

**UNIVERZITA KARLOVA**

Lékařská fakulta v Plzni



Autoreferát dizertační práce

Význam tumor infiltrujících lymfocytů jako prognostických faktorů u pacientů po embolizaci portální žíly (PVE) a po PVE s aplikací autologních kmenových buněk

Relevance of tumor infiltrating lymphocytes as a prognostic factors at patients with portal vein embolisation (PVE) and patients with PVE and administration of autologous stem cells

MUDr. Jan Brůha

Plzeň 2018



**UNIVERZITA KARLOVA**

Lékařská fakulta v Plzni



Autoreferát dizertační práce

Význam tumor infiltrujících lymfocytů jako prognostických faktorů u pacientů po embolizaci portální žíly (PVE) a po PVE s aplikací autologních kmenových buněk

Relevance of tumor infiltrating lymphocytes as a prognostic factors at patients with portal vein embolisation (PVE) and patients with PVE and administration of autologous stem cells

MUDr. Jan Brůha

Plzeň 2018

Dizertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu na  
**Chirurgické klinice FN Plzeň a LF UK v Plzni**

Uchazeč: **MUDr. Jan Brůha**

Školitel: **Prof. MUDr. Vladislav Třeška, DrSc.**

Oponenti: **Prof. MUDr. Robert Gürlich, CSc.**

Chirurgická klinika 3. LF UK a FN Královské Vinohrady  
Šrobárova 50, 103 34 Praha 10

**Doc. MUDr. Zdeněk Šubrt, Ph.D.**

Chirurgická klinika LF UK a FN Hradec Králové  
Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

Autoreferát byl rozeslán dne: .....

Obhajoba dizertační práce před komisí pro obhajobu disertačních prací studijního programu Chirurgie se koná dne: 13.6.2018

Místo obhajoby: aula Fakultní nemocnice v Plzni, alej Svobody 80, Plzeň - Lochotín

S dizertační prací je možné se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Husova 3, Plzeň.

Prof. MUDr. Vladislav Třeška, DrSc.

předseda komise pro obhajobu dizertačních prací v oboru Chirurgie

pracoviště: Chirurgická klinika FN Plzeň a LF UK v Plzni

# Obsah

<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>2</b>
<b>1 Teoretický úvod</b> .....	<b>3</b>
1.1 Metastazující kolorektální karcinom .....	3
1.2 Chirurgická léčba jaterních metastáz .....	3
1.3 Využití kmenových buněk v chirurgii jater .....	4
1.4 Imunitní systém a jaterní metastázy .....	5
1.5 Onkologická léčba a ABCC transportéry .....	7
<b>2 Cíle</b> .....	<b>8</b>
<b>3 Metodika</b> .....	<b>8</b>
3.1 Studie sledování efektu PVE a PVE s aplikací SCs na FLRV a CLM .....	8
3.2 Stanovení tumor infiltrujících lymfocytů .....	9
3.3 Stanovení ABCC10 a ABCC11 .....	10
3.4 Statistická metoda .....	10
<b>4 Výsledky</b> .....	<b>12</b>
4.1 Efekt PVE a PVE s aplikací SCs na růst FLRV a CLM.....	12
4.2 OS, DFI a vztah k onkologické léčbě s 5-FU u pacientů s provedenými resekčními výkony .....	14
4.3 Výsledky stanovení TILs .....	15
4.4 Stanovení ABCC10 a ABCC11 .....	25
<b>5 Diskuze</b> .....	<b>26</b>
5.1 Diskuze k efektu PVE a PVE s aplikací SCs na růst FLRV a CLM .....	26
5.2 Diskuze k DFI, OS a vztahu k onkologické léčbě po resekčních výkonech u pacientů po PVE, po PVE s aplikací SCs a pacientů primárně resektabilních ..	27
5.3 Diskuze k TILs .....	28
5.4 Diskuze k ABC transportérům.....	36
<b>6 Závěr</b> .....	<b>38</b>
<b>7 Použitá literatura</b> .....	<b>40</b>

## Seznam zkratk

ABC	ATP-binding cassette transportéry
CLM	jaterní metastázy kolorektálního karcinomu
CRC	kolorektální karcinom
CT	výpočetní tomografie
DCs	dendritické buňky
DFI	bezpříznakové období
FLRV	zbytkový jaterní objem
HPF	zorné pole pod největším (400x) zvětšením
HSCs	hematopoetické kmenové buňky
IS	imunitní systém
MSCs	mesenchymální kmenové buňky
NKs	přirození zabíječi
OS	overall survival
PVE	embolizace portální žíly
SCs	kmenové buňky
Tc	cytotoxické T lymfocyty
TCR	receptor T lymfocytů
Th	pomocné T lymfocyty
TILs	tumor infiltrující lymfocyty
T reg	T regulační lymfocyty
TLV	celkový objem jater
VLM	objem jaterních metastáz

# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Metastazující kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (Colorectal Cancer, CRC) je ve vyspělém světě velmi časté onemocnění [1]. U téměř 20 % pacientů s CRC se vyskytují synchronní jaterní metastázy (Colorectal Liver Metastases, CLM) a až u 50 % pacientů se v průběhu dispenzarizace objeví metachronní CLM [2, 3]. Všichni pacienti léčení s CRC podstupují pečlivou dispenzarizaci. V rámci dispenzarizace jsou k časnému zachytu recidivy nebo vzdálených metastáz využívány pravidelné odběry onkomarkerů, vyšetření hrudníku, břicha a pánve na počítačové tomografii (Computed Tomography, CT) a kolonoskopická vyšetření [4]. Včasný záchyt CLM je zcela zásadní pro další osud pacienta, protože chirurgická léčba je stále jediný způsob jak dosáhnout radikálního odstranění tumoru [5].

## 1.2 Chirurgická léčba jaterních metastáz

Mezi významné faktory, které v minulosti kontraindikovaly resekcční výkony na játrech, patřila nevhodná lokalizace metastáz (např. bilobární uložení metastáz), vysoký počet (více než 3) a velikost metastáz, mimo jaterní šíření CRC a postižení lymfatických uzlin jaterních pedikulů [6 s. 168, 7, 8]. Tyto faktory jsou v dnešní době považovány za prognosticky nepříznivé, ale jako takové nekontraindikují chirurgický výkon. V případech, kdy je nutné provést rozsáhlou jaterní resekci (3 a více jaterních segmentů) je zásadním faktorem, který určuje resekalitu, tzv. zbytkový jaterní objem (Future Liver Remnant Volume, FLRV).

FLRV je předpokládaný objem jaterní tkáně, který je pacientovi ponechán po resekcčním výkonu. Dostatečně velký FLRV slouží jako prevence pooperačního akutního jaterního selhání [9]. Předoperačně je nezbytné provést CT volumetrii jater se stanovením objemu jaterních laloků, celkového objemu jater (Total Liver Volume, TLV) a objemu metastáz (Volume of Liver Metastases, VLM). FLRV je pak převeden na procenta jako poměr  $FLRV/TLV \cdot 100$ . Nízký FLRV je příčinou proč pouze čtvrtina pacientů s CLM je primárně resekalibilní [10, 11, 12]. U pacientů se zdravým jaterním parenchymem ponecháváme FLRV v rozmezí 25-30 % [13]. Podání onkologické léčby u pacientů s CLM ovlivňuje morfologické a fyziologické poměry v játrech [14]. U standardních chemoterapeutických cyklů je doporučeno ponechat 30-35 % FLRV. V případě

prolongované chemoterapie (12 cyklů a více), nebo primárního poškození jaterní tkáně (např. cirhózou nebo steatohepatitidou) je vhodné počítat s FLRV minimálně 40 % [9, 14, 15]. U nižších hodnot FLRV můžeme indikovat embolizaci portální žíly (portal vein embolization, PVE).

PVE je metoda, při které je uzavřena část portálního řečiště a tok portální krve je přeměřován do neokludovaného řečiště. Okluze se provádí na straně plánované operace. V důsledku tohoto výkonu dochází ke kompenzatorní hypertrofii jaterního parenchymu neokludovaného portálního řečiště. Naopak na straně jaterního parenchymu s tumorem a okludovaným portálním řečištěm dochází k atrofii jaterního parenchymu. PVE je dnes již dobře etablovaná metoda s minimálním počtem komplikací a je považována za standardní způsob, jak navýšit FLRV [16]. Nárůst FLRV po PVE je sledován pravidelnými CT kontrolami v intervalu 2-4 týdnů od provedení PVE [9]. Obvyklá doba nárůstu FLRV je v průměru 25 dní (3,5 týdne) [17]. Nedostačující nárůst FLRV byl pozorován u 25-40 % pacientů, kteří tak nemohli podstoupit radikální operační výkon [18, 19]. Důvodem je nepoměr mezi rychlostí nárůstu FLRV a progresí samotných CLM po provedené PVE [20, 21]. Proto jsou dnes zkoumány metody, které urychlují nárůst FLRV po PVE. Jednou z nich je i použití kmenových buněk (Stem Cells, SCs).

### **1.3 Využití kmenových buněk v chirurgii jater**

Kmenové buňky (SCs) jsou základní primární nediferencované buňky, které se mohou diferencovat do jiných buněčných typů (tzv. multipotence) a současně jsou schopné sebeobnovy [22 s. 17]. V rámci regenerace jater jsou využívány především adultní multipotentní hematopoetické (CD34<sup>+</sup> a CD133<sup>+</sup>) (Hematopoietic Stem Cells, HSCs) a mesenchymální (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) kmenové buňky z kostní dřeně. Díky své plasticitě jsou schopné ovlivnit regeneraci jater [23].

Několik studií zkoumalo efekt intraportálně podaných CD133<sup>+</sup> nebo CD34<sup>+</sup> buněk na růst FLRV po PVE. Všechny studie byly provedeny na heterogenním souboru pacientů převážně s primárními tumory jater. Tyto studie prokázaly pozitivní efekt na nárůst FLRV, který byl signifikantně vyšší oproti samotné PVE [24, 25, 26]. Stále nevyjasněný je však efekt SCs na progresi maligního onemocnění.



## 1.4 Imunitní systém a jaterní metastázy

Imunitní systém (Immune System, IS) a nádorové onemocnění se vzájemně neustále ovlivňují. Reakce mezi tumorem a IS lze rozdělit do tří fází a to eliminace, rovnováha a únik. Ve fázi eliminace IS udržuje dohled nad vyvíjejícími se nádorovými buňkami. V případě, že nádorové buňky odolávají (obvykle v důsledku mutace) imunitní odpovědi, vstupují do fáze rovnováhy. IS zde prozatím brání šíření tumoru, ale není schopen vznik tumoru eliminovat. Pokud jsou nádorové buňky schopné měnit své povrchové antigeny, ovlivňovat okolní mikroprostředí a apoptotické mechanismy, mají vysoký potenciál přesmyknout se do fáze úniku a růst nezávisle na dohledu IS [27].

### Dendritické buňky

Dendritické buňky (Dendritic Cells, DCs) jsou složkou nespecifické imunity zodpovědné za fagocytózu a prezentaci antigenů buňkám imunity specifické. V minulosti byl popsán vztah DCs k lepšímu celkovému přežití (Overall Survival, OS) u pacientů s CRC [28]. U pacientů s CLM DCs zpomalovali růst metastáz [29].

### Natural killers

Přirození zabíječi (Natural Killers, NKs) jsou složkou nespecifické imunity, která je zodpovědná za časnou destrukci poškozených buněk přímým cytotoxickým účinkem. NKs jsou známé svým protinádorovým efektem s prodloužením OS a bezpříznakového období (Disease Free Interval, DFI) u CRC [30, 31]. Oproti tomu u CLM jsou NKs přítomny ve velmi nízkých počtech a jejich snížená funkce může být příčinou progresu onemocnění [32].

### T lymfocyty

T lymfocyty jsou charakteristické přítomností receptoru T lymfocytů (T-Cell Receptor, TCR) na svém povrchu. TCR lze rozdělit podle typů řetězců na  $\alpha\beta$  a  $\gamma\delta$ . TCR  $\alpha\beta$  rozeznávají hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex, MHC). TCR  $\alpha\beta$  se dále dělí podle přítomnosti povrchových molekul CD4 a CD8. CD4<sup>+</sup> molekuly jsou typické pro pomocné T lymfocyty (T helper cells, Th) a CD8<sup>+</sup> molekuly pro cytotoxické lymfocyty (T cytotoxic cells, Tc) [27 s. 139-141].

## ***Th lymfocyty***

Th lymfocyty lze rozdělit na Th1, Th2 a Th17. Každý Th lymfocyt produkuje specifické spektrum působků, kterým ovlivňuje různé složky IS. Th1 lymfocyty jsou zodpovědné za podporu cytotoxické reakce a spolupráci s Tc lymfocyty. Th2 lymfocyty jsou zodpovědné za řízení buněk nespecifické imunity a B lymfocytů. Th 17 ovlivňují Tc a B lymfocyty, NKs a DCs. Ve studiích byla prokázána souvislost progresu CRC při snížení infiltrace tumoru Th1 lymfocyty a při vzestupu infiltrace Th2 lymfocyty [33]. Katz porovnával zastoupení tumor infiltrujících lymfocytů (Tumor Infiltrating Lymphocytes, TILs) u pacientů s CLM. Pacienti s krátkým OS měli vyšší zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk [34].

## ***T regulační lymfocyty***

T regulační lymfocyty (regulatory T cells, T reg) jsou zásadní imunopresní složkou chránící organismus před autodestrucí [27 s. 148-150]. Katz referuje, že vysoké hodnoty poměrů FoxP3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> a FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> jsou u pacientů s CLM spojeny s kratším OS [35]. Pernot udává, že v tumorózní tkáni dochází ke konverzi CD4<sup>+</sup> buněk do T reg, které pak zkracují DFI a OS [36].

## ***Tc lymfocyty***

Jsou hlavní efektorové buňky protinádorové imunity. Jejich přítomnost v CRC je spojována s dobrou prognózou pro OS a nižším metastazováním do regionálních lymfatických uzlin [37]. Wagner popsal vyšší aktivitu Tc lymfocytů u pacientů s CLM oproti zdravým pacientům [38]. Katz spojuje vysoká zastoupení CD8<sup>+</sup> buněk a nízká zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk v CLM s dlouhodobým OS [34].

## **Granzym B**

Granzym B je serinová proteáza, nejvíce zastoupená v NKs a Tc lymfocytech. Granzym B vyvolává v cílové buňce apoptózu. V minulosti byl prokázán vztah nízké exprese granzymu B s časným metastazováním [39].

## **Serpiny**

Serpiny jsou inhibitory serinových proteáz, které chrání buňky IS před uvolněnými granzymy. Zvýšená exprese serpinů v tumorech je indukována hypoxií. Zvýšená

přítomnost serpinů pak může být příčinou sníženého efektu granzymů a důvodem nádorové rezistence vůči imunokompetentním buňkám [40].

## **1.5 Onkologická léčba a ABCC transportéry**

Kombinace chirurgické a onkologické léčby přináší nejlepší výsledky v OS a DFI u pacientů s CLM. Problémem dnešní doby je stoupající rezistence nádorových buněk vůči klasickým chemoterapeutikům a následné selhání léčby se zkrácením DFI a OS [6 s. 123-130]. Na tomto efektu se podílí i ATP-binding cassette transportéry (ABC). V důsledku efluxu přes buněčnou membránu se snižují intracelulární hladiny xenobiotik a tím i doba expozice chemoterapeutika v buňce. Rozlišujeme sedm skupin ABC transportérů (A – G) a následně i jejich podskupiny. Hlavatá prokázala, že transkripční hladiny intratumorálního ABCC10 korelují s gradingem CRC. U pacientů s paliativní léčbou bylo významně kratší DFI spojené s nízkou intratumorální transkripční hladinou ABCC11. DFI bylo významně kratší u pacientů s adjuvantní chemoterapií a nízkou transkripční hladinou ABCC11 [41]. U pacientů s CRC nízké hladiny proteinu ABCC10 třikrát zvyšovaly riziko. Nízké zastoupení proteinu ABCC11 čtyřikrát zvyšovalo riziko rekurence. Pacienti, kteří byli léčeni deriváty 5-FU a měli nízké zastoupení ABCC11 v tumoru, měli kratší DFI oproti pacientům s vysokou hustotou ABCC11 [42].

## 2 Cíle

Cílem dizertační práce je:

1. ověřit efekt aplikace SCs po PVE ve vztahu k nárůstu FLRV, nárůstu objemu CLM v období mezi PVE a resekčním výkonem, dosažení resekability CLM a u resekovaných pacientů vztah k DFI a OS.
2. stanovení TILs u pacientů primárně resekabilních pro CLM, u pacientů po PVE a pacientů po PVE s aplikací SCs ve vztahu k prognóze onemocnění, DFI, OS a výši rizika recidivy onemocnění
3. stanovení transportérů ABCC10 a ABCC11 u pacientů po resekci jater pro CLM ve skupinách primárně operabilních pacientů, pacientů po PVE a PVE s aplikací SCs a jejich vztah k DFI a OS.

## 3 Metodika

### 3.1 Studie sledování efektu PVE a PVE s aplikací SCs na FLRV a CLM

Do studie bylo zahrnuto 63 pacientů s primárně inoperabilními CLM za období od 1.1.2004 do 31.12.2015, kteří byli na Chirurgické klinice FN Plzeň indikováni k PVE nebo PVE s aplikací SCs (PVE SCs). K PVE nebo PVE SCs byli indikováni pacienti s FLRV menším než 30%, nebo pacienti s prolongovanou onkologickou léčbou a vyšším rizikem pooperačního jaterního selhání. Skupina s provedenou PVE měla 43 pacientů, skupina PVE SCs měla 20 pacientů. Z daných skupin jsme vyčlenili pacienty, kteří měli vstupní FLRV menší než 30 %, tzn. skupinu PVE 30 s 25 pacienty a skupinu PVE SCs 30 s 8 pacienty. Vstupní data byla mezi skupinami bez signifikantních rozdílů. PVE byla provedena perkutánní transhepatální cestou. U skupiny PVE SCs byl intraportálně podán derivát s SCs 24 hodin po PVE. SCs byly získány buď z periferní krve (10 pacientů) nebo z kostní dřeně (10 pacientů) podle metodiky publikované v minulosti [24, 25, 26]. CT volumetrie byly provedeny v období nejdéle 1 měsíc před PVE a 3 týdny po provedení PVE.

### 3.2 Stanovení tumor infiltrujících lymfocytů

Zastoupení TILs u pacientů po rozsáhlé jaterní resekci pro CLM bylo hodnoceno u třech skupin pacientů: 1. primárně operabilní, 2. resekabilní po předchozí PVE a 3. resekabilní po předchozí PVE s aplikací SCs. Celkem byly hodnoceny vzorky od 101 pacientů (PVE 26 pacientů, PVE SCs 13 pacientů a primární resekce jater u 62 pacientů).

Histopatologická vyšetření byla provedena na Šiklově patologicko-anatomickém ústavu Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty v Plzni, Univerzity Karlovy. Preparáty pro mikroskopické vyšetření byly získány z parafinových bločků nařezáním na 5µm řezy a obarvením v hematoxylinu - eosinu. Kvalitativní hodnocení sledovalo zastoupení TILs v lokalizaci: intratumorální ITL, intrastromální (ISL), peritumorální (PTL) a Crohn like (Crohn – like). V rámci semikvantitativního hodnocení se hodnotila síla infiltrace v dané lokalizaci pomocí čtyřstupňového systému: 0 = žádná infiltrace, 1 = mírná infiltrace, 2 = střední infiltrace, 3 = závažná infiltrace.

U daného souboru pacientů bylo provedeno imunohistochemické vyšetření. Pozitivní i negativní kontroly byly provedeny pomocí tkáně z palatinální lymfatické uzliny. Míra infiltrace lymfocytů byla hodnocena v pěti zorných polích v high power microscopical fields (HPF). Pro hodnocení byl opět použit semikvantitativní čtyřstupňový systém: 0 = žádná infiltrace, 1 = mírná infiltrace, 2 = střední infiltrace, 3 = závažná infiltrace. Značení primární protilátkou bylo provedeno supersenzitivním streptavidin-biotin peroxidázovým komplexem (Biogenex, San Ramon, Kalifornie, USA).

Ke stanovení TILs bylo využito barvení s protilátkami na CD4 (klon SP35, dále neředěno, Ventana, Rocklin, Kalifornie, USA) a CD8 (klon C8/144B, 1.50, Dako, Glostrup, Dánsko). K detekci T reg lymfocytů bylo využito barvení s protilátkami proti FoxP3 (klon mAbcam 450, 1:20, Abcam, Cambridge, Velká Británie) a CD25 (klon 4C9, dále neředěno, Ventana, Rocklin, Kalifornie USA). Z preparátů byly odečítány pozitivní lymfocyty.

Ke stanovení NKs bylo využito imunohistochemické barvení na CD57 (klon NK-1, dále neředěno, Ventana, Kalifornie, USA) s odečty pozitivních nenádorových buněk. Cytotoxická odpověď imunokompetentních buněk vůči nádorovým buňkám byla sledována barvením proti granzymu B (klon 11F1, 1:30, Leica Biosystems, USA). V rámci tohoto barvení byla sledována pozitivita nenádorových buněk. Efekt inhibitorů granzymů byl u nádorových buněk sledován pomocí protilátek proti serpinu B (klon P19-17, 1:100,

Abcam, Cambridge, Velká Británie). Stimulační aktivita APC buněk byla sledována pomocí protilátek proti CD86 (klon EP1158Y, dále neředěno, Abcam, Cambridge, Velká Británie).

### **3.3 Stanovení ABCC10 a ABCC11**

Stanovení ABCC10 a ABCC11 bylo provedeno u stejných skupin pacientů jako stanovení TILs. V závislosti na kvalitě preparátů byly zhodnoceny vzorky od 86 pacientů (primárně operabilní 54 pacientů, PVE 23 pacientů, PVE SCs 9 pacientů). Stanovení ABCC10 a ABCC11 bylo provedeno na Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty v Plzni, Univerzity Karlovy. K vyšetření byly využity vzorky CLM fixované ve 4 % formaldehydu zalité do parafínových bločků. Po přípravě mikroskopických preparátů bylo provedeno obarvení v hematoxylinu – eosinu. Na těchto vzorcích bylo provedeno imunohistochemické barvení pomocí protilátek proti ABCC10 (M7I-3, 1:10, Abcam, Cambridge, Velká Británie) a ABCC11 (M8I-74, 1:10, Abcam, Cambridge, Velká Británie).

Od každého pacienta byl vyšetřen 1 mikroskopický vzorek v 8 zorných polích. Kvantifikace ABCC10 a ABCC11 byla provedena pomocí stereologických metod softwarem Ellipse (ViDiTo, Košice, Slovenská republika) metodikou dle Tonara [43].

### **3.4 Statistická metoda**

Všechny analýzy byly provedeny v programu Statistica (StatSoft, Inc. 2013. Verze 12 Cz. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)). Všechny uváděné p-hodnoty jsou oboustranné a hladina statistické významnosti byla stanovena na  $\alpha = 0.05$ .

#### **Analýza vlivu aplikace SCs při PVE**

V rámci této analýzy byly zkoumány objemové ukazatele jaterní tkáně a CLM včetně rychlosti jejich růstu. Rozdíly těchto ukazatelů mezi skupinami PVE a PVE SCs (případně mezi PVE 30 a PVE SCs 30) byly testovány pomocí Mannova-Whitneyho U testu. Korelace byly testovány pomocí Spearmanovy pořadové korelace. U resekovaných pacientů byl stanoven DFI (od data výkonu do data recidivy, úmrtí pacienta nebylo považováno za recidivu) a OS. Statistická významnost rozdílů v OS a DFI byla testována Gehanovým-Wilcoxonovým testem. Bodové odhady časů a kvantilů přežití byly vypočteny z Kaplanových-Meierových odhadů funkce přežití lineární interpolací mezi ukončenými pozorováními. Odhad mediánu follow-up byl stanoven pomocí inverzní Kaplanovy-

Meierovy metody [44]. Rozdíly v pozorovaných relativních četnostech (incidence extrahepatálních metastáz, četnost explorativních laparotomií) byly testovány Fischerovým přesným testem.

### **Analýza TILs, ABCC10 a ABCC11**

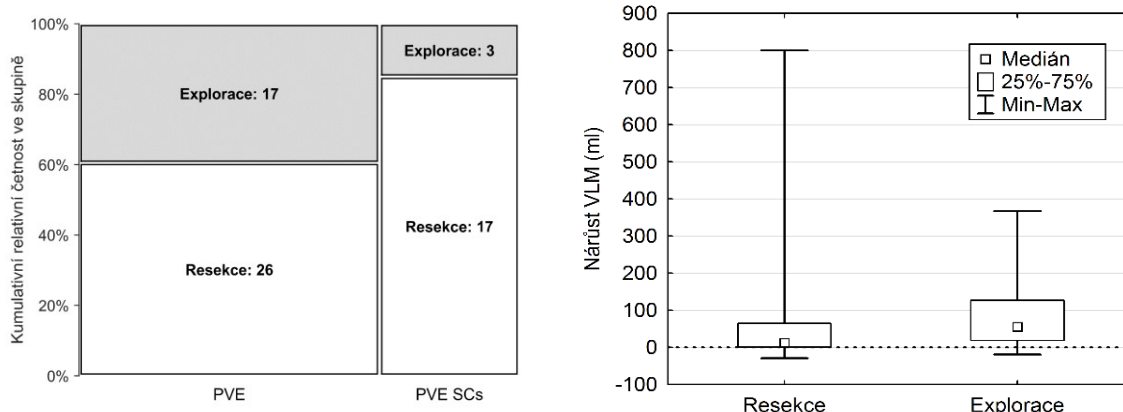
Jako primární popis klinických výstupů léčby byly opět zvoleny ukazatele přežití: DFI a OS. Souvislost DFI a OS s intenzitou a charakterem TILs infiltrace byla zkoumána v závislosti na charakteru nezávislé proměnné. Vliv kvantitativních veličin (vyjádřené  $x/HPF$ ) byl zkoumán dvojitým způsobem. Spojitá souvislost mezi hodnotou indikátoru a ukazateli přežití byla nejprve testována jednorozměrným Coxovým modelem proporcionálních rizik. U nálezů statisticky významných byla provedena stratifikace dle mediánu a dvě takto vzniklé skupiny byly následně porovnány (Kaplanova-Meierova analýza, Gehanův-Wilcoxonův test, stanovení poměru rizika jednorozměrným Coxovým modelem proporcionálních rizik). Semikvantitativní ukazatele byly zkoumány jak pomocí jednorozměrného Coxova modelu proporcionálních rizik, tak pomocí vícevýběrového testování (Kaplanova-Meierova analýza a vícevýběrové rozšíření Gehanova-Wilcoxonova testu). Poměry kvantitativně měřených ukazatelů byly vyhodnoceny stejně jako samotné kvantitativní ukazatele popsané výše s tím rozdílem, že před analýzou Coxovým modelem byly hodnoty poměrů logaritmicky transformovány (zlogaritmovány se základem 2). Tím bylo dosaženo symetričtější distribuce veličiny a faktické ekvivalence výsledku analýzy pro daný poměr a poměr převrácený. Poměry s opačným pořadím proto nebylo potřeba testovat zvlášť. S problematickými hodnotami bylo naloženo takto: pokud pro daného pacienta hodnota jednoho nebo obou porovnávaných TIL chyběla, byla výsledkem opět chybějící hodnota. Pro poměr 0/0 byla výsledkem chybějící hodnota. Hodnoty logaritmu menší než -5 (tedy poměr 1/32), případně větší než 5 (tedy poměr 32/1) byly nahrazeny hodnotami -5 a 5 (v tomto pořadí). Za logaritmy poměrů 0/x, případně x/0 ( $x \neq 0$ ) byly opět dosazeny hodnoty -5 a 5 (v tomto pořadí). Bodové odhady časů a kvantilů přežití byly vypočteny z Kaplanových-Meierových odhadů funkce přežití lineární interpolací mezi ukončenými pozorováními. Odhad mediánu follow-up byl stanoven pomocí inverzní Kaplanovy-Meierovy metody [44]. Rozdíly ukazatelů TIL mezi dvěma skupinami byly testovány pomocí Mannova-Whitneyho U testu, mezi třemi skupinami pak pomocí Kruskalovy-Wallisovy ANOVY. Rozdíly v zastoupení kategorií mezi

skupinami byly testovány pomocí chí-kvadrát testu. Korelace byly testovány pomocí Spearmanovy pořadové korelace. Rozdíly v plošném zastoupení ABCC10 a ABCC11 v závislosti na podání 5-FU byly testovány pomocí Mannova-Whitneyho U testu a dvoufaktorové analýzy rozptylu s interakcí.

## 4 Výsledky

### 4.1 Efekt PVE a PVE s aplikací SCs na růst FLRV a CLM

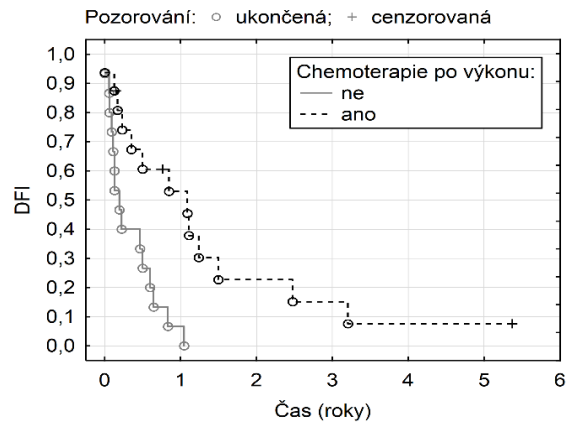
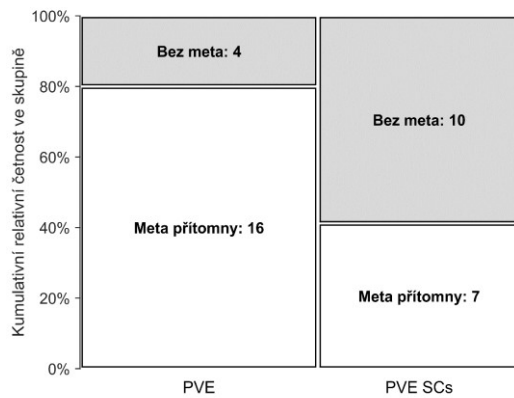
Mezi sledovanými skupinami PVE a PVE SCs a skupinami PVE 30 a PVE SCs 30 jsme neprokázali statisticky signifikantní rozdíly v nárůstu FLRV. Trend nejrychlejšího růstu FLRV byl pozorován u skupiny PVE SCs 30. Výsledky však nejsou statisticky signifikantní. U všech skupin jsme pozorovali růst VLM. Mezi sledovanými skupinami jsme však v růstu VLM neprokázali statisticky signifikantní rozdíl. Explorativní laparotomie byla u pacientů po PVE s podanými SCs provedena u 3 pacientů z celkového počtu 20 pacientů (15 %) a u samotné PVE u 17 pacientů z celkového počtu 43 pacientů (39,5 %). Statisticky je však tento výsledek nesignifikantní (Fischerův přesný test,  $p=0,080$ ) (obr. 1). Statisticky významným faktorem ovlivňující odstoupení od resekcího výkonu byla progresse metastáz (Mann-Whitney U test,  $p=0,0445$ ) (obr. 2). Výskyt extrahepatálních metastáz v pooperačním období byl statisticky signifikantně vyšší u skupiny PVE (Mann-Whitney U test,  $p=0,0210$ ) (obr. 3).



Obr. 1 (vlevo): explorativní laparotomie, porovnání skupin PVE a PVE SCs v % (Fischerův přesný test,  $p=0,0800$ )

Obr. 2 (vpravo): progresse metastáz ve vztahu k resekcími a exploračním výkonům (Mann-Whitney U test,  $p=0,0445$ )





Obr. 3 (vlevo): vyjádření počtu extrahepatálních metastáz, porovnání skupin PVE a PVE SCs (Mann-Whitney U test,  $p=0,0210$ )

Obr. 4 (vpravo): porovnání DFI mezi pacienty s pooperačně podanou a nepodanou chemoterapií (Gehan-Wilcoxon test  $p= 0,0086$ ; poměr rizika mezi sledovanými skupinami 0,2379)

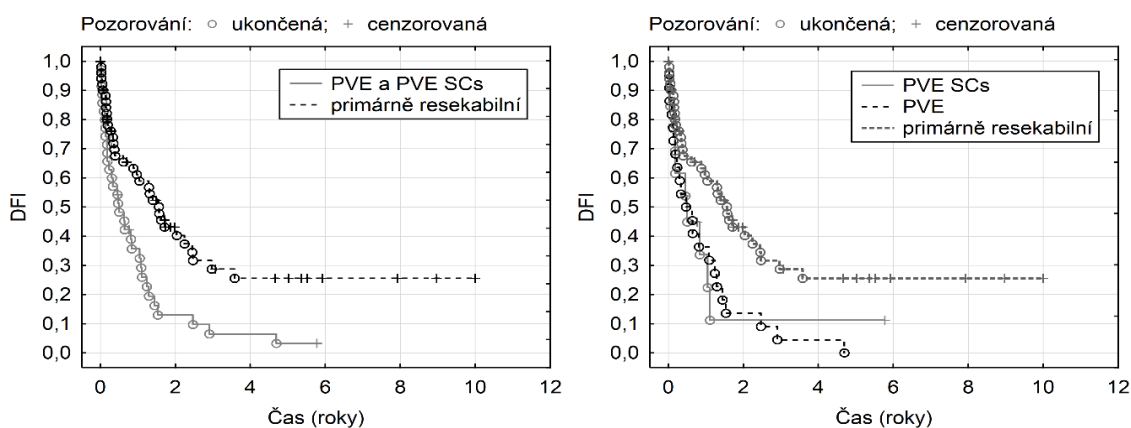
DFI u pacientů po provedené resekci bylo mezi skupinami PVE a PVE SCs bez statisticky signifikantního rozdílu (Gehan-Wilcoxon test,  $p= 1,0$ ). Ve skupině PVE bylo DFI 1. rok 25,6 %, 3. rok 2,0 %, 5. rok 0 %. Medián DFI u PVE byl 0,445 roku. U skupiny PVE SCs bylo DFI 1. rok 23,2 %, 3. rok 5,8-10,5 % (odhadované DFI), 5. rok 0,9-10,5 % (odhadované DFI). Medián DFI u PVE SC byl 0,367 roku.

OS u pacientů po resekci CLM bylo mezi skupinami PVE a PVE SCs bez statisticky signifikantního rozdílu. U skupiny PVE byl medián OS 3,3 roku. Pro skupinu PVE bylo OS 1. rok 84,5 %, 3. rok 59,4 %, 5. rok 6,7-14,7 % (odhadované OS). U PVE SCs byl medián pro OS 1,4 roku. U PVE SCs bylo OS 1. rok 81,3 %, 3. rok 29,9 % - 49,9 % (odhadované OS), 5. rok 4,7-49,9 % (odhadované OS) (Gehan-Wilcoxon test,  $p= 0,7180$ ). Obdobné statisticky nesignifikantní výsledky pro OS a DFI jsme pozorovali i mezi skupinami PVE 30 a PVE SCs 30.

Významně rychlejší recidiva je prokazatelná u pacientů bez podané adjuvantní chemoterapie (Gehan-Wilcoxon test,  $p= 0,0086$ ) (obr. 4). Signifikantní výsledek jsme pozorovali i u skupiny PVE (Gehan-Wilcoxon test,  $p= 0,042$ ), ale u skupiny PVE SCs nebyl tento výsledek signifikantní pro malý počet pacientů.

## 4.2 OS, DFI a vztah k onkologické léčbě s 5-FU u pacientů s provedenými resekčními výkony

V této části výsledků jsme porovnávali skupiny PVE SCs, PVE a primárně resekabilních pacientů. Mezi sledovanými skupinami byl prokázán statisticky signifikantní rozdíl v DFI (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,0087$  a  $p=0,0314$ ). Pacienti s provedenou PVE (skupina PVE SCs a PVE dohromady) měli kratší DFI oproti pacientům s primárně provedenou resekci. DFI pro pacienty s provedenou PVE bylo 1. rok 33,2 %, 3. rok 6,3 %, 5. rok nedefinováno. U pacientů s primárně provedenou resekci bylo DFI 1. rok 60,1 %, 3. rok 28,6 %, 5. rok nedefinováno (obr. 5 a 6).



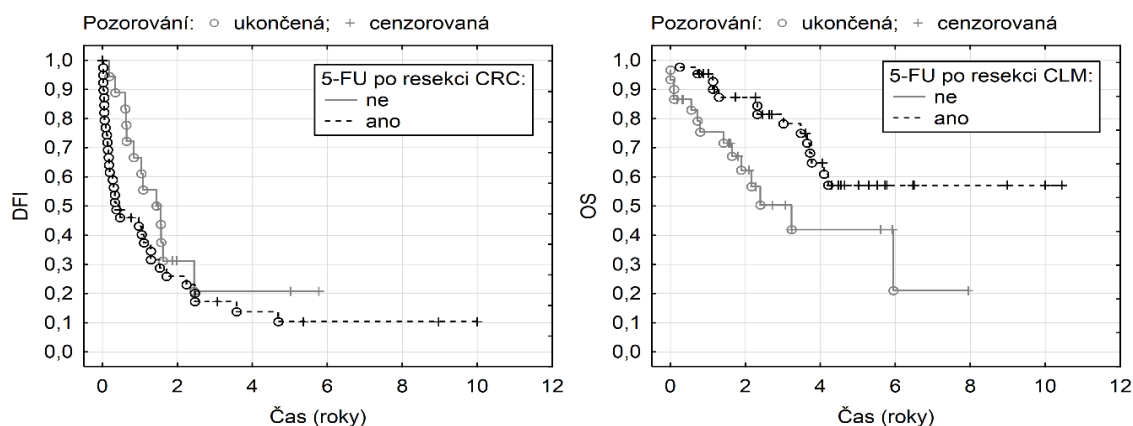
Obr. 5 (vlevo): DFI porovnání skupin PVE SCs a PVE (dohromady) versus primárně resekabilní pacienti (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,0087$ ; poměr rizika mezi sledovanými skupinami 0,4524)

Obr. 6 (vpravo): porovnání DFI mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resekabilních pacientů (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,0314$ ; poměr rizika mezi sledovanými skupinami 0,4524)

Statistická analýza neprokázala signifikantní rozdíl v OS mezi sledovanými skupinami (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,2128$  a  $p=0,4551$ ). U pacientů s provedenou PVE a PVE SCs bylo OS 1. rok 87,3 %, 3. rok 60,9 %, 5. rok nedefinováno. U primárně resekabilních pak bylo OS 1. rok 88,0 %, 3. rok 76,8 % a 5. rok 58,9 %

Statistická analýza prokázala, že pacienti (hodnoceno u všech pacientů) s provedenou resekci CLM měli lepší DFI, pokud měli po resekci primárního CRC podanou adjuvantní chemoterapii s 5-FU (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,0228$ ) (obr. 7). Data

pro OS byla statisticky nevýznamná (Gehan-Wilcoxon test,  $p= 0,0506$ ). Podání 5-FU v rámci onkologické léčby po resekci CLM bylo statisticky nevýznamné pro DFI (Gehan-Wilcoxon test,  $p= 0,9126$ ), ale bylo spojeno s delším OS (Gehan-Wilcoxon test,  $p= 0,0116$ ) (obr. 8).



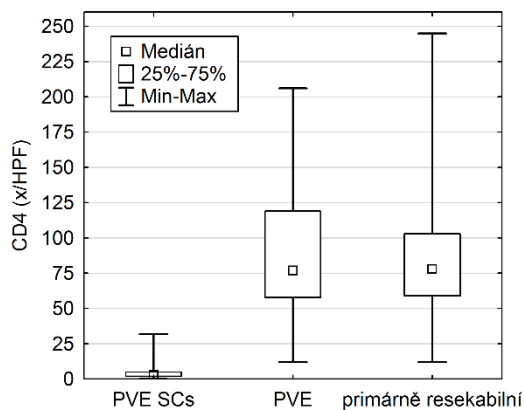
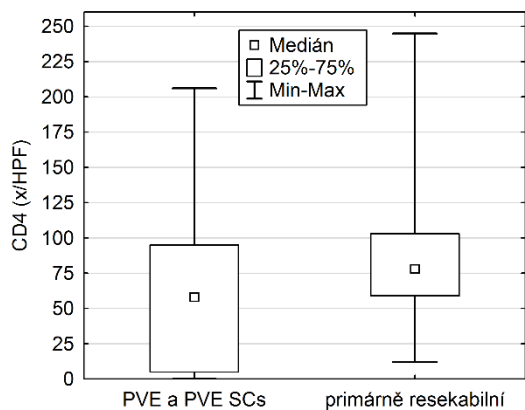
Obr. 7 (vlevo): porovnání DFI u pacientů po resekci jater v závislosti na podání adjuvantní léčby s 5-FU po resekci primárního CRC (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,0228$ , poměr rizika mezi sledovanými skupinami 1,6187)

Obr. 8 (vpravo): OS u pacientů s podanou adjuvantní onkologickou léčbou po resekci CLM (Gehan-Wilcoxon test,  $p= 0,0116$ ; poměr rizika mezi sledovanými skupinami 0,5418)

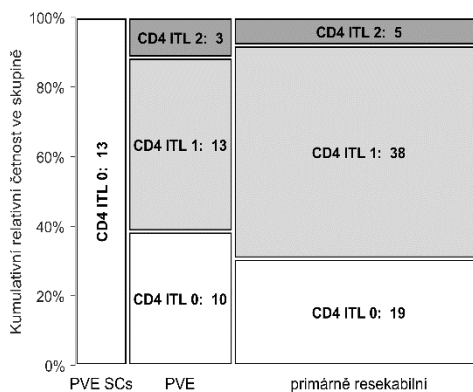
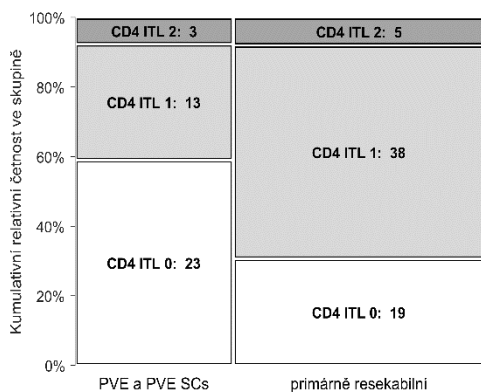
### 4.3 Výsledky stanovení TILs

#### Zastoupení jednotlivých TILs mezi sledovanými skupinami

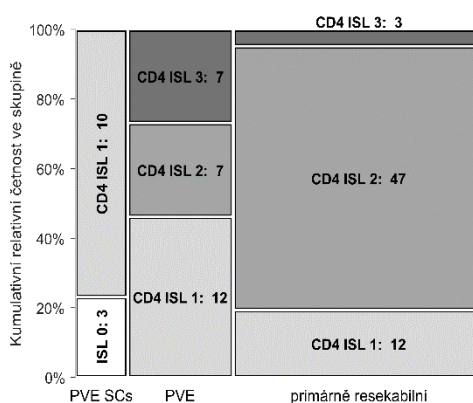
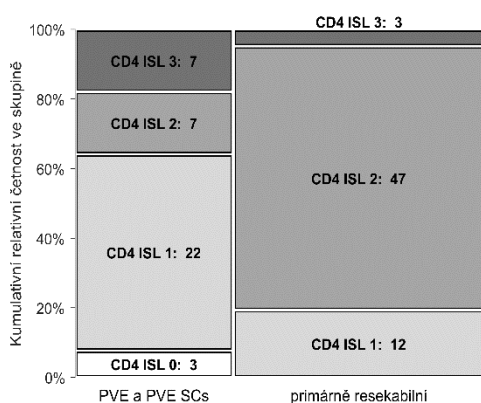
Při stanovení infiltrace  $CD4^+$  lymfocytů u pacientů s resekcí pro CLM byl mezi skupinami pozorován významný rozdíl ve všech sledovaných parametrech - v počtu  $CD4^+$  buněk v HPF (Mann-Whitney U test,  $p= 0,0126$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p < 0,0001$ ) (obr. 9 a 10), ITL (Chí kvadrát test,  $p= 0,0132$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p= 0,0001$ ) (obr. 11 a 12), ISL (Chí kvadrát test,  $p= 0,0016$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p < 0,0001$ ) (obr. 13 a 14), PTL (Chí kvadrát test,  $p= 0,009$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,0059$ ) (obr. 15 a 16) a Crohn like infiltraci (Chí kvadrát test,  $p= 0,0087$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p= 0,0002$ ) (obr. 17 a 18). Jak dokazují přiložené grafy, je infiltrace  $CD4^+$  lymfocyty významně nižší u skupiny PVE SCs. V případě PTL jsou patrné statisticky významně nižší hodnoty  $CD4^+$  lymfocytů u skupiny PVE SCs a PVE.



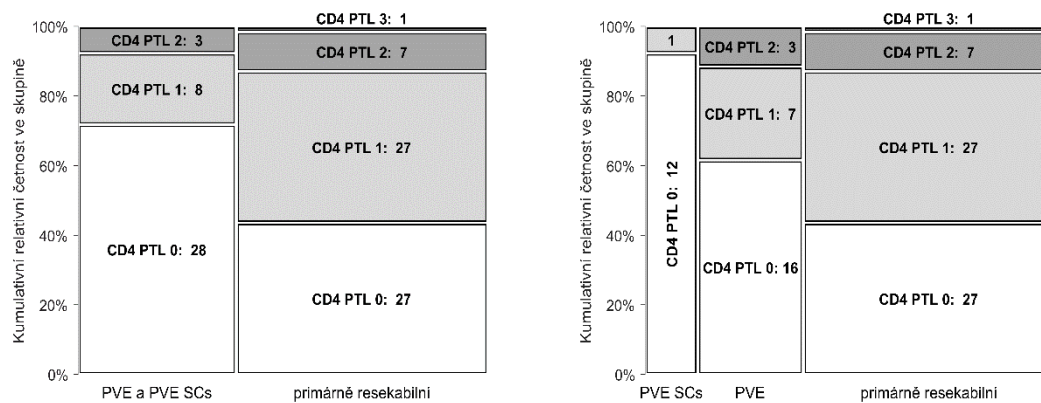
Obr. 9 a 10: zastoupení CD4<sup>+</sup>buněk v HPF mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resekalibilních pacientů (Mann-Whitney U test,  $p = 0,0126$  a Kruskal-Wallis ANOVA  $p < 0,0001$ )



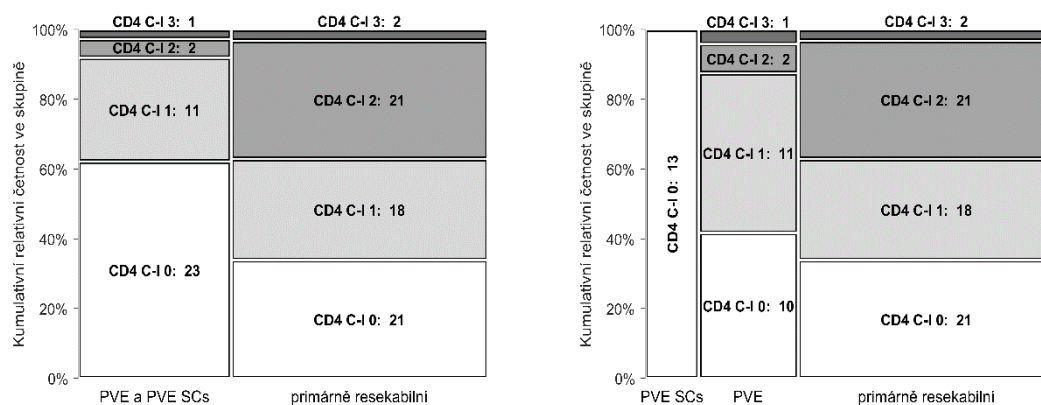
Obr. 11 a 12: zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk ITL mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resekalibilních pacientů (Mann-Whitney U test,  $p = 0,0132$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p = 0,0001$ )



Obr. 13 a 14: zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk v ISL mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resekalibilních pacientů (Chí kvadrát test,  $p = 0,0016$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p < 0,0001$ )

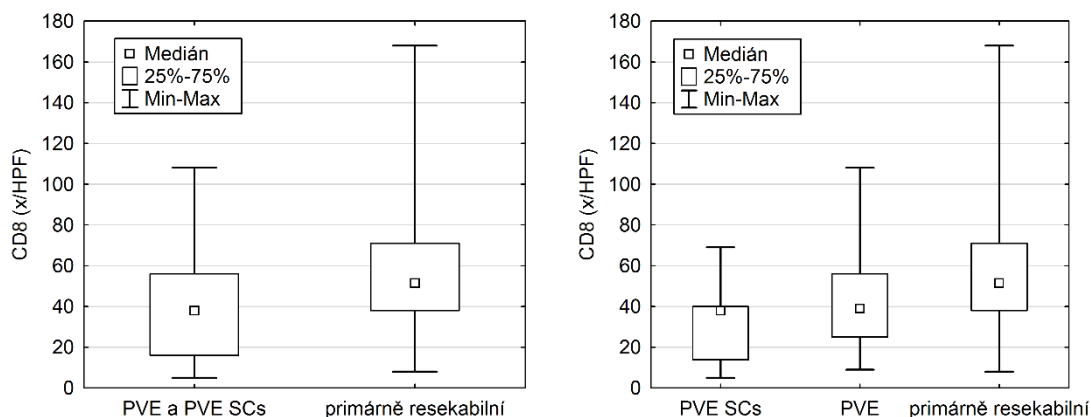


Obr. 15 a 16: zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk v PTL mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resekalibilních pacientů (Chí kvadrát test, p= 0,0090 a Kruskal-Wallis ANOVA, p=0,0059)



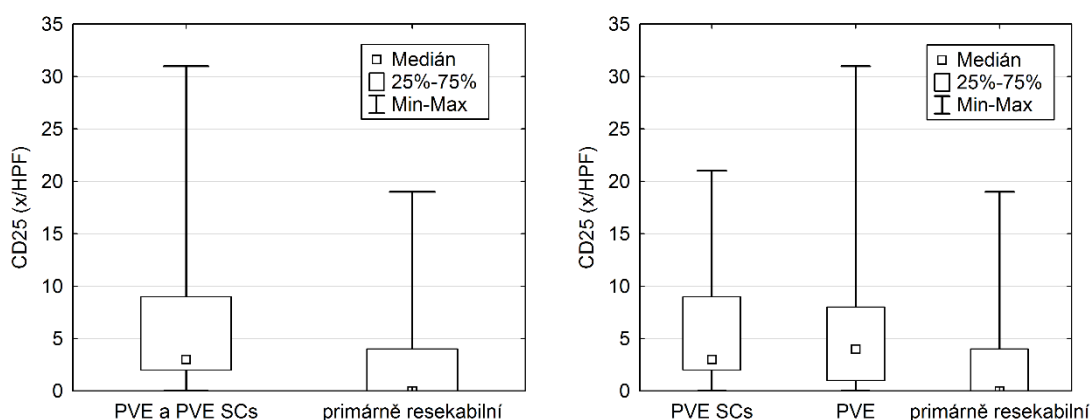
Obr. 17 a 18: zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk v Crohn like infiltraci mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resekalibilních pacientů (Chí kvadrát test, p= 0,0087 a Kruskal-Wallis ANOVA, p= 0,0002)

Při statistické analýze infiltrace CLM CD8<sup>+</sup> lymfocyty byl pozorován statisticky signifikantní výsledek pouze u počtu CD8<sup>+</sup> v HPF (Mann-Whitney U test, p= 0,0001 a Kruskal-Wallis ANOVA, p=0,0046) (obr. 19 a 20). Ostatní výsledky nebyly statisticky signifikantní. Vyšší infiltrace CD8<sup>+</sup> lymfocyty byla pozorována u pacientů primárně operabilních. Semikvantitativní hodnocení infiltrace CLM CD8<sup>+</sup> lymfocyty vyšlo bez statisticky signifikantních výsledků.

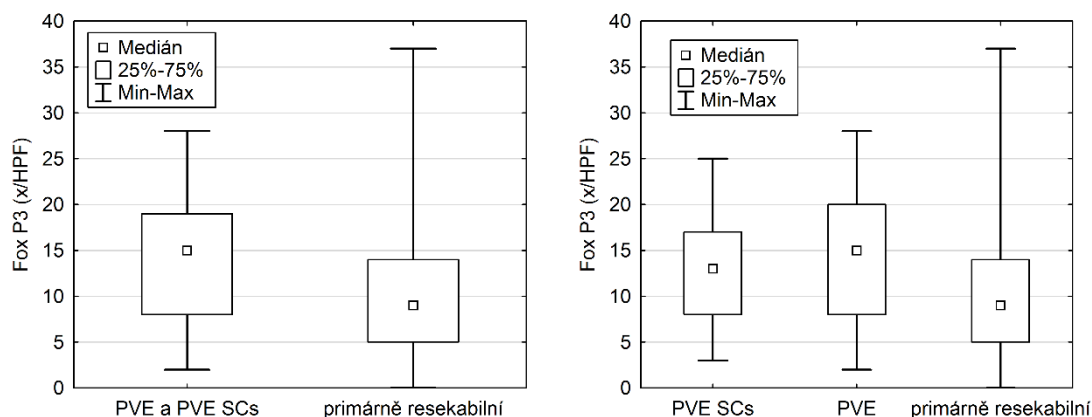


Obr. 19 a 20: zastoupení CD8<sup>+</sup> buněk v HPF mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resektabilních pacientů (Mann-Whitney U test,  $p=0,0001$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,0046$ )

Statistická analýza prokázala významně nižší zastoupení T reg ve skupině primárně resektabilních pacientů a to v celkovém počtu CD25<sup>+</sup> lymfocytů na HPF (Mann-Whitney U test,  $p=0,0019$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,0080$ ) (obr. 21 a 22) a počtu FoxP3<sup>+</sup> lymfocytů na HPF (Mann-Whitney U test,  $p=0,014$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,0468$ ) (obr. 23 a 24). Semikvantitativní hodnocení infiltrace CLM T reg neprokázalo statisticky významné výsledky.



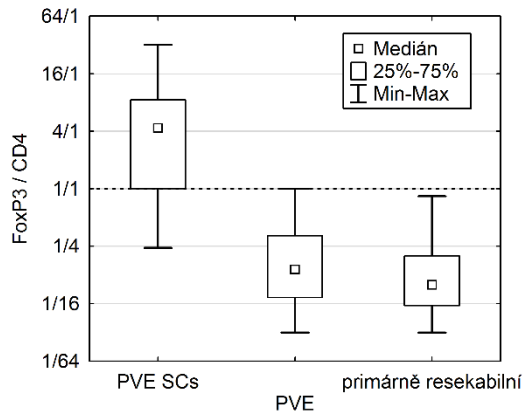
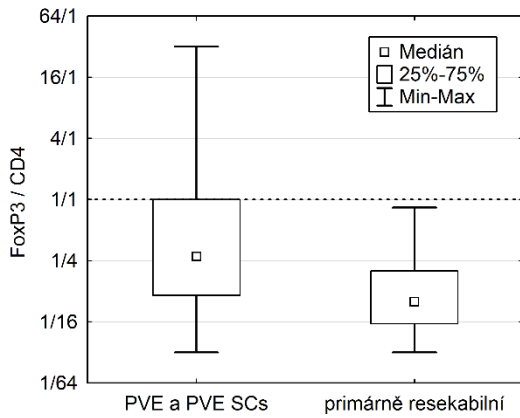
Obr. 21 a 22: zastoupení CD25<sup>+</sup> buněk v HPF mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resektabilních pacientů (Mann-Whitney U test,  $p=0,0019$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,0080$ )



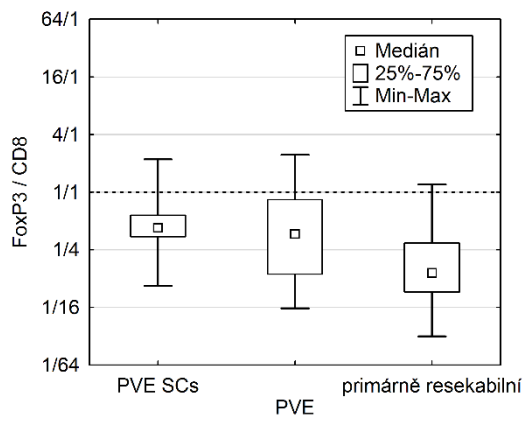
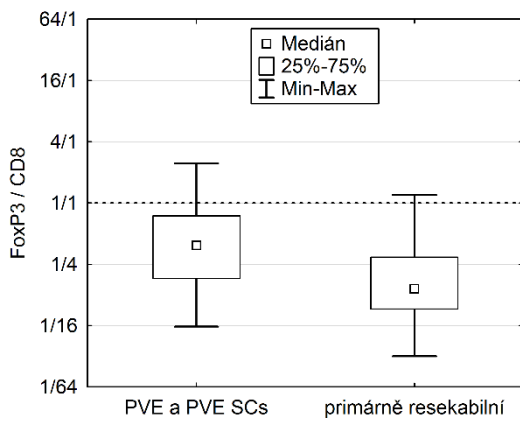
Obr. 23 a 24: zastoupení FoxP3<sup>+</sup> buněk v HPF mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resekovatelních pacientů (Mann-Whitney U test,  $p=0,014$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,0468$ )

Infiltrace CLM NKs (buňky CD57<sup>+</sup>) byla nízká u všech skupin a byla bez statisticky signifikantních rozdílů (Mann-Whitney U test,  $p=0,0866$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,1838$ ). Bez statisticky signifikantních rozdílů byla i infiltrace DCs (buňky CD86<sup>+</sup>) (Mann-Whitney U test,  $p=0,097$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,2052$ ). Taktéž stanovení granzymu B (Mann-Whitney U test,  $p=0,704$ ) a serpinů (Mann-Whitney U test,  $p=0,439$ ) neprokázalo statisticky signifikantní rozdíly mezi sledovanými skupinami.

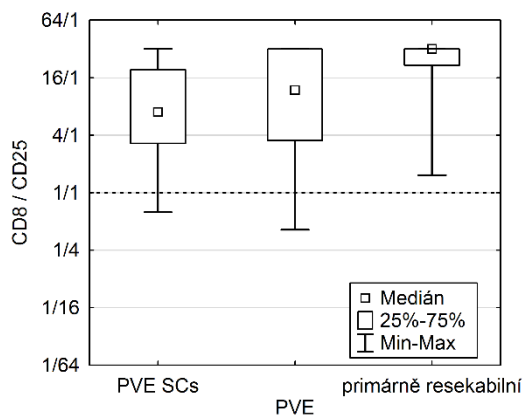
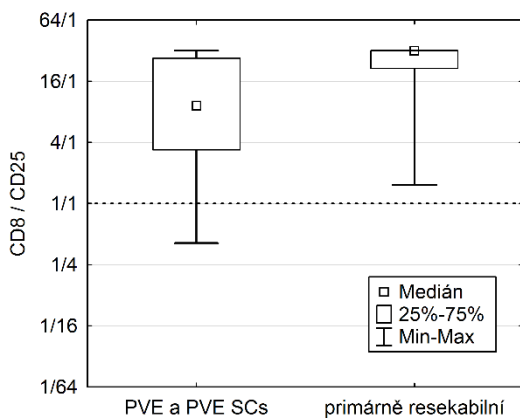
Při stanovení poměrů jednotlivých skupin TILs mezi skupinami PVE SCs, PVE a primárně resekovatelními pacienty, prokázala statistická analýza významný rozdíl u poměru buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> (Mann-Whitney U test,  $p<0,0001$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p<0,0001$ ) (obr. 25 a 26), FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Mann-Whitney U test,  $p<0,0001$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,0001$ ) (obr. 27 a 28), CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> (Mann-Whitney U test,  $p=0,0001$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p<0,0001$ ) (obr. 29 a 30), CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> (Mann-Whitney U test,  $p=0,0001$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,0001$ ) (obr. 31 a 32), FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> (Mann-Whitney U test,  $p=0,0120$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,0359$ ) (obr. 33 a 34). U poměru CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> byl signifikantní rozdíl pozorován až při porovnání PVE SCs proti PVE a primárně resekovatelním pacientům (Mann-Whitney U test,  $p=0,8161$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p<0,0001$ ) (obr. 35 a 36). Z následujících grafů je patrné, že u skupin s PVE a především u skupiny PVE SCs převažuje vyšší zastoupení T reg.



Obr. 25 a 26: poměr buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> u jednotlivých sledovaných skupin (Mann-Whitney U test,  $p < 0,0001$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p < 0,0001$ )

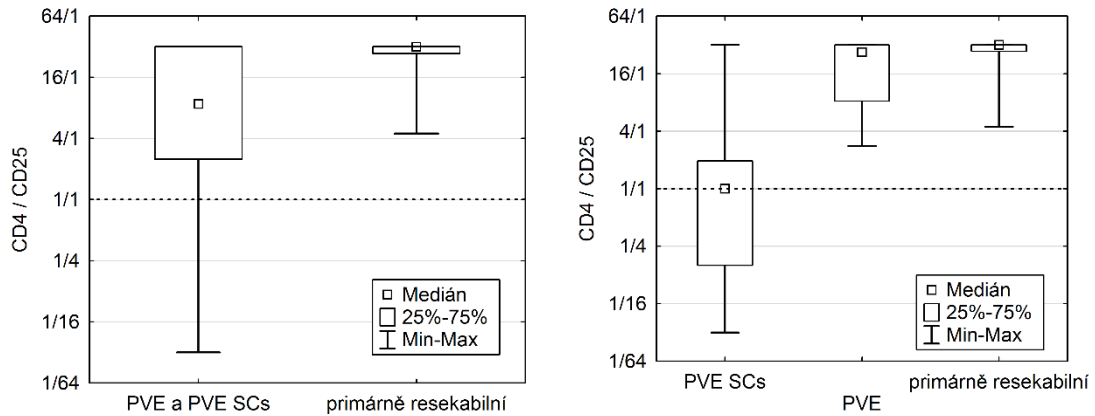


Obr. 27 a 28: poměr buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> u jednotlivých sledovaných skupin (Mann-Whitney U test,  $p < 0,0001$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p < 0,0001$ )

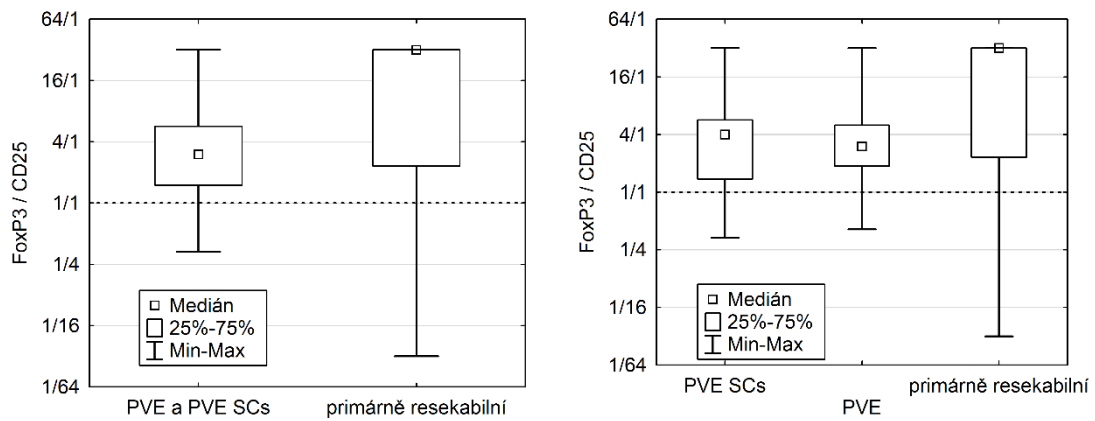


Obr. 29 a 30: poměr buněk CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> u jednotlivých sledovaných skupin (Mann-Whitney U test,  $p = 0,0001$  a Kruskal-Wallis ANOVA,  $p < 0,0001$ )

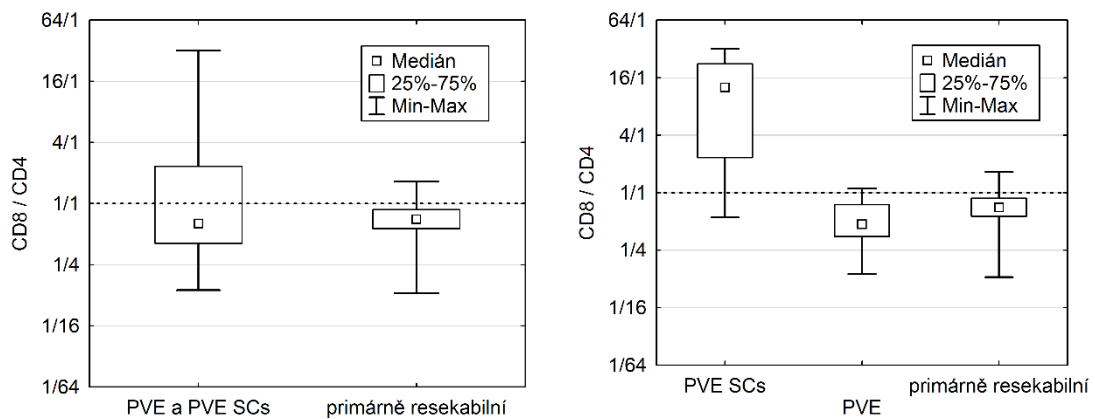




Obr. 31 a 32: poměr buněk CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> u jednotlivých sledovaných skupin (Mann-Whitney U test, p= 0,0001 a Kruskal-Wallis ANOVA, p= 0,0001)



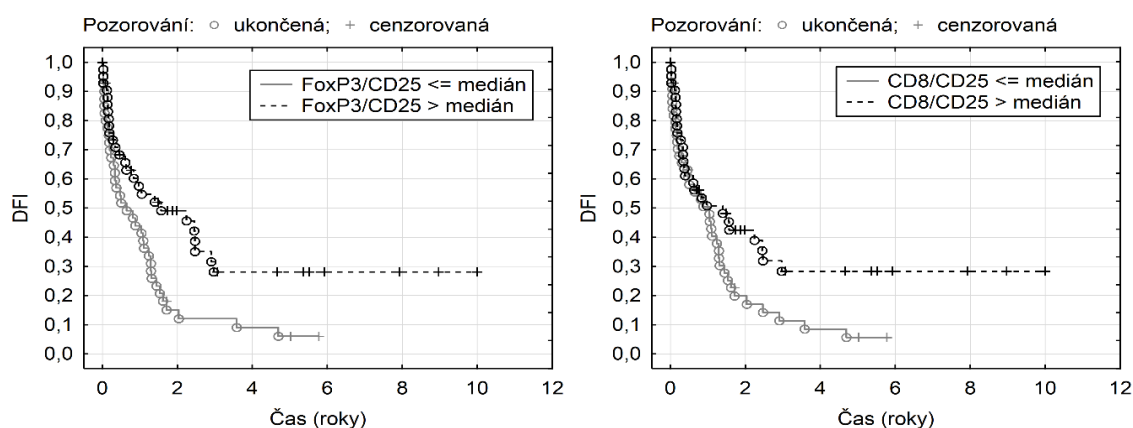
Obr. 33 a 34: poměr buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> u jednotlivých sledovaných skupin (Mann-Whitney U test, p= 0,0120 a Kruskal-Wallis ANOVA, p= 0,0359)



Obr. 35 a 36: poměr buněk CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> u jednotlivých sledovaných skupin (Mann-Whitney U test, p= 0,8161 a Kruskal-Wallis ANOVA, p=< 0,0001)

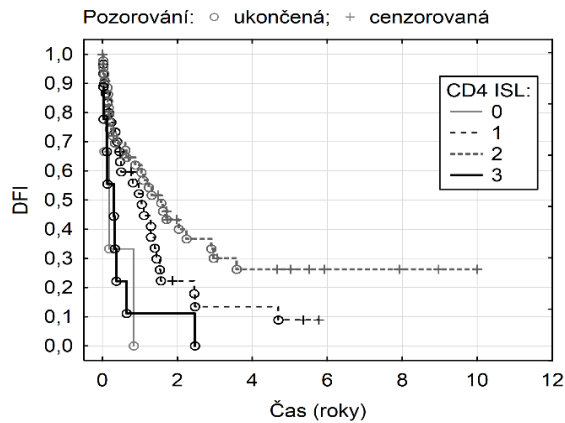
## Vztah TILs k DFI a OS

Nejprve byl zkoumán vztah TILs k DFI a OS společně u všech skupin - pacienti po operačním výkonu pro CLM ve skupinách PVE SCs, PVE a primárně resektabilních dohromady. Statisticky signifikantní rozdíl byl pozorován u poměru buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> (Coxův model,  $p=0,0234$ ) pro DFI a na hranici statistické významnosti jsme pozorovali poměr buněk CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> (Coxův model,  $p=0,0499$ ) pro DFI. Pro OS nevyšel žádný výsledek statisticky signifikantně. U poměrů buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> byl statistickou analýzou stanoven poměr rizika recidivy. Při zdvojnásobení hodnoty poměru buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> klesá riziko recidivy na 87,5 % (Coxův model,  $p=0,0234$ ) (obr. 37). U poměru buněk CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> klesá riziko recidivy na 85,9 % při zdvojnásobení hodnoty poměru (Coxův model,  $p=0,0499$ ) (obr. 38). Vícevýběrový test prokázal statisticky signifikantní výsledek vztahu CD4<sup>+</sup> buněk ISL infiltrace a DFI (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,0179$ ) (obr. 39).



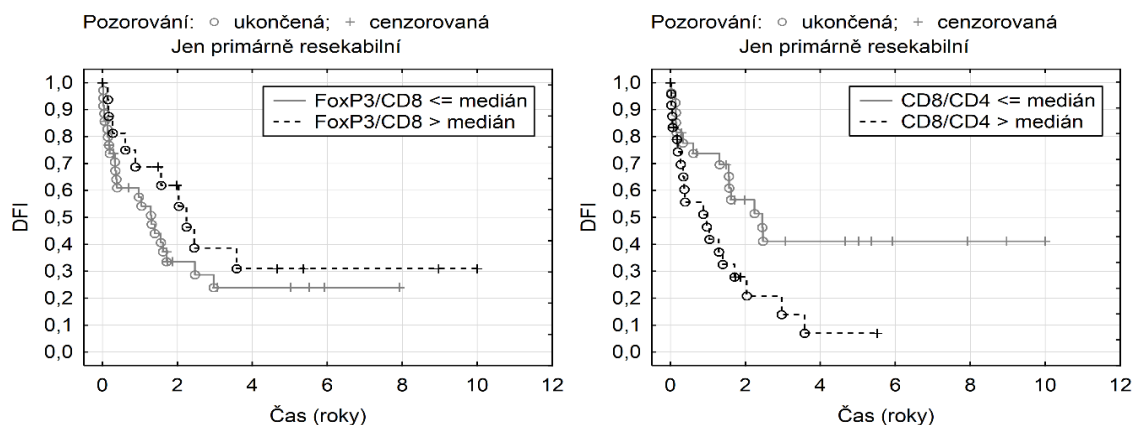
Obr. 37 (vlevo): vztah poměru buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> k DFI (Gehan-Wilcoxon test  $p=0,0412$ ; poměr rizika mezi skupinami 0,5075)

Obr.38 (vpravo): vztah poměru buněk CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> k DFI (Gehan-Wilcoxon test  $p=0,2140$  poměr rizika mezi skupinami 0,6051)



Obr.39: vztah CD4<sup>+</sup>buňek u ISL infiltrace k DFI při společném hodnocení všech sledovaných skupin (Gehan-Wilcoxon test, p= 0,0179)

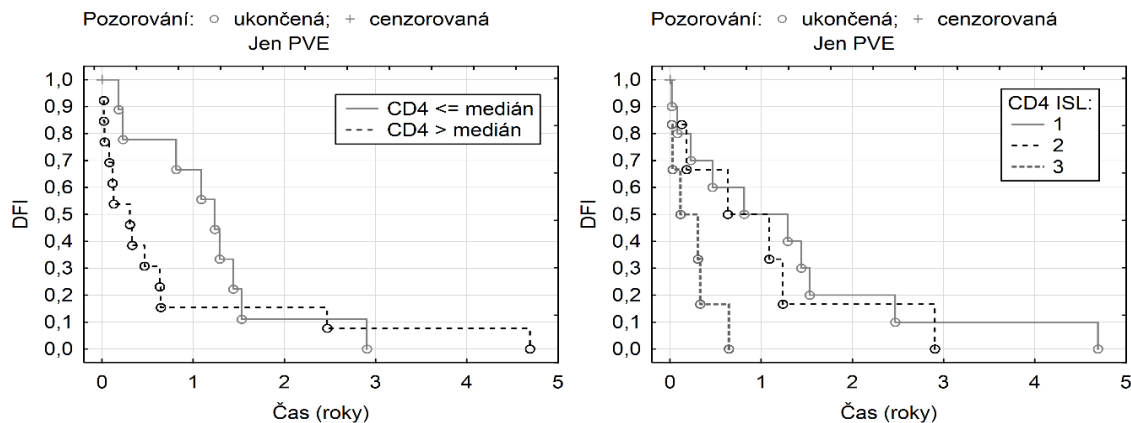
U skupiny pacientů primárně resekováných pro CLM jsme ve vztahu k DFI pozorovali statisticky signifikantní rozdíl u poměru buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Coxův model, p= 0,0255) a CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> (Coxův model, p= 0,0043). Ve vztahu k OS nebyl získán signifikantní výsledek. Dále byly stanoveny poměry rizika recidivy pro poměry buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>. U poměru buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> klesá riziko recidivy o 27,9 % na 72,1 % při zdvojnásobení hodnoty poměru (Coxův model, p=0,022) (obr. 40). Pro poměr buněk CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> platí, že při zdvojnásobení hodnoty poměru stoupá riziko recidivy 2,6x (Coxův model, p= 0,0043) (obr. 41).



Obr. 40 (vlevo): vztah poměru buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> k DFI u pacientů primárně resekováných pro CLM (Gehan-Wilcoxon test p= 0,1531; poměr rizika mezi skupinami 0,6483)

Obr. 41 (vpravo): vztah poměru buněk CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> k DFI u pacientů primárně resekovaných pro CLM (Gehan-Wilcoxon test  $p=0,0439$ ; poměr rizika mezi skupinami 2,3472)

Další analyzovanou skupinou byla skupina pacientů, kteří podstoupili resekci CLM po předchozí PVE. Zde statistická analýza prokázala signifikantní vztah k DFI u počtu CD4<sup>+</sup> buněk v HPF (Coxův model,  $p=0,0163$ ) a u ISL infiltrace CD4<sup>+</sup> buňkami (Coxův model,  $p=0,0335$ ). Ve vztahu k OS nebyl prokázán statisticky signifikantní výsledek. U signifikantních výsledků byl opět stanoven poměr rizika recidivy onemocnění. Při zvýšení CD4<sup>+</sup> buněk o 1 bod v HPF stoupá riziko recidivy o 1,2 % (Coxův model,  $p=0,0163$ ) (obr. 42). Při zvýšení ISL infiltrace CD4<sup>+</sup> buňkami o jeden stupeň semikvantitativního hodnocení stoupá riziko recidivy téměř na dvojnásobek (Coxův model,  $p=0,0335$ ) (obr. 43).



Obr. 42 (vlevo): vztah počtu CD4<sup>+</sup> buněk v HPF k DFI u pacientů resekovaných pro CLM po PVE (Gehan-Wilcoxon test  $p=0,0398$ ; poměr rizika mezi sledovanými skupinami 1,723)

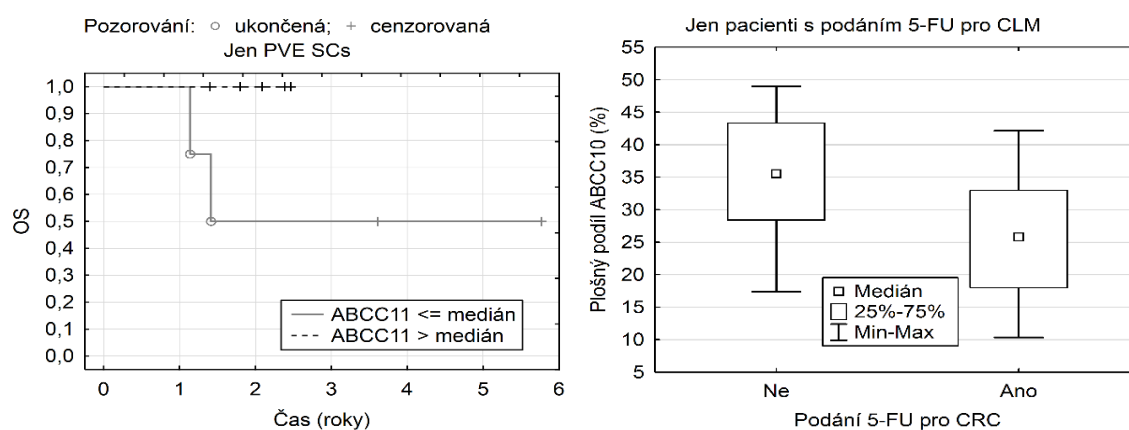
Obr. 43 (vpravo): vztah ISL infiltrace CD4<sup>+</sup> buňkami k DFI u pacientů resekovaných pro CLM po PVE (Gehan-Wilcoxon test  $p=0,1288$ )

Statistická analýza DFI a OS u skupiny pacientů, kteří podstoupili resekci jater po předchozí PVE s aplikací SCs prokázala významný vztah CD86<sup>+</sup> buněk k OS ( $p=0,0230$ ). Poměr rizika byl u CD86<sup>+</sup> buněk stanoven na 17 % při zvýšení CD86<sup>+</sup> buněk o jeden bod semikvantitativního hodnocení. Při vícevýběrovém hodnocení však nebylo možné provést bližší stanovení z důvodu malého počtu pacientů a získaný výsledek tak nelze považovat za validní.

#### 4.4 Stanovení ABCC10 a ABCC11

Porovnání plošných podílů ABCC10 a ABCC11 neprokázalo statisticky signifikantní rozdíl mezi sledovanými skupinami (Kruskal-Wallis ANOVA,  $p=0,1829$  a  $p=0,1856$ ).

Mezi pacienty zařazenými do studie nebyl pozorován statisticky signifikantní výsledek ve vztahu ABCC10 a ABCC11 k DFI a OS. Mezi jednotlivými skupinami bylo možné pozorovat významný vztah ABCC11 k OS u skupiny PVE SCs (Coxův model,  $p=0,0304$ ). Při bližším statistickém vyhodnocení vztahu ABCC11 a OS pomocí dvouvýběrového testu nevychází výsledek u skupiny PVE SCs jako statisticky významný (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,1309$ ). Důvodem je malý počet pacientů v dané skupině a výsledek tak může být falešně pozitivní (obr. 44).



Obr. 44 (vlevo): Vztah ABCC11 k OS u skupiny PVE SCs (Gehan-Wilcoxon test,  $p=0,1309$ )

Obr. 45 (vpravo): vztah plošného podílu ABCC10 (Mann-Whitney U test,  $p=0,021$ ) k léčbě 5-FU.

Ve studii byl zkoumán i vliv podaného 5-FU na plošný podíl ABCC10 a ABCC11. Podíl ABCC10 u pacientů po resekci CLM (hodnoceny všechny skupiny dohromady) byl vyšší u těch pacientů, kteří neměli po resekci primárního CRC do léčby zařazen 5-FU (Mann-Whitney U test,  $p=0,0217$ ) (obr. 45). U ABCC11 byl výsledek za hranicí statistické významnosti (Mann-Whitney U test,  $p=0,1123$ ). Při bližším porovnání pomocí vícefaktorové analýzy rozptylu jsou výsledky jak u ABCC10 tak i u ABCC11 těsně za hranicí statistické významnosti (vícefaktorová ANOVA,  $p=0,0542$  a  $p=0,0540$ ).

## 5 Diskuze

### 5.1 Diskuze k efektu PVE a PVE s aplikací SCs na růst FLRV a CLM

V této studii byl nárůst FLRV mezi sledovanými skupinami bez statisticky významných rozdílů. Z výsledných dat však bylo možné sledovat trend většího růstu FLRV u skupiny pacientů s aplikovanými SCs. Tento trend je umocněn především u skupiny PVE SCs 30. Rychlejší nárůst FLRV byl popsán v dříve publikovaných studiích, které využily SCs ke stimulaci růstu FLRV [24, 25]. Tyto studie však byly provedeny na heterogenním souboru pacientů. Náš soubor zahrnoval pouze pacienty s CLM. V naší studii byli k PVE s aplikací SCs indikováni i pacienti po prolongovaném podávání onkologické léčby. I tato prolongovaná onkologická léčba může mít negativní vliv na jaterní regeneraci a přispívá i k pomalejšímu růstu FLRV [45]. To může být i jedním z důvodů, proč jsme v naší studii statisticky významného růstu FLRV nedosáhli. Limitem této studie je malý počet pacientů, kteří byli do studie zařazeni. PVE s aplikací SCs je metoda vhodná jen pro malou skupinu pacientů s nízkým vstupním FLRV nebo kombinací nízkého FLRV a prolongovaného podávání onkologické léčby. Studie zcela jistě potřebuje vyhodnocení na větších skupinách pacientů.

Prozatím žádná z výše citovaných studií [24,25] se nezmiňuje o progresi maligního onemocnění po PVE a aplikaci SCs. V této studii je na provedených CT scanech a volumetriích metastáz patrná progresie metastáz u všech sledovaných skupin. Růst však nebyl mezi porovnávanými skupinami statisticky významný. V našem souboru pacientů tak aplikace SCs nevedla k rychlejší progresi metastáz oproti prosté PVE. Kombinace pomalé progresie růstu metastáz a urychleného FLRV je pro pacienty zcela klíčová, protože jim dává větší šanci podstoupit radikální resekcční výkon a snižuje procento explorativních výkonů [26]. V našem souboru pacientů bylo procento explorativních laparotomií výrazně nižší u pacientů s aplikovanými SCs. Pozoruhodný je i fakt významné progresie extrahepatálních metastáz u skupiny s prostou PVE. Využití SCs v léčbě maligního onemocnění nese určité riziko diseminace nádorového onemocnění nejen do jater, ale i dalších orgánů, např. plic [46]. V naší studii jsme však toto neprokázali, naopak extrahepatální diseminace byla častější u skupiny s prostou PVE, a to statisticky významně. V současné chvíli nejsme schopni tento efekt blíže vysvětlit.

Malé soubory pacientů mohou být jedním z důvodů, ale daný fakt bude cílem našeho dalšího výzkumu se zaměřením na eventuální protektivní efekt SCs.

## **5.2 Diskuze k DFI, OS a vztahu k onkologické léčbě po resekcích výkonech u pacientů po PVE, po PVE s aplikací SCs a pacientů primárně resekalibilních**

Hodnocení DFI a OS je v našem malém souboru pacientů po PVE a PVE s aplikací SCs obtížné vzhledem k velkému počtu statistických cenzorů. Jen malé množství pacientů jsme byli schopni sledovat po dobu delší než 3 roky. Proto v některých případech musíme uvádět pouze odhadované DFI a OS, nebo nejsme schopni DFI a OS definovat. Při porovnání pouze pacientů ze skupin PVE a PVE SCs jsme nepozorovali statisticky signifikantní rozdíly, jak v DFI, tak i v OS. Většina pacientů měla brzkou recidivu. Uvedená data svědčí pro velmi špatnou prognózu pacientů, kteří byli do studie zařazeni. Z naší studie vyplývá i zcela nezpochybnitelný efekt onkologické léčby po resekcím výkonu. Při porovnání dat mezi skupinami s provedenou PVE a primárně resekalibilními pacienty je významný rozdíl u DFI. Je diskutabilní, jestli krátká doba DFI u pacientů po PVE je dána pokročilejší fází maligního onemocnění. V řadě případů jsou k PVE indikováni pacienti s bilobárním postižením nebo víceložiskovým postižením jater. Tato samotná postižení jsou významným negativním prognostickým faktorem, ale zároveň nejsou v dnešní době považována za kontraindikace chirurgických výkonů [7, 8]. Časná progresse onemocnění je pak závislá především na dodržení R0 resekce. Dalším důvodem časně recidivy je i mikrometastatické postižení, které není v době operace patrné [3]. Využití neoadjuvantní chemoterapie prodlužuje dobu do progresse onemocnění po resekcii CLM a snižuje i výskyt mikrometastatického postižení [47]. U pacientů s PVE je však v době přípravy pacienta k resekcím výkonu, která může trvat i několik měsíců, riziko vzniku mikrometastatického postižení, které následně může zkrátit DFI po resekcii CLM. Tím se opět potvrzuje pravidlo nezbytné kombinace chirurgické a onkologické léčby a především její správné načasování ve smyslu neoadjuvantní terapie, resekce a pooperační chemoterapie.

V případě, že pacienti podstoupí resekci jater pro CLM po předchozí přípravě s PVE nebo PVE s aplikací SCs dosahují stejných hodnot OS. Porovnání skupin s PVE a PVE SCs neprokázalo statisticky signifikantní rozdíl v OS. Oproti významnému rozdílu v DFI jsme

v této studii neprokázali statistický významný rozdíl v OS mezi pacienty, kteří podstoupili PVE, a pacienty kteří byli primárně resekabilní. Díky dnešním možnostem paliativní léčby jsme schopni nabídnout i pacientům s časnou recidivou CLM alternativní možnosti jak prodloužit OS. U pacientů s recidivou v první době zvažujeme reoperaci s resekcí výkonem. U pacientů po rozsáhlých resekcích na játrech jsme obvykle omezeni malým FLRV. U těchto pacientů se pak snažíme využívat destrukce CLM pomocí radiofrekvenční ablace (především perkutánních CT navigovaných výkonů), transarteriální chemoembolizace a paliativní chemoterapií [48]. I v naší studii jsme prokázali, že podání 5-FU po resekcii jak primárního CRC, tak i CLM mělo významný vztah k DFI a OS.

Provedení PVE nabízí pacientům s dříve inoperabilním postižením jater možnost dosáhnout operabilního stádia a následně i OS, které je srovnatelné s pacienty primárně resekabilními. Aplikace SCs v naší studii přispěla k vyššímu procentu dosažených resekcí výkonů a měla nižší výskyt extrahepatální progresse onemocnění.

### **5.3 Diskuze k TILs**

K predikci prognózy u pacientů s maligním onemocněním nám v současné době slouží TNM klasifikace. U CRC však na jejím podkladě může dojít k podstázování pacientů, které má za následek nepodání adjuvantní onkologické léčby s následnou recidivou onemocnění. Proto jsou intenzivně zkoumány nové faktory, které by tyto, do daného stádia obtížně zařaditelné pacienty, odhalily. Jednou z možností je i imunoediting se stanovením TILs. U pacientů s CRC je již uveřejněna řada studií, ale u pacientů s CLM je prozatím provedeno malé množství studií, které by ozřejmily vztahy mezi IS a CLM. V naší studii nás zajímalo i to, zdali je provedení PVE a PVE s aplikací SCs schopné zastoupení TILs ovlivnit (např. použitím embolizačního materiálu a případně i vliv aplikovaných SCs).



## Diskuze k zastoupení jednotlivých TILs mezi sledovanými skupinami

### *CD8<sup>+</sup> lymfocyty*

Při porovnání zastoupení TILs mezi jednotlivými skupinami je patrné, že u pacientů po PVE s aplikací SCs a u pacientů po samotné PVE byl pozorován nižší počet CD8<sup>+</sup> buněk v HPF oproti pacientům primárně operabilním. Semikvantitativní hodnocení pak vyšlo bez statisticky signifikantních rozdílů.

Zvýšení CD8<sup>+</sup> buněk jako přímých cytotoxických efektorů je obecně spojováno s prognostickým benefitem [49]. U našich sledovaných skupin je patrné, že primárně operabilní pacienti mají vyšší zastoupení CD8<sup>+</sup> buněk oproti pacientům s provedenou PVE. Předpokládáme, že tento stav je dán pokročilostí nádorového onemocnění. Pacienti, kteří byli indikováni k PVE, mají pokročilejší nález CLM. Vyšší zastoupení CD8<sup>+</sup> buněk u primárně operabilních pacientů tak může svědčit o schopnosti organismu ještě vyvolat cytotoxickou reakci proti CLM, zatím co pacienti indikovaní k PVE již danou schopnost ztratili. Tuto myšlenku podporují i výsledky Gulubové, která ve své studii pozorovala nižší zastoupení TILs a tedy i CD8<sup>+</sup> lymfocytů u pacientů s vícečetnými CLM [50]. Samotná přítomnost CD8<sup>+</sup> lymfocytů však ještě nemusí znamenat cytotoxický efekt. Nejprve je nutná tumor specifická aktivace CD8<sup>+</sup> buněk. Tato aktivace je dána kooperací CD8<sup>+</sup> lymfocytů s CD4<sup>+</sup> lymfocyty migrujícími do tumorózní tkáně. U CRC je vysoká aktivace CD8<sup>+</sup> buněk přítomna u nízkých stádií CRC a nízká aktivace u vysokých stádií onemocnění [51]. U CLM je tento efekt prozatím neověřen. Lze předpokládat, že tento efekt nastává i v případě CLM, kdy s pokročilostí onemocnění klesá aktivace, a tedy i cytotoxický efekt CD8<sup>+</sup> lymfocytů. V našem případě pro nízkou aktivaci CD8<sup>+</sup> lymfocytů svědčí i nízká hodnota u zastoupení granzymu B, která se navíc nelišila mezi sledovanými skupinami.

Vzhledem k tomu, že zastoupení CD8<sup>+</sup> lymfocytů bylo významně nižší jak u skupiny PVE, tak i u skupiny PVE SCs oproti primárně resekabilním pacientům, nepředpokládáme, že by tento stav byl způsoben podáním SCs. Na rozdíl od jiných studií jsme neprokázali odlišné zastoupení CD8<sup>+</sup> buněk ve vztahu k infiltraci konkrétní části tumorózní tkáně. Brunner udává význam PTL CD8<sup>+</sup> ve stromatu blízko tumoru a ve fibrotické kapsule kolem tumoru [52]. Berthel ve své analýze udává, že k prodloužení OS

přispívají především CD8<sup>+</sup> lymfocyty lokalizované ve vzdálenosti 20-30  $\mu\text{m}$  od hranice metastázy [53]

V této studii jsme neprokázali statisticky signifikantní vztah CD8<sup>+</sup> lymfocytů k DFI a OS u žádné ze sledovaných skupin. Zde je naše studie v kontrastu s dříve publikovanými výsledky jiných autorů. Tyto studie však byly provedeny na větším vzorku pacientů, které byly až dvojnásobné při porovnání s naším souborem [34, 35]. O tom může svědčit např. vztah CD8<sup>+</sup> k DFI u pacientů primárně resekovaných, které vyšlo těsně za hranicí statistické významnosti. Je pravděpodobné, že při vyšším počtu pacientů bychom již získali statisticky signifikantní výsledek. Jako další faktor, který mohl negativně ovlivnit vztah CD8<sup>+</sup> k DFI a OS, je již výše diskutovaná nízká aktivace CD8<sup>+</sup> lymfocytů.

### ***CD4<sup>+</sup> lymfocyty***

V naší studii jsme u CD4<sup>+</sup> buněk pozorovali významně nižší zastoupení v jejich celkovém počtu na HPF u všech pacientů s provedenou PVE (skupina PVE a PVE SCs dohromady) oproti pacientům s primární resekci. Obdobné rozdíly jsme mohli pozorovat i u semikvantitativního hodnocení, kde byly významné rozdíly v zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk v ITL, ISL, PTL a Crohn-like infiltraci. Při bližším rozboru je však patrné, že tyto rozdíly byly dány především nízkým zastoupením CD4<sup>+</sup> lymfocytů v HPF, ITL, ISL a Crohn like infiltraci ve skupině pacientů s podanými SCs po PVE. Pouze u PTL byly hodnoty CD4<sup>+</sup> nízké jak u skupiny PVE SCs, tak i u skupiny PVE v porovnání se skupinou primárně operabilních pacientů. V současné době, není jasné, jaké chování SCs vykazují po jejich aplikaci a průchodu jaterním cévním řečištěm a jaterní tkání. Jednou z možností je i průchod systémovým řečištěm. Zde pak cestou a. hepatica dextra mohou projít jaterním parenchymem s okludovanou větví portální žíly a ovlivnit i buňky přítomné v tomto laloku. SCs mají díky tvorbě velké škály cytokinů a růstových faktorů potenciál ovlivnit CD4<sup>+</sup> buňky. To potvrzují i experimentální studie provedené na myších, kde SCs z kostní dřeně (především MSCs) byly schopné potlačit aktivaci CD4<sup>+</sup> lymfocytů a vedly k navýšení a diferenciaci T lymfocytů v T reg [54]. V humánní medicíně tento efekt SCs stojí za zmírněním projevů reakce štěpu proti hostiteli [55]. V korelaci s naší studií lze tímto dějem vysvětlit nízké zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk a vyšší zastoupení T reg u pacientů

s podanými SCs po PVE. V případě nízkého zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk u pacientů s provedenou PVE je nutné zmínit i možnost ovlivnění tohoto stavu onkologickou léčbou. Correale popisuje, že u pacientů s pokročilým CRC podstupujících chemoterapii nebo chemoimunoterapii pozoroval vyšší zastoupení T reg (FoxP3<sup>+</sup>) buněk [56]. Jednou skupinou pacientů, kteří byli indikováni k PVE, byli i pacienti s prolongovanou chemoterapií. V tomto případě nemůžeme vyloučit ani efekt podané onkologické léčby, která mohla stimulovat diferenciaci CD4<sup>+</sup> lymfocytů do FoxP3<sup>+</sup> buněk.

Vyšší zastoupení CD4<sup>+</sup> lymfocytů ve skupinách s PVE a primárně resektabilních pacientů podporuje naši hypotézu o snaze organismu vyvolat stimulací CD8<sup>+</sup> buněk cytotoxickou reakci vůči tumoru. CD4<sup>+</sup> buňky lze rozdělit na Th1, Th2 a T reg. V případě Th1 a Th2 lymfocytů byl popsán rozdílný účinek těchto dvou podskupin na CRC. Zvýšené počty Th1 lymfocytů a jejich cytokinů byly stanoveny jako prognosticky příznivé faktory z hlediska progresu onemocnění z adenomu do CRC, ale i ve vztahu k lepšímu DFI [33]. Progresi onemocnění naopak podporují Th2 lymfocyty a jejich působky. Tento efekt je dán stimulačním efektem Th1 lymfocytů na CD8<sup>+</sup> lymfocyty a podporou jejich cytotoxické reakce [57]. V naší studii jsme prokázali významný negativní vztah CD4<sup>+</sup> lymfocytů k DFI u skupiny pacientů s provedenou PVE. CD4<sup>+</sup> buňky se zde projeví jako negativní prognostický faktor, protože jejich přítomnost zvyšovala riziko recidivy. Katz udává, že pacienti, kteří měli vysoké zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk, dosáhli kratšího OS. Tyto závěry svědčí spíše pro přítomnost Th2 lymfocytů, které mohou mít protumorigenní potenciál. Prozatím není jasné, jaký mechanismus rozhoduje o aktivaci protumorigenní nebo již výše zmiňované cytotoxické reakce. Vybrané nádorové buňky se mohou adaptovat na přítomnost CD4<sup>+</sup> buněk a využít jejich prostimulační potenciál [34]. Uvažuje se, že samotné mikroprostředí tumoru atrahuje CD4<sup>+</sup> buňky, které následně působí jako akcelerátor nádorového růstu [58].

### ***T regulační lymfocyty***

Ve výsledcích naší studie je patrné, že u pacientů s provedenou PVE (a to jak prostou PVE, tak i PVE s aplikací SCs) bylo vyšší zastoupení T reg (CD25<sup>+</sup> a Foxp3<sup>+</sup> buněk) v HPF. Semikvantitativní rozdělení bylo bez statisticky významných rozdílů. Z grafů

vyplývá, že zvýšení jak FoxP3<sup>+</sup>, tak i CD25<sup>+</sup> buněk v HPF bylo u všech pacientů s provedenou PVE bez statisticky signifikantního rozdílu mezi PVE a PVE SCs.

T reg jsou podskupinou CD4<sup>+</sup> buněk vykazující vysoký supresní potenciál na okolní buňky. Tento supresní efekt je dán konkrétním typem produkovaného cytokinu nebo růstového faktoru. Jedná se např. o IL 10 nebo TGF-β [59]. T reg produkující TGF-β potlačují funkci jak Th1 tak i Th2 lymfocytů. TGF-β však má i významný vliv na regeneraci hepatocytů. Zde je důležitým mitoinhibitor, který ukončuje dělení hepatocytů a je schopen navodit apoptózu hepatocytů [60]. Zvýšené hladiny T reg ve skupinách PVE a PVE SCs si vysvětlujeme jako důsledek provedení PVE. T reg produkující TGF-β podporují vyvolání apoptózy hepatocytů. Apoptóza je důležitým dějem u pacientů podstupujících PVE, kdy postupně dochází k atrofii laloku s okludovaným portálním řečištěm. Míra atrofie pak indukuje i míru kompenzatorní hypertrofie kontralaterálního jaterního laloku a podporuje růst FLRV.

Velmi diskutovaný je efekt T reg na progresi nádorového onemocnění. Imunosupresní efekt T reg je v první řadě cílen jako mechanismus imunotolerance organismu [61]. V případě maligního nádorového onemocnění se tento efekt imunotolerance projeví jako negativní faktor, který snižuje antitumorózní imunitní reakci a tím zkracuje OS a DFI [59]. V případě prognostického významu T reg se publikované studie jak pro CRC, tak i pro CLM rozcházejí. Katz publikoval studii, kde bylo vysoké zastoupení T reg negativní prognostický faktor pro OS a DFI [35]. Na druhou stranu Nakagawa udává, že peritumorální přítomnost T reg buněk zlepšuje přežití u pacientů po resekci jater pro CLM. Domnívá se, že přítomné T reg se orientují na snížení zánětlivé odpovědi v okolí tumoru a neovlivňují cytotoxickou reakci vyvolanou CD8<sup>+</sup> lymfocyty [62]. Naše studie neprokázala statisticky signifikantní vztah samostatně stanovených T reg k OS a DFI ani u jedné ze sledovaných skupin.

### ***Poměry zastoupení TILs***

TILs jsou známé svoji kooperací mezi jednotlivými skupinami lymfocytů. Důležitá je spolupráce především T reg a CD4<sup>+</sup> buněk s CD8<sup>+</sup> buňkami. Stanovení poměrů slouží k ozřejvení těchto vztahů. Katz udává, že poměry TILs mají větší prediktivní hodnotu než individuální stanovení TILs. Poměry jsou schopné lépe zhodnotit funkční dopad

jednotlivých typů lymfocytů a v klinické praxi mohou mít více relevantní hodnotu [35]. I v této studii jsme využili poměrů, abychom si ověřili předpokládané vztahy jednotlivých TILs, které již byly zmíněny v diskuzi výše.

V naší studii byl mezi sledovanými skupinami patrný statisticky signifikantní rozdíl u poměrů buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>. Ve vztahu k DFI byl zaznamenán signifikantní vztah poměru buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> u celého souboru pacientů. U pacientů primárně resekabilních pak byl významný vztah poměru buněk CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> k DFI. Ve vztahu k OS jsme v naší studii nepozorovali žádný staticky signifikantní výsledek.

Z výsledků je patrné, že T reg byly zvýšené oproti CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> buňkám, a to u skupin PVE a PVE SCs. Tento vztah tak opět může svědčit o aktivaci proapoptotické složky v jaterním parenchymu s provedenou PVE. U porovnání T reg s CD4<sup>+</sup> buňkami je také patrné, že CD4<sup>+</sup> buňky byly významně sniženy a FoxP3<sup>+</sup> buňky naopak zvýšené u pacientů s PVE SCs. Lze spekulovat, zdali tento nálezní vypovídá o možném přispění SCs při rozvoji apoptózy jaterních buněk a následné atrofii daného jaterního laloku jako důsledek konverze CD4<sup>+</sup> do T reg [36]. Při porovnání T reg s CD8<sup>+</sup> lymfocyty je patrný trend aktivace cytotoxické složky u primárně resekabilních pacientů s CLM. U pacientů primárně resekabilních jsme pozorovali i statisticky signifikantní vztah poměru buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> vůči DFI. Pokud tento poměr stoupá, snižuje se riziko recidivy. Tento výsledek je však v kontrastu s Katzovou studií, kde byly vyšší hodnoty poměrů buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> a FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> spojeny s horším celkovým přežitím [35]. Jinou studii, která by tento vztah u pacientů s CLM studovala, se nám nepodařilo dohledat. Infiltrace tumoru FoxP3<sup>+</sup> lymfocyty jsou u řady karcinomů (ovaria, plic, ledvin, žaludku, jater) popisovány jako negativní prognostické faktory. U CRC je však situace odlišná. Na jedné straně stojí studie např. Sinicropeho nebo Suzukiho, kteří uvádí vztah poměru buněk CD3<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>, respektive CD8<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> jako prognosticky významný pro DFI a OS [63]. Sinicrope také udává, že nízký poměr buněk CD3<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> a nízké zastoupení samotných CD3<sup>+</sup> buněk ovlivňují mikrometastazování. Tato situace platí pro intraepiteliální zastoupení TILs. Autor také upozorňuje, že u stromální infiltrace může být vztah už jiný [64]. Na druhé straně řada studií potvrdila, že intratumorální přítomnost FoxP3<sup>+</sup> buněk u CRC zlepšuje prognózu [65]. Correale studoval zastoupení FoxP3<sup>+</sup> lymfocytů u pacientů

s pokročilým CRC, kteří podstupovali chemoimunoterapii. U těchto pacientů pozoroval, že vysoké zastoupení FoxP3<sup>+</sup> lymfocytů bylo významným prognostickým faktorem s lepší odpovědí na léčbu. Pacienti s CLM často podstupují onkologickou léčbu před samotnou resekci jater např. podání 6 cyklů onkologické léčby před chirurgickým výkonem. V případě skupiny PVE SCs byly pacienti často předlčeni prolongovanou onkologickou léčbou. I tento faktor může hrát významnou roli, proč byli v naší studii FoxP3<sup>+</sup> lymfocyty vysoce zastoupené u pacientů s PVE SCs a proč vycházejí jako pozitivní faktor pro DFI u primárně resekabilních pacientů ve vztahu k CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> buňkám [56].

Zajímavý výsledek přináší porovnání CD8<sup>+</sup> s CD4<sup>+</sup> buňkami. Je z něj patrné, že nejnižší hodnoty poměru dosahují pacienti ve skupině PVE. U pacientů primárně resekovaných je již poměr vyšší ve prospěch CD8<sup>+</sup> buněk a je tak v souladu s naším předpokladem vyšší aktivace cytotoxické složky u této skupiny pacientů. Překvapující je však poměr buněk CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> u skupiny PVE SCs, kde je patrné vysoké zastoupení CD8<sup>+</sup> buněk a nízké zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk. Nepředpokládáme, že by tento stav byl způsoben vyšší aktivací cytotoxické složky. Ve vztahu k ostatním výsledkům se přikláníme k názoru, že snížení CD4<sup>+</sup> (a jejich diferenciaci v T reg) v důsledku podání SCs nebo v důsledku předoperační onkologické léčby bylo natolik výrazné, že ovlivnilo tento poměr ve prospěch CD8<sup>+</sup>. V rámci rekurence onemocnění byl pozorován statisticky signifikantní vztah poměru buněk CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> k DFI u pacientů primárně resekabilních. Ve skupině PVE byl tento vztah k DFI těsně za hranicí statistické významnosti. V případě primárně resekabilních pacientů byl vzestup poměru spojen se vzestupem rizika rekurence. Katz ve své studii využil poměr buněk CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> a udává, že vysoká hodnota tohoto poměru byla v korelaci s lepším OS a DFI [35]. Pro vyvolání cytotoxické reakce cestou CD8<sup>+</sup> buněk je nezbytná jejich předchozí aktivace pomocí CD4<sup>+</sup> buněk [51]. Poměr mezi buňkami CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> tak vypovídá o tomto vztahu. Zvýšení CD4<sup>+</sup> buněk, které je v případě těchto poměrů spojeno s lepším OS nebo DFI, může svědčit o vyšší aktivaci cytotoxické složky [35].

Dalším zajímavým výsledkem je poměr buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>. Oba použité markery (FoxP3 i CD25) jsou markery T reg. Ve studii jsme pozorovali, že je tento poměr zvýšen u pacientů primárně resekabilních oproti pacientům ve skupinách PVE a PVE SCs. Také jsme pozorovali signifikantní vztah tohoto poměru k DFI u všech pacientů dohromady.

Z poměru rizika recidivy vyplývá, že v případě, kdy se výsledné číslo poměru zvyšuje, snižuje se riziko vzniku recidivy. CD25 je povrchový receptor pro IL-2. Jeho aktivace je nezbytná k následné aktivaci FoxP3 [61]. Předpokládá se tedy, že existují různě vyztřále populace T reg. Poměr buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> vypovídá o míře aktivace a procesu maturace T reg. Vyšší hodnoty poměru by tak ukazovaly na aktivaci vyztřálejších forem T reg. Z naší studie vyplývá, že vyšší zastoupení vyztřálejších forem T reg je pozitivním faktorem vzhledem k riziku rozvoje recidivy u pacientů, kteří podstupují jakoukoliv resekci jater pro CLM.

### ***Dendritické buňky, Natural Killers, granzym B a serpin B9***

V naší studii jsme neprokázali významné rozdíly v zastoupení DCs, NKs, granzymu B a serpinu B9 mezi skupinami PVE SCs, PVE a skupinou primárně resekabilních pacientů.

DCs (CD86<sup>+</sup> buňky) jsou hlavní složkou APCs. V minulosti byl popsán jejich vztah k CRC. Nízké zastoupení DCs u pacientů s CRC mělo vztah k metastazování do lymfatických uzlin [28]. V případě CLM byla popsána vazba mezi DCs a CD8<sup>+</sup> buněk. V případě vysoké infiltrace tumoru těmito imunocyty se snižuje růst CLM [29]. Na druhou stranu DCs jsou negativně ovlivňovány mikroprostředím tumoru, které v důsledku cytokinů snižuje denzitu DCs ve tkáni tumoru. U metastáz je zastoupení DCs až 6x nižší oproti tkáni CRC. Tím se snižuje i stimulace buněk specifické imunity, především efektorových CD8<sup>+</sup> buněk [66]. Předpokládáme, že nízké zastoupení APCs mohlo být jednou z příčin, která se podílela na nízké cytotoxické reakci organismu proti CLM v našem souboru pacientů.

Také NKs jsou spojované s prodloužením OS a DFI u pacientů s CRC [30, 31]. U pacientů s CLM je obvykle pozorované malé zastoupení NKs v okolí metastáz. Pokud jsou však přítomny, pak je to obvykle v korelaci s CD8<sup>+</sup> buňkami [50]. Důvodem, proč jsou NKs v CLM neefektivní, jsou vysoké hladiny TGF-β1, obvykle ze zvýšené produkce nádorovými buňkami. Tento růstový faktor zvyšuje apoptózu, narušuje funkci perforinů, Fas a snižuje expresi NKG2D receptorů [67]. TGF-β je hlavním produktem T reg, které byly ve zvýšené míře pozorované i u našich pacientů s PVE a PVE SCs. Mimo samotného mikroprostředí tumoru tak T reg mohou snižovat zastoupení a efekt NKS, tak jak jsme pozorovali i u našich skupin pacientů. Faktor, který také ovlivňuje efektivitu NKs a CD8<sup>+</sup> buněk, jsou

serpiny. Serpiny způsobují blokádu perforinů a granzymů uvolněných do extracelulárního prostředí (v našem případě serpinu B9 a granzymu B) [68]. V naší studii jsme u žádné skupiny nezaznamenali vysoké hodnoty serpinu B9. Na tomto faktu se mohlo podílet i nízké zastoupení granzymu B, který tak nevyvolal protireakci v podobě uvolňování serpinu B9 z okolních buněk.

#### **5.4 Diskuze k ABC transportérům**

Onkologická léčba je nedílnou součástí komplexní péče o onkologicky nemocné. U řady pacientů však dochází k progresi onemocnění i přes podanou onkologickou léčbu. U řady tumorů (karcinom prsu, slinivky, ovaria) byl již popsán význam ABC transportérů v rámci rezistence k onkologické léčbě [69]. Při terapii CRC jsou nejvíce využívány režimy na základě Oxaliplatinu a 5-FU. U pacientů s CRC nereagujících na onkologickou léčbu byla popsána souvislost s ABCC10 a ABCC11. V pracích, na kterých se podílelo i naše pracoviště, byl popsán vztah nízkých hladin ABCC11 a špatné odpovědi na paliativní léčbu. U pacientů s adjuvantní léčbou byl pozorován kratší DFI při nízkých transkripčních hladinách ABCC11 a stejně tak i nízká proteinová exprese ABCC11 zvyšovala riziko rekurence. Nízká transkripční hladina ABCC10 korelovala s gradingem tumoru a nízká proteinová exprese tohoto transportéru zvyšovala riziko úmrtí [41,42]. V naší studii jsme porovnávali zastoupení ABCC10 a ABCC11 mezi sledovanými skupinami a jejich vztah k DFI a OS. Mezi sledovanými skupinami jsme rozdíl v zastoupení jednotlivých transportérů neprokázali. Stejně tak nebyl prokázán vztah ABCC10 a ABCC11 k DFI a OS u žádné ze sledovaných skupin. Získané hodnoty ABC transportérů u sledovaných skupin jsme neporovnávali se zdravou jaterní tkání, což je nedostatkem tohoto stanovení. V současné době je jen minimum studií, které se zabývají ABC transportéry u pacientů s CLM. Nanashima ve své studii nepozoroval korelaci mezi tzv. MRP (Multidrug Resistance Proteins – dřívejší označení ABCC) a klinicko patologickými daty mezi pacienty s CRC a pacienty s CLM. Jednotlivé transportéry blíže nespecifikuje [70]. V naší studii jsme vyšli z předchozí zkušenosti s ABC transportéry u pacientů s CRC. Naše výsledky nevylučují, že se na rezistenci k onkologické léčbě nemohou podílet jiné typy ABC transportérů. Yamauchi udává vztah nízké hladiny ABCB1 u pacientů s časnou recidivou oproti pacientům bez rekurence [71]. ABCB1 je transportér obecně zodpovědný za lékové rezistence u jater. U HCC je popisován vztah dediferencovaných tumorů a



vaskulární mikroinvaze v případě nízkého zastoupení ABCB1. Exprese transportéru je také ovlivnitelná podanou chemoterapií, kdy při podání onkologické léčby stoupají zastoupení tohoto receptoru oproti pacientům s HCC bez podané onkologické léčby [72]. Trend ve změně povrchové exprese ABCC10 jsme pozorovali i u našeho souboru pacientů. Vzhledem k tomu, že výsledek vyšel těsně za hranici statistické významnosti, hovoříme o trendu, kdy pacienti, kteří měli po operaci primárního CRC podán 5-FU, vykazovali v resekovaných CLM nižší zastoupení ABCC10. Je zde patné, že ABCC10 a 5-FU se vzájemně ovlivňují, nicméně v našem případě tento vztah neměl korelaci k DFI ani OS. Tento vztah by se mohl projevit v případě většího souboru pacientů zahrnutých do studie. V rodině ABCC transportérů byly u primárních tumorů popsány změny exprese v ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4. Např. zvýšené exprese ABCC1 byly pozorovány u poloviny pacientů s dediferencovaným HCC a mikrovaskulární expanzí. Zvýšená exprese byla popsána i u CHCC, ale bez korelace s klinickopatologickými daty [72]. Rodina ABCC transportérů spolu s ABCB1 mohou být zajímavým cílem dalšího výzkumu lékové rezistence u pacientů s tumory jater. Danou skupinu transportérů lze doplnit ještě o ABCG2, který také vykazoval změny ve své expresi u pacientů s HCC v závislosti na podání onkologické léčby.

## 6 Závěr

Tato studie neprokázala statisticky signifikantní rozdíl v nárůstu FLRV u pacientů po PVE s aplikací SCs oproti pacientům s prostou PVE. Trend nejrychlejšího nárůstu FLRV jsme mohli pozorovat u pacientů s PVE a aplikací SCs se vstupním FLRV menším než 30 %. Aplikace SCs neakcelerovala růst CLM po provedení PVE. Pacienti po provedené PVE a aplikaci SCs měli nižší procento explorativních laparotomií a statisticky signifikantně nižší výskyt extrahepatálních metastáz v poresekčním období. Tento fakt bude jistě zajímavým tématem dalšího výzkumu. Pacienti po provedené PVE a aplikaci SCs dosahovali shodného DFI a OS jako pacienti s provedenou prostou PVE. Obě tyto skupiny pacientů pak vykazují kratší DFI oproti pacientům primárně operabilním, ale ve vztahu k OS jsme nezaznamenali statisticky signifikantní rozdíly. Studie tak vypovídá o přínosu PVE a PVE s aplikací SCs, kdy je možné i u pacientů s pokročilým metastatickým postižením jater dosáhnout shodného OS jako u pacientů primárně operabilních. Prokazatelný je přínos podané adjuvantní onkologické léčby k OS.

V rámci stanovení TILs jsme nepozorovali aktivaci cytotoxické složky specifické imunity u sledovaných skupin. I přes vyšší počty CD8<sup>+</sup> buněk u pacientů s primárně operabilními CLM jsme nepozorovali jejich korelaci s DFI a OS. Ve studii jsme prokázali význam T reg u skupin PVE a především u skupiny PVE SCs, kde T reg mohly výrazně přispět k atrofii okludovaných jaterních laloků. Samotné stanovení T reg se neprojevilo jako významný prognostický faktor ve vztahu k DFI nebo OS. Vysoké zastoupení T reg především u skupiny PVE SCs bylo pravděpodobnou příčinou nízkého zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk. Vliv SCs na případnou diferenciaci CD4<sup>+</sup> buněk do T reg a následné ovlivnění atrofie jaterních laloků může být směrem, kam výsledky této studie dále rozvíjet.

U skupiny PVE vyšlo stanovení CD4<sup>+</sup> buněk v HPF a v ISL jako negativní prognostický faktor zkracující DFI. Z důvodu malého počtu pacientů nevyšel pro PVE SCs žádný ze sledovaných parametrů jako prognosticky významný. NKs a DCs byly u pacientů zahrnutých do naší studie přítomny jen v malých počtech a neměly prognostický význam.

Pro lepší porozumění ve vztazích mezi jednotlivými TILs byly použity poměry jednotlivých imunocytů. Prokázali jsme signifikantní vztah poměru buněk FoxP3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> k DFI, kdy vyšší hodnoty snižovaly riziko rekurence u všech pacientů zařazených do studie. Tento poměr také nasvědčuje, že za snížením rizika rekurence stojí především

vyzrálé formy FoxP3<sup>+</sup> lymfocytů. Růst poměru buněk CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> se u primárně operabilních pacientů projevil jako negativní prognostický faktor. Nález svědčí pro neúspěšnou aktivaci cytotoxické reakce.

V poslední části práce bylo sledováno zastoupení ABC transportérů. Zastoupení ABCC10 a ABCC11 bylo bez signifikantních rozdílů mezi sledovanými skupinami. Ve studii je však patrný vztah v minulosti podaného 5-FU na expresi ABCC10. Pozorovali jsme trend ve změně exprese těchto transportérů u pacientů v minulosti léčených 5-FU, kteří následně měli nižší zastoupení ABCC10 v CLM. Ve studii jsme neprokázali vztah ABCC10 a ABCC11 transportérů k DFI a OS.

Tato práce prokazuje vztah T reg k CLM, a to především u pacientů podstupujících PVE a PVE s aplikací SCs. Studium T reg může přispět k objasnění vztahů mezi PVE, atrofii jaterního parenchymu s okludovaným portálním řečištěm a kontralaterální kompenzatorní hypertrofií FLRV. Tyto vazby pak lze využít k navyšování počtu primárně inoperabilních pacientů, kteří jsou na konec dovedeni k radikálnímu resekcčnímu výkonu.

## 7 Použitá literatura

1. DUŠEK, L. et al. Epidemiologie kolorektálního karcinomu v mezinárodním srovnání. *Kolorektum.cz* [online]. Brno: Masarykova univerzita, Institut biostatistiky a analýz, poslední aktualizace 10.12.2015 [cit. 2018-03-24]. ISSN 1804-0888. Dostupné z: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-odborniky--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu-v-mezinarodnim-srovnani>
2. MAYO, S. C. et al. Shifting trends in liver-directed management of patients with colorectal liver metastasis: a population-based analysis. *Surgery* [online]. 2011, **150**(2), 204-216 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1016/j.surg.2011.06.013. ISSN 0039-6060. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039606011002960>
3. BHOGAL, R. H. et al. Predictors of early recurrence after resection of colorectal liver metastases. *World Journal of Surgical Oncology* [online]. 2015, **13**(1) [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1186/s12957-015-0549-y. ISSN 1477-7819. Dostupné z: <http://www.wjso.com/content/13/1/135>
4. MEYERHARDT, J. A. et al. Follow-Up Care, Surveillance Protocol, and Secondary Prevention Measures for Survivors of Colorectal Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2013, **31**(35), 4465-4470 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1200/JCO.2013.50.7442. ISSN 0732-183X. Dostupné z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2013.50.7442>
5. LEE-KONG, S. a D. LISLE. Surgical Management of Complicated Colon Cancer. *Clinics in Colon and Rectal Surgery* [online]. 2015, **28**(04), 228-233 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1055/s-0035-1564621. ISSN 1531-0043. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0035-1564621>
6. LIPSKÁ, L. a kol. *Recidiva kolorektálního karcinomu: komplexní přístup z pohledu chirurga*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3026-4.
7. MISIAKOS, E. P., N. P. KARIDIS a G. KOURAKLIS. Current treatment for colorectal liver metastases. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2011, **17**(36), 4067-4075 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.3748/wjg.v17.i36.4067. ISSN 1007-9327. Dostupné z: <http://www.wjnet.com/1007-9327/full/v17/i36/4067.htm>
8. FONG, Y. et al. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Annals of Surgery* [online]. 1999, **230**(3), 309-321 [cit. 2018-03-19]. ISSN 1528-1140. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10493478>
9. LOFFROY, R. et al. Preoperative portal vein embolization in liver cancer: indications, techniques and outcomes. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery* [online]. 2015, **5**(5), 730-739 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.3978/j.issn.2223-4292.2015.10.04. ISSN 2223-4306. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4671969/>
10. LAM, V. W. T. et al. A systematic review of two-stage hepatectomy in patients with initially unresectable colorectal liver metastases. *HPB* [online]. 2013, **15**(7), 483-491 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1111/j.1477-2574.2012.00607.x. ISSN 1365-182X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1365182X15314234>
11. SHINDOH, J. et al. Optimal Future Liver Remnant in Patients Treated with Extensive Preoperative Chemotherapy for Colorectal Liver Metastases. *Annals of Surgical Oncology* [online]. 2013, **20**(8), 2493-2500 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1245/s10434-012-2864-7. ISSN 1068-9265. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1245/s10434-012-2864-7>
12. SHIMADA, H. et al. Treatment for multiple bilobar liver metastases of colorectal cancer. *Langenbeck's Archives of Surgery* [online]. 2006, **391**(2), 130-142 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1007/s00423-005-0003-7. ISSN 1435-2443. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00423-005-0003-7>
13. MEIER, R. P. H. et al. Improved liver function after portal vein embolization and an elective right hepatectomy. *HPB* [online]. 2015, **17**(11), 1009-1018 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1111/hpb.12501. ISSN 1365-182X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1365182X15320098>
14. ZORZI, D. et al. Chemotherapy-associated hepatotoxicity and surgery for colorectal liver metastases. *British Journal of Surgery* [online]. 2007, **94**(3), 274-286 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1002/bjs.5719. ISSN 0007-1323. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bjs.5719>

15. ELIAS, D. et al. Preoperative selective portal vein embolization before hepatectomy for liver metastases: long-term results and impact on survival. *Surgery*. 2002, **131**(3), 294–299. ISSN 0039-6060.
16. DENYS, A. et al. Portal Vein Embolization: What Do We Know?. *CardioVascular and Interventional Radiology* [online]. 2012, **35**(5), 999-1008 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1007/s00270-011-0300-1. ISSN 0174-1551. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00270-011-0300-1>
17. VAN LIENDEN, K. P. et al. Portal Vein Embolization Before Liver Resection: A Systematic Review. *CardioVascular and Interventional Radiology* [online]. 2013, **36**(1), 25-34 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1007/s00270-012-0440-y. ISSN 0174-1551. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00270-012-0440-y>
18. OUSSOULTZOGLOU, E. et al. Right Portal Vein Embolization Before Right Hepatectomy for Unilobar Colorectal Liver Metastases Reduces the Intrahepatic Recurrence Rate. *Annals of Surgery* [online]. 2006, **244**(1), 71-79 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1097/01.sla.0000217609.26178.35. ISSN 0003-4932. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00000658-200607000-00011>
19. FICHTL, J. et al. Predictive Value of Growth Factors and Interleukins for Future Liver Remnant Volume and Colorectal Liver Metastasis Volume Growth Following Portal Vein Embolization and Autologous Stem Cell Application. *Anticancer Research* [online]. 2016, **36**(4), 1901-1907 [cit. 2018-03-13]. ISSN 1791-7530. Dostupné z: <http://ar.iijournals.org/content/36/4/1901.long>
20. POMMIER, R. et al. Colorectal Liver Metastases Growth in the Embolized and Non-Embolized Liver After Portal Vein Embolization: Influence of Initial Response to Induction Chemotherapy. *Annals of Surgical Oncology* [online]. 2014, **21**(9), 3077-3083 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1245/s10434-014-3700-z. ISSN 1068-9265. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1245/s10434-014-3700-z>
21. SIMONEAU, E. et al. Portal vein embolization and its effect on tumour progression for colorectal cancer liver metastases. *British Journal of Surgery* [online]. 2015, **102**(10), 1240-1249 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1002/bjs.9872. ISSN 0007-1323. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bjs.9872>
22. HÄUSSINGER, D., ed. *Liver regeneration*. Berlin: de Gruyter, ©2011. ISBN 978-3-11-025078-7.
23. DUNCAN, A. W., C. DORRELL a M. GROMPE. Stem Cells and Liver Regeneration. *Gastroenterology* [online]. 2009, **137**(2), 466-481 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.05.044. ISSN 0016-5085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650850900818X>
24. AM ESCH, J. S. et al. Infusion of CD133+ Bone Marrow–Derived Stem Cells After Selective Portal Vein Embolization Enhances Functional Hepatic Reserves After Extended Right Hepatectomy. *Annals of Surgery* [online]. 2012, **255**(1), 79-85 [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1097/SLA.0b013e31823d7d08. ISSN 0003-4932. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00000658-201201000-00013>
25. HAN, H. S. et al. Autologous stem cell transplantation for expansion of remnant liver volume with extensive hepatectomy. *Hepatogastroenterology*. 2014, **61**(129), 156-161. ISSN 0172-6390.
26. TŘEŠKA, V. et al. Portal Vein Embolisation with Application of Haematopoietic Stem Cells in Patients with Primarily or Non-resectable Colorectal Liver Metastases. *Anticancer Research* [online]. 2014, **34**(12), 7279-7285. ISSN 1791-7530. Dostupné z: <http://ar.iijournals.org/content/34/12/7279.full>
27. HOŘEJŠÍ, V. et al. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.
28. GULUBOVA, M. V. et al. Role of dendritic cells in progression and clinical outcome of colon cancer. *International Journal of Colorectal Disease* [online]. 2012, **27**(2), 159-169 [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.1007/s00384-011-1334-1. ISSN 0179-1958. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00384-011-1334-1>
29. KITO, A. et al. Tumor doubling time and local immune response to hepatic metastases from colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology* [online]. 2007, **96**(6), 525-533 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1002/jso.20806. ISSN 0022-4790. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jso.20806>
30. LIŠKA, V. et al. Infiltration of Colorectal Carcinoma by S100+Dendritic Cells and CD57+ Lymphocytes as Independent Prognostic Factors after Radical Surgical Treatment. *Anticancer Research* [online]. 2012, **32**(5), 2129-2132 [cit. 2018-03-01]. ISSN 1791-7530. Dostupné z: <http://ar.iijournals.org/content/32/5/2129.long>
31. VYČÍTAL, O. *Molekulárně biologické mechanismy progresu kolorektálního karcinomu ve vztahu k individualizované onkochirurgické léčbě*. Plzeň, 2017. Dizertační práce. Univerzita Karlova,

Lékařská fakulta v Plzni, Chirurgická klinika. Vedoucí práce V. Liška. Dostupné také z:  
<https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/86625>

32. KASPER, H. U. et al. Dominance of CD4+ alpha/beta T-cells and inferior role of innate immune reaction in liver metastases. *Anticancer Research*. 2003, **23**(4), 3175-3181. ISSN 0250-7005.
33. EVANS, C. F. M. et al. The effect of colorectal cancer upon host peripheral immune cell function. *Colorectal Disease* [online]. 2010, **12**(6), 561-569 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1111/j.1463-1318.2009.01819.x. ISSN 1462-8910. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1463-1318.2009.01819.x>
34. KATZ, S. C. et al. T Cell Infiltrate Predicts Long-Term Survival Following Resection of Colorectal Cancer Liver Metastases. *Annals of Surgical Oncology* [online]. 2009, **16**(9), 2524-2530 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1245/s10434-009-0585-3. ISSN 1068-9265. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1245/s10434-009-0585-3>
35. KATZ, S. C. et al. Regulatory T Cell Infiltration Predicts Outcome Following Resection of Colorectal Cancer Liver Metastases. *Annals of Surgical Oncology* [online]. 2013, **20**(3), 946-955 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1245/s10434-012-2668-9. ISSN 1068-9265. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1245/s10434-012-2668-9>
36. PERNOT, S. et al. Colorectal cancer and immunity: What we know and perspectives. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2014, **20**(14), 3738-3750 [cit. 2018-03-29]. DOI: 10.3748/wjg.v20.i14.3738. ISSN 1007-9327. Dostupné z: <http://www.wjnet.com/1007-9327/full/v20/i14/3738.htm>
37. PAGÈS, F. et al. Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine* [online]. 2005, **353**(25), 2654-2666 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1056/NEJMoa051424. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa051424>
38. WAGNER, P. et al. Detection and Functional Analysis of Tumor Infiltrating T-Lymphocytes (TIL) in Liver Metastases from Colorectal Cancer. *Annals of Surgical Oncology*[online]. 2008, **15**(8), 2310-2317 [cit. 2018-03-29]. DOI: 10.1245/s10434-008-9971-5. ISSN 1068-9265. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1245/s10434-008-9971-5>
39. SALAMA, P. et al. Low expression of Granzyme B in colorectal cancer is associated with signs of early metastatic invasion. *Histopathology* [online]. 2011, **59**(2), 207-215 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2011.03915.x. ISSN 0309-0167. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2559.2011.03915.x>
40. CHOWDHURY, D. a J. LIEBERMAN. Death by a Thousand Cuts: Granzyme Pathways of Programmed Cell Death. *Annual Review of Immunology* [online]. 2008, **26**(1), 389-420 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090404. ISSN 0732-0582. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090404>
41. HLA VATÁ, I. et al. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* [online]. 2012, **27**(2), 187-196 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1093/mutage/ger075. ISSN 1464-3804. Dostupné z: <https://academic.oup.com/mutage/article-lookup/doi/10.1093/mutage/ger075>
42. KŘÍŽKOVÁ, V. et al. Protein expression of ATP-binding cassette transporters ABCC10 and ABCC11 associates with survival of colorectal cancer patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 2016, **78**(3), 595-603 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1007/s00280-016-3114-7. ISSN 0344-5704. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00280-016-3114-7>
43. TONAR, Zbyněk et al. Stereological tools for quantitative microscopy of the aortic wall with focus on the abdominal aortic aneurysm. In: *Microscopy: science, technology, applications and education*. Badajoz: Formatex Research Center, 2010. s. 926-935. ISBN 978-84-614-6190-5.
44. SCHEMPER, M. a T. L. SMITH. A note on quantifying follow-up in studies of failure time. *Controlled Clinical Trials*. 1996, **17**(4), 343-346. ISSN 0197-2456.
45. STURESSON, C., I. KEUSSEN a K.-G. TRANBERG. Prolonged chemotherapy impairs liver regeneration after portal vein occlusion – An audit of 26 patients. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* [online]. 2010, **36**(4), 358-364 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1016/j.ejso.2009.12.001. ISSN 0748-7983. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0748798309005423>
46. HERBERTS, C. A, M. S. G. KWA a H. P. H. HERMSEN. Risk factors in the development of stem cell therapy. *Journal of Translational Medicine* [online]. 2011, **9**(1) [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1186/1479-5876-9-29. ISSN 1479-5876. Dostupné z: <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-9-29>
47. NORDLINGER, B. et al. Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): long-term results of a

- randomised, controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* [online]. 2013, **14**(12), 1208-1215 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70447-9. ISSN 1470-2045. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204513704479>
48. KONOPKE, R. et al. Colorectal liver metastases: an update on palliative treatment options. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* [online]. 2012, **21**(1), 83-91 [cit. 2018-03-26]. ISSN 1842-1121. Dostupné z: <http://www.jgld.ro/2012/1/14.html>
  49. CURTIS, N. J. et al. The adaptive immune response to colorectal cancer: From the laboratory to clinical practice. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* [online]. 2012, **38**(10), 889-896 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1016/j.ejso.2012.05.011. ISSN 0748-7983. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0748798312003368>
  50. GULUBOVA, M. et al. Decrease in intrahepatic CD56+ lymphocytes in gastric and colorectal cancer patients with liver metastases. *APMIS* [online]. 2009, **117**(12), 870-879 [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2009.02547.x. ISSN 0903-4641. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0463.2009.02547.x>
  51. KOCH, M. et al. Tumor Infiltrating T Lymphocytes in Colorectal Cancer. *Annals of Surgery* [online]. 2006, **244**(6), 986-993 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1097/01.sla.0000247058.43243.7b. ISSN 0003-4932. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00000658-200612000-00019>
  52. BRUNNER, S. M. et al. Prognosis according to histochemical analysis of liver metastases removed at liver resection. *British Journal of Surgery* [online]. 2014, **101**(13), 1681-1691 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1002/bjs.9627. ISSN 0007-1323. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bjs.9627>
  53. BERTHEL, A. et al. Detailed resolution analysis reveals spatial T cell heterogeneity in the invasive margin of colorectal cancer liver metastases associated with improved survival. *Oncotarget* [online]. 2017, **6**(3), e1286436 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1286436. ISSN 2162-402X. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2017.1286436>
  54. LUZ-CRAWFORD, P. et al. Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. *Stem Cell Research & Therapy* [online]. 2013, **4**(3) [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1186/scrt216. ISSN 1757-6512. Dostupné z: <http://stemcellres.com/content/4/3/65>
  55. AGGARWAL, S. a M. F. PITTENGER. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* [online]. 2005, **105**(4), 1815-1822 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1559. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2004-04-1559>
  56. CORREALE, P. et al. Regulatory (FoxP3+) T-cell Tumor Infiltration Is a Favorable Prognostic Factor in Advanced Colon Cancer Patients Undergoing Chemo or Chemoimmunotherapy. *Journal of Immunotherapy* [online]. 2010, **33**(4), 435-441 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181d32f01. ISSN 1524-9557. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00002371-201005000-00010>
  57. TOSOLINI, M. et al. Clinical Impact of Different Classes of Infiltrating T Cytotoxic and Helper Cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Research* [online]. 2011, **71**(4), 1263-1271 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2907. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-10-2907>
  58. CUI, G. a J. FLORHOLMEN. Polarization of cytokine profile from Th1 into Th2 along colorectal adenoma-carcinoma sequence: implications for the biotherapeutic target? *Inflammation & Allergy Drug Targets*. 2008, **7**(2), 94-7. ISSN 0368-2811.
  59. COOLS, N. et al. Regulatory T Cells and Human Disease. *Clinical and Developmental Immunology* [online]. 2007, **2007**(89195), 1-10 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1155/2007/89195. ISSN 1740-2522. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2007/089195/abs/>
  60. FABREGAT, I. et al. TGF- $\beta$  signalling and liver disease. *The FEBS Journal* [online]. 2016, **283**(12), 2219-2232 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1111/febs.13665. ISSN 1742-464X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/febs.13665>
  61. TRIPLETT, T. A. et al. Defining a functionally distinct subset of human memory CD4+ T cells that are CD25POS and FOXP3NEG. *European Journal of Immunology* [online]. 2012, **42**(7), 1893-1905 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1002/eji.201242444. ISSN 0014-2980. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201242444>
  62. NAKAGAWA, K. et al. Low Infiltration of Peritumoral Regulatory T Cells Predicts Worse Outcome Following Resection of Colorectal Liver Metastases. *Annals of Surgical Oncology* [online].

- 2015, **22**(1), 180-186 [cit. 2018-03-29]. DOI: 10.1245/s10434-014-3974-1. ISSN 1068-9265. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1245/s10434-014-3974-1>
63. SUZUKI, H. et al. Intratumoral CD8(+) T/FOXP3 (+) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer. *Cancer immunology and immunotherapy* [online]. 2010, **59**(5), 653-651 [cit. 2018-04-05]. ISSN 1432-0851. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00262-009-0781-9>
  64. SINICROPE, F. A. et al. Intraepithelial Effector (CD3+)/Regulatory (FoxP3+) T-Cell Ratio Predicts a Clinical Outcome of Human Colon Carcinoma. *Gastroenterology* [online]. 2009, **137**(4), 1270-1279 [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.06.053. ISSN 0016-5085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650850901138X>
  65. SALAMA, P. et al. Tumor-Infiltrating FOXP3 + T Regulatory Cells Show Strong Prognostic Significance in Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2009, **27**(2), 186-192 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1200/JCO.2008.18.7229. ISSN 0732-183X. Dostupné z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2008.18.7229>
  66. LADOIRE, S., F. MARTIN a F. GHIRINGHELLI. Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy* [online]. 2011, **60**(7), 909-918 [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1007/s00262-011-1046-y. ISSN 0340-7004. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00262-011-1046-y>
  67. LEE, J. C. et al. Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *Journal of Immunology* [online]. 2004, **172**(12), 7335-7340 [cit. 2017-08-21]. DOI: 10.4049/jimmunol.172.12.7335. ISSN 1550-6606. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/content/172/12/7335.long>
  68. MEDEMA, J. P. et al. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2001, **98**(20), 11515-11520 [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1073/pnas.201398198. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.201398198>
  69. HLAVÁČ, V. et al. The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma. *Pharmacogenomics* [online]. 2013, **14**(5), 515-529 [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.2217/pgs.13.26. ISSN 1462-2416. Dostupné z: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/pgs.13.26>
  70. NANASHIMA, A. et al. Expression of multidrug resistance protein in metastatic colorectal carcinomas. *Journal of Gastroenterology* [online]. 1999, **34**(5), 582-588 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1007/s005350050376. ISSN 0944-1174. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s005350050376>
  71. YAMAUCHI, K. et al. Prediction of Early Recurrence After Curative Resection of Colorectal Liver Metastasis and Subsequent S-1 Chemotherapy. *Anticancer Research* [online]. 2016, **36**(5), 2175-2179. ISSN 1791-7530. Dostupné z: <http://ar.iijournals.org/content/36/5/2175.long>
  72. WLCEK, K. a B. STIEGER. ATP-binding cassette transporters in liver. *BioFactors* [online]. 2014, **40**(2), 188-198 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1002/biof.1136. ISSN 0951-6433. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biof.1136>



