

Sledování protinádorové buněčné imunitní odezvy u nemocných s renálním karcinomem, porucha proliferace T-lymfocytů

Š. Lukešová^{1,4}, V. Vroblová², D. Hlávková², O. Kopecký^{1,4}, D. Vokurková², P. Morávek³, H. Šafránek³, P. Souček²

¹ II. interní klinika Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové, přednosta: prof. MUDr. Jaroslav Malý, CSc.

² Ústav klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové, přednosta: prof. RNDr. Jan Krejssek, CSc.

³ Urologická klinika Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové, přednosta: doc. MUDr. Petr Morávek, CSc.

⁴ Oddělení klinické imunologie a mikrobiologie Oblastní nemocnice Náchod, prim. doc. MUDr. Otakar Kopecký, CSc.

Souhrn: Úvod: Řada pozorování nasvědčuje tomu, že u nemocných s renálním karcinomem (renal cell carcinoma – RCC) hraje imunitní systém důležitou roli při kontrole růstu nádoru. RCC je více než jiné nádory infiltrován leukocyty (Tumor Infiltrating Lymphocytes – TIL). Dominantní populací TIL buněk tvoří T-lymfocyty. Názory na úlohu T-lymfocytárních subpopulací, B-lymfocytů a NK buněk v protinádorové odezvě nejsou jednotné. Cíl: Stanovit fenotyp a aktivaci lymfocytárních buněk a porovnat jejich zastoupení v nádorovém stromatu (TIL), v periferní krvi a v krvi z renální žíly u nemocných s RCC. Soubor nemocných a metodika: Vzorky periferní krve z kubitální a renální žíly a buňky nádorového stromatu byly získány od 60 pacientů v průběhu operace pro primární RCC. TIL byly izolovány z mechanicky dezintegrované nádorové tkáně. PBL a TIL byly podrobeny imunofenotypové multiparametrové analýze. Pomocí průtokového cytometru byly charakterizovány jejich povrchové a aktivační znaky. Výsledky: Hlavní populací TIL byly T-lymfocyty CD3⁺ (70,4 %). Počet CD3⁺/CD8⁺ T-lymfocytů byl signifikantně vyšší v TIL, 39,7 % ($p < 0,01$), zatímco CD4⁺ T-lymfocyty byly většinou populací v periferní krvi, 41,35 % ($p < 0,001$). Zastoupení CD3⁺/69⁺ T-lymfocytů bylo signifikantně vyšší v TIL (32,05 %) než v PBL ($p < 0,001$). Naopak, počty CD3⁺/CD25⁺, CD8⁺/57⁺ a CD4⁺/RA⁺ (naivní CD4⁺ T-lymfocyty) byly vyšší v PBL ($p < 0,001$). Rozdíly v zastoupení NK buněk (CD3⁺/16⁺56⁺) a CD3⁺/DR⁺ T buněk v TIL a PBL nebyly signifikantní. Závěr: Uvedené výsledky dokazují, že v porovnávaných kompartmentech (tumor/PBL) jsou charakteristiky a intenzita protinádorové odezvy rozdílné. CD3⁺/CD8⁺ T-lymfocyty jsou dominantní lymfocytární populací TIL. Znalost fenotypu a funkcí efektorových buněk zodpovědných za protinádorovou odpověď jsou základní podmínkou pochopení protinádorové imunitní odpovědi a jejího selhání.

Klíčová slova: tumor-infiltrující lymfocyty – CD4 – CD8 – průtoková cytometrie – renální karcinom

Monitoring of anti-tumour cell-mediated response in patients with renal cell carcinoma, disturbance of T cell proliferation

Summary: *Introduction:* When checking tumour growth, a number of observations indicate that the immune system plays a significant role in patients with renal cell carcinoma („RCC“). Infiltration by lymphocytes (tumour infiltrating lymphocytes, „TILs“) is more prevalent in RCC than any other tumours. T lymphocytes are the dominant population of TIL cells. Views concerning the role of T lymphocytic subpopulations, B lymphocytes and NK cells in an anti-tumour response are not established. *Aim:* The aim is to determine the phenotype and activation of lymphocytic cells and to compare their representation in tumour stroma (TIL), peripheral blood (PBL) and renal vein blood in patients with RCC. *Patients and methods:* The samples of peripheral blood taken from the cubital and renal veins and tumour stroma cells were obtained from 60 patients in the course of their surgeries carried out due to primary RCC. TILs were isolated from mechanically disintegrated tumour tissue. Immunophenotype multiparametric analysis of PBL and TILs was carried out. Their surface and activation characteristics were determined by means of flow cytometer. *Results:* CD3⁺ T lymphocytes (70.4 %) were the main population of TILs. The number of CD3⁺/CD8⁺ T lymphocytes was significantly higher in TILs, 39.7 % ($p < 0.01$), while CD4⁺ T lymphocytes were the majority population in peripheral blood, 41.35 % ($p < 0.001$). The representation of CD3⁺/69⁺ T lymphocytes was significantly higher in TILs, 32.05 %, compared to PBL ($p < 0.001$). On the contrary, the numbers of CD3⁺/CD25⁺, CD8⁺/57⁺ and CD4⁺/RA⁺ (naive CD4⁺ T lymphocytes) were higher in PBL ($p < 0.001$). The differences in representation of (CD3⁺/16⁺56⁺) NK cells and CD3⁺/DR⁺ T cells in TILs and PBL were not significant. *Conclusion:* The above-mentioned results prove that the characteristics and intensity of anti-tumour responses are different in compared compartments (tumour/PBL). CD3⁺/CD8⁺ T lymphocytes are the dominant lymphocytic population of TILs. The knowledge of phenotype and functions of effector cells, which are responsible for anti-tumour response, are the basic precondition for understanding the anti-tumour immune response and the cause of its failure.

Key words: tumour-infiltrating lymphocytes – CD4 – CD8 – flow cytometry – renal cell carcinoma

Úvod

Nádorová onemocnění jsou jednou ze 3 nejčastějších příčin smrti člověka. Podle současných představ je maligní transformace buňky projevem akumulace genetických poruch. Eukaryotické buňky jsou vybaveny mechanismy, které mohou genetickou poruchu opravit na úrovni DNA, nebo zahájit proces apoptózy. Selhání těchto opravných mechanismů otevírá cestu k maligní transformaci buňky [5]. Jednou z posledních obranných bariér je protinádorová odezva imunitního systému. Za protinádorovou odezvu jsou odpovědní cytotoxické T-lymfocyty a NK buňky. Cytotoxická aktivita T-lymfocytů je zajišťována prostřednictvím exocytární dráhy, při které jsou uvolňovány perforiny a granzymy, jejichž působením dochází v terčové (nádorové) buňce k iniciaci procesu apoptózy. Druhým mechanismem, který vede k zahájení apoptózy nádorové buňky, je cesta zahrnující proapoptotické působení molekuly Apo/Fas a cesta zprostředkovaná TNF α [14,19]. Existuje velká podobnost v efektorových mechanismech cytotoxicity mezi CD8⁺ cytotoxickými T-lymfocyty a NK buňkami. V případě RCC existuje řada prací analyzujících buňky infiltrující nádor a jejich podíl na protinádorové odezvě. Není však jednotný názor na zastoupení a úlohu T-lymfocytárních subpopulací, B-lymfocytů a NK buňek [4,10,26,29].

Cílem naší práce bylo pomocí multiparametrové analýzy na průtokovém cytometru stanovit fenotyp a známky aktivace cytotoxických buněk a porovnat jejich zastoupení v TIL a v krvi odebrané z venae renalis a cubitalis.

Soubor nemocných a metodika

V období mezi dubnem roku 2005 a srpnem roku 2006 bylo provedeno chirurgické odstranění ledvinového nádoru 60 pacientům. Soubor byl tvořen 23 ženami a 37 muži ve věkovém rozmezí od 32 do 83 roků. Průměrný věk pacientů byl 66,35 let.

Většině pacientů byla provedena radikální nefrektomie (58 pacientů). Ve 2 případech byla provedena resekce části ledviny. Bilaterální nález tumoru ledviny byl nalezen u 1 pacienta, kterému byla provedena jednostranná nefrektomie s výhledem enkapsulace tumoru na druhé postižené ledvině.

Podle histologických nálezů se v 83 % (50 pacientů) jednalo o konvenční světlobuněčný karcinom, v 8 % (5 pacientů) šlo o papilární karcinom, ve 3 % (2 pacienti) byl nalezen chromofobní karcinom. V jednom případě byl diagnostikován sarkomatoidní karcinom, který vznikl transformací chromofobního karcinomu, v 1 případě jsme identifikovali uroteliální karcinom s dlaždicobuněčnou diferenciací a v 1 případě neklasifikovatelný karcinom vycházející pravděpodobně z Henleovy kličky („loopom“).

K určení stupně pokročilosti onemocnění jsme použili platnou klasifikaci TNM. Do T1a patřilo 27 % pacientů (16 případů), do T1b 28 % pacientů (17 případů), do T2 bylo zařazeno 5 % pacientů (3 případy), do T3a 27 % (16 případů), do T3b 10 % pacientů (6 případů), 1 pacient byl zařazen do T3c a 1 pacient do T4. Rozřazení do stadií je shodné s číselnými indexy prvotního ložiska. Jen 6 pacientů zařazených do T3 a jeden do T2 byli zařazení do stadia IV pro současný výskyt metastáz. Uzlínové postižení N1 bylo potvrzeno u 2 pacientů, N2 rovněž u 2 pacientů. Patologická lymfadenopatie u ostatních nemocných (91 %, 54 pacientů) nebyla prokázána. Do M1 bylo pro vzdálené metastázy zařazeno 7 pacientů (12 %), u 53 pacientů (88 %) nebyly vzdálené metastázy prokázány.

Od každého pacienta byl v den operace odebrán vzorek nádorové tkáně, krev z kubitální a renální žíly. Krev z v. cubitalis i krev z renální žíly byly odebírány do zkumavek s heparinem. Nádorová tkáň, odebraná do pufovaného fyziologického roztoku s heparinem (25 j/ml), byla mechanicky dezintegrovaná a zhomogenizována po-

mocí nůžek, pinzety a homogenizátoru na jednotlivé buněčné elementy, které byly přefiltrovány, 2krát promyty pufovaným fyziologickým roztokem s 5% azidem sodným a naředěny na přibližnou koncentraci 5×10^5 buněk. Zpracování vzorků bylo provedeno do 2 hod po odběru.

Vždy 25 μ l buněčné suspenze a heparinizované krve bylo inkubováno 20 min s 10 μ l naředěnými přímo značenými monoklonálními protilátkami (Beckman Coulter Company, Inc., USA) v následujících kombinacích: CD45-FITC/CD14-PE, CD3-FITC/CD16⁺56-PE/CD19-PC5, RO-FITC/RA-PE/CD4-PC, CD8-FITC/DR-PE/CD3-PC5, CD69-FITC/CD25-PE/CD3-PC5, CD57-FITC/TcR $\alpha\beta$ -PE/CD8-PC5, CD57-FITC/TcR $\gamma\delta$ -PE/CD8-PC5. Po lyzování červených krvinek lyzačním roztokem (0,5 ml OptiLyse C, Beckman Coulter, Inc., USA) jsme přidali fyziologický roztok (Infusio Natrii Chlorati Isotonica IMUNA Pharm a.s., Slovensko) s 5% azidem sodným (Natriumazid-MERCK, SRN). Měření bylo provedeno na průtokovém cytometru Coulter® Epics® XL (Coulter, Fullerton, USA). Vyhodnocení naměřených vzorků bylo provedeno analyzačním programem CXP software analysis. Základní funkce a exprese membránových molekul jsou uvedeny v tab. 1.

Pro statistické zpracování byl použit program Sigmapstat verze 2.0. Vlastní statistika je zpracována standardními metodami pro statistické porovnání několika skupin. Párová data (PK a L) byla posuzována párovým t-testem v případě, že test na normální rozložení byl úspěšný. Jinak byl použit Wilcoxon Signed Rank Test. Ostatní data (nepárová) byla v případě úspěšné vyhodnocení testu na normalitu vyhodnocena nepárovým t-testem, v opačném případě Mannovým-Whitneyovým Rank Sum testem.

Studie byla povolena etickou komisí LF UK Hradec Králové. Před vstupem do studie pacienti podepsali informovaný souhlas.

Tab. 1. Expres a hlavní funkce stanovených membránových znaků.

CD nomenklatura	Hlavní nález antigenu	Funkce antigenu
CD3	T-lymfocyty tymocyty	molekula asociována s T buněčným receptorem α/β nebo γ/δ dimerem, signální transdukce
CD4	T-lymfocytární subpopulace (pomocné indukované T-buňky)	receptor pro monomorfní HLA-DR, receptor pro HIV, cytoplazmatická část Ag asociována s p56-lck tyroxin kinázou, reguluje funkci CD3/TCR komplexu
CD8	subpopulace T-lymfocytů (cyto-toxické, supresorové), tymocyty	receptor pro monomorfní HLA-A,B,C, cytoplazmatická část molekuly asociována s p56-lck tyrozín kinázou, signální transdukce
CD16	1. NK buňky 2. polymorfonukleáry	nízkoafinitní receptor pro Fc domény lidského IgG, hlavní receptor ADCC na NK buňkách; uplatnění při fagocytóze
CD19	B-vývojová řada (od prekurzorů po zralé buňky) B-lymfocyty	zprostředkovává transmembránový signál v různých stádiích maturace pomocí cytoplazmatického řetězce (receptor pro funkce B-buněk, regulace protilátkové odezvy)
CD25	aktivované T a B-buňky aktivované makrofágy (subpopulace T a B) bazofily	CD25 α je nízkoafinitní receptor pro L-2, CD25 α asociován s gp75, který představuje vysokoafinitní receptor pro L-2, signální transdukce CD25 α - β
CD45	pan-leukocytární antigen	transmembránová molekula s enzymatickou aktivitou (protein-tyrozin-fosfatáza); regulace signální transdukce a aktivace lymfocytů
CD56	NK buňky aktivované lymfocyty normální buňky kostní dřeně	homotypická adhezivní molekula, uplatňuje se v adhezi NK buněk a v diferenciaci buněk během jejich embryogeneze
CD57	NK buňky T-subpopulace B-subpopulace	adhezivní funkce (neurální adhezivní molekula)
CD69	T-populace monocyty NK buňky aktivované buňky	může být asociován s funkční aktivitou NK buněk, uplatňuje se v aktivaci buněk (zprostředkovává časné aktivační signály)
$\alpha\beta$ T-buněčný receptor	T-lymfocyty	receptor T-lymfocytů pro antigen tvořený $\alpha\beta$ řetězcí; rozpoznávání cizorodých antigenů v komplexu s HLA I. nebo II. třídy; podílí se na signální transdukci
$\gamma\delta$ T-buněčný receptor	T-lymfocyty	receptor T-lymfocytů pro antigen tvořený $\gamma\delta$ řetězcí; rozpoznávání cizorodých antigenů
HLA-DR	B-lymfocyty monocyty	hlavní transplantační antigen s velkým polymorfizmem, regulace CD4 buněčných interakcí, modulace smíšené lymfocytární reakce, vazba peptidů
CD45RO	T-buňky (subpopulace) B-buňky (subpopulace) granulocyty	transmembránová molekula s enzymatickou aktivitou (protein-tyrozin-fosfatáza), reguluje signální transdukci, receptor pro CD22
CD45RA	B-populace monocyty granulocyty T-subpopulace („naivní a panenské“ T bb.)	transmembránová molekula s enzymatickou aktivitou (protein-tyrozin-fosfatáza), reguluje signální transdukci a aktivaci lymfocytů

Výsledky

Průměrná čistota lymfocytárních suspenzí izolovaných z tumoru byla 89,3 % a nepůsobila obtíže při měření a porovnání nálezů ve vzorcích žilní krve a buněčné suspenze z nádoru.

Výsledky měření jsou uvedeny v tab. 2. Počty buněk nesoucích fenotyp CD3⁺/69⁺ a CD3⁺/8⁺ byly signifikantně vyšší v TIL v porovnání s PBL (s lymfocyty v krvi z renální a loketní žíly). Naopak, počty buněk s fenoty-

pem CD3⁺/4⁺, CD19⁺, CD3⁺/16⁺/56⁺, CD3⁺/25⁺, CD8⁺/57⁺, CD4⁺/45RA⁺ byly signifikantně vyšší v PBL v porovnání s TIL. CD3⁺/8⁺ T-lymfocyty byly dominantní lymfocytární populací v nádorové tkáni, naopak CD3⁺/4⁺

Tab. 2. Imunofenotypové nálezy mononukleárních buněk v periferní krvi (PK), renální žíle (RŽ) a tumor infiltrujících lymfocytech (v nádoru ledviny – TIL).

	Med. PK (25–75%)	Med. RŽ (25–75%)	Med. TIL (25–75%)	PK – RŽ p	PK – TIL p	RŽ – TIL p
čistota	99,0 (98,6–99,3)	98,6 (97,6–99,2)	89,3 (75,7–94,3)	0,036	< 0,001	< 0,001
CD3 ⁺	72,5 (62,2–72,2)	72,8 (63,8–78,8)	70,4 (61,7–76,2)	n.s.	n.s.	n.s.
CD3 ⁺ /CD4 ⁺	41,4 (35,5–48,7)	40,2 (35,3–48,4)	24,9 (18,9–31,0)	n.s.	< 0,001	< 0,001
CD4 ⁺ /CD45RA ⁺	6,1 (3,3–8,9)	6,1 (3,0–8,6)	0,6 (0,2–1,0)	n.s.	< 0,001	< 0,001
CD4 ⁺ /CD45RO ⁺	26,2 (22,8–32,6)	25,8 (22,4–30,4)	23,2 (15,0–29,7)	n.s.	n.s.	n.s.
CD3 ⁺ /CD8 ⁺	25,3 (17,9–34,8)	25,1 (17,5–36,5)	39,7 (25,1–51,0)	n.s.	< 0,001	< 0,001
CD3 ⁺ /CD8 ⁺	4,3 (2,5–8,0)	4,1 (2,4–7,5)	3,9 (2,5–6,0)	n.s.	n.s.	n.s.
CD8 ⁺ /αβ ⁺	23,6 (19,2–32,9)	25,5 (17,8–38,9)	33,1 (21,7–46,0)	n.s.	0,014	0,032
CD8 ⁺ /γδ ⁺	0,6 (0,3–0,9)	0,3 (0,2–1,8)	1,2 (0,4–3,1)	n.s.	n.s.	n.s.
CD8 ⁺ /DR ⁺	1,1 (0,5–2,4)	1,2 (0,6–1,6)	1,1 (0,3–3,5)	n.s.	n.s.	n.s.
CD8 ⁺ /CD57 ⁺	12,1 (7,3–15,6)	11,7 (8,0–18,7)	4,4 (1,5–6,8)	n.s.	< 0,001	< 0,001
CD3 ⁺ /CD16 ⁺ CD56 ⁺	13,7 (10,2–19,9)	15,5 (10,0–22,3)	17,9 (6,3–23,5)	n.s.	n.s.	n.s.
CD3 ⁺ /CD16 ⁺ CD56 ⁺	5,5 (2,8–9,2)	5,3 (3,0–9,1)	3,4 (1,8–5,9)	n.s.	0,008	0,007
CD3 ⁺ /CD69 ⁺	1,1 (0,7–1,6)	1,2 (0,7–2,0)	32,1 (13,9–45,6)	n.s.	< 0,001	< 0,001
CD3 ⁺ /DR ⁺	2,0 (0,9–2,7)	1,8 (1,1–2,9)	1,9 (0,6–4,3)	n.s.	n.s.	n.s.
CD3 ⁺ /CD25 ⁺	3,0 (2,1–3,6)	3,1 (2,0–3,9)	2,1 (1,0–3,2)	n.s.	0,005	0,006
CD19 ⁺	9,8 (6,7–13,5)	9,4 (5,5–11,5)	1,0 (0,4–1,6)	n.s.	< 0,001	< 0,001
index CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,4 (1,0–1,7)	1,4 (1,0–1,9)	0,6 (0,4–0,8)	n.s.	< 0,001	< 0,001

PK – periferní krev, RŽ – renální žilní krev, TIL – tumor infiltrující lymfocyty, Med. – medián, p – hladina významnosti

T-lymfocyty byly většinou populací v periferní a renální žilní krvi. Zastoupení NK buněk (CD3⁺/16⁺/56⁺) a CD3⁺/DR⁺, CD8⁺/DR⁺, CD25⁺, CD4⁺/45RO⁺ T-lymfocytů a minoritní populace cytotoxických buněk CD3⁺/8⁺ nepatřící do T-lymfocytů nevykazovalo statisticky významné rozdíly. Lymfocytární populace v renální žíle se neliší od žíly periferní.

Diskuse

Klinická pozorování jak spontánních regresí primárních i sekundárních ložisek RCC, tak i léčebné odezvy u 15–20 % nemocných po podání IL-2 svědčí pro účinnou protinádorovou odezvu. Za protinádorovou odezvu jsou zodpovědní tumor infiltrující lymfocyty (TIL). Jedná se o heterogenní populaci cytotoxických buněk nesoucích převážně fenotyp CD3⁺/CD8⁺ a CD3⁺/CD16⁺/CD56⁺. CD4⁺ T-lymfocyty a B-lymfocyty jsou většinou autorů shledány minoritní populací v TIL

[27]. Na všech uvedených buněčných populacích izolovaných z RCC jsou nalézány znaky časně i pozdní aktivace [5]. Pro efektivní protinádorovou odezvu je důležité rozpoznání nádorových struktur T-lymfocyty. V tomto ohledu je za klíčovou považována role dendritických buněk (dendritic cells – DC) a monocytů infiltrujících tumor. Dendritické buňky předkládají nádorové antigeny cytotoxickým lymfocytům a mohou svým cytokinovým spektrem upřednostňovat Th1 nebo Th2 odezvu CD4⁺ subsetů [11].

Až u 70 % renálních tumorů tvoří CD8⁺ T-lymfocyty hlavní buněčnou populaci TIL buněk [21]. S tímto nálezem souhlasí i naše pozorování. Převaha populace CD3⁺CD8⁺ buněk byla popsána i ve stromatu nádorů vycházejících z jiných tkání [9,20,29,40,41]. Protinádorovou aktivitu vykazují CD4⁺ T-lymfocyty, které jsou hlavním producentem IL-2. Působením IL-2 je indukována diferenciace

a aktivace cytotoxických T-lymfocytů a NK buněk [6]. Th1 subset CD4⁺ T-lymfocytů produkuje IFN a zesiluje cytotoxickou funkci CD8⁺ T-lymfocytů. Naopak převažuje-li aktivita Th2 subsetu, je upřednostňována protilátková odezva a prostřednictvím IL-4 a IL-5 je potlačována funkce Th1 podtypu. Přítomnost efektorových buněk infiltrujících tumor a jejich aktivace je důkladem lokální imunitní odezvy [15].

Igarashi et al porovnali zastoupení lymfocytárních subpopulací v tumor infiltrujících lymfocytech (TIL). Tato studie hodnotila korelaci mezi fenotypem TIL a odezvou na léčbu interferonem-α. U nemocných s pokročilým onemocněním (III. a IV. stadiem), u kterých CD4⁺ T-lymfocyty tvořily více než 40 % TIL buněk, bylo podáním interferonu-α dosaženo parciální remise nebo stabilizace nemoci. Naopak, u nemocných s počtem CD8⁺ TIL vyšším než 25 % nebylo dosaženo léčebné odezvy. Zvýšení CD8⁺ a snížení CD4⁺

tumor infiltrujících lymfocytů bylo spojeno z horší prognózou onemocnění. Nadto in vitro provedené funkční analýzy TIL potvrdily, že CD4⁺ T-lymfocyty vykazují známky aktivace, zatímco CD8⁺ T-lymfocyty v některých případech neexprimovaly povrchové molekuly svědčící pro aktivaci a tyto buňky nebyly schopny efektivně indukovat cytolyzu terčových buněk [17]. U našich pacientů byl receptor pro antigen (TcR) na CD8⁺ T-lymfocytech tvořený převážně heterodimerem α/β . Poměr CD8⁺ T-lymfocyt s TcR α/β k TcR γ/δ byl stejný v periferní krvi, krvi z renální žíly i TIL. Naproti tomu u pacientů s lokalizovanou chorobou (I. a II. stadium) nemá fenotyp TIL prognostický význam [35,38].

Specifické T-lymfocyty se po setkání s antigenem aktivují, což je provázeno změnou exprese aktivačních molekul, jako například molekuly CD69, HLA-DR a receptoru pro IL-2 (CD25) [22,31]. Exprese časné aktivační molekuly CD69 je detekovatelná za 2–3 hod po stimulaci. Počty buněk nesoucích fenotyp CD3⁺/69⁺ byly u našich pacientů signifikantně vyšší v TIL než v periferní krvi. Arteficiální stimulace při zpracování nádorové tkáně byla blokována azidem sodným, který byl obsažen v ředícím i promývacím roztoku (0,1%). Tiemssen popsala zvýšenou expresi CD69 molekuly na antigeny stimulovaných T-lymfocytech. Vlivem TGF- β (transformujícího růstového faktoru) na aktivované T-lymfocyty došlo k signifikantnímu zvýšení exprese CD69 [36]. Aktivované lymfocyty však neměly vyjádřenou expresi molekuly CD25, která odráží časné stadium buněčné aktivace a je přítomna na TIL nemocných, odpovídajících na léčbu rekombinantními cytokiny [34]. Zvýšená exprese CD25 (řetězce α , který je součástí receptoru pro IL-2) na T-lymfocytech u renálního karcinomu, je považována za průkaz lokální protinádorové aktivity [1,2,23,32]. V našem souboru jsme našli naopak signifikantně snížené zastoupení CD25⁺ T-lymfocytů v TIL v porovnání s peri-

ferní krvi [28,30]. Vlivem nádorového mikroprostředí je porušeno vyzrávání aktivovaných TIL, část buněk vstupuje do apoptózy. V nádorové tkáni, ale i v séru nemocných s nádory je prokázán TGF β , produkovaný nádorovými buňkami. TGF β se významně podílí na nádorové angiogenezi.

U našich nemocných nebyl v porovnání s periferní krví zjištěn ani zvýšený počet TIL nesoucích molekulu HLA-DR. Vyjádření HLA-DR molekul je projevem prolongované stimulace. Molekuly HLA-DR II. třídy je možné prokázat na buňkách se zpožděním 48–72 hod po antigenní stimulaci [8]. Výsledky naší studie se shodují s jinými pracemi, popisujícími expresi molekul HLA-DR na CD3 a CD8 pozitivních T-lymfocytech. Ačkoliv zastoupení CD3⁺/DR⁺ a CD8⁺/DR⁺ buněk bylo u našich pacientů vyšší v TIL než PBL, nebyly tyto rozdíly signifikantní [7,37].

NK buňky v periferní krvi jsou fenotypově heterogenní populací. CD56 molekula je prezentována téměř na všech NK buňkách, zatímco CD57 molekula je prezentována jen na zralých NK buňkách. Přítomnost NK buněk je důležitá pro účinnost léčby IL-2. Donskov et al uvádí, že v průběhu léčby světlobuněčného karcinomu ledviny nebyla prokázána detekovatelná přítomnost CD56⁺ buněk v tumoru [12]. Naopak bylo prokázáno, že přítomnost CD57 pozitivních buněk je pro dosažení léčebné odezvy po podání IL-2 nezbytná. Bylo potvrzeno, že přítomnost CD57⁺ NK buněk v nádoru má vliv na délku přežití jak u renálního karcinomu, tak u karcinomu kolorektálního a u karcinomu žaludku. NK buňky jsou považovány za klíčovou populaci zajišťující kontrolu nádorového bujení [18]. Nízký počet NK buněk mezi TIL je spojen s vyšším rizikem progresu nádoru. Chybění CD3⁺CD56⁺CD16⁺ buněk v periferní krvi a/nebo mezi TIL buňkami u nemocných s RCC je spojeno s rizikem rozvoje metastáz, což svědčí o protektivní roli těchto buněk [16,39]. Zastoupení NK buněk v periferní krvi a nádorovém stromatu ne-

vykazovalo u našich nemocných rozdíly [24].

Infiltrace nádoru lymfocyty vykazují cytotoxickou aktivitu namířenou proti nádorovým buňkám je považována za známku účinné protinádorové odezvy. Navzdory těmto nálezům, spontánní regrese tumoru a terapeutická odezva na podání biologické léčby jsou pozorovány pouze u malé části nemocných s karcinomem ledviny. Přítomnost aktivovaných T-lymfocytů nemusí odrážet protinádorovou odezvu. Zvýšená exprese molekuly CD69, která není nenásledovaná vyjádřením CD25 a HLA-DR na T-lymfocytech, je třeba považovat za projev selhání protinádorové imunitní odezvy [21,37].

B-lymfocyty tvoří minoritní populaci TIL. Ačkoliv přesná role B-lymfocytů není známa, vyjádření molekuly CD69 na B-lymfocytech infiltrujících tumor svědčí o jejich účasti v protinádorové odezvě [25]. V případě nádoru může protilátková odezva na nádorové antigeny vést po navázání protilátky k zabíjení epitelových buněk rozpoznávaných specifickými cytotoxickými T-lymfocyty a potencionovat nádorový růst. Vyšší zastoupení B-lymfocytů mezi TIL bylo pozorováno u nemocných s převahou aktivity Th2 infiltrujících lymfocytů. Význam role antigen prezentující buňky nebyl v případě B-lymfocytů u nádorových onemocnění jednoznačně prokázán [3,27,33,40,41]. U našich nemocných tvořily B-lymfocyty méně než 1 % TIL a jejich počty byly v porovnání s počty v PBL signifikantně nižší.

K odlišným závěrům dospěl Shabtai v práci, která porovnávala zastoupení T- a B-lymfocytů v TIL a periferní žilní krvi u 8 nemocných s pokročilým renálním karcinomem. Poměr počtu B-lymfocytů infiltrujících nádor k B-lymfocytům v periferní krvi byl 2,4, zatímco poměr T-lymfocytů infiltrujících nádor k T-lymfocytům v periferní krvi byl 0,48. Navíc T-lymfocytární populace byla zastoupena převážně CD3⁺/CD4⁺ lymfocyty [34]. U těchto nemocných pravděpodobně došlo k převážení

Th2 odezvy nad Th1 s tvorbou protiláték blokujících specifické nádorové antigeny a cytokinů, které umožnily nádorový růst [15].

Porovnáním lymfocytárních subpopulací v periferní krvi a v renální žíle nebyl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl v jejich zastoupení. Tento nálezný jsme vzhledem k relativnímu průtoku renální žílou předpokládali, nicméně literární údaje o tomto nálezu jsme v literatuře nenalezli. V naší studii jsme využili možnosti peroperačního odběru krve z renální žíly.

Závěr

Lze shrnout, že zastoupení aktivovaných T-lymfocytů v nádoru je vyšší než v periferní krvi. CD3⁺/CD8⁺ T-lymfocyty jsou dominantní lymfocytární populací TIL. Ze znalosti fenotypu efektorových buněk lze usuzovat na charakter protinádorové imunitní odezvy. Za hlavní příčinu selhání protinádorové odezvy je považováno cytokinové mikroprostředí uvnitř nádoru a nedostačující nádorové antigenní podněty. Výsledkem je neúčelná zánětová lokální reakce a progresse tumoru. K prolomení tohoto stavu, při kterém jsou tolerovány nádorové struktury, nevedou ve většině případů ani imunomodulační zásahy interleukinem-2 a interferonem- α [13].

Tento příspěvek vznikl s podporou grantu výzkumného záměru IGA: NR/8914-4.

Zkratky

BP-filtr	bandpass filtr
CV	koeficient variability
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FITC	fluorescein izothiokyanát
Med.	medián
p	probability level (hladina významnosti)
PC5	phycoerythrin cyanin 5
PE	phycoerythrin
PI	propidium jodid
RNA	ribonukleová kyselina
TNM	Tumor, Nodi, Metastasis klasifikace

Literatura

1. Bayer AL, Baliga P, Woodward JE. Differential effects of transferrin receptor

blockade on cellular mechanisms involved in graft rejection. *Transplant Immunol* 1999; 7: 131.

2. Bayer AL, Baliga P, Woodward JE. Transferrin receptor in T cell activation and transplantation. *J Leukocyte Biol* 1998; 64: 19.

3. Bilik R, Mor C, Hazaz B et al. Characterisation of T lymphocyte populations infiltrating primary breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother* 1989; 28: 143–147.

4. Böhm M, Ittenson A, Schierbaum KF et al. Pretreatment with interleukin-2 modulates peri-operative immuno-dysfunction in patients with renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2002; 41: 458–468.

5. Bremers AJA, Parmiani G. Immunology and immunotherapy of human cancer: present concepts and clinical developments. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000; 34: 1–25.

6. Bubeník J. Interleukin-2 Therapy of Cancer. *Folia Biol (Praha)* 2004; 50: 120–130.

7. Coventry BJ, Weeks SC, Heckford SE et al. Lack of IL-2 cytokine expression despite IL-2 messenger RNA transcription in tumor-infiltrating lymphocytes in primary human breast carcinoma: selective expression of early activation markers. *J Immunol* 1996; 156: 3486.

8. Chadburn A, Inghirami G, Knowels DM. The kinetics and temporal expression of T cell activation-associated antigens CD15 (LeuM1), CD30 (Ki-1) EMA and CD11c (LeuM5) by benign activated T cells. *Hematol Pathol* 1992; 6: 193.

9. Chakraborty NG, Sporn JR, Pasquale DR et al. Suppression of lymphokine-activated killer cell generation by tumor-infiltrating lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; 59: 407–416.

10. Characiejus D, Pašukonienė V, Kazlauskaitė N et al. Predictive value of CD8^{high}CD57⁺ lymphocyte subset in interferon therapy of patients with renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 2002; 22: 3679–3684.

11. de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Spr Sem Immun* 2005; 26: 289–307.

12. Donskov F, Bennedsen KM, von der Maase H et al. Intratumoural and peripheral blood lymphocyte subsets in patients with metastatic renal cell carcinoma undergoing interleukin-2 based immunotherapy: association to objective response and survival. *Br J Cancer* 2002; 87: 194–201.

13. Eckschlag T, Kodet R. Renal cell carcinoma in children: a single institution's experience. *Med Pediatr Oncol* 1994; 23: 36–39.

14. Elsässer-Beile U, Gierschner D, Welchner T et al. Different expression of Fas and Fas ligand in tumor infiltrating and peripheral lymphocytes of patients with renal cell carcinomas. *Anticancer Res* 2003; 23: 433–438.

15. Elsässer-Beile U, Grussenmeyer T, Gierschner D et al. Semiquantitative analysis of Th1 and Th2 cytokine expression in CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ renal-cell-carcinoma-infiltrating lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother* 1999; 48: 204–208.

16. Hayakawa K, Morita T, Augustus LB et al. Human renal cell carcinoma cells are able to activate natural killer cells. *Int J Cancer* 1992; 51: 290.

17. Igarashi T, Takahashi H, Tobe T et al. Effect of tumor-infiltrating lymphocyte subsets on prognosis and susceptibility to interferon therapy in patients with renal cell carcinoma. *Urol Int* 2002; 69: 51–56.

18. Indrová M, Bubeník J, Jakoubková J et al. Subcutaneous interleukin-2 in combination with vinblastine for metastatic renal cancer: cytolytic activity of peripheral blood lymphocytes. *Neoplasma* 1994; 41: 197–200.

19. Klener P jr, Anděra L, Klener P et al. Cell death signalling pathway in the pathogenesis and therapy of haematologic malignancies: Overview of therapeutic approaches. *Folia Biol (Praha)* 2006; 52: 119–136.

20. Koo AS, Tso CL, Shimabukuro T et al. Autologous tumor-specific cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes derived from human renal cell carcinoma. *J Immunother* 1991; 10: 347–354.

21. Kowalczyk D, Skorupski W, Kwias Z et al. Flow cytometric analysis of tumour-infiltrating lymphocytes in patients with renal cell carcinoma. *Br J Urol* 1997; 80: 543–547.

22. Kronke M, Leonard WJ, Depper JM et al. Sequential expression of genes involved in human T lymphocyte growth and differentiation. *J Exp Med* 1985; 161: 1593–1598.

23. Lucivero G, Dalla Mora L, Bresciano E et al. Functional characteristics of cord blood T lymphocytes after lectin and anti-CD3 stimulation. Differences in the way T cells express activation molecules and proliferate. *Int J Clin Res* 1996; 26: 255.

24. Lukešová Š, Kopecký O, Vrobllová V et al. Porovnání v zastoupení lymfocytárních populací u světlobuněčného karcinomu ledviny (v nádorové tkáni, renální žíle a periferní krvi). 307–309. In: Edukační sborník z XXX. brněnských onkologických dnů s XX. Konferencí pro sestry a laboranty. Brno: Masarykův onkologický ústav 2006.
25. Malinowski K, Kono K, Takayama T et al. Inhibition of lymphocyte proliferative responses by renal cell carcinoma extract. *Transplant Proc* 1997; 29: 839.
26. Martel CL, Lara PN Renal cell carcinoma: current status and future directions. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 45: 177–190.
27. Mitropoulos D, Kooi S, Rodriguez-Villanueva J et al. Characterization of fresh (uncultured) tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) and TIL-derived T cell lines from patients with renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol* 1994; 97: 321–327.
28. Nakamura K, Kitani A, Fuss I et al. TGF- β 1 plays an important role in the mechanism of CD4⁺ CD25⁻ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol* 2004; 172: 834–842.
29. Panelli MC, Nagorsen D, Wang E et al. Mechanism of immune response during immunotherapy. *Yonsei Med J* 2004; 45 (Suppl): 15–17.
30. Park H, Paik D, Jang E et al. Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor- β -costimulated CD4⁺ CD25⁻ T cells. *Inter Immunol* 2004; 16: 1203–1213.
31. Reed JC, Alpers JD, Nowell PC et al. Sequential expression of protooncogenes during lecithin-stimulated mitogenesis of normal human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 3982–3986.
32. Rodriguez MA, De Sanctis JB, Blasini AM et al. Human IFN- γ up-regulates IL-2 receptors in mitogen-activated T lymphocytes. *Immunol* 1990; 69: 554.
33. Santin AD, Ravaggi A, Bellone S et al. Tumor-infiltrating lymphocytes contain higher numbers of type 1 cytokine expressors and DR⁺ T cells compared with lymphocytes from tumor draining lymph nodes and peripheral blood in patients with cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2001; 81: 424–432.
34. Shabtai M, Ye H, Frischer Z et al. Increased expression of activation markers in renal cell carcinoma infiltrating lymphocytes. *J Urol* 2002; 168: 2216–2219.
35. Schoof DD, Terashima Y, Peoples GE et al. CD4⁺ T cell clones isolated from human renal cell carcinoma possess the functional characteristics of Th2 helper cells. *Cellular Immunol* 1993; 150: 114–123.
36. Tiemessen MM, Kunzmann S, SchmidT-Weber CB et al. Transforming growth factor- β inhibits human antigen-specific CD4⁺ T cell proliferation without modulating the cytokine response. *Inter Immunol* 2003; 12: 1495–1504.
37. van den Hove LE, van Gool SW, van Poppel H et al. Identification of an enriched CD4⁺ CD8 α^{++} CD8 β^{+} T-cell subset among tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 1997; 71: 178.
38. van den Hove LE, van Gool SW, van Poppel H et al. Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumour-infiltrating lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 501–509.
39. Whiteside TL, Herberman RB The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 704–710.
40. Whitford P, Mallon EA, George WD et al. Flow cytometric analysis of tumour infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Br J Cancer* 1990; 62: 971–975.
41. Zeromski J, Dworacki G, Kruk-Zagajewska A et al. Assessment of immunophenotype of potentially cytotoxic tumor infiltrating cells in laryngeal carcinoma. *Arch Immunol Ther Exp* 1993; 41: 57–62.

MUDr. Šárka Lukešová

www.fnhk.cz

e-mail: mudr.sarka.lukesova@seznam.cz

Doručeno do redakce: 18. 12. 2006

Přijato po recenzi: 8. 10. 2007

www.kardiologickeforum.cz