

VYDÁVÁ  
ČESKÁ LÉKAŘSKÁ  
SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ  
IČO 444359

V NAKLADATELSTVÍ  
ApS BRNO, spol. s r. o.  
IČO 543535

REDAKCE:  
Masarykův onkologický ústav Brno  
Žlutý kopec č. 7  
656 53 Brno

Sekretář redakce:  
ing. Zdeněk Bouša  
tel., fax: 543 134 226

Grafická a technická úprava:  
Bohuslav Havlíček

Tiskne Moravská typografie, a. s.  
Brno, Moravské náměstí 13  
IČO 15549763

Vychází 6krát ročně  
Roční předplatné 180 Kč  
pro studenty LF 90 Kč

Expedici na základě roční objednávky  
vyřizuje redakce

Ministerstvo kultury ČR  
MK ČR 5158  
ISSN 0862-495 X

INTERNET – vstupní adresa:  
<http://www.linkos.cz>

INDEXED IN EXCERPTA MEDICA

ČASOPIS ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI  
A SLOVENSKEJ ONKOLOGICKEJ SPOLOČNOSTI

THE JOURNAL OF THE CZECH AND SLOVAK  
ONCOLOGICAL SOCIETIES

VEDOUcí REDAKTOR: REJTHAR ALEŠ

ZÁSTUPCE VEDOUcíHO  
REDAKTORA: KOZA IVAN  
VÝKONNÝ REDAKTOR: FAIT VUK

#### REDAKTOŘI:

ČOUPEK PETR VALÍK DALIBOR  
HÁJEK ROMAN VORLÍČEK JIŘÍ  
KOCÁK IVO ŽALOUĐÍK JAN

#### REDAKČNÍ RADA:

ADAM ZDENĚK, Brno KOVAŘÍK JAN, Brno  
BABUŠÍKOVÁ OLGA, Bratislava KOZA IVAN, Bratislava  
BEDNAŘÍK OTAKAR, Praha MAYER JIŘÍ, Brno  
BEŠKA FRANTIŠEK, Ostrava MECHL ZDENĚK, Brno  
BILDER JOSEF, Brno NĚMEC JAROSLAV, Brno  
ČOUPEK PETR, Brno ONDRUŠ DALIBOR, Bratislava  
DRBAL JOSEF, Brno PAČOVSKÝ ZDENĚK, Brno  
ECKHARDT SANDOR, Budapešť PLEŠKO IVAN, Bratislava  
FAIT VUK, Brno PETRUŽELKA LUBOŠ, Praha  
HÁJEK ROMAN, Brno REJTHAR ALEŠ, Brno  
JURGA LUDOVIT, Trnava SPURNÝ VLADIMÍR, Brno  
KALLAY JOZEF, Bratislava UJHÁZY VILIAM, Bratislava  
KAUŠITZ JURAJ, Bratislava VORLÍČEK JIŘÍ, Brno  
KLAŠTERSKÝ JAN, Brusel VYZULA ROSTISLAV, Brno  
KLENER PAVEL, Praha WAGNEROVÁ MÁRIA, Košice  
KOCÁK IVO, Brno ŽALOUĐÍK JAN, Brno  
KOUTECKÝ JOSEF, Praha

<b>Přehled</b>	
Hatina J. Imunologie nádorů – současný stav a poznatky z 1. mezinárodní konference základní a klinické imunogenomiky. Část I – Interakce nádoru a imunitního systému .....	119
Hatina J. Imunologie nádorů – současný stav a poznatky z 1. mezinárodní konference základní a klinické imunogenomiky. Část II – Protinádorová imunoterapie .....	126
Mlynček M., Uharček P. Vulvární histiocytóza z langerhansových buniek .....	134
<b>Původní práce</b>	
Zemková M., Jebavý L., Čermák P., Koblíhová H., Vlček J. Vliv selektivního tlaku vybraných antibiotik na rezistenci nejčastěji se vyskytujících gramnegativních bakteriálních kmenů na oddělení klinické hematologie ve FN v Hradci Králové .....	138
Brychtová S., Fiurášková M., Sedláková E., Tichý M., Ehrmann J., Beneš M., Brychta T. Molekulární změny ovlivňující progresi maligního melanomu .....	145
Bartoňková H., Standara M., Schneiderová M. Výsledky DOBI vyšetření v Masarykově onkologickém ústavu .....	149
<b>Sdělení</b>	
Fait V., Schneiderová M., Chrenko V. Pomůcka pro výběr materiálu pro orientaci preparátu v mammární chirurgii .....	152
<b>Informace</b> .....	155
<b>Onkologické společnosti</b> .....	156

---

**CONTENTS**

<b>Review</b>	
Hatina J. Tumour immunology – present status and lessons from the 1st International Conference on Basic and Clinical Immunogenomics. Part I – Interaction between the tumour and the immune system .....	119
Hatina J. Tumour immunology – present status and lessons from the 1st International Conference on Basic and Clinical Immunogenomics. Part II – Tumour immunotherapy .....	126
Mlynček M., Uharček P. Vulvar Langerhans cell histiocytosis .....	134
<b>Original publications</b>	
Zemková M., Jebavý L., Čermák P., Koblíhová H., Vlček J. Influence of selective pressure of antibiotics on gram-negative bacterial flora resistance in the haematology unit at the Teaching Hospital Hradec Kralove, Czech Republic .....	138
Brychtová S., Fiurášková M., Sedláková E., Tichý M., Ehrmann J., Beneš M., Brychta T. Molecular changes influencing progression of malignant melanoma .....	145
Bartoňková H., Standara M., Schneiderová M. The results of DOBI examinations in Masaryk Memorial Cancer Institute .....	149
<b>Communication</b>	
Fait V. A clue for choosing appropriate material for sample orientation in breast surgery .....	152
<b>Notification</b> .....	155
<b>Oncological Association</b> .....	156

## IMUNOLOGIE NÁDORŮ – SOUČASNÝ STAV A POZNATKY Z 1. MEZINÁRODNÍ KONFERENCE ZÁKLADNÍ A KLINICKÉ IMUNOGENOMIKY.

### ČÁST I – INTERAKCE NÁDORU A IMUNITNÍHO SYSTÉMU

#### TUMOUR IMMUNOLOGY – PRESENT STATUS AND LESSONS FROM THE 1ST INTERNATIONAL CONFERENCE ON BASIC AND CLINICAL IMUNOGENOMICS.

#### PART I – INTERACTION BETWEEN THE TUMOUR AND THE IMMUNE SYSTEM

HATINA J.

UNIVERSITA KARLOVA, LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI, ÚSTAV BIOLOGIE

**Souhrn:** Vývoj nádoru je automaticky provázen spontánní imunitní odpovědí. Nádorové buňky exprimují řadu nádorových antigenů, které umožňují specifické rozpoznání buňkami imunitního systému. Jako nádorové antigeny vystupují jednak nové proteinové sekvence, které jsou výsledkem somatické mutagenese, chyb ve splicingu atp. onkogenů a tumorových supresorových genů (tumor-specifické antigeny), nebo normální buněčné proteiny nadměrně exprimované v nádorových buňkách, ať už jako pozůstatek expresního profilu výchozího buněčného typu nádoru či jakožto výsledek globálních změn v expresi genomu provázejících vývoj a progresi nádorů (tumor-asociované antigeny). Identifikace nádorových antigenů byla tradičně založena na imunologických metodikách, nové nádorové antigeny jsou v současnosti ovšem charakterizovány nejčastěji s využitím metodik moderní molekulární biologie, zejména charakterizací specifického expresního profilu nádorových buněk. Vztah imunitního systému a nádoru představuje komplexní vzájemnou interakci, která prochází během vývoje nádoru několika stádii. Počáteční kontrolní funkce imunitního systému, která charakterizuje fázi imunitního dozoru a fázi rovnováhy, je ztracena v dalších etapách vývoje nádoru, které se projevují únikem z imunitní kontroly. Tento únik je samozřejmým předpokladem vývoje nádoru do stavu klinické detekovatelnosti a je založen na dvou skupinách mechanismů – nádorem indukované imunosupresi a ztrátě rozpoznávacích antigenních struktur z povrchu nádorových buněk. Nádorem indukovaná imunosuprese může být výsledkem exprese specifických signálních molekul na povrchu nádorových buněk (fasL) či sekrece specifických cytokinů, zejména TGF- $\beta$  a IL-10, jejichž působení charakterizuje systemická imunosuprese, nebo se tato imunosuprese může zakládat na změnách v diferenciaci pomocných T-lymfocytů ve smyslu poměru Th1 a Th2 subsetů. Na interakci nádoru a imunitního systému se účastní celá řada dalších specializovaných populací leukocytů, vedle cytotoxických T-lymfocytů, které představují hlavní efektorovou populaci protinádorové imunity, se dále jedná zejména o tumor-asociované makrofágy a regulační supresorové T-lymfocyty. Rozeznání a odpověď na různé nádorové antigeny ze strany imunitního systému probíhá s velmi rozdílnou efektivitou, jejímž výsledkem je imunodominance některých antigenů. Imunitní systém působí jako významný selekční prvek vývoje imunorezistentních variant nádorových buněk v rámci procesu immunoeditingu.

**Klíčová slova:** nádorové antigeny, imunitní dozor, únik z imunitní kontroly, nádorem indukovaná imunosuprese, regulační T-lymfocyte, Th2/Th2 polarizace

**Summary:** Tumour development is generally accompanied by a spontaneous immune response towards the developing tumour. Tumour cells bear a lot of tumour antigens, which are specifically recognized by immune cells. Tumour antigens are either new protein sequences resulting from somatic mutagenesis, splicing errors etc. in oncogenes and tumour suppressor genes (tumour-specific antigens), or normal cellular proteins overexpressed or aberrantly expressed by the tumour. These latter tumour-associated antigens are either a remnant of genes expressed in a cell type, from which the tumour originates, or result from global changes in the expression of genome along the tumour development and progression. Identification of tumour antigens has been traditionally based on immunological techniques, new tumour antigens are nowadays more frequently identified, however, by means of molecular biology and especially genomics. The relationship between the tumour and the immune system is best characterized in terms of a complex mutual interaction, which takes different forms as the tumour is initiated and develops. Three stages are generally distinguished. Initially, the immune system manages to control the tumorigenic process, either by eliminating initiated tumour cells (immune surveillance) or by keeping the tumour cell population at a constant, tiny number (equilibrium). Development of clinical cancer implies previous loss of this immune control (escape). Two groups of processes underlie the escape of tumour cells – tumour-induced immunosuppression and loss of immune recognition structures from escaping tumour cells. The tumour-induced immunosuppression can result from expression of specific signalling molecules on the surface of tumour cells (fasL), secretion of specific immunosuppressive cytokines (TGF- $\beta$ , IL-10), or from changes in differentiation of helper T-lymphocytes along the Th1/Th2 paradigm. Various other specialized leukocyte populations are involved in the complex interaction between the tumour and the immune system, notably cytotoxic T-lymphocytes, which provide the main effector antitumour population, tumour associated macrophages and regulatory T-cells. Different tumour antigens tend to induce the immune response with markedly different efficacy, resulting in immunodominance of some antigens. Besides, the immune system might be regarded as an important selection pressure driving the development of tumour escape variants, a process termed immunoediting.

**Key words:** tumour antigens, immune surveillance, escape from immune control, tumour-induced immunosuppression, regulatory T-cells, Th1/Th2 polarization

Ve dnech 3.-7. října 2004 se v Budapešti sešel 1. kongres klinické a experimentální imunogenomiky. Jednalo se o velký, obecně zaměřený kongres pokrývající celou šíři současné imunologie, s metodickým důrazem ne moderní postupy molekulární biologie a obzvláště genomiky. Imunologie nádorů představovala jen relativně malou část náplně kongresu, ovšem jednotlivé příspěvky byly zvoleny tak důmyslně, že ve svém celku pokrývaly převážnou část disciplíny. Jejich přehled, doplněný o nezbytný molekulárně biologický a imunologický kontext, který na tomto místě přináším, může proto poskytnout cenný průřez současnou nádorovou imunologií.

### Imunologie nádorů

Imunologie nádorů je nesmírně komplexní hraniční disciplínou mezi dvěma obory, jejichž komplexita sama o sobě již bere dech - onkologií a imunologií. Jejím cílem je odedávna nalezení klíče k pochopení vztahu nádoru a imunitního systému a využití této znalosti pro efektivní léčbu nádorů. Nádorová imunologie má velmi dlouhou historii a za jejího zakladatele se pokládá Paul Ehrlich, který poprvé přišel s hypotézou aktivního monitorování tkání a orgánů ze strany imunitního systému s cílem včas zachytit a zničit transformované buňky; tato hypotéza byla posléze v 60. letech formulována do koncepce imunitního dozoru (1). Ze strany praktických onkologů přispěl k základům oboru zejména William Coley, který na základě pozorování spontánní remise nádorů u pacientů prodávajících horečnatou infekci provedl zřejmě první zdářilou imunoterapii, a to nespecifickou aktivací imunitního systému supernatanty z bakteriálních kultur (2, 8). Pro teoretické základy oboru mělo klíčovou roli vypracování metodik transplantace nádorů v rámci inbredních myších kmenů ve 40. a 50. letech, kdy se podařilo poprvé nade vší pochybnost demonstrovat, že transplantovaný nádor indukuje specifickou imunitní odpověď (3). Tento posun od přirozené ke specifické imunitní odpovědi musel mít pak logicky za následek postupnou charakterizaci nádorových antigenů a znalost nádorových antigenů zase nemůže vést nikam jinam než k pokusům využít těchto antigenů pro žádanou stimulaci imunitního systému odpovídající vakcinací (4).

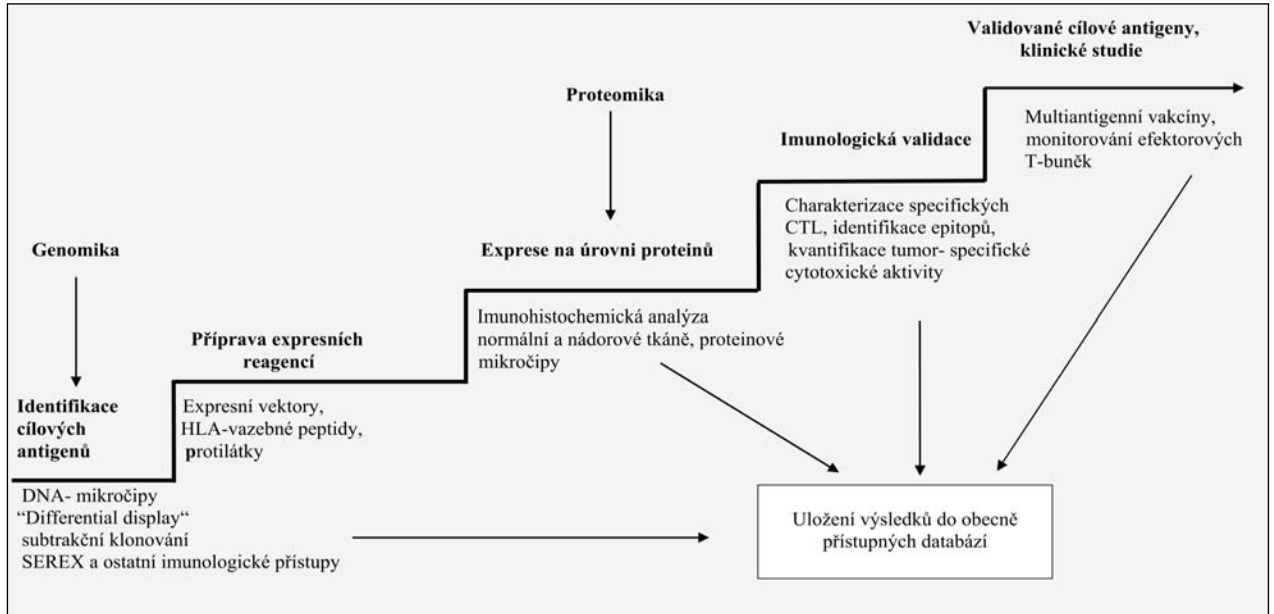
### Nádorové antigeny

Rozeznání nádorových buněk specifickým imunitním systémem implikuje existenci specifických nádorových antigenů, které jsou imunitnímu systému prezentovány ve formě komplexů peptidových fragmentů nádorových antigenů a proteinů hlavního histokompatibilitního komplexu (MHC) a které jsou po aktivaci příslušné imunitní odpovědi cílem obou základních efektorových větví specifické imunitní odpovědi, tj. humorální imunity, jejímiž antigenními receptory jsou imunoglobuliny produkované B-lymfocyty, a buněčné imunity, u níž antigen rozeznávají T-buněčné receptory (TCR) na povrchu aktivovaných T-lymfocytů, v případě protinádorové imunity zejména cytotoxických T-lymfocytů (CTL) (5). Nádorové antigeny byly na molekulární úrovni charakterizovány v době relativně nedávné, tj. až od 90. let, a v mnoha ohledech se v této otázce stal jakýmsi průkopnickým systémem maligní melanom, a to z několika příčin - relativně vysoké incidence onemocnění, relativní přístupnosti populace tumor-infiltrujících lymfocytů (TIL) a poměrně schůdně možnosti kultivace melanomových buněčných linií *in vitro* (6). Při popisu nádorových antigenů je užitečné rozlišovat dvě velké kategorie - tumor-asociované antigeny (TAA) a tumor-specifické antigeny (TSA). U první kategorie asociovaných antigenů se jedná o normální buněčné proteiny, které jsou z nějakého důvodu exprimovány s vyšší četností u určité kategorie nádorů, ale jejich exprese je vždy rovněž zaznamenána u většího či menšího rozsahu normálních buněčných typů. Patří sem zejména tzv. liniově-specifické či diferenciacní antigeny, tj. proteiny specifické pro buněčný typ, ze kterého se vyvíjí nádor (např. melanomové antigeny MART-1/Melan A, gp100, tyrozináza

a tyrozináza-příbuzné proteiny TRP-1 a TRP-2, taktéž exprimované v normálních melanocytech). Druhou velkou skupinu tumor-asociovaných antigenů tvoří onkospermatogonální antigeny (cancer/testis antigens), které jsou fyziologicky exprimovány v průběhu spermatogeneze a aberantně aktivovány v průběhu nádorové transformace. Předpokládá se, že podstatou jejich aktivace v průběhu tumorigeneze je globální demethylace genomu, která je důležitou součástí procesů imortalizace a genomické nestability nádorových buněk. Mezi onkospermatogonální antigeny patří genové rodiny MAGE-1, -2 a -3, CAGE, GAGE, SAGE, XAGE, NY-ESO-1 a PRAME; tyto antigeny nebývají vyhraněně specifické jen pro určité typy nádorů. Příbuznou skupinu představují onkofetální antigeny, které jsou kromě nádorů detekovány i v průběhu embryonálního a fetálního vývoje a mezi jejichž typické zástupce patří carcinoembryonální antigen (CEA) a antigen OFA/ILRP (immature laminin receptor protein). Expresse nádorově-asociovaných antigenů je tedy buď „zděděná“ z normálního diferenciacního programu výchozího buněčného typu, nebo pramení z globálních změn v regulaci exprese genomu (1-8). Nádorově-specifické antigeny oproti tomu představují proteiny, které nejsou exprimovány mimo nádor a zpravidla jsou i kauzálně spjata s procesem karcinogeneze. Patří sem zejména mutačně změněné onkogeny a tumorové supresorové geny, jakož i proteinové sekvence, jejichž exprese pramení z narušení mechanismů genové regulace (např. kódované introny, k jejichž expresi dochází v důsledku poruch sestřihu). Zvláštní skupinu nádorových antigenů pak představují antigeny virové, u virově-indukované tumorigeneze, a antigeny klonální, tj. např. povrchové imunoglobuliny a T-buněčné receptory u nádorů vycházejících z B- a T-lymfocytů (3, 7). Identifikace a charakterizace nádorových antigenů tradičně vycházela z imunologických technik, kdy nádorem indukované imunologické efektoři byly použity ke screeningu expresních či peptidových knihoven; tento postup bývá někdy souborně označován jako reverzní imunologie. Takto byly identifikovány a charakterizovány jak nádorově specifické, tj. mutované antigeny (např. ribozomální protein L9, helikáza p68,  $\beta$ -katenin, cyklin-dependentní kináza 4 aj.), tak nádorově asociované antigeny, např. rodin MAGE a NY-ESO-1 (3, 9). Zvláště tento posledně jmenovaný se ukázal jako velice cenný svou imunogenicitou ve smyslu indukce buněčné imunitní odpovědi, ovšem jeho izolace proběhla screenováním expresní knihovny sérem získaným z onkologických nemocných, tj. na základě samovolné humorální imunitní odpovědi (tzv. metodika SEREX - viz dále) (2). Tato souběžná humorální a buněčná imunitní odpověď ovšem zdaleka nemusí být pravidlem a řada imunitních regulačních mechanismů působí proti tomuto souběhu. Úplně opačný postup identifikace nádorových antigenů vychází z molekulárně biologické analýzy nádorů, kdy vysoce frekventní mutace či expresní změny v klíčových onkogenech či tumorových supresorových genech jsou zkoumány z hlediska jejich antigenicity. Zatímco imunologické využití mutací v *ras*-onkogenu či mutací a následně stabilizované exprese p53-tumorového supresorového proteinu se ukazuje zatím jako problematické, telomeráza se ukázala jako velmi dobrý antigenní cíl, jak je rozvedeno dále. Současné přístupy k identifikaci a charakterizaci nových nádorových antigenů s využitím metod genomiky a proteomiky představil ve svém příspěvku Dr. Laszlo Radvanyi (Aventis Pasteur, Toronto) (Obr. 1, tab.1) (2).

Uplatnění nejnovějších postupů genomiky a proteomiky v současné experimentální onkologii představuje dosti širokou problematiku přesahující možnosti tohoto příspěvku; na tomto místě chci pouze dosti povrchně zmínit základní principy analýzy prostřednictvím tzv. DNA-čipů (DNA-microarrays). Jedná se o na určitý pevný podklad (nylon, sklo) roboticky nanesené fragmenty DNA, které jsou hybridizovány s populací značených cDNA molekul, získanou izolací mRNA z příslušné tkáně či orgánu, reverzně přepsanou na cDNA a popř. ampli-

**Obr. 1. Současné přístupy k identifikaci nádorových antigenů.** Nádorový antigen musí být s vysokou preferencí exprimován nádorovými buňkami. Takové proteiny lze odhalit moderními molekulárně biologickými přístupy, jako jsou metodiky identifikace diferencially exprimovaných genů, ať už v podobě DNA-mikročipů nebo např. postupem „differential display“ či subtrahčního klonování. Výsledky získané na genové úrovni je nutné ověřit na úrovni proteinu a z takto identifikovaných nádorově-specificky exprimovaných proteinů jsou potom v řadě kroků postupně identifikovány ty, které představují skutečné nádorové antigeny, tj. jsou prezentovány nádorovými buňkami a jsou schopny zprostředkovat cytotoxicitu protinádorových efektorových T-lymfocytů. Na tuto imunologickou validaci pak navazuje formulování protinádorových vakcín a jejich klinické testování. V celém průběhu tohoto procesu jsou údaje ukládány do obecně přístupných databází a dále zpracovávány bioinformatickými přístupy. Upraveno podle ref. 2.



fikovanou prostřednictvím polymerizační řetězové reakce (PCR). Při analýze se mohou uplatnit dva základní scénáře. Prvním klasickým uspořádáním je použití tzv. „cDNA-microarrays“, kdy na daný podklad jsou naneseny fragmenty cDNA-molekul známých genů. Ze srovnávaných buněčných populací, např. nádorových a odpovídajících normálních buněk, jsou připraveny populace cDNA-molekul, které jsou fluorescenčně značeny odlišnými fluorofory (např. cDNA připravená z nádorových buněk zeleně a z normálních buněk červeně). Obě cDNA populace jsou potom smíchány v poměru 1:1 a hybridizovány na příslušný cDNA-mikročip. Z poměrů červeného a zeleného fluorescenčního signálu na hybridizovaném mikročipu lze potom identifikovat geny, specificky nadměrně či naopak redukovane exprimované v příslušných dvou buněčných populacích (10, 11). Druhým možným uspořádáním jsou oligonukleotidové čipy, například fy Affimetrix. V tomto případě jsou přímo na daném pevném podkladu syntetizovány oligonukleotidové sondy pro jednotlivé geny, obvy-

kle kolem 25 nukleotidů dlouhé. Přitom každý zkoumaný gen je zachycen několika sondami odvozenými z různých oblastí genu a ke každému oligonukleotidu s dokonalou shodou vůči známé sekvenci genu (PM-oligonukleotidy – perfect match) jsou syntetizovány oligonukleotidy se sekvenční odchylkou uprostřed (MM-oligonukleotidy – mismatch). Toto uspořádání skýtá principiálně jinou možnost experimentální analýzy, než je tomu u cDNA-čipů. Hybridizace k PM a MM-oligonukleotidům totiž poskytuje unikátní hybridizační vzor, který je přímo závislý na koncentraci příslušné sondy (tedy mRNA v analyzovaném vzorku) a tímto způsobem lze tedy odvodit přímo relativní expresní hladiny jednotlivých genů v jediném analyzovaném vzorku (12).

Dr. Radvanyi použil právě toto druhé experimentální uspořádání, tj. na zakázku dělané oligonukleotidové čipy fy Affimetrix, jejichž pomocí screenoval 54 vzorků karcinomu prsu oproti 150 normálním dospělým tkáním a buněčným typům, představujícím v současnosti nejrozsáhlejší reprezentativní profil normální genové exprese u člověka. Výsledkem byla izolace pěti nových genů specifických pro vysoký podíl nádorových vzorků (označených jako BFA4, BFA5, BFY3, BCZ4 a BCY1). Jedním z kritérií pro selekci uvedených nádorově specifických genů z pohledu možné terapeutické protinádorové vakcinace je vzájemně se doplňující expresní profil v nádorech (např. BAF4 a BFY3 jsou v různých nádorech alternativně exprimovány); pomocí takto vzájemně se doplňujících nádorově specifických genů kolektivně pokrývajících rozhodující část nádorových vzorků je možné koncipovat multiantigenní vakciny, účinné vůči velkému podílu nádorů. Z funkčního hlediska je mezi těmito 5 nádorově specifickými geny zřejmě nejzajímavější BCZ4, který je totožný s genem pro N-acetyltransferázu NAT-1, propůjčující rezistenci vůči doxorubicinu, a BCY1, což je RNA-vazebný protein podle všeho regulující motilitu a proliferaci nádorových buněk (imunohistochemická analýza exprese v izolované rostoucí koloniích buněčné linie odvozené z nádoru prsu BT474 odhalila specifickou expresi na okrajích kolonie, což je zřejmý ekvivalent té části nádoru, která aktivně invaduje do okolí). V současnosti probíhá imunologická validace takto definovaných potenciál-

**Tab. 1. Ideální vlastnosti nádorového antigenu z hlediska návrhu protinádorové vakciny.**

Nadměrná exprese v >95 % buněk pozitivně klasifikovaného nádoru a v >50% analyzovaných klinických nádorů (analyzováno imunohistochemicky)
Expresse v životně důležitých normálních tkáních nesmí být detekovatelná, exprese v ostatních orgánech (gonády, kůže) je přípustná
Vysoká imunogenicita, indukce buněčné imunitní odpovědi jak na úrovni CD8 <sup>+</sup> tak i CD4 <sup>+</sup> T-lymfocytů u normálních osob i onkologických pacientů
Stabilní exprese v primárním nádoru i metastázách
Úroveň exprese je minimálně ovlivněna chemo- a imunoterapií
Může být snadno kombinován s jinými antigeny v rámci multiantigenních vakcín, nevykazuje imunodominanci vůči jiným antigenům
Expresse není dotčena rozsáhlejší variabilitou na úrovni splicingu, popř. na dalších expresních úrovních

Upraveno podle ref. 2.

ních nádorových antigenů, to znamená, že je třeba odhalit, jestli jsou peptidy těchto proteinů prezentovány (obecně a zejména nádorovými buňkami), jestli je možné izolovat klony cytotoxických T-lymfocytů schopných rozeznat takto prezentované antigeny a jestli jsou tyto cytotoxické T-lymfocyty schopny zabít prezentující nádorové buňky. Řadu těchto experimentů lze provádět *in vitro* (například velmi výhodná je v této fázi imunologické validace thymomová buněčná linie T2, která nese mutaci v genu pro peptidový transportér TAP-1, v důsledku čehož jsou na buněčném povrchu vystaveny pouze nestabilní prázdné prezentující komplexy HLA-A2 molekul, které je možné stabilizovat externím přidáním zkoumaných antigenních peptidů). Důležitým prvkem *in vivo*-analýzy je pak ve fázi imunologické validace HLA-A2-transgenní myš, která umožňuje přímou imunizaci a následnou izolaci a analýzu myších HLA- a antigen-specifických T-lymfocytů a rovněž umožňuje formulovat vakcinační schéma. Projekt Dr. Radvaniho se v současnosti nachází v tomto stádiu.

### Interakce nádoru a imunitního systému

Nutným logickým důsledkem samotné kategorie nádorových antigenů je rozeznání nádoru efektorovými mechanismy imunitního systému, tedy protinádorová imunitní odpověď. Podle současných modelů prochází protinádorová imunitní odpověď v průběhu karcinogeneze třemi stádii. Ve stádiu imunitního dozoru (immune surveillance) má ve vzájemném vztahu transformované buňky a imunitního systému navrch právě imunitní systém, který je schopen rozeznat a zničit transformovanou buňku dříve, než by dala vznik nádoru. Právě tohoto mechanismu se dovolávali Paul Ehrlich, Macfarlane Burnett a George Thomas, kteří vědecky koncipovali teorii imunitního dozoru. Klinicky detekovatelné nádory samozřejmě nemohou již podléhat mechanismům imunitního dozoru a v jejich případě se hovoří o úniku z imunitního dozoru čili „escape“ (viz dále). Předpokládá se dále, že mezi oběma krajními fázemi imunitního dozoru a úniku existuje ještě fáze rovnováhy (equilibrium), při které zůstává populace nádorových buněk konstantní a pod úrovní klinické detekovatelnosti, nicméně imunitní systém ji není schopen eliminovat. Ve prospěch této rovnovážné fáze hovoří klinická pozorování náhlého se objevení nádorů v transplantovaných orgánech, přičemž zpětně se zjišťuje, že dárci transplantátů byli před léty úspěšně vyléčeni z nádorového onemocnění; předpokládá se přitom, že imunosupresivní posttransplantační léčba ruší rovnováhu na úkor imunitního systému a přítomný mikronádor velice snadno přechází do „escape“-fáze (13).

Samotný imunitní dozor představuje zřejmě nejproblematictější fázi tohoto vztahu, jejíž vnímání také prošlo nejdramatictější vývojem, od jeho vyzvání jakožto bariéry proti celosvětové epidemii nádorových onemocnění v klasických teoriích až po jeho popření na konci 90. let. Problémem je, že tato fáze je implicitně klinicky neanalyzovatelná a celá tato koncepce imunitního dozoru stojí na využití modelových experimentálních systémů, popř. na epidemiologických pozorováních u imunosuprimovaných lidských populací. Právě tento druhý směr analýzy poskytl nejvíce argumentů proti obecné roli imunitního dozoru – u pacientů podrobujícím se dlouhodobé imunosupresi po orgánových transplantacích či např. u infikovaných HIV nedochází k žádnému dramatickému nárůstu nejčastějších nádorů, imunosupresi provázající nádorová onemocnění zahrnují především určité specifické hematologické nádory a zejména virově indukovaná nádorová onemocnění (3). Co se týče experimentálních zvířecích modelů, nejnovější pokusy s myšími modely vytvořenými metodikami cílené manipulace genomu, popř. s cílenou deplecí definovaných populací leukocytů, přinesly spíše důkazy pro existenci imunitního dozoru. Řada myších kmenů s cíleně vnesenými defekty imunitního systému vykazuje signifikantně zvýšenou citlivost vůči etablovaným protokolům chemické karcinogeneze. Ukázalo se přitom, že velmi významnou, možná i roz-

hodující úlohu v imunitním dozoru hrají složky přirozené (neadaptivní) imunity. Signifikantně zvýšená citlivost vůči chemické karcinogenezi byla např. sledována u myši nemajících  $\gamma\delta$  T-lymfocyty (*TCR $\gamma$ -/-* knockout), NK- a NK T-buňky (deplece specifickou protilátkou), a rovněž u *IFN $\gamma$ -/-*, *IFNGR -/-* a *STAT1 -/-* knockout kmenů (13). Konečně, existenci často velmi důmyslných a komplexních mechanismů nádorem-iniciované imunosuprese (viz dále) lze rovněž pojmut jako nepřímý důkaz imunitního dozoru – kdyby neexistovala žádná imunitní odpověď na vyvíjející se nádor, bylo by stěžejí vysvětlitelné, že by se v něm rozvinuly tyto dokonalé mechanismy protiútoky v podobě paralýzy celé řady imunitních efektorových mechanismů.

Jiný aspekt velmi časně imunitní odpovědi vůči nádoru vyplynul z příspěvku Dr. Anne-Lise Børresen-Dale (Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, Oslo). Jedna z otázek, kterou si ve svém příspěvku položila, byla – existuje nějaký buněčný typ, který by působil jako obecný „senzor“ vyvíjejícího se nádoru? Experimentální schéma, které použila bylo následující. Od pacientek, podstupujících diagnostickou mamografii, byly současně s vyšetřením odebrány vzorky leukocytů periferní krve a expresní profil genů v této heterogenní buněčné populaci byl korelován s následnou diagnózou. Skutečně se podařilo identifikovat skupinu genů specificky exprimovaných u leukocytů vzorků z pacientek posléze pozitivně diagnostikovaných, a prakticky všechny tyto geny odpovídají expresnímu profilu aktivovaného neutrofilu. Toto pozorování ukazuje na časnou zánětlivou reakci na nádor a potvrzuje postavení zánětu jakožto jednoho z markerů nádoru.

Zánětlivá odpověď ovšem představuje velice komplexní problém v nádorové imunologii. Na jedné straně zánět může představovat rozhodující mechanismus přechodu od přirozeně neadaptivní k antigen-specifické imunitní odpovědi (zánětlivé cytokiny působí např. dokončení diferenciace dendritických buněk, které jsou schopny s vysokou účinností prezentovat nádorové antigeny naivním T-lymfocytům a aktivovat je) (5), na druhé straně dochází s rozvojem populace tumor-asociovaných makrofágů (TAM) k růstovému synergismu s nádorovými buňkami i k rozvoji mechanismů umožňujících ustavení tolerance vůči nádoru a tedy úniku nádoru z imunitní kontroly (8, 14).

### Imunitní odpověď vůči nádoru

Samotná existence nádorových antigenů, z nichž nemalá část byla ostatně objevena metodami reverzní imunologie, implikuje existenci spontánní imunitní odpovědi vůči nádoru. Její existence, zejména ve formě tumorantigen-specifických T-lymfocytů a protilátek, byla přesvědčivě popsána v řadě prací u širokého spektra nádorů a lze ji dnes pokládat za prokázanou. Dokonce na příkladu melanomu se ukázalo, že intenzita této odpovědi, přinejmenším v kvantitativním vyjádření, tj. kvantifikací nádorově specifických T-lymfocytů, se zvyšuje paralelně s progresí nádoru. Postuluje se přitom, že zejména metastazování do spádových mízních uzlin, spolu se zvyšující se kvantitou nádorových antigenů s rostoucí nádorovou masou, představují výrazné aktivační signály pro expanzi a diferenciaci nádorově-specifických efektorových buněk. Tato spontánní protinádorová imunitní odpověď vykazuje významné inter-individuální rozdíly a příznačná je přitom zejména ta skutečnost, že tyto rozdíly nijak nekorelují s klinickým průběhem onemocnění (15). Nádorové buňky totiž v průběhu nádorové progresy aktivují mechanismy úniku z této imunitní kontroly, které jsou schopny dopad této imunitní odpovědi efektivně neutralizovat. Těchto „escape“-mechanismů byla popsána celá řada a stále jsou objevovány nové. Zčásti jsou dílem samotných nádorových buněk, zčásti pak kooptovaných populací imunitních buněk, zejména tumor-asociovaných makrofágů (TAM) a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulačních T-lymfocytů. V principu můžeme tyto mechanismy rozdělit do dvou skupin - mechanismy systematické i lokální paralýzy efektorových mechanismů protinádo-

rové imunity a mechanismy ztráty struktur na povrchu nádorových buněk umožňujících jejich rozpoznání a likvidaci efektorovými imunitními buňkami.

Byla popsána řada systemických změn imunitního systému onkologických pacientů, a to jak na velmi povšechné polyklonální úrovni, tak na úrovni nádorově antigen-specifických buněk; vzhledem k tomu, že s výjimkou nejpokročilejších stádií nevykazuje imunitní systém pacientů s nádory obecné disfunkce, např. v reakci na infekci, lze předpokládat, že pozorování na obecné i na antigen-specifické úrovni popisují v zásadě tytéž fenomény. Na úrovni oněch obecných pozorování se například uvádí snížená proliferativní odpověď periferních lymfocytů na mitogenní stimulaci či snížená cytolytická aktivita NK-buněk. Tyto funkční defekty na úrovni lymfocytů periferní krve jsou zpravidla mírnější než je tomu na úrovni populace tumor-infiltrujících lymfocytů (TIL) - z toho lze usuzovat, že část paralyzujících efektů nádoru na imunitní systém má systemickou povahu, větší část se ovšem odehrává v rámci mikroprostředí nádoru. Produkce imunosupresivních cytokinů, zejména transformujícího růstového faktoru- $\beta$  a interleukinu-10, jakož i dalších imunosupresivních látek, jako jsou prostaglandiny, by mohla mít onen systemický efekt, ovšem i zde, vzhledem k obecné povaze cytokinů působit na krátké vzdálenosti mezi buňkami, lze předpokládat zvýšený efekt na úrovni samotného nádoru. V řadě modelových situací byla úloha TGF- $\beta$  a IL-10 v nádorové imunosupresi experimentálně prokázána, nicméně také platí, že, jako u všech cytokinů, se jedná o pleiotropní regulační molekuly, jejichž regulační působení může být velmi rozdílné v různém biologickém kontextu a pro oba cytokiny též bylo popsáno určité specifické aktivační působení (16).

Co se týče nádorově specifických efektorových buněk, zdá se, že jsou často ve zvýšené míře směřovány k apoptóze. To může být výsledkem celé řady navzájem komunikujících mechanismů. Efektorové buňky protinádorové imunity vykazují specifické signální defekty, zejména ztrátu  $\xi$ -proteinu, který je součástí TCR-signálního komplexu cytotoxických T-lymfocytů a FC $\gamma$ RIII-komplexu NK-buněk, a dále poruchy signální dráhy transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B. Zvláště tato druhá porucha by mohla mít kauzální postavení pro větší apoptotickou náchylnost těchto buněk, neboť mezi cílové geny NF- $\kappa$ B patří významné antiapoptotické geny - *Bcl-2*, *Bcl-XL* a buněčné inhibitory apoptózy (*cIAP*), a rovněž gen pro interleukin-2. Co se týče  $\xi$ -podjednotky receptorových komplexů, tam je situace složitější, poněvadž na jedné straně samozřejmě nedostatečný „první“ signál přes TCR-komplex může orientovat cytotoxický T-lymfocyt směrem k apoptóze, na druhé straně samotná  $\xi$ -podjednotka byla identifikována jako přímý substrát kaspáz -3 a -7. Další z možných spouštěcích drah apoptózy je samozřejmě dráha fasL - fas; byla popsána řada agresivně rostoucích nádorů konstitutivně exprimujících fasL a bylo přineseno dostatek důkazů ve prospěch hypotézy, že tato konstitutivní exprese přímo indukuje apoptózu tumor-infiltrujících lymfocytů exprimujících receptorovou molekulu fas. Ani tady není ovšem zřejmě situace takto černobílá, neboť se ukázalo, že zvýšená exprese fasL u experimentálních transplantovaných nádorů působí jako aktivační signál pro neutrofile, které působí rychlé zničení transplantovaného nádoru. Tato funkce aktivovaných neutrofilů je přitom zrušena působením TGF- $\beta$  (16, 17).

Zvýšená úroveň apoptózy efektorových buněk protinádorové imunity nachází svůj výraz ve dvou obecných pozorováních. Za prvé, nebývá provázána lymfopenií, to znamená že musí být kompenzována rychlejším obratem buněk (17). Za druhé způsobuje, že zejména cytotoxické T-lymfocyty zřídka dosahují terminálních diferenciacních stádií charakterizovaných vysokou expresí cytotoxických molekul perforinu a granzymu B (15).

Co se týče únikových mechanismů na úrovni samotných nádorových buněk, tyto mechanismy můžeme rozlišit do dvou sku-

pin - mechanismy rezistence vůči imunitnímu útoku a mechanismy ukrytí se před rozpoznáním imunitním systémem. Pokud se jedná o mechanismy rezistence, na prvním místě z hlediska klinického významu stojí mechanismy rezistence vůči indukované apoptóze, poněvadž ty mohou stát právě tak dobře za chemorezistencí nádorových buněk. Byla jich popsána celá škála podél jednotlivých apoptózu-indukujících signálních drah, tj. v případě útoku imunitních efektorových buněk dráha perforin - granzym B a fasL - fas. Jeden z nově popsaných mechanismů rezistence nádorových buněk zneužívá seobrany vlastních cytotoxických lymfocytů proti nahodilé aktivaci intracelulárního granzymu B. CTL exprimují inhibitor granzymu B ze skupiny serpinů, známý jako proteinázový inhibitor -9 (PI-9), a aktivace exprese PI-9 byla popsána u celé řady lidských klinických i experimentálních myších nádorů - není potom divu, že jsou rezistentní vůči útoku CTL. Co se týče dalších efektorových mechanismů protinádorové imunity, u řady nádorů byla popsána zvýšená exprese proteinů typu DAF (decay accelerating factor) - CD46, CD55 a CD59 - se zřejmým dopadem v podobě rezistence vůči působení komplexu (16).

Pokud jde o ztrátu rozpoznávacích struktur, nejčastěji se jedná o ztrátu povrchové exprese MHC-glykoproteinů I. třídy a o ztrátu exprese tumor-asociovaných antigenů. Expese MHC genů a proteinů I.třídy může mít celou řadu příčin, jak na úrovni genů, tak na úrovni represe jejich exprese, a jak na úrovni samotných MHC-genů, tak na úrovni dalších proteinů zúčastněných v procesu prezentace antigenu, například peptidových transportérů TAP-1 a -2. Logickým důsledkem je potom ztráta antigenních struktur z povrchu nádorových buněk, a tedy ztráta specifického rozeznání imunitním systémem (1, 3, 16). Různorodost těchto mechanismů nádorové imunoprese může nacházet svůj protějšek v buněčné heterogenitě uvnitř nádoru - různé mechanismy mohou být současně vyjádřeny různými subpopulacemi nádorových buněk. Imunitní systém pak působí jako důležitý selekční prvek buněčné evoluce nádoru. Vztah nádoru a imunitního systému je tedy oboustranná komplexní interakce, kdy spontánní imunitní odpověď může být jednou z hnacích sil nádorové progresy ústící ve stav imunitní suprese a rezistence - tato relativně nová koncepce byla označena jako imunoeediting (13).

### Regulační T-lymfocyty

Koncepce regulačních supresorových T-lymfocytů jakožto jednoho z velmi důležitých mechanismů periferní tolerance začíná v posledních několika letech své znovuzrození, poté co byla po více než jednu dekádu téměř zakázána (18). Jedny z prvních náznaků aktivní role supresorových buněk lze najít již na počátku 80. let, a to současně ve fotoimunologii i nádorové imunologii. V první oblasti stojí za zmínku pozorování, že UV-ozářené myši se stávají necitlivé vůči aplikaci kontaktních alergenů, což je výsledkem antigen-specifické tolerance, která může být přenesena na neošetřená zvířata splenocyty tolerizovaných myši, přičemž jako kritická byla shledána populace T-lymfocytů (5). Naprosto analogicky se chovají UV-indukované myši nádory; jedná se zpravidla o silně imunogenní nádory, po transplantaci vyvolávající prudkou imunitní reakci ústící v odhojení transplantovaného nádoru (typ nádoru označený jako „regresor“), přesto však vykazující progresivní růst končící smrtí u té myši, u níž byl indukován ozářením (3). To je opět v souladu s modelem UV-indukované aktivní suprese, která paralyzuje protinádorovou imunitní odpověď v prvotním hostiteli přes nepochybnou silnou imunogenicitu nádoru.

Problematika regulačních T-lymfocytů začala nabývat konkrétnějších obrysů koncem 90.let, kdy byla několika týmy nezávisle charakterizována jedna specifická populace těchto supresorových buněk, která je charakterizována kombinací exprese CD4 a konstitutivní exprese  $\alpha$ -podjednotky receptoru pro IL-2 (CD25), na úrovni jaderných regulačních proteinů

charakterizuje tuto buněčnou populaci přítomnost transkripčního represoru FOXP3. Aktivačními antigenními peptidy pro CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg-buňky jsou peptidy organismu vlastních „self“-proteinů, po této antigenní stimulaci autoantigeny se stávají ve svém supresorovém působení nezávislými na antigenu a jsou schopny efektivní inhibice efektorových buněk, a to zřejmě současně několika mechanismy jako je přímý mezibuněčný kontakt či sekrece imunosupresivních cytokinů. Jedná se o minoritní populaci T-lymfocytů (5-10%), která prokázala své schopnosti suprese efektorových mechanismů imunity v různých modelových situacích, jako jsou autoimunní reakce či odhojení transplantátu. A poněvadž stěžejní část experimentální nádorové imunologie vždy vycházela z metodiky transplantace nádorů, nenechal na sebe dlouho čekat nálezy, že deplece této lymfocytární populace  $\alpha$ -CD25 monoklonální protilátkou zvyšuje imunitní odpověď vůči transplantovanému nádoru (19).

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg-buňky jsou součástí populace tumor-infiltrujících lymfocytů a vysoké hladiny těchto buněk byly nalezeny v nádorech plic, prsu, pankreatu a vaječnících. Právě posledně jmenovaný typ nádoru byl v době velmi nedávne podroben v tomto ohledu podrobné analýze. Ukázalo se, že tyto buňky byly v nádoru signifikantně četnější než odpovídá fyziologickým periferním hodnotám (až 23%), přičemž jejich hladina se zvyšovala s progresí nádoru, souběžně ovšem klesala ve spádových místních uzlinách. Jako atraktant regulačních T-lymfocytů byl identifikován chemokin CCL22, produkovaný jak nádorovými buňkami samotnými tak tumor-asociovanými makrofágy; regulační T-lymfocyty přitom exprimovaly odpovídající chemokinový receptor CCR4. Tyto s nádorem asociované Treg-lymfocyty byly schopny efektivně blokovat tumor-specifické cytotoxické T-lymfocyty jak *in vitro*, tak *in vivo* v xenotransplantátovém modelu, přičemž tento inhibiční efekt byl blokován  $\alpha$ -CCL22 protilátkou. Podstatné je též pozorování, že hladina nádorových regulačních T-lymfocytů představovala významný negativně prognostický faktor onemocnění; toto pozorování znovu ilustruje obecné paradigma existující spontánní imunitní antitumorové reakce, která musí být v zájmu vývoje nádoru paralyzována (20, 21).

Důležitou praktickou otázkou, pokoušíme-li se definovat postavení regulačních T-lymfocytů v nádorové biologii, je identifikace jejich antigenů. V jednom případě, na modelu maligního melanomu, byl tento antigen identifikován jako LAGE-1, což je zástupce tumor-asociovaných antigenů typu „cancer-testis“ (22). Jiné vodítko v této oblasti zmínila ve svém příspěvku Dr. Aija Line (Biomedical Research and Study Centre, University of Latvia, Riga), která se zaměřila na využití SEREX-metodiky (viz výše) v procesu identifikace nádorových antigenů. Jde o to, že protilátky sér onkologických nemocných často identifikují právě řadu normálních buněčných proteinů, a byl podán důkaz, že takto definované konstitutivní SEREX-identifikované proteiny mohou představovat „self“-antigeny nutné k aktivaci právě CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulačních T-lymfocytů. Zajímavé přitom je, že současná imunizace nádorovým a SEREX-antigenem zvyšuje intenzitu efektorové odpovědi, zatímco imunizace pouze SEREX-antigeny navozuje stav tolerance vůči nádoru právě v důsledku aktivace CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg-buněk. Celkový osud imunitní odpovědi tedy do značné míry závisí na antigenním kontextu (23).

#### Regulace protinádorové imunitní odpovědi prostřednictvím Th1 a Th2 subpopulací pomocných T-lymfocytů

Jakákoliv antigen-specifická imunitní odpověď vyžaduje kromě rozeznání antigenu efektorovými buňkami (B-lymfocyty či cytotoxické T-lymfocyty) ještě další signál doručený příslušným antigenem aktivované buňce pomocnými T-lymfocyty, jednak ve formě tzv. kostimulačních povrchových molekul, jednak ve formě cytokinů (5). Na základě repertoáru exprimovaných cytokinů bývají pomocné T-lymfocyty klasifikovány do dvou subpopulací označovaných jako Th1 a Th2.

Tyto polarizované populace pomocných T-lymfocytů diferencují z tzv. Th0 prekursorů pod vlivem dosti komplexních a ne úplně pochopených signálů od antigen prezentujících buněk (APC), svou úlohu přitom hrají jednotlivé kostimulační molekuly exprimované na povrchu APC, typ antigenu a cytokinové prostředí, v němž tato diferenciace probíhá. Th1 subpopulace diferencuje hlavně pod vlivem interleukinu-12 a jejím klasickým vlastním cytokinem je IL-2 a zejména interferon  $\gamma$ . Th1 buňky se tak podílí zejména na aktivaci buněčné imunitní odpovědi aktivací NK-buněk, CTL a makrofágů, a na zánětlivé reakci. Th2 - subpopulace diferencuje pod vlivem a sama preferenčně syntetizuje IL-4, který spolu s dalšími secernovanými interleukiny -5, -6, -9 a -10 zejména aktivuje B-lymfocyty a humorální typ imunitní odpovědi a zároveň působí spíše protizánětlivě. Diferenciace ve směru Th1 - a Th2-subsetů mají tendenci navzájem antagonizovat, což často vede k polarizované celkové imunitní odpovědi v jednom či druhém směru. Je ovšem také pravda, že imunitní odpověď může probíhat jako integrovaná, zahrnující jak buněčnou tak humorální část; v tom případě se na její regulaci podílí buď pomocné buňky typu Th0 nebo Th1 - a Th2-subsety v jejím rámci koexistují (5, 24).

Na několika místech předchozího textu již byla zmíněna klíčová funkce buněčné imunity v imunitní odpovědi vůči nádoru. Z tohoto pohledu může hrát rovnováha mezi Th1 - a Th2-subpopulacemi pomocných T-lymfocytů velmi významnou regulační funkci. Polarizace ve směru Th1 bude zásadní pro účinnou aktivaci protinádorové imunitní odpovědi, zatímco Th2-polarizace svým inhibičním účinkem na diferenciaci ve směru Th1 bude na celkovou protinádorovou imunitní odpověď působit negativně. Uvedená disbalace Th1  $\rightarrow$ Th2 diferenciace byla skutečně popsána u celé řady nádorů, jako je kolorektální karcinom, karcinom močového měchýře, ledvin, prostaty či melanom (24).

Zajímavý příspěvek k této problematice uvedla Dr. Julia Szekeres (Department of Medical Microbiology and Immunology, Pecs University, Pecs). Její práce vyšla z oblasti reprodukční imunologie. Již delší dobu je známo, že rovněž gravidita je jedním z faktorů zasahujícím do polarizace pomocných T-lymfocytů ve směru Th2; tato polarizace patří mezi jeden z graviditu ochraňujících efektů progesteronu a jejím prostředníkem je protein zvaný PIBF, který je uvolněn z lymfocytů v odpověď na progesteronový signál. PIBF zřejmě působí na úrovni aktivace transkripčního faktoru STAT-6, což je faktor fyziologicky aktivovaný interleukinem-4 prostřednictvím dobře popsané JAK-STAT signální dráhy a hrající klíčovou a nezastupitelnou úlohu ve fyziologických dopadech IL-4 ve směru Th2-diferenciace (25). Z hlediska dopadu tohoto článku je ovšem podstatná ta část sdělení Dr. Szekeres, v jejímž rámci byla exprese PIBF prokázána nejen v lymfocytech gravidní samice, nýbrž rovněž v celé řadě nádorů - močového měchýře, varlete, ledvin, melanomu, nádorů oblasti hlavy a krku a hematologických nádorových onemocnění. Neutralizace sekrece PIBF specifickou protilátkou zvyšuje senzitivitu vůči lytickému působení NK-buněk *in vitro* a imunizace vůči PIBF signifikantně brzdí růst následně transplantovaného myelomu a melanomu. Zdá se tedy, že se jedná o další příklad toho, že nádor si je schopen osvojit z hlediska tumorigeneze naprosto nepřibuznou regulační dráhu k tomu, aby paralyzoval účinnou imunitní odpověď.

#### Imunodominance

Jedním z problémů protinádorové imunitní odpovědi, a to jak přirozené, tak stimulované specifickou vakcínou, který ovšem nebývá příliš často diskutován, je problém imunodominance. Podstatou imunodominance je skutečnost, že přestože nádorově transformovaná, popřípadě v menší míře virově infikovaná, buňka exprimuje a prezentuje současně řadu epitopů, které mohou sloužit jako cílové struktury buněčné imunitní odpovědi, imunitní systém zpravidla není schopen souběžně



imunitní odpovědi proti těmto různým antigenním strukturám. Pouze jeden nebo několik málo antigenů je v každém časovém okamžiku předmětem imunitní odpovědi - tyto antigeny se označují jako imunodominantní. Tato antigenní hierarchie má celou řadu závažných biologických a praktických důsledků. Mimo jiné velmi napomáhá selekci a progresi klonů, které unikají přirozené endogenní protinádorové imunitní reakci, a to ve dvou ohledech. Předně, imunodominance chrání nádorové buňky, které ztratily expresi imunodominantního antigenu, a to dokud jsou přítomny buňky původní nádorové populace v místě nádoru. Expresie imunodominantního antigenu totiž diktuje antigenní specifitu v místě nádoru, takže „escape“-varianty, přestože exprimují řadu dalších antigenů, jsou pro lokální imunitní odpověď neviditelné. Za druhé, v experimentálních systémech se ukazuje, že imunodominanci je možné těsně korelovat s rychlostí imunitní odpovědi proti danému antigenu - imunodominantní antigen indukuje rychlou imunitní odpověď, zatímco nástup imunitní odpovědi proti imunorecesivním

antigenům je pomalejší. Tento vztah platí při současné imunizaci různými antigeny. Pochopitelně v průběhu nádorové progresie, tedy postupné mutagenese a objevování se nových antigenních variant spolu s fenotypickou progresí nádoru není tato „startovní čára“ jednotlivých antigenů totožná - existující imunitní odpověď má tendenci se chovat dominantně vůči nově se objevujícím antigenům, takže imunitní odpověď bývá deformovaná ve prospěch časnějších benigních či méně maligních stádií, poněvadž antigeny charakterizující např. metastatické buňky mohou zůstat tímto způsobem neaktivní. Konečně, imunodominance může závažným způsobem snížit účinnost multiantigenních protinádorových vakcín, jejichž koncepci ve svém příspěvku rozebral Dr. Radvanyi (viz výše) - imunodominantní antigen nepřipustí indukci široké imunitní odpovědi proti všem antigenům v příslušné vakcíně. Imunodominance může být v tomto případě překonána oddělenou vakcínací imunorecesivními antigeny, ovšem v každém případě je nutné ji vzít v úvahu při koncipování vakcinačního schématu (26).

## Literatura

- Falk C.S., Riethmüller G., Gruber R. (2004): Tumorimmunologie. In: Hiddemann W., Huber H., Bartram C. (eds): Die Onkologie, pp.355-380, Berlin, Heidelberg: Springer.
- Radvanyi L. (2004): Discovery and immunologic validation of new antigens for therapeutic cancer vaccines. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 133, 179-197.
- Schreiber H. (1999): Tumor immunology. In: Paul W.E. (ed.): *Fundamental Immunology*, Fourth Edition, pp.1237-1270, Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Zaloudík J. (1997): Protinádorová imunoterapie. *Klinická onkologie* 10,94-96.
- Schwarz T. (2003): Immunology. In: Bologna J.L., Jorizzo J.L., Rapini P.R. (eds.): *Dermatology*, pp.65-81, New York: Mosby.
- Zarour H.M., DeLeo A., Finn O.J., Storkus W.J. (2003): Tumor antigens. In: Kufe D.W., Pollock R.E., Weichselbaum R.R., Bast R.C. Jr., Gansler T.S., Holland J.F., Frei E. (eds.): *Cancer Medicine* 6, pp.196-208, Hamilton, London: BC Decker.
- Kuball J., Derigs H.-G., Wölfel T. (2002): T-Zelltherapie in der Onkologie. Therapeutische Vakzination, allogene Blutstammzelltransplantation und adoptiver T-Zelltransfer. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 127, 755-762.
- Krejsek J., Kopecký O. (2004): Imunita a nádorové bujení. In: Krejsek J., Kopecký O.: *Klinická imunologie*, pp.541-570, Hradec Králové: Nukleus HK.
- van der Bruggen P., Traversari C., Chomez P., Lurquin C., de Plaen E., van den Eynde B., Knuth A., Boon T. (1991): A gene encoding an antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647.
- Šmardová J., Pacholík K. (2003): Molekulární podstata kancerogeneze. In: Adam Z., Vorlíček J., Koptíková J. (eds.): *Obecná onkologie a podpůrná léčba*, pp.59-90, Praha: Grada.
- Bruchová H., Brdička R. (2004): Čipové technologie v molekulární biologii. In: Jonák J. Jr., Jonák J. (eds.): *Molekulární biologie a genetika XI*, pp.7-20, Praha: Ústav molekulární genetiky AV ČR.
- Mocellin S., Wang E., Panelli M., Pilati P., Marincola F.M. (2004): DNA array-based gene profiling in tumor immunology. *Clinical Cancer Res.* 10, 4597-4606.
- Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. (2004): The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137-148.
- Al-Sarireh B., Eremin O. (2000): Tumour-associated macrophages (TAMS): disordered function, immune suppression and progressive tumour growth. *J.R.Coll.Surg.Edinburgh* 45, 1-16.
- Anichini A., Vegetti C., Mortarini R. (2004): The paradox of T cell-mediated antitumor immunity in spite of poor clinical outcome in human melanoma. *Cancer Immunol.Immunother.* 53, 855-864.
- Chambers W.H., Rabinowich H., Heberman R.B. (2004): Tumor-associated immunodeficiency and implications for tumor development and prognosis. In: Kufe D.W., Pollock R.E., Weichselbaum R.R., Bast R.C. Jr., Gansler T.S., Holland J.F., Frei E. (eds.): *Cancer Medicine* 6, pp.229-239, Hamilton, London: BC Decker.
- Whiteside T.L., Heberman R.B. (2004): Effectors of immunity and rationale for immunotherapy. In: Kufe D.W., Pollock R.E., Weichselbaum R.R., Bast R.C. Jr., Gansler T.S., Holland J.F., Frei E. (eds.): *Cancer Medicine* 6, pp.221-228, Hamilton, London: BC Decker.
- Hatina J. (2002): Molekulární biologie imunitní odpovědi - 11. mezinárodní imunologický kongres, Stockholm, 22.-27. 7. 2001. *Epidemiol. Mikrobiol. Immunol.* 51, 82-87.
- Neumann-Haefelin C., Spangenberg H.C., Thimme R., Blum H.E. (2004): Suppressor-T-Zellen: Immunologische Regulatorzellen mit klinischer Perspektive. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 129, 1627-1630.
- Curiel T.J., Coukos G., Zou L., Alvarez X., Cheng P., Mottram P., Evdemon-Hogan M., Conejo-Garcia J.R., Zhang L., Burow M., Zhu Y., Wei S., Kryczek I., Daniel B., Gordon A., Myers L., Lackner A., Disis M.L., Knutson K.L., Chen L., Zou W. (2004): Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Med.* 10, 942-947.
- Shevach E.M. (2004): Fatal attraction: tumors beckon regulatory T cells. *Nature Med.* 10, 900-901.
- Wang H.Y., Lee D.A., Peng G., Guo Z., Li Y., Kiniwa Y., Shevach E.M., Wang R.F. (2004): Tumor-specific human CD4<sup>+</sup> regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity* 20, 107-118.
- Nishikawa H., Kato T., Tanida K., Hiasa A., Tawara I., Ikeda H., Ikarashi Y., Wakasugi H., Kronenberg M., Nakayama T., Taniguchi M., Kuribayashi K., Old L.J., Shiku H. (2003): CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 100, 10902-10906.
- Lauerová L., Kocák I. (2001): Regulace protinádorové imunity pomocnými CD4<sup>+</sup> Th1/Th2 lymfocyty. *Klinická onkologie* 14, 154-156.
- Szekeress-Bartho J. (2002): Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int.Rev.Immunol.* 21, 471-495.
- Schreiber H., Wu T.H., Nachman J., Kast W.M. (2002): Immunodominance and tumor escape. *Sem.Cancer Biol.* 12, 25-31.

# IMUNOLOGIE NÁDORŮ – SOUČASNÝ STAV A POZNATKY Z 1. MEZINÁRODNÍ KONFERENCE ZÁKLADNÍ A KLINICKÉ IMUNOGENOMIKY. ČÁST II – PROTINÁDOROVÁ IMUNOTERAPIE

## TUMOUR IMMUNOLOGY – PRESENT STATUS AND LESSONS FROM THE 1ST INTERNATIONAL CONFERENCE ON BASIC AND CLINICAL IMUNOGENOMICS. PART II – TUMOUR IMMUNOTHERAPY

HATINA J.

UNIVERSITA KARLOVA, LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI, ÚSTAV BIOLOGIE

**Souhrn:** Cílem imunoterapie nádorů je ovlivnit pacientův imunitní systém v průběhu samotného nádorového onemocnění tak, aby došlo k eliminaci či alespoň redukcí populace nádorových buněk. Aktivní imunoterapie se snaží tohoto cíle dosáhnout prostřednictvím aktivní imunizace, tj. terapeutickou vakcinací. Její podstatou je specifická aktivace imunitního systému pacienta vhodnou aplikací nádorových antigenů, v nejrůznějších formách (letálně ozářené nádorové buňky, nádorové lyzáty, purifikované proteiny, peptidy, peptidy naložené dendritické buňky aj.). Dosavadní účinnost těchto postupů, vyjádřená klinickou odezvou, je nízká (3 – 10 %). Současný vývoj aktivní imunoterapie nádorů se ubírá dvěma směry. Prvním je snaha pochopit faktory determinující klinickou odezvu na terapeutickou vakcinaci nádorů na imunologické a molekulárně biologické úrovni, tj. analýzou diferenciální exprese genů či polymorfismů přímo v sekvenci genomu. Důležitým dílčím cílem tohoto úsilí je předpovědět s dostatečnou přesností klinickou odezvu nádoru před zahájením vlastní vakcinace. Druhým směrem vývoje je hledání nových nádorových antigenů, popř. nových vakcinačních strategií, s vyšší klinickou úspěšností. Jako velmi nadějný nádorový antigen pro terapeutickou vakcinaci vystupuje v poslední době katalytická podjednotka telomerázy. Z nových vakcinačních schémat na sebe podobně upozorňuje použití komplexů peptidů a proteinů tepelného šoku. Jejich terapeutická účinnost ovšem musí být vymezena rozsáhlejšími klinickými studiemi. Druhým hlavním přístupem protinádorové imunoterapie je pasivní imunoterapie, jejíž podstatou je doplnění imunitního systému onkologického pacienta *ex vivo* připravenými a aktivovanými imunitními efektorů. Tradičním zástupcem pasivní imunoterapie je protilátková léčba, v poslední době byly zaznamenány významné klinické úspěchy rovněž ve dvou oblastech buněčné pasivní imunoterapie – v oblasti aktivace NK-buněk v rámci alogenní či haploidentické transplantace hematopoetických kmenových buněk při léčbě některých leukémií a v oblasti krátkodobé *in vitro* expanze/aktivace tumor-infiltrujících lymfocytů při léčbě metastazujícího maligního melanomu. Novým směrem pasivní buněčné imunoterapie je snaha o cílené zásahy do genů pro T-buněčné receptory s cílem zvýšení jejich afinity pro nádorové antigeny. Poněkud stranou těchto dvou hlavních proudů protinádorové imunoterapie je léčba cytokiny, zejména interleukinem-2 a interferony- $\alpha$ . Molekulárně biologická analýza expresních změn melanomových buněk v odpověď na aplikaci IFN $\alpha$  naznačuje, že výsledkem interferonové léčby by mohlo být oslabení imunodominance některých liniově-specifických antigenů, čehož by mohlo být s výhodou využito v rámci následné terapeutické vakcinace.

**Klíčová slova:** terapeutická vakcinace, telomeráza, komplexy peptidů a proteinů tepelného šoku, protilátková léčba, NK-buňky, adoptivní transfer tumor-specifických efektorových buněk, cytokinová léčba

**Summary:** The ultimate goal of tumour immunotherapy is to modulate a patient's immune system in the course of cancer disease to the extent of being able to eliminate or at least reduce the tumour load. The active immunotherapy tries to achieve this goal by active immunization, i.e. therapeutic vaccination. Its underlying principle is a specific activation of the patient's immune system by a convenient delivery of tumour antigens of choice, which can adopt a variety of forms (lethally irradiated cancer cells, tumour lysates, antigenic proteins or peptides, peptide-loaded dendritic cells etc.). Actual efficacy of these approaches, in terms of an objective clinical response, is quite low (3 – 10 %). Two prominent directions are appearing in the current development of the active immunotherapy of cancer. The first is an effort to understand the factors determining the clinical response on a level of basic immunological and molecular biological knowledge, e.g. in terms of differentially expressed genes or polymorphic information in the genome itself. Important goal of this approach is to predict with reasonable accuracy the clinical response of a tumour before starting the vaccination. The second direction of the current development in this field is a search for new tumour antigens or vaccination protocols with improved clinical efficacy. Telomerase seems to be such a promising new antigen and, likewise, application of vaccines based on complexes of peptides with heat shock proteins is similarly regarded with hope. Their clinical impact awaits, nevertheless, validation in larger clinical studies. The second main approach to the tumour immunotherapy, namely the passive immunotherapy, consists in supplementing the patient's immune system with *ex vivo* prepared and activated immune effectors. Traditionally represented by antibody-based therapies, passive immunotherapy approaches scored recently important clinical successes for cell-based therapies as well, namely in exploiting natural killer cell activation in frames of allogeneic and haploidentical blood stem cell transplantation in treatment of some leukaemias, and in adoptively transferred short-term *in vitro* expanded autologous tumour infiltrating lymphocytes in treatment of metastasizing malignant melanoma. A new development in passive cellular immunotherapy is an effort to manipulate the T cell receptor genes to increase their affinity for a tumour antigen in question. A little removed from these two main immunotherapeutic branches is tumour treatment based on sole cytokine administration, with the two major cytokines being interleukin-2 and interferons- $\alpha$ . Molecular analysis of genes activated and repressed by IFN $\alpha$  treatment of malignant melanoma suggests that this treatment might result in suppression of some melanocyte-specific immunodominant antigens, which could be exploited with advantage in terms of successive therapeutic vaccination.

**Key words:** therapeutic vaccination, telomerase, heat shock protein-peptide complexes, antibody therapy, natural killer cells, adoptive transfer of antitumour cells, cytokine therapy

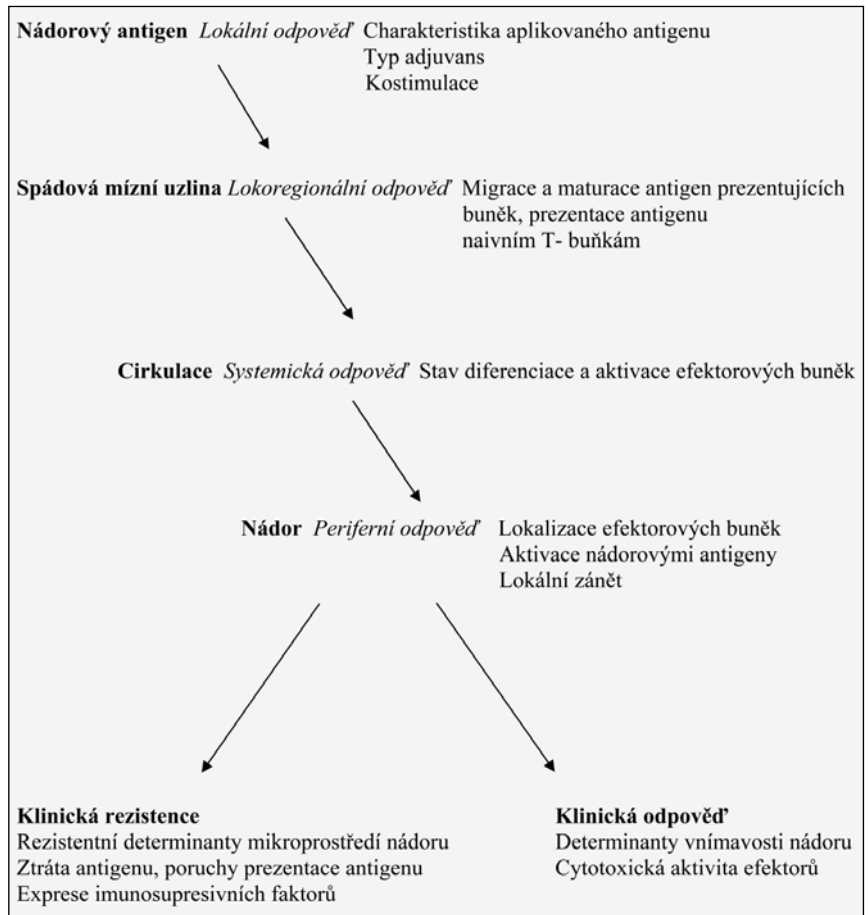
## Imunoterapie nádorů

Znalost dobře charakterizovaných nádorových antigenů spolu s důkazem existence přirozené imunitní odpovědi vůči nádoru přímo vybízí k hledání strategií jak využít tuto protinádorovou imunitu klinicky, tj. jakožto léčebnou strategii. Nádorová imunoterapie může být koncipována buď jako aktivní, t.zn. terapeutická vakcinace, jejímž cílem je vhodnou imunizací aktivovat imunitní systém nemocného, nebo pasivní, spočívající v podávání již hotových efektorových složek, jako jsou protilátky či aktivované a expandované lymfocyty (1-6). Aktivní imunoterapie, pakliže by se jí skutečně podařilo formulovat do podoby účinné vakcíny, by měla celou řadu předností - v případě účinného a široce exprimovaného nádorového antigenu by ji bylo možno podávat širokému souboru pacientů, léčba by mohla probíhat ambulantně a vzhledem k existenci endogenních regulačních mechanismů se ukazuje riziko nežádoucí aktivace imunitního systému, například v podobě indukce autoimunity, jako nízké (7). Navíc, u úspěšné vakcinace se předpokládá dlouhodobá imunitní odpověď, tedy vytvoření imunologické paměti, i když se v době velmi nedávné ukázalo, že imunitní paměť může být výsledkem i některých zdařilých protokolů pasivní imunoterapie. V klinických experimentech byla dosud testována celá řada vakcinačních schémat, které lze velmi povšechně rozdělit na dvě skupiny - vakcinace nádorovými buňkami nebo vakcinace přímo nádorovým antigenem. Nejjednodušší vakcíny mají podobu letálně ozářené krátkodobé nádorové buněčné kultury či nádorového antigenu, buď v podobě celého proteinu nebo přímo specifického prezentovaného peptidu. Součástí takových vakcín ovšem rovněž může být vhodné adjuvans, jehož úkolem je atrahovat a aktivovat antigen-prezentující buňky; jako na vhodné adjuvans lze nahlížet i na některé cytokiny, např. GM-CSF či IL-2. Jinou cestou k aktivaci prezentace nádorových antigenů je vakcinovat dendritickými buňkami, které byly předtím *in vitro* ošetřeny tak, aby ve zvýšené míře prezentovaly cílový nádorový antigen, například inkubací s nádorovým lyzátem, nádorovým antigenem či přímo prezentovaným peptidem (tzv. peptide-pulsed dendritic cells), či transfekcí genu pro nádorový antigen (1-6). Řada těchto klinických studií terapeutické vakcinace byla před velmi krátkou dobou předmětem kritického shrnutí, jež vyústilo v konstatování velmi nízké klinické účinnosti terapeutické vakcinace (nicméně je třeba podotknout, že z uvedeného shrnutí byly vyloučeny ty studie, kdy vakcinační protokol zahrnoval také nespecifickou aktivaci imunitního systému cytokiny, takže výsledek tohoto shrnutí není zcela reprezentativní) (7). Toto konstatování vyvolalo následnou diskusi o perspektivnosti celé této imunoterapeutické strategie (8); podle zdroje kompilace se klinická odpověď na terapeutickou vakcinaci udává v rozmezí od 3% do 10% vakcinovaných pacientů. Proč se terapeutická vakcinace zatím jen zřídka setkala s klinickým

úspěchem? Je třeba především uvést, že se jedná o cíl ze samotné biologické podstaty značně ambiciózní - aktivovat imunitní systém v průběhu onemocnění tak, aby byl schopen toto onemocnění zlikvidovat. Tohoto cíle se zatím nepodařilo dosáhnout ani u virových onemocnění, které často bývají uváděny jako nedostižný vzor protinádorové aktivní imunoterapie, ovšem u nichž se dosažené úspěchy omezují na profylaktickou vakcinaci, tj. před vlastním onemocněním, a to je přitom imunogenicita virových antigenů daleko vyšší než je tomu u nádorových antigenů. U terapeutické vakcinace nádorů k tomu přistupuje navíc celkové zeslabení imunitního systému jak v důsledku samotného nádoru, tak v důsledku léčby předcházející vlastní imunoterapií.

O systematický pohled na problémy aktivní imunoterapie nádorů se ve svém příspěvku pokusil Dr. Francesco Marincola (Immunogenetics Section, Department of Transfusion Medicine, Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda) (Obr.1). Imunitní odpověď na terapeutickou vakcinaci sestává z několika diskretních kroků, z nichž každý musí proběhnout s dostatečnou účinností, aby mohlo dojít ke klinické odpo-

**Obr. 1. Sled procesů formování imunitní odpovědi vůči nádoru.** Nádorový antigen, ať už původu endogenně se vyvíjejícího nádoru nebo aplikovaný v rámci aktivní imunoterapie, vede nejprve k lokální odpovědi, nejčastěji v rámci spádových lymfatických orgánů. Zde dochází k prezentaci antigenu profesionálními antigen-prezentujícími buňkami naivním T-lymfocytům a k diferenciaci jak APC, tak aktivovaných T-buněk. Intenzita této lokální odpovědi závisí na řadě faktorů, jako je imunogenicita antigenu, cytokinové prostředí, exprese kostimulačních molekul atp., a tyto faktory také určují, nakolik je lokální odpověď rozvinuta do systemické odpovědi. Pro klinickou protinádorovou odpověď je nezbytné, aby se systemická imunitní odpověď posléze přenesla na úroveň nádoru. To předpokládá lokalizaci aktivovaných protinádorových T-lymfocytů v místě nádoru a jejich přímou cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým buňkám, zprostředkovanou jejich rozeznáním na základě exprimovaných nádorových antigenů. Bezprostřední klinická odpověď je do značné míry předurčena charakteristikami mikroprostředí každého nádoru, na délce klinické odpovědi ve smyslu relapsu původně citlivých nádorů se vedle toho významně podílejí faktory imunoeditingu, kdy imunitní systém působí jakožto selekční prostředí růstu rezistentních buněčných klonů, které ztratily původní citlivost např. v důsledku ztráty exprese nádorových antigenů, poruchy jejich prezentace či aktivace exprese imunosupresivních faktorů. Upraveno podle ref. 9.



úspěchem? Je třeba především uvést, že se jedná o cíl ze samotné biologické podstaty značně ambiciózní - aktivovat imunitní systém v průběhu onemocnění tak, aby byl schopen toto onemocnění zlikvidovat. Tohoto cíle se zatím nepodařilo dosáhnout ani u virových onemocnění, které často bývají uváděny jako nedostižný vzor protinádorové aktivní imunoterapie, ovšem u nichž se dosažené úspěchy omezují na profylaktickou vakcinaci, tj. před vlastním onemocněním, a to je přitom imunogenicita virových antigenů daleko vyšší než je tomu u nádorových antigenů. U terapeutické vakcinace nádorů k tomu přistupuje navíc celkové zeslabení imunitního systému jak v důsledku samotného nádoru, tak v důsledku léčby předcházející vlastní imunoterapií.

vědi (9). V rámci současných vakcinačních schémat se zdá být relativně schůdné dosáhnout systemické imunitní odpovědi u významné části vakcinovaných pacientů, hlavním problémem zůstává, že tato systemická imunitní odpověď nenalézá svou odezvu v odpovídající klinické odpovědi nádoru. Tým Dr. Marincoly se pokusil porozumět tomuto poslednímu problému analýzou diferenciální exprese genů a polymorfismů v sekvenci DNA, tedy prostředky moderní genomiky. První otázka zněla - je nějaký rozdíl v globální expresi genů mezi individuálními metastázami (všechny projekty byly řešeny na modelu maligního melanomu) odpovídajícími klinicky na aktivní imunoterapii a těmi, u kterých ke klinické odpovědi nedošlo? U citlivých metastáz došlo v průběhu klinické odpovědi k aktivaci exprese specifické sady genů, zatímco u rezistentních lézí žádnou specifickou genovou expresi nebylo možné prokázat. Tento výsledek je možno interpretovat v tom smyslu, že mikroprostředí každého jednotlivého nádoru obsahuje determinanty, které rozhodují o jeho citlivosti vůči aktivovaným lymfocytům. Nejsou-li tyto determinanty naplněny, je nádor vůči okolní systemické imunitní odpovědi rezistentní. Klinická rezistence vůči aktivní imunoterapii je tedy v první řadě způsobena nedostatečnou citlivostí a tedy nikoli mechanismy úniku odpovídajícími imunoeditingu v případě spontánní protonádorové imunity (protože jinak by rovněž u rezistentních metastáz musela být prokazatelná specifická expresní změna) (10).

Druhá otázka byla následující - je možné identifikovat geny, jejichž exprese před vlastní vakcinací bude prediktabilní pro následnou klinickou odpověď či rezistenci? Odpověď Dr. Marincoly zní ano - srovnáním expresního profilu metastáz později klinicky odpovídajících a klinicky rezistentních bylo identifikováno 33 genů, jejichž expresní profil kolektivně určuje pozdější klinickou odpověď; asi polovina z těchto genů, u nichž je známa jejich funkce, kóduje proteiny přímo implikované v imunitní a zánětlivé odpovědi, což opět hovoří ve prospěch předešle naznačeného principu, že mikroprostředí každého jednotlivého nádoru má v sobě již v okamžiku zahájení vakcinace zakódovanou pozdější klinickou odpověď (10). Otázka třetí - lze na molekulární úrovni charakterizovat úlohu IL-2 jakožto adjuvans terapeutické vakcinace? Úloha IL-2 v regulaci imunitní odpovědi je totiž značně komplexní; na jedné straně působí jako prominentní růstový faktor T-lymfocytů a NK-buněk, který je nepostradatelnou součástí veškerých kultivačních médií používaných pro jejich *in vitro* expanzi a aktivaci, na druhé straně myší nesoucí mutace v genu pro IL-2 či v genech kódujících jeho receptorové podjednotky trpí generalizovanou autoimunitou ( a nikoli imunodeficiencí, jak by na základě *in vitro* kultivace bylo možno soudit) (11, 12). Řešení tohoto imunologického paradoxu pravděpodobně představují výše zmíněné regulační T-lymfocyty (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) - CD25 představuje  $\alpha$ -podjednotku receptorového komplexu pro IL-2, nutnou pro vysoce afinitní vazbu ligandu, a IL-2 je nepostradatelný pro vývoj této buněčné populace, odkud pramení zřejmě jeho tolerizační účinek (11).

IL-2 se ovšem ukázal jako faktor významně zvyšující imunitní i klinickou odpověď na terapeutickou vakcinaci a ve světle jeho spíše tolerizačního účinku není lehké porozumět, proč tomu tak je. Odpověď vzešla opět z analýzy diferenciální exprese genů a zjistilo se přitom, že všechny geny aktivované IL-2 v rámci aktivní imunoterapie hrají úlohu v procesu aktivace monocytů a makrofágů. Tedy makrofágy a monocyty, a nikoli lymfocyty, jsou oním buněčným typem stojícím za terapeutickým efektem IL-2 v rámci vakcinačních protokolů a tento nálezk hovoří ve prospěch významu lokálního zánětu pro klinickou odpověď nádoru.

Posledním diskutovaným projektem skupiny Dr. Marincoly, o němž na konferenci referovala Dr. Wangová, byla analýza DNA-polymorfismu jakožto klíče k dešifrování výsledku protinádorové imunitní odpovědi. Otázka přitom zněla - do jaké míry je klinická odpověď nádoru vysvětlitelná faktory nádorové heterogenity a specifického mikroprostředí každého nádoru a do jaké míry je naopak určena rozdíly na úrovni genomu? Zmíněný projekt vycházel z pozorování velmi odlišné odpovědi na terapeutickou vakcinaci peptidem gp100<sub>209-217</sub> (jeden z klasických melanom-asociovaných antigenů) v kombinaci s IL-2, pro nějž byla v jedné studii zaznamenána velmi dobrá systemická imunitní i klinická odpověď v bělošské populaci a prakticky žádná odpověď v čínské populaci. Z vakcinovaných pacientů obou populací byly izolovány mononukleární periferní krve, které jednak posloužily jako zdroj DNA pro analýzu typu SNP (single nucleotide polymorphism) (13), jednak byly dále kultivovány v přítomnosti IL-2 a využity jako zdroj RNA pro analýzu transkripčního profilu na cDNA mikročipu a zdroj proteinů pro proteomickou analýzu. U obou populací lze najít jasné rozdíly v genech aktivovaných IL-2 jak na úrovni transkripcie, tak na úrovni proteomu, a v současnosti jsou tyto rozdíly korelovány s polymorfismem v sekvenci DNA. Nalezení funkčních a regulačních polymorfismů v sekvenci příslušných genů a jejich promotorů ve vztahu k odlišné aktivaci interleukinem-2 nepochybně významně posune naše pochopení imunomodulačního účinku tohoto cytokinu, a to jak v rámci aktivní protinádorové terapie, tak i nad její rámec v oblasti obecné imunologie. Zjevným cílem v oblasti terapeutické vakcinace nádorů je najít takové polymorfismy v DNA, které by byli prediktabilní pro pozdější imunitní a klinickou odpověď. To by umožnilo lépe selektovat pacienty podrobující se aktivní imunoterapii a zvýšit tak efektivitu celého tohoto terapeutického přístupu.

Bylo rovněž formulováno několik imunologických strategií, jak zvýšit účinnost terapeutické vakcinace. Jednou z možností je současně s vakcinací provádět blokování negativních regulačních mechanismů zodpovědných za udržování imunologické tolerance. Jedná se například o použití blokujících protilátek vůči CTLA-4 (povrchová molekula aktivovaných T-lymfocytů, která interaguje s kostimulačními molekulami B7-1 a B7-2 a výsledkem této interakce je velmi silný negativní signál doručení T-lymfocytu) (14), či o neutralizaci CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulačních T-lymfocytů prostřednictvím  $\alpha$ -CD25-neutralizační protilátky (problematická strategie, poněvadž CD25 je exprimován rovněž na aktivovaných efektorových T-lymfocytech) nebo farmakologicky (5). Pro ani jednu z těchto možností nejsou k dispozici odpovídající klinické studie, lze ovšem předpovědět, že jedním z problémů bude riziko obecné autoimunní aktivity. Jinou z možností je použít pro vakcinaci peptidy, do jejichž sekvence byly zaneseny cílené aminokyselinové substituce, které zvyšují jejich afinitu vůči prezentujícím HLA-molekulám (6). Konečně, je také nutné uvažovat o nové generaci nádorových antigenů, které se vedle vysoké specifické exprese vyznačují rovněž přímou funkcí v procesu nádorové transformace; lze předpokládat, že nádorové buňky nebudou schopny reprimovat expresi takových antigenů do té míry, jak to bylo například popsáno u řady tumor-asociovaných antigenů. Přestože mechanismy úniku nehrají zřejmě žádnou významnou roli v prvotní rezistenci nádoru vůči imunoterapii (viz výše), v průběhu samotné imunoterapie se zcela jistě dostávají ke slovu a projevují se relapsem a rezistencí původně citlivých nádorů (4). Jedním z těchto nových tumorových antigenů, jehož imunoterapeutické využití by tímto nebezpečím nemělo být zatíženo, je telomeráza, a první klinické výsledky s terapeutickou vakcinací prezentoval na konferenci Dr. Gustav Gaudernack (Section of Immunotherapy, Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, Oslo).

**Telomeráza jako nádorový antigen nové generace**  
Telomeráza představuje komplexní ribonukleoprotein schopný aktivního prodlužování konců chromozomů - telomer, a tímto způsobem uděluje buňce imortalizovaný fenotyp. Buněčná imortalizace je důležitou a stabilní součástí nádorové transformace a ektopicky exprimovaná telomeráza je schopna kooperovat s buněčnými a virovými onkogeny v procesu transforma-

ce lidských buněk *in vitro*. Telomerázový komplex sestává z několika podjednotek, z nichž jako limitní vystupuje katalytická podjednotka - hTERT (human telomerase reverse transcriptase). Aktivace exprese této reverzní transkriptázy je nalézána ve shruha 85 % klinických nádorů, vedle toho v germinálních buňkách a na podstatně nižší úrovni v bazální vrstvě keratinocytů, kmenových buňkách a aktivovaných lymfocytech (15). Telomeráza je cílem vyvíjené protinádorové terapie nejen ve smyslu imunoterapie, ale samozřejmě též ve smyslu farmakologických inhibitorů. U farmakologického blokování ovšem stále zůstávají pochybnosti ohledně možných toxických účinků na zmíněné normální telomeráza-positivní buňky, zatímco imunoterapie se v tomto ohledu zdá velmi nádorově-specifická: nízká exprese v kmenových buňkách zřejmě vylučuje, aby se tyto buňky, vzhledem k nízké aktivity denzitě, staly citlivé vůči příslušným cytotoxickým T-lymfocytům, a germinální buňky zase vůbec neexprimují HLA-geny I. třídy, se stejným efektem. Bylo prokázáno, že hTERT-protein je procesován a odpovídající peptidy prezentovány nejrozšířenějšími class I HLA-alelickými variantami - HLA-A2, -A3 a -A24, a rovněž, což může být důležité z hlediska dlouhodobé imunitní odpovědi, HLA class II-přezentační drahou (HLA-DR7). CD8<sup>+</sup> CTL specifické pro několik hTERT-peptidů byly izolovány z periferní krve a po *in vitro* aktivaci byly schopné lyzovat celou škálu nádorových buněčných linií, rovněž byly izolovány odpovídající CD4<sup>+</sup> pomocné T-lymfocyty. Z této teoretické práce vyplynulo, že telomeráza vystupuje jako efektivní a univerzální nádorový antigen (16).

Dr. Gaudernack prezentoval předběžné výsledky norskó-švýcarské klinické studie terapeutické vakcinace hTERT-peptidy u nemocných s neoperovatelným karcinomem pankreatu (bez předchozí chemoterapie), nemalobuněčnou rakovinou plic a maligním melanomem. K vakcinaci byl použit pár z části identických peptidů - delší peptid představoval HLA class II-epitop pro indukci pomocných T-lymfocytů, z něho odvozený kratší peptid byl selektován pro vazbu s HLA molekulami I. třídy pro indukci cytotoxických T-lymfocytů. Peptidy byly aplikovány intradermálně současně s GM-CSF (pro aktivaci dendritických a Langerhansových buněk) v režimu 1., 2., 3., 4., 6. a 10. týden. Uvedený vakcinační režim byl schopen velmi efektivní aktivace imunitní odpovědi (indukce pomocných a cytotoxických T-lymfocytů byla zaznamenána u 80 % pacientů) a první výsledky naznačují velmi slibnou klinickou odezvu - v první malé sérii pacientů se objevilo několik kompletních a částečných klinických odpovědí u všech tří nádorových kategorií. Aktivovaná imunitní a klinická odpověď byly přitom nezávislé na HLA-alelické konfiguraci, což potvrzuje dřívější výsledky široké prezentace telomerázových peptidů napříč HLA-alelickým spektrem. Podařilo se rovněž optimalizovat dávku peptidu pro vakcinaci; ukázalo se totiž, že výsledkem příliš vysoké dávky peptidu je energie T-lymfocytů, pravděpodobně v důsledku nadměrného aktivačního signálu.

#### Vakcinace buněčnými komplexy peptidů a proteinů tepelného šoku

Nevýhodou běžných vakcinačních strategií tak, jak byly popsány až dosud, je, že se jedná o do značné míry neselektivní postup ve vztahu k jednotlivým nádorům, který nepřiléhá k unikátním molekulárním vlastnostem každého jednotlivého nádoru. Tyto neselektivní strategie musí být nutně založeny na tumor-asociovaných antigenech, tedy převážně normálních buněčných proteinech koexprimovaných ve významném podílu nádorů dané nádorové kategorie. Tato strategie s sebou nese dvě základní nevýhody. Jednak vzhledem k tomu, že tyto proteiny nejsou nijak funkčně implikovány v procesu nádorové transformace, představuje utlumení jejich exprese jeden z příhodných mechanismů úniku nádorových buněk před imunitním útokem, jednak, jelikož se jedná o tělu vlastní normální proteiny, lze vycházet z toho, že imunitní odpověď vůči nim bude zatížena současně probíhajícími mechanismy tolerance

a jejich imunogenicitu bude tudíž poměrně slabá. Již z klasických experimentů transplantace nádorů vyplývá, že většina nádorů vlastní silné imunogenní determinanty, které jsou ovšem specifické pro každý individuální nádor a které podle všeho odpovídají tumor-specifickým antigenům, tj. mutovaným proteinům kauzálně implikovaným v etiologii daného nádoru (2). Z hlediska nádoru tudíž nebude lehké tyto geny expresně vypnout a vzhledem k tomu, že se jedná o nové proteinové sekvence vzniklé mutacemi původních genů, mechanismy imunologické tolerance vůči nim nebudou zřejmě aktivní. Unikátní kombinace těchto specifických antigenních determinant v každém nádoru ovšem vylučuje běžné vakcinační postupy, např. peptidy či peptidem naloženými dendritickými buňkami. Objevila se ovšem nová vakcinační strategie, která by mohla být zaměřena právě vůči těmto unikátním tumor-specifickým antigenům, a to vakcinace komplexy peptidů a proteinů tepelného šoku (HSP-PC - heat shock protein-peptide complexes).

Proteiny tepelného šoku totiž vedle své klasické funkce molekulárních chaperonů v procesu sbalení proteinu do správné sekundární a terciální struktury mají ještě další specifickou funkci v procesu aktivace imunitního systému, a sice jako transportéry peptidů. V cytoplazmě každé buňky byly detekovány komplexy těchto proteinů s antigenními peptidy; předpokládá se přitom, že dojde-li ve tkáni k buněčné lýze, jsou tyto komplexy uvolněny do prostředí a následně interagují se specifickými receptory na povrchu profesionálních antigen-přezentujících buněk, především dendritických buněk. Dosud bylo popsáno několik receptorů pro HSP-PC, zejména CD14, CD91 a receptory Toll-like rodiny, především TLR2 a TLR4. Tato interakce vede k endocytóze komplexů, ovšem následované class I -prezentační drahou (crosspresentation). Takto dopravené peptidy jsou následně vystaveny na povrchu APC v komplexu s MHC glykoproteiny I. třídy a mohou tak nastartovat aktivaci cytotoxických CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů. HSP-PC zastávají kromě tohoto transportu peptidů další významné imunomodulační funkce, zejména aktivují diferenciaci dendritických buněk (a tedy zvýšení exprese kostimulačních molekul) a současně jsou schopny přímou vazbou aktivovat NK-buňky. HSP-PC tedy aktivují výhradně buněčnou imunitní odpověď (17). Proteiny tepelného šoku představují z biochemického hlediska dosti heterogenní skupinu, zahrnující nejméně 5 proteinových rodin, výrazně se lišících ve svých imunogenních vlastnostech; největší imunogenicitu vykazují peptidové komplexy hsp-proteinů Hsp 70 a gp 96. HSP-PC svým složením, tedy zastoupením jednotlivých peptidů, vždy odráží antigenní vlastnosti buněk, ze kterých jsou izolovány. Izolace HSP-PC z nádorů tedy poskytuje cestu k unikátním tumor-specifickým antigenním peptidům a vzhledem k jejich shora naznačené funkci lze HSP-PC komplexy izolované z chirurgicky odstraněného nádoru přímo použít jakožto protinádorovou vakcínu (18). Svě zkušenosti s tímto způsobem vakcinace na konferenci prezentoval Dr. Giorgio Parmiani (Unit of Immunotherapy of Human Tumors, Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Milan).

Dr. Parmiani prezentoval výsledky dvou malých klinických studií, jedné zaměřené na maligní melanom a druhé na do jater metastazující kolorektální karcinom. Ve všech případech byly k vakcinaci použity peptidové komplexy s proteinem tepelného šoku gp96, izolované z chirurgicky odstraněného nádoru a aplikované intradermálně, buď samostatně nebo, u jedné skupiny pacientů s maligním melanomem, společně s GM-CSF (s cílem aktivace dendritických buněk) a interferonem- $\alpha$  (s cílem zvýšení exprese HLA molekul I. třídy). Ve všech případech se podařilo dosáhnout významné systematické protinádorové imunity; vzhledem k tomu, že v tomto případě neznáme specifický antigen, je nutné přijmout speciální postupy kvantifikace této systematické imunitní odpovědi - kvantifikace se v tomto případě prováděla na základě schopnosti lymfocytů periferní krve lyzovat nádorové buňky určitého repre-

zentativního panelu nádorových buněčných linií. Celková doba přežití byla signifikantně vyšší u pacientů odpovídajících na vakcinaci systemickou imunitou ve srovnání s pacienty, u nichž této systemické odpovědi dosaženo nebylo; u skupiny pacientů s kolorektálním karcinomem bylo možné toto odlišení provést na velmi silné hladině významnosti ( $p < 0,0001$ ), u maligního melanomu tak impozantní hladiny významnosti dosaženo nebylo ( $p < 0,01$ ). Stejně jako u jiných přístupů terapeutické vakcinace nebylo možné ani zde korelovat systemickou imunitní a klinickou odpověď nádoru. Za zmínku stojí rovněž skutečnost, že ve všech případech pozitivní odpovědi na vakcinaci byla prokázána aktivace protinádorových CTL i NK-buněk.

V literatuře je možné najít několik dalších koncepčně podobných klinických studií terapeutické vakcinace HSP-peptidovými komplexy, se srovnatelnými výsledky. Randomizovaná studie fáze III v současnosti probíhá u melanomu a karcinomu ledviny a její výsledky lze očekávat s velkým zájmem. Zřetelnou nevýhodou tohoto způsobu vakcinace je ovšem naprostá závislost na vstupním vzorku odoperovaného nádoru, a to jak v kvantitativním slova smyslu (k přípravě HSP-peptidových komplexů je nutná určitá minimální velikost nádoru, aspoň 1 až 5 g, lépe 10 g, vakcinace končí vyčerpáním tohoto jednorázově připraveného množství HSP-PC), tak kvalitativně (nádor by měl být například prost rozsáhlejší nekrózy, problémy s přípravou HSP-PC mohou rovněž nastat u tkání se zvýšeným obsahem proteáz jako je například karcinom žaludku či pankreatu) (18). Možné řešení těchto problémů načrtl ve svém přehledu Milani et al., a to že by bylo možné sestavit pro každou nádorovou kategorii určitý antigenně reprezentativní panel nádorových buněčných linií a ty by pak představovaly potenciálně nekonečný zdroj HSP-peptidových komplexů pro vakcinaci (17). Důmyslné rozvinutí této strategie zmínil v diskusi Dr. Parmiani - podařilo-li by se sestavit tento reprezentativní panel nádorových buněčných linií, bylo by je možné stabilně transfektovat modifikovanými genovými konstrukty *hsp*-genů, které by umožnily sekreci HSP-PC do kultivačního média, což by ohromně usnadnilo přípravu odpovídající vakcíny. Zdá se tudíž, že v této oblasti protinádorové terapeutické vakcinace lze v budoucnosti očekávat fascinující vývoj.

### Pasivní imunoterapie

Terapeutická vakcinace představuje základní směr aktivní protinádorové terapie. Druhou možnou cestou je pasivní imunoterapie, při které doplňujeme pacientův imunitní systém již hotovými *ex vivo* připravenými a aktivovanými efektorovými mechanizmy. Z hlediska humorální imunity přicházejí v úvahu jako snad nejnámější představitelé pasivní imunoterapie monoklonální protilátky, z nichž několik získalo postavení standardních schválených léčiv. Postavení protilátek v nádorové imunologii obecně je ovšem zahaleno řadou otázek. Z hlediska mechanismu účinku si lze představit dvojí typ působení - působení založené na imunologických mechanismech a působení založené na blokování a následné funkční neutralizaci povrchových signálních molekul. Imunologické mechanismy si lze v podstatě představit trojího druhu - aktivaci komplementu, aktivaci tzv. na protilátkách závislé buněčné cytotoxicity (ADCC - antibody dependent cellular cytotoxicity), jejíž podstatou je vazba Fc-receptorů a následná aktivace specifických efektorových buněčných populací, zejména NK-buněk a makrofágů, či konečně za třetí aktivaci idiotypické regulační sítě (14). Protilátky proti nádorovým antigenům jsou stabilní součástí séra onkologických pacientů, ostatně metodika identifikace nádorových antigenů screenováním expresních knihoven sérem onkologických nemocných (SEREX) již byla několikrát zmíněna. Žádné zjevné lytické působení těchto protilátek na nádorové buňky *in vivo* ovšem nikdy nebylo prokázáno, přestože *in vitro* po přidání heterologního komplementu může být tento

efekt docela snadno pozorován (2). Vyhraněně humorální typ imunitní odpovědi vůči nádoru lze považovat za prognosticky spíše špatné znamení, poněvadž tento typ imunitní odpovědi předpokládá polarizaci pomocných T-lymfocytů ve směru subsetu Th2, což s sebou automaticky nese potlačení diferenciací ve směru subsetu Th1, který je kriticky významný pro rozvoj buněčné imunitní odpovědi, jejíž místo v protinádorové imunitě je na rozdíl od protilátek nezpochybnitelné (19).

Kromě strategií zaměřených na imunologické popřípadě signálně-blokující mechanismy lze afinitu protilátek vůči povrchovým nádorovým antigenům využít ještě jedním způsobem, totiž jakožto prostředku transportu cytotoxických substancí do bezprostřední blízkosti nádorové buňky. V tomto případě se ovšem nepoužívají zpravidla protilátky v té podobě, jak se vyskytují *in vivo* (tzn. tetramer dvou lehkých a dvou těžkých řetězců), nýbrž metodikou rekombinantí DNA se ve vhodném uspořádání kombinují genové úseky odpovídající antigen-vazebným doménám (tzv. single-chain antibody). Na tyto molekuly je potom možné konjugovat např. radioaktivní izotop, rostlinný toxin nebo cytostatikum. Obecným problémem protilátkové léčby je u pevných nádorů přístupnost buněk lokalizovaných uvnitř nádoru. Zřejmě nejsnadnější bude proto uplatnění protilátkové léčby buď ve stádiu minimální reziduální nemoci u pevných nádorů, anebo při léčbě leukémií (1).

Buněčná pasivní imunoterapie rovněž prošla svým vývojem a jejím klasickým klinickým příkladem je využití tzv. LAK-buněk (lymphokine activated killers). Jedná se o heterogenní populaci lymfocytů periferní krve aktivovaných krátkodobou kultivací v přítomnosti interleukinu-2 a poté zpětně aplikovaných příslušnému pacientovi. Uvedený postup vedl v některých případech ke klinické odezvě u pacientů s melanomem a karcinomem ledviny, tento výsledek ve ovšem nepodařilo potvrdit v širěji koncipovaných klinických studiích a celá tato strategie byla v podstatě opuštěna. Možné imunologické vysvětlení fenoménu LAK-buněk je v zásadě dvojitý - jednak aktivace NK- a NK T-buněk, jednak aktivace cytotoxických T-lymfocytů (IL-2 představuje možný kostimulační signál pro aktivaci CTL a bylo prokázáno, že tumor-infiltrující lymfocyty nabývají schopnosti lyzovat nádorové buňky až po několikahodinové kultivaci v přítomnosti IL-2) (1, 20). Heterogenní povaha LAK-populace ovšem dosti ztěžuje imunologickou analýzu tohoto fenoménu.

Klinicky významným příkladem buněčné antigen-nespecifické pasivní imunoterapie je alogenní, resp. haploidentická transplantace kostní dřevě či hematopoetických kmenových buněk při léčbě celé řady zhoubných onemocnění krevních buněk. Vyzkávají-li dárce a příjemce transplantátu alelické rozdíly v HLA-genech, zejména I.třídy, pak to může vést jednak k odhojení transplantátu tak, jako u transplantací všech ostatních orgánů, nebo, specificky v případě transplantace kmenových buněk krvetvorby, k reakci nově zrekonstruovaného imunitního systému proti somatickým buňkám příjemce transplantátu (graft vs. host disease - GvHD - reakce štěpu proti hostiteli). Tato reakce představuje na jedné straně významnou klinickou posttransplantační komplikaci, ovšem podařili se jí překonat, snižuje se výrazně riziko pozdějšího relapsu leukémie (tzv. efekt graft vs. leukaemia - GvL). Toto zprvu empirické pozorování se vysvětluje tak, že imunitní odpověď nově zrekonstruovaného imunitního systému na bázi kmenových buněk dárce transplantátu aktivovaná alelickým rozdílem v HLA-genech se také zaměřuje proti reziduálním leukemickým buňkám, které přežily chemo- a radioterapii předcházející vlastní transplantaci. Dvě buněčné populace jsou zřejmě z hlavní části odpovědné za GvL-efekt - aktivované T-lymfocyty a NK-buňky. Z hlediska CTL je GvL-efekt vysvětlován tak, že výsledkem alelických rozdílov v prezentujících HLA glykoproteinech je odlišné spektrum prezentovaných peptidů polymorfních vnitrobuněčných proteinů, kte-

ré se označují jako tzv. minoritní histokompatibilní antigeny (4, 20). Co se týče NK-buněk, právě jejich význam je v současnosti předmětem bedlivé analýzy a teoretický základ jejich využití pro GvL-efekt poskytla obecně imunogenetická přednáška, kterou na konferenci proslavil Dr. John Trowsdale (Immunology Division, Department of Pathology, University of Cambridge).

Pro biologickou aktivaci NK-buněk jsou klíčové receptory pro MHC glykoproteiny I.třídy; u člověka jsou tyto receptory kódovány tzv. *KIR*-geny (killer immunoglobuline-like receptors), přičemž interakce s odpovídajícím HLA class I-ligandem představuje pro NK-buňku prominentní negativní signál (tato koncepce aktivace NK-buněk se označuje jako „missing self“). Vedle těchto inhibičních receptorů jsou k dispozici rovněž aktivující *KIR*, platí ovšem, že každá NK-buňka exprimuje určitý inhibiční receptor a že jím doručeny negativní signál dominuje i v případě současného aktivujícího signálu. Na genetické úrovni vykazují *HLA*-geny i *KIR*-geny řadu pozoruhodných paralel. V obou případech jsou geny uspořádány do velkých genových clusterů - *HLA*-komplex na chromozomu 6p21 a *LCR* (leukocyte receptor complex), jehož složkou je *KIR*-podkomplex, na chromozomu 19q13. V obou případech došlo ke značné diverzifikaci jak počtu genů, tak na úrovni alelické bohatosti. Z evolučního hlediska se zdá, že tyto aspekty se během evoluce vyvíjely opakovaně a nezávisle - srovnání např. člověka a myši neumožňuje kupř. dedukovat ortologní geny pro MHC geny I.třídy (neexistuje žádná sekvenční homologie, která by umožnila přiřadit *HLA-A*, *-B* a *-C* k myším *H-2K*, *-D* a *-L* genům) a ještě o poznání větší druhová specifita existuje u *KIR*-genů. Tyto geny jsou u myši přítomny jen rudimentárně a jejich funkci plní strukturálně odlišné geny rodiny *Ly-49* - to je důkazem rychlé evoluce obou genových sestav. Podstatné je rovněž, že *HLA*- a *KIR*-geny spolu na několika úrovních funkčně interagují. Například na genetické úrovni byla prokázána epistáze (tj. interaktivní, nikoli aditivní působení) v genetické etiologii komplexní imunitních fenotypů, jako je např. progresivní AIDS a psoriatická artritida (21, 22).

Na úrovni vývoje imunitního systému a z hlediska vysvětlení GvL-efektu je klíčový jiný typ interakce. Jde o to, že alelická sestava *HLA*-genů I.třídy diktuje to, které konkrétní *KIR*-geny budou klonálně exprimovány NK-buňkami tak, aby byla naplněna koncepce „missing self“. Jinými slovy, populace NK-buněk každého jedince sestává z klonů, z nichž každý exprimuje určitou typickou kombinaci *KIR*-genů, které souborne doručují negativní signál při interakci s přítomnými alelickými variantami *HLA*-glykoproteinů I.třídy - tímto způsobem je zajištěna tolerance na úrovni NK-buněk (23). A odtud pramení vysvětlení účasti NK-buněk v GvL-reakci. Alelický rozdíl v *HLA*-genech I.třídy (zejména *HLA-B* a *HLA-C* genech) mezi příjemcem a dárcem transplantátu, je-li takové povahy, že NK-buňky dárce nejsou inhibovány *HLA*-glykoproteiny příjemce, vede k aktivaci NK-buněk. Tato aktivace je z důvodů, které nejsou dosud uspokojivě vysvětleny, zaměřena především vůči krevním buňkám příjemce (a nikoli ostatním somatickým buňkám jako je tomu u T-lymfocytů s výsledkem GvHD). To má několik důsledků. Za prvé se tím přímo vysvětluje GvL-efekt. Za druhé se tato aktivita rovněž obrací k reziduálním T-lymfocytům příjemce transplantátu, čímž se snižuje pravděpodobnost jeho odhojení, a za třetí vůči anti-gen-prezentujícím buňkám příjemce (zejm. dendritickým buňkám), které jsou nezbytné pro aktivaci T-lymfocytů transplantátu v rámci GvHD, jejíž frekvence se tudíž také snižuje - všechny tyto efekty byly klinicky prokázány u akutní myeloidní leukémie i samozřejmě na experimentální úrovni u myšího modelu tohoto onemocnění. Zdá se tedy, že typizace dárce a příjemce transplantátu na vhodnou alelickou neshodu *HLA*-genů I.třídy a *KIR*-genů může mít významné klinické uplatnění (24-26).

Pasivní specifická buněčná nádorová imunoterapie má v současnosti zejména podobu pokusů o adoptivní transfer defino-

vaných populací tumor-antigen-specifických cytotoxických T-lymfocytů, například v podobě izolace, *in vitro* expanze a zpětné aplikace tumor-infiltrujících lymfocytů (TIF) či z nich odvozených buněčných klonů tumor-reaktivních CTL. *In vitro* expanze těchto buněk se většinou provádí  $\alpha$ -CD3 monoklonální protilátkou (což simuluje antigenní signál zprostředkovaný TCR) při kultivaci v přítomnosti IL-2. Tato *in vitro* expanze je dnes metodicky dobře zvládnutá a tímto způsobem je možné dosáhnout u ošetřovaných pacientů jednorázově velmi vysokých hladin tumor-reaktivních T-lymfocytů, zajisté výrazně vyšších, než je hladina dosažitelná aktivní imunizací (20). Touto metodikou *in vitro* expanze a následného adoptivního transferu se v nedávné době podařilo dosáhnout významných klinických úspěchů při léčbě pacientů s pokročilým metastazujícím maligním melanomem. Klinická odezva byla ovšem zaznamenána jen při adoptivním transferu krátkodobě expandovaných TIF (tedy nikoliv při aplikaci čistých buněčných klonů), a to pacientům, u nichž byla těsně před adoptivním transferem indukována lymfopenie krátkodobou intenzivní chemoterapií (kombinací cyklofosfamidu a fludarabinu). Objektivní klinická odpověď při tomto režimu adoptivního transferu byla zaznamenána u 50% ošetřených pacientů, což je výsledek nikdy nedosažený jakoukoli terapeutickou vakcínou (27).

Za ním stojí pravděpodobně několik nezávislých imunologických fenoménů. Použití krátkodobě expandované heterogenní směsi tumor-infiltrujících lymfocytů je pravděpodobně spojeno s nízkou mírou vyčerpání vnitřního proliferačního potenciálu buněk. Bylo rovněž prokázáno, že tato heterogenní TIF-populace obsahuje jak CD8<sup>+</sup> tak i CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty a lze tudíž předpokládat, že v tomto případě se aplikují aktivované cytotoxické i pomocné lymfocyty, jejichž kooperace je nutná pro krátkodobou i dlouhodobou imunitní odpověď; v této souvislosti není překvapující velmi nedávné sdělení, že adoptivně přenesené CTL diferencují až v paměťové cytotoxické T-lymfocyty (29). Obdobná aplikace klonovaných vysoce afinitních CD8<sup>+</sup>-CTL musí být logicky spojena s daleko větší úrovní *in vitro* expanze (s možnými důsledky například v podobě přiblížení se senescenčnímu limitu) a nijak neřeší otázku pomocných T-lymfocytů. Indukovaná lymfopenie pak pravděpodobně působí na úrovni tzv. homeostatické proliferace, tj. poměrně málo definované přirozeného regulačního mechanismu udržujícího fyziologické hladiny periferních lymfocytů. Jednou ze složek této homeostatické regulace může být kompetice o limitní koncentrace prorůstových cytokinů (IL-2, IL-7, IL-15) - v tomto případě si lze představit, že cílená redukce endogenního imunitního systému před vlastním adoptivním transferem udělí kompetitivní výhodu přenášeným lymfocytům. V každém případě pouze uvedená kombinace krátkodobě expandovaných tumor-infiltrujících lymfocytů a lymfopenického příjemce těchto lymfocytů zajišťuje dlouhodobou perzistenci (po řadu měsíců) vysokých hladin (až 70% všech lymfocytů periferní krve) aktivovaných antitumorových lymfocytů, která s sebou nese klinickou odpověď (27, 28).

Zajímavou možností dalšího vývoje pasivní buněčné imunoterapie shrnul ve svém příspěvku Dr. Michael I. Nishimura (Department of Surgery, University of Chicago, Chicago). Jedná se o strategii cíleného směřování imunitní odpovědi transferem  $\alpha$ - a  $\beta$ -genů pro T-buněčné receptory specifických pro žádaný nádorový antigen. Jde tedy o to klonovat geny pro T-buněčné receptory vykazující vysokou specifitu a afinitu vůči prezentovaným peptidovým epitopům daného nádorového antigenu, tyto geny vsunout do retrovirových vektorů a tyto vektory použít pro genovou manipulaci vlastních pacientových lymfocytů. Zdrojem vhodných *TCR*-genů mohou být tumor-infiltrující lymfocyty či například *HLA*-transgenní myši po příslušné imunizaci. Ty jsou zejména výhodné pro izolaci vysoce afinitních *TCR* vůči self-antigenům (což je značná část tumor-asociovaných antigenů), protože v tomto případě lze

předpokládat, že T-buňky nesoucí vysoce afinitní TCR budou deletovány z periferního repertoáru člověka (30). Dr. Nishimura v této souvislosti prezentoval nanejdéle pozoruhodný nálezy, a to identifikaci TCR specifického pro peptid tyrozinázy (368-376, restrikce HLA-A2), izolovaného z klonu CD4<sup>+</sup>T-lymfocytů z TIF-populace maligního melanomu (31). Jedná se tedy o výjimečný případ TCR exprimovaného CD4<sup>+</sup>T-lymfocyty a přesto rozeznávající peptid v kontextu prezentace HLA molekulami I.třídy. Tento nálezy otevírá cestu k jedné velmi zajímavé praktické možnosti a k celé řadě experimentálních aplikací.

Afinita příslušného TCR vůči komplexu daného peptidu a prezentující molekuly HLA-A2 je zjevně tak velká, že je schopen efektivní interakce s nádorovým epitopem i bez přítomnosti koreceptoru, tj. CD8 (exprimovaný CD4 se nemůže v kontextu HLA molekul I.třídy uplatnit). Lze si tudíž představit možnost, že by mohlo dojít k současné interakci nádorové buňky s adoptivně podanými geneticky manipulovanými CD4<sup>+</sup>T-lymfocyty vybavenými tímto TCR a endogenními tumor-specifickými CD8<sup>+</sup> CTL, a v tomto případě by k aktivaci protinádorové buněčné imunitní odpovědi mohlo dojít přímo v prostředí nádoru, poněvadž tyto geneticky modifikované CD4<sup>+</sup>T-lymfocyty by přímo zde mohly uplatnit svoji pomocnou funkci.

Z experimentálních aplikací je celá oblast manipulace lymfocytů *TCR*-geny propůjčujícími známou antigenní specifitu a afinitu velmi vhodná pro analýzu vzájemného vztahu afinity (tj. síly molekulární interakce mezi TCR- a MHC-komplexy), avidity (vyjadřující celkovou sílu interakce mezi CTL a cílovou nádorovou buňkou, která je funkcí exprimovaných koreceptorů, afinity a hladiny exprese interagujících TCR- a MHC-komplexů) a fenoménu aktivaci-indukované buněčné smrti (AICD - activation induced cell death). Podstatou AICD je skutečnost, že příliš silný signál doručení TCR-komplexem indukuje v příslušném T-lymfocytu apoptózu, a pro záměrné programování T-lymfocytů transferem *TCR*-genů je samozřejmě kriticky významné znát optimální úroveň afinity a expresní hladiny vnesených *TCR*-genů, která by zajišťovala maximální specifitu a aviditu vůči cílovým nádorovým buňkám, ale ještě neindukovala AICD.

### Klinické použití interferonů a ostatních cytokinů

Různé cytokiny jsou součástí řady protokolů aktivní i pasivní imunoterapie, jak je v jednotlivých konkrétních případech uvedeno výše, vedle toho ovšem existují protokoly samostatného farmakologického použití některých cytokinů. Nejrozšířenější jsou v tomto ohledu interferony, zejména interferony- $\alpha$ , a interleukin-2. Přímé farmakologické nasazení cytokinů nemá zdaleka tak obecný charakter jako je tomu u ostatních imunoterapeutických postupů a týká se pouze několika typů nádorů - vedle několika hematologických nádorových onemocnění jde z pevných nádorů zejména o karcinom ledviny a maligní melanom, u IL-2 i o hepatocelulární karcinom.

Léčebné použití samotného IL-2 je principiálně totožné s jeho adjuvantním uplatněním v protokolech terapeutické vakcinace či adoptivního transferu efektorových buněk, jedná se tedy o pokus obecně aktivovat imunitní systém. Již předešle citované příklady dokládají ovšem, že IL-2 se nijak nevymyká z obecných dvou principů fungování cytokinů - redundance a pleiotropie, tj. řada fenotypických efektů IL-2 je taktéž determinována dalšími cytokiny, ať už nezávisle či v kooperaci, a IL-2, jakožto každý jiný cytokin, má řadu různých a někdy i protichůdných efektů na různé populace leukocytů; jeho současné postavení v mechanismech aktivace efektorové odpovědi i tolerance bylo již předešle popsáno. Lze proto jen zopakovat závěr, který byl na stránkách tohoto časopisu již učiněn, že samostatné podávání imunomodulačních cytokinů bude vždy tak trochu sázkou do loterie, poněvadž klinická odezva bude vždy velmi závislá na velmi jemných odstínech stavu a míry aktivity imunitního systému ošetřovaného pacienta,

a to jak na systemické úrovni, tak na úrovni léčeného nádoru, přičemž je velmi obtížné tyto aspekty v potřebné míře analyzovat před zahájením terapie (32).

Postavení interferonů je v tomto ohledu poněkud odlišné. Biologický účinek interferonů zahrnuje totiž jak imunomodulační působení, v některých ohledech analogické interleukinu-2, ovšem jeho součástí je rovněž přímý efekt na somatické buňky. Receptory interferonů (zejména typu  $\alpha/\beta$ ) jsou široce tkáňově distribuovány a mezi přímé biologické efekty na úrovni somatických buněk patří např. inhibice proliferace, indukce diferenciaci a inhibice angiogeneze. Signál doručení interferony je buňkou zpracováván v poměrně velmi komplexní podobě na několika úrovních, jejichž podrobný popis přesahuje rámec tohoto článku - primární signál je z buněčného povrchu do jádra převáděn transdukční drahou JAK-STAT, mezi takto nově exprimovanými geny se ovšem nalézají geny pro další transkripční faktory, jako je rodina transkripčních faktorů IRF, dále PML a CIITA, které propagují interferonový signál v rámci sekundární transkripční odpovědi (33, 34). Mezi geny aktivovanými interferonem je i klasický tumorový supresorový gen *p53*, a to jak v rámci primární odpovědi (35), tak prostřednictvím faktoru PML (36, 37), vedle toho byl přímý tumorový supresorový účinek popsán i pro protein IRF-1 (38). Interferony vedle toho standardně zvyšují expresi *HLA* genů I.třídy. Interferonový signál má ovšem na druhé straně za následek i represi specifických genů, mj. genu pro vaskulární endotelový růstový faktor-1, odkud se pravděpodobně odvozuje jeho inhibiční účinek na nádorovou angiogenezi (39).

Maligní melanom je nádor, u kterého je IFN $\alpha$  přímo farmakologicky používáno (40) a molekulární podstata tohoto farmakologického působení interferonů byla předmětem příspěvku Dr. Józsefa Tímára (National Institute of Oncology, Budapest). Cílem bylo identifikovat geny, jejichž exprese zakládá v klinické praxi velmi heterogenní odezvu na aplikaci interferonů. Po metodické stránce projekt zahrnoval identifikaci a porovnání souboru aktivovaných a reprimovaných genů kultivovaných buněčných populací kryjících celou škálu vývoje a progresu melanomu (normální kultivované melanocyty, melanomové buněčné linie odpovídající různým stádiím nádorové progresu - primární vs. invazivní vs. metastatické - a různým úrovním růstové senzitivity na interferonový signál - senzitivní vs. rezistentní). Projekt dosud nebyl publikačně dokončen a proto není možné uvést detailní výčet zjištěných diferencially exprimovaných genů. Dva nálezy ovšem stojí za zdůraznění - zjistilo se, že IFN $\alpha$  reprimuje expresi genu pro MART-1/Melan A a současně zvyšuje expresi genu pro multilekóvou rezistenci *MDR-1*. Tyto nálezy jsou velice zajímavé z hlediska diskuse, jaká forma následné terapie by byla nejvýhodnější v případě, že daný melanom vykazuje rezistenci vůči interferonu. Aktivace *MDR-1*-genu dopředu diskvalifikuje chemoterapii, ovšem jak represe *MART-1/Melan A*-genu, tak aktivace *MDR-1*-genu spolu s aktivací *HLA*-genů I.třídy by byla potenciálně možná s výhodou využít pro následnou specifickou imunoterapii. *MDR-1*-pumpa totiž podle všeho zvyšuje sekreci cytokinů, včetně IL-2 (41), což by mohlo přispět k vytvoření vhodného mikroprodtředí pro aktivaci imunitní odpovědi. Ještě významnější se zdá nálezy represe *MART-1/Melan A*-genu. Jedná se totiž o imunodominantní liniově-specifický antigen, tzn. že je exprimován už na melanocytech, T-lymfocyty namířené proti němu musí být tudíž fyziologicky předmětem mechanismů tolerance, zároveň ovšem, vzhledem ke své imunodominanci, diktuje specifitu imunitní odpovědi a zastíňuje pozdější melanomově-specifické antigeny. Represe tohoto genu následkem předchozí interferonové terapie by tudíž mohla být velmi výhodná právě z pohledu zrušení této imunodominance, což by mohlo otevřít dveře k vývoji a uplatnění nových melanomově-specifických vakcín s lepší vyhlídkou na klinickou odezvu.



## Literatura

1. Falk C.S., Riethmüller G., Gruber R. (2004): Tumorimmunologie. In: Hiddemann W., Huber H., Bartram C. (eds): Die Onkologie, pp.355-380, Berlin, Heidelberg: Springer.
2. Schreiber H. (1999): Tumor immunology. In: Paul W.E. (ed.): Fundamental Immunology, Fourth Edition, pp.1237-1270, Philadelphia: Lippincott-Raven.
3. Žaloudík J. (1997): Protinádorová imunoterapie. Klinická onkologie 10, 94-96.
4. Kuball J., Derigs H.-G., Wölfel T. (2002): T-Zelltherapie in der Onkologie. Therapeutische Vakzination, allogene Blutstammzelltransplantation und adoptiver T-Zelltransfer. Dtsch.Med.Wochenschr. 127, 755-762.
5. Blattman J.N., Greenberg P.D. (2004): Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. Science 305, 200-205.
6. Ko E.C., Wang X., Ferrone S. (2003): Immunotherapy of malignant diseases. Int.Arch.Allergy Immunol. 132, 294-309.
7. Rosenberg S.A., Yang J.C., Restifo N.P. (2004): Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. Nature Med. 10, 909-915.
8. Mocellin S., Mandruzzato S., Bronte V., Marincola F.M., Timmerman J.M., Levy R., Rosenberg S.A., Yang J.C., Restifo N.P. (2004): Cancer vaccines: pessimism in check. Nature Med. 10, 1278-1280.
9. Marincola F.M., Wang E., Herlyn M., Seliger B., Ferrone S. (2003): Tumors as elusive targets of T-cell-based active immunotherapy. Trends Immunol. 24, 335-342.
10. Wang E., Miller L.D., Ohnmacht G.A., Mocellin S., Perez-Diez A., Petersen D., Zhao Y., Simon R., Powell J.L., Asaki E., Alexander H.R., Duray P.H., Herlyn M., restifo N.P., Liu E.T., Rosenberg S.A., Marincola F.M. (2002): Prospective molecular profiling of melanoma metastases suggests classifiers of immune responsiveness. Cancer Res. 62, 3581-3586.
11. Nelson B.H. (2004): IL-2, regulatory T cells, and tolerance. J.Immunol 172, 3983-3988.
12. Hatina J. (2002): Molekulární biologie imunární odpovědi – 11. mezinárodní imunologický kongres, Stockholm, 22. – 27.7.2001. Epidemiol.Mikrobiol. Imunolo. 51, 82-87.
13. Erichsen H.C., Chanock S.J. (2004): SNPs in cancer research and treatment. British J.Cancer 90, 747-751.
14. Schwarz T. (2003): Immunology. In: Bologna J.L., Jorizzo J.L., Rapini P.R. (eds.): Dermatology, pp.65-81, New York: Mosby.
15. Hatina, J., Reischig J. (2001): Molekulární biologie buněčné imortalizace a její vztah ke karcinogenezi. Klinická onkologie 14, 145 – 153
16. Nguyen B., Elmore L.W., Holt S.E. (2003): Telomerase as a target for cancer immunotherapy. Cancer Biol.Therap. 2, 131-136.
17. Milani V., Endres M., Kuppner M.C., Issels R.D., Noessner E. (2004): Hitzenschokproteine, Immunokompetenz und Vakzinierung. Dtsch. Med. Wochenschr. 129, 31-35.
18. Oki Y., Younes A. (2004): Heat shock protein-based cancer vaccines. Expert Rev.Vaccines 3, 403-411.
19. Lauerová L., Kocák I. (2001): Regulace protinádorové imunity pomocnými CD4+ Th1/Th2 lymfocyty. Klinická onkologie 14, 154-156.
20. Bernhard H., Schmidt B., Meyer zum Büschenfelde C., Peschel C. (2001): Adoptiver Transfer von tumorreaktiven T-Zellen. Onkologie 7, 1196-1202.
21. Trowsdale J. (2001): Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. Immunity 15, 363-374.
22. Trowsdale J., Parham P. (2004): Defense strategies and immunity-related genes. Eur.J.Immunol. 34, 7-17.
23. Shilling H.G., Young N., Guethlein L.A., Cheng N.W., Gardiner C.M., Tyan D., Parham P. (2002): Genetic control of human NK cell repertoire. J.Immunol. 169, 239-247.
24. Kärre K. (2002): A perfect mismatch. Science 295, 2029-2031.
25. Ruggeri L., Capanni M., Urbani E., Perruccio K., Shlomchik W.D., Tosti A., Posati S., Rogaia D., Frassoni F., Aversa F., Martelli M.F., Velardi A. (2002): Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. Science 295, 2097-2100.
26. Velardi A., Ruggeri L., Capanni M., Mancusi A., Burchielli E., Perruccio K., Aversa F., Martelli M.F. (2004): Natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplantation. Hematology 2004, 337-341.
27. Dudley M.E., Wunderlich J.R., Robbins P.F., Yang J.C., Hwu P., Schwarzenberger D.J., Topalian J.C., Sherry R., Restifo N.P., Hubicki A.M., Robinson M.R., Raffeld M., Duray P., Seipp C.A., Rogers-Freer L., Morton K.E., Mavroukakis S.A., White D.E., Rosenberg S.A. (2002): Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. Science 298, 850-854.
28. Rosenberg S.A., Dudley M.E. (2004): Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 101 (Suppl.2), 14639-14645.
29. Powell D.J.Jr., Dudley M.E., Robbins P.F., Rosenberg S.A. (2005): Transition of late-stage effector T cells to CD27+CD28+ tumor reactive effector memory T cells in humans after adoptive cell transfer therapy. Blood 105, 241-250.
30. Kaplan B.L.F., Yu D.C., Clay T.M., Nishimura M.I. (2003): Redirecting T lymphocyte specificity using T cell receptor genes. Intern.Rev.Immunol 22, 229-253.
31. Roszkowski J.J., Yu D.C., Rubinstein M.P., McKee M.D., Cole D.J., Nishimura M.I. (2003): CD8-independent tumor cell recognition is a property of the T cell receptor and not the T cell. J.Immunol. 170, 2582-2589.
32. Žaloudík J. (1998): Lokoregionální aplikace interleukinu-2 u solidních nádorů. Klinická onkologie 11, 8-13.
33. Adam S., Vorlíček J. (1996): Biologie, farmakologie a přehled léčebného užití interferonů. Klinická onkologie 9, 115-120.
34. Boudný V., Kocák I., Kovařík J. (2002): Patogeneze transdukčních drah interferonových signálů a jejich význam pro predikci citlivosti nádoru na imunoterapii. Klinická onkologie 15, 126-129.
35. Takaoka A., Hayakawa S., Yanai H., Stoiber D., Negishi H., Kikuchi H., Sasaki S., Imai K., Shibue T., Honda K., Taniguchi T. (2003): Integration of interferon- $\alpha/\beta$  signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. Nature 424, 516-523
36. Bernardi R., Scaglioni P.P., Brgmann S., Horn H.F., Vousden K.H., Pandolfi P.P. (2004): PML regulates p53 stability by sequestering mdm2 to the nucleolus. Nature Cell Biol. 6, 665-672.
37. de Stanchina E., Querido E., Narita M., Davuluri R.V., Pandolfi P.P., Ferbeyre G., Lowe S.W. (2004): PML is a direct p53 target that modulates p53 effector function. Molecular Cell 13, 523-535.
38. Taniguchi T., Lamphier M.S., Tanaka N. (1997): IRF-1: the transcription factor linking the interferon response and oncogenesis. Biochim. Biophys. Acta 1333, M9-M17.
39. von Marschall Z., Scholz A., Cramer T., Schafer G., Schirmer M., Oberg K., Wiedenmann B., Hocker M., Rosewicz S. (2003): Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. J.Natl.Cancer Inst. 95, 437-448.
40. Sabel M.S., Sondak V.K. (2003): Pros and cons of adjuvant interferon in the treatment of melanoma. The Oncologist 8, 451-458.
41. Drach J., Gsur A., Hamilton G., Zhao S., Angerler J., Fiegl M., Zojer N., Raderer M., Haberl I., Andreeff M., Huber H. (1996): Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon- $\gamma$  in normal human T lymphocytes. Blood 88, 1747-1754.

# VULVÁRNA HISTIOCYTÓZA Z LANGERHANSOVÝCH BUNIEK

## VULVAR LANGERHANS CELL HISTIOCYTOSIS

MLYNČEK M., UHARČEK P.

DEPARTMENT OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY  
FACULTY HOSPITAL NITRA, SR

\*\*Author to whom correspondence should be sent

**Súhrn:** Histiocytóza z Langerhansových buniek je vzácné proliferatívne ochorenie, ktoré má nejasnú etiológiu, pestré klinické symptómy a veľmi široké biologické správanie. Liečba nie je presne definovaná a je veľmi individuálna. Obťažnosť terapie spočíva aj v nemožnosti predpovedať klinický priebeh ochorenia. Sú potrebné ďalšie klinické štúdie s cieľom predikcie priebehu ochorenia a definovania prognostických faktorov. Výskumné úsilie sa musí zamerať na objasnenie patogenézy a vypracovanie racionálnej terapie. Autori článku podávajú prehľad o vulvárnej lokalizácii histiocytózy z Langerhansových buniek a prezentujú súčasnú koncepciu biologických funkcií Langerhansových buniek.

**Kľúčové slová:** histiocytóza z Langerhansových buniek, vulva, imunohistochemia, terapia

**Summary:** Langerhans cell histiocytosis (LCH) is a rare proliferative disorder of Langerhans cells with uncertain etiology, wide spectrum of clinical symptoms and varied behavior. Treatment is not well defined and is highly individualized. The difficulty of the therapy also lies in the unpredictability of the clinical course. Further clinical studies are required to establish the natural course and prognostic factors of this disease and more research needs to be conducted to understand the pathogenesis and rational management of this disorder. The authors present a review of vulvar localization of LCH, and the current concept of Langerhans cell biofunction is also outlined.

**Key words:** Langerhans cell histiocytosis, vulva, immunohistochemistry, treatment

### INTRODUCTION

Langerhans cell histiocytosis (LCH) encompasses a group of diverse disorders that are typically characterized by the accumulation and infiltration of monocytes, macrophages, and dendritic cells in the affected tissues. The clinical presentation in this group of disorders varies greatly, ranging from mild to life threatening.

Although nearly a century has passed since the recognition of histiocytic disorders, their pathophysiology remains an enigma. LCH may affect patients of any age.

The exact adult disease incidence is unknown, but is much more common in children. The estimated pediatric incidence is approximately 3-4 per million with a peak between 1 and 3 years (1). The estimated total mortality of LCH is approximately 3% in adults and 15% in children (2). Most reports are based on a single-specialty experience and there are only a few describing relatively large series of patients (3).

### TERMINOLOGY

Langerhans cell histiocytosis (LCH), also known as Langerhans cell granulomatosis or histiocytosis X was first described by Paul Langerhans in 1868 (4).

Lichtenstein originated the term histiocytosis X in 1953 to describe a group of poorly understood diseases that differed in presentation but had a common pathologic characteristic: histiocyte proliferation (5).

In 1987, the International Histiocyte Society changed the name of the disease from histiocytosis X to Langerhans' cell histiocytosis (6).

Patients with LCH can have a broad spectrum of disease manifestations, from involvement of a single site to widespread systemic involvement. This spectrum of clinical presentations has led to a number of terms for LCH.

Eosinophilic granuloma refers to disease limited to a single site, usually bone. Patients with Hand-Schüller-Christian disease present with a classic triad of multiple bone lesions,

exophthalmos, and diabetes insipidus. Abt-Letterer-Siwe disease is an acute, progressive, and often fatal multisystem variant of LCH that usually affects the very young. There may be transitional forms between the three entities from the outset or during the evolution of the disease (7).

### PATHOGENESIS

Although the clinical and histological aspects of LCH are well established, the cause and pathogenesis of LCH remain unclear. Infectious agents and cellular and immune system dysfunction, whether related to lymphocytes and cytokines, genetic factors, cellular adhesion molecules, or a combination of these, have been implicated in the etiology and pathophysiology of these disorders.

LCH is a disorder of Langerhans cells (LC). LC are dendritic, peripheral, antigen-processing cells of bone marrow origin. They present various environmental, viral, and tumor-associated alloantigens to immunologically competent T-lymphocytes, stimulate allogeneic and syngeneic mixed leukocyte reactions, secrete interleukin-1, function as accessory cells in the generation of cytotoxic T-lymphocytes, and are target cells for the generation of delayed hypersensitivity reactions and possibly for cytotoxic T-lymphocytes in acquired immune deficiency syndrome. Thus, Langerhans cells constitute an important part of the afferent limb of the localized immune response (8, 9, 10). These cells are found throughout the body but are primarily located in the suprabasal layer of human epidermis (11).

LC act as sentinels. They recognize, internalize, and process antigens encountered in the skin. Upon encountering antigens, LC become activated with subsequent maturation and induction of their migratory capacity. Activated LC then detach from their surrounding epidermal microenvironment and travel to draining lymph nodes via afferent lymphatics, where they are termed interdigitating dendritic cells. Once in the lymph node, LC lose their ability to take up and process

antigen, but instead acquire immunostimulatory capabilities. These capabilities include: upregulation of MHC molecules, expression of B7 molecules, necessary for naïve T lymphocyte activation, and the upregulation of several adhesion molecules, important for interactions with antigen-specific T cells. In this way, LC are able to process and present antigens encountered in the skin to naïve T lymphocytes in the draining lymph nodes. Maturation into functional LC is affected by cytokines such as GM-CSF, IL-1, and TNF- $\alpha$  (12-16).

The disease is believed to result from a disorder of immune regulation (17).

Langerhans cells in patients with LCH are aberrant and profoundly differ from normal LC. They differ from their normal counterparts in their migration, efficiency of antigen presentation, cytokine production, and expression of important cell surface proteins. LCH cells can accumulate in organs that are outside of the normal physiologic distribution of LC cells. Langerhans cells normally reside only in skin, lymph nodes, or thymus. LCH cells may also involve the abnormal accumulation of dendritic cell progenitors, which are CD34+. In a small study, the percentage of CD34+ cells isolated from the peripheral blood of patients with LCH was three times higher than in normal controls (18).

Whether LCH is reactive or neoplastic is even debated, and several features provide seemingly contradictory evidence on this point: spontaneous resolution of disease on the one hand and clonality of lesional LCH on the other (19, 20).

Like cancer, LCH can affect any organ system. LCH is not regarded as a „conventional“ malignancy. Histopathologist describes Langerhans' cell „accumulation“ or „activation“ rather than „proliferation“ important difference from true malignancy. Even studies of clonality may yield puzzling results, with some reports examining only one sample per patient and therefore showing evidence of LCH cell monoclonality in some forms of the disease (21) whilst others have reported polyclonality, when distinct lesions of the same patient have been studied at the same time (22).

The alternative possibility of LCH arising from somatic mutations that cause clonal expansion of Langerhans cells or their precursors has been proposed. However, this theory also may involve a viral theory in which viral nucleic acids give rise to such mutations, but the search for viral cause and for molecular abnormalities are still unsuccessful (23, 24, 25).

Concept of clonality in LCH remains controversial (26).

Several important insights have recently been made, which support the hypothesis that LCH is a neoplasia of dendritic cells (22).

The observation that around 1% of cases of LCH have another affected relative, either child or adult, suggests a genetic predisposing factor (27).

Therefore, each theory should not be considered to be mutually exclusive.

LCH can be progressive and fatal. In other cases, LCH is localized and self-limited. The natural history of this disease is atypical and often fluctuates. Its systemic manifestations include weight loss, fever, chills, and fatigue (28).

LCH is practically the only known human disease of dendritic cells, whose key immunological role, especially in cancer surveillance, is now of considerable interest. The importance of a methodical approach is that it may not only throw light on a disease process, but also on the physiological function of the normal cell counterpart (29).

## GENITAL INVOLVEMENT

LCH of the lower female genital tract was first reported in a 6-year-old child by Lane and Smith in 1939. This case was in association with diffuse cutaneous and multiorgan involvement (30).

Localization of LCH in the female genital mucosa is rare, and

Axiotis et al reviewed 42 cases in which the lesions, which were often multiple, preceded systemic evidence by many years. The age at onset ranged from 8 months to 85 years, average 29 years. LCH may encompass the vulva, vagina, cervix, endometrium, and ovary (31). These authors classified genital LCH into four distinct nosologic groups, based on initial clinical presentation and natural history:

(a) LCH of only the genital tract, (b) genital LCH with subsequent multiorgan involvement, (c) oral or cutaneous LCH with subsequent genital and multiorgan involvement, and (d) diabetes insipidus with subsequent genital and multiorgan involvement (31).

There appears to be no correlation between the histology and the outcome of the genital lesions. Complete regression, partial improvement, persistent lesions, and recurrences were seen in all four groups of patients.

Genital LCH as the sole manifestation of this disease is very unusual (32).

„Pure“ vulvar Langerhans cell histiocytosis is a rare presentation. To date, 19 cases of isolated (localized) vulvar LCH have been reported (33, 34). Clinical follow-up of these cases showed that one third of the patients developed disseminated disease. The most common sites of dissemination were bones, including the sella turcica causing diabetes insipidus. Other sites of dissemination included skin, lung, oral cavity, bone marrow, and other sites in the female genital tract. Prognostic conclusions could not be drawn in this patient series due to a lack of documentation of patient follow-up.

## CLINICAL PRESENTATION OF VULVAR LCH

Vulvar LCH may mimic various neoplastic and non-neoplastic disorders. Pruritic, erythematous lesions resemble eczema, seborrheic dermatitis, or Darier's disease.

Papular lesions with ulceration may resemble chancroid, granuloma inguinale, or lymphogranuloma venereum. Single indurated ulcers can have the appearance of syphilitic chancres, tuberculosis, Crohn's disease, or squamous cell carcinoma. Painful multiple ulcerovesicular lesions may be mistaken for herpes genitalis, erythema multiforme, or Behcet's syndrome. When the lesions are projecting, multicentric masses, the differential diagnosis also includes malignant melanoma and sarcoma. The rare, diffusely, indurated lesion clinically mimics Paget's disease of the vulva (32, 35-39).

## DIAGNOSIS

The diagnosis of LCH is based on histopathology pattern in biopsy specimens showing multinucleated Langerhans' cells, histiocytes, and eosinophils. The presence of Birbeck granules on electron microscopic examination or the antigenic markers that react with Cd1a glycoprotein and the cytoplasmic protein S-100 detected by immunoperoxidase staining is considered diagnostic (4, 8, 40).

Strict diagnostic criteria have been published by the Histiocyte Society (6): Fresh-tissue biopsy is required to diagnose the disease. In order to establish a definitive diagnosis, either Birbeck's granules must be identified on electron microscopy or the cells must be CD1a-positive. Birbeck's granules are pentalaminar cytoplasmic inclusion bodies that sometimes have a dilated terminal. A less certain diagnosis can be made if biopsy reveals characteristic morphology and if two or more of the following are present on staining: characteristic peanut lectin binding, S-100 protein, alpha-D-mannosidase, and adenosine triphosphatase.

The differential diagnosis of LCH at the microscopic level includes immunodeficiency syndromes with graft-versus-host disease, viral infections, and infiltrative diseases such as leukemia or lymphoma, reticuloendothelial storage diseases, Erdheim-Chester disease, and papular xanthomas (41, 42).

It seems possible that LCH involving the vulva has been under-diagnosed in the past, considering that almost all cases of isolated vulvar LCH have been reported within the past twenty years. Increased awareness of isolated LCH involving the vulva and other sites in the gynecologic tract is one likely explanation for these cases being reported during the past two decades. The availability of immunohistochemical analysis for routinely processed tissues, which became widespread in the 1980s, also is a likely explanation.

It is important to exclude systemic disease in any patient suspected of having vulvar LCH. The routine evaluation should include measuring serum electrolytes and performing a chest X-ray, CT of the abdomen and pelvis, and skeletal survey (43).

### TREATMENT OF VULVAR LCH

The course of LCH is unpredictable. In some cases, it resolves without treatment.

On the other hand, it can recur even after the initial response to treatment was successful. Due to the rarity of this disease, treatment of vulvar LCH is still very diverse and is highly individualized.

Therapeutic options include surgery, topical and systemic steroids, topical nitrogen mustard, radiotherapy, chemotherapy (mechlorethamine, etoposide, methotrexate, cyclosporine, vincristine, vinblastine), photochemotherapy and other treatment modalities (trimethoprim-sulfamethoxazole, isotretinoin, interferon, thalidomide) (43-47). Mixed results have been obtained with all treatment modalities.

Voelklein et al. report the case of a 36-year-old woman who presented with a 9-year history of vulvar lesions. The diagnosis of LCH was established by immunohistochemical techniques. The patient received radiotherapy to the vulva and responded with complete remission (39).

Pathner et al. presented a case of isolated vulvar LCH that was initially treated with an excision biopsy but recurred 2 months later. Local vulvar radiotherapy resulted in complete resolution of the lesion and there was no evidence of recurrence after 24 month of follow-up (35).

Borglin et al, Dadey and Hurxthal performed vulvectomy on the patients with vulvar LCH as initial therapy (48, 49). Also the case of Chauffaile et al support the recommendation for the primary surgical resection of the vulvar histiocytic lesions (50).

It seems that local excision of LCH nodules isolated on the vulva has the best therapeutic benefit in adult patients but 50% of the patients with genital LCH who underwent surgical excision relapsed after surgery (51). If LCH indeed has its origin in the bone marrow, then it is hardly surprising that such a high relapse rate exists.

Santillan et al. referred a 33-year-old women with isolated vulvar LCH. The patient was treated with external beam radiotherapy to the vulva after excision biopsy. The recurrence on the vulva was treated with radical vulvar excision. The second recurrence in the perineum was successfully treated with thalidomide (46).

Isolated vulvar LCH has the potential for aggressive clinical behavior, either as local recurrence or disseminated disease. Two patients of LCH primary involving the vulva presented by Padula et al after dissemination of the disease were treated with radiation therapy, vulvectomy and thalidomide (34).

Montero et al advocate in the treatment of genital LCH the use of immunomodulatory agents (thalidomide, trimethoprim-sulfamethoxazol, interferons, retinoids) as initial first-line therapies, rather than surgical excision or radiotherapy (51). The first case of the successful use of thalidomide for genital LCH was reported by Gnassia et al in 1987 (52).

Dramatic responses of cutaneous and ano-genital lesions to thalidomide and interferons have been reported. Interferon  $\alpha$  and  $\beta$ , as well as isotretinoin, have been used in cutaneous disease with some reports of lasting remissions, and should be further investigated as potential therapies for genital LCH (53).

The efficacy of thalidomide in treating several inflammatory skin diseases suggests that the mechanism of action is related to immune modulation, cytokine inhibition, and/or anti-angiogenesis. The reason for its use to treat LCH is that thalidomide is an inhibitor of tumor necrosis factor, which plays a prime role in generating Langerhans' cells from their CD34+ bone precursors (54).

Several investigators found thalidomide to be effective in treating cutaneous and genital LCH, but the response was temporary, and disease recurred after treatment ended (55, 56).

Optimal treatment has not yet been determined. New treatment modalities are needed for this disease. Large scale, clinical control, randomized trials to assess optimal therapy generally are not feasible in such an uncommon disease with variable clinical features and natural history. The difficulty of the treatment also lies in the unpredictability of the course of LCH. The establishment of the International Histiocyte Society Registry was the first step towards a cooperative effort in the management of LCH (57).

### CONCLUSION

Although the occurrence of LCH on the vulva is very unusual, gynecologists must bear this possibility in mind when a woman presents atypical chronic lesions on the genital mucosa. The clinical diagnosis is impossible to establish because no typical lesions are found. In such cases, it is necessary to perform a biopsy on the mucosa, rule out the possibility of systemic disease, and review the patient periodically in order to forestall a possible spread of the disease at any time.

Its etiology and pathophysiology, as well as the most effective modes of therapy, remain elusive. More research needs to be conducted so that we may better understand the mechanisms of LCH and help to predict when the disease is benign and may resolve on its own, and when it is aggressive and unremitting and requires treatment.

### REFERENCES

1. Broadbent V, Egeler RM, Nesbit ME Jr. Langerhans cell histiocytosis – clinical and epidemiological aspects. *Br J Cancer* 1994; 23 (Suppl): S11-16.
2. Malpas JS. Langerhans cell histiocytosis in adults. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12: 259-268.
3. Giona F, Caruso R, Testi AM et al. Langerhans' cell histiocytosis in adults: a clinical and therapeutic analysis of 11 patients from single institution. *Cancer* 1997; 80: 1786-1791.
4. Coppes-Zantinga A, Egeler RM. The Langerhans cell histiocytosis X files revealed. *Br J Haematol* 2002; 116: 3-9.
5. Lichtenstein L. Histiocytosis X. Integration of eosinophilic granuloma of bone, „Letterer-Siwe disease“, and „Hand-Schüller-Christian disease“ as related manifestation of a single nosologic entity. *AMA Arch Pathol* 1953; 56: 84-102.
6. Writing Group of the Histiocyte Society. Histiocytosis syndromes in children. *Lancet* 1987; 1: 208-209.
7. Cline MJ. Histiocytes and histiocytosis. *Blood* 1994; 84: 2840-2853.
8. Chu T, Jaffe R. The normal Langerhans cell and the LCH cell. *Br J Cancer* 1994;23(Suppl): S4-10.
9. Murphy GF, Bhan AK, Sato S et al. Characterization of Langerhans' cells by the use of monoclonal antibodies. *Lab Invest* 1981; 45: 465-468.
10. Silberberg I, Baer RL, Rosenthal SA. The role of Langerhans cells in allergic contact sensitivity. *J Invest Dermatol* 1981; 53: 149-174.
11. Stingl GKT, Katz SI. Origin and function of epidermal Langerhans' cells. *Immunol Rev* 1981; 53: 149-174.
12. Cumberbatch M, Kimber I. Phenotypic characteristics of antigen-bearing cells in the draining lymph nodes of contact sensitized mice. *Immunology* 1990; 71: 404-410.

13. Cumberbatch M, Dearman RJ, Kimber I. Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 beta for migration. *Immunology* 1997; 92: 388-395.
14. Cumberbatch M, Dearman RJ, Kimber I. Interleukin 1 beta and the stimulation of Langerhans cell migration: comparisons with tumour necrosis factor alpha. *Arch Dermatol Res* 1997; 289: 277-284.
15. Larsen CP, Ritchie SC, Pearson TC et al. Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations. *J Exp Med* 1992; 176: 1215-1220.
16. Prignano F, Domenici L, Carli P et al. Langerhans cell histiocytosis of the vulva: an ultrastructural study. *Ultrastruct Pathol* 1999; 23: 127-132.
17. De Graaf JH, Egeler RM. New insights into the pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis. *Curr Opin Pediatr* 1997; 9: 46-50.
18. Misery L, Rougier N, Crestani B et al. Presence of circulating abnormal CD34+ progenitors in adult Langerhans cell histiocytosis. *Clin Exp Immunol* 1999; 117: 177-182.
19. Yamaguchi S, Oki S, Kurisu K. Spontaneous regression of Langerhans cell histiocytosis: a case report. *Surg Neurol* 2004; 62: 136-140.
20. Yu RC, Chu C, Buluwela L, Chu AC. Clonal proliferation of Langerhans cells in Langerhans cell histiocytosis. *Lancet* 1994; 343: 767-768.
21. Willman CL, Busque L, Griffith BB et al. Langerhans'-cell histiocytosis (histiocytosis X)—a clonal proliferative disease. *N Engl J Med* 1994; 331: 154-160.
22. Yousem SA, Colby TV, Chen YY et al. Pulmonary Langerhans' cell histiocytosis: molecular analysis of clonality. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 630-636.
23. Brabencova E, Tazi A, Lorenzato M et al. Langerhans cells in Langerhans cell granulomatosis are not actively proliferating cells. *Am J Pathol* 1998; 152: 1143-1149.
24. Egeler RM, Favara BE, van Meurs M et al. Differential in situ cytokine profiles of Langerhans-like cells and T cells in Langerhans cell histiocytosis: abundant expression of cytokines relevant to disease and treatment. *Blood* 1999; 94: 4195-4201.
25. McLelland J, Newton J, Malone M et al. A flow cytometric study of Langerhans cell histiocytosis. *Br J Dermatol* 1989; 120: 485-491.
26. Willman CL, McClain KL. An update on clonality, cytokines, and viral etiology in Langerhans cell histiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12: 407-416.
27. Arico M, Danesino C. Langerhans' cell histiocytosis: is there a role for genetics? *Haematologica* 2001; 86: 1009-1014.
28. Howarth DM, Gilchrist GS, Mullan BP et al. Langerhans cell histiocytosis. Diagnosis, natural history, management, and outcome. *Cancer* 1999; 85: 2278-2290.
29. Donadieu J. Langerhans cell histiocytosis: portrait of a disease as a rare tumour. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1465-1466.
30. Lane CW, Smith MG. Cutaneous manifestations of chronic (idiopathic) lipoidosis (Hand-Schüller-Christian disease): Report of four cases, including autopsy observations. *Arch Dermatol Syphilol* 1939; 39: 617-644.
31. Axiotis CA, Merino MJ, Duray PH. Langerhans cell histiocytosis of the female genital tract. *Cancer* 1991; 67: 1650-1660.
32. Solano T, Espana A, Sola J, Lopez G. Langerhans' cell histiocytosis on the vulva. *Gynecol Oncol* 2000; 78: 251-254.
33. Cremonozzi D, Bruno M. Langerhans' cell histiocytosis of the vulva (case report). *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* 2004; 61: 40-43.
34. Padula A, Medeiros J, Silva EG, Deavers MT. Isolated vulvar Langerhans cell histiocytosis: report of two cases. *Int J Gynecol Pathol* 2004; 23: 278-283.
35. Pather S, Moodley JM, Bramdev A. Isolated Langerhans cell histiocytosis of the vulva: a case report. *J Obstet Gynaecol Res* 2001; 27: 111-115.
36. Rose PG, Johnston GC, O'Toole RV. Pure cutaneous histiocytosis X of the vulva. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 587-590.
37. Schwartz A, Zich P. Eosinophilic histiocytic granuloma of the vulva and cervix. *Sb Lek* 1989; 91: 1-4.
38. Stentella P, Cipriano L, Covello R et al. Langerhans cell histiocytosis of vulva and cervix in a 19-year-old woman. *Gynecol Obstet Invest* 1997; 44: 67-69.
39. Voelklein K, Horny HP, Marzusch K, Dielt J. Primary Langerhans cell histiocytosis of the vulva. *Gynecol Obstet Invest* 1993; 36: 189-190.
40. Pritchard J, Broadbent V. Histiocytosis—an introduction. *Br J Cancer* 1994; 23(Suppl): S1-3.
41. Teillac-Hamel D, Delanoe P, Fekete CN, de Prost Y. Skin diseases of the vulva in children. *Ann Dermatol Venerol* 1992; 119: 991-998.
42. Wong KK, Lin HP, Looi LM. Histiocytosis X and vulvar ulceration. *Int J Gynaecol Obstet* 1992; 39: 131-134.
43. Otis CN, Fischer RA, Johnson N et al. Histiocytosis X of the vulva: a case report and review of the literature. *Obstet Gynecol* 1990; 75: 555-558.
44. Meehan SA, Smoller BR. Cutaneous Langerhans cell histiocytosis of the genitalia in the elderly: a report of three cases. *J Cutan Pathol* 1998; 25: 370-374.
45. Miodovnik M, Adatto R, Adoni A et al. Vulvar eosinophilic granuloma. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1979; 58: 565-567.
46. Santillan A, Montero AJ, Kavanagh JJ et al. Vulvar Langerhans cell histiocytosis: a case report and review of the literature. *Gynecol Oncol* 2003; 91: 241-246.
47. Verret JL, Hadet M, Brunet A et al. Histiocytosis X with perianovular eosinophilic granuloma. Favorable effect of the local application of nitrogen mustard onto anovular lesions. *Ann Dermatol Venerol* 1985; 112: 165-166.
48. Borglin NE, Söderström J, Wehlin L. Eosinophilic granuloma (histiocytosis X) of the vulva. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1966; 73: 478-486.
49. Dadey JL, Hurxthal LM. Clinical manifestation of histiocytosis-X in the adult. *J Chronic Dis* 1957; 6: 475-482.
50. Chauffaile Mde L, Valerio RM, Diniz CM et al. Langerhans cell histiocytosis. *Rev Paul Med* 1998; 116: 1625-1628.
51. Montero AJ, Diaz-Montero CM, Malpica A et al. Langerhans cell histiocytosis of the female genital tract: A literature review. *Int J Gynecol Cancer* 2003; 13: 381-388.
52. Gnassia AM, Gnassia RT, Bonvalet D et al. Histiocytose X avec granulome eosinophile vulvaire: effect spectaculaire de la thalidomide. *Ann Dermatol Venerol* 1987; 114: 1387-1389.
53. Munn S, Chu AC. Langerhans cell histiocytosis of the skin. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12: 269-286.
54. Barnhill RL, McDougal AC. Thalidomide: use and possible mode of action in reactional lepromatous leprosy and in various other conditions. *J Am Acad Dermatol* 1982; 7: 317-323.
55. Bensaid P, Machet L, Vaillant L et al. Histiocytose Langherhansienne de l'adulte: localisation parotidienne regressive après traitement par thalidomide. *Ann Dermatol Venerol* 1992; 119: 281-283.
56. Thomas L, Ducros B, Secchi T et al. Successful treatment of adult's Langerhans cell histiocytosis with thalidomide. Report of two cases and literature review. *Arch Dermatol* 1993; 129: 1261-1264.
57. Arico M, Girschikofsky M, Genereau T et al. Langerhans cell histiocytosis in adults. Report from the International Registry of Histiocyte Society. *Eur J Cancer* 2003; 39: 2341-2348.

## VLIV SELEKČNÍHO TLAKU VYBRANÝCH ANTIBIOTIK NA REZISTENCI NEJČASTĚJI SE VYSKYTUJÍCÍCH GRAMNEGATIVNÍCH BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ NA ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE VE FAKULTNÍ NEMOCNICI V HRADCI KRÁLOVÉ

### AN INFLUENCE OF SELECTIVE PRESSURE OF ANTIBIOTICS ON GRAM-NEGATIVE BACTERIAL FLORA RESISTANCE IN THE HAEMATOLOGY UNIT AT THE TEACHING HOSPITAL HRADEC KRALOVE, CZECH REPUBLIC

ZEMKOVÁ M.<sup>1</sup>, JEBAVÝ L.<sup>2</sup>, ČERMÁK P.<sup>3</sup>, KOBLIHOVÁ H.<sup>1</sup>, VLČEK J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> KATEDRA KLINICKÉ A SOCIÁLNÍ FARMACIE, UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE, FARMACEUTICKÁ FAKULTA, HRADEC KRÁLOVÉ

<sup>2</sup> II. INTERNÍ KLINIKA - ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, LÉKAŘSKÁ FAKULTA A FN HRADEC KRÁLOVÉ

<sup>3</sup> ÚSTAV KLINICKÉ MIKROBIOLOGIE, LÉKAŘSKÁ FAKULTA A FN HRADEC KRÁLOVÉ

**Cíl studie:** Analyzovat vztah mezi expozicí antibiotikům (cefotaxim, ceftazidim, ofloxacin, ciprofloxacín, imipenem, meropenem, gentamicin, amikacin, netilmicin a amoxicilin/kyselina klavulánová) a rezistencí nejčastěji se vyskytujících gram-negativních bakteriálních kmenů na Oddělení klinické hematologie II. Interní kliniky Fakultní nemocnice. **Použité metody:** Jedná se o retrospektivní, observační studii. Sběr dat byl prováděn v období od 1.1.1998 do 31. 12. 2001. Spotřeba antibiotik byla vyjádřena v definovaných denních dávkách vztažených na 100 ošetrovacích dnů - lůžkodnů (DDD/100 lůžkodnů). Identifikace bakteriálních kmenů a vyšetření citlivosti (disková difusní metoda) bylo provedeno v souladu s mezinárodně akceptovanými pokyny. Do studie byly pro jednu hospitalizaci jednoho pacienta zahrnuty pouze odlišné fenotypy. Závislost četnosti rezistentních kmenů na expozici antibiotikům byla analyzována pomocí lineární regrese. **Výsledky:** Statisticky významná lineární závislost byla zjištěna mezi relativní roční spotřebou fluorochinolonů a rezistencí kmenů *Enterobacter spp.* k fluorochinolonům ( $r=0,821$ ;  $p=0,005$ ). Statisticky významná negativní korelace byla zjištěna mezi expozicí gentamicinu a rezistencí kmenů *Klebsiella pneumoniae* ( $r=-0,882$ ;  $p=0,012$ ). **Závěr:** V prostředí hemato-onkologického oddělení bylo zjištěno, že snížení selekčního tlaku fluorochinolonů vede rovněž ke snížení výskytu kmenů *Enterobacter spp.* rezistentních k tomuto antibiotiku. Paradoxně byl na oddělení při nízké spotřebě gentamicinu pozorován vysoký podíl kmenů *Klebsiella pneumoniae* rezistentních vůči gentamicinu.

**Klíčová slova:** antibiotika, selekční tlak antibiotik, gram-negativní bakterie, hemato-onkologie

**Objective:** Aim of the study was to evaluate the relationship between usage of antimicrobial agents intended to treat infection caused by Gram-negative bacteria (cefotaxim, ceftazidim, ofloxacin, ciprofloxacín, imipenem, meropenem, gentamicin, amikacin, netilmicin and amoxicilin/clavulanic acid) and resistance of those bacteria in the haemato-oncology unit at the University Hospital. **Methods design:** Observational, retrospective study. Data had been collected from January 1, 1998 to December 31, 2001. Antibiotic usage data were obtained by chart extraction. Non-duplicate strains isolated from haemato-oncology inpatients were tested for their susceptibility by the disk diffusion test. **Results:** A relationship between relative one-year consumption (expressed in DDD/100bed-days) and rates of resistance for selected Gram-negative bacteria was evaluated by the means of linear regression. We identified statistically significant positive correlation for fluoroquinolones usage and *Enterobacter spp.* resistance ( $r=0,821$ ;  $p=0,005$ ). Statistically significant negative correlation was found for usage of gentamicin ( $r=-0,882$ ;  $p=0,012$ ) and *Klebsiella pneumoniae* resistance. **Conclusion:** In the haemato-oncology setting a decrease of selective pressure of fluoroquinolones entailed a decrease of *Enterobacter spp.* strains resistant to fluoroquinolones. In paradox, high resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains to gentamicin was observed at the haemato-oncology wards with low consumption of gentamicin.

**Keywords:** antibiotics, antibiotic selective pressure, gram-negative bacteria, haemato-oncology

#### Úvod

Bakteriální rezistence vůči antibiotikům je závažným celosvětovým problémem. Zvyšující se frekvence rezistentních bakteriálních kmenů je opakovaně zjišťována jak v nemocničním prostředí, tak v komunitě.

V nemocničním prostředí je situace závažná zejména na hemato-onkologických odděleních a jednotkách intenzivní péče, kde vysoký selekční tlak antibiotik a mnohdy nedodržování hygienických opatření vede ke vzniku a šíření nozokomiálních

nákaz [1-3]. Kmeny, které tato onemocnění způsobují, bývají často multirezistentní a jsou v literatuře dávány do souvislosti s neúspěšnou a nákladnou terapií [4, 5]. Navzdory zvyšující se prevalenci grampozitivních bakteriálních agens zůstávají gramnegativní kmeny stále významnými patogeny [6, 7].

Selekční tlak antibiotik je kromě dalších rizikových faktorů uváděn jako primární příčina narůstající bakteriální rezistence vůči antibiotikům. Expozice antibiotikům je uváděna jako

jeden z rizikových faktorů osídlení pacientů multirezistentními kmeny. Dalšími rizikovými faktory (sekundárně usnadňující kolonizaci/infekci rezistentními kmeny) jsou základní onemocnění, aplikace cytostatických režimů se zvýrazněnou slizniční toxicitou, programy autologních a allogenních transplantací periferních kmenových buněk (PBPCT), intravaskulární či permanentní katetrizace, mechanická ventilace, délka hospitalizace; celková závislost na zdravotnickém personálu, dodržování hygienických opatření aj. [8, 9].

Naše studie byla provedena s cílem analyzovat vliv selekčního tlaku některých antibiotik, používaných v léčbě/profylaxi infekcí gramnegativními bakteriemi, a rezistenci nejčastěji se vyskytujících gramnegativních bakteriálních kmenů na Oddělení klinické hematologie II. Interní kliniky Fakultní nemocnice [10,11].

## Metodika

### Soubor nemocných

Retrospektivně, za období od 1.1. 1998 do 31.12. 2001, byly ze zdravotnické dokumentace všech pacientů hospitalizovaných na dále uvedených jednotkách Oddělení klinické hematologie (OKH) ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové, zjišťovány údaje o veškeré expozici antibiotikům.

### Sledované oddělení:

- Standardní oddělení 29 lůžek
- Integrované oddělení klinické onkologie (IOKO) 25 lůžek
- Transplantační oddělení 6 lůžek
- Oddělení hematologické intenzivní péče 6 lůžek
- Jednotka intenzivní péče 4 lůžka

Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice v Hradci Králové rozhodnutím ze dne 13. 3. 2002.

### Gramnegativní bakterie

Byla provedena frekvenční analýza zachycení jednotlivých bakteriálních druhů/rodů. Do dalšího šetření byla zahrnuta rezistence bakteriálních agens, které tvořily během sledovaného období více než 3 % z celkového zastoupení izolovaných G- bakterií.

### Mikrobiologické vyšetření

Pacienti podstupují mikrobiologické vyšetření, a to při příjmu a následně vždy, pokud si to klinický stav pacienta vyžaduje. Bakteriální kmeny byly izolovány z klinicky relevantního biologického materiálu (nazofaryngeální sekret, bronchoalveolární laváž, sputum, krev, cerebrospinální mok, moč, jiné tělní tekutiny a exudáty, intravaskulární katetry). Ve studii jsou zařazeni pouze pacienti, u kterých byly prokázány infekční komplikace získané během hospitalizace (dle CDC definice). Údaje o citlivosti kmenů byly získány z mikrobiologické laboratoře Fakultní nemocnice. Identifikace bakteriálních kmenů a vyšetření citlivosti (disková difusní metoda) bylo provedeno v souladu s mezinárodně akceptovanými pokyny [12].

K vyloučení duplicit kultivací byly do studie, ke zjištění celkového podílu rezistentních kmenů, zahrnuty pouze odlišné fenotypy pro jednu hospitalizaci daného pacienta. Jako odlišné fenotypy byly definovány kmeny, které se lišily svou citlivostí alespoň k jednomu antibiotiku ve škále vyšetřovaných antibiotik. U jednotlivých kultivací se nerozlišovalo, zda se jedná o kolonizaci nebo floridní infekci. Bakteriální rezistence byla vyjádřena jako podíl kmenů rezistentních k vyšetřovanému antibiotiku z celkového počtu izolovaných G- bakterií.

### Spotřeba antibiotik

Celková expozice antibiotikům byla zaznamenána u každého pacienta hospitalizovaného na výše zmíněném oddělení. Tyto údaje byly získávány ze zdravotní dokumentace pacienta. Pro účely analýzy byla vybrána antibiotika s účinkem proti kmenům gramnegativních patogenů: cefalosporinů 3. generace

(cefotaxim, ceftazidim), fluorochinolony (ofloxacin, ciprofloxacin), karbapenemy (imipenem, meropenem), aminoglykosidy (gentamicin, amikacin, netilmicin) a aminopeniciliny s inhibítorem beta-laktamázy (amoxycilin/kyselina klavulánová).

Pro účely studie byla antibiotika seskupena na základě ATC klasifikace (Anatomicko-terapeuticko-chemická klasifikace). Definované denní dávky pro jednotlivá antibiotika byly zjištěny na základě ATC/DDD klasifikace [13] a agregovaná data byla vyjádřena jak v absolutní (celkové) roční spotřebě (DDDatb), tak v relativních hodnotách (relativní roční spotřeba antibiotik; RDDDatb) definovaných denních dávek na 100 ošetřovacích dnů - lůžkodnů (DDDatb /100 lůžkodnů).

Selekční tlak antimikrobních preparátů na Oddělení klinické hematologie (OKH) fakultní nemocnice byl hodnocen pomocí parametru RDDDatb, který lze definovat poměrem absolutního počtu definovaných denních dávek (DDDatb) jednotlivých antibiotik na 100 ošetřovacích dnů-lůžkodnů (DDDatb /100 lůžkodnů) podle vzorce:

$$RDDDatb = DDDatb \times 100 / \text{počet lůžkodnů} [14]$$

Při hodnocení byla porovnávána půlroční období v intervalu I. pololetí 1998- II. pololetí 2001 (I./1998, II./1998, I./1999, II./1999, I./2000, II./2000, I./2001, II./2001).

### Statistika

Sledováno bylo zastoupení jednotlivých gram-negativních kmenů v uvedeném období a procentuální zastoupení rezistence na jednotlivá antibiotika. Srovnávány byly změny v zastoupení jednotlivých mikrobů a změny v rezistenci na jednotlivá antibiotika v časovém horizontu let 1998-2001. Závislost četnosti kmenů rezistentních vůči danému antibiotiku na expozici daného antibiotika na oddělení klinické hematologie byla analyzována metodou lineární regrese. Statistická významnost byla stanovena na hladině 95 %.

### Výsledky

Celkový počet pacientů hospitalizovaných na Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice Hradec Králové ve sledovaném období byl 7432 pacientů. Přehled frekvence gramnegativních bakteriálních druhů izolovaných z klinicky relevantních biologických materiálů je podán v tabulce 1. Procentuální podíl kmenů *Escherichia coli* činil ve sledovaném období 13,2-20,5 % izolovaných kmenů. Z dalších gram-negativních bakterií byly s největší četností výskytu identifikovány druhy *Enterobacter spp.* (3,6-8,1 %), *Pseudomonas aeruginosa* (11,8-17,0 %), *Acinetobacter spp.* (1,8-7,5 %) a *Klebsiella pneumoniae* (8,1-17,8%). Frekvence *Stenotrophomonas maltophilia* byla prokázána v intervalu 0,3-7,4 %. Analýza aplikace jednotlivých antimikrobních preparátů ve sledovaném období na Oddělení klinické hematologie (OKH) je uvedena v tabulce 2. Na základě uvedených dat je zřejmé, že aplikace aminoglykosidových antibiotik se snížila o 18,5%, významného poklesu bylo dosaženo rovněž u amoxicilin/kys. klavulánová (o 16,3 %). Výrazný pokles (o 38,1 %) byl zaznamenán u cefalosporinů 3. generace. Selektivní tlak fluorochinolony byl výrazněji redukován až v roce 2000, kdy jejich spotřeba byla v porovnání s rokem 1999 nižší o 14,1 %.

**Tabulka 1: Frekvence izolovaných G-bakterií u pacientů hospitalizovaných na Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice Hradec Králové.**

Druh	relativní četnost (v %)			
	1998	1999	2000	2001
<i>Enterobacter spp.</i>	8,1	6,0	7,2	3,6
<i>Escherichia coli</i>	20,5	18,7	13,2	18,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16,6	14,7	17,0	11,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13,7	8,1	8,8	17,8
<i>Acinetobacter spp.</i>	7,5	5,7	3,2	1,8
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,3	0,3	3,0	7,4

**Tabulka 2: Selekční tlak jednotlivých antimikrobních preparátů na Oddělení klinické hematologie vyjádřený pomocí RDDDatb (DDDatb/100lůžkodnů).**

ATB	ATC	I/1998	II/1998	I/1999	II/1999	I/2000	II/2000	I/2001	II/2001
Ofloxacin	J01MA011	25,45	27,44	21,08	26,49	17,20	21,57	18,45	12,59
Ciprofloxacin	J01MA021	1,98	4,51	3,34	7,54	6,86	4,57	6,29	5,59
Gentamicin	J01GB031	1,81	2,63	2,07	3,39	1,66	2,20	1,73	1,50
Amikacin	J01GB061	2,63	7,69	5,51	8,47	6,19	6,44	4,82	5,60
Netilmicin	J01GB071	1,07	1,60	0,61	0,34	0,00	0,12	0,27	0,30
Cefotaxim	J01DA101	1,47	0,93	1,46	3,45	2,74	2,66	1,44	1,05
Ceftazidim	J01DA111	2,63	1,92	0,61	0,20	1,85	0,97	0,90	0,91
Cefoper.+sulb	J01DA 1	0,34	2,88	0,71	0,00	2,74	3,22	3,78	3,37
Cefepim	J01DA241	1,65	3,99	2,69	1,36	2,43	0,00	0,00	2,80
Cefpirom	J01DA371	3,31	4,67	2,19	4,14	3,25	4,16	2,33	0,57
Meropenem	J01DH021	0,68	2,04	0,30	0,50	0,08	0,67	0,00	1,68
Imipenem+inh	J01DH511	0,51	0,00	0,00	0,06	0,32	0,48	1,49	0,67
Amx.+enz.inh	J01CR021	32,78	27,40	35,73	45,14	33,50	26,14	30,05	20,30
Amp.+enz.inh	J01CR011	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Legenda: ošetřovací dny na OKH ve sledovaných obdobích: 1998-11789, 1999-16892, 2000-18633, 2001-19295

**Tabulka 3: Výsledky lineární regresní analýzy závislosti rezistence gramnegativních bakteriálních kmenů na spotřebě antibiotik na Oddělení klinické hematologie ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové.**

ATB <sup>a</sup>	Klebsiella pneumoniae		Pseudomonas aeruginosa		Acinetobacter spp		Escherichia coli		Enterobacter spp.	
	R <sup>b</sup>	P <sup>c</sup>	R <sup>b</sup>	P <sup>c</sup>	R <sup>b</sup>	P <sup>c</sup>	R <sup>b</sup>	P <sup>c</sup>	R <sup>b</sup>	P <sup>c</sup>
CTX	<b>-0,965</b>	<b>0,044</b>	<b>-0,951</b>	<b>0,049</b>	0,144	0,856	0,678	0,322	0,216	0,784
CTZ	0,842	0,158	-0,023	0,977	0,423	0,577	NT	NT	0,175	0,825
GEN	<b>-0,882</b>	<b>0,012</b>	-0,549	0,451	0,615	0,385	0,318	0,682	0,706	0,294
AMI	-0,777	0,223	0,660	0,340	0,353	0,647	NT	NT	NT	NT
NET	0,364	0,636	<b>-0,998</b>	<b>0,030</b>	-0,067	0,933	0,347	0,653	-0,078	0,922
FQ	0,102	0,898	0,264	0,736	0,236	0,764	<b>-0,994</b>	<b>0,004</b>	<b>0,821</b>	<b>0,005</b>
AMX+CA	<b>-0,996</b>	<b>0,004</b>	NT	NT	0,679	0,321	0,052	0,948	-0,820	0,180

Legenda: <sup>a</sup>) CTX - cefotaxim, CTZ - ceftazidim, GEN - gentamicin, AMI - amikacin, NET - netilmicin, FQ - fluorochinolony, AMX+CA - amoxicilin+kys. klavulanová; <sup>b</sup>) R - hodnota regresního koeficientu; <sup>c</sup>) P - hodnota pravděpodobnosti (tučně zvýrazněny statisticky významné hodnoty); <sup>d</sup>) NT - nebylo testováno

Vývoj selekčního tlaku aminoglykosidových antibiotik, cefalosporinů 3. generace, fluorochinolonů a amoxicilin/kys.klavulanová ve vztahu k výskytu rezistentních kmenů *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter spp.* a *Pseudomonas aeruginosa* je pro názornost uveden v grafech 1-5.

Z výsledků je zřejmá poměrně dobrá citlivost sledovaných G-baktérií k aminoglykosidovým antibiotikům s výjimkou zvýšené frekvence gentamicin a netilmicin-rezistentních kmenů *Klebsiella pneumoniae* (30,3-56,7 %; 27,3-33,0 %), gentamicin-rezistentních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* (32,6-51,4 %) a *Acinetobacter spp.* (36,4-43,8 %). Nízká úroveň rezistence byla prokázána u amikacinu, kde vyšší četnost rezistentních kmenů byla zaznamenána u *Pseudomonas aeruginosa* (11,6-24,3 %), naopak pokles rezistence byl pozorován u *Acinetobacter spp.* (27,3-18,8%). V případě cefalosporinů 3. generace byl prokázán pokles míry rezistence u *Acinetobacter spp.* (27,3-12,5 % pro ceftazidim), *Enterobacter spp.* (30,8-12,5% pro cefotaxim) a *Stenotrophomonas maltophilia* (50,0-37,5% pro ceftazidim). Účinnost fluorochinolonů byla limitována u kmenů *Escherichia coli* (5,4-24,4 %), *Pseudomonas aeruginosa* (39,5-50,0%) a *Stenotrophomonas maltophilia* (25,0-37,5 %), pokles rezistence byl dokumentován u *Klebsiella pneumoniae* (24,2-15,5 %). Pokles četnosti rezistentních kmenů k amoxicilinu/kys. klavulanová byl pozorován pouze u *Acinetobacter spp.* (63,6-25,0 %).

Výsledky regresní analýzy jsou prezentovány v tabulce 3. V tabulce jsou uvedeny hodnoty koeficientu lineární regrese společně s hodnotami spolehlivosti. Statisticky význam-

ná lineární závislost byla zjištěna mezi expozicí antibiotikům fluorochinolonové řady a rezistencí kmenů *Enterobacter spp.* k fluorochinolonům ( $r = 0,821$ ;  $p = 0,005$ ). Statisticky významná negativní korelace byla zjištěna mezi expozicí antibiotikům fluorochinolonové řady a rezistencí kmenů *Escherichia coli* k fluorochinolonům ( $r = -0,994$ ;  $p = 0,004$ ), spotřebou gentamicinu a rezistencí kmenů *Klebsiella pneumoniae* k tomuto antibiotiku ( $r = -0,882$ ;  $p = 0,012$ ), spotřebou cefotaximu a rezistencí kmenů *Klebsiella pneumoniae* k cefotaximu ( $r = -0,965$ ;  $p = 0,044$ ), spotřebou amoxicilinu/kys. klavulanová a rezistencí kmenů *Klebsiella pneumoniae* k tomuto antibiotiku ( $r = -0,996$ ;  $p = 0,004$ ) a spotřebou netilmicinu a rezistencí kmenů *Pseudomonas aeruginosa* k tomuto antibiotiku ( $r = -0,998$ ;  $p = 0,030$ ).

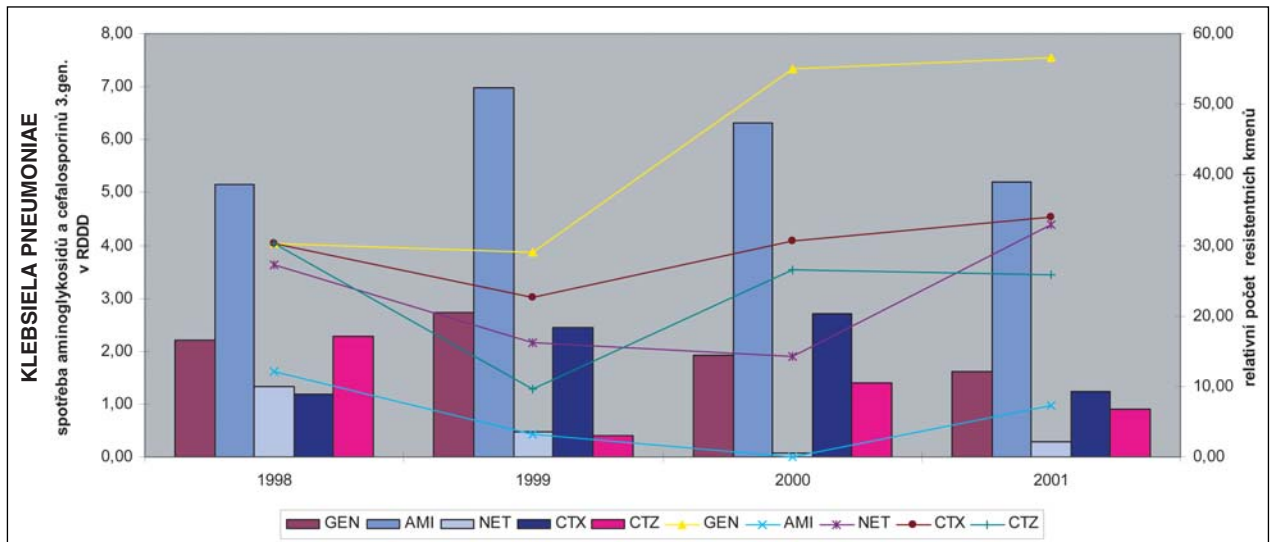
### Diskuse

Práce, kterou zde prezentujeme, patří do širší analýzy hledání vztahu mezi expozicí antibiotik a vývojem rezistence. Navazujeme na projekt [15], jehož výsledky ukázaly na možný vztah mezi vývojem rezistence fluorochinolonů a amikacinu ve vztahu k jejich spotřebě v prostředí celé nemocnice. Možnost tohoto projektu byla dána snadným přístupem k informacím o expozici léčiv a o vývoji rezistence.

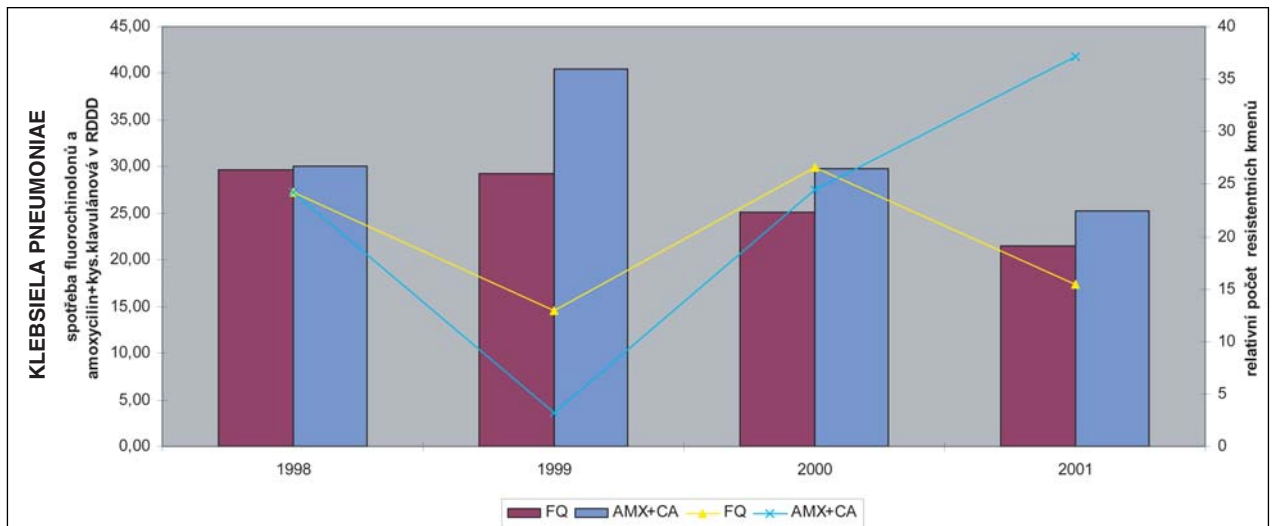
Analýza vztahu expozice antimikrobních léčiv a vývoje rezistence na Oddělení klinické hematologie je obtížnější, protože prostředí ve sledované fakultní nemocnici v současné době nedovoluje sledovat expozici léčiv pomocí počítačové techniky po absenci databáze předepisovaných léčiv na oddělení.



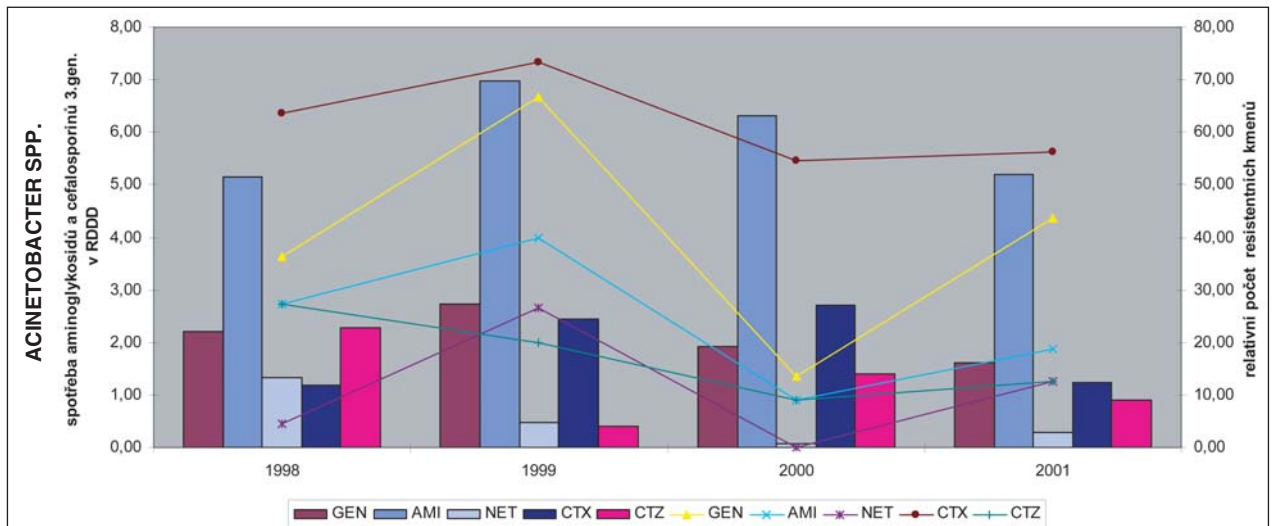
Graf 1: Vývoj selekčního tlaku aminoglykosidových antibiotik a cefalosporinů 3. generace (ve sloupcích) ve vztahu k výskytu rezistentních kmenů *Klebsiella pneumoniae* (spojené přímký).



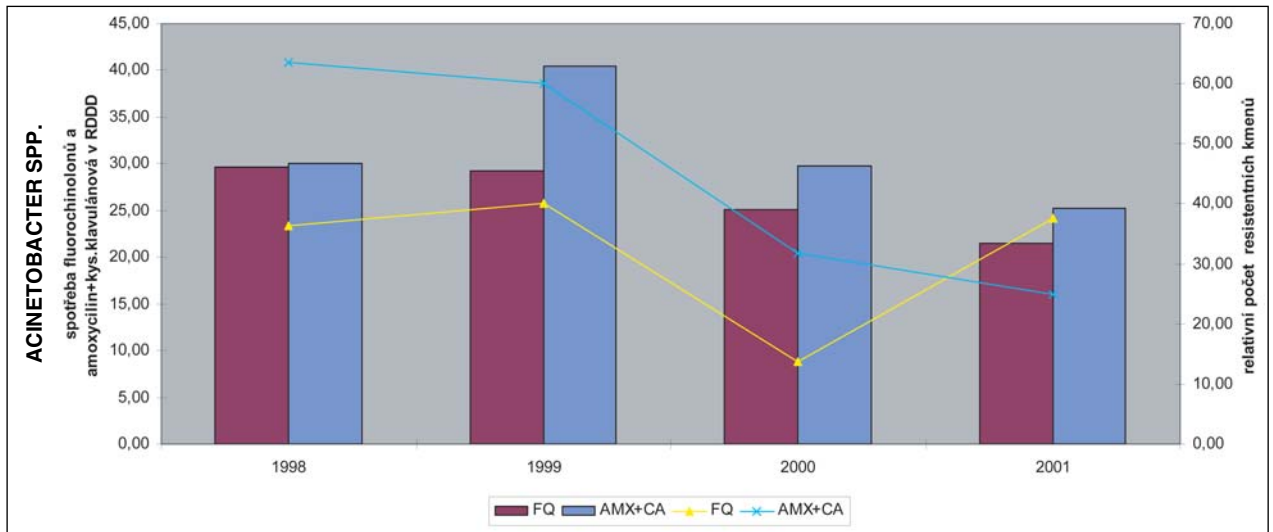
Graf 2: Vývoj selekčního tlaku antibiotik fluorochinolonové řady a amoxycilin/kys. klavulanová (ve sloupcích) ve vztahu k výskytu rezistentních kmenů *Klebsiella pneumoniae* (spojené přímký).



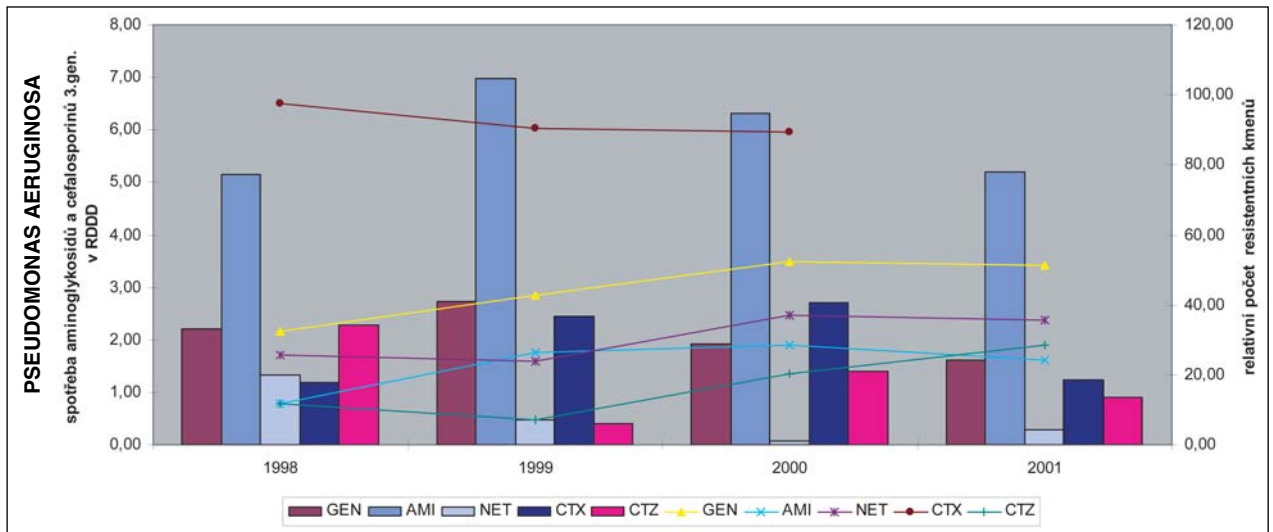
Graf 3: Vývoj selekčního tlaku aminoglykosidových antibiotik a cefalosporinů 3. generace (ve sloupcích) ve vztahu k výskytu rezistentních kmenů *Acinetobacter spp* (spojené přímký).



Graf 4: Vývoj selekčního tlaku antibiotik fluorochinolonové řady a amoxicilin/kys. klavulánová (ve sloupcích) ve vztahu k výskytu rezistentních kmenů *Acinetobacter spp* (spojené přímký).



Graf 5: Vývoj selekčního tlaku aminoglykosidových antibiotik a cefalosporinů 3.generace (ve sloupcích) ve vztahu k výskytu rezistentních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* (spojené přímký).



Naopak výhodou je, že díky studiu dokumentace máme přístup k plně informaci o expozici léčiva.

Důraz byl kladen zejména na hlavní, v literatuře často zmiňovaný, rizikový faktor pro osídlení multirezistentními bakteriálními kmeny, a to selekční tlak antibiotik [4, 5, 15]. V naší studii jsme se zaměřili na kmeny gram-negativních bakterií a antibiotika, která jsou v léčbě/prevenci infekcí způsobených těmito patogeny užívána v praxi. Kvůli potenciální možnosti zkřížené rezistence byla zaznamenávána kompletní antibiologická expozice u jednotlivých pacientů.

Význam kmenů *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter spp* a *Stenotrophomonas maltophilia*, jako potenciální původce bakteriálních onemocnění, ve flóře pacientů na hemato-onkologických odděleních byl opakovaně doložen v recentních studiích [16-20].

Jsmo si vědomi problémů, které vyplývají z retrospektivního způsobu sběru dat, možnou neúplnost průzkumu nebo průběžné změny v testovacích panelech jednotlivých antibiotik. Výše uvedené výsledky rezistence zahrnují pouze antibiotika, která byla testována stejnou metodikou v celém průběhu sledovaného období.

V naší studii byla nalezena lineární závislost mezi spotřebou fluorochinolonů a vývojem rezistence kmenů *Enterobacter spp.* k tomuto antibiotiku a spotřebou gentamicinu a rezistencí kmenů *Klebsiella pneumoniae* ke gentamicinu, přesto jsme zde zaznamenali významné rozdíly jednotlivých bakteriálních populací.

V souladu s publikovanými studiemi [6, 7, 8, 15, 23] naše analýza potvrdila, pozitivní korelaci vztahu selekčního tlaku fluorochinolonů a vývoje rezistence *Enterobacter spp.* k této skupině antibiotik. U ostatních *Enterobacterií*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* nebyl tento vztah prokázán. Pozitivní hodnota regresního koeficientu ukazuje, že na oddělení s nízkým selekčním tlakem fluorochinolonů byla většinou zaznamenána nízká rezistence kmenů *Enterobacter spp.* Tato závislost byla pozorována již dříve [16,18] a je vysvětlována jednak alterací subjednotky A DNA gyrázy a jednak sníženou akumulací antibiotika v buňce. Naprosto odlišná závislost byla zjištěna mezi spotřebou gentamicinu a rezistencí kmenů *Klebsiella pneumoniae* ke gentamicinu. Tento trend neumíme uspokojivě vysvětlit a toto pozorování je v rozporu s obecně známým předpokladem, že čím nižší je selekční tlak antibiotik, tím nižší je rezistence bakteriálních kmenů.

V literatuře se nám nepodařilo najít sdělení, které by potvrdilo statisticky významnou korelaci mezi spotřebou gentamicinu a rezistencí kmenů *Klebsiella pneumoniae*. Eldeen et al. pozorovali nižší výskyt rezistentních kmenů *Klebsiella pneumoniae* při nižší expozici aminoglykosidovým antibiotikům. Autoři však neprovedli dostatečnou statistickou analýzu [20]. Další sdělení uvádějí rovněž statisticky významný pokles (nikoliv korelaci) rezistence kmenů *Klebsiella pneumoniae* ke gentamicinu při nižší expozici gentamicinu [21-22].

Další studie však naznačují, že vztah spotřeby a rezistence mezi expozicí gentamicinu a rezistencí kmenů *Klebsiella pneumoniae* k tomuto antibiotiku není tak jednoznačný. Kolář et al. neidentifikovali statisticky významnou závislost [23]. Gerdink et al. pozorovali statisticky významný pokles rezistence po výměně gentamicinu amikacinem. Po znovuzavedení gentamicinu do praxe autoři nezjistili žádný vzestup rezistence gramnegativních bakteriálních kmenů ke gentamicinu [24]. Rovněž Mylotte neprokázal, že by navzdory převažující expozici gentamicinu došlo během devíti let k vzestupu rezistence gramnegativních kmenů izolovaných z hemokultur [25].

Asensio et al. identifikovali expozici aminoglykosidům a expozici cefalosporinům 3. generace jako nezávislý rizikový faktor pro záchyt multirezistentního kmene *Klebsiella pneumoniae* [26]. Také další sdělení uvádí podávání aminoglykosidových antibiotik jako rizikové pro následující osídlení pacientů multirezistentními kmeny *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Kromě expozice aminoglykosidovým antibiotikům, však shodně i v naší studii, byla prokázána rovněž pozitivní asociace mezi expozicí antibiotikům flurochinolonové řady a nálezem multirezistentních bakteriálních kmenů [17] a asociace mezi expozicí aminopenicilinům s inhibitorem beta-laktamázy a nálezem multirezistentních bakteriálních kmenů [19].

V souladu s dalšími sděleními [27], i v naší studii, byla prokázána pozitivní asociace mezi expozicí aminoglykosidům a antibiotikům cefalosporinové řady a nálezem multirezistentních kmenů *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa*.

Asociace mezi expozicí aminoglykosidům, cefalosporinům 3. generace a aminopenicilinům s inhibitorem beta-laktamázy a multirezistencí může být vysvětlena existencí genů kódujících rezistenci k několika antibiotikům [16, 22, 25, 27, 28, 29, 30].

Určitým vysvětlením, které však zůstává pouze v rovině spekulací, by mohla být zkřížená rezistence nebo „koncentrační závislost“ aminoglykosidových antibiotik (nízkými dávkami by mohly být způsobeny subinhibiční koncentrace, které umožňují růst rezistentních kmenů) [31,32].

Rezistence ke karbapenemům je převážně způsobena produkcí beta-laktamázy. Literatura uvádí, že dalším mechanismem přispívajícím k tomuto jevu je alterace proteinů vnější membrány [33]. Nedávno byly identifikovány plazmidy kódující multirezistenci k beta-laktamovým antibiotikům včetně karbapenemů. Ahmad a kol. pozorovali selekci rezistentních kmenů během terapie karbapenemy [34].

Multirezistentní kmeny *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, způsobující epidemie v nemocničním prostředí, často produkují ESBL (širokospektré beta-laktamázy) [16, 17, 35, 36]. Ve fakultní nemocnici je prováděna jejich detekce pouze u vybraných kmenů.

Pro sledování vývoje rezistence pomocí diskové difusní metody by bylo vhodnější pracovat s evidovanými průměry inhibičních zón. Vhodné by bylo i použití dat o testování MIC, nicméně toto hodnocení nebylo na sledovaném oddělení v uvedeném období prováděno tak často, aby mohly být získány relevantní výsledky o stavu rezistence mikroorganismů. Statistická významnost vzestupu nebo poklesu rezistence nebyla hodnocena vzhledem ke krátkému sledovanému období. Během pěti let byl však statisticky významný pokles rezistence kmenů *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa* vůči cefotaximu, ceftazidimu, gentamicinu, amikacinu a ciprofloxacinu pozorován na neurochirurgické klinice JIP fakultní nemocnice. Tohoto trendu bylo dosaženo striktním dodržováním hygienických opatření [37].

K základním předpokladům racionální antibiotické léčby patří vedle znalosti frekvence bakteriálních patogenů na konkrétním oddělení i informace o jejich rezistenci k antimikrobním preparátům. Dalším důležitým faktorem, ovlivňujícím výběr vhodnější léčby, je vývoj bakteriální rezistence v souvislosti se selekčním tlakem antibiotik, což vyžaduje podrobné studium vlivu selekčního tlaku antibiotik na citlivost bakteriálních agens analýzou epidemiologických dat, získaných jak z ambulantní, tak nemocniční praxe [38, 39].

I když je význam antibiotické politiky v nemocnicích stále nedoceněn, představuje základní nástroj k regulaci rezistence. Bylo publikováno sdělení [40], ve kterém program kontroly spotřeby antibiotik vedl ke snížení nákladů na antibiotika a zároveň ke zvýšení citlivosti bakterií k antibiotikům. Tyto programy kontroly používání antibiotik mají své výhody (snížení nákladů, snížení nežádoucích účinků antibiotik, lepší volba použitého antibiotika), ale i nevýhody (zvýšené náklady na administrativu, obtížné zavádění do nemocničního prostředí aj.). Naše sdělení může přispět k motivaci metodicky zvládnout takový typ analýz a dát tak do rukou antibiotických center další zdroj informací pro jejich práci.

S výsledky studie byli seznámeni pracovníci antibiotického střediska Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Ve fakultní nemocnici se buduje systém monitorování výskytu nejčastějších nosokomiálních patogenů, který je podkladem pro práci nemocničního hygienika, který na základě získaných poznatků provádí hygienická opatření na konkrétním pracovišti.

Jelikož víme, že vývoj rezistence a spotřeba úzce souvisí s místem a časem, bylo by zajímavé srovnat výsledky s jinými nemocnicemi. Toto bychom rádi provedli v další analýze, pokud bude zájem z pracovišť, která mají požadovaná data k dispozici.

**Poděkování:** Studie vznikla za podpory CEZ: J13/98: 11600004.

## Literatura

1. Urli T, Perone G, Acquarolo A, Zappa S, Antonini B. Surveillance of infections acquired in intensive care: usefulness in clinical practice. *J Hosp Infect* 2002; 52: 130-135
2. Leverstein-van Hall MA, Fluit AC et al. Control of nosocomial multiresistant Enterobacteriaceae using temporary restrictive-antibiotic agent policy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 20: 785 - 791
3. Kolář M. Antibiotická léčba nosokomiálních infekcí. Triton; Praha 2000
4. Urbášková P. Rezistence bakterií k antibiotikům. Vybrané metody. Triton; Praha 1999
5. Garouste-Orgeas M, Marie O, Rouveau M, Villers S, Arlet G, Schlemmer B: Secondary carriage with multi-resistant *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella pneumoniae* in an adult ICU population: relationship with nosocomial infections and mortality. *J Hosp Infect* 1996; 34: 279-289.
6. Raymond DP, Pelletier SJ, Crabtree TD, Evans HL, Pruet TL, Sawyer RG. Impact of antibiotic-resistant Gram-negative bacilli infections on outcome in hospitalized patients. *Crit Care Med* 2003; 31: 1035 - 1041

7. Waterer GW, Wundering RG.: Increasing threat of Gram-negative bacteria. *Crit Care Med* 2001; 29: 75 - 81
8. Kolář M, Kurašová Y, Látal T, Hejnar P, Faber E, Raida L. Výskyt bakteriálních kmenů izolovaných u neutropenických pacientů a jejich rezistence k antibiotikům. *Čas Lék Čes* 1998; 137: 84-88
9. Mayer J. Infekce způsobené grampozitivními bakteriemi u onkologicky nemocných a význam vankomycinu v jejich léčbě. *Klin onkol* 1998; 11: 137-143
10. EORTC- International Antimicrobial Therapy Cooperative Group. Three antibiotic regimens in the treatment of infections in febrile granulocytopenic patients with cancer. *Am J Med* 1989; 86: 668-672
11. Nyč O, Kavan P, Lochmann O. Současné možnosti antimikrobní léčby onkologicky nemocného pacienta s febrilní neutropenií. *Remedia Klin. Mikrobiol* 1997; 1: 144-147
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixth international supplement, *Nat Comm Clin Lab Standards*, Villanova PA, 1995

13. Anatomical therapeutic chemical (ATC) index (including defined daily doses (DDDs) for plain substances) Oslo: WHO collaboration centre for drug statistics methodology, 1996
14. Bergman U, Christerson I, Jansson B, Wiholm BE. Auditing drug utilization by means of defined daily dose per bed-day. A methodological study, *Eur J Clin Pharmacol* 1980; 17: 183 – 187
15. Vlček J, Pozlerová E, Lonská V et al. Analýza vývoje rezistence gramnegativních tyčků k fluorochinolonům, amikacinu a třetí generaci cefalosporinů ve vztahu k jejich spotřebě ve fakultní nemocnici. *Remed Klin Mikrobiol* 1997; 1 (6): 176 –180
16. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-spectrum betalactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1162-1171
17. Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, Patel JB, Edelstein PH, Fishman NO. Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1288-1294
18. Sanders WE, Sanders ChC. Enterobacter spp. Pathogens poised to flourish at turn of the century. *Clin Microb Rev* 1997; 10 (2): 220-241
19. Morris AJ. Susceptibility patterns of bacterial isolates from intensive care and haematology/oncology patients in New Zealand. *New Zealand Medical Journal* 1997; 110: 187-189
20. Eldeen AS, Araj GF, Thulesius O. A comparison of antibiotic consumption and bacterial resistance patterns in Kuwait and Sweden. *AMPIS* 1998; (Suppl 3):56-62
21. Muscato JJ, Wilbur DW, Stout JJ, Fahrlander RA. An evaluation of the susceptibility patterns of gram-negative organisms isolated in cancer center with aminoglycoside usage. *Antimicrob Chemother* 1991; 27: 1-7
22. Peetersmans WE, Bobbaers HJ. Amicacin as first-choice aminoglycoside in a medical intensive care unit: a one year bacteriological surveillance study. *J Chemother* 1996; 8 (1): 17-24
23. Kolář M, Urbánek K, Látal T. Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 17: 357 – 363
24. Gerding DN, Larson TA, Hughes RA, Weiler M, Shanholtzer C, Peterson LR. Aminoglycoside resistance and aminoglycoside usage: ten years of experience in one hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35 (7): 1284-1290
25. Mylotte JM. Gentamicin resistance among gram-negative bacillary blood isolates in a hospital with a long-term use of gentamicin. *Arch Intern Med* 1987; 147 (9): 1642-1644
26. Asensio A, Olivek A, Gonzales –Diego P. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as a risk factor for colonization and infection. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 55-60
27. Mohr JF, Jones A, Zeichner-Ostrosky L, Wanger A, Tillotson G. Association between antibiotic use and changes in susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* in a private, university-affiliated teaching hospital: a 8-year- experience: 1995-2002. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24:346-351
28. Patterson JE, Hardin TC, Kelly CA, Garcia RC, Jorgensen JH. Association of antibiotic utilization measures and control of multiple-drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21: 455-458
29. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002; 34: 634-640
30. Drlica K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 11-17
31. Li L, Lim CK: A novel large plasmid carrying multiple beta-lactam resistance genes isolated from a *Klebsiella pneumoniae* strain. *J. Appl. Microbiol.*, 2000; 88: 1-14
32. Traub WH, Schwarze I, Bauer D. Nosocomial outbreak of cross-infection due to multiple-antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae*: characterization of the strain and antibiotic susceptibility studies. *Chemotherapy* 2000; 46: 1-14
33. Ardanuy C, Linares J, Dominguez MA, Hernandez-Alles S, Benedi VJ, Martinez-Martinez L. Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1636-1640
34. Ahmad M, Urban C, Mariano N. Clinical characteristics and molecular epidemiology associated with imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 352-355.
35. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hamed A: Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Research in Microbiology* 2004; 155: 409-421
36. Zemelman C, Bello H, Domínguez M, Gonzales G, Mella S, Zemelman R. Activity of cefepime, cefotaxime, ceftazidime, and aztreonam against extended-spectrum- producing isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from Chilean hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2001; 40: 41-43
37. Čermák P, Žabka L, Šlezarová P, Škrabková Z. Zlom ve vývoji rezistence *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa* izolovaných na jednotce intenzivní péče neurochirurgické kliniky FN v Hradci Králové v letech 1995-1999. *Klin mikrobiol inf* 2001; 7 (2). 43-46
38. Kolář M, Látal T. Implementation of a practical antibiotic policy in the Czech Republic. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; 20: 440-443
39. Couper MR. Strategies for the rational use of antimicrobials. *Clin Infect Dis* 1997; 24 (Suppl 1): 154–156
40. White AC, Atmar RL, Wilson J et al. Effects on requiring prior authorization for selected antimicrobials: expenditures, susceptibilities and clinical outcomes. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 230 – 239

# MOLEKULÁRNÍ ZMĚNY OVLIVŇUJÍCÍ PROGRESI MALIGNÍHO MELANOMU

## MOLECULAR CHANGES INFLUENCING PROGRESSION OF MALIGNANT MELANOMA

BRYCHTOVÁ S.<sup>1</sup>, FIURÁŠKOVÁ M.<sup>1</sup>, SEDLÁKOVÁ E.<sup>1</sup>, TICHÝ M. jr.<sup>2</sup>, EHRMANN J. jr.<sup>1</sup>, BENEŠ M.<sup>3</sup>, BRYCHTA T.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Ústav patologie, Laboratoř molekulární patologie LF UP Olomouc

<sup>2</sup> Klinika chorob kožních a pohlavních LF a FN Olomouc

<sup>3</sup> Onkologická klinika FN Olomouc

<sup>4</sup> SPEA Olomouc, s.r.o.

**Souhrn:** Cílem práce bylo sledování exprese onkoproteinu Myc, PDGF a bFGF u souboru 42 bioptických vzorků, z nichž bylo 11 nodulárních melanomů (NM), 12 superficiálních melanomů (SSM), 9 dysplastických névů a 10 konvenčních pigmentových névů. Vyšetření bylo provedeno na tkáňových řezech metodou nepřímé imunohistochemie s použitím EnVision plus kitu. Zjistili jsme, že exprese Myc a PDGF byla signifikantně vyšší u nádorových buněk než u benigních melanocytů. Nebyla prokázána významně vyšší exprese bFGF. Tento protein však vykazoval rozdílnou intracelulární distribuci. Sledované antigeny jsme prokázali i ve stromálních elementech v okolí maligních lézí. Toto zjištění podporuje hypotézu o vzájemné kooperaci melanomových buněk a buněk nádorového stromatu při rozvoji onemocnění. Nelze vyloučit, že ovlivnění nádorového stromatu může být jednou z cest, jak terapeuticky ovlivnit progresi maligního melanomu.

**Klíčová slova:** maligní melanom, nádorové stroma, Myc onkoprotein, růstové faktory

**Summary:** The aim of this study was evaluation of Myc oncoprotein, PDGF and bFGF expression in the file of a total number of 42 bioptic specimens including 11 nodular melanomas (NM), 12 superficial spreading melanomas (SSM), 9 dysplastic naevi and 10 common naevi. Detection was performed on tissue sections by indirect immunohistochemistry using EVision visualization system. We found that Myc and PDGF expression was significantly higher in malignant cells in comparison to benign melanocytes. We did not prove higher bFGF expression. This protein however showed different intracellular distribution. The antigen above was also detected in the stromal elements in the neighborhood of malignant lesions. Our finding supports a hypothesis of mutual cooperation between melanoma cells and tumor stromal cells. We can not exclude that affecting tumor stroma might be one of the ways how to therapeutically influence malignant melanoma progression.

**Key words:** malignant melanoma, tumorous stroma, Myc oncoprotein, growth factors

### Teoretický úvod

Maligní melanom (MM) je vysoce zhoubný novotvar s rapidně narůstající incidencí, který vychází z pigmentových buněk derivovaných z neurální lišty. Jeho prognóza je doposud založena hlavně na hodnocení velikosti tumoru, hloubce invaze, ulceraci a mitotické aktivitě. Dané parametry však zdaleka neumožňují přesnější predikci tohoto onemocnění. Stále platí, že MM je nádor vysoce nevyzpytatelný, schopen metastazovat kdykoli a kamkoli (Heenen a Laporte 2003). Z těchto důvodů je výzkum dalších prognostických faktorů vysoce aktuální.

Transformace normálních melanocytů je provázána četnými genetickými alteracemi, umožňujícími autonomní růst a nekontrolovanou proliferaci buněk, spojenou s poruchou regulace buněčného cyklu (Halaban 1999). Genetické a cytogenetické studie odhalily široké spektrum chromozomálních abnormalit a bodových mutací, vedoucích k inaktivaci nádorových supresorů pRb a jeho variant, p53, PTEN a CDKN2A/p16 (Koenig a 2002, Tsao et al. 2003). Rovněž jsou popisovány mutace a aberrantní exprese onkogenů ras (Kraehn et al., 1995), c-kit (Lassam a Bickford 1992) a dalších. Expresí některých onkogenů je závislá na faktorech zevního prostředí, z nichž k nejvýznamnějším patří UV záření. Doposud však žádná zjištěná genetická alterace nemůže být označena jako faktor jednoznačně podmiňující biologický potenciál tumoru nebo určující citlivost na terapii. Předpokládá se však, že molekulární analýza

genetických změn bude důležitým doplňkem histologického nálezu, který v budoucnosti pomůže objektivně posoudit význam jednotlivých genetických alterací.

Nádorová progresie není jednoznačně definována pouze alterací onkogenů a nádorových supresorů v samotných nádorových buňkách, ale signifikantní význam mají i změny, ke kterým dochází ve stromálním mikroprostředí obklopujícím nádorové buňky a které souvisí s poruchami komunikace mezi tímto mikroprostředím a maligními buňkami (Hendrix et al. 2003, Mueller a Fusenig 2002). Bylo prokázáno, že dochází ke změnám fenotypu nově vytvořeného reaktivního stromatu, kde se mění složení a struktura extracelulární matrix, zvyšuje se počet zánětlivých elementů a zvyšuje se aktivita proteolytických enzymů (Borgono a Diamandis, 2004). K faktorům, které se nejvýznamněji uplatňují v remodelaci stromatu patří růstový faktor odvozený z destiček, fibroblastový růstový faktor a transformační růstový faktor beta (PDGF, FGF, TGFbeta), skupina matrixových metaloproteáz (MMP) a jejich inhibitorů (TIMP) a rodina vaskulárních růstových faktorů (VEGF). Tyto faktory ovlivňují přežívání, proliferaci, migraci nádorových buněk a indukují angiogenezi. Interakce mezi nádorovými buňkami a stromatem jsou vzájemné (Fusenig, 2004). Jednak nádorové buňky samy regulují složení nádorového stromatu svou autokrinní a parakrinní produkcí růstových faktorů, jejich receptorů, regulačních molekul a remodelujících enzymů (Ramont et al. 2003) a jednak podobnou aktivitu mají rovněž buňky stro-

mální. Nejvýznamnější role je přisuzována fibroblastům, které vytvářejí prostředí podobné fetálnímu, dokáží aktivovat imortalizující onkogeny jako c-myc a produkovat růstové faktory (Gu et al. 2001). Rovněž zánětlivé buňky, zejména makrofágy, se považují za regulátory cytokinové rovnováhy, jejichž působky podporují šíření nádorových buněk (De Wever a Mareel 2003).

V naší studii jsme u souboru maligních i benigních melanocytárních kožních nádorů sledovali expresi Myc, PDGF a bFGF, tedy proteinů, které se významně uplatňují v remodelaci stromatu různých solidních nádorů.

### Materiál a metody

Do studie bylo zařazeno 42 bioptických vzorků, z nichž bylo 11 nodulárních melanomů (NM), 12 superficiálních melanomů (SSM), 9 dysplastických névů a 10 benigních intradermálních i dermoepidermálních pigmentových névů. Pro detekci byly využity parafinové bloky archivované na Ústavu patologie LF UP a FN Olomouc. Tkáňové řezy o tloušce 5 µm byly zpracovány nepřímou imunohistochemickou technikou, s použitím primárních protilátek uvedených v tabulce 1. Po odparafinování a zavodnění řezů následovalo demaskování antigenů v mikrovlnném generátoru 1x20 minut a zrušení endogenní peroxidázové aktivity. Poté byly řezy inkubovány přes noc s primární protilátkou. Po promytí následovala detekce byla prováděna pomocí EnVision plus (Dako Cytomation, Dánsko) po dobu 60 minut při pokojové teplotě a vizualizace s AEC (aminoetylkarbazolem). Hodnocení bylo provedeno semikvantitativně výpočtem H-skóre (procento pozitivních buněk násobené intenzitou zbarvení). Výsledky byly statisticky analyzovány Chi-kvadrát testem ( $p < 0.05$ ).

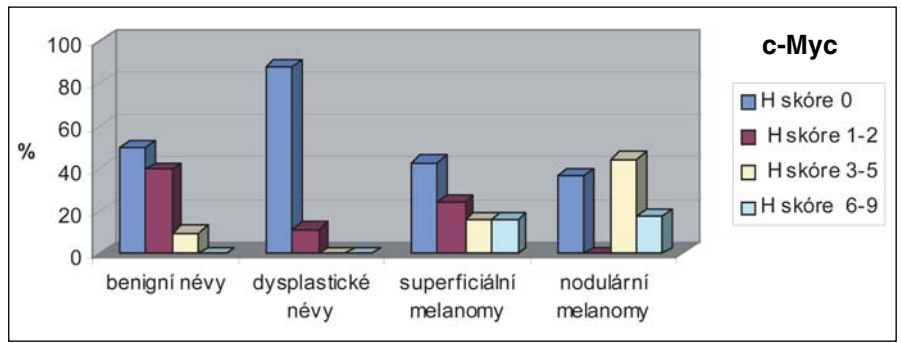
### Výsledky

Onkoprotein Myc (Graf 1), vykazoval granulární perinukleární nebo difuzní cytoplasmatickou expresi (Obr 1). Vyšší přítomnost tohoto onkoproteinu byla zaznamenána v buňkách melanocytárního původu. Myc byl však rovněž disperzně přítomen ve stromálních fibroblatech a lymfocytech v okolí infiltrativně rostoucích tumorů. Statisticky významný rozdíl v expresi c-Myc byl zjištěn u skupiny NM a SSM ve srovnání s konvenčními benigními ( $p=0,033$ ) a dysplastickými névy ( $p=0,026$ ).

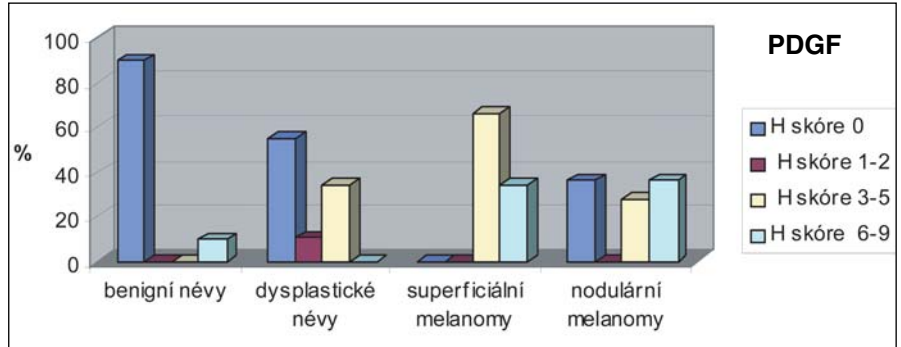
Tabulka 1.

protilátka	typ	klon/registrační č.	firma	ředění
PDGF	mouse	P-GF.44C	Novocastra Laboratories Ltd.,UK	1:100
FGF-2	rabbit	147	Santa Cruz Biotechnology,USA	1:100
c-Myc	mouse	9E11	Novocastra Laboratories Ltd.,UK	1:50

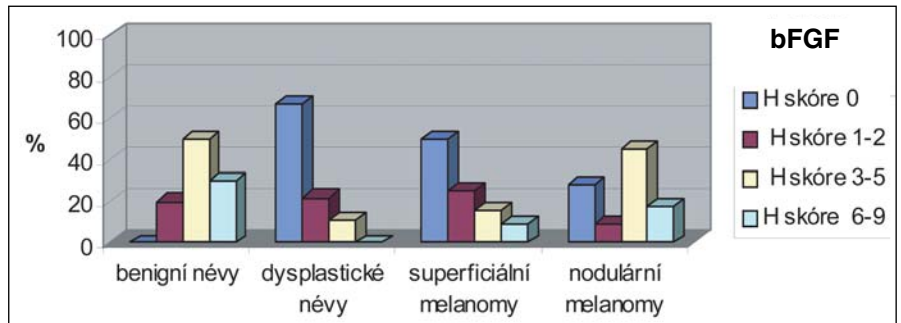
Graf 1: Srovnání exprese c-Myc mezi jednotlivými diagnózami.



Graf 2: Srovnání exprese PDGF mezi jednotlivými diagnózami.



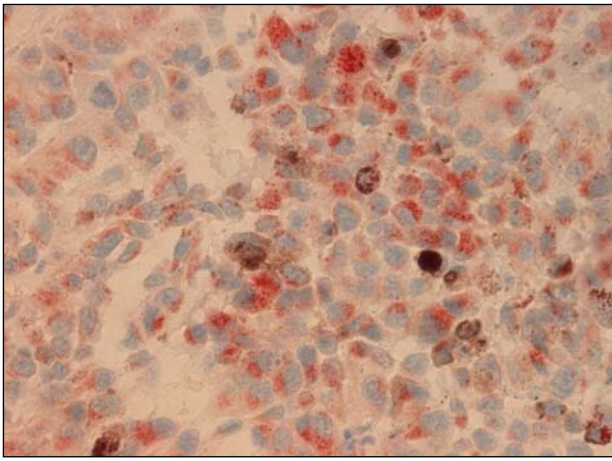
Graf 3: Srovnání exprese bFGF mezi jednotlivými diagnózami.



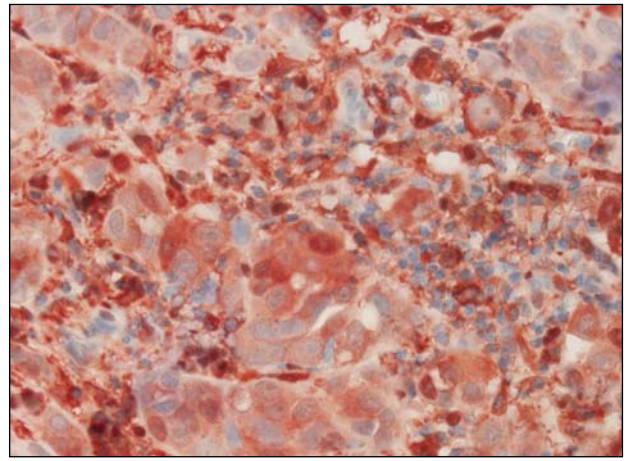
c-myc	H skóre			
	0	1-2	3-5	6-9
benigní névy	50	40	10	0
dysplastické névy	88	12	0	0
perficiální melanomy	43	25	16	16
nodulární melanomy	37	0	45	18

c-myc	H skóre			
	0	1-2	3-5	6-9
benigní névy	90	0	0	10
dysplastické névy	55	11	34	0
perficiální melanomy	0	0	66	34
nodulární melanomy	36	0	28	36

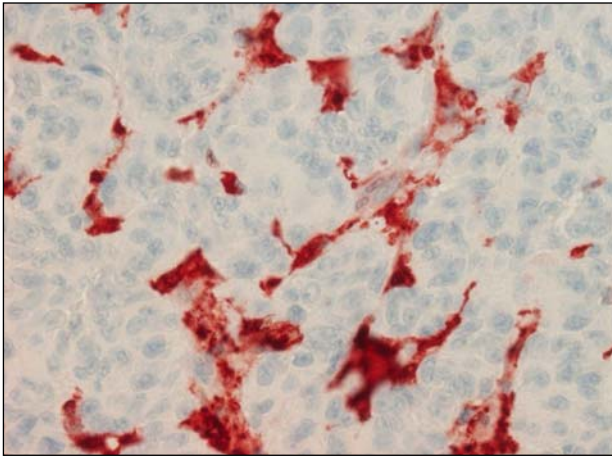
c-myc	H skóre			
	0	1-2	3-5	6-9
benigní névy	0	20	50	30
dysplastické névy	67	22	11	0
perficiální melanomy	50	25	16	9
nodulární melanomy	28	9	45	18



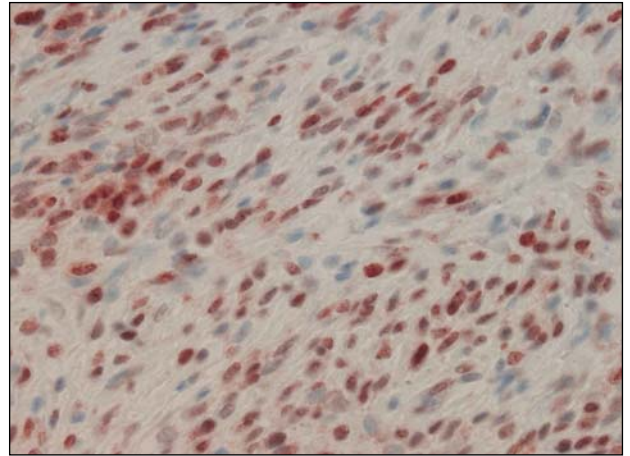
Obr. 1



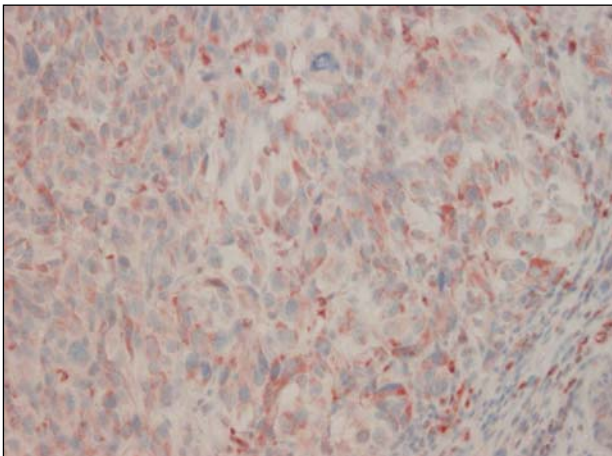
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5

Obr 1: Cytoplasmatická exprese onkoproteinů c-Myc v buňkách nodulárního melanomu, zvětšeno 400x.  
 Obr 2: Difuzní, silné zbarvení PDGF v nádorových buňkách nodulárního melanomu, zvětšeno 400x.  
 Obr 3: Silná pozitivita PDGF, zejména fibroblastů v nádorovém stromatu nodulárního melanomu, zvětšeno 400x.  
 Obr 4: Jaderná exprese bFGF v intradermálním pigmentovém névu, zvětšeno 400x.  
 Obr 5: Cytoplasmatická lokalizace bFGF v buňkách nodulárního melanomu, zvětšeno 200x.

Expresce bFGF (Graf 3) vykazovala rozdílnou lokalizaci v závislosti na povaze léze. Zatímco u melanocytů benigních lézí jsme pozorovali nukleární expresi (Obr. 4), u maligních melanocytů převažovala cytoplasmatická přítomnost tohoto proteinu (Obr. 5). Jaderná lokalizace byla přítomna i u „atypických melanocytů“ vyžívajících intradermálních pigmentových névů. Protein byl rovněž přítomen ve stromálních fibroblastech. Signifikantní rozdíly ve stupni exprese byly patrné mezi skupinami dysplastických névů a SSM ( $p=0,039$ ), nebyly prokázány významné rozdíly mezi konvenčními névy a NM.

Protein PDGF (Graf 2) byl lokalizován převážně v cytoplasmě buněk, i když jsme sporadicky zaznamenali i pozitivitu jadernou. Protein byl exprimován epidermálními a folikulárními keratinocyty, výrazně maligními melanocyty a dále buňkami stromatu. Jednalo se zejména o fibroblasty v okolí maligních lézí a místy rovněž o endotelie (Obr 2, 3). Zcela ojediněle byl protein exprimován melanocyty konvenčních névů. Statistická analýza potvrdila signifikantně vyšší expresi PDGF u maligních lézí ve srovnání s benigními ( $p=0,0001$  pro SSM a  $p=0,035$  pro NM).

### Diskuze

Zvýšená exprese růstových faktorů a onkoproteinů Myc u maligních melanomů a to nejen přímo v nádorových buňkách samotných, ale i v buňkách v bezprostředním sousedství maligních lézí, může svědčit pro vzájemnou komunikaci mezi oběma typy elementů. Tento fenomén nebyl pozorován pouze u pokročilejších stádií onemocnění, ale i u stádií s počínající invazí. Můžeme tedy předpokládat, že tato změna souvisí již s časnou fází malignizace.

Protoonkogen c-Myc je aktivován u celé řady solidních lidských tumorů. K jeho hlavním účinkům patří stimulace proliferace buněk a inhibice jejich diferenciace. Prokázalo se také, že tento protein má i vlastní transformační potenciál. Předpokládá se, že vyšší exprese tohoto onkoproteinu v nádorových buňkách je asociována s pokročilejšími stádii onemocnění (Kraehn a kol. 2001). Myc může rovněž výrazně ovlivňovat proliferaci fibroblastů, a tak i složení nádorového stromatu (Gu a kol., 2001). Onkoprotein Myc je ve tkáních stabilizován pomocí FGF, což je provázáno zvýšenou proliferací aktivitou buněk (Lepiguiue a kol. 2004). Nádorové stroma pravděpodobně nemá na nádorové buňky jen podpůrný účinek, ale předpokládá se i jeho přímý transformační vliv. Onkogenní signály vycházející z nádorových myofibroblastů a potenciálně i z jiných buněk (například endotelu) stimulovaly progresi nenádorové buněčné populace v nádorovou. Tato progresie byla spojována se změnami genetické exprese a různými genetickými alteracemi (Tisty, 2001, Philips a kol., 2001). Naopak nádorové buňky přenesené do nealterovaného prostředí ztratily svůj maligní potenciál.

Protein bFGF je znám jako mitogen, který stimuluje lidské melanocyty a podporuje růst melanomových buněk (Scott a kol. 1991). Předpokládá se, že aberantní exprese tohoto faktoru patří k časným změnám melanocytárních lézí, které ovlivňují proliferaci a dediferenciaci buněk. Zvýšená exprese bFGF může být vyvolána expozicí ultrafialového záření (Berking a kol. 2004). K poruše exprese bFGF dochází pravděpodobně z důvodů inaktivace některých nádorových supresorů (Halaban, 1993). Halaban se spolupracovníky (1988) označují bFGF jako jeden z hlavních faktorů ovlivňujících růst melanomu a popisují expresi bFGF pouze u maligních buněk. Tyto výsledky však nebyly plně potvrzeny dalšími autory, kteří expresi bFGF sice rovněž popsali v maligních melanocytech, ale konstatují, že vzhledem k jeho nálezu i v konvenčních benigních névech (Scott a kol. 1991) tento růstový faktor rozhodně nemůže být označen jako marker transformace melanocytů. V našem souboru jsme tento protein detegovali u lézí maligního melanomu, stejně jako v benigních, zejména vyzrávajících névech. Doposud nepopsaným fenoménem je také rozdílná intracelulární distribuce toho-

to proteinu. Zatímco u maligních melanocytů je protein lokalizován intracytopasmaticky, u névových lézí dominuje jeho jaderná lokalizace. Je možné, že právě rozdílná lokalizace proteinu může být klíčem k dalšímu pochopení, jak může bFGF ovlivňovat růst maligních lézí nebo stimuloval produkci vaziva a vyzrávání konvenčních pigmentových névů.

Výraznou mitogenní aktivitu spojenou se stimulací nádorů může mít i PDGF (Furuhashi a kol., 2004). Jeho zvýšená exprese není popisována pouze v buňkách primárních kožních melanomů, ale i v jeho metastázách (Barnhill a kol., 1996). Zajímavým zjištěním je i skutečnost, že PDGF má i transformační a antiapoptotický potenciál (Heldin a Westermarck, 1999). Kromě nádorových buněk je faktor produkován i aktivovanými makrofágy a fibroblasty, endotelem a hladkou svalovinou cév a epidermálními keratinocyty. PDGF dále stimuluje rozvoj nádorového stromatu a novotvorbu krevních a lymfatických cév. PDGF rovněž indukuje desmoplazii a to působením na stromální fibroblasty, které se jeho účinkem diferencují v myofibroblasty. Myofibroblasty v nádorovém stromatu (nádorové myofibroblasty) produkují růstové faktory jako například VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor), proteázy a skupinu MMP (matrixových metaloproteáz) (Mueller a Fusenig, 2002). Experimentálně bylo prokázáno, že melanomové buňky, které zvýšeně exprimovaly PDGF, indukovaly desmoplazii stromatu s četnými krevními cévami. Naopak, buňky melanomu bez exprese PDGF tvořily tumory chudě vaskularizované a nekrotizující, bez zmoženého pojivové tkáně (Tuxhorn a kol. 2001).

Závěrem můžeme shrnout, že sledované faktory Myc, bFGF a PDGF byly prokázány nejen v maligních buňkách samotných, ale i v okolních stromálních elementech. Toto zjištění podporuje hypotézu o vzájemné kooperaci melanomových buněk a buněk nádorového stromatu při rozvoji onemocnění. Ukazuje se, že stejně jako u jiných solidních nádorů, tak i u MM může být ovlivnění nádorového stromatu jednou z cest, jak terapeuticky potlačit jeho progresi.

**Poděkování:** Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR 1A/8245-3/2004 a MSM 6198959216.

#### Literatura:

1. Heenen M, Laporte M. Molecular markers associated to prognosis of melanoma *Ann Dermatol Venerol.* 2003 Nov;130(11):1025-31
2. Halaban R. Melanoma cell autonomous growth: the Rb/E2F pathway. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18(3):333-43
3. Koenig A, Bianco SR, Fosmire S, Wojcieszyn J, Modiano JF. Expression and significance of p53, rb, p21/waf-1, p16/ink-4a, and PTEN tumor suppressors in canine melanoma. *Vet Pathol.* 2002 Jul;39(4):458-72.
4. Tsao H, Mihm MC Jr, Sheehan C. PTEN expression in normal skin, acquired melanocytic nevi, and cutaneous melanoma *J Am Acad Dermatol.* 2003 Nov;49(5):865-72.
5. Kraehn GM, Utikal J, Udart M, Greulich KM, Bezold G, Kaskel P, Leiter U, Peter RU. Extra c-myc oncogene copies in high risk cutaneous malignant melanoma and melanoma metastases. *Br J Cancer.* 2001 Jan 5;84(1):72-9.
6. Lassam N, Bickford S. Loss of c-kit expression in cultured melanoma cells. *Oncogene.* 1992 Jan;7(1):51-6.
7. Hendrix MJ, Seftor EA, Kirschmann DA, Quaranta V, Seftor RE. Remodeling of the microenvironment by aggressive melanoma tumor cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 May;995:151-61.
8. Borgono A.A., Diamandis E.P. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nature rev Cancer.* 4,11,2004. 876-890.
9. Fusenig N.E. Friends or foes- bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature rev Cancer.* 4,11,2004. 839-847.
10. Ramont L, Pasco S, Hornebeck W, Maquart FX, Monboisse JC. Transforming growth factor-beta1 inhibits tumor growth in a mouse melanoma model by down-regulating the plasminogen activation system. *Exp Cell Res.* 2003 Nov 15;291(1):1-10.
11. Gu X, Fu X, Yang Y, Sun T, Jiang L. Expression characteristics of c-fos, c-myc and bFGF in early burn tissue. *Chin Med J (Engl).* 2001 Sep;114(9):925-8.
12. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol.* 2003 Jul;200(4):429-47.
13. Kraehn GM, Schartl M, Peter RU. Human malignant melanoma. A genetic disease? *Cancer.* 1995 Mar 15;75(6):1228-37.
14. Lepique AP, Moraes MS, Rocha KM, Eichler CB, Hajj GN, Schwindt TT, Armelin HA. c-Myc protein is stabilized by fibroblast growth factor 2 and

- destabilized by ACTH to control cell cycle in mouse Y1 adrenocortical cells. *J Mol Endocrinol.* 2004 Dec;33(3):623-38.
15. Tisty TD. Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Semin. Cancerbiol.* 2001, 11,97-104.
16. Phillips JL, Hayward SW, Wang Y, Vasselli J, Pavlovich C, Padilla-Nash H, Pezullo JR, Ghadimi BM, Grossfeld GD, Rivera A, Linehan WM, Cunha GR, Ried T. The consequences of chromosomal aneuploidy on gene expression profiles in a cell line model for prostate carcinogenesis. *Cancer Res.* 2001 Nov 15;61(22):8143-9.
17. Berking C, Takemoto R, Satyamoorthy K, Shirakawa T, Eskandarpour M, Hansson J, VanBelle PA, Elder DE, Herlyn M. Induction of melanoma phenotypes in human skin by growth factors and ultraviolet B. *Cancer Res.* 2004 Feb 1;64(3):807-11.
18. Halaban R. Molecular correlates in the progression of normal melanocytes to melanomas. *Semin Cancer Biol.* 1993 Jun;4(3):171-81.
19. Scott G, Stoler M, Sarkar S, Halaban R. Localization of basic fibroblast growth factor mRNA in melanocytic lesions by in situ hybridization. *J Invest Dermatol.* 1991 Mar;96(3):318-22.
20. Halaban R, Kwon BS, Ghosh S, Delli Bovi P, Baird A. bFGF as an autocrine growth factor for human melanomas. *Oncogene Res.* 1988 Sep;3(2):177-86.
21. Furuhashi M, Sjoblom T, Abramsson A, Ellingsen J, Micke P, Li H, Bergsten-Folestad E, Eriksson U, Heuchel R, Betsholtz C, Heldin CH, Ostman A. Platelet-derived growth factor production by B16 melanoma cells leads to increased pericyte abundance in tumors and an associated increase in tumor growth rate. *Cancer Res.* 2004 Apr 15;64(8):2725-33.
22. Barnhill RL, Xiao M, Graves D, Antoniadis HN. Expression of platelet-derived growth factor (PDGF)-A, PDGF-B and the PDGF-alpha receptor, but not the PDGF-beta receptor, in human malignant melanoma in vivo. *Br J Dermatol.* 1996 Dec;135(6):898-904.
23. Heldin CH, Westermarck B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999 Oct;79(4):1283-316.
24. Mueller MM, Fusenig NE. Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation.* 2002 Dec;70(9-10):486-97.
25. Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol.* 2001 Dec;166(6):2472-83.



# VÝSLEDKY DOBI VYŠETŘENÍ V MASARYKOVĚ ONKOLOGICKÉM ÚSTAVU

## THE RESULTS OF DOBI EXAMINATIONS IN MASARYK MEMORIAL CANCER INSTITUTE

BARTOŇKOVÁ H., STANDARA M., SCHNEIDEROVÁ M.

RDG ODDĚLENÍ, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

**Souhrn: účel:** Zhodnotit novou vyšetřovací metodu pro diagnostiku nádorů prsu zaměřenou na měření prostupnosti červeného světla přem a zaznamenání odezvy na tlakový podnět, který vyvolává změny v objemu protékající krve.

**Soubor a metoda:** 100 ženám vyšetřeným na RDG oddělení Masarykova onkologického ústavu v Brně mamografií bylo v případech, kdy mamografie prokazovala podezřelou lézi, následně provedeno vyšetření metodou dynamicko optického zobrazení prsu (Dynamic Optical Breast Imaging - DOBI). Všem ženám byla poté provedena z podezřelého místa cílená core-cut biopsie a zhodnocena citlivost a přesnost DOBI ve srovnání s mamografií.

**Výsledky:** Senzitivita 71% i specifická 64% DOBI vyšetření z naší studie dává naději na možné využití této nezářivé metody v budoucnu k detekci maligních lézí prsu.

**Summary: Purpose:** The purpose of our study was to evaluate an upcoming breast cancer diagnostic modality based on measurements of the red light absorption in the breast and response on pressure stimulus inducing circulating blood volume changes. **Patients and Method:** Patients (n=100) with suspicious mammography finding underwent Dynamic Optical Breast Imaging (DOBI) followed by core-cut biopsy in Masaryk Memorial Cancer Institute. Sensitivity and specificity were calculated to compare DOBI with mammography. **Results:** Both sensitivity and specificity (71% and 64% respectively) indicates that DOBI can be a promising minimum-stress method in malignant breast lesion detection.

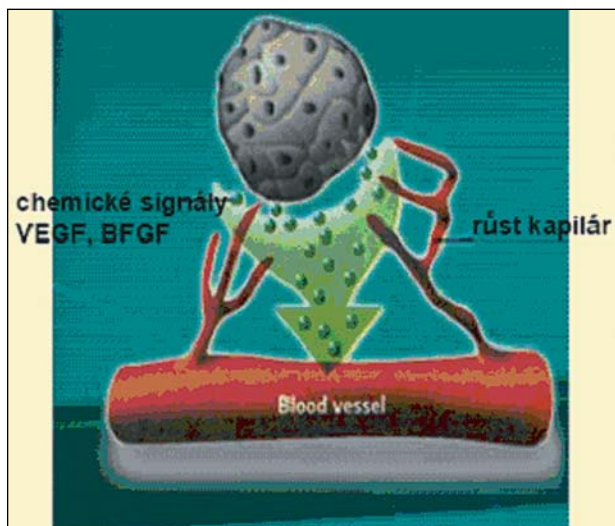
### Úvod

Metody, které přispívají k diagnostice zhoubných nádorů, jsou řadu let v popředí zájmu lékařů a výzkumných pracovníků, neboť maligní tumory jsou v České republice po ischemické chorobě srdeční druhou nejčastější příčinou smrti. Zhoubný nádor prsu je u nás nejčastějším zhoubným onemocněním u žen, proto všemu, co může přispět k jeho včasnému zachytu, je věnována maximální pozornost lékařů a vědeckých pracovníků, zabývajících se touto problematikou.

K časnému zachytu zhoubného novotvaru prsu v České republice nesporně přispělo a nadále přispívá spuštění mamografického (MG) screeningu v září 2002. V posledních letech se však věnuje pozornost i novým zobrazovacím diagnostickým metodám vyšetření prsu, zejména laserovému zobrazení prsu (CTLM – CT Laser Mammography) a optickému zobrazení tkáně mléčné žlázy (DOBI – Dynamic Optical Breast Imaging).

Princip DOBI je obecně založen na poznatku, že buňky tvořící nádor vyžadují stálý přísun živin a zejména kyslíku a současně se zbavují odpadních produktů svého metabolismu /1/. Rostoucí tumor si tvoří síť kapilár, kterou jsou živiny a kyslík přiváděny ve stále větší míře. Složitý proces, vedoucí k tvorbě nových cév nádoru se nazývá angiogeneze, respektive neoangiogeneze /obr. 1/.

Neoangiogeneze a její formy jsou intenzivně studovány zejména u karcinomu prsu. Neoangiogeneze se v prsu v současné době stanovuje biopsií vzorku prsní tkáně. Zvýšená vaskularita spojená s růstem maligních tumorů může být změněna stanovením tzv. mikrovaskulární denzity (MVD). V současnosti je hlavním úkolem standardizace hodnocení MVD obrazu /3/. V nedávné době již bylo na některých studiích zdokumentováno, že vysoká hodnota MVD koreluje s přítomností lokoregionálních i vzdálených metastáz /2/, a vytváří tak vztah mezi přítomností neoangiogeneze a invazivity u karcinomu prsu /5,6/. Tato soudobá zjištění naznačují, že vyšší hodnota MVD u karcinomu prsu by mohla sloužit jako prediktivní faktor.



Obr. 1

Mamografie je v současnosti nejpoužívanější vyšetření prsu v detekci karcinomu prsu. Nelze opomenout ani ultrazvukové vyšetření prsu, u žen středního a vyššího věku však vždy následuje až po mamografii a současně vyžaduje značnou erudici vyšetřujícího lékaře. Pak se však jedná o metodu nesmírně výtěžnou z hlediska senzitivity i specifity. Míra detekce u mamografie se vyznačuje širokou variabilitou. Kolb uvádí celkovou senzitivitu a specifitu u mamografického screeningu 68 % až 88 % resp. 82 % až 98% /7/. Citlivost mamografického vyšetření je vyšší u žen ve věku nad 50 let (vyšší senzitivita i specifita u involuční žlázy s tukovou přestavbou) ve srovnání se ženami mladšími 50 let (vyšší procentuální zastoupení typu žlázy neredukované, denzní). Jiní autoři uvádí, že věk silně ovlivňuje citlivost mamografie, která byla nejvyšší u žen ve věkové skupině od 60 do 69 let (87,0 %) a nej-

nižší u žen ve věku 30 až 39 let (67,9 %) /8/. Tato zjištění naznačují, že je třeba zlepšit vyšetřovací možnosti v diagnostice karcinomu prsu u mladších žen a u žen s vyšší denzitou tkáně prsu. Bylo zjištěno, že zvýšená vaskularita asociovaná s růstem maligních lézí se jednoznačně odlišuje od vaskularity pozorované u normální zdravé tkáně. Systém dynamicko-optického zobrazení prsů (DOBI) přístrojem ComfortScan detekuje jeden z těchto rozdílů hodnocením absorpce světla při aplikaci vnějších tlakových stimulů v čase. V důsledku tohoto tlakového podnětu dynamické chování optických vlastností tkáně vytváří různé dynamické profily pro oblasti s abnormální vaskularizací ve srovnání s vaskularizací okolní normální prsní tkáně. Měřením propustnosti červeného světla přes prsní tkáň a zaznamenáváním přechodné odpovědi na tlakové podněty je systém ComfortScan schopen odlišovat oblasti prsů s abnormální vaskularizací od oblastí s normální tkání. Účelem systému ComfortScan jako diagnostického nástroje je neinvazivní rozlišení mezi specifickými optickými profily různě vaskularizovaných oblastí a tím i poskytování doplňujících informací pro lékaře ohledně angiogenetického stavu suspektní oblasti. Systém ComfortScan jako pomocné vyšetření k mamografii je určen k získávání informací, které mohou pomoci lékaři v diagnostickém postupu a potenciálně i v doporučeních pro léčbu.

## MATERIÁL A METODIKA

V Masarykově onkologickém ústavu bylo během 5 měsíců roku 2004 vyšetřeno v klinické studii 100 žen na ComfortScanu. Byly vybrány pouze ženy, které na předcházející mamografii měly patologický nález ložiska nebo podezření na ložiskový proces v prsu. Všem těmto ženám byla po mamografii a DOBI vyšetření provedena cílená core-cut biopsie z podezřelého místa. Hodnocení obrazu z ComfortScanu bylo provedeno v den tohoto vyšetření, nejpozději následující den a vždy předcházelo informaci o histologickém nálezu, tak aby výsledky hodnocení DOBI nemohly být ovlivněny.

Vlastní vyšetření ComfortScanem je pro ženu podstatně příjemnější než vyšetření mamografií. U přístroje ComfortScan žena stojí, je prováděna pouze jedna kraniokaudální projekce při velmi mírné kompresi prsu pružnou průhlednou membránou přístroje, který celkovou vizáží i velikostí mírně připomíná mamograf. Při vyšetření je prs umístěn na vyšetřovací desku přístroje a jemně komprimován pomocí nafukovací silikonové membrány. Na vyšetřovací desce je umístěn zdroj světla (LED iluminátory). Zdroj světla se automaticky nastaví tak, aby osvětloval prs ve stavu, kdy je membrána nafouknuta. Tlak na vrcholu vyšetření dosahuje 3x nižší hodnoty než při RTG mamografii, tedy zhruba 10 mmHg. Světlo procházející prsem se zaznamenává v časové posloupnosti po dobu asi 30 sekund vysoce citlivou digitální kamerou (CCD). Dynamicky se měnící obrazy se ukládají do digitální paměti a zpracovávají příslušným softwarem tak, aby se zdůraznily rozdíly v časových kolísáních intenzity iluminace mezi normální (benigní) a maligní tkání.

Vyšetření celkově trvá cca 12–13 minut od vstupu do vyšetřovny a všechny ženy ho zvládly velmi dobře.

U každé ženy, zařazené do studie, byl vyplněn i klinický protokol obsahující kompletní anamnestické údaje s důrazem předchozí či současné podávání hormonálních preparátů a ostatních léčiv.

## VÝSLEDKY

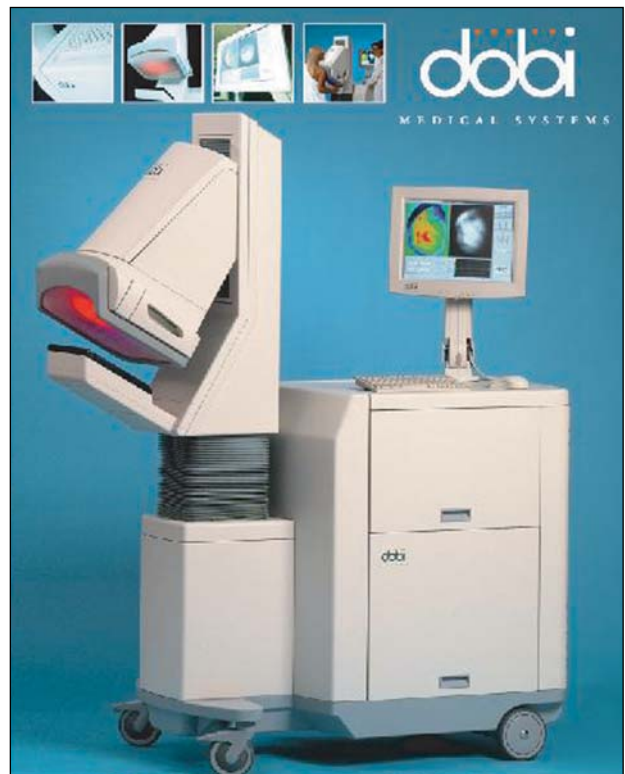
V tabulce 1 jsou uvedeny výsledky hodnocení obrazů z mamografie (MG), která vždy předcházela DOBI vyšetření. V tabulce 2 je zhodnoceno vyšetření DOBI. Při posuzování obrazů z DOBI hodnotící neznala ani výsledky MG vyšetření nehodnotila ani výsledek histologie. U obou typů vyšetření je současně vypočítána senzitivita a specifita vyšetření.

Histologie		Shoda s MG	Neshoda s MG
Benigní	59	22 (TN)	37 (FP)
Maligní	41	37 (TP)	4 (FN)
<b>Senzitivita</b>		<b>TP/ TP+FN</b>	<b>90 %</b>
<b>Specifita</b>		<b>TN/ TN+FP</b>	<b>37 %</b>
<b>Negativní prediktivní hodnota</b>		<b>TN/ TN+FN</b>	<b>76 %</b>

Tab. 1

Histologie		Shoda s DOBI	Neshoda s DOBI
Benigní	59	38 (TN)	21 (FP)
Maligní	41	29 (TP)	12 (FN)
<b>Senzitivita</b>		<b>TP/ TP+FN</b>	<b>71 %</b>
<b>Specifita</b>		<b>TN/ TN+FP</b>	<b>64 %</b>
<b>Negativní prediktivní hodnota</b>		<b>TN/ TN+FN</b>	<b>76 %</b>

Tab. 2



Obr. 2 DOBI ComfortScanner

Výsledky mamografií podle šestistupňové klasifikace BI-RADS jsme zařadili do skupiny MG-pozitivní nebo MG-negativní stejně jako se používá toto hodnocení v MG screeningu výsledek mamografie BI-RADS 1, 2 a 3 do skupiny negativních a výsledek BI-RADS 0, 4 a 5 do skupiny pozitivních mamografií. Na hodnocení denzity žlázy byla použita pětistupňová klasifikace dle Tabára (Tabár I až V).

Ve srovnání s poměrně vyrovnanými hodnotami senzitivity i specifity u DOBI jsou stejné parametry u mamografie zřetelně rozdílné. Senzitivita i specifita mamografie byla v našem souboru nepochybně ovlivněna především poměrně častým

výsledkem mamografie BI-RADS 0 (60% ze všech výsledků v kategorii BI-RADS 0,4,5) u denzní struktury prsů. V našem souboru převládala u většiny vyšetřovaných žen středně denzní žláza typu Tabár I (51%). Výrazně denzní žláza typu Tabár IV a Tabár byla ve 13% všech vyšetřovaných žen. Denzní typ prsu byl tedy celkově u 64% vyšetřovaných žen, procentuální zastoupení involučních typů Tabár II a III bylo 36%. U denzního typu prsu logicky zaznamenáváme častěji výsledek BI-RADS 0, čímž je samozřejmě snižována specifická vyšetření.

## DISKUSE

Progredující novotvorba cév spojená s nárůstem maligních lézí se liší od vaskulárního zásobení benigních lézí a normální prsní tkáně. Patologická vaskularita se chová odlišně i v odpovědi na mírný tlak (přibližně 10 mm Hg). Systém DOBI ComfortScan umožňuje měření prostupnosti červeného světla prsem a zaznamenává odezvu na tlakový podnět, který vyvolává změny v objemu protékající krve. Pohlcování světla v okolí malignity je ve srovnání s absorpcí v benigní nebo normální tkáni zvýšené. DOBI systém je určen právě ke zjišťování tohoto rozdílu, což umožňuje rozlišení maligních a benigních oblastí. Zkoumá dynamické chování a optické vlastnosti prsní tkáně a rozpoznává typický kontrast pro maligní poruchy ve srovnání se sousední normální tkáni prsu.

Z výsledků je zřejmé, že rozdíly senzitivity a specifity obou hodnocených metod nejsou výrazné. V této souvislosti je nutné si současně uvědomit, že metoda DOBI je zcela nová a až

hodnotící lékařka prošla školením, nelze prvotní zkušenosti s hodnocením porovnávat s letitými zkušenostmi s hodnocením mamografií. Obrazy jsou navíc naprosto odlišné od klasických rentgenových snímků. Orientačně lze uvést, že se víc přibližují obrazům z vyšetření v nukleární medicíně.

Také hodnocené soubory jsou prozatím velmi malé, literatura v současné době uvádí pouze jednu zahraniční malou studii o DOBI vyšetřování ve Francii z letošního roku /8/ s podobným závěrem, jaký předkládáme my. Větší soubory žen vyšetřených DOBI ComfortScanem v delším časovém horizontu nesporně zřetelněji napoví, zda je možné počítat do budoucna se standardním zařazením DOBI vyšetření v diagnostice maligních lézí prsu. Znamenalo by to zřetelný zisk nejen z hlediska rozšíření diagnostiky, ale především z hlediska radiační zátěže, která u dynamicko-optického zobrazování je samozřejmě nulová. Tím by byla tato metoda velmi vhodná k využití v mamografickém screeningu.

## ZÁVĚR

Jako první pracoviště v České republice a jedno z mála ve světě provedl Masarykův onkologický ústav v Brně klinickou studii DOBI vyšetřování prsů. Úvodní výsledky u metody, která je zcela nová, radiačně nezatěžující a vyšetřeny ženami velmi dobře snášená, dávají naději na další, zejména softwarový rozvoj a standardizaci hodnotících parametrů. Současně bychom rádi zdůraznili potřebu kvalitní erudice hodnotících lékařů, kterou pokládáme za enormně důležitou a velmi ovlivňující výsledky vyšetření.

## Literatura

1. Folkman J : Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N. Engl. J. Med* 1971; 285: 1182-1186.
2. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. : Tumor Angiogenesis and Metastasis—Correlation in Invasive Breast Carcinoma. *New England Journal of Medicine* 1991 Jan. 3; 324(1): 1-8.
3. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP : Second International Consensus on the Methodology and Criteria of Evaluation of Angiogenesis Quantification in Solid Human Tumours. *Eur. Journal of Cancer* 38 2002, 1564-1579.
4. Gasparini G : Clinical Significance of the Determination of Angiogenesis in Human Breast Cancer: Update of the Biological Background and Overview of the Vicenza Studies. *Eur. J. Cancer* 1996; 32A: 2485-93.
5. Weidner N, Folkman J, Pozza F et al. : Tumor Angiogenesis: A New Significant and Independent Prognostic Indicator in Early-Stage Breast Carcinoma. *J. of the Natl. Cancer Institute*, December 1992.
6. Kolb TM, Lichy J, Hewhouse JH : Comparison of the Performance of Screening Mammography, Physical Examination, and Breast US and Evaluation of Factors that Influence Them: An Analysis of 27,825 Patient Evaluations. *Radiology* 2002 October; 225(1):165-75.
7. Kerlikowske K, Carney PA, Geller B et al. : Performance of Screening Mammography Among Women With and Without a First-Degree Relative with Breast Cancer. *Annals of Internal Medicine* 2000 Dec. 5; 133(11)855-63.
8. Athanasiou A, Vanel D, Balleyguier C et al. : Dynamic optical breast imaging: A new technique to visualise breast vessels: Comparison with breast MRI and preliminary results. *EJR* 2004; 54: 72-79

## POMŮCKA PRO VÝBĚR MATERIÁLU PRO ORIENTACI PREPARÁTU V MAMMÁRNÍ CHIRURGII

### A CLUE FOR CHOOSING APPROPRIATE MATERIAL FOR SAMPLE ORIENTATION IN BREAST SURGERY

FAIT, V.<sup>1</sup>, SCHNEIDEROVÁ, M.<sup>2</sup>, CHRENKO, V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ CHIRURGICKÉ ONKOLOGIE

<sup>2</sup> MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ RADIODIAGNOSTIKY

**Souhrn:** Jedním z problémů v konzervativní chirurgii prsu je lokalizace a pooperační orientace resekátu. Nejjednodušším způsobem orientace je použití dvou značek ve dvou na sebe kolmých rovinách. Doporučujeme označit- naložit orientační stehy před kompletním vyjmutím preparátu, čímž se zamezí změně směru. V případech, kdy jsou odstraňovány mikrokalciфикации, je nezbytností „specimen radiography“. Tehdy je vhodné využití relativně radiokonstrastního materiálu. Popisujeme jednoduchou a lacinou metodu výběru nejvhodnějšího materiálu – snímek řady vzorků stehů.

**Klíčová slova:** karcinom prsu, specimen radiography, značení, konzervativní chirurgie prsu

**Summary:** One of specific problems in breast conserving surgery is localization and postoperative orientation of the tissue specimen. The simplest way for orientation of a tissue sample is inserting of two marks showing two perpendicular directions. Our recommendation is insertion of these two marks - stitches - before complete removal of the sample in order to avoid a shift. In cases of microcalcification removal specimen radiography is essential. In these cases it is beneficial to use radioopaque material. Here we present a simple and inexpensive method for choosing of suitable material – x-ray of a series of stitch samples.

**Key words:** breast cancer, specimen radiography, marking, breast conservation

#### Úvod

Konzervativní chirurgie prsu je již všeobecně přijatým postupem. Navzdory zdánlivé jednoduchosti skutečně kvalitních výsledků lze dosahovat pouze při systematickém soustředění pacientek do specializovaných center.

Chirurg ve své snaze co nejdokonaleji odstranit patologický proces v prsu při co nejmenším poškození tvaru prsu naráží pravidelně na několik problémů.

Jedním z problémů je lokalizace nehmavných nebo špatně hmatných ložisek. Potřeba lokalizace je v současné době, při převažujícím podílu pacientek zachycených mammologickým screeningem stále výraznější. Dalším problémem je zajištění kompletnosti resekce, která patří k základním předpokladům úspěšné konzervativní chirurgie<sup>5</sup>.

Lokalizačních technik je celá řada. Lokalizovat lze pomocí mammografie nebo sonografie, k samotnému označení ložiska lze použít zavedení drátku k ložisku, tetovává pomocí barviva (suspenze karbonu nebo tetovací barvy), aplikace radioaktivní značky k ložisku nebo i prosté zakreslení na kůži. V některých případech je dokonce nejjednodušší přesný popis polohy dle mammografie. Při neúčastném pohledu se problematika může jevit poměrně jasná a vyřešená, ve skutečnosti však všechny metody mají své nedostatky a prozatím není možno se uchýlit pouze k jedné možnosti.

Samostatným problémem je pak označování rozsahu tumoru před neoadjuvantní chemoterapií.

Bez ohledu na metodu lokalizace (tedy i při vyhledání hmatem) je pak vždy nutná důkladná kontrola kompletnosti resekce patologem se zpětnou vazbou k operatérovi<sup>1</sup>. Zde pro případy nekompletních resekčních okrajů je nutný zavedený systém orientace operačních preparátů pro možnost cíleného doresekování<sup>2</sup>.

U pacientek, u nichž při mammografické diagnostice byly nalezeny maligní mikrokalciфикации, je nutné také kompletní odstranění těchto mikrokalciifikationen. Toto lze poměrně rychle pooperačně zabezpečit rtg vyšetřením preparátu „specimen radiography“. Pro případy, kdy mikrokalciifikationen vyžadují doresekování, je opět výhodné, aby i rentgenolog byl co nejlépe informován o orientaci preparátu.

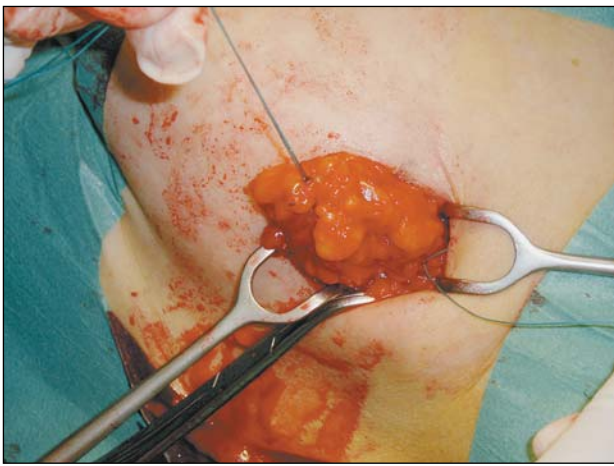
#### Samotná technika

Metod orientování operačního preparátu je opět větší množství, zásady jsou však podobné. V literatuře se lze setkat s různě složitými systémy, nicméně k určení orientace trojrozměrného tělesa je zapotřebí znát dva na sebe kolmé směry, které je nutno adekvátním způsobem označit. Výběr označených směrů a druhu značek je nepodstatný, pochopitelnou volbou je co nejjednodušší způsob.

Na našem pracovišti bylo jako relativně nejjednodušší zvoleno označení ventrálního směru a směru kraniálního dvěma různě dlouhými stehy. Zásadou nakládání stehů je označení dřívě, než je celý preparát vytnut, čímž se snažíme v co největší míře zabránit následné změně orientace. Technika se ve spolupráci s patologií osvědčila a prozatím nemáme důvod ji nahrazovat sofistikovanějšími metodami.

Jistý problém u této metody nastával v případech, kdy resekát byl prvně snímkován. V některých případech nebyly značky na mammogramu zřetelné.

Pro tento účel bylo nutno najít nejvhodnější způsob značení. Nabízelo se použití korálků, kontrastních klipů, nebo i speciálních rtg kontrastních stehů. Vzhledem k tomu, že nám byla známa velmi dobrá rozlišovací schopnost mammografu i případy, kdy jsou na mammografiích viditelné nevstřebatelné stehy po předchozích operacích, rozhodli jsme se nejprve jedno-



Obr. 1. Aplikace orientačních stehů před uvolněním preparátu.



Obr. 4. Preparát s orientačními stehy.



Obr. 2. Řada stehů různé síly na mammografu před osnímkováním.



Obr. 5. Preparát v mammografu.



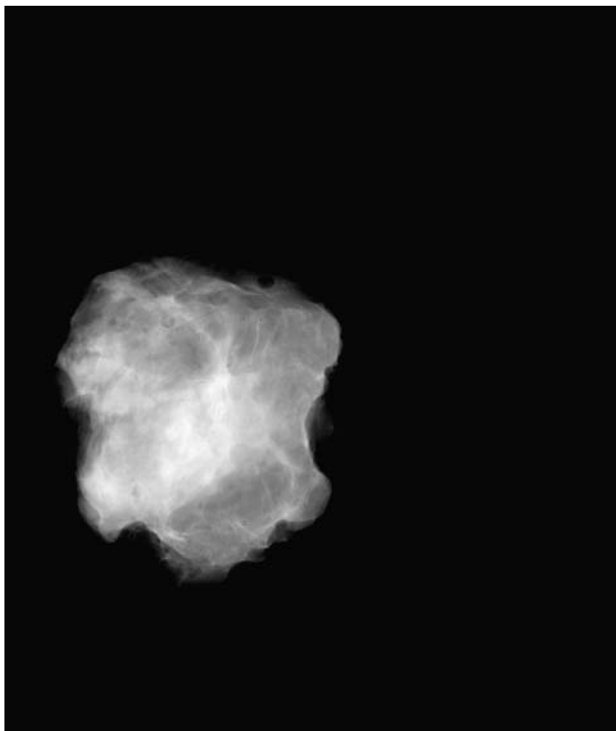
Obr. 3. Snímek řady stehů.

duchým způsobem vyzkoušet běžně dostupné materiály. Použili jsme vzorky běžného nevstřebatelného šicího materiálu o různých tloušťkách, konkrétně silonu a terylénu, tyto jsme sestavili na projekční plochu ve vzestupných řadách, jednotlivé stehy jsme pro odlišitelnost oddělili jednoduchými kontrastními značkami z kancelářské sponky. Řady byly osnímkovány a nejkontrastnější materiál byl použit při nejbližší operaci tohoto typu. Snímky prokázaly dostatečný kontrast šicího materiálu, zvláště po elektronické úpravě kontrastu, a tedy vhodnost pro další používání.

Vcelku logickým nálezem bylo, že nejlépe viditelné byly stehy větších tlouštěk, v našich podmínkách měl výrazně lepší viditelnost Teryléne oproti silonovým stehům.

#### Diskuse a závěr

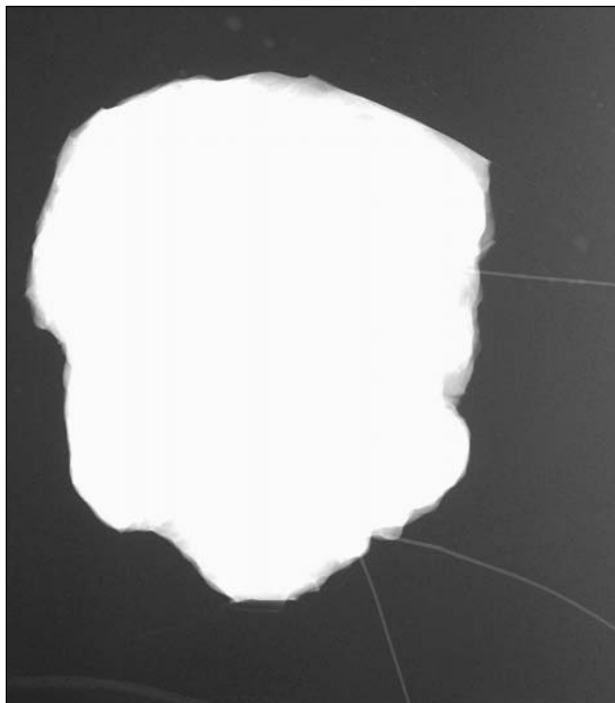
V literatuře se lze setkat s poměrně komplikovanými postupy zabezpečení orientace pro patologa, příkladem může být postup Loha a spol.<sup>3</sup>, kteří resekovaný preparát přifixují k stranově orientovanému kartonu s vystříženým tvarem prsu. Výhodou tohoto postupu může být zachování místa uložení resekátu v prsu. Otázkou je, zda právě tato informace má pro další terapii zásadní význam, navíc je obsažena jak v místě uložení jizvy, tak v popisu operace a v umístění kontrastních značek v prsu. Za zásadní nevýhodu jak tohoto postupu, tak i některých podobných považujeme nutnost preparát nejprve vyjmout a teprve poté orientovat. Mnoho operatérů sice tvrdí, že jsou schopni po vyjmutí preparátu tento správně zorientovat, ale stačí je pozorně sledovat a velmi rychle se přesvědčíme o opaku. Z tohoto důvodu se domníváme, že nejpřesnější lokaliza-



Obr. 6. Snímek preparátu.

ce lze docílit umístěním značek před úplným uvolněním preparátu, kdy není ještě možná rotace preparátu. Umístění pouze dvou na sebe kolmých značek sice určuje pouze orientaci, ale v případě nutnosti doresekce informace o kritickém okraji a klinický nálezh plně dostačují k přesnému určení oblasti k doresekování.

Určení přesné orientace preparátu při specimen radiography je záležitost poměrně opomíjená. Při přítomnosti mikrokalcifikací, po osnímkování ve dvou na sebe kolmých rovinách je mnoh-



Obr. 7. Snímek po elektronické úpravě kontrastu – pro viditelnost při tisku výrazně vyšší.

dy možno orientaci určit i podle konfigurace mikrokalcifikací při srovnání s původní mammografií<sup>4</sup>. Vzhledem k tomu, že projekce pochopitelně nemusí souhlasit, může být srovnání někdy poměrně obtížné, zvláště v situaci, kdy část mikrokalcifikací chybí. Možnost určení orientace pomocí dvou stehů pak je pro rentgenologa vítaná. Vyzkoušení viditelnosti jednotlivých druhů šicího materiálu na mammogramu je pak zcela jednoduchou procedurou, která může zlepšit přesnost i komfort metody bez zbytečných nákladů na speciální značky.

#### Literatura

1. Gould E. W., Robinson, P. G.: The pathologist examination of the „lumpectomy“ – The pathologists' view of surgical margins. *Sem Surg Oncol*, 1992, 8, s 129-135.
2. Kupsch E., Sperling M.: Orientierungshilfen an Biopsiepräparaten. *Der Pathologe*, 2000, 21, s 92-94.
3. Loh A., Salman A., Arthur G. W.: Use of a breast template: an aid for orientation of breast biopsy specimens. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 1991, 73, s 276-277

4. Rebner M., Pennes D. R., Baker D. E. et al: Two-view specimen radiography in surgical biopsy of nonpalpable breast masses. *AJR Am J Roentgenol.*, 1987, 149, s 283-5.
5. Schnitt S.J., Abner A., Gelman R. et al: The relationship between microscopic margins of resection and the risk of local recurrence in patients with breast cancer treated with breast conserving surgery and radiation therapy. *Cancer*, 1994, 74, s 1746-51



Vážení přátelé a kolegové,

v loňském roce jsem měl možnost navštívit centrum moderní hospicové péče - St. Christopher's hospice v Londýně-Sydenhamu.

Samotný pobyt byl pro mě vrcholem jedné životní etapy, jakýmsi zhodnocením smyslu mého současného pracovního zaměření a významnou inspirací do budoucna.

Dostal jsem možnost poznat, jakou obrovskou silou disponuje hnutí, kterého jsme v paliativní medicíně součástí a nebylo možné si nevšimnout úcty, kterou na každém mém kroku po anglických hospicích požívala žena, jež stála u jejich zrodu Dame Cicely Saunders.

O to více mně stejně jako jistě mnoho dalších lidí, zapálených po celém světě pro paliativní péči, oslovila zpráva od přátel ze Sydenhamu, kterou jsem v pátek 15. 7. 2005 našel ráno v počítači. Byla velmi krátká a říkala, že paní Cicely Saunders, lékařka, graduovaná zdravotní sestra i sociální pracovnice, nositelka řady ocenění, vyznamenání a mezinárodních cen, ale především zakladatelka moderního hospicového hnutí, zemřela ve svých 87 letech na lůžku zařízení, v jehož zrodu a rozvoji byla ústřední osobou - St. Christopher's hospice v Londýně-Sydenhamu.

Dame **Cicely Saunders** si získala úctu, obdiv i mezinárodní věhlas pro svůj příspěvek v péči o zmírnění utrpení umírajících. Stovky hospiců v Británii a více jak 95 dalších zemích byly inspirovány hospicem St. Christopher's v Sydenhamu, který založila v roce 1967.

St. Christopher's hospice se pokusil z její iniciativy poprvé realizovat paliativní péči pro terminálně nemocné centralizovanou na pacienta, kombinující emocionální, spirituální a sociální podporu se specializovanou lékařsko-sesterskou péčí. Tato praxe byla již mnohokrát kopírována a rozvíjena. Současný St. Christopher's hospice poskytuje péči více jak 2000 pacientům a jejich rodinám ročně a výškolením více jak 60000 profesionálů ovlivnil standart péče o umírající napříč celým světem.

Plánování umístění a financování hospice v Londýně-Sydenhamu trvalo roky. Zde Cicely Saunders vyzkoušela všechny své představy o možnostech kombinace kvalitní lékařské péče s podporou pacientů a jejich rodin v domácím prostředí, čímž změnila existující pohled na péči o umírající v praxi. Během boje o finanční i odborné zázemí této péče se Cicely Saunders ukázala být zdatným vedoucím lékařem, téměř geniálním fundraiserem, houževnatým správcem a celosvětovým zastáncem hospicové myšlenky. Bylo zřejmé, že dosáhla toho, co si dala za cíl.

Její vliv na myšlení zdravotníků v péči o umírající se nejvíce projevil tehdy, když anglická Královská lékařská společnost uznala paliativní medicínu za samostatný lékařský obor. Když byla v roce 2002 zahájena činnost Nadace Cicely Saunders, její reputace přivedla nejvýznamnější specialisty Severní Ameriky a Austrálie k účasti v mezinárodním vědeckém poradním výboru. Cíle nadace jsou, promítnout výzkum evidence based medicine do všech aspektů paliativní medicíny a péče o umírající, s důrazem na multiprofesionální spolupráci a propojení klinické i výzkumné práce.

Přijměte prosím tento článek jako malý hold její památce.

Ladislav Kabelka

## ZÁPIS Z JEDNÁNÍ VÝBORU ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI KONANÉHO DNE 14. 6. 2005 V LIBERCI

*Přítomni:* Vorlíček, Abrahámová, Aschermannová, Cwiertka, Eckschlagler, Fínek, Jelínková, Konopásek, Petera, Stáhalová, Stankušová, Vyzula, Žaloudík

*Omluveni:* Příbylová, Petruželka, Rob, Stankušová

*Hosté k bodu 2:* dr. Štastný, dr. Nedvěd, ing. Vojtíšek

Členy výboru uvítal v liberecké nemocnici prim. MUDr. Jiří Bartoš a stručně charakterizoval onkologickou situaci v kraji, o níž pak bylo ještě dále jednáno na tiskové konferenci po skončení výboru.

Kontrola zápisu - návrh připravených inovovaných doporučených postupů zašle doc. Vyzula do konce týdne k připomínkování všem členům výboru ČOS, k 1. 7. 2005 budou připraveny k vydání.

1. Projednáván návrh kritérií pro přiznání statutu komplexního onkologického centra/skupiny (KOC/KOS) garantovaného ČOS. Kritéria byla bod za bodem diskutována a doplněna, finální verze je přiložena k zápisu. Kritéria pro garanci KOC/KOS Českou onkologickou společností budou předána vedení VZP a odboru zdravotní péče MZ ČR do konce června.
2. Předseda Vorlíček uvítal dr. Štastného, dr. Nedvěda, ing. Vojtíška a výbor vyslechl jejich osobní a nedokladované připomínky k přiznávání akreditací mamodiagnostickým pracovištím pro screening. Jmenovaní vznesli závažná zpochybnění regulérnosti procesu. Zpochybnili také kritérium minimálního počtu screeningových vyšetření 5000 za rok. Výbor ČOS pro objektivizaci stížností požádá MZ o protokoly k akreditaci screeningových pracovišť stěžovatelů a doplní si informace o celém procesu akreditací a reakreditací vedeném MZ ČR. Všichni přítomní se shodli na užitečnosti mamárního screeningu a potřebě podpořit jeho další a nezpochybnitelné fungování.
3. Výbor vyslechl informaci výkonné redakce časopisu Klinická onkologie, ocenil, že časopis vychází kontinuálně v dobré kvalitě a v pravidelných intervalech bez problémů. Výbor vyzývá všechny členy ČOS k publikování v Klinické onkologii, zejména pokud jde o originální výsledky

grantových projektů a odborné práce onkologických pracovišť. Projekty podpořených granty BTF mají publikaci výsledků v Klinické onkologii jako podmínku úspěšného splnění.

4. Výbor odložil bod náplně preventivních onkologických prohlídek na příští jednání s tím, že budou ještě shromážděny podklady od praktických lékařů.
5. Výbor odsouhlasil zaplacení každoročního členského příspěvku pro Sekci onkochirurgie ve World Federation of Surgical Oncology Societies.
6. Dr. Aschermannová podala zprávu revizní komise, která neshledala nedostatky v hospodaření. Stav účtu ČOS je 385 750 Kč.
7. Prof. Vorlíčkem byl vznesen námět na potřebu vzniku **Sekce psychoonkologie**, dr. Fínek námět na vznik **Sekce uroonkologie** v rámci ČOS. Výbor vyzývá členy ČOS takto specializované nebo zajímavější se o tyto problematiky, aby se aktivně přihlásili předsedovi ČOS a pomohli při vzniku sekci.
8. Sekce diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie ČOS pořádá ve dnech 9. až 10. 12. 2005 konferenci ve Zlíně, podrobnější informace budou zveřejněny na [www.lin-kos.cz](http://www.lin-kos.cz), výbor ČOS přebírá nad konferencí záštitu.
9. Nadále trvá úkol výboru ČOS jednat s praktiky a gastroenterology o screeningu kolorektálního karcinomu, neboť v jeho organizaci, popularizaci i monitoringu jsou dosud značné rezervy.
10. Výbor schválil přijetí nových členů: Dr. Kubala (Ostrava-Poruba), Dr. Štipl (Jindřichův Hradec)
11. Doc. Petruželka připraví na jednání výboru ČOS v září 05 návrh stanoviska výboru k aplikacím erythropoetinu u solidních nádorů na podkladě platných vyhlášek a mezinárodních guidelines.
12. Termíny výborů ČOS na podzim 2005:  
20. 09. - České Budějovice  
**11. 10. - Zlín - pozor změna proti původní domluvě**  
**15. 11. - Hradec Králové - pozor změna proti původní domluvě**  
13. 12. - Praha-Motol