

Úvod

Již dlouhou dobu je v oblasti biologických vlastností nádorů předmětem studia vztah mezi nádorem a imunitním systémem. Ten hraje důležitou roli v obraně organismu proti nádorovému bujení, některé imunitní reakce však působí opačně a růst tumoru podporují mimo jiné také podílem v indukci angiogeneze. V obraně proti nádorovému bujení jsou T lymfocyty spolu s NK buňkami nejdůležitější efektorovou strukturou a jsou také jednou z cílových struktur při protinádorové imunoterapii (například aktivace T lymfocytů pomocí stimulace interleukinem 2 používaná v terapii renálního karcinomu).

Prognostický význam lymfocytů v nádoru je studován již několik desetiletí. V poslední době se začaly rozlišovat tumor infiltrující (intraepiteliální) a tumor asociované (stromální) lymfocyty. Prognostický význam má pravděpodobně pouze první zmiňovaná kategorie a to konkrétně CD8⁺ cytotoxické T lymfocyty a TH1 subset CD4⁺ T lymfocytů. Význam protilátkové imunity a B lymfocytů se v protinádorové imunitě nejeví jako zásadní. Za příznivý prognostický faktor se považuje jak vyšší počet CD3⁺ (obecný T lymfocytární marker) tak i CD8⁺ tumor infiltrujících lymfocytů. Naproti tomu tento vztah není popisován u CD4⁺ lymfocytů, protože TH2 subset produkuje cytokiny s angiogenním působením a proto má pravděpodobně spíše pronádorový vliv.

Prezentovaná studie se zabývá vztahem CD3⁺ lymfocytů k odpovědi na neoadjuvantní chemoterapii u karcinomu prsu. Cílem bylo posouzení jak jejich prediktivního významu, tak i změn v aktivitě imunitního systému po proběhlé chemoterapii. Důvodem pro druhý z cílů byl předpoklad, že k cytotoxické aktivitě CD8⁺ T lymfocytů je důležité prezentování antigenu nádorových buněk. Při chemoterapii dochází k apoptóze nádorových buněk a jejich antigeny jsou proto dostupnější, a proto lze předpokládat vzestup počtu tumor infiltrujících lymfocytů. Výsledky byly korelovány s průkazem standardně vyšetřovaných imunohistochemických markerů: estrogenových a progesteronových receptorů, proliferčního markeru Ki-67, onkoproteinu p53 a onkoproteinu HER2/neu.

LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA NÁDORŮ PRSU

Metodika

U každé ze 73 pacientek sledovaných na Klinice onkologie a radioterapie FN Hradec Králové, léčených neoadjuvantní chemoterapií – kombinací paclitaxelu a doxorubicinu -v letech 1998-2003, byl vyšetřován vzorek z jehlové biopsie prsu nebo drobné kožní excize (u tumorů infiltrujících kůži) odebraný před podáním neoadjuvantní chemoterapie a následně resekát prsu. Pacientky byly vybírány na základě dostatečného množství materiálu v tkáňových blocích (zejména v případě jehlové biopsie). Materiál byl standardně zpracováván, byl fixován 10% formalínem a zalit v parafinu. Řezy silné 4 m byly barveny hematoxylinem eosinem. Imunohistochemická barvení byla prováděna streptavidin-biotinovou metodou s peroxidázovým detekčním systémem (EnVision, DAKO). Použité markery: CD 3 (polyklonální, DAKO), estrogenové receptory (1D5, DAKO), progesteronové receptory (PgR636, DAKO), Ki-67 (MIB-1, DAKO), p53 (DO-7, DAKO). Ke zhodnocení HER2/neu byl použit standardizovaný kit HercepTest™ (DAKO)

Metodika hodnocení počtu lymfocytů byla stejná pro vzorky před i po chemoterapii. Počítána byla průměrná hodnota ze tří zorných polí při zvětšení 400x a maximální hodnota. Zvlášť byly hodnoceny elementy intraepiteliální a zvlášť lymfocyty ve stromatu. Stejný systém hodnocení byl použit pro kvantifikaci lymfocytů v normální prsní žláze. Ostatní rutinně vyšetřované markery byly hodnoceny pouze v invazivním tumoru a to standardními metodikami (u ER a PR imunoreaktivní skóre, procento Ki-67 pozitivních nádorových buněk, semikvantitativní hodnocení p53 včetně procenta pozitivních nádorových buněk a HER skóre dle doporučení výrobce kitu).

Statistické hodnocení bylo provedeno Mann-Whitneyovým testem a T testem.

Výsledky

Věk pacientek v souboru se pohyboval od 22 do 75 let, medián věku 56 let. Patologická kompletní odpověď, zde braná jako nepřítomnost tumoru v resekátu (tj. ani in situ komponenty) a nepostižené lymfatické uzliny, se vyskytla u 10 pacientek (tj. 16%).

Histologický typ tumoru ve vzorcích před chemoterapií:

	pCR	non pCR
duktální	60%	5%
lobulární	30%	19%
ostatní	10%	6%

Stupeň diferenciace tumoru ve vzorcích před chemoterapií:

	pCR	non pCR
grade 1	10%	3%
grade 2	50%	49%
grade 3	40%	48%

Srovnání lymfocytů v tumoru před chemoterapií dle odpovědi na chemoterapii:

	pCR	non pCR
CD3 tumor infiltrující lymfocyty max.	14 ± 14	5 ± 7
CD3 tumor infiltrující lymfocyty prům.	7 ± 8	2 ± 3
CD3 tumor asociované lymfocyty max.	263 ± 251	213 ± 162
CD3 tumor asociované lymfocyty prům.	34 ± 30	47 ± 52

Srovnání lymfocytů v tumoru před a po chemoterapii:

	před NCHT	po NCHT
CD3 tumor infiltrující lymfocyty max.	7 ± 8	10 ± 16
CD3 tumor infiltrující lymfocyty prům.	3 ± 4	2 ± 6
CD3 tumor asociované lymfocyty max.	220 ± 176	359 ± 370
CD3 tumor asociované lymfocyty prům.	45 ± 49	41 ± 90

Srovnání lymfocytů v normální prsní tkáni po chemoterapii dle odpovědi na chemoterapii:

LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA NÁDORŮ PRSU

	pCR	non pCR
CD3 intraepiteliální lymfocyty max.	18 ± 12	19 ± 20
CD3 intraepiteliální lymfocyty prům.	8 ± 7	8 ± 10
CD3 stromální lymfocyty max.	116 ± 104	133 ± 174
CD3 stromální lymfocyty prům.	28 ± 34	25 ± 29

Ostatní markery před chemoterapií dle odpovědi na chemoterapii:

	pCR	non pCR		pCR	non pCR
p53 (%)	31 ± 38	13 ± 27	HER skóre 0	40%	40%
ER (IRS)	5 ± 5	5 ± 5	HER skóre 1	30%	34%
PR (IRS)	1 ± 3	4 ± 4	HER skóre 2	10%	13%
Ki67 (%)	36 ± 26	26 ± 20	HER skóre 3	20%	13%

Srovnání ostatních markerů před a po chemoterapii:

	před NCHT	po NCHT		před NCHT	po NCHT
p53 (%)	11 ± 25	12 ± 24	HER skóre 0	40%	34%
ER (IRS)	6 ± 5	5 ± 4	HER skóre 1	34%	43%
PR (IRS)	4 ± 4	6 ± 5	HER skóre 2	12%	8%
Ki67 (%)	26 ± 20	16 ± 21	HER skóre 3	14%	15%

Statisticky významný rozdíl byl u následujících položek:

- U maximálních ($p = 0,004$) a průměrných ($p = 0,05$) hodnot tumor infiltrujících lymfocytů mezi skupinami s pCR a bez pCR.
- U maximálních hodnot tumor infiltrujících ($p = 0,05$) i asociovaných ($p = 0,004$) lymfocytů mezi skupinami před a po chemoterapii.
- U p53 ($p = 0,03$) a progesteronových receptorů ($p = 0,01$) mezi skupinami s pCR a bez pCR.
- U Ki 67 mezi skupinami před a po chemoterapii ($p = 0,0002$).

Diskuze

Tumor infiltrující lymfocyty byly v souvislosti s neoadjuvantní chemoterapií dosud sledovány pouze v jedné studii (Demaria a kol.: Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy) čítající 25 pacientek. Hodnocení bylo semikvantitativní, hodnoceny byly pouze tumor infiltrující lymfocyty. Výsledky srovnání počtu tumor infiltrujících lymfocytů před a po chemoterapii však byly podobné jako v našem souboru. Prediktivní význam tumor infiltrujících lymfocytů zde nebyl prokázán. Náš soubor je také poměrně malý (skupina pCR čítá pouze 10 pacientek), nicméně vztah mezi tumor infiltrujícími lymfocyty a odpovědí na chemoterapii se zdá patrný a ukazuje na vhodnost ověření na větším souboru. Mimo tyto hodnoty jsme se pokusili zhodnotit rozdíl mezi resekáty po neoadjuvantní chemoterapii pacientek s pCR a bez ní hodnocením lymfocytů v normální prsní tkáni, zde není patrný výraznější rozdíl, proto se zdá, že odpověď na chemoterapii závisí více na vlastnostech tumoru (včetně toho jakou odpověď imunitního systému indukují) než na obecném stavu imunitního systému, nicméně i zde je třeba brát výsledky vzhledem k malému rozsahu souboru pouze jako předběžné.

Prediktivní hodnota odpovědi na chemoterapii byla v souladu s literárními údaji prokázána u exprese progesteronového receptoru a u onkoproteinu p53. Literárně jsou udávány jako predikční faktor také vyšší grade, vyšší proliferativní aktivita, negativita exprese estrogenového receptoru a overexprese onkoproteinu HER2/neu, u nichž byl (kromě stupně diferenciace a exprese estrogenových receptorů) v našem souboru patrný rozdíl mezi skupinou bez reziduálního tumoru a ostatními pacientkami, ovšem nedosahoval statistické významnosti. Důvodem může být poměrně malý soubor i metodické nedostatky.

Závěr

Naše studie ukazuje, že mimo známého prognostického významu tumor infiltrujících lymfocytů, jsou tyto velmi pravděpodobně i prediktivním markerem v odpovědi na chemoterapii. Ze vzestupu maximálních hodnot T lymfocytů v tumoru po chemoterapii lze usuzovat na jejich úlohu v likvidaci nádorových buněk (resp. úklidové reakci) při chemoterapii. Jde o další posun vpřed v poznání reakcí mezi tumorem a imunitním systémem, i když zatím bez možnosti konkrétního terapeutického dopadu pro pacientky.

Práce byla podpořena grantem MZ ČR IGA NR 8392-3/2005.