména v ranných stádiích karcinogeneze. Imunitní odpověď organismu na nádorovou buňku má komplexní povahu a jsou do ní zapojeny všechny imunitní mechanismy, jak nespecifické (neadaptivní), tak specifické (adaptivní) imunity. Bylo zjištěno, že zásadní úlohu v rozvoji protinádorové imunitní reakce hrají dendritické buňky. Dendritické buňky indukují protinádorovou reakci, ale pouze za podmínky jejich adekvátní aktivace. Protinádorová imunoterapie má v klinické medicíně největší naději na úspěch, jestliže je aplikována buď v časných fázích onemocnění nebo v kombinaci s jinými terapeutickými zásahy, jejichž cílem je cytoredukce nádorových hmot [7].

2.3.1 Imunitní reakce při nádorovém onemocnění

Nádorové buňky vznikají z normálních buněk organismu, vzájemně se ale od sebe liší a teoreticky by měly být rozpoznány imunitním systémem. Bohužel jsou odlišnosti rozeznatelné imunitními mechanismy buď příliš malé (imunitní systém je ignoruje) nebo používají nádorové buňky mechanismy, které jim umožní inaktivovat, případně zcela paralyzovat zbraně imunitního systému. Rozvoj nádorového onemocnění je složitý proces komplexní povahy, který se vyvíjí v několika stupních (viz. kapitola 2.3.3). Bylo prokázáno, že imunitní systém dokáže kontrolovat růst nádorových buněk v počátečních stádiích karcinogeneze. Avšak s pokračujícím růstem nádoru se možnosti imunitní odpovědi zmenšují a imunitní mechanismy jsou paralyzovány (viz. kapitola 2.3.4).

2.3.2 Úloha jednotlivých složek imunity v obraně proti nádorům

Imunitní reakce proti nádorové buňce vzniká stejnými mechanismy, jako jiné druhy imunitních reakcí. Zásadním předpokladem rozvoje imunitní reakce je rozeznání neoplastické buňky od buňky normální. První úvahy o tom, že by imunitní systém mohl rozpoznat nádorové bujení se objevily počátkem 20. století. Americký chirurg Coley si povšiml, že pacientovi s recidivujícím sarkomem zmizel nádor v oblasti krku poté, co se v oblasti operační rány objevil erysipel [13]. V 60. letech minulého století byla formulována hypotéza o protinádorovém imunitním dohledu a existenci strážných buněk pocházejících z thymu, které trvale monitorují přítomnost transformovaných nádorových buněk [12]. Imunitní systém využívá v protinádorové odpovědi oba typy imunitní reakce - nespecifickou (neadaptivní) i specifickou (adaptivní). Z nespecifických imunitních reakcí je využívána v buněčné imunitě aktivita makrofágů, NK-buněk a granulocytů. Z humorální imunity, pak zejména komplement, cytokiny a některé antimikrobiální peptidy. Výhodou nespecifické imunitní reakce je její rychlost, jak ve smyslu rychlé detekce, tak schopnosti rychlé eliminace nádorové

buňky. Nevýhodou nespecifické imunity je neschopnost imunologické paměti. Imunologická paměť je doménou až specifické imunity a zajišťují ji T a B lymfocyty [7]. Rozvoj specifické imunity trvá v řádu dní, po tuto dobu je nezbytné, aby obranu zajistila nespecifická imunita. Nejúčinnějším mechanismem aktivace specifického lymfocytu je setkání naivního lymfocytu se zralou antigen prezentující buňkou (APC), nejčastěji dendritickou buňkou (DC). Podmínkou této aktivace je nutnost přítomnosti daného antigenu na povrchu DC. Složitou interakcí APC a T lymfocytu dojde ke klonální expanzi a k vytvoření dostatečné populace efektorových buněk. Efektorový T lymfocyt je pak aktivován při setkání s antigenem na povrchu patogenu (příp. nádorové buňky) a vede k jeho eliminaci. Reakce imunitního systému na nádorovou buňku je v principu obdobná s reakcí na infekční agens (např. patogenní bakterii). Reakce proti nádorové buňce je však řádově slabší v porovnání s antiinfekční reakcí [73]. Je to dáno tím, že nádorová buňka vychází z normální buňky tělu vlastní a imunitní reakce je tlumena mechanismy imunologické tolerance.

2.3.3 Editace nádoru imunitním systémem

Jedním ze základních pojmů nádorové imunologie je imunitní dozor. Podle hypotézy o imunitním dozoru vznikají transformované nádorové buňky v organismu zcela běžně a jsou eliminovány imunitním systémem. Tuto hypotézu posiluje fakt, že u pacientů s poruchami specifické buněčné imunity je výrazně zvýšeno riziko nádorů vyvolanými viry [36]. Dále bylo prokázáno, že u imunodeficitních jedinců je zvýšené riziko spontánních a chemicky indukovaných nádorů. Tato hypotéza byla potvrzena ve studiích s geneticky modifikovanými zvířaty, jimž chybí T, B, NK lymfocyty. Nejznámější studie byly publikovány na myších bez funkčních genů pro rekombinaci T a B buněčných receptorů (RAG 2 $-/-$). Tyto myši nemají T a B lymfocyty. U těchto myši bylo prokázáno, že častěji vyvinou chemicky indukované nádory, ale také tvoří mnohem více spontánních nádorů ve srovnání s kontrolou (myši bez defektu RAG). Nádory, které nejsou pod kontrolou funkčního imunitního systému rostou rychleji a s větší frekvencí v porovnání s imunokompetentními kontrolami a vytvoří více spontánních nádorů [80]. Rozšířením hypotézy o imunitním dozoru vznikl pojem tzv. imunitní editace nádorů (cancer immunoediting). V případě onkologického onemocnění spolu nádor a imunitní systém vzájemně interagují. Nádor je pod neustálým selekčním tlakem, postupně se adaptuje a zvyšuje svoji odolnost vůči útokům imunitního systému. Novou hypotézu imunitní editace nádorů publikoval v roce 2004 Dunn a popsal tři úrovně boje imunitního systému proti nádoru, fázi eliminace (elimination), rovnováhy (equilibrium) a úniku (escape) [19]. Fáze eliminace je typická "nadvládou" imunitního systému nad

nádorem, imunitní systém rozpoznává a ničí nádorové buňky. Pokud nejsou eliminovány všechny nádorové buňky, dochází k hromadění mutací a zásadním změnám vlastností nádorových buněk. Proces imunitní editace postoupí do fáze rovnováhy. V této fázi již imunitní systém nedokáže eliminovat nádor zcela, ale dokáže ho kontrolovat a blokovat jeho růst. Ve fázi rovnováhy nejsou žádné klinické projevy onemocnění a doba trvání této fáze může trvat krátce a nebo také po celý život postiženého organismu. V případě, že dojde k dalším dramatickým změnám v genetické výbavě nádoru nebo k výraznému oslabení imunitního systému, přechází fáze rovnováhy do fáze úniku. Ve fázi úniku už imunitní systém nedokáže kontrolovat růst nádoru a dochází ke klinickým projevům nemoci.

2.3.4 Mechanizmy úniku nádorových buněk před imunitním systémem

Nádorové buňky vyvíjejí celou řadu mechanismů jak odolávat imunitnímu systému, případně zcela uniknout jeho kontrole. Tyto mechanismy jsou podobné, někdy zcela analogické unikovým mechanismům infekčních mikroorganismů. Jedna z nejúčinnějších form obrany nádorových buněk je aktivní stimulace mechanismů vytvářející toleranci imunitního systému. Nejznámější mechanismy jsou ztráta nádorového antigenu následkem častých mutací, nízká hustota exprese nádorových antigenů, sialylace povrchu nádorových buněk (zamaskování epitopů nádorových antigenů navázáním sialové skupiny), faktory inaktivující lymfocyty, inhibice funkce nebo životnosti dendritických buněk apod. [36]. Nádorové buňky bohužel nefungují jako antigen prezentující buňky (APC), tzn. že pokud prekurzorový cytotoxický lymfocyt rozezná na povrchu buňky nádorový antigen není následně aktivován, ale naopak utlumen. Velmi významným faktorem je inhibice protinádorové odpovědi regulačními T lymfocyty (Treg) (viz. kapitola 2.5.2). Důležité je také zmínit vliv velikosti nádoru. Nádor je komplexní systém tvořený nejen nádorovými buňkami, ale i krevními cévami, vazivem a mezibuněčnou hmotou. Mikroprostředí nádoru se často velmi liší od prostředí v organismu. Vlivem hypoxického prostředí a vysoké hladiny toxických zplodin z rozpadajících se nádorových buněk jsou imunitní mechanismy uvnitř nádorové hmoty výrazně oslabeny.

2.3.5 Imunoterapie nádorových onemocnění

Imunoterapie nádorových onemocnění je založena na principu indukce protinádorové imunity. Využívají se také imunitní mechanismy k cílenému směřování léčiv do samotného nádoru. Největší účinnost vykazuje imunoterapie v léčbě tzv. minimální reziduální nemoci. Imunoterapie využívá možností stimulace jak protilátkové, tak buněčné odpovědi. Z monoklonálních protilátek je neznámější protilátka trastuzumab (Herceptin) reagující s

antigenem HER2/neu, dále se podávají monoklonální protilátky např. k léčbě leukémií a lymfomů. Monoklonální protilátky lze také označit radioizotopy nebo účinnými toxiny. Protilátka pak funguje jako nosič dopravující účinnou látku do místa působení. Buněčně zprostředkovaná protinádorová terapie využívá zejména modifikované a stimulované T lymfocyty nebo imunoterapii dendritickými buňkami. Dendritické buňky (DC, dendritic cells) jsou nejúčinnější buňky, které mají schopnost předkládat antigen (APC). DC byly pojmenovány podle typické morfologie s množstvím výběžků, tzn. dendritů. Poprvé byla dendritická buňka popsána Ralphem Steinmanem v roce 1973. Za objev dendritických buněk a jejich roli v rámci získané imunity byla v roce 2011 udělena Nobelova cena. DC se vyvíjejí z prekurzorových buněk v kostní dřeni a v periferní krvi se vyskytují ve velmi malém množství. V 90. letech minulého století bylo zjištěno, že DC mohou být kultivovány z monocytů či kmenových hematopoetických buněk za přítomnosti různých cytokinů. To byl zásadní průlom, který umožnil studium dendritických buněk in vitro. DC jsou vyplavovány z kostní dřene v nezralém stavu. V tomto nezralém stavu jsou DC schopny fagocytovat různé antigenní částice (např. bakterie, viry, infikované buňky nebo buňky nádorové). Nezralá DC se mění na zralou (profesionální) procesem, který se nazývá maturace. Proces maturace se zahajuje ve chvíli, kdy DC rozpozná hrozící nebezpečí, nejčastěji se jedná o průnik infekčního agens do organismu. Proces maturace je typický tím, že DC ztratí schopnost fagocytózy a dochází k výraznému zvýšení exprese MHC molekul I. a II. třídy a dalších kostimulačních molekul. Zrající DC následně migruje do lymfatických uzlin, kde předkládá antigeny na svém povrchu nezralým (naivním) T lymfocytům. T lymfocyt se tímto aktivuje a vede k eliminaci patogenu. Dendritické buňky se staly předmětem intenzivního výzkumu pro schopnost indukce protinádorové imunitní odpovědi.

Dále viz. článek: Aktivní buněčná imunoterapie karcinomu ovaria pomocí dendritických buněk.

Aktivní buněčná imunoterapie karcinomu ovaria pomocí dendritických buněk

Čes. Gynek.
2012, 77, č. 3
s. 215-220

Active cellular immunotherapy of ovarian cancer using dendritic cells

Brtnický T.¹, Podrazil M.², Bartůňková J.², Špišek R.², Rob L.¹

¹Gynekologicko-porodnická klinika 2. LF UK a FN Motol, Praha, přednosta prof. MUDr. L. Rob, CSc.

²Ústav imunologie 2. lékařské fakulty UK a FN Motol, Praha, přednostka prof. MUDr. J. Bartůňková, DrSc.

ABSTRACT

Objective: Overview and comparison of current results of studies dealing with the development and application of anti-cancer vaccines based on dendritic cells in ovarian cancer.

Setting: Department of Obstetrics and Gynaecology Charles University, Prague, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Department of Immunology 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol.

Summary: Ovarian carcinoma (OVCA) is highly sensitive to chemotherapy; however despite this results from treatment are fairly unsatisfactory. Bearing this in mind, it is important to look for new ways to better understand the immunological mechanisms which could affect reactivation of the disease. It is likely that new knowledge in the field of the immunology of ovarian carcinoma could improve monitoring of the disease and help to ameliorate prognosis of the disease. One strategy in development is creation of anti-OVCA vaccines. These vaccines are made by the fusion of dendritic cell (DC) and tumor cells or its parts (NA, peptides). DC are bone-marrow derived leukocytes that are critical in the initiation of T cell mediated immunity. DC are fused to patient-derived ovarian carcinoma cells. The fusion cells induces cytotoxic T cell against autologous OVCA cells.

Key words: dendritic cells, anti-tumor vaccines, antitumor immunity, biological therapy, ovarian cancer.

SOUHRN

Cíl práce: Přehled asrovnání aktuálních výsledků studií zabývajících se vývojem a aplikací protinádorových vakcín na bázi dendritických buněk u ovariálního karcinomu.

Název sídlo pracoviště: Gynekologicko-porodnická klinika 2. LF UK a FN Motol, Ústav imunologie 2. LF UK a FN Motol, Praha.

Souhrn: I přes poměrně vysokou chemosenzitivitu jsou výsledky komplexní léčby pokročilých stadií ovariálních karcinomů neuspokojivé. To je i důvod hledání cest k lepšímu poznání imunologických mechanismů, které mohou ovlivňovat reaktivaci onemocnění. Je pravděpodobné, že nové poznatky v oblasti imunologie ovariálních karcinomů mohou zlepšovat monitorování onemocnění a pomáhat zlepšit prognózu onemocnění.

Jednou z možností je vývoj protinádorové buněčné imunoterapie ovariálního karcinomu. Principem tohoto přístupu je podávání dendritických buněk (DC), které prezentují nádorové antigeny a indukují specifickou protinádorovou imunitní odpověď. DC jsou neúčinnější antigen prezentující buňky, vyvíjejí se v kostní dřeni a hrají zásadní roli v zahájení T buněčné imunity. Aplikace dendritických buněk vede k indukci cytotoxických lymfocytů T, které specificky rozpoznávají nádorové buňky karcinomu ovaria.

Klíčová slova: dendritické buňky, protinádorová imunoterapie, protinádorová imunita, biologická terapie, ovariální karcinom.

ÚVOD

Incidence ovariálních zhoubných nádorů v České republice do roku 2004 stoupala a v roce 2004 dosáhla nejvyšší hodnoty 24,2 na 100 000 žen. Přestože stále dochází k prodlužování průměrného věku žen, incidence karcinomu ovaria má sestupný trend. Jeden z nejprav-

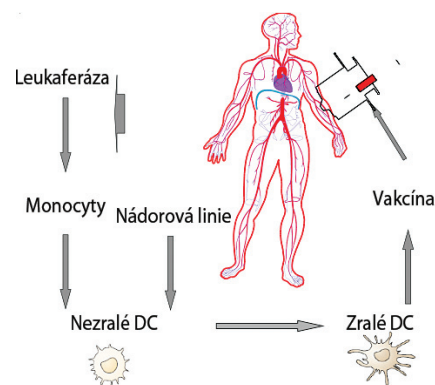
děpodobnějších důvodů tohoto jevu je masivní užívání hormonální antikoncepce. Mortalita je i přes pokles (za posledních 10 let poklesla asi o 10 %) stále vysoká hlavně proto, že většinu ovariálních nádorů (75–80 %) diagnostikujeme v pokročilých stadiích (III a IV). Ovariální zhoubné nádory jsou z gynekologických nádorů nejčastější příčinou smrti (v absolutních číslech). Jednou z nově diskutovaných léčebných možností nádoro-

vých onemocnění je aktivní buněčná imunoterapie, která spočívá v indukci imunitní reakce namířené proti populaci nádorových buněk. Jednou z možností jak indukovat imunitní odpověď proti antigenům nádorových buněk je podání dendritických buněk (DC), které prezentují nádorové antigeny T-lymfocytům. DC jsou klíčovými buňkami imunitní reakce, které stojí na rozhraní mezi nespecifickou a specifickou imunitou. Mají v tomto výjimečném postavení schopnost jednak rozpoznat antigeny a v dalším kroku proti těmto antigenům zahájit odpovídající imunitní odpověď. Podání dendritických buněk v terapii nádorových onemocnění bylo intenzivně sledováno na zvířecích modelech a nyní se dostává do stadia možného využití v humánní medicíně.

VYUŽITÍ DENDRITICKÝCH BUNĚK V IMUNOTERAPII NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Terapeutický účinek imunoterapie byl pozorován u mnoha pacientů např. s maligním melanomem, hematologickými malignitami či jinými solidními tumory [7, 22, 29, 31, 38, 43, 50]. Využití dendritických buněk v léčbě nádorových nemocí se zakládá na jejich schopnosti účinně aktivovat imunitní mechanismy [8, 12, 34, 39, 46].

Dendritické buňky jsou považovány za neúčinnější buňky předkládající antigen (APC) a jsou hlavním spojujícím článkem mezi antigenně nespecifickou a specifickou částí imunitního systému [2, 3, 13, 23, 40]. Ve většině tkání se DC vyskytují v tzv. nezralém stavu, kdy na svém povrchu nemají molekuly nezbytné pro aktivaci T-lymfocytů. Nezralé DC předávají organismu informaci o skladbě vnitřního prostředí a upozorňují včas na hrozící nebezpečí. Nezralé DC se vyskytují téměř ve všech periferních tkáních, a přicházejí tedy do kontaktu s antigenem brzy po jeho průniku do organismu. Pokud není v organismu přítomna infekce či jiný druh signálu nebezpečí, nezralé dendritické buňky pohlcují průběžně odumřelé buňky zdravých tkání a molekuly rozpuštěné v mezibuněčné tekutině následně migrují do lymfatických uzlin, pohlcené molekuly zpracují a vystaví je na svém povrchu [32]. Specifické lymfocyty T, které takový antigenní peptid rozpoznají, nejsou aktivovány, ale jsou buď zcela utlumeny, nebo se z nich vytvoří regulační lymfocyty T. Takto se nezralé dendritické buňky podílejí na zachování tolerance vůči vlastním tkáním [5, 41, 42]. Pokud však nezralé dendritické buňky rozpoznají podnět, který představuje pro organismus nebezpečí (nejčastěji jde o patogenní mikroorganismy, nekrotické, ale i maligně transformované buňky), aktivují se a stávají se z nich zralé dendritické buňky, které dokážou jako jediné aktivovat naivní T-lymfocyty [25, 26, 27]. Zralé DC se od nezralých liší expresí povrchových markerů i funkčními charakteristikami [19, 28]. Mezi funkční změny patří ztráta schopnosti fagocytovat, ale naopak se zvyšuje kapacita zpracování antigenu. Antigenní štěpy jsou pak vystaveny na povrchu spolu s molekulami MHC a předloženy lymfocytům T. Rozdíl ve složení povrchových



Obr. 1. Obecné schéma imunoterapie dendritickými buňkami je znázorněno na obrázku

vých molekul nezralých a zralých DC spočívá zejména ve vyšší expresi kostimulačních molekul na zralých DC, které zesilují signály zprostředkované dendritickou buňkou a zahajují aktivaci různých druhů lymfocytů T. Dochází také ke zvýšení exprese komplexů MHC molekul I. a II. třídy s antigeny. Během procesu zrání produkují DC řadu cytokinů, které modulují vznikající imunitní odpověď. Mezi nejdůležitější patří IL-1, IL-6, TNF a IL-12. V průběhu těchto změn se zralé DC přesouvají do lymfatických uzlin, kde se setkávají s lymfocyty specifickými pro vystavené antigeny. V následném kroku se rozvine odpovídající imunitní odpověď vůči vyvolávajícímu podnětu.

V případě některých onemocnění, zvláště nádorových, je však popsán fyziologický sled jednotlivých stupňů rozvoje imunitní odpovědi narušen, imunitní reakce proti nádoru jsou potlačeny, a dovoří tak rozvoj nádorového onemocnění. Základním principem imunoterapie na bázi dendritických buněk je využití klíčového postavení DC v rozvoji účinné imunitní reakce. V procesu výroby vakcíny jsou DC in vitro inkubovány s nádorovými antigeny, projdou výše popsaným procesem maturace a získají schopnosti navodit účinnou imunitní odpověď.

Zásadní pro využití DC buněk pro imunoterapii nádorových nemocí je jejich dostatečné množství k přípravě vakcíny [35]. Je známo, že DC tvoří v organismu jen velmi malé procento populace buněk. V laboratorních podmínkách jsou již k dispozici protokoly výroby dendritických buněk z autologních monocytů stimulovaných v přítomnosti cytokinů GM-CSF (Granulocyte-Monocyte-Colony Stimulating Factor) a IL-4 [36]. Existuje několik způsobů jak zajistit, aby DC prezentovaly nádorové antigeny. Patří k nim inkubace DC s peptidy, nádorovými lyzáty nebo tvorba hybridů dendritických a nádorových buněk. Všechny tyto postupy vedly k žádoucímu procesu maturace DC a k použití takto připravených DC v protinádorové imunoterapii (obr. 1).

PREKLINICKÉ STUDIE

Schopnost dendritických buněk účinně aktivovat imunitní systém deklaruje mnoho provedených in vitro stu-

dií [20, 49]. V těchto studiích bylo prokázáno, že DC jsou schopny indukovat antigen specifickou imunitní odpověď proti různým typům nádorů. Vieweg a kol. ve studii s dendritickými buňkami transferovanými mRNA kódující PSA popisují indukci PSA specifických odpovědí in vitro [15]. Palucka a kol. ve svých in vitro experimentech demonstrují schopnost dendritických buněk pohltit usmrcené nádorové buňky maligního melanomu, T-buněčného lymfomu linie Jurkat nebo karcinomu prostaty s následným navozením tumor specifických odpovědí [33]. Extrapolace in vitro experimentů s DC vakcínami do zvířecích modelů přinesla další důkazy o možnosti efektivity tohoto přístupu.

Studie na myších prokázaly, že DC vystavující nádorový antigen mohou vyvolat účinnou protinádorovou imunitní odpověď, a lze tak dosáhnout vyléčení již vzniklého nádoru nebo předejít jeho vzniku. Další důkazy o tom, že DC vakcíny mohou v praxi dobře fungovat, poskytly studie ukazující imunogenicitu antigenů vystavených na DC u pacientů s nádorovým onemocněním [10] nebo pacientů s chronickou HIV infekcí [24].

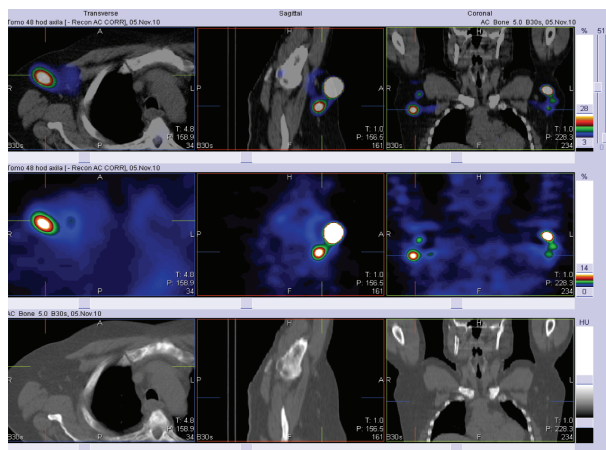
Nežádoucí účinky vakcín

Provedené studie s protinádorovými vakcínami typu pulzovaných dendritických buněk prokázaly na zvířecích modelech jejich bezpečnost a dobrou toleranci. Nebyly zaznamenány toxické účinky po jednorázovém nebo opakovaném podávání. Také nebyla prokázána karcinogenita, reprodukční toxicita nebo genotoxicita použitých vakcín. Nežádoucí účinky se limitovaly na lokální kožní reakce, které se ale nijak neodlišovaly od reakcí po běžných vakcínách [4, 9, 30, 44, 45].

ÚČINKY U ČLOVĚKA

Farmakokinetika a metabolismus léčiva u člověka

Studie na pacientech a zdravých dobrovolnících ukázaly, že zralé dendritické buňky migrují do lymfatických uzlin mnohem efektivněji než nezralé dendritické buňky [1]. Po intradermálním nebo subkutánním podání do lymfatických uzlin migruje přibližně 5 % injikovaných buněk [11]. Z pilotních studií se zdá, že v lymfatických uzlinách přežívají injikované dendritické buňky déle, než se původně předpokládalo, až několik dní. Počet dendritických buněk, které dosáhnou lymfatických uzlin, koreluje s mírou indukce antigen specifické imunity. Některé studie navrhují ošetření místa vpichu injekcí prozánětlivých cytokinů, např. TNF α , pro zvýšenou migraci [6]. Zvažována je také přímá injekce dendritických buněk do lymfatických uzlin pod sonografickou kontrolou, ale zatím není dostatek studií, které by dovolovaly plně zvážit přínos tohoto technicky velmi náročného postupu [48]. Studie z poslední doby prokázala víceméně stejnou schopnost indukce imunitní reakce, ať byly DC injikovány intradermálně, subkutánně (obr. 2) nebo intranodálně. Dendritické buňky, které nemigrují z místa vpichu do uzlin, jsou během 48 hodin fagocytovány okolními mak-



Obr. 2. Farmakokinetika DC byla detekována pomocí DC označených Indiem (111). Přípravená vakcína o objemu 1 ml (6 MBq) byla podávána subkutánně a bilaterálně do podpaží a tříselných oblastí. Vizualizace byla provedena s použitím scintigrafie a single photon emission computed tomography (SPECT) ve spojení s low-dose computed tomography (CT) obrazy. Účinnost značení byla 81%. Scintigrafické snímky z těchto oblastí byly provedeny za 1, 4, 24 a 48 hodin. Za 48 hodin bylo provedeno snímkování pomocí SPECT / low-dose CT zaměřené na místo aplikace. Pomocí zobrazovacích metod pro detekci DC migrace in vivo bylo prokázáno, že po aplikaci vakcíny dochází k migraci značených DC do regionálních lymfatických uzlin (Podrazil M.)

rofágy [47]. Naopak intravenózní podání se nejeví jako vhodné pro nízkou schopnost intravenózně podaných vakcín indukovat specifickou imunitní reakci [9].

Přehled in vitro a in vivo studií u člověka

DC pulzované peptidy

Brossart P. et al. [6] publikovali studii zabývající se indukci cytotoxické T-lymfocytární odpovědi in vivo po vakcinaci peptidy pulzovanými autologními dendritickými buňkami (DC). Do studie bylo zařazeno celkem 10 pacientek (7 pacientek s pokročilým karcinomem prsu a 3 pacientky s pokročilým ovariálním karcinomem). Pacientkám byly aplikovány DC vakcíny, které byly pulzovány buď s HER-2/neu nebo MUC1-derivovanými peptidy. DC vakcinace byla dobře tolerována, bez nežádoucích vedlejších efektů. U pěti z 10 pacientek byly detekovány peptid-specifické cytotoxické T-lymfocyty (CTLs). U jedné pacientky imunizované HER-2/neu peptidy byly zjištěny MUC1-specifické T-lymfocyty po aplikaci 7. vakcíny. Tento výsledek podporuje teorii „antigen spreading“ in vivo po aplikaci vakcíny s pouze jedním tumor antigenem. Závěry této studie potvrzují, že vakcinace DC pulzovanými pouze jedním tumor antigenem mohou indukovat imunologickou odpověď u pacientů jak s ovariálním karcinomem, tak s karcinomem prsu.

DC pulzované nukleovými kyselinami

V roce 2007 publikovali J. J. Hernando et al. v Lancet Oncology [17] kazuistiku 61leté ženy s diagnostikovaným pokročilým epitelálním karcinomem ovaria (stadium IIIC podle FIGO klasifikace). Šlo o ovariální tumor s peritoneálním rozsevem a elevovaným CA-125 nad 3000 U/ml. Vzhledem k inoperabilnímu nálezu se při-

stoupilo k podání neadjuvantní chemoterapie (v kombinaci platinový derivát + taxany). Poté proveden debulking s cytoredukcí, reziduální nemoc méně než 1 cm. Po adjuvantních 3 sériích chemoterapie poklesla hladina CA-125 pod 30 U/ml. Po 12 měsících následovala recidiva onemocnění. Následoval sekundární debulking bez makroskopického rezidua. Po 2. linii chemoterapie pokles CA-125 pod 20 U/ml. Za 4 měsíce následoval opět rychlý relaps onemocnění, elevace CA-125, metastázy v paraortálních a axilárních lymfatických uzlinách. Bulky axilární uzliny, které negativně ovlivňovaly běžnou denní činnost byly exstirpovány. Následovala vakcinace autologními DC pulzovanými mRNA (kódující folat-receptor typu alpha). Výroba vakcín zahrnovala reverzní transkripci plné délky FR- α -cDNA z total RNA z lidské ovariální nádorové linie. Zralé DC byly injikovány pod UZ kontrolou do nezvětšených inguinálních lymfatických uzlin. Celkem bylo aplikováno 10 vakcín po 4týdenních intervalech. Výsledky CT před vakcinací a po 3 měsících po vakcinaci ukázaly částečnou odpověď. Follow up CT po 16 měsících odhalilo více než 50% regresi metastáz v lymfatických uzlinách. Hladina CA-125 se prudce snížila za 4 týdny po první vakcinaci (z 640 U/ml na 60 U/ml) a udržovala se na baseline hladině. Takto rychlá a dlouhotrvající regrese a remise onemocnění po vakcinaci je pozoruhodná.

DC pulzované nádorovými buňkami

Pennsylvanská skupina [37] zařadila do své studie 10 pacientek s ovariálním karcinomem. Autologní DC byly pulzovány s usmrcenými autologními nádorovými buňkami. Vzniklé fúzané buňky byly kultivovány za přítomnosti tumor necrosis faktoru α + TRANCE (tumor necrosis factor-related activation-induced cytosine) za účelem indukce maturace. TRANCE a CD40 ligandy byly účinné na zrání DC. Buněčné linie T-lymfocytů vytvořené in vitro byly tumor-specifické pro MHC I. třídy. Výsledky této studie demonstrují skutečnost, že zralé DC buňky prezentující tumor antigeny získané z fagocytovaných autologních nádorových buněk mohou být použity k zesílení protinádorové imunity in vitro. Závěry této studie tedy podporují vhodnost terapeutického využití vakcín u pacientek s ovariálním karcinomem.

Harvardská studie [14] se zabývá fúzí nádorových buněk ovariálního karcinomu s autologními dendritickými buňkami. Vzniklá populace buněk heterokaryonů exprimovala antigen CA 125 a DC kostimulační a adhezivní molekuly. Podobné výsledky dosáhli fúzí nádorových buněk s alogenními DC. Fúzané buňky stimulovaly proliferaci autologních T-lymfocytů. Výsledky také ukázaly schopnost fúzaných buněk indukovat cytolytickou T-buněčnou aktivitu a lýzu autologních nádorových buněk.

V další Harvardské studii se v roce 2005 [21] zabývali hodnocením úspěšnosti fúze dendritických buněk (DC) a buněk ovariálního karcinomu (OVCA) a hodnotili schopnost těchto fúzaných buněk stimulovat protinádorovou imunitní odpověď. Nádorové a DC buňky byly izolovány od 22 pacientů s ovariálním karcinomem. V této studii se také zabývali dopadem radiace, zmraze-

ní a tání na fúzané buňky. Závěr studie byl následující: U všech 22 pacientů došlo k úspěšné fúzi nádorových buněk s autologními DC. Vytvořené heterokaryony exprimovaly nádorové antigeny (MUC1, CA 125 a DC odvozené MHC II. třídy a kostimulační molekuly). Fúzané buňky stimulovaly k proliferaci autologní lymfocyty T proti ovariálním nádorovým buňkám. Bylo také zjištěno, že radiace, zmrazení a tání má minimální dopad na stimulační efekt fúzaných buněk.

Německá skupina [16] do své studie zařadila 8 pacientek s pokročilým maligním gynekologickým nádorem (2 pacientky se sarkomem dělohy a 6 pacientek s ovariálním karcinomem). Pacientky obdržely 3 až 23 vakcín podaných intrakutánně. Šlo o vakcíny s DC pulzovanými autologními nádorovými antigeny. Vzorčky nádoru byly získány během primární operace a byly zpracovávány ihned po výkonu nebo zmrazeny na -80°C . Z nádorové masy byly získány lyzáty nádorových buněk. Pacientky obdržely vakcíny v 10denních až 4týdenních intervalech. Obě pacientky s diagnózou sarkomu dělohy a jedna pacientka s ovariálním karcinomem progredovaly a zemřely krátce po obdržení třetí, šesté a osmé vakcíny. U čtvrté pacientky byla zjištěna progresse onemocnění po 4. vakcíně a obdržela 3. linii chemoterapie. U páté pacientky došlo ke stabilizaci onemocnění (stable disease po dobu 45 týdnů). Poté následovala elevace hodnoty na 75 U/ml. MRI stagingem byly odhaleny lokální a vzdálené metastázy. Po cytoredukční reoperaci obdržela pacientka dalších 6 vakcín vytvořených z nádorových lyzátů z posledně excidovaného tumoru. Onemocnění bylo stabilizováno na dalších 23 týdnů. U šesté pacientky přetrvávala stabilizace onemocnění 25 týdnů, poté byla zjištěna elevace CA-125 a progresse onemocnění na CT. Pacientka podstoupila cytoredukční reoperaci. Pacientky 7 a 8 měly stabilizované onemocnění bez známek recidivy po dobu 14 resp. 27 týdnů. Pacientky byly po celou dobu imunizovány v pravidelných intervalech, další data nejsou k dispozici. Léčba byla bezpečná, dobře tolerovaná, imunologicky aktivní. Bez závažných nežádoucích účinků. U dvou pacientek se objevila mírná přechodná únava a subfebrilie, které nevyžadovaly žádnou léčbu. U jedné pacientky se objevilo mírné zvětšení lymfatické uzliny. Pět pacientek mělo lehkou kožní reakci ve formě erytému v místě aplikace vakcíny. U žádné z pacientek se neobjevila celková kožní reakce ve formě vyrážky nebo lymfadenopatie. U žádné z pacientek se nerozvinulo autoimunitní onemocnění.

Japonská studie [18] zkoumala skupinu 22 pacientů s odlišnými pokročilými stadii maligního onemocnění. Děvět z těchto 22 pacientů obdrželo kromě DC vakcín (DC/tumor-fusion vaccine) také rekombinantní lidský interleukin 12 (rhIL-12). Cílem studie bylo zjistit, zda vakcinace DC buňkami, které jsou fúzané příslušnými nádorovými buňkami, mohou kromě indukované protinádorové imunitní odpovědi vyvolat nežádoucí autoimunitní reakci. K monitoraci autoimunitní odpovědi sledovali hladiny antinukleárních protilátek (ANA) v séru pacientů. U tří pacientů byly hladiny ANA zvýšené více než třikrát po léčbě. Pacient 1 (karcinom žaludku) a pacient 2 (karcinom prsu) byli imunizováni pouze

DC/tumor-fusion vakcínami. Pacientka 3 (karcinom ovaria) obdržela DC/tumor-fusion vakcínu spolu s rhIL-12. U dalších 2 pacientů byla zjištěna elevace ANA méně než třikrát (pacient s karcinomem prsu a kolorektálním karcinomem). Pacientka 3 (ovariální karcinom) obdržela 4 série kombinované imunoterapie (DC/tumor-fusion vaccine + rhIL-12). Pokročilé onemocnění s mnohočetnými metastázami po peritoneu, v lymfatických uzlinách a v játrech bylo udržováno ve stabilizovaném stadiu (stable disease) po dobu 9 měsíců s přechodným snížením hladin CA-125 během imunizace. Pacientka nevykazovala žádné symptomy autoimunitního onemocnění během terapie. U nikoho z léčených pacientů se zvýšenými hladinami ANA nebyly zjištěny symptomy autoimunitního onemocnění. Pacienti se zvýšenými ANA měli signifikantně prodlouženou dobu vhodnou k podávání vakcín ve srovnání s pacienty bez elevace ANA. Zvýšené hladiny ANA po podání DC/tumor-fusion vakcín mohou být asociované se zvýšenou protinádorovou imunitní odpovědí indukovanou vakcinací.

DISKUSE

Buňky ovariálního karcinomu exprimují velké množství TAA (tumor-associated antigens) CA-125, HER2/neu a MUC1. Pulzace DC s tumor antigeny reprezentuje vhodnou a široce použitelnou strategii k vyvolání specifické imunitní odpovědi.

Podle výše uvedených studií se jeví aplikace DC vakcín jako bezpečná, proveditelná a klinicky velmi dobře tolerovaná léčebná modalita. Přesto se objevuje, jak ukazují klinické in vivo studie, mnoho nevyřešených otázek a problémů jak s přípravou, tak se samotným podáním DC vakcín. Je třeba optimalizovat klinické protokoly aplikace vakcín, vyhodnotit nejúčinnější zdroj antigenů z nádoru potřebných k pulzaci s DC buňkami – peptidy, proteiny, nukleové kyseliny nebo samotné nádorové buňky? Je třeba optimalizovat nejlepší cestu aplikace vakcíny do těla pacienta (intradermálně?, subkutánně?, intranodálně?). Ze závěru klinických studií však jednoznačně vyplývá, že hlavní zaměření DC vakcinace bude směřováno k pacientům s minimální reziduální nemocí nebo jako další adjuvantní léčebná modalita, neboť tito pacienti vykazují nejlepší léčebné výsledky.

Z uvedených studií také vyplývá, že aplikace DC vakcín neindukuje rozvoj autoimunitního onemocnění navzdory zjištění zvýšených hladin ANA protilátek v krvi pacientů. Tyto výsledky tak podporují tezi o snížení imunitní tolerance a s tím související posílení protinádorové imunity organismu, která však nevede k rozvoji autoimunitního onemocnění.

ZÁVĚR

V současné době se 75–80 % karcinomů ovarii diagnostikuje v pozdních stádiích, tj. ve stadiu III. a IV.

(FIGO klasifikace). Jako standardní léčba se v klinické praxi používá radikální operace a následně kombinovaná chemoterapie. U pozdních stadií (stadium III. a IV.) dnes dosáhneme ve více než 70 % případů kompletní klinické remise, ale do 2 let recidivuje z této skupiny více než 50 % žen. Klinické studie s inhibitory angiogeneze zatím prokazují prodloužení disease free intervalu (bezpříznakového období), ale nezlepšují zatím celkové přežití. Velmi zajímavá a atraktivní se jeví myšlenka individualizované péče o pacienty. DC vakcína vyrobená přímo „na míru“ pacientovi z jeho vlastních nádorových buněk získaných buď přímo z primárního nádoru při operaci, nebo např. z ascitu obsahujícího nádorové buňky. DC vakcíny mohou být úspěšnou léčebnou modalitou po intenzivní high-dose chemoterapii, hlavně ve smyslu eliminace reziduální nemoci. Reziduální nemoc je chápána jako klon chemorezistentních maligních buněk, které jsou nejčastější příčinou časně či pozdní recidivy onemocnění. Tyto chemorezistentní maligní buňky nejsou detekovatelné běžnými vyšetřovacími metodami. Biologická léčba ve formě DC vakcíny, která by natrvalo eliminovala tyto buňky popř. by je udržela pod kontrolou imunitního systému je revoluční a velmi slibnou cestou k moderní onkologické léčbě. DC vakcinace by se mohla stát účinnou konsolidační terapií nejen ovariálního karcinomu, ale mnoha dalších onkologických onemocnění.

LITERATURA

1. Adema, G.J., de Vries, I.J., Punt, C.J., Figdor, C.G. Migration of dendritic cell based cancer vaccines: in vivo veritas? *Curr Opin Immunol*, 2005, 17, p. 170–174.
2. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., et al. Immunobiology of dendritic cells. *An Rev Immunol*, 2000, 18, p. 767–811.
3. Banchereau, J., Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998, 392, p. 245–252.
4. Barrou, B., Benoit, G., Ouldacaci, M., et al. Vaccination of prostatectomized prostate cancer patients in biochemical relapse, with autologous dendritic cells pulsed with recombinant human PSA. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53, p. 453–460.
5. Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., et al. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med*, 2002, 196, p. 1627–1638.
6. Boullart, A.C., Aarntzen, E.H., Verdijs, P., et al. Maturation of monocyte-derived dendritic cells with Toll-like receptor 3 and 7/8 ligands combined with prostaglandin E2 results in high interleukin-12 production and cell migration. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57, p. 1589–1597.
7. Brossart, P., Wirths, S., Stuhler, G., et al. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood*, 2000, 96, p. 3102–3108.
8. Burgdorf, S.K., Fischer, A., Claesson, M.H., et al. Vaccination with melanoma lysate-pulsed dendritic cells, of patients with advanced colorectal carcinoma: report from a phase I study. *J Exp Clin Cancer Res*, 2006, 25, p. 201–206.
9. Curti, A., Tosi, P., Comoli, P., et al. Phase I/II clinical trial of sequential subcutaneous and intravenous delivery of dendritic cell vaccination for refractory multiple myeloma using patient-specific tumour idiotype protein or idiotype (VDJ)-derived class I-restricted peptides. *Br J Haematol*, 2007, 139, p. 415–424.
10. Davis, I.D., Jefford, M., Parente, P., Cebon, J. Rational approaches to human cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol*, 2003, 73, p. 3–29.

11. De Vries, IJ., Krooshoop, DJ., Scharenborg, NM., et al. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res*, 2003, 63, p. 12–17.
12. Dubsy, P., Hayden, H., Sachet, M., et al. Allogeneic tumor lysate can serve as both antigen source and protein supplementation for dendritic cell culture. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57, p. 859–870.
13. Fujii, S., Shimizu, K., Hemmi, H., Steinman, RM. Innate Valpha14(+) natural killer T cells mature dendritic cells, leading to strong adaptive immunity. *Immunol Rev*, 2007, 220, p. 183–198.
14. Gong, J., et al. Fusion of Human Ovarian Carcinoma Cells with Autologous of Allogenic Dendritic Cells Induce Antitumor Immunity, 2000, 165, p. 1705–1711.
15. Heiser, A., Dahm, P., Yancey, DR., et al. Human dendritic cells transfected with RNA encoding prostate-specific antigen stimulate prostate-specific CTL responses in vitro. *J Immunol*, 2000, 164, p. 5508–5514.
16. Hernando, JJ., et al. Vaccination with autologous tumor antigen-pulsed dendritic cells in advanced gynaecological malignancies: clinical and immunological evaluation of a phase I trial. *Cancer Immunol Immunother*, 2002, 51, p. 45–52.
17. Hernando, JJ., et al. Vaccination with dendritic cells transfected with mRNA-encoded folate-receptor- α for relapsed metastatic ovarian cancer. *Lancet Oncol*, 2007, 8, p. 451–454.
18. Homma, S., et al. Cancer immunotherapy using dendritic/tumor-fusion vaccine induces elevation of serum anti-nuclear antibody with better clinical responses. *Clin Exp Immunol*, 2006, 144, p. 41–47.
19. Inaba, K., Turley, S., Iyoda, T., et al. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med*, 2000, 191, p. 927–936.
20. Inaba, K., Young, JW., Steinman, RM. Direct activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells. *J Exp Med*, 1987, 166, p. 182–194.
21. Koido, S., et al. Assessment of fusion cells from patient-derived ovarian carcinoma cells and dendritic cells as a vaccine for clinical use. *Gynecol Oncol*, 2005, 99, p. 462–471.
22. Kugler, A., Stuhler, G., Walden, P., et al. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med*, 2000, 6, p. 332–336.
23. Liu, YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell*, 2001, 106, p. 259–262.
24. Lu, W., Arraes, LC., Ferreira, WT., Andrieu, JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med*, 2004, 10, p. 1359–1365.
25. Matzinger, P. An innate sense of danger. *Semin Immunol*, 1998, 10, p. 399–415.
26. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Ann Rev Immunol*, 1994, 12, p. 991–1045.
27. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997, 388, p. 394–397.
28. Mellman, I., Steinman, RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, 2001, 106, p. 255–258.
29. Murphy, GP., Tjoa, BA., Simmons, SJ., et al. Infusion of dendritic cells pulsed with HLA-A2-specific prostate-specific membrane antigen peptides: a phase II prostate cancer vaccine trial involving patients with hormone-refractory metastatic disease. *Prostate*, 1999, 38, p. 73–78.
30. Murphy, GP., Tjoa, BA., Simmons, SJ., et al. Phase II prostate cancer vaccine trial: report of a study involving 37 patients with disease recurrence following primary treatment. *Prostate*, 1999, 39, p. 54–59.
31. Nestle, FO., Aljagic, S., Gilliet, M., et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*, 1998, 4, p. 328–332.
32. Niess, JH., Brand, S., Gu, X., et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*, 2005, 307, p. 254–258.
33. Nouri-Shirazi, M., Banchereau, J., Bell, D., et al. Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses. *J Immunol*, 2000, 165, p. 3797–3803.
34. Palmer, DH., Midgley, RS., Mirza, N., et al. A phase II study of adoptive immunotherapy using dendritic cells pulsed with tumor lysate in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2009, 49, p. 124–132.
35. Romani, N., Reider, D., Heuer, M., et al. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods*, 1996, 196, p. 137–151.
36. Rozkova, D., Tiserova, H., Fucikova, J., et al. FOCUS on FOCIS: combined chemo-immunotherapy for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Clin Immunol*, 2009, 131, p. 1–10.
37. Schlienger, K., et al. TRANCE - and CD40 ligand-matured Dendritic Cells Reveal MHC Class I-restricted T Cells Specific for Autologous Tumor in Late-Stage Ovarian Cancer Patients. *Clin Cancer Res*, 2002, 9, p. 1517–1527.
38. Schuler-Thurner, B., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., et al. Mage-3 and influenza-matrix peptide-specific cytotoxic T cells are inducible in terminal stage HLA-A2.1+ melanoma patients by mature monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 2000, 165, p. 3492–3496.
39. Spisek, R., Chevallier, P., Morineau, N., et al. Induction of leukemia-specific cytotoxic response by cross-presentation of late-apoptotic leukemic blasts by autologous dendritic cells of nonleukemic origin. *Cancer Res*, 2002, 62, p. 2861–2868.
40. Steinman, RM., Cohn, ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, 1973, 137, p. 1142–1162.
41. Tarbell, KV., Yamazaki, S., Olson, K., et al. CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med*, 2004, 199, p. 1467–1477.
42. Tarbell, KV., Yamazaki, S., Steinman, RM. The interactions of dendritic cells with antigen-specific, regulatory T cells that suppress autoimmunity. *Semin Immunol*, 2006, 18, p. 93–102.
43. Thurner, B., Haendle, I., Roder, C., et al. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med*, 1999, 190, p. 1669–1678.
44. Tjoa, BA., Simmons, SJ., Bowes, VA., et al. Evaluation of phase I/II clinical trials in prostate cancer with dendritic cells and PSMA peptides. *Prostate*, 1998, 36, p. 39–44.
45. Tjoa, BA., Simmons, SJ., Elgamal, A., et al. Follow-up evaluation of a phase II prostate cancer vaccine trial. *Prostate*, 1999, 40, p. 125–129.
46. Tobiasova, Z., Pospisilova, D., Miller, AM., et al. In vitro assessment of dendritic cells pulsed with apoptotic tumor cells as a vaccine for ovarian cancer patients. *Clin Immunol*, 2007, 122, p. 18–27.
47. Verdijk, P., Aarntzen, EH., Lesterhuis, WJ., et al. Limited amounts of dendritic cells migrate into the T-cell area of lymph nodes but have high immune activating potential in melanoma patients. *Clin Cancer Res*, 2009, 15, p. 2531–2540.
48. Verdijk, P., Aarntzen, EH., Punt, CJ., et al. Maximizing dendritic cell migration in cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8, p. 865–874.
49. Young, JW., Steinman, RM. Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells. *J Exp Med*, 1990, 171, p. 1315–1332.
50. Yu, JS., Wheeler, CJ., Zeltzer, PM., et al. Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. *Cancer Res*, 2001, 61, p. 842–847.

MUDr. Tomáš Brtnický
Gynekologicko-porodnická klinika
2. LF UK a FN Motol
V Úvalu 84
150 00 Praha 5

2.4 Základní vlastnosti nádorových buněk

2.4.1 Nádorové antigeny.

Přítomnost nádorového antigenu je hlavním předpokladem rozvoje protinádorové imunitní reakce. Existují dvě kategorie nádorových antigenů, antigeny specifické pro nádory (TSA) a antigeny asociované s nádory (TAA). Antigeny specifické pro nádory jsou zejména proteiny, které se na normálních buňkách nevyskytují. Antigeny asociované s nádory nejsou specifické pouze pro nádorové buňky, ale nacházejí se i na normálních buňkách. TAA se ale mohou exprimovat v jiné kvantitě, mohou být atypicky umístěné apod. Do skupiny TAA patří onkofetální antigeny, pro které je typické, že se vykytují pouze embryonálně a v postnatálním období mizí. Do této skupiny patří např. α -fetoprotein (hepatomy), karcinoembryonální antigen (kolorektální karcinom) apod. Dalšími zástupci TAA jsou PSA antigen nebo antigen HER2/neu (receptor růstového faktoru epitelálních buněk, jeho overexprese je typická pro některé karcinomy prsu).

2.4.2 Autokrinní stimulace a schopnost neodpovídat na protirůstové signály

Maligně transformovaná buňka přestává odpovídat na produkci růstových faktorů od jiných buněk a naopak často produkuje velké množství růstových faktorů, na které sama reaguje. Některé nádorové buňky dokonce sekretují cytokiny a jiné působky inhibující imunitní odpověď, např. IL-10 a TGF- β inhibuje zrání DC nebo oxid dusnatý indukuje apoptózu DC [36].

2.4.3 Proliferace nádorových buněk

Během transformace normální buňky na buňku nádorovou dochází k různým mutacím, které vedou k "nesmrtenosti" buňky. Dobře prozkoumaná je mutace proteinu p53, jehož snížená nebo nulová exprese vede k nekontrolovanému dělení buněk.

2.4.4 Schopnost inhibice apoptózy

Nádorové buňky mají schopnost vyvíjet rezistenci k signálům spouštějícím apoptózu. Naopak některé nádorové buňky exprimují na svém povrchu FasL (Fas ligand - transmembránový protein vyskytující se na povrchu T lymfocytů). Pomocí tohoto ligandu mohou nádorové buňky indukovat apoptózu v protinádorových T lymfocytech.

2.4.5 Schopnost invazivního růstu a metastazování

Metastazování je nejčastější příčinou úmrtí při maligním onemocnění. Tvorba metastáz je podmíněna invazivitou nádorových buněk z primárního nádoru do okolní tkáně a následně do krevního nebo lymfatického řečiště. Únik nádorové buňky do krevního nebo lymfatického oběhu ale neznamená, že založí metastázu. Nádorová buňka musí být schopna v řečišti přežít a následně ho opustit, uchytit se a začít se dělit. Proces metastazování je několikastupňový a je označován jako metastatická kaskáda. Nádorové buňky mají schopnost inaktivovat nebo naopak aktivovat celou řadu proteinů, které jim umožní adherovat. Podobně využívají nádorové buňky proteolytické enzymy (např. katepsin), což jim umožňuje odpoutat se od primárního ložiska nádoru a založit metastázu.

2.5 Základní vlastnosti imunokompetentních buněk

2.5.1 Subpopulace dendritických buněk

Dendritické buňky (DC) jsou nejúčinnější buňky předkládající antigen. Představují hlavní spojující článek mezi antigenně nespecifickou a specifickou imunitou. Dendritické buňky se v krevním oběhu vyskytují jen v malém množství, nejvíce se nacházejí v tkáních, které tvoří rozhraní organismu s vnějším prostředím. Největší množství DC je v kůži, ve sliznicích dýchacího a zažívacího traktu. Rozlišují se dva druhy dendritických buněk: plazmacytoidní a myeloidní DC. Plazmacytoidní buňky se svým vzhledem podobají plazmatickým buňkám. Jejich hlavní úloha je obrana proti virovým infekcím. Vyznačují se expresí CD123 a přítomností receptoru pro IL-3 (IL-3 je důležitý růstový faktor plazmacytoidních DC) [83]. Myeloidní DC představují nejpočetnější skupinu DC, řadí se mezi ně intersticiální DC a Langerhansovy buňky epidermis. Intersticiální DC se nachází ve všech tkáních [90]. Jednotlivé subpopulace DC se liší různou výbavou a specializací v obraně proti různým infekcím.

2.5.2 Subpopulace T lymfocytů

T lymfocyty zajišťují antigenně specifickou buněčně zprostředkovanou imunitu. Aktivované (efektorové) T lymfocyty eliminují z organismu buňky infikované intracelulárními parazity, buňky mutované a nádorové. Hrají důležitou roli i v protilátkové imunitní reakci, při regulaci vývoje B lymfocytů v plasmocyty. Většina T lymfocytů se vyvíjí v thymu, kde se učí rozeznávat peptidy vázané v komplexu s MHC glykoproteiny. Podle typu TCR (T cell receptor) se rozdělují na typ $\alpha\beta$ nebo $\gamma\delta$. T lymfocyty, které exprimují TCR typu $\alpha\beta$ se dále dělí na CD8 (koreceptor pro MHC glykoproteiny I. třídy) a CD4 (koreceptor pro MHC

glykoproteiny II. třídy). CD8⁺ T buňky jsou prekurzory cytotoxických T lymfocytů (Tc) nebo paměťových buněk. Většina CD4⁺ T buněk jsou prekurzory pomocných T buněk (tzv. helperů - Th) [36]. Další subpopulací jsou T regulační lymfocyty (Treg). Regulační CD4⁺ T lymfocyty, někdy také označované jako tlumivé nebo supresorové (dále jen Treg) se vyznačují schopností potlačovat aktivity jiných efektorových T lymfocytů. V posledních letech bylo zjištěno, že mají schopnost potlačovat aktivity i antigenprezentujících buněk. Vyznačují se expresí transkripčního faktoru FoxP-3, která je pro vývoj těchto buněk nezbytná. Treg hrají klíčovou úlohu v regulaci tolerance k vlastním antigenům a předcházejí tak výskytu autoimunitních onemocnění [62]. V organismu existuje zřejmě několik různých druhů Treg buněk, nejvíce prozkoumané jsou tzv. "přirozené" regulační CD4⁺ T lymfocyty (nTreg, natural Treg) a tzv. indukované regulační T lymfocyty (iTreg). Přirozené Treg tvoří cca 1-5% krevních lymfocytů a vznikají v thymu. Jsou silně závislé na interlekinu-2 (IL-2), tím se podobají aktivovaným T lymfocytům (povrchová exprese podjednotky IL-2 receptoru CD25). Treg disponují několika mechanismy účinku. Prvním mechanismem je produkce tlumivých cytokinů (IL-10, TGF- β , IL-35). Druhým, pravděpodobně ještě účinnějším mechanismem je suprese jiných buněk (zejména aktivovaných lymfocytů a dendritických buněk) přímým kontaktem [36]. Treg mají schopnost přímého cytotoxického působení (obdobným mechanismem jako aktivované cytotoxické T lymfocyty - Tc). Je to schopnost sekrece perforinů a granzymů. Treg mohou tímto cytotoxickým mechanismem zabít efektorové T lymfocyty, zejména ty autoreaktivní, dále dendritické buňky i jiné antigen prezentující buňky (APC). Na experimentálních zvířatech bylo prokázáno, že odstranění Treg z organismu vede ke vzniku těžkých multiorgánových autoimunit [75]. Hlavní úlohou přirozených Treg je zabezpečovat periferní toleranci a bránit rozvoji autoimunitních onemocnění. Indukované Treg nevznikají v thymu, ale v periferních tkáních. Jejich úlohou je nejspíše tlumivý efekt na škodlivé imunopatologické reakce supresí imunitní reakce. Treg se podílejí také na kontrole protinádorové imunity ve smyslu její suprese a stávají se tak jednou z hlavních překážek protinádorové imunoterapie. U některých nádorů bylo zjištěno, že procento Treg buněk v periferní krvi koreluje s prognózou pacientů [16]. Monitorace množství cirkulujících Treg v krvi je možným prognostickým markerem vývoje onkologického onemocnění (viz. kap. 3.1, 5.1, 6.1).

2.6 Cílená léčba karcinomu ovaria

2.6.1 Úloha adekvátní chirurgické léčby

O důležitosti adekvátní cytoredukční chirurgické léčby pokročilých karcinomů ovaria není pochyb. Mechanizmů jakými maximálně cytoredukční chirurgické výkony prodlužují bezpříznakové období a přežití je několik. Velké nádorové masy mají poměrně chudé centrální krevní zásobení, které vede k hypoxickému prostředí uvnitř nádoru. Nádorové buňky v této oblasti nádoru vykazují menší růstový a mitotický potenciál a jsou tedy více rezistentní k chemoterapii [91]. Rovněž metody protinádorové imunoterapie vykazují při léčbě pokročilých stádií s velkým nádorovým reziduem mnohem menší účinnost. Solidní nádor je třeba chápat nejen jako shluk nádorových buněk, ale jako komplexní "ekosystém", který kromě vlastních nádorových buněk obsahuje krevní cévy, vazivové buňky a mezibuněčnou matrix. Uvnitř nádoru je specifické prostředí, většinou hypoxické, se zvýšenou hladinou toxických látek, které unikají z rozpadajících se nádorových buněk. V menším dobře perfundovaném nádorovém reziduu je růstový potenciál a mitotická aktivita zvýšená. Samotné chemoterapeutikum zde dosahuje vyšších koncentrací a s lepším cytostatickým efektem. Snahou o maximální nádorový debulking se rovněž snižuje pravděpodobnost vzniku chemorezistentních klonů nádorových buněk. Tyto chemorezistentní nádorové buňky vznikají výsledkem spontánních mutací. Počet mutací se zvyšuje s počtem reziduálních nádorových buněk [31]. Navíc žádné nebo minimální nádorové reziduum si pro nižší riziko recidivy vyžádá méně sérií chemoterapie a snižuje se tak pravděpodobnost indukce vzniku chemorezistentních nádorových buněk. Při operačním řešení ovariálního karcinomu se standardně provádí výkon na otevřeném bříše z dolní střední laparotomie, která se standardně prodlužuje nad pupek (např. k provedení omentektomie, paraaortální lymfadenektomie, deperitonealizaci bránice apod.). Po otevření dutiny břišní se odebírá ascites k cytologickému vyšetření, není-li přítomen je nutné doplnit lavage, přínosné je rovněž provedení bráničních stěrů. Standardní rozsah operace zahrnuje provedení hystererektomie s oboustrannou adnexektomií, debulking, omentektomie, apendektomie a pánevní a paraaortální lymfadenektomie. Debulking je široký pojem, který může obsahovat výkony jako jsou deperitonealizace pánve, resekční operace na střevech, deperitonealizace bránice, resekce sleziny atd.). Pro označení N0 je nutné získat během operace minimálně 10 lymfatických uzlin [71]. Sporné je provedení lymfadenektomie v případě, že není dosažen optimální debulking (tzn. přítomnost makroskopického rezidua). Převládá názor, že v případě nemožnosti dosáhnout R0 (bez makroskopického rezidua) je pro pacientku přínosem pouze odstranění zvětšených lymfatických uzlin (tzv. bulky uzlin) [43]. Optimální cytoredukce

včetně odstranění pánevních a paraaortálních uzlin má pro pacientku nejen silně pozitivní prognostický efekt, ale rovněž poskytuje plné informace pro histopatologické vyšetření, a tím pádem přesný staging onemocnění. Optimálním výsledkem cytoredukční operace je žádný makroskopický nádor. Pravděpodobnost provedení adekvátního operačního výkonu také zvyšuje dostupnost peroperačního bioptického vyšetření. Nejdůležitějším faktorem pro dosažení optimálního cytoredukčního výkonu však zůstává zkušený operátor s onkogynekologickou erudicí. Z výše jmenovaných důvodů by měly být pacientky se zhoubným nádorem ovaria centralizovány do onkogynekologických center. Pouze ty jsou schopny zajistit kvalifikované operátory, dostatečné technické vybavení a podporu zkušenými patologi. Onkogynekologická centra musí splňovat určitá kritéria a profitem pro pacientku je maximální šance na optimální a přitom bezpečný cytoredukční výkon. Určitou renesanci přináší návrat superradikálních primárních operačních výkonů (resekční operace na tlustém a tenkém střevě, suprakolická omentektomie, deperitonealizace pánve, močového měchýře a bránice apod.). Je to totiž jedna z cest, jak výrazně zlepšit výsledky léčby pokročilých karcinomů ovaria. Konzervativní operace lze v případě karcinomu ovaria provádět pouze v přísně indikovaných případech. V managementu onkogynekologického centra FN v Motole musí pacientka splňovat následující kritéria [43]: 1. žena v reprodukčním věku si přeje těhotenství, 2. intaktní pouzdro, 3. nádor je omezen na jedno ovarium a nebo obě ovaria, 4. nádor není na povrchu ovaria, 5. není přítomen ascites, 6. peroperační histopatologické vyšetření, 7. grade nádoru maximálně 2. Pokud pacientka splňuje tato kritéria je možné provést konzervativní operaci spočívající v jednostranné (event. oboustranné) adnexektomii, vizualizaci druhostranného ovaria (resekce nepostiženého ovaria není nutná, pouze v případě nejasného nálezu), omentektomii, apendektomii a pánevní a paraaortální lymfadenektomii. Konzervativní operace má význam i v případě oboustranného postižení ovárií s následnou oboustrannou adnexektomií, vzhledem k velkým možnostem reprodukční medicíny (dárcovství oocytu). Časná reoperace (restaging) je indikována při nedostatečně provedené primární operaci. Cílem časně reoperace je provést staging a provedení adekvátní cytoredukční operace před zahájením chemoterapie. Interval debulking surgery (IDS) se standardně provádí po dvou až čtyřech sériích neoadjuvantní chemoterapie. Smyslem operace je provést maximální debulking v případě, že během primární operace nebyl možný. Jedním z ukazatelů kvality onkogynekologického centra je malý počet pacientek operovaných v rámci IDS.

2.6.2 Konvenční chemoterapie

Historie chemoterapeutické léčby karcinomu ovaria v ČR je dobře mapována od 60. let minulého století. Pokročilá stadia karcinomu ovaria se léčila monoterapií cyklofosfamidem, léčebná odpověď byla kolem 30-40%. V 70. letech po přidání platinového derivátu se léčebná odpověď pohybovala kolem 75%. V 90. letech se stal standardní léčebným protokolem v celosvětovém měřítku dvojkombinace chemoterapeutik paklitaxel a platinový derivát. Léčebná odpověď se u této kombinace dosahuje v 85% [43]. Tato kombinace chemoterapeutik je používána dodnes. Diskutuje se ale o otázkách, kolik sérií chemoterapie u různých stádií podat, jak léčit recidivy, zda nepokračovat v monoterapii paklitaxelem apod. Závazné je doporučení Onkogynekologické sekce ČGPS ČLS JEP, České onkologické společnosti ČLS JEP a Společnosti radiační onkologie a biofyziky ČLS JEP, poslední z roku 2013 [99]. Časná stadia IA a IB (pN0), grade 1 lze při adekvátně provedené operaci ponechat bez adjuvantní léčby. Adjuvantní chemoterapeutická léčba je indikována u FIGO stádií IA a IB (pN0), grade 1 v případě, že byla provedena neadekvátní operace a v případě, že nelze provést restagingovou operaci. Dále stadia IIA, IIB; G1, G2 a stadia IC a IIC; G1 jsou indikována ke kombinované chemoterapii (paklitaxel/platinový derivát) a to v 3-6 cyklech. Další stadia (pozdní stadia a pacientky s vysokým rizikem) jsou indikovány ke kombinované chemoterapii (paklitaxel/platinový derivát) 6-9 cyklů. Individuální přístup je třeba využít v případě, kdy celkový stav pacientky nebo komorbiditů neumožňují podat kombinovanou nebo plně dávkovanou chemoterapii. Doporučená dávka chemoterapie je u paklitaxelu 135 mg/m² v 24 hodinové infuzi + cisplatina 75 mg/m² nebo paklitaxel 175 mg/m² v 3 hodinové infuzi + karboplatina 5-7,5 AUC) [43]. Neoadjuvantní chemoterapie (dále jen NAC) je indikována u stadia III a IV, kde není možné dosáhnout optimální cytoredukce během primární operace. Podmínkou podání NAC je performance status WHO 0, 1, 2 nebo Karnofsky 70-100%, celkový stav umožňující dodržet kurativní dávku chemoterapie a histologická nebo cytologická diagnóza ovariálního epiteliálního karcinomu [99]. Po třech, případně maximálně po čtyřech cyklech NAC následuje onkogynekologické zhodnocení efektu léčby a v případě, že dojde k regresi nádoru a je předpoklad dosažení optimálního cytoredukčního výkonu je indikováno IDS. Není-li indikováno IDS, pokračuje se v podání dalších tří až šesti cyklů chemoterapie. V případě provedení IDS a umožňuje-li to celkový stav pacientky, jsou podány další tři až šest cyklů chemoterapie. Ukončení léčby je indikováno v případě podání plánovaného počtu cyklů, při známkách progresu onemocnění při probíhající léčbě nebo při příznacích závažných toxických nežádoucích účinků léčby. V případě recidivy onemocnění je silným prognostickým faktorem doba od ukončení primární chemoterapie do následné

recidivy. Pacientky se rozdělují do třech skupin. První skupinou jsou pacientky s perzistencí léčby při chemoterapii nebo recidivou do 6 měsíců od ukončení léčby (tzv. časná recidiva nebo platina refrakterní /rezistentní/ onemocnění). Druhou skupinou jsou pacientky s recidivou onemocnění za 6-12 měsíců od ukončení léčby (tzv. intermediate group). Třetí skupinou jsou pacientky s recidivou po více jak 12 měsících od ukončení léčby (tzv. platina sensitivní onemocnění) [99].

2.6.3 Konsolidační (maintain – udržovací) léčba

Hledání vhodné konsolidační léčby u pacientek s karcinomem ovaria je dlouhodobým cílem mnoha onkologických pracovišť. Přes vysoké procento léčebných odpovědí, které střídají časně a pozdní recidivy, přináší dlouhodobé výsledky léčby pokročilých karcinomů ovaria zklamání. První pokusy o vhodnou konsolidační léčbu byly založeny nejčastěji na radioterapii nebo na prolongované cytostatické léčbě. Tyto postupy však byly pro vysokou toxicitu a nežádoucí účinky opuštěny, rovněž léčebné výsledky byly nepřesvědčivé. Zajímavou možností konsolidační terapie se zdá podávání nízkých (metronomických) dávek etoposidu nebo cyklofosfamidu. Bylo zjištěno, že nízké (metronomické) dávky etoposidu resp. cyklofosfamidu nemají přímý cytotoxický efekt na chemorezistentní nádorové buňky, ale z mnoha experimentálních studií byl zejména u cyklofosfamidu zjištěn pozitivní efekt této nízkodávkované léčby ve smyslu zastavení růstu nádoru, jeho regresi, příp. oddálení recidivy onemocnění (dále viz. kapitola 2.5.2). Konsolidační dávka etoposidu je v perorálním podání 50-100 mg/den 10-14 dnů se 14 denní pauzou, podávat dle tolerance a klinického nálezu 6 měsíců a déle. Cyklofosfamid lze podávat v dávce 2x 50mg p.o. po dobu 14 dnů, poté 10 dnů bez léčby, tento režim opakovat opět dle tolerance. Jako konsolidační léčbu lze využít inhibitory angiogeneze (více viz. kapitola 2.6.4). Z cytostatik přichází po léčbě paklitaxelem s platinou v úvahu inhibitory topoizomeráz, vzhledem k jejich rozdílnému mechanismu účinku [43]. Zajímavé jsou výsledky studie zabývající se užitím PARP inhibitoru olaparib v konsolidační terapii pacientek s HGSC, a to jak sporadicky vzniklých, tak BRCA 1/2 pozitivních (viz. kapitola 2.6.5). Nadějnou konsolidační terapií budoucnosti je imunoterapie. Velké pokroky se v posledních letech učinily ve vývoji vakcín obsahující aktivované dendritické buňky (viz. kapitola 2.3.5). Prozatím největším úspěchem imunoterapie jsou ale jednoznačně protilátky, které mají schopnost blokovat T-regulační lymfocyty. Důsledkem těchto blokujících protilátek je komplexní aktivace protinádorové imunitní odpovědi, která není T-regulačními lymfocyty tlumena. V minulém roce vzbudily velký ohlas výsledky studií

tzv. checkpoint inhibitorů, zejména anti-PD1 protilátky, u maligního melanomu a u nemalobuněčného karcinomu plic.

2.6.4 Inhibitory angiogeneze

Angiogeneze, resp. neovaskularizace se fyziologicky uplatňuje nejen při embryogenezi, ale i při hojení ran nebo ovulaci. Je zcela regulována humorálními faktory, které se nazývají angiogenní a antiangiogenní. Pokud není angiogeneze stimulována onkologickým onemocněním jsou výše zmíněné faktory v rovnováze [47]. Primární nádor nebo metastáza potřebuje ke svému růstu přívod kyslíku a živin. V případě, že nádor dosáhne určité velikosti (cca 100 μm , což je difuzní limit pro kyslík) není již dále schopen zásobovat buňky pouhou difúzí a přestane růst [23]. Nádorové buňky jsou vystavené hypoxii a následně dochází k deregulaci angiogenního procesu a k převaze angiogenních faktorů. Tyto změny vyústí v tzv. angiogenní přepnutí (angiogenní switch) a následně k vytváření nových cév pro rostoucí nádor [5]. Novotvořené cévy jsou nepravidelně až chaoticky uspořádané, často strukturálně defektní, vyskytují se defekty bazální membrány a chybí zde podpůrné svalové buňky. V důsledku těchto jevů dochází k nedostatečnému cévnímu zásobení nádoru, k častým nekrotickým nálezům nádorových buněk a následně k další stimulaci angiogeneze [47]. Bohužel také významně klesá průnik cytostatik do nádoru. Nejvýznamnějším angiogenním faktorem je vascular endothelial growth factor (dále jen VEGF). Tento angiogenní faktor stimuluje proliferaci a migraci endotelových buněk. Angiogenezi lze inhibovat použitím přirozených antagonistů angiogeneze nebo blokadou angiogenních faktorů. Nejvíce prostudovaná je metoda neutralizace ligandu VEGF humanizovanou monoklonální protilátkou bevacizumab (Avastin). Tato monoklonální protilátka se používá v kombinaci s chemoterapií. Známé jsou zatím 4 velké studie hodnotící bevacizumab v léčbě karcinomu ovaria. Dvě front-line studie GOG a ICON7 a dvě studie OCEANS a AURELIA hodnotící účinek bevacizumabu u rekurentního karcinomu ovaria citlivého resp. rezistentního k platině. Studie GOG (Gynecologic Oncology Group) byla zaměřena pouze na pacientky s pokročilým nádorem stádia III a IV. Studie ukázala, že užití bevacizumabu během chemoterapie paklitaxel/carboplatina a následně dalších 10 měsíců po skončení chemoterapie prodloužilo medián progression-free survival (dále jen PFS) o 4 měsíce [9]. Druhou studií je studie ICON7, kde byly zařazeny pacientky jak s časným, tak pokročilým stádiem. Do studie bylo zařazeno celkem 1528 pacientek z 11 zemí. V této studii bevacizumab prokázal ve skupině pacientek s vysokým rizikem (stádium III se suboptimální cytoredukcí, stádium IV a neoperované pacientky) prodloužení mediánu celkového přežití o 9,4 měsíce [68]. Preparát

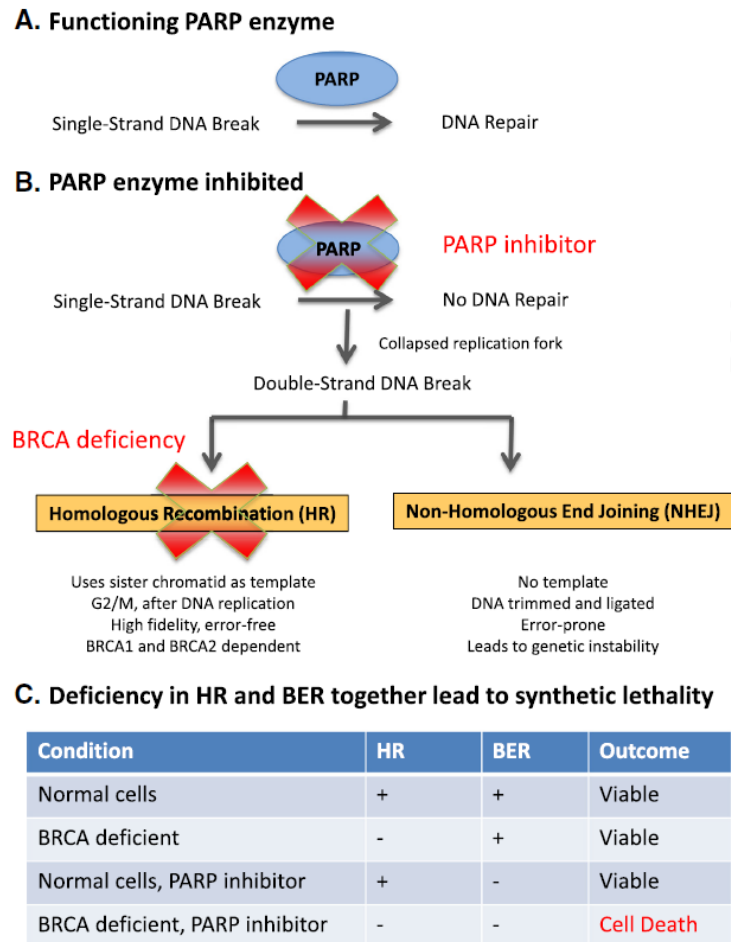
bevacizumab (Avastin) je v EU registrován od prosince 2011 a od 1. srpna 2014 je v ČR na základě studie ICON7 hrazen též pro primární léčbu pacientek s ovariálním karcinodem vysokého rizika.

2.6.5. PARP inhibitory

DNA v buňkách je neustále vystavovaná různým vlivům a působení různých faktorů, které jí mohou více nebo méně poškozovat. V lidském těle existuje několik opravných mechanismů, které jsou schopné opravovat vzniklá poškození. V poslední době se zaměřila pozornost na možné ovlivnění jednoho z důležitých mechanismů reparace DNA - PARP1 (poly(ADP-ribozo)polymeráza-1) enzym. Jedná se o důležitý (kritický) enzym buněčné proliferace a opravy DNA poškození. Tento enzym opravuje především tzv. jednovláknové zlomy (SSB – single-strand break) [89], a to opravou pomocí tzv. báze excizní reparace (BER). Velké naděje se vkládají do výzkumu léčiv označovaných jako PARP inhibitory. PARP inhibitory fungují nejlépe v kombinaci s cytostatickou léčbou, která navodí poškození DNA. Protinádorový efekt je posílen blokadou opravných mechanismů DNA PARP inhibitorem [88]. Normální buňky nereplikují svojí DNA tak často jako buňky nádorové a pokud v buňce není přítomna vrozená mutace BRCA1 nebo BRCA 2, tak má buňka plně zachovanou funkci homologní opravy (homologous recombination) dvoušroubovice DNA. Normální buňka inhibicí PARP1 enzymu toleruje a přežívá. Nosička mutace BRCA1 nebo BRCA2 se již rodí s jednou mutovanou alelou příslušného tumor supresorového genu, tzn. že je mutace v heterozygotní formě přítomna ve všech somatických buňkách. V případě inhibice PARP1 enzymu, pak dělicí se buňka nesoucí BRCA mutaci zmírá (viz. obr. č. 11). BRCA1 a BRCA2 deficitní buňky jsou velmi citlivé k inhibici PARP1 enzymu a léčebný potenciál u této skupiny pacientek se zdá obrovský. U léčby karcinomu prsu se zatím největší pokrok ve využití PARP inhibitoru zaznamenal s preparátem BSI-201 (Iniparib). V léčbě karcinomu ovaria existují zatím největší studie hodnotící PARP inhibitor Olaparib (Lynparza). V roce 2010 byly publikovány výsledky fáze 1 (hodnocena zejm. léčebná odpověď v závislosti na dávce a frekvenci podání) [2]. Další klinická studie fáze 2 publikována v roce 2011 hodnotila léčebnou odpověď u pacientek se sporadickým i BRCA pozit. karcinodem ovaria [27]. Jiná randomizovaná dvojitě zaslepená studie hodnotila Olaparib jako konsolidační terapii u pacientek jak se sporadickým HGSC, tak u pacientek s HGSC BRCA 1/2 pozitivní v období remise. Pacientky, které obdržely olaparib 400mg 2x denně měly PFS 8.4 měsíce versus pacientky užívající placebo PFS 4.8 měsíce [55]. Na základě výsledků provedených studií byl v prosinci 2014 schválen preparát Lynparza (olaparib) americkou FDA ke klinickému užití u

pacientek s pokročilým ovariálním karcinomem a s pozitivitou BRCA mutace (zdroj: U.S. Food and Drug Administration, FDA News Release, 19.12.2014, <http://www.fda.gov/>).

obr. č. 11



Walsh CS, Gynecol Oncol (2015) [94]
Pozn. HR - homologous recombination, BER - base excision repair

2.6.6 Perzonalizovaná medicína - nové postupy (GPK FN Motol)

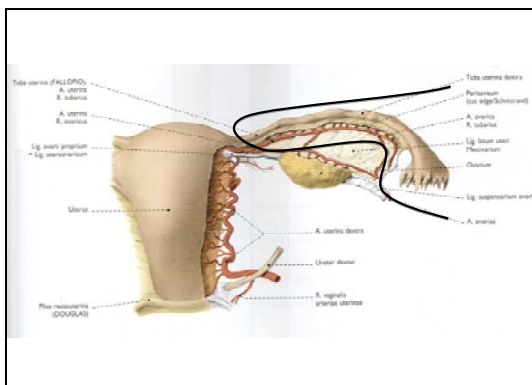
Nová etiopatogeneze serózního karcinomu ovaria (viz. kapitola 2.2) otevřela několik zásadních otázek jak u žen bez hereditárního rizika, ale i u žen s prokázaným hereditárním rizikem pro karcinomy ovarií. První je otázka profylaktické salpingektomie u premenopausálních žen, které podstupují odstranění dělohy. S tím i úzce souvisí změna v rozsahu výkonu sterilizací, kde dřívější výkony nahrazujeme salpingektomií jako bezpečnější alternativu různých sterilizačních výkonů na vejcovodech. Podobně i nová patogeneze tuboovariálních zhoubných nádorů přivádí k myšlenkám o změnách

v managementu dispenzarizace u žen s mutacemi BRCA1 a BRCA2. Cílem je redukovat riziko vzniku zhoubného karcinomu ovaria.

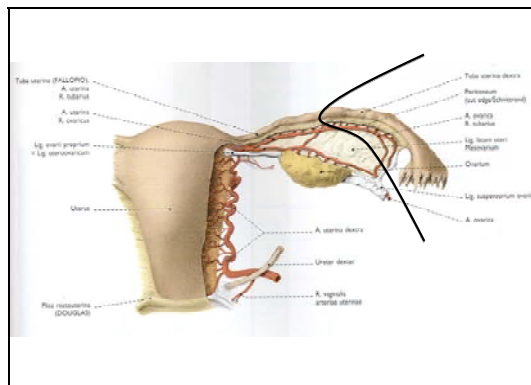
A) Ženy bez hereditárního rizika nad 40 let věku

V případě ženy nad 40 let věku, neplánující těhotenství a bez hereditárního rizika, která je indikována k hysterektomii z benigní indikace (např. děložní myomatóza, benigní cysta ovaria, menometrorrhagie apod.), je pro pacientku přínosné připojit oboustrannou salpingektomii (viz. obr. č. 12). Tento postup nabízíme klientkám od roku 2010 jako standard jak při abdominálních tak laparoskopických operacích u všech benigních nálezů.

obr. č. 12



obr. č. 13



Některé školy v USA přicházejí s teorií parciální resekce vejcovodu (odstranění fimbriálního konce tuby, viz. kapitola 2.2 Nová etiopatogeneze karcinomu ovaria) (viz. obr. č. 13). Sami v tomto postupu nevidíme zásadní přínos.

B) Ženy s indikovanou sterilizací

V současnosti poučujeme ženy, které plánují podstoupit indikovanou sterilizaci, že existuje alternativa, která i u žen bez hereditární zátěže potencionálně v budoucnu redukuje rizika ovariálních karcinomů. Proto též ženám nabízíme laparoskopické salpingektomie jako alternativu standardních postupů.

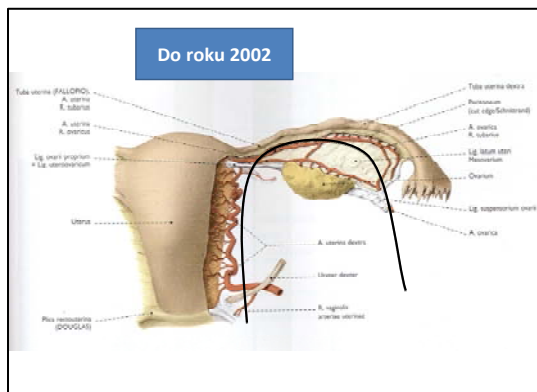
C) Ženy s hereditárním rizikem

U žen s hereditárním rizikem (BRCA1 nebo BRCA2 mutace) je situace složitější. Riziko vzniku HGSC v případě germinální mutace BRCA1 mutace se blíží 50% (40-65%) a průměrný věk diagnózy je mezi 49-53 lety věku. Riziko vzniku HGSC u BRCA2 mutace je

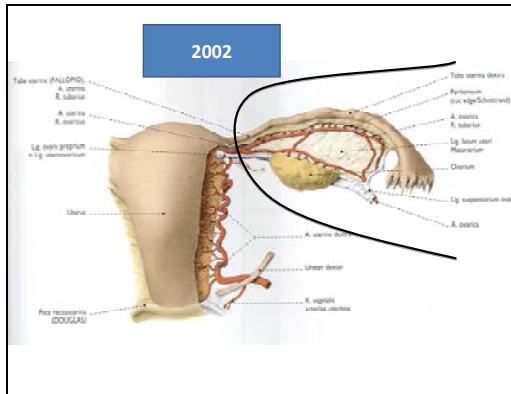
nižší, pohybuje se mezi 11-37% a průměrný věk zjištění diagnózy se pohybuje mezi 55-58 lety. Téměř všechny BRCA indukované nádory představují high-grade serózní karcinom [58]. Na základě těchto dat, sami doporučujeme pacientkám splnit svoje reprodukční plány do 35, lépe 30 let věku. V případě splnění reprodukčních plánů je diskutováno provedení profylaktické adnexektomie nebo námi doporučovaný alternativní postup provést v prvním kroku oboustrannou salpingektomií a ve druhém kroku (ve věku 40-45 let) oboustrannou ovariectomií vždy s hysterektomií. Pokud se žena rozhodne během svého života k provedení profylaktické adnexektomie doporučujeme i provedení hysterektomie. Indikací k hysterektomii opíráme o několik faktů. Tyto ženy jsou vystaveny i vyššímu riziku serózních papilárních karcinomů endometria a i karcinosarkomy mají vyšší riziko vzniku u nositelek BRCA mutací, případná substituce estrogeny je méně riziková než kombinace estrogen - progestagen.

Následující schémata dokumentují vývoj postupu v řešení pacientek s hereditárním rizikem karcinomu ovaria na Gynekologicko-porodnické klinice FN v Motole (viz. obr. č. 14-18)

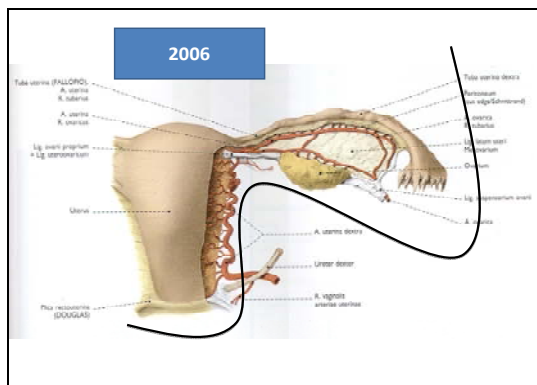
obr. č. 14



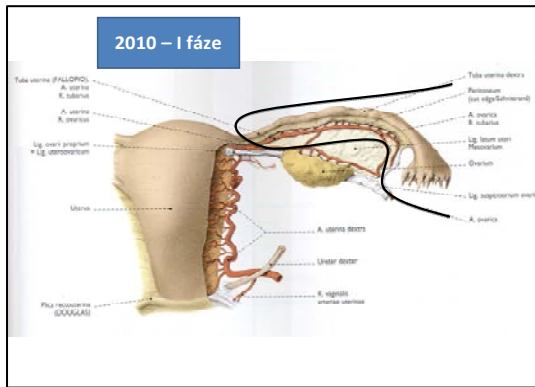
obr. č. 15



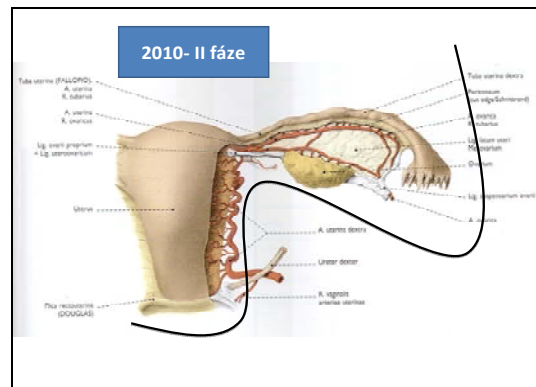
obr. č. 16



obr. č. 17



obr. č. 18



Tyto postupy jsou dnes široce diskutovány a v současnosti řada společností (onkogynekologové, kliniční onkologové, genetici) aktualizuje doporučené postupy.

3 Hypotézy a cíle práce

Problematika je rozdělena do třech oblastí:

3.1 Klinický význam monitorace T-regulačních lymfocytů v periferní krvi u pacientek s ovariálním karcinomem

Naší hypotézou bylo:

CD4+CD25+ T regulační lymfocyty (Treg) hrají klíčovou úlohu v regulaci tolerance k vlastním antigenům a předcházejí tak výskytu autoimunitních onemocnění [62]. U lidí představují Treg 5-10% z cirkulujících CD4+ T lymfocytů. Jsou definovány funkčně svou schopností potlačovat aktivaci a proliferaci CD4+ a CD8+ efektorových T lymfocytů. Treg se podílejí na kontrole imunitních reakcí při infekcích, u transpantační tolerance a protinádorové imunity. Bylo prokázáno, že počty Treg jsou vyšší u zvířat s nádorem [29]. U lidí byl zjištěn nárůst CD4+CD25+ T lymfocytů v krvi pacientů s nádory různého druhu: tlustého střeva [77], pankreatu a prsu [56], u melanomů [42], hepatocelulárního karcinomu [65], ovaria a karcinomu plic [95]. Procento Treg buněk v periferní krvi koreluje u většiny nádorů s prognózou pacientů [16, 77]. U ovariálních nádorů tato problematika šířeji nebyla studována, zejména ve smyslu využitelnosti Treg jako prognostického faktoru onemocnění. Recidiva onemocnění u pacientek po radikální operaci a primární chemoterapeutické léčbě vzniká z klonů chemorezistentních maligních buněk. Ze třech nezávislých studií v letech 2005 až 2007 vyplývá, že perorální podávání metronomických (nízkých) dávek cyklofosfamidu u pacientů s pokročilým nádorem způsobilo výraznou redukci cirkulujících T – regulačních lymfocytů [10, 11, 30]. Ve výše jmenovaných studiích perorální podávání metronomických (nízkých) dávek cyklofosfamidu u pacientů s pokročilým nádorem způsobilo hlubokou a selektivní redukci cirkulujících Treg, spojenou se zablokováním jejich inhibiční funkce proti konvenčním T buňkám a NK buňkám a vedoucí k obnovení periferní T buněčné proliferace a přirozené cytotoxicity. Cílem experimentální konsolidační léčby je tedy razantně snížit počet cirkulujících Treg buněk a tím teoreticky posílit přirozenou protinádorovou imunitu organismu proti přetrvávajícím chemorezistentním buňkám.

Jednotlivé úkoly řešené v průběhu experimentu:

Ověřit, zda množství T–regulačních lymfocytů v periferní krvi koreluje s prognózou pacientů u zhoubných nádorů ovarií. Zhodnotit klinickou využitelnost množství T–regulačních lymfocytů v periferní krvi jako další prognostický faktor vývoje onemocnění.

Porovnat účinek jednotlivých chemoterapeutik v metronomických dávkách (cyklofosfamid, etoposid) na množství T-regulačních lymfocytů. Porovnat účinek experimentální konsolidační léčby se skupinou kontrolní (bez konsolidační terapie).

Na základě výsledků vypracovat optimální postup pro monitorování léčených žen s karcinomy ovaria.

Na základě výsledků vyhodnotit potencionálně nejperspektivnější režim konsolidační terapie nízkými dávkami chemoterapeutika.

3.2 Dynamika imunitního infiltrátu v závislosti na stádiu ovariálního karcinomu.

Postupná změna imunitní reakce od efektorových Th17 lymfocytů k regulačním T lymfocytům

Naší hypotézou bylo:

Během progresu ovariálního karcinomu z časných do pokročilých stádií dochází k posílení imunitních mechanismů, které mají za důsledek oslabení protinádorové imunitní reakce.

Vyšetřením spontánní a stimulované sekrece specifických cytokinů a chemokinů v nádoru je možné určit, zda jsou nádorové buňky schopny tyto cytokiny a chemokiny samy produkovat a následně tím modifikovat imunitní mikroprostředí v nádoru.

T regulační lymfocyty se významnou měrou podílí na imunosupresivním mikroprostředí nádoru. T regulační lymfocyty vcestují do nádoru z periferní krve a nevznikají z naivních T lymfocytů v nádorové tkáni.

Jednotlivé úkoly řešené v průběhu experimentu:

Analýza imunitních buněk imunofluorescenční metodou (Th1, Th17, Tc, Treg, DC, makrofágy/monocyty).

Stanovení spontánní a stimulované sekrece cytokinů a chemokinů v nádoru.

3.3 Lidské nádorové buňky usmrcené antracykliny indukují tumor-specifickou imunitní odpověď

Naší hypotézou bylo:

Imunogenní smrt nádorové buňky je charakterizována časnou povrchovou expresí chaperonů zejm. calreticulinu a proteinů tepelného šoku (dále HSPs - heat shock proteins). Chaperony jsou speciální proteiny, které v buňce pomáhají skládat většinu bílkovin do jejich správného prostorového uspořádání, a tím těmto proteinům umožňují vykonávat jejich funkci v buňce. Calreticulin a HSPs mají významnou úlohu v dozrávání dendritických buněk, přijímání antigenů a prezentaci těchto antigenů na povrchu DC. Fyziologická smrt buňky procesem apoptózy je neimunogenním procesem, tzn. že po fagocytóze takto odumřelé buňky není vyvolaná imunitní odpověď. Imunogenní smrt buňky je naopak charakterizována schopností indukce specifické imunitní odpovědi. Usmrcená imunogenní nádorová buňka vystavuje na svém povrchu molekuly, které usnadňují dendritickým buňkám jejich identifikaci a následnou fagocytózu. Většina informací o vzniku imunogenních a neimunogenních nádorových buněk bylo získáno ze studií na myších modelech [32]. Cílem této studie bylo lépe prostudovat klinické využití různých cytostatik k indukci imunogenní smrti lidských nádorových buněk. Imunogenní schopnost nádorových buněk usmrcených cytostatiky byla porovnána s buňkami usmrcenými UVA zářením. Mezi testovaná cytostatika byl zařazen etoposide, gemcitabin, doxorubicin a idarubicin. Hlavními ukazateli imunogenní smrti nádorové buňky byl calreticulin, HSP70 a HSP90.

Jednotlivé úkoly řešené v průběhu experimentu:

Prokázat, zda je možné indukovat imunogenní smrt lidských nádorových buněk, tak jak bylo prokázáno na myším modelu.

Porovnat mechanizmus a letální efekt jednotlivých cytostatik v porovnání s UVA zářením na nádorové linie a primární nádorové buňky u akutní lymfoblastické leukemie, ovariálního karcinomu a karcinomu prostaty.

Porovnat efekt stimulace dendritických buněk pomocí usmrcených nádorových buněk cytostatiky a UVA zářením.

Porovnat počet indukovaných T-regulačních lymfocytů u DC pulzovaných s usmrcenými imunogenními a neimunogenními nádorovými buňkami.

4 Materiál a metodika

Materiál a metodika této dizertační práce je popsána v původních publikacích s impakt faktorem. V kapitole 5 jsou tyto publikace uvedeny v plnotextové formě.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Klinický význam monitorace T-regulačních lymfocytů v periferní krvi u pacientek s ovariálním karcinomem

Ve studii bylo potvrzeno, že pacientky v časném stádiu I a II podle FIGO klasifikace mají výbornou prognózu. Výrazný rozdíl v dalším průběhu onemocnění byl zjištěn mezi skupinami pacientek ve stadiu IIIC bez pooperačního nádorového rezidua a s reziduem. Pooperační reziduum bylo shledáno silným negativním prognostickým faktorem. Neshledali jsme žádný rozdíl v parametru PFS u pacientek s nádorovým reziduem, které užívaly konsolidační terapii ve srovnání s pacientkami bez konsolidační terapie. Pacientky ve stadiu IIIC s nádorovým reziduem měly recidivu do 36 měsíců po ukončení primární chemoterapie v 70% případů, a to bez ohledu, zda užívaly nebo neužívaly konsolidační terapii (skupina užívající cyklofosfamid vs etopozid vs kontrola). U pacientek s časnou recidivou onemocnění jsme zaznamenali rychlejší nárůst počtu Treg v periferní krvi. Kinetika zvyšování počtu Treg v periferní krvi se ukázala jako statisticky významný prediktor časného relapsu onemocnění. U pozdních recidiv neměla kinetika počtu v Treg v periferní krvi žádnou prediktivní hodnotu. Elevace Treg byla zjištěna u 100% pacientek s časným relapsem onemocnění, u 15% pacientek s pozdním relapsem a u 31% pacientek v remisi onemocnění. Podávání konsolidační terapie (metronomické dávky cyklofosfamidu nebo etoposidu) nevedlo k poklesu počtu Treg v periferní krvi. Na základě několika studií (viz. kapitola 3.1) bylo zjištěno, že metronomické dávky cyklofosfamidu u pacientů s pokročilým onkologickým onemocněním mohou indukovat selektivní pokles cirkulujících Treg. Nicméně na podkladě dalších studií bylo prokázáno, že konsolidační terapie cyklofosfamidem nejdříve snižuje počty Treg, ale následně se počet Treg opět zvyšuje na původní hodnoty [25, 26]. V naší studii jsme neprokázali statisticky významné snížení počtu Treg při užívání cyklofosfamidu resp. etoposidu v metronomických dávkách ani vliv na klinický průběh onemocnění. Jak již bylo zmíněno, zvýšené hodnoty Treg v periferní krvi jsou negativním prognostickým faktorem u různých typů zhoubných nádorů, včetně karcinomu ovaria [6, 16]. Ve studiích porovnávajících množství Treg v periferní krvi u pacientů s různými typy zhoubných nádorů se zdravými kontrolami, byly statisticky významné rozdíly zachyceny pouze u malobuněčného karcinomu plic a karcinomu prostaty [61, 96]. U ostatních zatím studovaných malignit byly výsledky mezi nemocnými a zdravými kontrolami rozporuplné až protichůdné. Několik studií prokázalo, že Treg mají schopnost inhibovat T buněčné odpovědi jak antigen-specifické, tak antigen nespecifické. Následkem toho je velmi pravděpodobné, že Treg snižují účinnost imunoterapeutických léčebných postupů [6, 17, 40]. Mechanismy způsobující elevaci Treg v

periferní krvi nejsou zcela objasněny. Existují však práce, které vysvětlují zvýšenou hladinu Treg produkcí tzv. tumor-derived faktorů (např. prostaglandin E2, TGF- β nebo různé typy chemokinů), které zvýšení Treg v krvi přímo indukují [49, 93]. Tuto hypotézu posiluje fakt, že u pacientů po resekci nádoru žaludku došlo k normalizaci množství Treg na normální hodnoty [51].



Contents lists available at ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/humimm

Clinical relevance of regulatory T cells monitoring in the peripheral blood of ovarian cancer patients



Tomáš Brtnický^{a,*}, Anna Fialová^b, Jan Laštovička^b, Lukáš Rob^a, Radek Špíšek^b

^a Department of Gynecology and Obstetrics, 2nd Medical School and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

^b Department of Immunology, 2nd Medical School and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 December 2013

Accepted 3 December 2014

Available online 13 December 2014

Keywords:

Ovarian cancer

Regulatory T cells

Metronomic chemotherapy

ABSTRACT

Background: Tregs play a suppressive role in the control of antitumour immunity. In this study we evaluated the relevance of prospective monitoring of peripheral blood regulatory T cells (Tregs) as a potential prognostic marker of future outcome of epithelial ovarian cancer in patients with or without a metronomic chemotherapy.

Methods: 46 patients diagnosed with the ovarian cancer were enrolled in the study and divided into groups according to the stage of the disease, outcome of the surgery and treatment received. Proportions of Tregs in the peripheral blood samples were evaluated using flow cytometry.

Results: We show that the early stage of the disease and absence of the tumor residuum after radical surgery are the most important factors predicting a favourable clinical outcome in the ovarian cancer. We did not show any significant effect of consolidation chemotherapy with metronomic doses of etoposide or cyclophosphamide on the peripheral blood Tregs and on the clinical outcome. The slope of the Tregs trend line was a significant predictor of an early relapse, even after controlling for stage and tumor residuum after the surgical debulking by using the Cox proportional hazard model.

Conclusions: This study shows that the faster kinetics of Tregs increase in the peripheral blood, expressed as the slope of the Tregs trend line, is a significant predictor of ovarian cancer early relapse hazard. However, due to its relatively low specificity, the informative value of regular monitoring of Tregs kinetics in the peripheral blood for the subsequent clinical outcome is limited.

© 2014 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Ovarian cancer is associated with the highest cancer-related mortality among gynecological cancers and is one of the ten most common malignancies in females worldwide (American Cancer Society, 2011) [1]. The 5 year survival rate irrespective of the stage is around 40%. The mortality remains high, despite the efforts for early diagnosis and modern therapeutic protocols. One of the reasons of these unsatisfactory results are the late diagnoses. 75–80% of ovarian carcinomas are presently found in the later stages – namely the third and fourth stages (FIGO classification).

Standard treatment employs the use of radical surgery and subsequent combined chemotherapy with platinum agents and

taxanes. Today in the late stages (III. a IV.) more than 70% of patients achieve complete clinical remission; however within 2 years more than 50% of women from this group suffer from relapses. In some series of malignant tumours multiple peripheral regulatory CD4+CD25+FoxP3+ T lymphocytes (Tregs) were found. Tregs play a suppressive role in the control of antitumour immunity.

In some tumours the percentage of Tregs cells in peripheral blood were found to correlate with the patients' prognosis [2,3]. Monitoring the amount circulating CD4+CD25+FoxP3+ T regulation lymphocytes in the blood might be a promising prognostic marker of disease development.

Presently it is still standard procedure to use 6–8 cycles of chemotherapy (as found for platinum derivation and paclitaxel). In adjuvant chemotherapy adding a third cytostatic agent did not improve treatment, as oppose to the advantages of intraperitoneal chemotherapy over intravenous. The new experimental procedure in consolidatory treatment dictates weekly extended usage of low paclitaxel dosages or peroral low etoposide dosages. Low (metronomic) dosages don't have a direct cytotoxic effect on

* Corresponding author at: Department of Gynecology and Obstetrics, 2nd Medical School, Charles University, V Úvalu 84, CZ-15006 Prague 5, Czech Republic. Fax: +420 224434220.

E-mail addresses: tomas.brtnicky@gmail.com (T. Brtnický), fialova@sotio.com (A. Fialová), jan.lastovicka@lfmotol.cuni.cz (J. Laštovička), lukas.rob@lfmotol.cuni.cz (L. Rob), radek.spisek@lfmotol.cuni.cz (R. Špíšek).

chemoresistant tumour cells but from many experimental animal studies cyclophosphamide was found to have a positive effect on this low doses treatment in stopping growing tumours and their regression – eventually removing disease relapse. The results from the studies are that peroral usage of low cyclophosphamide doses in the patients with advanced tumour caused deep and selective reduction of circulating regulatory CD4+CD25+ T cells [4–6].

The aim of this study was to evaluate the relevance of regular Tregs monitoring for the clinical management of ovarian cancer. Evaluate the clinical relevance of peripheral blood Tregs as a prognostic marker of future disease outcome. We also wanted to compare the effect of metronomic cyclophosphamide and etoposide during consolidation therapy on peripheral blood Tregs numbers, Ca125 and progression-free survival (PFS).

2. Material and methods

2.1. Patients characteristics

46 patients diagnosed with the ovarian cancer were enrolled in the study and divided into groups according to the stage of the disease, outcome of the surgery and treatment received: 7 patients with early stage ovarian cancer (Controls III), 9 patients at stage IIIC with zero residuum after the radical surgery (Controls II), 11 patients at stage IIIC with residuum after the surgery and no consolidation therapy (Controls I), 11 patients with stage IIIC ovarian cancer with residuum treated by etoposide as consolidation therapy (Etoposide group) and 8 patients with stage IIIC ovarian cancer treated by cyclophosphamide during the consolidation therapy (CFM group). Patients underwent radical surgery followed by 6–8 cycles of the first line chemotherapy (platinum compound in combination with taxanes). Twelve blood samples were collected at specific timepoints and used for the monitoring of Ca125 levels and frequency of Tregs in the peripheral blood. Schedule of the blood sampling and the study design is shown on Fig. 1. None of the patients enrolled in the study had received neoadjuvant chemotherapy prior to the surgery. Blood samples were collected with patient consent, and the study was approved by the Institutional Review Board of the University Hospital Motol (Table 1).

2.2. Identification of regulatory T cells

Regulatory T cells (Tregs) were identified by surface staining with anti-CD3 (Exbio), anti-CD4 (eBioscience), anti-CD8 (Exbio), anti-CD25, anti-CD127 and anti-CCR4 (BioLegend) antibodies followed by fixation and permeabilization with a Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience) and intracellular staining with anti-FoxP3 (eBioscience) antibody. Samples were analyzed on a BD FACSAria (BD Biosciences) using FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR). To calculate the slope of the Treg trend line for each patient, the Treg values obtained during each time point were graphed on an x, y dot plot and a regression line was drawn to fit the values using Statistica® 10.0 software (StatSoft, Tulsa, OK). The slope of the regression line represents the slope of the Treg trend line.

2.3. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Statistica® 10.0 software. The parametric assumptions of the data were verified using the Kolmogorov–Smirnov test for normality. The homogeneity of variances was tested by the Levene test. Correlations between investigated parameters were evaluated using the Pearson r coefficient. The remaining data were analyzed using an ANOVA followed by a Scheffé test. Additionally, the Cox proportional hazard model was done to assess the prognostic value of the stage of the disease, presence of tumor residuum after surgical debulking, levels of Ca125 and slope of the Tregs trend line for disease-free survival. The results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

Progression free survival (PFS) of the five groups of patients showed an excellent prognosis of patients with stage I/II of the disease and very good outcome in stage IIIC patients with no residual tumor after first surgery. There was no difference in the PFS of patients with residual tumor after surgery, irrespective of the consolidation therapy received (Fig. 2). In all three groups of stage IIIC patients with tumor residuum after surgery (no consolidation therapy, cyclophosphamide or etoposide treatment), 70% of patients relapsed within 36 months. Similarly there were no significant differences in the distribution of patients with early or late relapses between these three groups (Fig. 3).

Patients with the late relapse of the ovarian cancer (>12 months after the end of the first line chemotherapy) had significantly higher serum Ca125 levels at B8 timepoint ($p < 0.01$). Patients with the early relapse had significantly higher Ca125 starting from B6 timepoint ($p < 0.01$) (Fig. 4).

Patients with the early relapse had significantly faster kinetics of the rise of Tregs in the peripheral blood, which translated into the higher slope of Tregs trend line (Fig. 5A). The slope of the Tregs trend line was a significant predictor of an early relapse ($p = 0.02$), even after controlling for stage and tumor residuum after the surgical debulking by using the Cox proportional hazard model. The slope of Tregs trend line does not have any predictive value for late relapses. A rising slope of the Tregs trend line was observed in 100% of patients with an early relapse, 15.38% of patients with the late relapse and 31.82% of patients in remission.

Administration of consolidation therapy does not lead to the decrease of Tregs in the peripheral blood.

4. Discussion

Standard treatment of ovarian cancer consists of radical/cytoreductive surgery and subsequent combined chemotherapy with platinum-based agents in combination with taxanes. Despite the high primary response, the majority of stage III and IV patients experience relapse which is ultimately fatal. The three major prognostic factors of ovarian cancer outcome are stage at diagnosis,

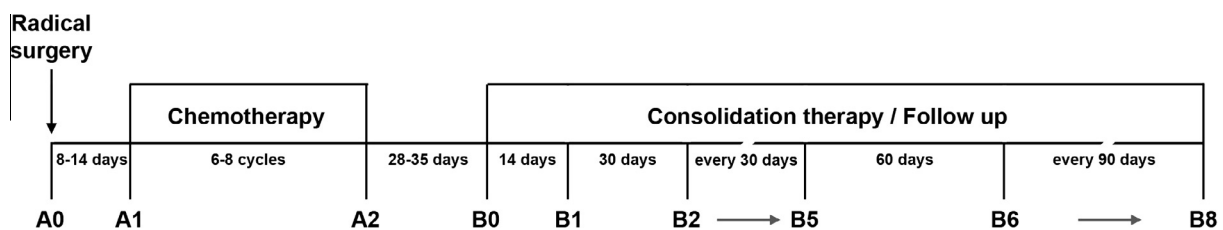


Fig. 1. Schedule of the therapy and blood sampling during the study.

Table 1
Characteristics of the patients in the study.

	Age	FIGO stage	Tumor residuum	Histological subtype	Differentiation	Interval debulking surgery	Clinical outcome	Consolidation therapy
1	51	IIIC	Yes	Serous	Poor	No	Relapse	CFA
2	49	IIIC	Yes	Endometrioid	Moderate	No	Relapse	CFA
3	58	IIIC	Yes	Other	Poor	No	Relapse	CFA
4	37	IIIC	Yes	Other	Poor	No	Relapse	CFA
5	58	IIIC	Yes	Serous	Poor	No	Relapse	CFA
6	76	IIIC	Yes	Serous	well	No	Remission	CFA
7	59	IIIC	Yes	Other	Poor	No	Relapse	CFA
8	63	IIIC	Yes	Serous	Poor	No	Remission	CFA
9	62	IIIC	Yes	Serous	Poor	Yes – residuum+	Relapse	Etoposide
10	39	IV	Yes	Serous	Moderate	No	Relapse	Etoposide
11	62	IIIC	Yes	Serous	Moderate	No	Relapse	Etoposide
12	66	IIIC	Yes	Serous	Poor	No	Relapse	Etoposide
13	39	IIIC	Yes	Serous	Moderate	No	Remission	Etoposide
14	68	IIIC	Yes	Serous	Moderate	Yes – residuum +	Relapse	Etoposide
15	50	IIIC	Yes	Serous	Moderate	No	Relapse	Etoposide
16	78	IIIC	Yes	Serous	Poor	No	Relapse	Etoposide
17	48	IIIC	Yes	Serous	Moderate	No	Remission	Etoposide
18	64	IIIC	Yes	Serous	Poor	No	Relapse	Etoposide
19	41	IIIC	Yes	Serous	Moderate	No	Remission	Etoposide
20	50	IIIC	Yes	Other	Poor	Yes – residuum 0	Relapse	Controls I
21	52	IIIC	Yes	Serous	Poor	No	Relapse	Controls I
22	63	IIIC	Yes	Mucinous	Poor	No	Remission	Controls I
23	63	IIIC	Yes	Serous	Moderate	No	Relapse	Controls I
24	46	IIIC	Yes	Serous	Poor	No	Relapse	Controls I
25	50	IIIC	Yes	Serous	Poor	No	Remission	Controls I
26	43	IIIC	Yes	Serous	Moderate	Yes – residuum 0	Remission	Controls I
27	64	IIIC	Yes	Other	Poor	No	Relapse	Controls I
28	62	IIIC	Yes	Serous	Poor	Yes – residuum 0	Remission	Controls I
29	63	IIIC	Yes	Serous	Poor	Yes – residuum 0	Relapse	Controls I
30	49	IIIC	Yes	Mucinous	Poor	Yes – residuum +	Relapse	Controls I
31	65	IIIC	No	Mucinous	Poor	No	Relapse	Controls II
32	45	IIIC	No	Serous	Poor	No	Remission	Controls II
33	61	IIIC	No	Other	Poor	No	Remission	Controls II
34	41	IIIC	No	Serous	Poor	No	Remission	Controls II
35	58	IIIC	No	Serous	Poor	No	Remission	Controls II
36	34	IIIC	No	Serous	Moderate	No	Remission	Controls II
37	42	IIIC	No	Other	Poor	No	Remission	Controls II
38	72	IIIC	No	Serous	Moderate	No	Remission	Controls II
39	51	IIIC	No	Other	Poor	No	Remission	Controls II
40	62	IB	No	Mucinous	Poor	No	Remission	Controls III
41	56	IC	No	Mucinous	Moderate	No	Remission	Controls III
42	60	IC	No	Clear cell	GX	No	Remission	Controls III
43	68	IC	No	Clear cell	GX	No	Remission	Controls III
44	49	IC	No	Clear cell	GX	No	Remission	Controls III
45	42	IC	No	Endometrioid	Moderate	No	Remission	Controls III
46	48	IC	No	Endometrioid	Moderate	No	Remission	Controls III

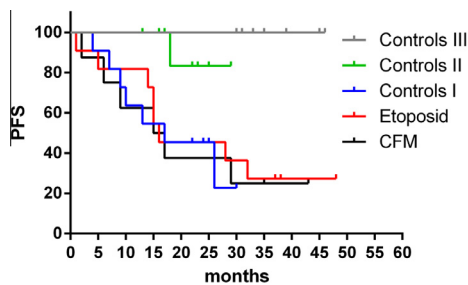


Fig. 2. Progression free survival (PFS) is predicted by the stage of ovarian cancer and the presence of residual tumor after the first surgery, but not by the consolidation therapy. Controls I represent patients with residual tumor after surgery, Controls II represent patients with no residual tumor after first surgery and Controls III represent stage I/II patients.

presence of tumor residuum following cytoreductive surgery and performance status [7].

Since only 20% of late stage patients are cured using the standard therapy protocols, a novel therapy that reduces the risk of relapse is needed. Metronomic chemotherapy is a relatively new strategy of administration of cytotoxic drugs, which were shown

to have anti-angiogenic properties if administered frequently and at lower doses compared to schedules based on maximal tolerated doses (MTD). Promising results of metronomic chemotherapy were achieved in breast and prostate cancer patients; however, a true metronomic schedule was only tested in very few randomized trials [8]. Previous studies showed that low, metronomic doses of cyclophosphamide in advanced cancer patients could induce, in addition to the anti-angiogenic effect, a selective decrease of circulating Tregs favoring a better control of tumor progression [4–6]. On the contrary, Ge et al. reported that although metronomic doses of cyclophosphamide initially reduced Treg numbers in the peripheral blood, the Treg levels completely recovered during the treatment due to increased proliferative activity and maintained their suppressive capacity [9,10]. In our study, we did not show any statistically significant effect of consolidation chemotherapy with metronomic doses of etoposid or cyclophosphamide on the slope of the peripheral blood Tregs trend line and on the clinical outcome.

It was reported that the presence of high levels of Tregs in the tumor tissue was a negative prognostic marker of overall survival in a wide spectrum of tumors including ovarian cancer [2,11]. Data comparing Tregs levels in peripheral blood mononuclear cells

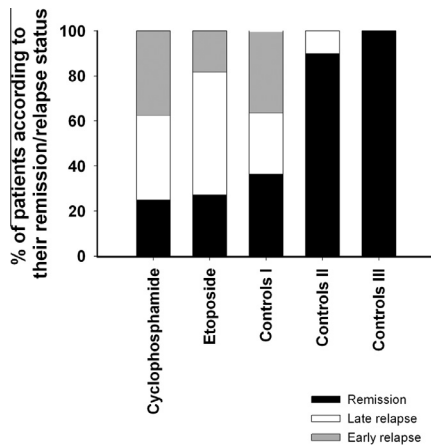


Fig. 3. Proportions of the early and late relapses of the ovarian cancer depend on the stage of the disease and the presence of the residual tumor after the first surgery, but not on the consolidation therapy received. Controls I represent patients with residual tumor after surgery, Controls II represent patients with no residual tumor after first surgery and Controls III represent stage I/II patients. Data are expressed as the proportions of patients in remission, patients with the late relapse (>12 months after the end of the first line chemotherapy) and patients with the early relapse (<12 months after the end of the first line chemotherapy).

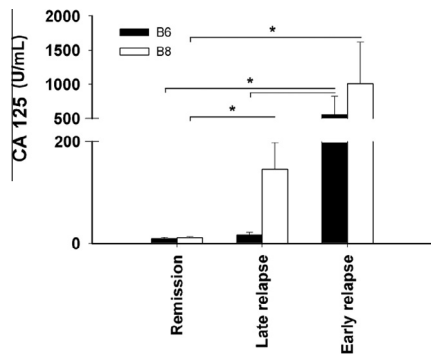


Fig. 4. Patients with an ovarian cancer relapse have significantly higher serum Ca125 levels. Late relapse: >12 months after the end of the first line chemotherapy; Early relapse: <12 months after the end of the first line chemotherapy. Data are expressed as the mean Ca125 level + S.E.M. * $p < 0.05$ (ANOVA followed by Scheffé test).

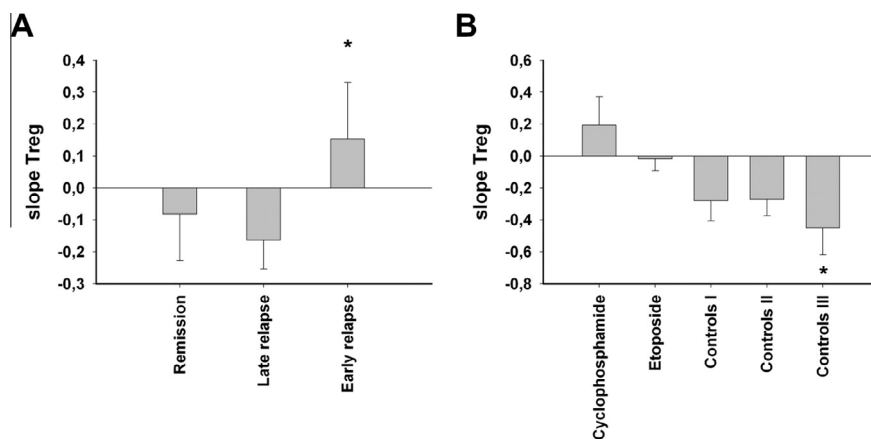


Fig. 5. Proportions of Tregs in the peripheral blood were increasing during the follow up in the ovarian cancer patients with the early relapse (<12 months after the end of the first line chemotherapy). (A) Consolidation therapy has no significant effect on Tregs kinetics. (B) Controls I represent patients with residual tumor after surgery, Controls II represent patients with no residual tumor after first surgery and Controls III represent stage I/II patients. Data are expressed as the mean slope of the Tregs trend line + S.E.M. * $p < 0.05$ (ANOVA followed by Scheffé test).

(PBMC) of cancer patients and healthy donors are contradictory; however, it was shown that patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and prostate cancer [12,13] had elevated levels of Tregs in the peripheral blood compared to healthy controls. In myeloma patients, it has been reported that increased frequencies of Tregs in the peripheral blood predicted shorter time to progression [14] and were associated with poor survival; however, similar data are missing in solid cancers.

Several studies indicated that Tregs were able to inhibit both antigen-specific and nonspecific T cell responses [15,16] and consequently could reduce the efficacy of immunotherapeutic protocols [11,17,18]. In our study, we have shown that patients with the early relapse of ovarian cancer have significantly faster kinetics of the rise of Tregs in the peripheral blood, which translates into the higher slope of the Tregs trend line (Fig. 5A). Additionally, the slope of the Tregs trend line was a significant predictor of an early relapse, even after controlling for stage and surgical debulking. Despite the statistical significance, the increased slope of Tregs trend line was not specific for the patients who experienced an early relapse. In particular, 100% of patients with an early relapse had a rising slope of the Tregs trend line. However, 15.38% of patients with the late relapse and 31.82% of patients in remission also showed an increased Tregs kinetics.

The mechanism of the increase of Tregs proportions in the peripheral blood still remains unknown. It was suggested that tumor-derived factors, such as prostaglandin E_2 , TGF β or chemokines, directly induce the enhancement of Tregs levels in the peripheral blood [19,20]. The resection of gastric tumors restored peripheral Tregs to normal levels, confirming this hypothesis [21].

In summary, our study confirms that the early stage of the disease and absence of the tumor residuum after radical surgery are the most important factors predicting a favourable clinical outcome in the ovarian cancer. We did not show any significant effect of consolidation chemotherapy with metronomic doses of etoposide or cyclophosphamide on the peripheral blood Tregs and on the clinical outcome. For the first time, this study shows that the faster kinetics of Tregs increase in the peripheral blood, expressed as the slope of the Tregs trend line, is a significant predictor of ovarian cancer early relapse hazard. However, due to its relatively low specificity, the informative value of regular monitoring of Tregs kinetics in the peripheral blood for the subsequent clinical outcome is limited.

List of abbreviations

Tregs, regulatory T cells; PFS, progression-free survival; PBMC, peripheral blood mononuclear cells.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Charles University GAUK 63310/2010 and grant IGA NT12402-5 from the Czech Ministry of Health.

References

- [1] Hilpert F, du Bois A, Greimel ER, et al. Feasibility, toxicity and quality of life of first-line chemotherapy with platinum/paclitaxel in elderly patients aged ≥ 70 years with advanced ovarian cancer – a study by the AGO OVAR, Germany. *Ann Oncol* 2007;18:282–7.
- [2] Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10:942–9.
- [3] Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 2003;98:1089–99.
- [4] Bocci G, Tuccori M, Emmenegger U, et al. Cyclophosphamide–methotrexate ‘metronomic’ chemotherapy for the palliative treatment of metastatic breast cancer. A comparative pharmacoeconomic evaluation. *Ann Oncol* 2005;16:1243–52.
- [5] Buckstein R, Kerbel RS, Shaked Y, et al. High-dose celecoxib and metronomic “low-dose” cyclophosphamide is an effective and safe therapy in patients with relapsed and refractory aggressive histology non-Hodgkin’s lymphoma. *Clin Cancer Res* 2006;12:5190–8.
- [6] Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:641–8.
- [7] Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2000;19:3–10.
- [8] Romiti A, Cox MC, Sarcina I, et al. Metronomic chemotherapy for cancer treatment: a decade of clinical studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013;72:13–33.
- [9] Ge Y, Domschke C, Stoiber N, et al. Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome. *Cancer Immunol Immunother* 2012;61:353–62.
- [10] Gebbia V, Boussen H, Valerio MR. Oral metronomic cyclophosphamide with and without methotrexate as palliative treatment for patients with metastatic breast carcinoma. *Anticancer Res* 2012;32:529–36.
- [11] Barnett B, Kryczek I, Cheng P, et al. Regulatory T cells in ovarian cancer: biology and therapeutic potential. *Am J Reprod Immunol* 2005;54:369–77.
- [12] Miller AM, Lundberg K, Ozenci V, et al. CD4+CD25high T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients. *J Immunol* 2006;177:7398–405.
- [13] Yokokawa J, Cereda V, Remondo C, et al. Enhanced functionality of CD4+CD25(high)FoxP3+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:1032–40.
- [14] La Raja M, Barcobbello M, Bet N, et al. Incidental finding of monoclonal gammopathy in blood donors: a follow-up study. *Blood Transfus* 2012;10:338–43.
- [15] Chakraborty NG, Twardzik DR, Sivanandham M, et al. Autologous melanoma-induced activation of regulatory T cells that suppress cytotoxic response. *J Immunol* 1990;145:2359–64.
- [16] Mukherji B, Guha A, Chakraborty NG, et al. Clonal analysis of cytotoxic and regulatory T cell responses against human melanoma. *J Exp Med* 1989;169:1961–76.
- [17] Irvine KR, Chamberlain RS, Shulman EP, et al. Route of immunization and the therapeutic impact of recombinant anticancer vaccines. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:390–2.
- [18] Dannull J, Su Z, Rizzieri D, et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest* 2005;115:3623–33.
- [19] Knutson KL, Disis ML, Salazar LG. CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:271–85.
- [20] Vigiuer M, Lemaitre F, Verola O, et al. Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 2004;173:1444–53.
- [21] Kono K, Kawaida H, Takahashi A, et al. CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:1064–71.

5.2 Dynamika imunitního infiltrátu v závislosti na stádiu ovariálního karcinomu.

Postupná změna imunitní reakce od efektorových Th17 lymfocytů k regulačním T lymfocytům

Imunitní dohled hraje při vzniku a vývoji zhoubného nádorového onemocnění zásadní roli. Během progresu nádoru dochází z imunologického hlediska ke složitým změnám, při kterých se rozvíjí protinádorové imunitní reakce, ale zároveň se rozvíjejí mechanismy, které tyto protinádorové mechanismy tlumí až blokuje. Nejeftivnější "zbraní" protinádorové imunity jsou efektorové cytotoxické T lymfocyty (CD8+). Několik studií prokázalo, že zvýšené množství CD8+ cytotoxických lymfocytů v nádorové tkáni zlepšuje prognózu pacientek s ovariálním karcinomem [34, 78]. Naproti tomu zvýšené množství CD4+CD25+FoxP3+ regulačních T lymfocytů (Treg), plasmocytoidních dentritických buněk a B7-H4 makrofágů v nádorové tkáni jsou nepříznivým prognostickým faktorem [16]. Treg jsou považovány za velmi účinné supresory imunitního systému, včetně protinádorové imunity. Zvýšený výskyt CD+T pomocných buněk - Th17 lymfocytů je prognosticky příznivý a Th17 lymfocyty jsou považovány za důležitý mezičlánek protinádorové imunity. V naší studii bylo prokázáno, že Th17 lymfocyty jsou akumulovány v nádorové tkáni časných stádií ovariálního karcinomu. S postupnou progresí onemocnění, ale množství Th17 lymfocytů klesá a dochází k významnému navýšení počtu supresorových Treg. V nestimulované nádorové tkáni byly detekovány pouze 3 cytokiny (IL6, IL10 a TNF- α). IL-1 β , který je důležitý pro funkci Th17 lymfocytů byl detekován pouze u pacientek ve stadiu I. V nestimulované nádorové tkáni byla prokázána produkce vysokých hladin chemokinů CCL20, CCL22 a inflamatorních CXCL9 a CXCL10. Hladiny CCL22, CXCL9 se snižovaly s progresí nádoru. Treg jsou atrahovány do nádorové tkáně z periferní krve interakcí chemokinů CCL22 a CCR4. Dále bylo ve studii zjištěno, že nádorové buňky ovariálního karcinomu zvýšeně produkují chemokiny včetně CCL22 při stimulaci interferonem gama (IFN γ).

Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: The gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells

Anna Fialová¹, Simona Partlová¹, Luděk Sojka¹, Hana Hromádková¹, Tomáš Brtnický², Jitka Fučíková¹, Petr Kocián^{1,3}, Lukáš Rob², Jiřina Bartůňková¹ and Radek Špišek¹

¹Department of Immunology, UK and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

²Department of Gynecology and Obstetrics, UK and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

³Department of Surgery, UK and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

The type of immune cells that are present within the tumor microenvironment can play a crucial role in the survival of patients. However, little is known about the dynamics of the tumor-infiltrating immune cells during disease progression. We studied the immune cells that infiltrated the tumor tissues of ovarian cancer patients at different stages of disease. The early stages of development of ovarian carcinomas were characterized by a strong Th17 immune response, whereas in stage II patients, recruitment of high numbers of Th1 cells was observed. In disseminated tumors (Stages III–IV), we detected a dominant population of Helios⁺ activated regulatory T cells (Tregs) along with high numbers of monocytes/macrophages and myeloid dendritic cells (mDCs). Tumor-infiltrating Tregs had markedly lower expression of CCR4 than circulating Tregs, and the numbers of tumor-infiltrating Tregs significantly correlated with the levels of CCL22 in ovarian tumor cell culture supernatants, suggesting their recruitment *via* a CCR4/CCL22 interaction. CCL22 was mainly produced by tumor cells, monocytes/macrophages and mDCs in the primary ovarian tumors, and its expression markedly increased in response to IFN γ . Taken together, the specific recruitment of Tregs, probably triggered by inflammatory stimuli, leads to a significant immune suppression in the advanced stages of ovarian cancer.

Introduction

Ovarian cancer is one of the 10 most common malignancies in females worldwide and is known to have the highest mortality rate among gynecologic cancers.¹ Because of the lack of sensitive and specific biomarkers and due to the fact that the disease tends to develop and spread rapidly, almost 70% of patients are diagnosed at an advanced stage of tumor dissemination with poor prognosis. Although conventional treatment leads to a significant reduction in malignant cell

numbers in more than 80% of ovarian carcinomas, most of the patients experience an eventually lethal relapse of the disease within 2–5 years because of the persistence of a small number of chemotherapy-resistant tumor cells.² To improve the prognosis of ovarian cancer patients, there is a need for superior prognostic markers and novel therapeutic strategies that can identify high-risk patients and diminish the likelihood of relapse, respectively.

Immune surveillance has been proposed to play a crucial role in cancer development and progression. Experiments in immunodeficient mice have shown that the immune system is able to recognize and eradicate tumors.^{3–5} However, although cancer cells can prime tumor-specific immune responses, interactions between the tumor and the host immune system may not result in clinical regression of the disease but instead to the development of an immunosuppressive microenvironment within the tumor tissue, consequently promoting immune evasion.⁶

Despite being unable to eradicate established tumors, the presence of certain tumor-infiltrating immune cells can represent strong prognostic markers in cancer patients. Zhang et al.⁷ has reported that high numbers of tumor-infiltrating CD3⁺ T cells are associated with a favorable clinical outcome in advanced ovarian cancer patients. More recent studies have reported that improved survival is associated with enhanced numbers of CD8⁺ cytotoxic T cells.^{8,9} By contrast, high numbers of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells

Key words: epithelial ovarian cancer, Th17, Treg, CCL22, recruitment

Abbreviations: DC, dendritic cell; EOC, epithelial ovarian cancer; FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics; mDC: myeloid dendritic cell; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; Treg: regulatory T cell

Grant sponsor: Czech Ministry of Education; **Grant number:** MSM 0021620812; **Grant sponsor:** Czech Ministry of Health; **Grant number:** IGA NT12402-5; **Grant sponsor:** Charles University; **Grant numbers:** GAUK 3654/2011, 63310/2010

DOI: 10.1002/ijc.27759

History: Received 2 Feb 2012; Revised 24 Jun 2012; Accepted 18 Jul 2012; Online 2 Aug 2012

Correspondence to: Dr. Anna Fialová, Department of Immunology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, V Úvalu 84, CZ-15006 Prague 5, Czech Republic, Tel.: +420 224 435 950, Fax: +420 224 435 962, E-mail: anna.fialova@lfmotol.cuni.cz

What's new?

The types of immune cells within a tumor can play a crucial role in patient survival. In this study of ovarian cancer (OC), the authors examined the immune cells infiltrating tumor tissues of patients at various stages of the disease. They found that the pattern of cells shifted as the disease progressed, from an active anti-tumor immune response to one of immune suppression, with activated regulatory T cells (Tregs) becoming the most abundant cell type in advanced OC. The authors conclude that overcoming this suppressive microenvironment should play a role in new therapeutic protocols.

(Tregs),¹⁰ plasmacytoid dendritic cells,¹¹ and B7-H4⁺ macrophages¹² within the tumor tissue can indicate a poor prognosis. The role of CD4⁺ T helper cells is less well documented; however, there is strong evidence that Th17 cells may be substantial players in cancer immunity. Proinflammatory Th17 cells have primarily been associated with autoimmune diseases and mucosal immunity.¹³ Further studies have demonstrated that Th17 cells are present in different types of tumors, including ovarian cancer, head and neck cancer, gastric cancer, breast cancer, colorectal cancer and prostate cancer.^{14–19} Although extensively studied, the exact role of Th17 cells in tumor immunity and the survival of patients remains controversial. On the one hand, IL-17-producing cells have been reported to promote antitumor immunity,^{20–22} but on the other hand, IL-17 is known to act as an angiogenic factor that can enhance tumor growth.^{23–25}

Most published studies have focused on the pattern and prognostic significance of different types of tumor-infiltrating immune cells; however, little is known about the dynamics of the immune response within the tumor tissue during disease progression. In this study, we evaluated the distribution, phenotype and clinico-pathological significance of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, dendritic cells (DCs) and monocytes/macrophages in different stages of epithelial ovarian cancer (EOC). Our findings demonstrate an alteration in the tumor-infiltrating immune cell pattern during cancer development and clearly show a dynamic shift from an effector Th17 cell infiltration, which prevail over Tregs in the early stages of EOC, to a significant Treg accumulation in the advanced stages of disease.

Material and Methods**Patients and tissue samples**

Peripheral blood and primary epithelial ovarian cancer specimens were obtained from 44 patients undergoing initial cytoreductive surgery at the University Hospital Motol in Prague between March 2009 and October 2011. None of the patients enrolled in the study had received neoadjuvant chemotherapy prior to the surgery. All tissue specimens were collected with patient consent, and the study was approved by the Institutional Review Board of the University Hospital Motol. The clinico-pathological characteristics of the patients are summarized in Table 1.

Tumor tissue was minced with scissors, digested in PBS containing 1 mg/ml of Collagenase D (Roche, Basel, Switzerland) at 37°C for 30 min, mechanically dissociated using the

gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) and passed through a 100 µm nylon cell strainer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from blood samples were isolated using Ficoll-Paque density gradient solution (GE Healthcare, Waukesha, WI).

Cell lines

The ovarian cancer cell lines, OV-90 and SKOV3, were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FCS, L-glutamine and penicillin-streptomycin (all from Invitrogen, Carlsbad, CA) at 37°C and 5% CO₂.

Flow cytometry analysis

To detect tumor infiltrating myeloid DCs (mDCs), plasmacytoid DCs (pDCs) and monocytes/macrophages, single cell suspensions were stained with specific antibodies against CD3, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD20, CD45, CD56 (Exbio, Vestec, Czech Republic), CD123 (eBioscience, San Diego, CA) and HLA-DR (BD Biosciences). Regulatory T cells (Tregs) were identified by surface staining with anti-CD3 (Exbio), anti-CD4 (eBioscience), anti-CD8 (Exbio), anti-CD25, anti-CD127 and anti-CCR4 (BioLegend) antibodies followed by fixation and permeabilization with a Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience) and intracellular staining with anti-FoxP3 (eBioscience) and anti-Helios (BioLegend) antibodies. For detection of intracellular cytokines, cell suspensions were stimulated with 50 ng/ml of PMA and 1 µg/ml of ionomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 4 hr in the presence of brefeldin A (BioLegend). After the 4-hr incubation, cells were stained with antibodies against CD3 (Exbio), CD4 (eBioscience), and CD8 (Exbio), fixed and permeabilized with the Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience) and stained with anti-IL-17 (BioLegend) and anti-IFNγ (BD Biosciences) antibodies. For CCL22 detection, cells were cultured in the presence of brefeldin for 4 hr and labeled with the antibodies used for DC/macrophage identification, EpCAM (BioLegend) and CCL22 (R&D, Minneapolis, MN) as described above. Samples were analyzed on a BD FACSAria (BD Biosciences) using FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR).

Cytokine and chemokine detection

Tumor tissue-derived cell suspensions (1 x 10⁶ cells/ml) were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FCS, L-glutamine and penicillin-streptomycin (Invitrogen) in the presence or absence of PMA + ionomycin. For IFNγ-mediated induction of chemokines, ovarian cancer cell

Table 1. Clinicopathological characteristics of the EOC patients in the study

Variable	No.	%
Total no. of patients	44	
Age		
Mean	56	
Range	33–83	
FIGO stage		
I	6	13.6
II	5	11.4
III	32	72.7
IV	1	2.3
Histological subtype		
Serous	27	61.4
Mucinous	9	20.4
Clear cell	3	6.8
Other	5	11.4
Differentiation		
Well	6	13.6
Moderate	9	20.4
Poor	21	47.7
ND	8	18.3

lines and primary tumor tissue-derived cell suspensions (1×10^6 cells/ml) were cultured in the presence of 10, 50 and 100 ng/ml of recombinant human IFN γ (Invitrogen). After 24 hr of incubation, culture supernatants were harvested and stored at -80°C until use. Concentrations of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17a, IL-21, IFN γ and TNF α released into the culture supernatants were determined using a MILLIPLEXTM Human Cytokine/Chemokine Kit (Millipore, Billerica, MA). Concentrations of chemokines (CCL2, CCL5, CCL17, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CXCL9 and CXCL10) were analyzed using a Quantibody[®] Array Kit (Raybiotech, Norcross, GA).

Extraction of genomic DNA and quantitative real time PCR-based methylation assay

Genomic DNA (gDNA) was isolated from a lysate containing 2×10^6 tumor tissue-derived cells using the PureLink Genomic DNA Mini kit (Invitrogen, Carlsbad, USA). Concentrations of extracted gDNA were measured with a Nanodrop[®] 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA). Four to five micrograms of gDNA was treated with sodium bisulfite using the MethylCode Bisulfite Conversion kit (Invitrogen). Quantitative real time PCR amplification of the methylated and demethylated *FoxP3* Treg-specific demethylated region (TSDR) was performed using bisulfite-treated gDNA, 0.5 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen), PCR buffer without MgCl₂, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs (each), 1 μM primers and 0.2 μM

TaqMan[®] probe. PCR reactions were performed using a CFX 96 cycler (BioRad, Hercules, USA). Methylation-specific and demethylation-specific primers and TaqMan[®] probes were commercially synthesized (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany). Amounts of methylated and demethylated *FoxP3* TSDR DNA were estimated from calibration curves by crossing points linear regression using the second derivative maximum method as described by Rasmussen *et al.*²⁶ The proportion of cells with a demethylated *FoxP3* TSDR was calculated as the ratio of demethylated *FoxP3* TSDR DNA to the sum of methylated and demethylated *FoxP3* TSDR DNA.^{27,28}

Plasmid constructs

DNA fragments of the methylated and demethylated *FoxP3* TSDR (86 bp) were cloned into the pUC18 plasmid (Amersham Biosciences, Amersham, UK) using *Hind*III and *Eco*RI restriction sites. The identity of the plasmid constructs was verified by sequencing followed by plasmid DNA purification using a Wizard Plus Midipreps kit (Promega, Madison, USA) and dilution to seven final concentrations of 100, 10, and 1 pg/ μl and 100, 10, 1 and 0.1 fg/ μl , representing a range of 3.34×10^{-7} to 3.34×10^{-1} plasmid copies. Serial dilutions demonstrated the specificity of the assay and were used as standards for quantification of the methylated and demethylated *FoxP3* TSDR.

RNA extraction and quantitative real time PCR

Total RNA was extracted from 2×10^6 tumor-tissue derived cells using an RNA Easy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA concentrations were determined with a Nanodrop[®] 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific), and RNA integrity was assessed using an Experion automated system (BioRad). Complementary DNA was synthesized from total RNA using the M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) and amplified by quantitative real time PCR in the presence of primers and TaqMan[®] probes specific for TGF β and the β -actin housekeeping gene, which was used as an internal reference. All primers and probes were commercially synthesized (TIB MOLBIOL). The identity of qPCR products in each assay was verified by sequencing. The relative expression of the target genes was normalized to the expression of β -actin.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Statistica[®] 10.0 software (StatSoft, Tulsa, OK). The parametric assumptions of the data were verified using the Kolmogorov-Smirnov test for normality. The homogeneity of variances was tested by the Levene test. Correlations between tumor-infiltrating immune cells were evaluated using the Pearson *r* coefficient. The differences between tumor tissue and peripheral blood samples were analyzed using a paired *t*-test. The remaining data were analyzed using an ANOVA followed by a Scheffé test. The results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

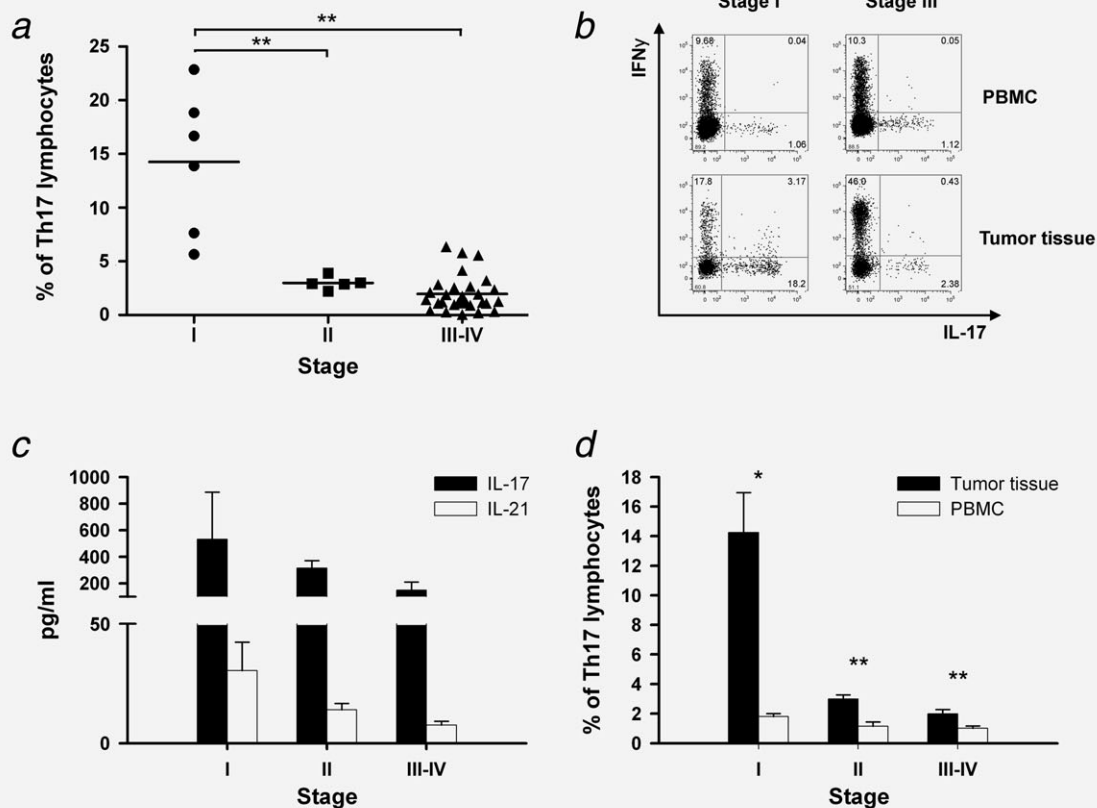


Figure 1. Proportions of Th17 cells within the primary ovarian tumor tissue and peripheral blood according to the stage of the disease. (a) Data are expressed as the proportion of Th17 lymphocytes among $CD4^+$ T cells, — represents the mean value in each stage. (b) Dot plots are gated on $CD3^+CD4^+$ cells and show IL-17 and IFN γ in two representative patients. (c) Columns represent mean levels of IL-17 and IL-21 produced by PMA + ionomycin stimulated tumor tissue-derived cells + S.E.M. (d) Columns represent mean proportions of Th17 cells in the tumor tissue and PBMC + S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (A, ANOVA followed by Scheffé test; D, paired t -test).

Results

Th17 lymphocytes accumulate in the tumor tissue and their proportions negatively correlate with disease progression

Th17 lymphocytes were detected in 100% of the analyzed ovarian tumor samples (range, 0.06–22.8%). The proportion of Th17 cells within the $CD4^+$ T cell subset was significantly higher in the tumor tissues obtained from patients with limited disease (FIGO Stage I) than in those from patients suffering from disseminated disease (FIGO Stages III–IV) (Figs. 1a and 1b). The frequency of Th17 cells within the whole tumor-derived single cell suspensions showed the same pattern (data not shown), indicating that the absolute numbers of Th17 cells significantly decreased in the advanced disease. In accord with these findings, the concentration of IL-17 and IL-21 in tumor tissue-derived cell culture supernatants of early stage patients was markedly higher in both unstimulated (data not shown) and PMA- and ionomycin-stimulated (Fig. 1c) cultures. Despite the significant decrease in Th17 cell proportions in the later stages of the disease, the percentage of tumor-infiltrating Th17 cells was still significantly higher when compared with the peripheral blood of patients (Fig. 1d). The frequency of

Th17 cells in the peripheral blood was not predictive of the number or proportion of Th17 cells in the tumor tissue.

The proportion of tumor-infiltrating Tregs is enhanced in the tumor tissue and increases with disease progression

In contrast to Th17 cells, the proportion of $CD4^+CD25^+CD127^-FoxP3^+$ Tregs was significantly higher in the tumor tissues obtained from patients with disseminated disease (FIGO Stages III–IV) when compared with the samples from patients with Stage I disease (Figs. 2a and 2b). The proportion of tumor-infiltrating Tregs (Ti-Tregs) was significantly higher than that found in the peripheral blood of patients in all stages of the disease (Fig. 2c). To better characterize the status of Ti-Tregs, we included an analysis of the transcription factor, Helios, which is a marker of Treg activation. The proportion of Helios $^+$ Tregs was significantly higher in the tumor tissue ($67.8 \pm 2.5\%$) than in the peripheral blood ($56.3 \pm 4.2\%$) of EOC patients (Fig. 2d). There was no difference in the proportions of Helios $^+$ Tregs in the different stages of disease. The increasing proportion of stable Ti-Tregs during disease progression was further confirmed using a quantitative real time PCR-based methylation assay,

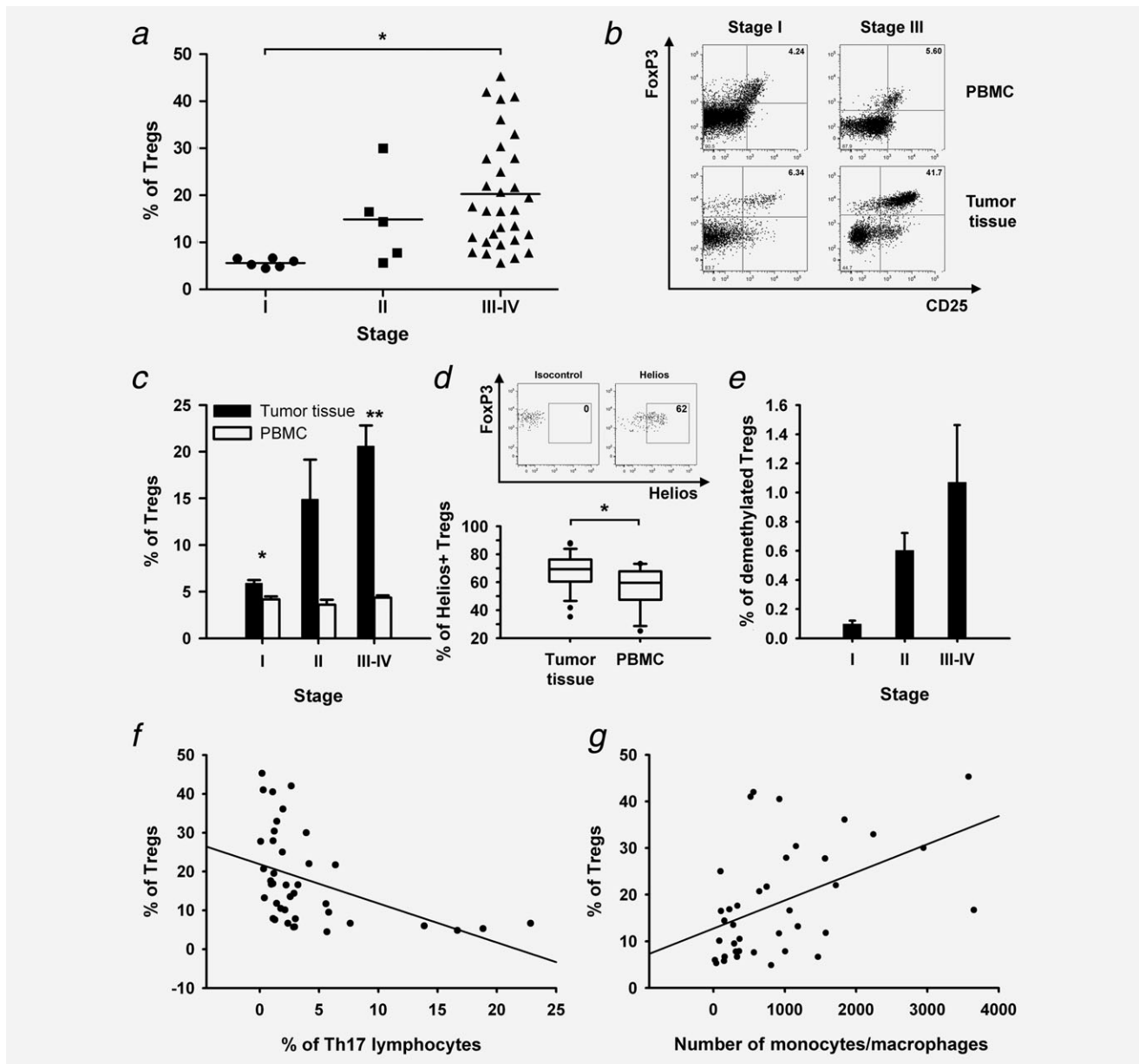


Figure 2. Proportions of Tregs within the primary ovarian tumor tissue and peripheral blood according to the stage of the disease. (a) Data are expressed as the proportion of CD4⁺CD25⁺CD127⁻FoxP3⁺ Tregs among CD4⁺ T cells, — represents the mean value in each stage. (b) Dot plots are gated on CD3⁺CD4⁺ cells and show CD25⁺FoxP3⁺ Tregs in two representative patients. (c) Columns represent mean proportions of Tregs in the tumor tissue and PBMC + S.E.M. (d) Dot plots are gated on CD3⁺CD4⁺ CD25⁺CD127⁻ cells and show FoxP3⁺Helios⁺ Tregs in the tumor tissue of a representative patient. Box plots represent the proportion of Helios⁺ Tregs among CD4⁺CD25⁺CD127⁻FoxP3⁺ Tregs. The boundaries of the box indicate the 25th and the 75th percentiles, the line within the box represents the median. Whiskers indicate the 90th and 10th percentiles. (e) Columns represent proportions of Tregs demethylated in *FoxP3* TSDR among cells isolated from the primary ovarian tumor tissue in different stages of the disease, error bars indicate S.E.M. (f) The line shows negative correlation between % of tumor-infiltrating Tregs and Th17 cells. (g) The line shows positive correlation between % of tumor-infiltrating Tregs and the number of tumor-infiltrating monocytes/macrophages. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 (a, ANOVA followed by Scheffé test; c, d, paired *t*-test).

which assessed the percentage of stable Tregs that were demethylated at the *FoxP3* TSDR in tumor tissue-derived single cell suspensions (Fig. 2e). The proportions of Tregs and Th17 lymphocytes were inversely correlated in the same tumors ($r = -0.44, p < 0.01$) (Fig. 2f), whereas the proportion of Tregs positively correlated with the number of monocytes/macrophages ($r = 0.47, p < 0.01$) (Fig. 2g).

Proportions of Th1 and CD8⁺ T lymphocytes, DCs and monocytes/macrophages do not show significant changes during disease progression

In addition to Th17 cells and Tregs, we also analyzed the presence of other immune cell subsets, including Th1 cells, CD8⁺ T cells, pDCs, mDCs and monocytes/macrophages, in the tumor tissue. Although there was a trend toward an increase in

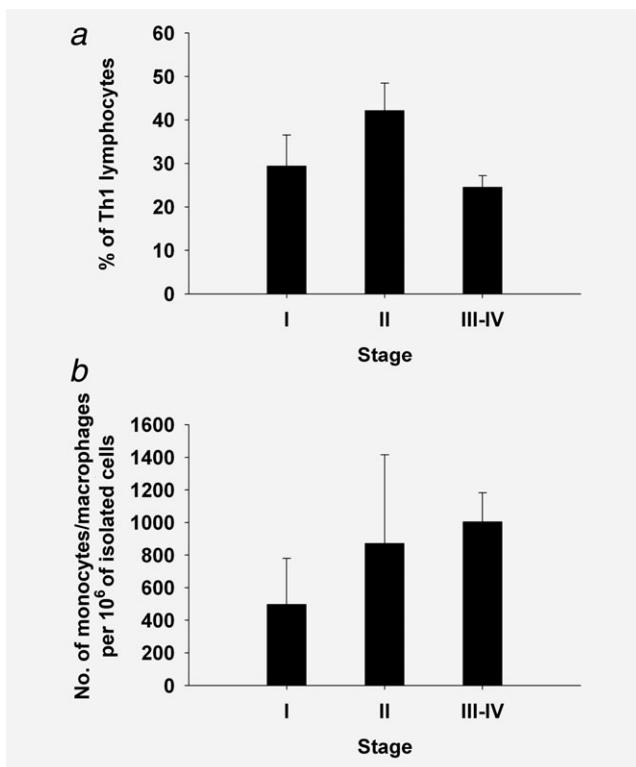


Figure 3. Proportions of Th1 lymphocytes and monocytes/macrophages within the primary ovarian tumor tissue according to the stage of the disease. (a) Data are expressed as the mean proportion of CD3+CD4⁺IFN γ + Th1 cells among CD4⁺ T cells + S.E.M. (b) Columns represent the mean number of CD45⁺Lineage⁻HLA-DR⁺CD14⁺ monocytes/macrophages in 1×10^6 of isolated tumor-derived cells + S.E.M.

mDC and monocyte/macrophage proportions in the advanced tumors (Fig. 3), none of these cell types showed any statistically significant dynamics during ovarian cancer progression.

Cytokine and chemokine profiles of tumor-derived single cell suspensions support the recruitment of polarized Th lymphocytes into the tumor tissue rather than their *in situ* priming and polarization

To better characterize the tumor microenvironment and to evaluate, whether the cytokine profile supports *in situ* priming and polarization of T lymphocytes, we assessed the cytokine and chemokine profile in the tumor-derived cell culture supernatants. In the unstimulated culture supernatants, only three cytokines were detected in significant amounts, IL-6, IL-10 and TNF α (Fig. 4a). IL-2, IL-4, IL-12 and IL-23 levels were below the limit of detection of the MILLIPLEXTM assay in most of the patient samples tested, and IL-17 was only detected in cell supernatants of patients in Stage I of disease. Importantly, only minimal concentrations of IL-1 β (4.2 ± 2.5 pg/ml), which is crucial for Th17 polarization, were detected in culture supernatants from Stage I patients, who had the highest proportions of tumor-infiltrating Th17 cells (Fig. 4c). Except for IL-17, no other significant correla-

tions with disease progression were observed in the unstimulated cultures. Upon PMA and ionomycin stimulation, most of the tested cytokines were produced, except IL-12 and IL-23 (Fig. 4a). The production of IL-21 was significantly decreased in culture supernatants from patients in the advanced stages of the disease when compared with culture supernatants from Stage I patients (Fig. 1c). The expression of TGF β mRNA was observed in all of the patient samples and did not significantly correlate with disease stage (Fig. 4d).

Unstimulated tumor-derived cells produced high amounts of CCL20, CCL22 and inflammatory CXCL9 and CXCL10 (Fig. 4b) but low amounts of CCL2, CCL5, CCL17, CCL19 and CCL21. The levels of CCL22 (Fig. 5a), CXCL9 and CXCL10 (not shown) increased during disease progression; however, these data were not statistically significant. The levels of CXCL9 significantly correlated with the numbers of tumor-infiltrating CD4⁺ ($r = 0.65$, $p < 0.01$) and CD8⁺ ($r = 0.64$, $p < 0.01$) T lymphocytes. There was no correlation with a particular Th lymphocyte subset (not shown). Most important, the levels of CCL22 significantly correlated with the number of Ti-Tregs ($r = 0.66$, $p < 0.01$) (Fig. 5b). No other correlations between the chemokines and tumor-infiltrating immune cells were observed.

Tregs are probably recruited to the tumor tissue via a CCL22/CCR4 interaction and proliferate *in situ*

As described above, the number of Ti-Tregs significantly correlated with the level of CCL22 in the tumor cell culture supernatants. In accord with these observations, Ti-Tregs had significantly lower expression of CCR4 than Tregs from the peripheral blood (mean fluorescence intensity $6,280 \pm 35$ and $3,487 \pm 333$, respectively; $n = 6$) (Fig. 5c). To evaluate whether Ti-Tregs proliferated *in situ*, Ki67 staining was performed in tumor tissue-derived cell suspensions and PBMCs. A markedly higher percentage of Ti-Tregs expressed Ki67 when compared with Tregs in the peripheral blood ($21.8 \pm 5.1\%$ and $12.9 \pm 1.8\%$, respectively; $n = 6$). Ki67 was expressed in a significantly lower proportion of conventional CD4⁺FoxP3⁻ T cells in comparison with Tregs ($7.6 \pm 2.7\%$ in the tumor tissue and $2.3 \pm 0.4\%$ in the peripheral blood) (Figs. 5d and 5e).

Ovarian cancer cell lines produce chemokines, including CCL22, upon IFN γ stimulation

To assess whether ovarian cancer cell lines were able to produce CCL22, OV-90 and SKOV3 cells were cultured either without stimulation or upon stimulation with recombinant human IFN γ , as IFN γ has been shown to induce CCL22 production in breast cancer cell lines.²⁹ In contrast to primary tumor-derived cell suspensions, spontaneous CCL22 secretion was undetectable in the ovarian cancer cell lines, a result that was similar to most of the other chemokines measured in this study. The SKOV3 cell line spontaneously produced small amounts of CXCL9 (Fig. 6a), whereas unstimulated

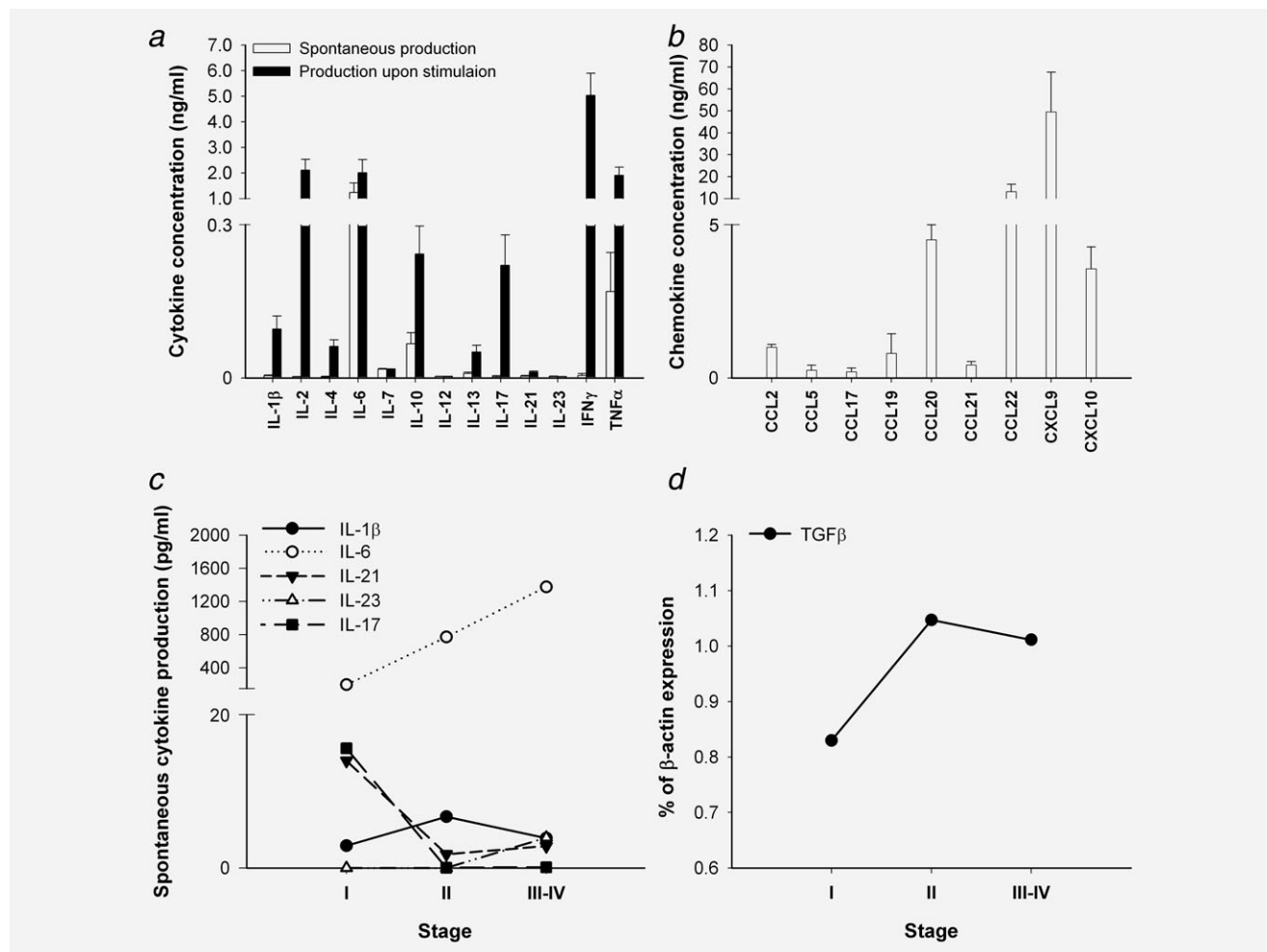


Figure 4. Cytokine and chemokine profiles of tumor-derived single cell suspensions. (a) White columns represent the mean spontaneous cytokine production; black columns represent cytokine production upon PMA and ionomycin stimulation. (b) Columns represent mean spontaneous chemokine production. All error bars indicate S.E.M. (c) The plot expresses the dynamics of the mean spontaneous production of Th17 polarizing cytokines and IL-17 during the disease progression. (d) The plot indicates the dynamics of TGF β mRNA expression during the disease progression presented as the mean proportion of β -actin mRNA expression.

OV-90 cells produced high amounts of CXCL9, CXCL10 and CCL20 (Fig. 6b). The addition of IFN γ induced robust secretion of CCL19, CCL21 and CCL22 in both of the cell lines tested. Surprisingly, production of CXCL9, CXCL10 and CCL20 increased in SKOV3 but decreased in OV-90 cells upon IFN γ stimulation (Figs. 6a and 6b).

Primary ovarian tumor-derived cells have markedly increased CCL22 production upon IFN γ stimulation

To evaluate the effect of IFN γ on primary tumor-derived single cell suspensions, cells isolated from patient tumor tissues ($n = 6$) were cultured in the presence of IFN γ . As shown in Figure 6c, only CCL21, CCL22 and CXCL10 concentrations increased in the tumor cell culture supernatants upon IFN γ stimulation, with the most significant increase observed for CCL22. As the source of the CCL22 secretion, EpCAM $^+$ tumor cells, monocytes/macrophages and mDCs were identified in unstimulated as well as stimulated cultures (Fig. 6d).

Discussion

The presence and prognostic value of different types of tumor-infiltrating immune cells within tumor tissues have been extensively studied; however, little is known about the alterations in immune cell patterns within the tumor tissue during disease progression. To investigate the dynamics of immune cell distribution within cancer tissues, adequate selection of patients with both early and advanced disease is essential. However, with less than 15% of EOC patients diagnosed at Stage I,^{30,31} it is very challenging to study the microenvironment of the early ovarian cancer lesions in prospective studies. Despite the extremely low availability of fresh tumor tissue samples from early disease patients, we were able to analyze six tumor samples from Stage I patients together with 38 tumor samples from patients with more advanced disease (Stages II–IV).

We found that different subsets of CD4 $^+$ T cells, but not other immune cell types, were present and exhibited a significantly different pattern during disease progression. Indeed, the

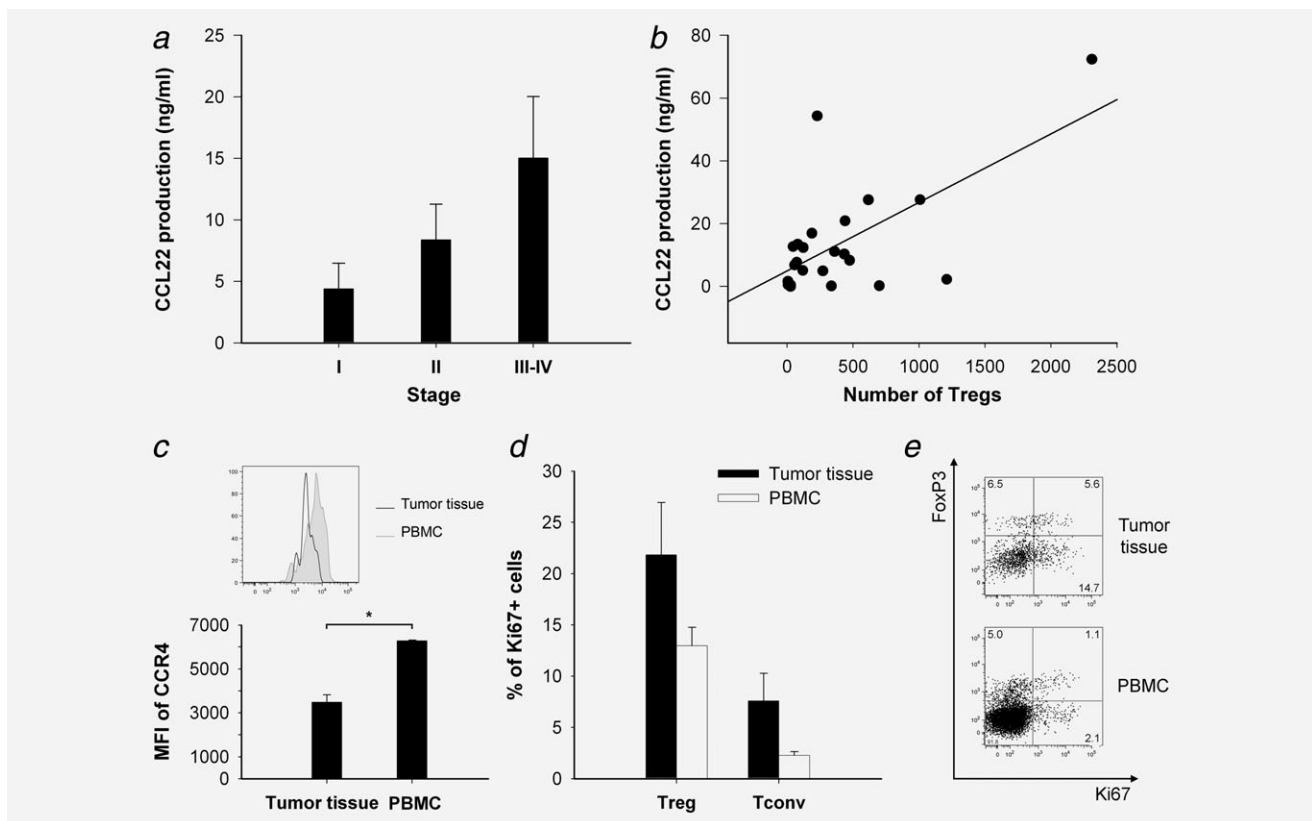


Figure 5. Recruitment of Tregs into the ovarian tumor tissue is probably CCL22-mediated. (a) Columns represent CCL22 production in tumor tissue derived cell culture supernatants + S.E.M. (b) The scatter plot expresses the positive correlation between CCL22 production and number of Ti-Tregs. (c) Histograms show the CCR4 expression in CD4⁺CD25⁺CD127⁻FoxP3⁺ Tregs in the tumor tissue (black line) and peripheral blood (gray line, tinted) in a representative patient. Columns represent the mean fluorescence intensity of CCR4 on CD4⁺CD25⁺CD127⁻FoxP3⁺ Tregs in the tumor tissue and peripheral blood + S.E.M. ($n = 6$). (d) Columns represent the mean proportion of proliferating Ki67⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻FoxP3⁺ Tregs and CD4⁺FoxP3⁻ conventional T cells (Tconv) in the tumor tissue and peripheral blood + S.E.M. ($n = 6$). (e) Dot plots are gated on CD3⁺CD4⁺ cells and show the proportion of Ki67⁺ FoxP3⁺ Tregs and FoxP3⁻ Tconv in a representative Stage III patient. * $p < 0.05$ (paired t -test).

early stages of EOC were characterized by a strong Th17 immune response (Fig. 1a), whereas in advanced stages of disease, a dominant population of regulatory T cells was detected (Fig. 2a). Surprisingly, CD8⁺ T lymphocytes and pDCs did not show any substantial alterations, whereas the proportions of mDCs and monocytes/macrophages appeared to increase during disease progression. The proportion of Th1 cells slightly increased in the Stage II tumors and then decreased again in the advanced stages of disease (data not shown). However, neither the alterations in mDCs and monocytes/macrophages nor those in Th1 cells were statistically significant. A similar kinetics of CD4⁺ effector T cells, *i.e.*, an early burst of Th17 cells that was replaced by high numbers of IFN γ -producing cells, has been described in mouse models of EAE³² and infection.³³ Consistent with these observations, Lohr *et al.*³⁴ transferred antigen-specific T cells into transgenic mice expressing the antigen recognized by the T cells and found the sequential development of Th17 and then Th1 effector cells followed by Treg development in the late phase of disease. As far as we know, this dynamic has not yet been described in the microenvironment of human tumors.

Notably, the origin of the tumor-infiltrating Th17 cells and their exact role in tumor immunity remain controversial. Kryczek *et al.*¹⁵ has reported that macrophages isolated from EOC tissues are capable of inducing Th17 cells *in vitro*. However, because IL-1 β , IL-6 and IL-23 are supposed to be essential for the differentiation of human Th17 cells,^{35,36} the cytokine profile of the tumor microenvironment that was observed in our study, especially the very low levels of IL-1 β in stage I patients together with the complete lack of IL-23 (Fig. 4c), does not support the hypothesis of Th17 polarization *in situ*. It has been shown that Th17 trafficking could be mediated *via* the CCR6/CCL20 axis.³⁷ Surprisingly, in our study we have not observed any correlation between the numbers of Th17 cells and CCL20 levels in the tumor tissue.

In comparison with Th17 cells, many more studies have focused on the trafficking properties and prognostic significance of Tregs in tumors. Curiel *et al.* has shown that Tregs infiltrating ovarian cancer tissues effectively inhibit TAA-specific immunity *in vitro* and *in vivo* and contribute to tumor growth. These authors also suggested that Treg tumor trafficking could be mediated by CCL22.¹⁰ Treg recruitment into

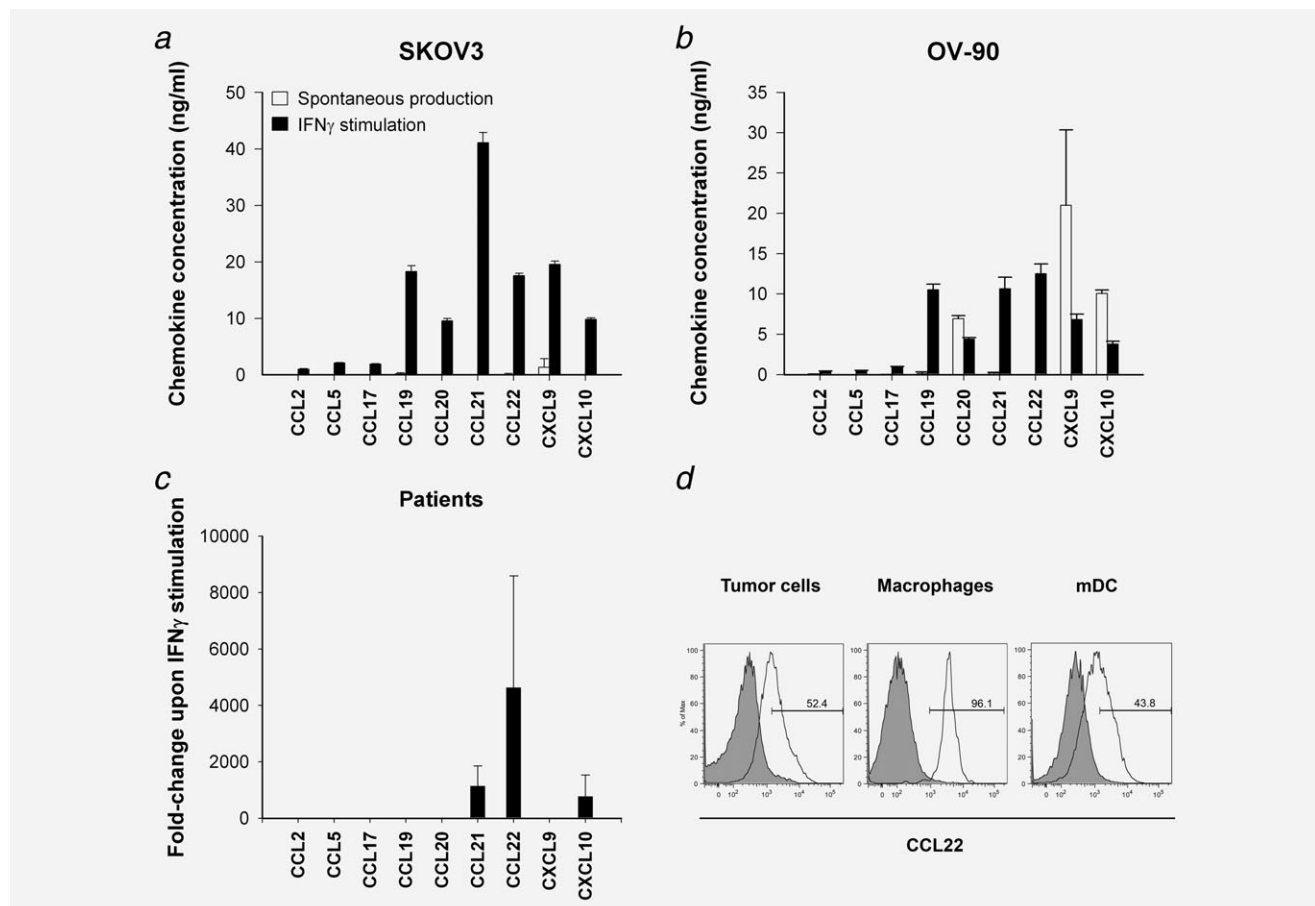


Figure 6. IFN γ induces chemokine production in both ovarian cancer cell lines and patients. (a, b) Columns represent the mean chemokine production in ovarian cancer cell lines with (black columns) or without IFN γ (white columns) stimulation + S.E.M. (c) Data are expressed as the mean fold-changes in chemokine levels in IFN γ -stimulated primary tumor-derived cell cultures in comparison to unstimulated cultures + S.E.M. (d) Histograms show the spontaneous expression of CCL22 in primary tumor-derived cells. Cells are gated on CD45⁺EpCAM⁺ tumor cells; CD45⁺Lineage⁻HLA-DR⁺CD14⁺ monocytes/macrophages and CD45⁺Lineage⁻HLA-DR⁺CD14⁻CD11c⁺ mDCs.

the tumor tissue *via* CCL22/CCR4 has recently been confirmed in breast cancer patients.^{29,38}

In this study, we showed that Ti-Tregs were mainly Helios⁺ activated Tregs. A significant number of these Ti-Tregs was demethylated in the *Foxp3* TSDR. Naturally occurring, but not *in vitro* TGF β -induced, Foxp3⁺ Tregs have been shown to display stable Foxp3 expression that is associated with selective demethylation of the TSDR.³⁹ Similarly, the Ikaros family member, Helios, has been reported to be a marker useful for discriminating between naturally occurring thymic-derived Tregs (nTregs) and those peripherally induced from naïve CD4⁺ T cells (iTregs),⁴⁰ but these findings have very recently been questioned by Akimova *et al.*⁴¹ Thus, rather than discriminating between nTregs and iTregs, Helios appears to be useful for indicating activated Tregs regardless of their origin.⁴¹ Taken together, the high expression of Helios together with the demethylation of the TSDR found in the Ti-Tregs in the EOC tissues in our study indicate the stability and highly activated status of these cells.

In accord with the studies concerning Treg tumor trafficking, we demonstrated that the number of Ti-Tregs signifi-

cantly correlated with the concentration of CCL22 in the ovarian tumor cell culture supernatants. Consistently, Ti-Tregs had significantly lower expression of CCR4 than circulating Tregs. As shown by Gobert *et al.*,³⁸ low levels of CCR4 reflect its internalization due to an active engagement with CCL22. We also observed that a large proportion of Ti-Tregs (21.8 \pm 5.1%) expressed the proliferation marker, Ki67, indicating their extensive local expansion.

Faget *et al.*²⁹ has demonstrated that IFN γ triggers production of CCL22 by breast tumor cells. Indeed, the cooperation between tumor cells and the immune cell infiltrate (especially macrophages and NK cells) has been shown to be essential for inducing high quantities of CCL22. Similarly, we observed that ovarian cancer cell lines produced chemokines, including significant levels of CCL22, upon IFN γ stimulation. Most important, in primary ovarian cancer tissue-derived cells, recombinant IFN γ selectively augmented CCL22 production with only a small effect on the other chemokines tested (Fig. 6c). Tumor cells, monocytes/macrophages and mDCs were identified as the key source of CCL22 in the cancer tissue samples in our study.

In summary, our data suggest that the development of the antitumor immune response in ovarian cancer patients is highly dynamic. In the early stages of the disease, a strong recruitment of Th17 cells is observed, which is followed by a recruitment of Th1 cells, monocytes/macrophages and mDCs. In the later stages of EOC, enhanced levels of IFN γ , probably produced by the immigrating cells, together with increased proportions of monocytes/macrophages and mDCs may favor the production of CCL22 and the recruitment of Tregs via CCL22/CCR4, thus promoting the development of a suppressive

microenvironment. Thus, as our findings clearly show a dynamic shift from an active antitumor immune response to a significant immune suppression in the advanced EOC, the development of novel cancer immunotherapy protocols should not only involve immune-boosting strategies but should also target the immunosuppressive tumor microenvironment in advanced disease.

Acknowledgements

The authors would like to thank Hana Ulčová for technical assistance.

References

- American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures, 2nd ed. Atlanta: American Cancer Society, 2011. 58 p.
- Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2003;21:3194–200.
- van den Broek ME, Kägi D, Ossendorp F, et al. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med* 1996;184:1781–90.
- Smyth MJ, Thia KY, Street SE, et al. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 2000;191:661–8.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001;410:1107–11.
- Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005;5:263–74.
- Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003;348:203–13.
- Sato E, Olson SH, Ahn J, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:18538–43.
- Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:3360–5.
- Curjel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10:942–9.
- Labidi-Galy SI, Sisirak V, Meeus P, et al. Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer. *Cancer Res* 2011;71:5423–34.
- Kryczek I, Wei S, Zhu G, et al. Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2007;67:8900–5.
- Bettelli E, Korn T, Oukka M, et al. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008;453:1051–7.
- Miyahara Y, Odunsi K, Chen W, et al. Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:15505–10.
- Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 2009;114:1141–9.
- Kesselring R, Thiel A, Pries R, et al. Human Th17 cells can be induced through head and neck cancer and have a functional impact on HNSCC development. *Br J Cancer* 2010;103:1245–54.
- Maruyama T, Kono K, Mizukami Y, et al. Distribution of Th17 cells and FoxP3(+) regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in patients with gastric cancer. *Cancer Sci* 2010;101:1947–54.
- Su X, Ye J, Hsueh EC, et al. Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *J Immunol* 2010;184:1630–41.
- Sfanos KS, Bruno TC, Maris CH, et al. Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin Cancer Res* 2008;14:3254–61.
- Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, et al. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* 2009;31:787–98.
- Muranski P, Boni A, Antony PA, et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* 2008;112:362–73.
- Kryczek I, Wei S, Szeliga W, et al. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* 2009;114:357–9.
- Murugaiyan G, Saha B. Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J Immunol* 2009;183:4169–75.
- Zhang JP, Yan J, Xu J, et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* 2009;50:980–9.
- Ji Y, Zhang W. Th17 cells: positive or negative role in tumor? *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:979–87.
- Rasmussen R. Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nagawara K, eds. Rapid Cycle real-time PCR, methods and application. Heidelberg: Springer Press, 2001. 21–34.
- Wieczorek G, Asemussen A, Model F, et al. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res* 2009;69:599–608.
- de Vries IJ, Castelli C, Huygens C, et al. Frequency of circulating Tregs with demethylated FOXP3 intron 1 in melanoma patients receiving tumor vaccines and potentially Treg-depleting agents. *Clin Cancer Res* 2011;17:841–8.
- Faget J, Biota C, Bachelot T, et al. Early detection of tumor cells by innate immune cells leads to T(reg) recruitment through CCL22 production by tumor cells. *Cancer Res* 2011;71:6143–52.
- Visintin I, Feng Z, Longton G, et al. Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:1065–72.
- Howlander N, Noone AM, Krapcho M, et al, eds. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2008. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2011.
- Korn T, Bettelli E, Gao W, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007;448:484–7.
- Lin Y, Ritchea S, Logar A, et al. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunity* 2009;31:799–810.
- Lohr J, Knoechel B, Caretto D, et al. Balance of Th1 and Th17 effector and peripheral regulatory T cells. *Microbes Infect* 2009;11:589–93.
- Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, et al. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007;8:942–9.
- Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007;8:950–7.
- Kesselring R, Thiel A, Pries R, et al. Human Th17 cells can be induced through head and neck cancer and have a functional impact on HNSCC development. *Br J Cancer* 2010;103:1245–54.
- Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 2009;69:2000–9.
- Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol* 2008;38:1654–63.
- Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 2010;184:3433–41.
- Akimova T, Beier UH, Wang L, et al. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One* 2011;6:e24226.

5.3 Lidské nádorové buňky usmrcené antracykliny indukují tumor-specifickou imunitní odpověď

Apoptotická smrt buňky je považována za neimunogenní, protože po pohlcení této buňky antigen-prezentující buňkou (APC) nedochází k rozvoji antigen-specifické imunitní odpovědi. Naproti tomu imunogenní smrt buňky tuto antigen-specifickou odpověď vyvolává (viz. kapitola 3.3). K vyvolání imunogenní smrti buňky byla v této studii použita cytostatika. Ve studii byla testována schopnost jednotlivých cytostatik indukovat expresi známých ukazatelů imunogenní smrti buněk (calreticulin, HSP70, HSP90). Byly použity nádorové linie leukémie, karcinomu ovaria a karcinomu prostaty, ale také primární nádorové buňky jmenovaných malignit. Nejlepších úspěchů bylo dosaženo aplikací antracyklinů. Nádorové buňky usmrcené antracykliny vykazovaly vyšší expresi HSP70, HSP90 a calreticulinu s následnou translokací na povrch buňky. Tato zvýšená exprese markerů imunogenní smrti buňky nebyla prokázána u buněk usmrcených pomocí UVA záření. Dále bylo prokázáno, že buňky usmrcené antracykliny byly fagocytovány významně rychleji než buňky usmrcené jinými cytostatiky. Dendritické buňky pulzované buňkami usmrcenými antracykliny vykazovaly schopnost vyvolávat tumor specifické T buněčné odpovědi. Navíc tyto zralé dendritické buňky indukovaly signifikantně menší počet T-regulačních lymfocytů (Treg), v porovnání s DC pulzovanými s neimunogenními nádorovými buňkami. Chemoterapie a imunoterapie byly dlouhou dobu považovány za antagonisticky působící léčebné strategie. Výsledky této studie však ukazují, že chemoterapie antracykliny má kromě cytostatického efektu i významný efekt imunoterapeutický.

Human Tumor Cells Killed by Anthracyclines Induce a Tumor-Specific Immune Response

Jitka Fucikova¹, Petra Kralikova¹, Anna Fialova¹, Tomas Brtnicky², Lukas Rob², Jirina Bartunkova¹, and Radek Špišek¹

Abstract

Immunogenic cell death is characterized by the early surface exposure of chaperones including calreticulin and HSPs, which affect dendritic cell (DC) maturation and the uptake and presentation of tumor antigens. It has also been shown that it is characterized by the late release of high mobility group box 1 (HMGB1), which acts through Toll-like receptor 4 (TLR4) and augments the presentation of antigens from dying tumor cells to DCs. Most of the data on immunogenic tumor cell death were obtained using mouse models. In this study, we investigated the capacity of clinically used chemotherapeutics to induce immunogenic cell death in human tumor cell lines and primary tumor cells. We found that only anthracyclines induced a rapid translocation of calreticulin, HSP70, and HSP90 to the cell surface and the release of HMGB1 12 hours after the treatment. The interaction of immature DCs with immunogenic tumor cells led to an increased tumor cell uptake and induces moderate phenotypic maturation of DCs. Killed tumor cell-loaded DCs efficiently stimulated tumor-specific IFN- γ -producing T cells. DCs pulsed with killed immunogenic tumor cells also induced significantly lower numbers of regulatory T cells than those pulsed with nonimmunogenic tumor cells. These data indicate that human prostate cancer, ovarian cancer, and acute lymphoblastic leukemia cells share the key features of immunogenic cell death with mice tumor cells. These data also identify anthracyclines as anticancer drugs capable of inducing immunogenic cell death in sensitive human tumor cells. *Cancer Res*; 71(14); 4821–33. ©2011 AACR.

Introduction

Cancer affects half of the inhabitants of developed countries and kills one third of them. Primary tumors can often be completely removed with current cancer therapeutic modalities; however, micrometastases of dormant tumor cells frequently lead to the establishment of the distant metastases and to the relapse of the disease (1). In addition to the standard treatment of metastatic disease by combinations of chemotherapeutics, it would be beneficial for cancer patients to elicit a tumor-specific immunity that would control or slow the growth of residual tumor cells. A combination of chemotherapy with immunotherapeutic strategies aiming to induce tumor-specific immunity represents a challenging task because chemotherapy is generally considered to be immunosuppressive. Physiologic cell death by apoptosis is known to be nonimmunogenic or tolerogenic

(2). Consequently, phagocytosis of apoptotic tumor cells has been long considered to be immunologically silent (3). However, recent studies have shown that tumor cells killed by some chemotherapeutics, such as bortezomib (4, 5), oxaliplatin (6), and anthracyclines (7), can induce a tumor-specific immune response. This immunogenic cell death is characterized by molecular events shared for all described chemotherapeutics. Anthracyclines have a major role in the treatment of leukemia, lymphoma, sarcoma, and uterine, ovarian, and breast malignancies. Despite their side effects, anthracyclines (8) are able to induce immunogenic cell death in mouse tumor cells. Within hours after the initiation of immunogenic cell death, preapoptotic tumor cells translocate calreticulin (CRT; refs. 9, 10) and HSPs from the endoplasmic reticulum to the cell surface together with other molecules that serve as "eat me" signals (phosphatidylserine). At the same time, tumor cells undergoing immunogenic tumor cell death downregulate the expression of "don't eat me" signals, such as surface CD47, to facilitate tumor cell recognition and engulfment by dendritic cells (DC; ref. 11). In addition, following permeabilization of the plasma membrane, cells release the late apoptosis marker high mobility group box 1 (HMGB1; ref. 12) into the extracellular milieu. HMGB1 can bind several pattern recognition receptors (PRR), such as Toll-like receptor (TLR) 2, TLR4 (8, 13), and receptor for advanced glycosylation end products (RAGE). The release of this protein seems to be required

Authors' Affiliations: ¹Department of Immunology, Charles University, and ²Department of Gynecology and Obstetrics, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

Corresponding Author: Assoc. Prof. Radek Špišek, Institute of Immunology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine, V Uvalu 84, Prague 5, Czech Republic. Phone: 420-224-435-961; Fax: 420-224-435-962; E-mail: radek.spisek@lfmotol.cuni.cz

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0950

©2011 American Association for Cancer Research.

for optimal presentation of antigens from dying tumor cells, T-cell priming by DCs, and subsequent T-cell-mediated elimination of the tumor.

All these findings were obtained using mouse models, and it is thus important to determine whether immunogenic tumor cell death can also be induced in humans and whether similar molecular events also occur in human cancer cells. Here, we report that anthracyclines are able to induce the expression of several immunogenic molecules on the surface of a wide spectrum of primary and secondary human cancer cell lines (leukemia, ovarian cancer, and prostate cancer), in contrast to other tested chemotherapeutic agents and irradiation, which is often used in immunotherapeutic protocols. The uptake of anthracycline-killed human tumor cells by DCs leads to the stimulation of the T-cell response and the induction of anti-tumor immunity.

Materials and Methods

Cell lines

Acute lymphoblastic leukemia cell lines were kindly provided by Childhood Leukemia Investigation Prague (CLIP; REH, HLA-A2 positive; DSMZ). Ovarian cancer cells [OV90, HLA-A2 positive; American Type Culture Collection (ATCC)], prostate cancer cells (LNCap, HLA-A2 positive; ATCC). All cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco). All media were supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Lonza), 100 U/mL penicillin, and 2 mmol/L L-glutamine.

Isolation of primary tumor cells

Primary ovarian cancer cells were obtained from patients undergoing surgery for ovarian cancer. The resected tumors were weighed, minced into small pieces (1–3 mm), and mechanically minced into smaller pieces in PBS + 2 mmol/L EDTA. The portions of tumor were then placed in gentle-MACS C tubes in 10 mL PBS + 2 mmol/L EDTA or an enzyme solution (Collagenase D), placed into the incubator (37°C) for 30 minutes and then mixed again twice. The cell suspension was mashed through a sterile cell strainer (100 µm). The cell suspension was washed in PBS + 2 mmol/L EDTA at least twice by centrifugation. The tumor cells were isolated by Ficoll 100% gradient centrifugation. Primary ovarian cancer cells (~80%–95% purity) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS)/glutamine/penicillin.

Apoptosis induction and detection

Tumor cell death was induced by UV (UVA) light exposure (7 and 6 J/cm²). Cell death was assessed by Annexin V/fluorescein isothiocyanate staining. Briefly, 2 × 10⁵ cells per sample were collected, washed in PBS, pelleted, and resuspended in an incubation buffer containing Annexin V/fluorescein isothiocyanate antibody. The samples were kept in the dark and incubated for 15 minutes before the addition of another 400 µL of 0.1% propidium iodide (PI) incubation buffer and subsequent analysis on a FACSAria flow cytometer (BD Bioscience) using FlowJo software.

Flow cytometric analysis of HSP70, HSP90, and CRT on the cell surface

A total of 10⁵ cells were plated on 12-well plates and treated the following day with the indicated agents or were UV-irradiated for 6, 12, or 24 hours. The cells were collected and washed twice with PBS. The cells were incubated for 30 minutes with primary antibody diluted in cold blocking buffer (2% FBS in PBS), followed by washing and incubation with the Alexa 648-conjugated monoclonal secondary antibody in a blocking solution. Each sample was then analyzed by a FACSAria flow cytometer (BD Bioscience) to identify cell surface HSP70, HSP90, and CRT.

Detection of HMGB1 release

REH cells, OV90 cells, LNCap cells, primary ovarian cells, and leukemic blasts (10⁶) were plated in 1 mL full medium appropriate for the cell type. Supernatants were collected at different time points, dying tumor cells were removed by centrifugation, and the supernatants were isolated and frozen immediately. Quantification of HMGB1 in the supernatants was assessed by ELISA according to the manufacturer's instructions.

Fluorescent microscopy

For surface detection of CRT, the cells were placed on ice, washed twice with PBS, and fixed in 0.25% paraformaldehyde in PBS for 5 minutes. The cells were then washed twice in PBS, and a primary antibody diluted in cold blocking buffer was added for 30 minutes. After 2 washes in cold PBS, the cells were incubated for 30 minutes with the appropriate Alexa 648-conjugated secondary antibody. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes, washed in PBS for 20 minutes, and mounted on slides.

For phagocytosis, the DCs were stained with Vybrant DiO cell labeling solution (Invitrogen). The tumor cells were stained with Vybrant DiI cell labeling solution (Invitrogen) and cultured in the presence of selected cytostatic agents or UV radiation for 24 hours. Immature DCs (day 5) were fed tumor cells at a DC/tumor cell ratio of 1:5. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes, washed in PBS for 20 minutes, and mounted on slides with ProLong Gold anti-fade reagent (Invitrogen).

Generation of tumor-loaded DCs and induction of tumor cell death

DCs were generated by culture of purified CD14⁺ cells isolated from buffy coats in the presence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; Gentaur) and interleukin-4 (IL-4; Gentaur; ref. 14). Tumor cells were killed by culturing in the presence of a selected cytostatic agent (100 nmol/L) or by UV irradiation for 24 hours. The extent of apoptosis was monitored by Annexin V/PI staining. The cells were extensively washed before feeding to DCs. Immature DCs (day 5) were fed tumor cells at a DC/tumor cell ratio of 1:5. In some experiments, pulsed DCs were stimulated with 100 ng/mL of lipopolysaccharide (LPS; Sigma) for 12 hours.

Fluorescence-activated cell-sorting analysis of DC phenotype after interaction with killed tumor cells

The phenotype of DCs cultured with tumor cells was monitored by flow cytometry (15, 16). Tumor cells were killed by a selected cytostatic agent or by UV irradiation and were cocultured for 24 hours with immature DCs. For some experiments, the DCs and tumor cells were dye labeled before coculture to monitor phagocytosis. Monoclonal antibodies (mAb) against the following molecules were used: CD80-A700 (Exbio), CD83-PerCP-Cy5.5 (BioLegend), CD86-A647 (BioLegend), CD14-PE (Exbio), CD11c-APC (Exbio), and HLA-DR PC7 (BD Biosciences).

The DCs were stained for 30 minutes at 4°C, washed twice in PBS, and analyzed using a FACSAria flow cytometer (BD Biosciences) using FlowJo software. The DCs were gated according to the forward (FSC) and side scatter (SSC) properties. The appropriate isotype controls were included, and 50,000 viable DCs were acquired for each experiment.

Evaluation of IFN- γ -producing tumor-specific T cells

Unpulsed or tumor-loaded DCs were added to autologous T cells at a ratio of 1:10 on days 0 and 7 of culture. IL-2 (25–50 IU/mL; PeproTech) was added on days 2 and 7 of culture. The cultures were tested for the presence of tumor-specific T cells 7 to 9 days after the last stimulation with DCs. The induction of tumor-reactive, IFN- γ -producing T cells by tumor-loaded DCs was determined by flow cytometry. The T cells were stained with anti-human CD8/IFN- γ (17).

Results

We first tested the cytotoxic effect of a wide spectrum of clinically used cytostatic agents on the viability of REH (T-ALL), ovarian cancer (OV90), and prostate (DU145) cancer cell lines. The viability of tumor cells was repeatedly analyzed over the course of 48 hours by PI and Annexin V staining. Cytostatic agents that killed more than 50% of tumor cells after 24 hours were used for subsequent experiments to analyze the capacity of these agents to induce an immunogenic cell death (Fig. 1).

Expression of immunogenic cell death markers HSP70, HSP90, and calreticulin by human cancer cell lines and human primary tumor cells

Cytostatics were tested for their ability to induce the expression of the known immunogenic cell death markers HSP70, HSP90, and calreticulin in leukemic, ovarian, and prostate cancer cell lines and primary tumor cells. Significant expression of HSP70, HSP90, and calreticulin on T-ALL leukemia cells and T-ALL leukemic cells was detected 12 and 24 hours after the treatment with anthracyclines (doxorubicin and idarubicin; Fig. 2A and B). Increased expression of HSP70, HSP90, and calreticulin after the treatment with anthracyclines was accompanied by their translocation to the cell surface (Fig. 2C). The anthracyclines also induced significant upregulation of HSP70, HSP90, and calreticulin in the OV90 ovarian cancer cell line, in primary ovarian cancer cells freshly isolated from resected tumors, and in the DU145 prostate cancer cell line (Fig. 2D). We did not observe any significant

upregulation of immunogenic cell death markers on ovarian, prostate, and ALL human tumor cells after UV light exposure.

Anthracyclines induce HMGB1 secretion in human T-ALL, ovarian cancer, and prostate cancer cells

We analyzed the release of a late-stage marker of immunogenic cell death HMGB1 in the supernatants of T-ALL, ovarian, and prostate cancer cell lines and primary T-ALL and ovarian tumor cells. Of the tested drugs, only anthracyclines induced significant release of HMGB1 in all tested human tumor cells (Fig. 3). Maximal release of HMGB1 nuclear protein was detected 24 hours after the induction of tumor cell death.

Anthracycline treatment increases the rate of phagocytosis of killed tumor cells by DCs

For the functional studies, we tested only the T-ALL cell line, as it was more feasible to work with the cells in suspension. In view of the established role of calreticulin as an "eat me" signal, we first investigated the rate of phagocytosis of cytostatic-treated REH tumor cells by DCs. Anthracycline-treated tumor cells were phagocytosed at faster rate and to a higher extent than the tumor cells killed by other cytostatic agents. After 12 hours, the rate of phagocytosis of leukemic cells treated with anthracyclines was 3-fold higher than that of cells killed by UV irradiation or other tested drugs. The difference was even higher after 24 hours, especially for idarubicin-treated tumor cells (Fig. 4). The rate of phagocytosis closely correlated with the intensity of calreticulin expression and, although to a lesser degree, with the intensity of HSP70 and HSP90 expression (Fig. 4D).

Phagocytosis of anthracycline-treated tumor cells induces the expression of maturation-associated molecules on DCs

The ability of DCs to activate the immune response depends on their maturation status and the expression of costimulatory molecules. We analyzed the phenotype of DCs that phagocytosed REH tumor cells killed by the indicated cytostatic agents or UV irradiation. The interaction of DCs with idarubicin- and doxorubicin-treated T-ALL cells induced the upregulation of CD83, CD86, and HLA-DR, although to a smaller extent than activation by LPS (Fig. 5). Activation of DCs with anthracycline-killed tumor cells and LPS together induced comparable expression of costimulatory molecules as treatment with LPS alone (data not shown).

DCs pulsed with anthracycline-treated tumor cells induce tumor-specific T cells

To investigate whether tumor cells expressing immunogenic cell death markers induce antitumor immunity, we evaluated the ability of tumor cell-loaded DCs to activate tumor cell-specific T-cell responses. Leukemic cells killed by selected cytostatic agents or by UV irradiation were cocultured with immature DCs with or without subsequent maturation with LPS. These DCs were then used as stimulators of autologous T cells, and the frequency of IFN- γ -producing T cells was analyzed 1 week later after restimulation with tumor cell-loaded DCs. DCs pulsed with REH cells killed by

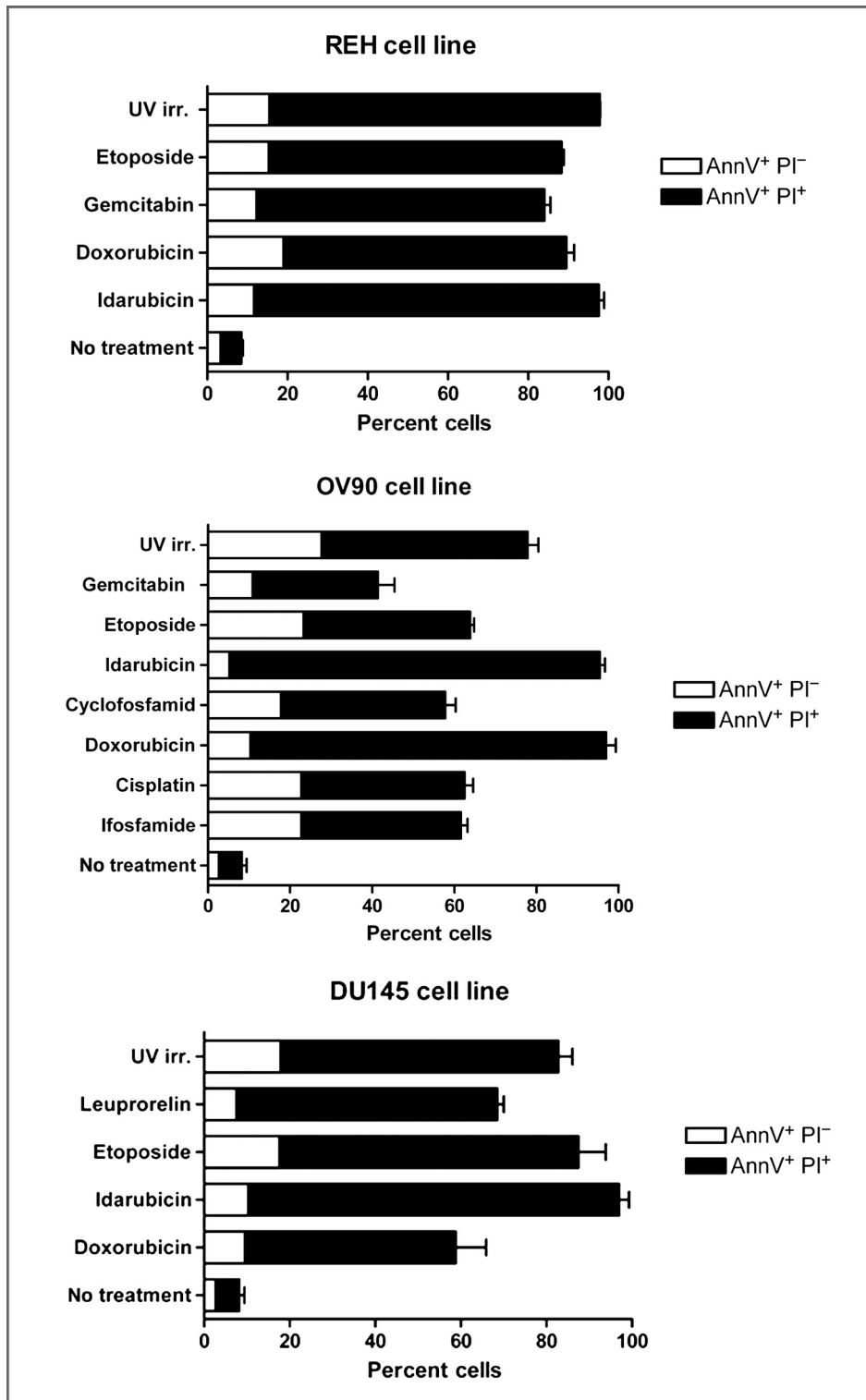


Figure 1. Sensitivity of T-ALL (REH), OV90 (ovarian cancer), and DU145 (prostate cancer) cell lines to the tested cytostatics. Cells were treated for 24 hours with the indicated drugs, and the percentage of early [Annexin V (AnnV⁺)/PI⁻] and late (AnnV⁺/PI⁺) apoptotic cells was determined by flow cytometry.

anthracyclines induced a greater number of tumor-specific CD4⁺ and CD8⁺ IFN- γ -producing T cells than DCs pulsed with UV light-exposed cells in all experiments ($n = 5$), even in the absence of additional maturation stimulus (LPS; Fig. 6).

In addition, we also tested the frequency of regulatory T cells (Tregs) induced in DC and T-cell cocultures. DCs pulsed with REH cells killed by anthracyclines had a lower capacity to expand Tregs than both immature DCs and LPS-activated DCs

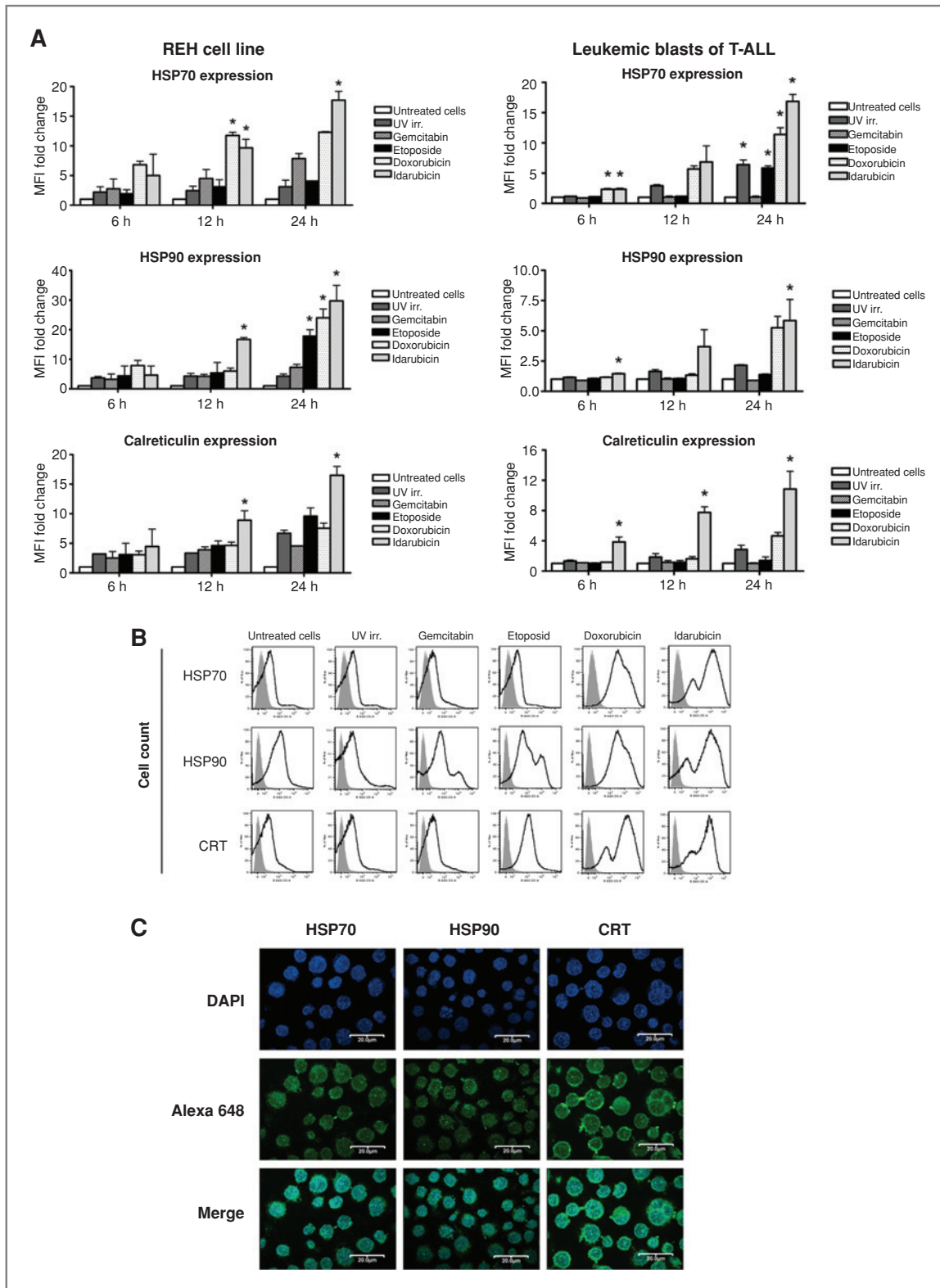


Figure 2. Anthracyclines induce the expression of HSPs on human tumor cells. **A**, the kinetics of HSP70, HSP90, and calreticulin expression on the T-ALL cell line (REH) and leukemic blasts isolated from T-ALL patients treated by the indicated cytostatics. The expression of the indicated markers is shown as a fold change of mean fluorescence intensity (MFI) when compared with untreated cells. The summary of a total of 5 experiments is shown. *, $P < 0.05$. **B**, representative histograms of one of the experiments showing the expression of HSP70, HSP90, and calreticulin after 24 hours of treatment by tested cytostatics. **C**, confocal microscopy images of cells treated for 24 hours with anthracyclines and stained for HSP70, HSP90, and calreticulin.

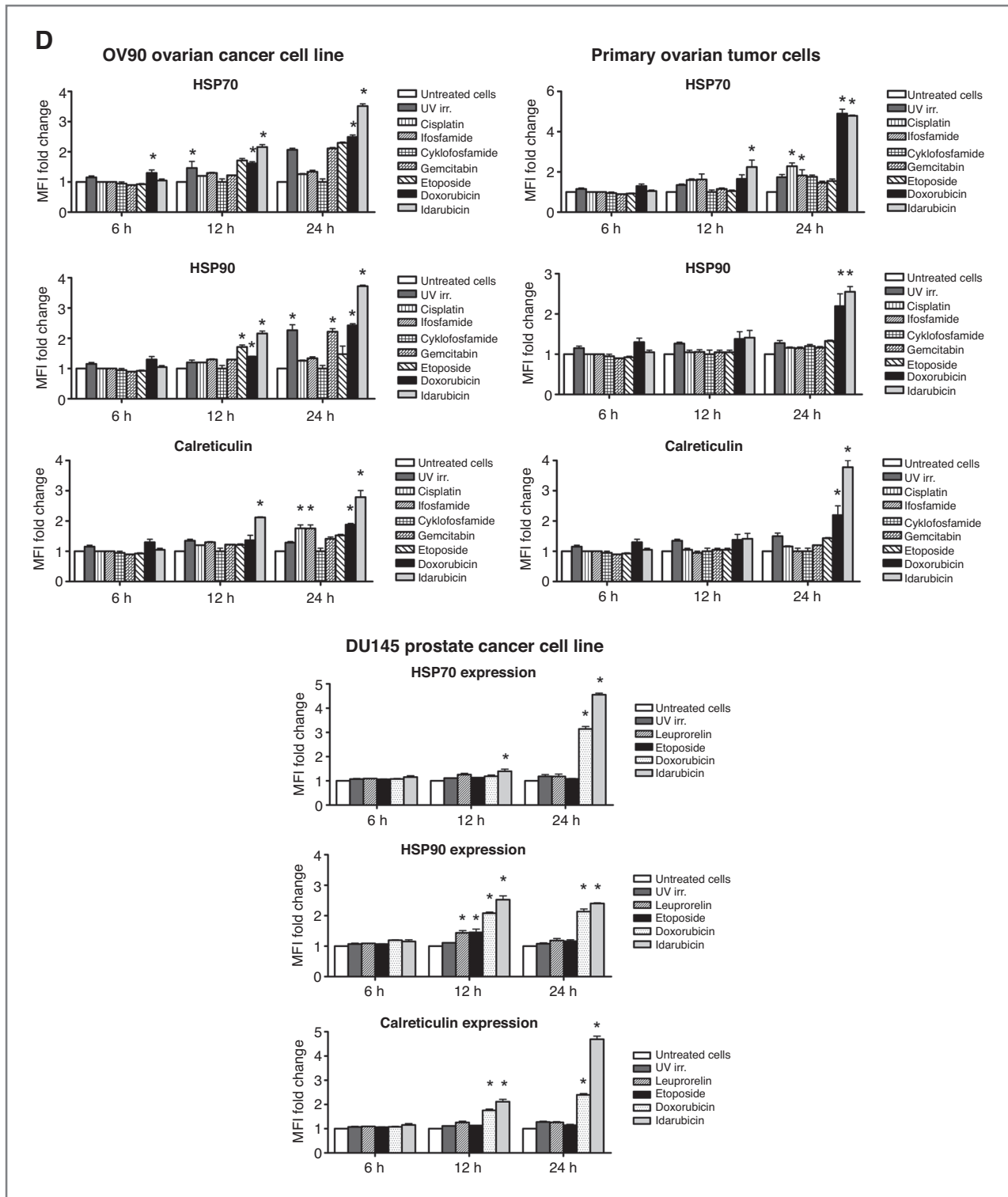


Figure 2. (Continued) D, the kinetics of HSP70, HSP90, and calreticulin expression on an ovarian cancer cell line (OV90), primary ovarian cancer cells, and a prostate cancer cell line (DU145) after treatment with cytostatics. The expression of the indicated markers is shown as a fold change in the MFI when compared with untreated cells. The summary of a total of 5 experiments is shown. *, $P < 0.05$ for comparison with irradiated tumor cells.

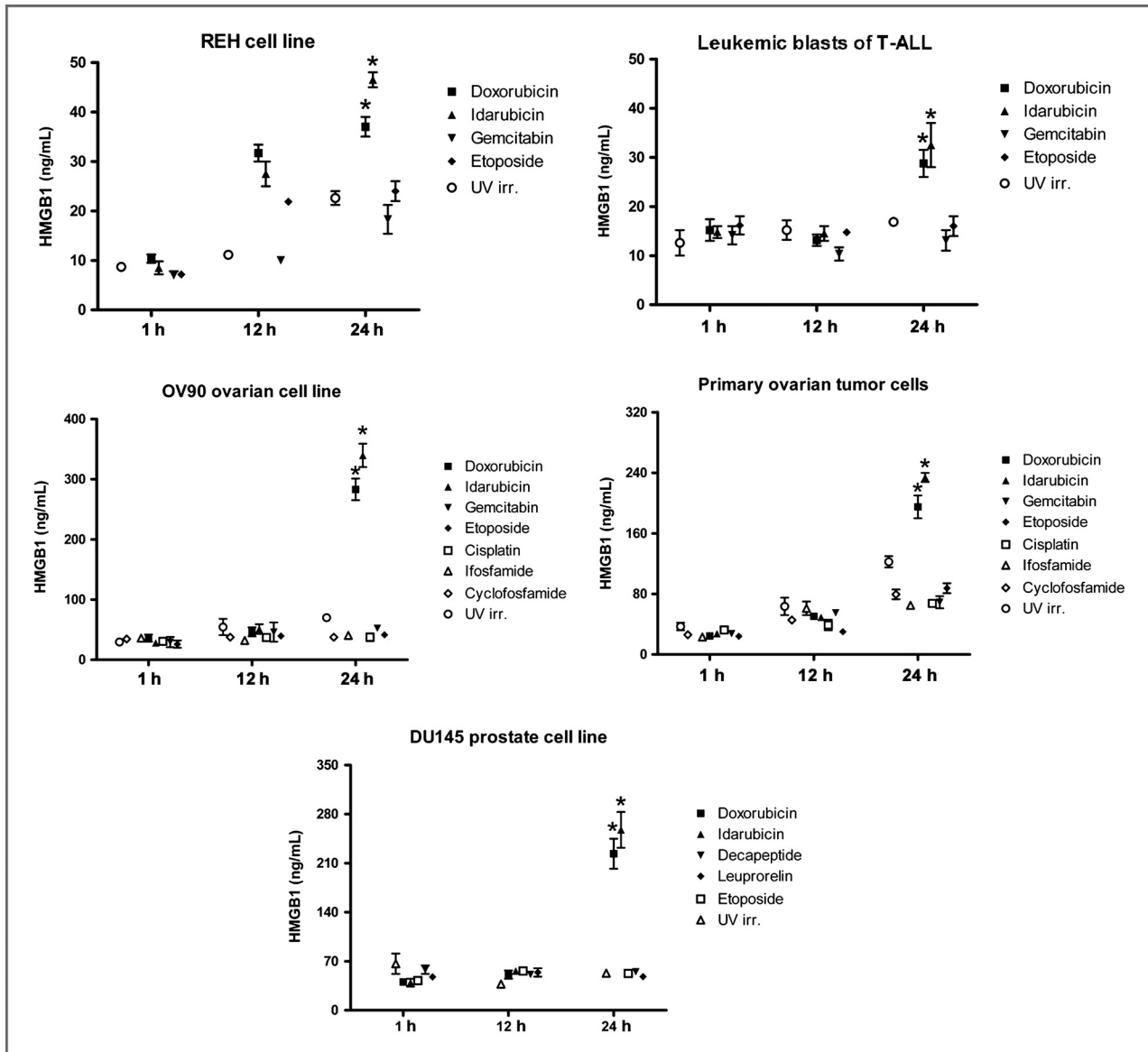


Figure 3. The kinetics of the concentration of HMGB1 (in ng/mL) in culture supernatants of tumor cells treated with tested cytostatics. The data show the summary (mean ± SD) of 5 independent experiments. *, $P < 0.05$ for comparison with irradiated tumor cells.

(Fig. 7). We also sorted the induced $CD4^+CD25^{\text{high}}$ T cells to test their inhibitory capacity in an allogeneic mixed lymphocyte reaction (MLR), and we did not see any significant difference in the inhibitory activity of Tregs induced by tumor cells killed by various cytostatics (data not shown).

Discussion

There is considerable interest in understanding the biochemical features of immunogenic versus nonimmunogenic death of tumor cells induced by anticancer therapies.

Identification of potent activating signals expressed by immunogenic tumor cells would significantly contribute to understanding the interaction between tumor cells and the

immune system and would facilitate the design of more effective immunotherapeutic strategies. Recent studies identified several markers accompanying immunogenic cell death. Our recent study reported the induction of immunogenic cell death in primary myeloma tumor cells by bortezomib, a specific inhibitor of the 26S proteasome subunit. Immunogenicity of tumor cells correlated with the expression of HSP90 on the surface of myeloma cells killed by bortezomib (4, 5). Cell surface expression of HSP90 was critical for the immunogenicity of killed tumor cells because activation of DCs was cell-contact dependent, and the specific blockade of HSP90 abolished the immunogenicity of myeloma cells. In addition to the study on primary myeloma tumor cells, upregulation of maturation-associated markers was reported for murine DCs

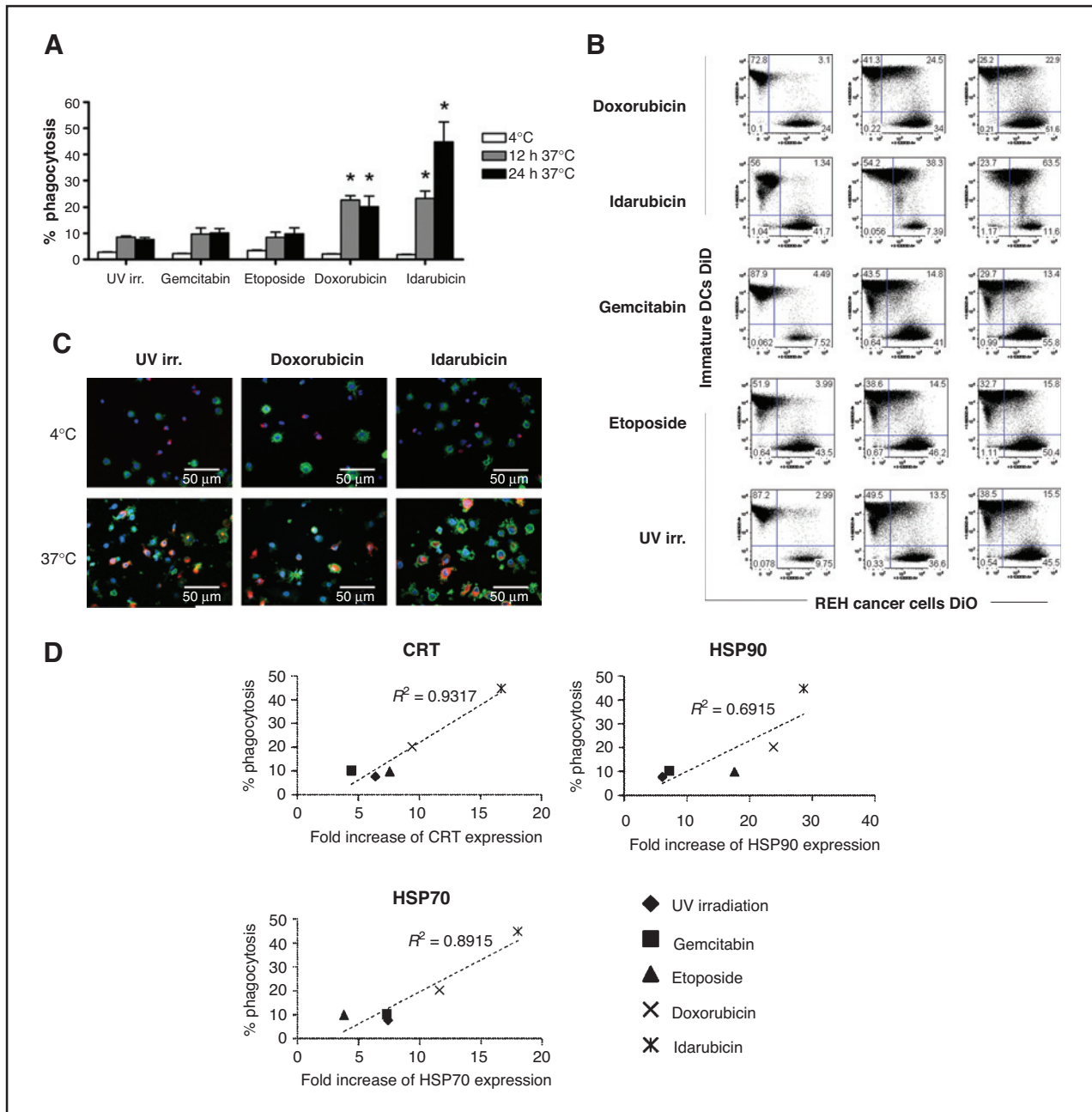


Figure 4. The kinetics of phagocytosis of cytosstatic-treated REH T-ALL cells by immature DCs. A, the percentage of phagocytosis at 12 and 24 hours is shown relative to the control at 4°C. B, dot plots of the representative experiments are shown. Killed REH cells were labeled with DiO and cocultured with DiD-labeled immature DCs. C, confocal microscopy analysis of the phagocytosis experiment. After 24 hours of coculture of killed tumor cells with immature DCs, the engulfment of tumor cells was verified by confocal microscopy. D, correlation between the expression of immunogenic cell death markers and the rate of phagocytosis at 24 hours. Summary of 7 independent experiments is shown.

that phagocytosed bortezomib-killed 67NR colon carcinoma cells (13). This report also showed increased immunogenicity of bortezomib-killed tumor cells in tumor protection experiments. In a mouse colon carcinoma model (CT26 cell line), Zitvogel and Kroemer screened an array of chemotherapeutic drugs for each drug's capacity to induce immunogenic cell death (9). Evaluating the ability of tumor cells killed by tested

drugs to serve as a protective vaccine in tumor protection experiments, they identified anthracyclines as compounds that induced immunogenic cell death, even in the absence of external activation signals (18, 19). Rapid translocation of the endoplasmic reticulum-resident chaperone protein calreticulin to the cell surface of dying tumor cells was identified as a molecular mechanism underlying the increased

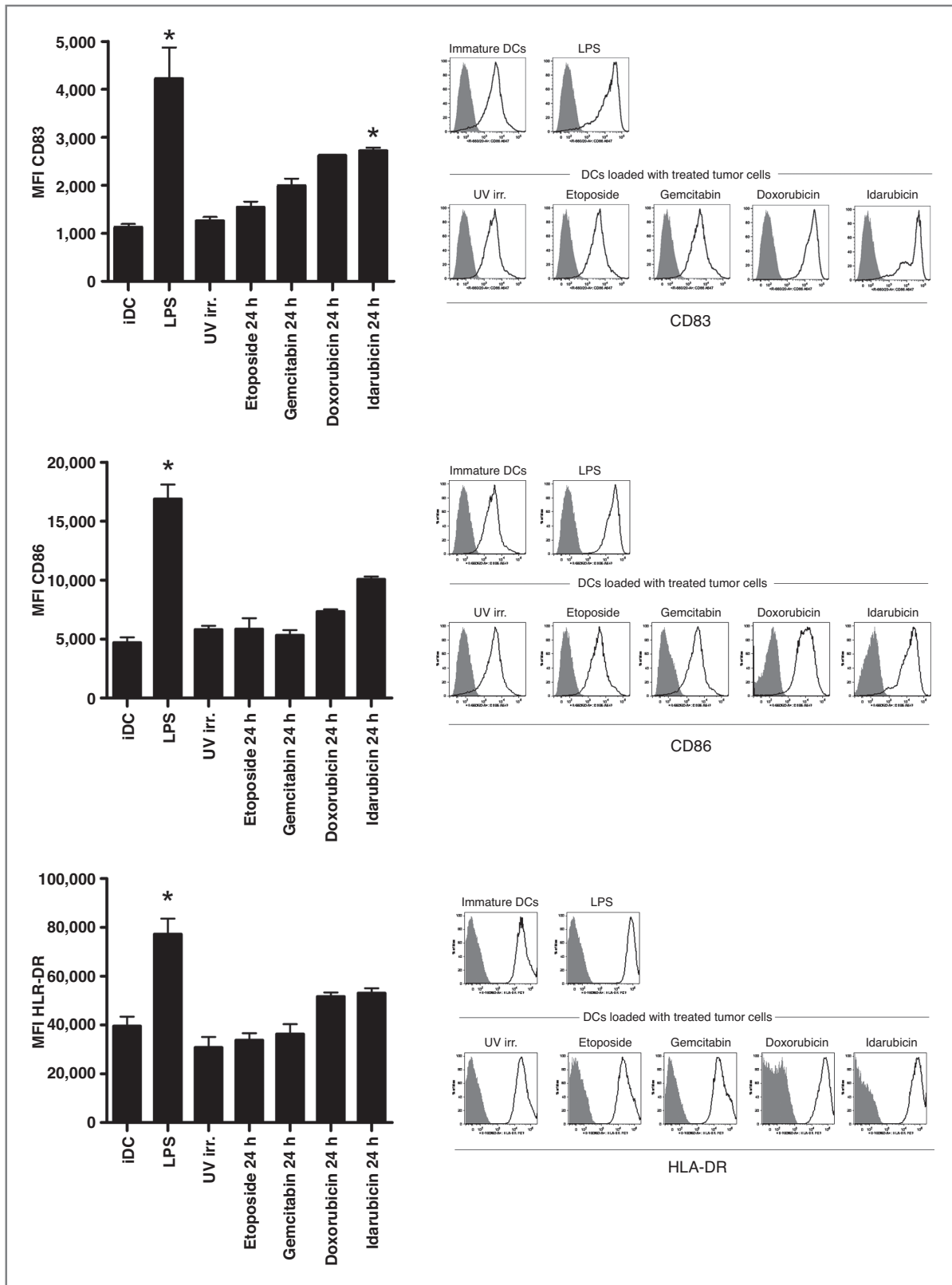


Figure 5. The phenotype of DCs after interaction with cytostatic-killed REH cells. day 5 immature DCs were cultured for 24 hours with REH T-ALL cells killed by irradiation or the indicated cytostatics. After 24 hours, the expression of CD83, CD86, and HLA-DR on DCs was analyzed by flow cytometry. The mean fluorescence intensity (MFI) and representative histograms are shown. *, $P < 0.05$ for comparison with irradiated tumor cell-loaded DCs.

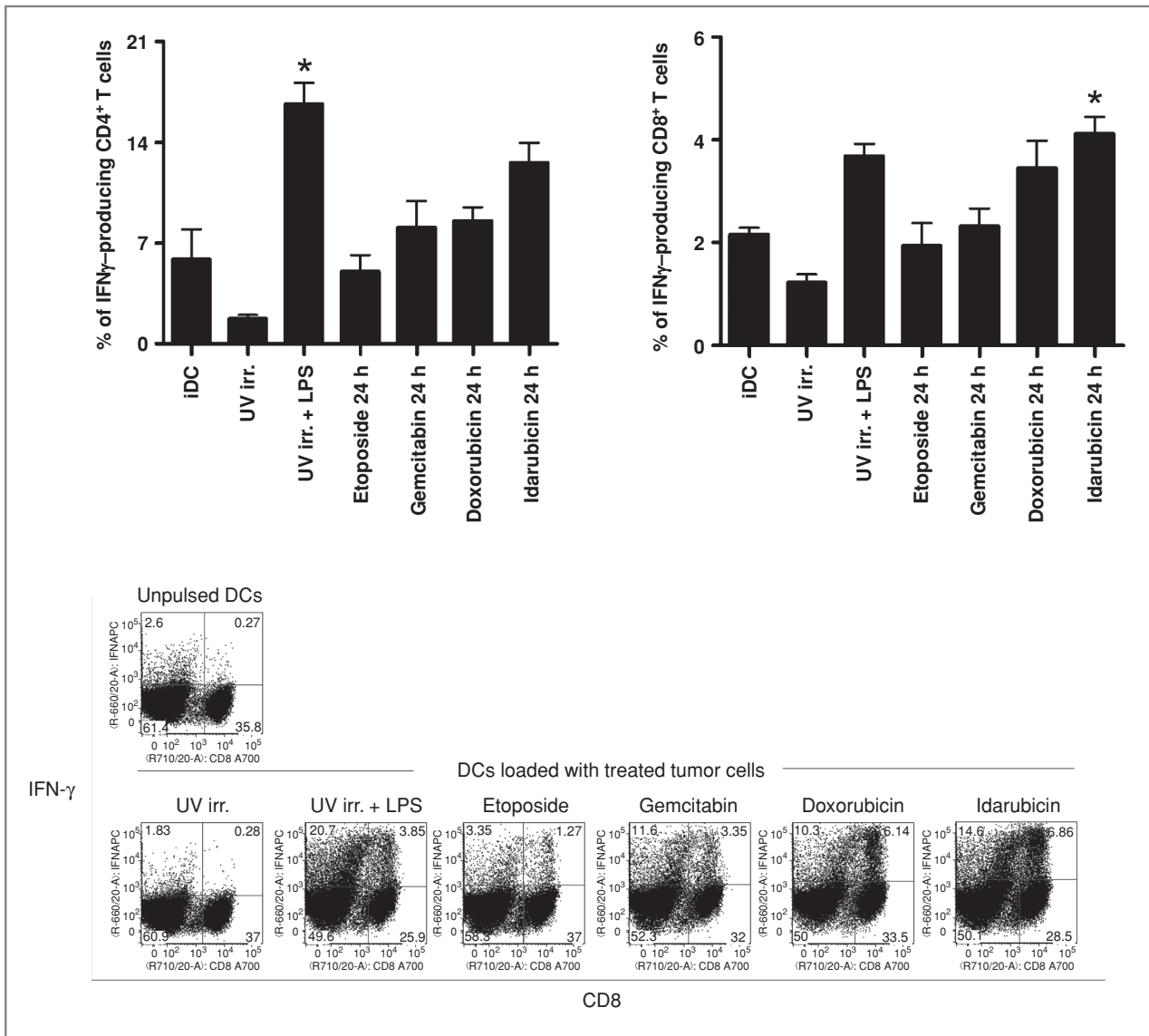


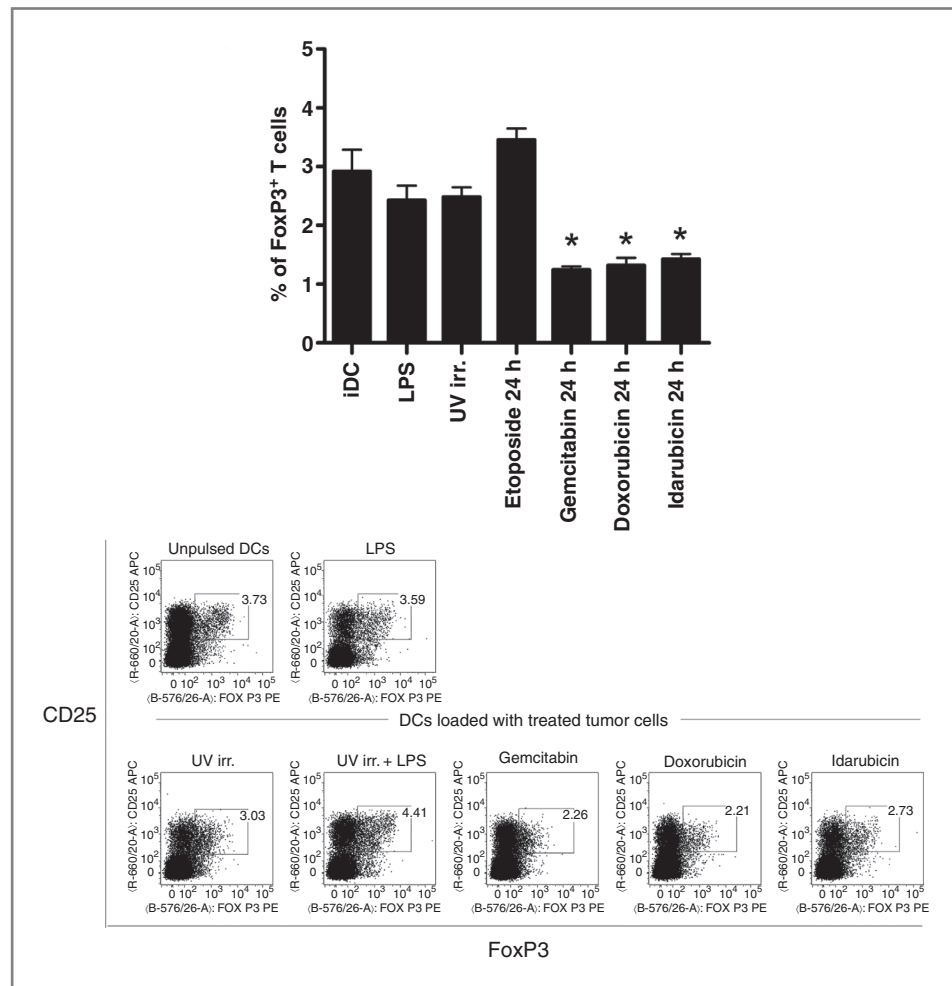
Figure 6. The induction of tumor-specific T cells by cytostatic-killed REH T-ALL cells without the need for an exogenous DC maturation stimulus. Monocyte-derived DCs were pulsed with REH T-ALL cells killed by irradiation or tested drugs and then used for the stimulation of autologous T cells for 2 weeks. The number of IFN- γ producers in cultures with unpulsed DCs or DCs pulsed with REH T-ALL cells was analyzed by intracellular IFN- γ staining. The data show a summary (top) and representative staining (bottom) of 5 independent experiments.

immunogenicity of tumor cells (9, 10). Calreticulin translocation enhanced the phagocytosis of tumor cells by DCs, and blockade of calreticulin abolished anthracycline-induced immunogenicity of killed tumor cells in mice. Upon exposure to anthracyclines, calreticulin translocates very quickly to the outer leaflet of the cell membrane, whereas other tested chemotherapeutics fail to induce calreticulin translocation and thus did not induce immunogenic cell death. The identification of HSPs as markers of immunogenic cell death is also in accordance with murine studies showing that cell surface HSPs represent a potent immunogenic signal and promote the development of autoimmunity. Immunostimulatory activity and increased immunogenicity of tumor cells enriched in

HSPs after induction of hyperthermia has also been reported in various animal tumor vaccination models as well as in the human *in vitro* model (20, 21). Together, the common theme from these independent observations is that the expression of HSPs on the surface of dying cells may be a marker for immunogenic forms of cell death and deliver an activating stimulus to DCs.

Recently, Apetoh and colleagues conducted elegant studies that led to the discovery of another soluble endogenous danger signal (6, 8, 12). They reported that TLR4 deficiency compromised the immunogenicity of tumor cells and identified HMGB1 as a specific ligand of TLR4 that is released from dying tumor cells at the stage of late apoptosis. HMGB1

Figure 7. The expansion of Tregs by cytostatic-killed REH T-ALL cells. Monocyte-derived DCs were pulsed with REH T-ALL cells killed by irradiation or by tested drugs and then used for the stimulation of autologous T cells. After 2 weeks, the frequency of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells was analyzed. The data show a summary (top) and representative staining (bottom) of 5 independent experiments. *, *P* < 0.05 value for comparison with irradiated tumor cells.



is a nonhistone chromatin-binding protein that influences transcription and other cell functions. HMGB1 is actively secreted from inflammatory cells or released from necrotic cells (22, 23). The identity of its receptor is still controversial, but it signals through TLR2 and TLR4 as well as RAGE (24–26). Depletion of HMGB1 from tumor cells abolished TLR4-dependent DC-mediated presentation of tumor antigens. The relevance of this study is further illustrated by the finding that breast cancer patients with the TLR4 allele variant that reduces the affinity of TLR4 for HMGB1 had a higher incidence of metastasis after conventional treatments than patients with the wild-type allele (8).

As most of the data on immunogenic tumor cell death were obtained using mouse models, we investigated whether analogous mechanisms also apply to human cancer cells. We tested the capacity of clinically used cytostatics to induce immunogenic cell death in human tumor cell lines and primary tumor cells derived from prostate cancer, ovarian cancer, and acute lymphoblastic leukemia.

We show that only anthracyclines induced a rapid translocation of calreticulin, HSP70, and HSP90 to the cell surface and the release of HMGB1 12 hours after the treatment in all 3 models, as

documented by cytometric analysis, confocal microscopy, and ELISA. The interaction of immature DCs with immunogenic tumor cells led to an increased tumor cell uptake and induced moderate expression of maturation-associated markers on DCs. As in the mice studies published by the group of Zitvogel and Kroemer, the rate of phagocytosis in our study very closely correlated with the intensity of calreticulin expression and, although to a lesser degree, with the intensity of HSP expression.

DCs loaded with anthracycline-killed tumor cells efficiently stimulated tumor-specific IFN- γ -producing T cells, even in the absence of other maturation stimuli such as LPS. DCs pulsed with killed immunogenic tumor cells also induced significantly lower numbers of Tregs, identified as CD4⁺CD25^{high} and FoxP3⁺, compared with nonimmunogenic tumor cells, which may be relevant for the design of cancer immunotherapy studies. To test that by using the phenotypic markers of Tregs, we indeed identify the cells with inhibitory potential, we sorted the induced CD4⁺CD25^{high} T cells to test their inhibitory capacity in an allogeneic MLR (27) and we did not see any significant difference in the inhibitory activity of Tregs induced by DCs loaded with tumor cells killed by various cytostatics (data not shown).

These data indicate that human prostate cancer, ovarian cancer, and acute lymphoblastic leukemia cells share the key features of immunogenic cell death with mice tumor cells, and we identified anthracyclines as anticancer drugs capable of inducing immunogenic cell death in sensitive human tumor cells. In mouse studies, Obeid and colleagues (10) also showed that γ -ray irradiation and UV light exposure induce a moderate expression of calreticulin on tumor cells and that irradiated tumor cells expressing calreticulin induce protection against subsequent challenge with live tumor cells. In this study, we show that killing of human tumor cells by UVA light exposure (7.6 J/cm^2) does not lead to a significant upregulation of immunogenic cell death markers. We also tested tumor cells killed by γ -ray irradiation (20 and 75 Gy, data not shown), and we did not see any significant upregulation of immunogenic cell death-associated markers in accordance with previous studies in human tumor cells (5, 28). The absence of significant expression of immunogenic cell death-associated markers correlated with the low capacity of DCs pulsed with irradiated tumor cells to induce tumor cell-specific T cells in the absence of LPS.

Breakthrough studies that identified markers of immunogenic tumor cell death after chemotherapy treatment challenge the long-time perception of chemotherapy and immunotherapy as opposing and incompatible treatment modalities. The introduction of chemotherapy regimens and their thorough testing in well-designed clinical trials undeniably represents one of the greatest triumphs of modern medicine. For example, in childhood acute lymphoblastic leukemias, an invariably fatal disease in the 1960s, the introduction and subsequent improvement of

chemotherapy protocols led to a cure rate of almost 90% in the last decade. Despite the continuous introduction of new drugs and further improvements of chemotherapy protocols, it is likely that, at some point, chemotherapy will reach its limits, and clinical efficacy will plateau. Moreover, despite the undeniable success in the treatment of some malignancies, in some tumors, particularly in solid tumors, chemotherapy is rarely curative. A combination of treatment modalities has been a standard strategy for cancer treatment, the combination of surgery with chemo- or radiotherapy being a classical example. Effort should be made not only to design modern immunotherapeutic strategies but also to incorporate immunotherapy approaches into current chemotherapy protocols (29, 30). Chemotherapy and immunotherapy should not be henceforth considered antagonist forms of therapy, and it is conceivable that their rational combination could substantially improve the prognosis of cancer patients.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Grant Support

This study was supported by grant GACR 310/08/0838. J. Fucikova was supported by grant GAUK 8976/2008 provided by Charles University.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received March 17, 2011; revised May 12, 2011; accepted May 17, 2011; published OnlineFirst May 20, 2011.

References

- Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006;6:715–27.
- Green JE, Hudson T. The promise of genetically engineered mice for cancer prevention studies. *Nat Rev Cancer* 2005;5:184–98.
- Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 2007;14:1237–43.
- Spisek R, Dhodapkar MV. Towards a better way to die with chemotherapy: role of heat shock protein exposure on dying tumor cells. *Cell Cycle* 2007;6:1962–5.
- Spisek R, Charalambous A, Mazumder A, Vesole DH, Jagannath S, Dhodapkar M. Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. *Blood* 2007;109:4839–45.
- Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L, et al. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ* 2008;15:3–12.
- Panaretakis T, Joza N, Modjtahedi N, Tesniere A, Vitale I, Durchschlag M, et al. The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ* 2008;15:1499–509.
- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007;13:1050–9.
- Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007;13:54–61.
- Obeid M, Panaretakis T, Joza N, Tufi R, Tesniere A, van Endert P, et al. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2007;14:1848–50.
- Martins I, Kepp O, Galluzzi L, Senovilla L, Schlemmer F, Adjemian S, et al. Surface-exposed calreticulin in the interaction between dying cells and phagocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1209:77–82.
- Apetoh L, Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Piacentini M, et al. Immunogenic chemotherapy: discovery of a critical protein through proteomic analyses of tumor cells. *Cancer Genomics Proteomics* 2007;4:65–70.
- Demaria S, Santori FR, Ng B, Liebes L, Formenti SC, Vukmanovic S. Select forms of tumor cell apoptosis induce dendritic cell maturation. *J Leukoc Biol* 2005;77:361–8.
- Sochorova K, Budinsky V, Rozkova D, Tobiasova Z, Dusilova-Sulkova S, Spisek R, et al. Paricalcitol (19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D2) and calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D3) exert potent immunomodulatory effects on dendritic cells and inhibit induction of antigen-specific T cells. *Clin Immunol* 2009;133:69–77.
- Rozkova D, Horvath R, Bartunkova J, Spisek R. Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors. *Clin Immunol* 2006;120:260–71.
- Boura E, Liebl D, Spisek R, Fric J, Marek M, Stokrova J, et al. Polyomavirus EGFP-pseudocapsids: analysis of model particles for introduction of proteins and peptides into mammalian cells. *FEBS Lett* 2005;579:6549–58.
- Spisek R, Chevallier P, Morineau N, Milpied N, Avet-Loiseau H, Harausseau JL, et al. Induction of leukemia-specific cytotoxic

- response by cross-presentation of late-apoptotic leukemic blasts by autologous dendritic cells of nonleukemic origin. *Cancer Res* 2002;62:2861–8.
18. Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 2005;202:1691–701.
 19. Zitvogel L, Casares N, Pequignot MO, Chaput N, Albert ML, Kroemer G. Immune response against dying tumor cells. *Adv Immunol* 2004;84:131–79.
 20. Masse D, Ebstein F, Bougras G, Harb J, Meflah K, Gregoire M. Increased expression of inducible HSP70 in apoptotic cells is correlated with their efficacy for antitumor vaccine therapy. *Int J Cancer* 2004;111:575–83.
 21. Shi H, Cao T, Connolly JE, Monnet L, Bennett L, Chapel S, et al. Hyperthermia enhances CTL cross-priming. *J Immunol* 2006;176:2134–41.
 22. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002;418:191–5.
 23. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999;285:248–51.
 24. Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim JY, Strassheim D, Sohn JW, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C917–24.
 25. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 2004;279:7370–7.
 26. Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, Valentini B, Cattanotti F, Giazon M, et al. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep* 2004;5:825–30.
 27. Banerjee DK, Dhodapkar MV, Matayeva E, Steinman RM, Dhodapkar KM. Expansion of FOXP3^{high} regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) *in vitro* and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood* 2006;108:2655–61.
 28. Dhodapkar KM, Krasovsky J, Williamson B, Dhodapkar MV. Antitumor monoclonal antibodies enhance cross-presentation of cellular antigens and the generation of myeloma-specific killer T cells by dendritic cells. *J Exp Med* 2002;195:125–33.
 29. Spisek R. Immunoprevention of cancer: time to reconsider timing of vaccination against cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006;6:1689–91.
 30. Spisek R, Dhodapkar MV. Immunoprevention of cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2006;20:735–50.

6 Závěr

6.1 Klinický význam monitorace T-regulačních lymfocytů v periferní krvi u pacientek s ovariálním karcinomem

Naše studie potvrdila skutečnost, že nejsilnějším prognostickým faktorem dalšího vývoje malignity je stádium onemocnění a přítomnost nádorového rezidua po primární operaci. Nádorové reziduum je však u každé pacientky individuální a může dosahovat ložiska o velikosti několika milimetrů až po inoperabilní nádorové masy. Vystává otázka, jak velké pooperační nádorové reziduum významně snižuje prognózu pacientky. Podle dostupných dat se prognóza pacientky významně zhoršuje již při nádorovém reziduu nad 1 cm. Optimálním výsledkem cytoredukční operace je tedy žádný makroskopický nádor, suboptimální pooperační reziduum menší než 1 cm [39]. Prognóza pacientky s pokročilým ovariálním karcinomem významně koreluje s úspěšností cytoredukční operace. Centralizace této malignity do onkogynekologického centra je pro prognózu pacientky velmi důležitým faktorem. Regulační CD4+ T lymfocyty (Treg) tvoří 1-5% lymfocytů v periferní krvi. Jsou někdy označovány jako supresorové lymfocyty, protože mají schopnost potlačovat aktivitu efektorových T lymfocytů. Podílejí se tím výrazně na kontrole protinádorové imunity. Na základě dat z několika studií bylo zjištěno, že iatrogenní snížení množství Treg v periferní krvi zlepšuje prognózu pacientek, nejspíše posílením efektu přirozené protinádorové imunity. V naší studii bylo zjištěno, že rychlost navýšení počtu Treg (slope of the Tregs trend line) v periferní krvi je statisticky významným prediktorem časně recidivy onemocnění. U pozdních recidiv jsme ale tento jev neprokázali. Na základě výsledků studie jsme zjistili, že pravidelná monitorace Treg v periferní krvi má u pacientek s ovariálním karcinomem omezenou informační hodnotu. Studium Treg v periferní krvi výrazně prohloubilo naše znalosti u pacientek s diagnózou karcinomu ovaria. Nicméně pravidelná monitorace Treg v periferní krvi není v rutinní klinické praxi pro pacientku přínosná. Důležitým zjištěním je, že množství Treg vyskytující se v nádoru se významně liší v různých stádiích onemocnění. V pokročilých stádiích dochází k chemotaxi Treg z periferní krve do nádorové tkáně. Intratumorálně lokalizované Treg se významně podílejí na zvýšení imunopresivního mikroprostředí uvnitř nádoru.

6.2 Srovnání účinku jednotlivých chemoterapeutik v metronomických dávkách (cyklofosfamid, etoposid) na množství T- regulačních lymfocytů

V naší studii jsme podávali metronomické dávky cyklofosfamidu nebo etoposidu (viz. kapitola 2.6.3) jako konsolidační terapii po ukončení primární chemoterapie. Efekt konsolidační terapie na množství Treg v periferní krvi ani na prognózu pacientek, ve smyslu prodloužení PFS, nebyl prokázán. Do studie bylo zařazeno celkem 46 pacientek, z toho 19 pacientek užívalo konsolidační terapii. Z tohoto malého počtu pacientek nelze učinit validní závěr, zda konsolidační terapie (cyklofosfamid resp. etoposid) má efekt na zlepšení prognózy pacientek. K tomuto závěru by byla nutná studie zahrnující řádově stovky pacientek, tak jak je tomu u velkých komerčních studií zaměřených např. inhibitory angiogeneze, příp. PARP inhibitory. Hlavním úkolem této studie bylo zhodnotit efekt podávání metronomických dávek cyklofosfamidu resp. etoposidu na množství Treg v periferní krvi a také snášenlivost této léčby v dlouhodobém podávání (intervalově po dobu 6 měsíců, viz. kapitola 2.6.3). U žádné z 19 pacientek nebyl zjištěn závažný nežádoucí účinek, který by byl důvodem k ukončení podávání konsolidační terapie. Jediným nežádoucím účinkem byly lehké zažívací obtíže, zejm. nauzea. Tyto nežádoucí účinky zpravidla vymizely během několika dní nebo týdnů užívání. Cyklofosfamid ani etoposid v metronomických dávkách nesnižoval signifikantně množství Treg v periferní krvi.

7 Poděkování

Děkuji svému školiteli prof. Lukášovi Robovi za odborné vedení, jak ve vědecké práci, tak v praktické výuce na Gynekologicko-porodnické klinice. Rád bych také upřímně poděkoval prof. Radku Špíškovi za odborné vedení v oblasti imunologie, RNDr. Anně Fialové za cenné rady a odbornou pomoc při tvorbě publikací a celému kolektivu pracovníků Ústavu imunologie za skvělou spolupráci. V neposlední řadě děkuji své rodině, bez jejíž silné podpory by tato práce nikdy nevznikla.

8 Seznam citované literatury

1. Anglesio MS. et al., *Molecular characterization of mucinous ovarian tumours supports a stratified treatment approach with HER2 targeting in 19% of carcinomas*. J Pathol. 2013 Jan;229(1):111-20.
2. Audeh MW. et al, *Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 563 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial*. Lancet 2010;376:245–51.
3. Auersperg N., *The origin of ovarian carcinomas: a unifying hypothesis*. Int J Gynecol Pathol. 2011 Jan;30(1):12-21.
4. Austin RM, Norris HJ., *Malignant Brenner tumor and transitional cell carcinoma of the ovary: a comparison*. Int J Gynecol Pathol. 1987;6(1):29-39.
5. Baeriswyl V, Christofori G. *The angiogenic switch in carcinogenesis*. Semin Cancer Biol 2009; Oct;19(5):329-37.
6. Barnett B et al., *Regulatory T cells in ovarian cancer: biology and therapeutic potential*. American journal of reproductive immunology 2005;54:369-77
7. Bartůňková J.: *Protinádorová imunita*, Postgraduální medicína 8.2.2012.
8. Beral V et al., *Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls*. Lancet. 2008 Jan 26;371(9609):303-14.
9. Burger RA. et al., Gynecologic Oncology Group. *Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer*. N Engl J Med. 2011 Dec 29;365(26):2473-83
10. Bocci, G., M. Tuccori, et al. (2005). *Cyclophosphamide-methotrexate 'metronomic' chemotherapy for the palliative treatment of metastatic breast cancer. A comparative pharmacoeconomic evaluation*. Ann Oncol 16(8): 1243-52.
11. Buckstein, R., R. S. Kerbel, et al. (2006). *High-Dose celecoxib and metronomic "low-dose" cyclophosphamide is an effective and safe therapy in patients with relapsed and refractory aggressive histology non-Hodgkin's lymphoma*. Clin Cancer Res 12(17): 5190-8.
12. Burnet, FM. *The concept of immunological surveillance*. Prog Exp Tumor Res, 1970, 13, p. 1–27.

13. Coley WB., *The Treatment of Malignant Tumors by Repeated Inoculations of Erysipelas: With a Report of Ten Original Cases*. Clinical Orthopaedics & Related Research. 262:3-11, January 1991.
14. Crispens MA et al., *Response and survival in patients with progressive or recurrent serous ovarian tumors of low malignant potential*. Obstet Gynecol. 2002 Jan;99(1):3-10.
15. Cuatrecasas M. et al., *K-ras mutations in mucinous ovarian tumors: a clinicopathologic and molecular study of 95 cases*. Cancer. 1997 Apr 15;79(8):1581-6.
16. Curiel TJ et al., *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. Nat Med 2004;10:942–9.
17. Dannull J. et al., *Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells*. The Journal of clinical investigation 2005;115:3623-33.
18. DePriest PD et al., *Endometrioid carcinoma of the ovary and endometriosis: the association in postmenopausal women*. Gynecol Oncol. 1992 Oct;47(1):71-5.
19. Dunn, GP., Old, LJ., Schreiber, RD. *The three Es of cancer immunoediting*. Annu Rev Immunol, 2004, 22, p. 329–360.
20. Duska LR. et al., *When 'never-events' occur despite adherence to clinical guidelines: the case of venous thromboembolism in clear cell cancer of the ovary compared with other epithelial histologic subtypes*. Gynecol Oncol. 2010 Mar;116(3):374-7.
21. Feeley KM., Wells M., *Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy*. Histopathology. 2001 Feb;38(2):87-95.
22. Fialová A. et al., *Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: the gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells*. Int J Cancer. 2013 Mar 1;132(5):1070-9.
23. Folkman J. *Tumour angiogenesis: therapeutic implications*. New Engl J Med 1971; 285: 1182– 1188.
24. Fukunaga M. et al., *Ovarian atypical endometriosis: its close association with malignant epithelial tumours*. Histopathology. 1997 Mar;30(3):249-55.
25. Ge Y. et al., *Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome*. Cancer immunology, immunotherapy 2012;61:353-62.

26. Gebbia V, Boussen H, Valerio MR. *Oral metronomic cyclophosphamide with and without methotrexate as palliative treatment for patients with metastatic breast carcinoma*. Anticancer research 2012;32:529-36.
27. Gelmon KA. et al., *570 Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated 571 ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, 572 open-label, non-randomised study*. Lancet Oncol 2011;12:852–61.
28. Gershenson DM et al., *Recurrent low-grade serous ovarian carcinoma is relatively chemoresistant*. Gynecol Oncol. 2009 Jul;114(1):48-52.
29. Ghiringhelli F. et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative*. Eur J Immunol. 2004 Feb;34(2):336-44.
30. Ghiringhelli, F. et al. *Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients*. Cancer Immunol Immunother. 2007, 56(5): 641-8.
31. Goldie JH, Coldman AJ. *A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate*. Cancer Treat Rep 1979;63:1727-33.
32. Green JE, Hudson T. *The promise of genetically engineered mice for cancer prevention studies*. Nat Rev Cancer 2005;5:184–98.
33. Hallgrimsson J., Scully RE., *Borderline and malignant Brenner tumours of the ovary. A report of 15 cases*. Acta Pathol Microbiol Scand Suppl. 1972;233:56-66.
34. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, et al. *Programmed cell death 1 ligand 1 and tumorinfiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer*. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:3360–5.
35. Heintz AP et al., *Carcinoma of the ovary*. Int J Gynaecol Obstet. 2003 Oct;83 Suppl 1:135-66.
36. Hořejší V, Bartůňková J, Brdička T, Špišek R: *Základy imunologie*, 5. vydání, 2013, Triton, ISBN 978-80-7387-713-2, str. 148-150.
37. Hunn J., Rodriguez GC. et al., *Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology*. Clin Obstet Gynecol. 2012 Mar;55(1):3-23.
38. Chan JK. et al., *Do clear cell ovarian carcinomas have poorer prognosis compared to other epithelial cell types? A study of 1411 clear cell ovarian cancers*. Gynecol Oncol. 2008 Jun;109(3):370-6.

39. Chi DS. et al., *An analysis of patients with bulky advanced stage ovarian, tubal, and peritoneal carcinoma treated with primary debulking surgery (PDS) during an identical time period as the randomized EORTC-NCIC trial of PDS vs neoadjuvant chemotherapy (NACT)*. Gynecol Oncol. 2012 Jan;124(1):10-4.
40. Irvine KR. et al., *Route of immunization and the therapeutic impact of recombinant anticancer vaccines*. Journal of the National Cancer Institute 1997;89:390-2.
41. Irving JA. et al., *Synchronous endometrioid carcinomas of the uterine corpus and ovary: alterations in the beta-catenin (CTNNB1) pathway are associated with independent primary tumors and favorable prognosis*. Hum Pathol. 2005 Jun;36(6):605-19.
42. Javia LR, Rosenberg SA: *CD4+CD25+ suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens*. J Immunother. 2003 Jan-Feb;26(1):85-93.
43. Jurga E. M a kol. *Klinická a radiačná onkológia. 2. diel*. Martin: Osveta 2010. ISBN 978-80-8063-302-8, str. 1115-1125.
44. Ketabi Z. et al., *Ovarian cancer linked to Lynch syndrome typically presents as early-onset, non-serous epithelial tumors*. Gynecol Oncol. 2011 Jun 1;121(3):462-5.
45. Kindelberger DW. et al., *Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship*. Am J Surg Pathol. 2007 Feb;31(2):161-9.
46. Klemi PJ. et al., *Endometrioid carcinoma of the ovary. A clinicopathologic, histochemical, and electron microscopic study*. Obstet Gynecol. 1979 May;53(5):572-9.
47. Klener P., *Angiogeneze jako součást nádorového „ekosystému“ a možnosti jejího ovlivnění*. Klin Onkol 2010; 23(1): 14–20.
48. Kline RC. et al., *Endometrioid carcinoma of the ovary: retrospective review of 145 cases*. Gynecol Oncol. 1990 Dec;39(3):337-46.
49. Knutson KL, Disis ML, Salazar LG. *CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis*. Cancer immunology, immunotherapy 2007;56:271-85.
50. Köbel M. et al., *Differences in tumor type in low-stage versus high-stage ovarian carcinomas*. Int J Gynecol Pathol. 2010 May;29(3):203-11.

51. Kono K, Kawaida H, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, Omata H, Fujii H. CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer immunology, immunotherapy* 2006;55:1064-71.
52. Kurman RJ. et al., *WHO Classification of Tumours of the Female Reproductive Organs*, International Agency for Research on Cancer, Edition: 4th, 2014, ISBN-13: 978-9283224358, p. 15-40.
53. Kurman RJ., Shih I., *The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory*. *Am J Surg Pathol*. 2010 Mar;34(3):433-43.
54. Leake J. et al., *Immunocytochemical and serological expression of CA 125: a clinicopathological study of 40 malignant ovarian epithelial tumours*. *Histopathology*. 1994 Jan;24(1):57-64.
55. Ledermann J. et al., *Olaparib 579 maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer*. *N Engl J Med* 580 2012;366:1382–92.
56. Liyanage UK. et al., *Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma*. *J Immunol*. 2002 Sep 1;169(5):2756-61.
57. Madeiros F et al., *The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome*. *Am J Surg Pathol*. 2006 Feb;30(2):230-6.
58. Mavaddat N et al., *Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA)*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012 Jan;21(1):134-47.
59. McKenney JK et al., *Ovarian mature teratomas with mucinous epithelial neoplasms: morphologic heterogeneity and association with pseudomyxoma peritonei*. *Am J Surg Pathol*. 2008 May;32(5):645-55.
60. Miles PA., Norris HJ., *Proliferative and malignant brenner tumors of the ovary*. *Cancer*. 1972 Jul;30(1):174-86.
61. Miller AM. et al., *CD4+CD25high T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients*. *Journal of immunology* 2006;177:7398-405.
62. Morse, M. A. et al. *Immunoregulatory T cells in cancer immunotherapy*. *Expert Opin Biol Ther*. 2002 Dec;2(8):827-34.

63. Mostoufizadeh M., Scully RE., *Malignant tumors arising in endometriosis*. Clin Obstet Gynecol. 1980 Sep;23(3):951-63.
64. Ogawa S et al., *Ovarian endometriosis associated with ovarian carcinoma: a clinicopathological and immunohistochemical study*. Gynecol Oncol. 2000 May;77(2):298-304.
65. Ormandy LA. et al., *Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma*. Cancer Res. 2005 Mar 15;65(6):2457-64.
66. Peluchi C. et al., *Lifetime ovulatory cycles and ovarian cancer risk in 2 Italian case-control studies*. Am J Obstet Gynecol. 2007 Jan;196(1):83.e1-7.
67. Permuth-Wey J., Sellers TA., *Epidemiology of ovarian cancer*. Methods Mol Biol. 2009;472:413-37.
68. Perren TJ. et al., *ICON7 Investigators: A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer*. N Engl J Med. 2011 Dec 29;365(26):2484-96.
69. Pothuri B et al., *Genetic analysis of the early natural history of epithelial ovarian carcinoma*. PLoS One. 2010 Apr 26;5(4):e10358.
70. Przybycin CG et al., *Are all pelvic (nonuterine) serous carcinomas of tubal origin?* Am J Surg Pathol. 2010 Oct;34(10):1407-16.
71. Rob L. et al., *Význam primární chirurgické léčby v managementu „pozdních stadií“ epitelálních ovariálních karcinomů (EOC)*. Gynekolog 1997, 6(2), s. 52-55.
72. Robová H., Pilka R., *Současné trendy v chirurgii a chemoterapii ovariálních nádorů. Referátový výběr z onkologie, speciál II - gynekologické malignity, 2007: s.32-43.*
73. Rosenberg, SA, Yang JC, Restifo, NP. *Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines*. Nat Med, 2004, 10, p. 909-915.
74. Roth LM., Czernobilsky B., *Ovarian Brenner tumors. II. Malignant*. Cancer. 1985 Aug 1;56(3):592-601.
75. Sakaguchi S. et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25): Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol 1995; 155: 1151–1164
76. Salvador S. et al., *Chromosomal instability in fallopian tube precursor lesions of serous carcinoma and frequent monoclonality of synchronous ovarian and*

- fallopian tube mucosal serous carcinoma*. Gynecol Oncol. 2008 Sep;110(3):408-17.
77. Sasada T. et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression*. Cancer 2003;98:1089-99.
 78. Sato E. et al., *Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer*. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:18538–43.
 79. Savvari P et al., *Paraneoplastic humorally mediated hypercalcemia induced by parathyroid hormone-related protein in gynecologic malignancies: a systematic review*. Onkologie. 2009 Sep;32(8-9):517-23.
 80. Shankaran et al., *IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001, 410, p. 1107–1111.
 81. Shappell et al., *Diagnostic criteria and behavior of ovarian seromucinous (endocervical-type mucinous and mixed cell-type) tumors: atypical proliferative (borderline) tumors, intraepithelial, microinvasive, and invasive carcinomas*. Am J Surg Pathol. 2002 Dec;26(12):1529-41.
 82. Shih I, Kurman Rj., *Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis*. Am J Pathol. 2004 May;164(5):1511-8.
 83. Shortman K, Liu YJ., *Mouse and human dendritic cell subtypes*. Nat Rev Immunol. 2002 Mar;2(3):151-61.
 84. Soliman PT et al., *Synchronous primary cancers of the endometrium and ovary: a single institution review of 84 cases*. Gynecol Oncol. 2004 Aug;94(2):456-62.
 85. Storey DJ et al., *Endometrioid epithelial ovarian cancer : 20 years of prospectively collected data from a single center*. Cancer. 2008 May 15;112(10):2211-20.
 86. Sueblinvong T., Carney ME. *Current understanding of risk factors for ovarian cancer*. Curr Treat Options Oncol. 2009 Apr;10(1-2):67-81.
 87. Sugiyama T et al., *Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy*. Cancer. 2000 Jun 1;88(11):2584-9.
 88. Špánik S, *PARP inhibitory*. Onkológia (Bratisl.), 2010; roč. 5 (6): 360–363.

89. Underhill C, Toulmonde M, Bonnefoi H. *A review of PARP inhibitors: from bench to bedside*. Ann Oncol (2010) doi: 10.1093/annonc/mdq322. First published online: July 19, 2010
90. Valladeau J, Saeland S: *Cutaneous dendritic cells*. Semin Immunol. 2005 Aug;17(4):273-83.
- 91st Van der Burg M.E., van Lent M., Buyse M. et al.: *The Effect of Debulking Surgery after Induction Chemotherapy on The Prognosis in Advanced Epithelial Ovarian Cancer*. N. Engl. J. Med. 1995, 332, s. 629 – 634
92. Vang R. et al., *Ovarian mucinous tumors associated with mature cystic teratomas: morphologic and immunohistochemical analysis identifies a subset of potential teratomatous origin that shares features of lower gastrointestinal tract mucinous tumors more commonly encountered as secondary tumors in the ovary*. Am J Surg Pathol. 2007 Jun;31(6):854-69.
93. Viguier M. et al., *Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells*. Journal of immunology 2004;173:1444-53.
94. Walsh CS, *Two decades beyond BRCA1/2: Homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy*, Gynecol Oncol. 2015 May;137(2):343-350.
95. Woo EY. et al., *Regulatory CD4(+)/CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer*. Cancer Res. 2001 Jun 15;61(12):4766-72.
96. Yokokawa J. et al., *Enhanced functionality of CD4+CD25(high)FoxP3+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with prostate cancer*. Clinical cancer research 2008;14:1032-40.
97. Zaino RJ et al., *Synchronous carcinomas of the uterine corpus and ovary*. Gynecol Oncol. 1984 Nov;19(3):329-35.
98. Zaino RJ. et al., *Advanced stage mucinous adenocarcinoma of the ovary is both rare and highly lethal: a Gynecologic Oncology Group study*. Cancer. 2011 Feb 1;117(3):554-62.
99. Zikán M. et al., *Guideline gynekologických zhoubných nádorů: standard – Komplexní léčba ovariálních epiteliálních zhoubných nádorů, 2013*. Doporučení Onkogynekologické sekce ČGPS ČLS JEP, České onkologické společnosti ČLS JEP a Společnosti radiační onkologie a biofyziky ČLS JEP.

9 Seznam vlastních publikací

9.1 GAUK

Projekt řešený v rámci disertační práce byl podpořen Grantovou agenturou UK registrační číslo 63310/2010 s názvem: *Klinický význam T - regulačních lymfocytů v periferní krvi u ovariálních karcinomů.*

9.2 Publikace s IF ve vztahu k disertační práci

1. **Brtnický T**, Fialova A, Lastovicka J, Rob L, Spisek R. *Clinical relevance of regulatory T cells monitoring in the peripheral blood of ovarian cancer patients.* Hum Immunol. 2015 Mar;76(2-3):187-91., IF 2.282

2. Fialová A, Partlová S, Sojka L, Hromádková H, **Brtnický T**, Fučíková J, Kocián P, Rob L, Bartůňková J, Spíšek R. *Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: the gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells.* Int J Cancer. 2013 Mar 1;132(5):1070-9. Epub 2012 Aug 24, IF 5.007

3. Fucikova J, Kralikova P, Fialova A, **Brtnický T**, Rob L, Bartunkova J, Spisek R. *Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response.* Cancer Res. 2011 Jul 15;71(14):4821-33. Epub 2011 May 20, IF 9.284

9.3 Publikace bez IF v recenzovaném časopise ve vztahu k disertační práci

1. **Brtnický T**, Podrazil M, Bartunkova J, Spíšek R, Rob L. *Active cellular immunotherapy of ovarian cancer using dendritic cells.* Ceska Gynekol. 2012 Jun;77(3):215-20.