

Imunologické aspekty v onkologii – cirkulující $\gamma\delta$ T lymfocyty

Immunological Aspects in Oncology – Circulating $\gamma\delta$ T Cells

Cibulka M.^{1,2}, Selingerová I.¹, Fědorová L.¹, Zdražilová Dubská L.¹⁻³

¹ Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

² Advanced Cell Immunotherapy Unit, Farmakologický ústav, LF MU, Brno

³ Oddělení laboratorní medicíny, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

$\gamma\delta$ T lymfocyty představují menšinovou populaci T lymfocytů, která se v základu liší konstrukcí TCR receptoru. Unikátní vlastnosti $\gamma\delta$ TCR dávají pak těmto buňkám jedinečné efektorové funkce a specifickou roli (nejen) v protinádorové imunitní odpovědi. V tomto článku popisujeme základní charakteristiku těchto buněk ve vztahu k onkologickým onemocněním. V experimentální části je pak provedena exploratorní analýza zastoupení $\gamma\delta$ T lymfocytů v běžné populaci a srovnání těchto hodnot s hodnotami pacientů s melanomem a karcinomem prsu. Medián procentuálního zastoupení $\gamma\delta$ ze všech lymfocytů byl 2,9 % (interkvartilové rozpětí – IQR 1,7–4 %). Medián absolutních počtů $\gamma\delta$ buněk v litru krve byl $5,05 \times 10^7$ (IQR 2,9–7,84 $\times 10^7$). Medián procentuálního zastoupení $\gamma\delta$ buněk mezi T lymfocyty byl 3,9 % (IQR 2,3–5,6 %). V referenční populaci nebyla prokázána závislost kvantitativních parametrů $\gamma\delta$ buněk na pohlaví či věku. Dále proběhla detailní imunofenotypizace popisující zastoupení paměťových subpopulací (pomocí značení CD45RO a CD27) a výskyt povrchových markerů HLA-Dr, CD69, CD25, CD28, CCR7, CTLA-4, ICOS, PD-1L a PD-1 mezi $\gamma\delta$ T lymfocyty u kontrol a pacientek s karcinomem prsu. Z této analýzy je patrné, že $\gamma\delta$ buňky netvoří uniformní populaci, ale mohou se ve svých povrchových markerech lišit, stejně jako se pak liší v efektorových funkcích.

Klíčová slova

$\gamma\delta$ T lymfocyty – nádorová onemocnění – imunitní systém – periferní krev – imunoterapie – T lymfocyty

Summary

$\gamma\delta$ T cells present a minor population of the T cell family which basically differs in construction of their T cell receptor (TCR). Thanks to the features of $\gamma\delta$ TCR, these cells can acquire unique effector functions and play a specific role (not only) in anti-tumor immune response. In this article, we describe the basic characteristics of this cell population and their connection to cancer. In the experimental part we performed exploratory analysis of circulating $\gamma\delta$ T cells in reference population and comparison with melanoma and breast carcinoma patients. The median percentage of $\gamma\delta$ T cells from all lymphocytes was 2.9% (interquartile range – IQR 1.7–4%). The median absolute numbers of $\gamma\delta$ cells per liter of blood was 5.05×10^7 (IQR 2.9–7.84 $\times 10^7$). The median percentage of $\gamma\delta$ cells between all CD3 T cells was 3.9% (IQR 2.3–5.6%). No correlation between $\gamma\delta$ T cells levels and gender or age was observed in reference population. Detailed immunophenotyping was also conducted describing representation of memory subsets (using CD45RO and CD27 markers) and presence of surface markers HLA-Dr, CD69, CD25, CD28, CCR7, CTLA-4, ICOS, PD-1L and PD-1 between $\gamma\delta$ T cells of the controls and breast carcinoma patients. From this analysis, it is evident that $\gamma\delta$ T cells do not represent a uniform population but they differ in surface markers as well as in their effector functions.

Key words

$\gamma\delta$ T cells – cancer – immune system – peripheral blood – immunotherapy – T lymphocytes

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), projekty MŠMT – NPU I – LO1413 a ACIU LM201117 a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This study was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), by the projects MEYS – NPS I – LO1413, ACIU LM201117, and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



RNDr. Lenka Zdražilová Dubská, Ph.D.
Oddělení laboratorní medicíny
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: dubska@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 4. 5. 2015

Přijato/Accepted: 9. 7. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20152560>

Úvod

Základní povrchovou strukturou T lymfocytů je tzv. T-cell receptor (TCR). Pomocí tohoto receptoru a kostimulačních molekul pak T lymfocyty rozpoznávají antigenní peptidy, ve většině případů prezentované pomocí hlavního histokompatibilního komplexu (major histocompatibility complex – MHC) antigen prezentujících buněk (antigen presenting cells – APC). TCR je transmembránový heterodimer složený ze dvou řetězců, buďto α a β nebo γ a δ . Každý řetězec sestává z intracelulární, transmembránové a extracelulární domény, jejíž variabilní doména je odpovědná za rozpoznání antigenního komplexu. Zatímco TCR receptor konvenčních $\alpha\beta$ T lymfocytů interaguje pouze s peptidy navázanými na molekuly MHC třídy I nebo II, $\gamma\delta$ TCR je schopen rozpoznat širokou škálu vlastních a cizích antigenů, např. malých peptidů, solubilních či membránových proteinů, fosfolipidů apod., bez prezentace prostřednictvím MHC [1], díky čemuž je jejich role v rámci imunitního systému spíše vrozená než adaptivní.

Mezi efektorové funkce $\gamma\delta$ T lymfocytů patří produkce cytokinů (INF- γ , TNF- α) a chemokinů (MIP-1 α/β , RANTES), stejně jako přímá cytotoxicita (perforin, granzym) a buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (antibody dependent cellular cytotoxicity – ADCC) [2]. U člověka a myši představují $\gamma\delta$ T lymfocyty méně než 5 % všech cirkulujících lymfocytů [3], naopak u přežvýkavců se jejich zastoupení pohybuje mezi 15 a 60 % a zde $\gamma\delta$ T lymfocyty mají roli spíše regulační než cytotoxickou [4]. Mimo cirkulaci a lymfatické orgány se $\gamma\delta$ T lymfocyty u člověka nacházejí také v epitelu. Přesné typy $\gamma\delta$ TCR receptoru jsou tkáňově specifické. Konkrétně V γ 9V δ 2 TCR je exprimován na 50–95 % $\gamma\delta$ buněk v periferní krvi [5], zatímco TCR složený z jiných V δ elementů se vyskytují na $\gamma\delta$ buňkách ve vnitřních orgánech (V δ 1 a V δ 3) nebo kůži (V δ 1) [6].

Cílem tohoto sdělení je shrnout literární data o úloze $\gamma\delta$ buněk u onkologických onemocnění. Cílem experimentální části je popsat: a) hladiny cirkulujících $\gamma\delta$ T lymfocytů v krvi jedinců z běžné populace a provést exploratorní analýzu; b) hodnoty cirkulujících $\gamma\delta$ T lymfocytů u pacientů s maligním melano-

mem a karcinomem prsu a c) detailního imunofenotypu.

Patofyziologická úloha $\gamma\delta$ T lymfocytů

Vzhledem k tomu, že aktivace $\gamma\delta$ buněk nevyžaduje zpracování a prezentování antigenu antigen-prezentující buňkou, mohou být $\gamma\delta$ buňky velmi rychle aktivovány a sloužit tak jako součást časné fáze imunitní odpovědi. Stejně jako NK buňky, i $\gamma\delta$ T lymfocyty reagují na stimulaci ligandy indukovanými infekcí nebo stresem, kterými jsou u lidí např. MICA/B nebo ULBP [7]. Tyto ligandy jsou obvykle exprimovány slabě či vůbec a k jejich upregulaci dochází pouze za přítomnosti stresu (poškození DNA, teplotní stres) nebo infekce. K aktivaci $\gamma\delta$ buněk pak dochází prostřednictvím jejich receptoru NKG2D [8,9], v některých případech přímo prostřednictvím $\gamma\delta$ TCR receptoru [10]. Lidské $\gamma\delta$ T buňky navíc exprimují receptory rozpoznávající molekulární vzorce (pattern recognizing receptors – PRR) jako např. toll-like receptory (TLR), které modulují jejich aktivaci [11]. Historicky je známa především schopnost mykobakterií reaktivovat $\gamma\delta$ T lymfocyty [12].

Studie ukázaly, že V γ 9V δ 2 buňky lidské periferní krve dokážou po aktivaci fosfoantigenem vyvolat imunitní odpověď typu Th1 [13], která je charakterizována produkcí cytokinů TNF- α a INF- γ a cytotoxickou aktivitou [14]. Tato diferenciace V γ 9V δ 2 buněk cestou Th1 pravděpodobně probíhá během jejich periferní expanze po vystavení environmentálním mikrobiálním antigenům. Novorozenecké $\gamma\delta$ buňky produkují INF- γ , schopnost produkovat TNF- α získávají po jednom měsíci od vystavení antigenům prostředí po porodu [15]. V *in vitro* podmínkách je ale v závislosti na přítomných cytokinech a stimulech TCR receptoru možno diferencovat $\gamma\delta$ buňky do fenotypů připomínajících Th2, Th17, folikulární pomocné T buňky (Tfh) nebo regulační T buňky (Treg) [16,17].

$\gamma\delta$ T lymfocyty a onkologická onemocnění

Mechanismus rozpoznání nádorové buňky

Aktivace a získání efektorových funkcí je u $\gamma\delta$ buněk, stejně jako u ostatních po-

pulací T lymfocytů, podmíněno stimulací TCR receptoru. Ten u $\gamma\delta$ T lymfocytů specificky rozeznává molekuly, jejichž exprese je zvýšená ve stresových podmínkách. V případě normální buňky je koncentrace izoprenoidních metabolitů (jako např. izopentyl pyrofosfát – IPP) příliš malá na to, aby byla rozpoznána V γ 9V δ 2 buňkami jakožto varovný signál. Deregulace izoprenoidního metabolismu má u některých nádorů za následek nadprodukcii IPP, které je pak detekováno V γ 9V δ 2 buňkami jako nádorový antigen [18]. K akumulaci IPP dochází např. při zablokování metabolismu kyseliny mevalonové pomocí aminobisfosfonátů. Stimulace NKR exprimovaného $\gamma\delta$ buňkami a částečně také receptoru NKG2D může rovněž efektivně spustit protinádorové funkce těchto buněk. NKG2D je exprimován V γ 9V δ 2 buňkami a váže se na nekonvenční MHC molekuly typu MIC nebo ULBP, které jsou exprimovány nádorovými buňkami [8,9].

Vliv na aktivitu jiných imunokompetentních buněk

Kromě přímého cytotoxického efektu se $\gamma\delta$ buňky podílí na protinádorové imunitní odpovědi také nepřímo prostřednictvím aktivace jiných buněčných typů, jako např. dendritických buněk, NK buněk a efektorových T lymfocytů (obr. 1). Při kontaktu s nádorovou buňkou nebo po stimulaci TCR, NKG2D či za působení cytokinů jako IL-12 nebo IL-18 produkují lidské $\gamma\delta$ T lymfocyty INF- γ a TNF- α [8,19]. Tyto dva cytokiny mohou potlačovat růst nádoru několika možnými způsoby, především však iniciací protinádorové aktivity CD8 buněk (obr. 1A) a inhibicí angiogeneze [20].

Pro-nádorová aktivita $\gamma\delta$ T lymfocytů

Imunosupresivní schopnosti lidských V γ 9V δ 2 buněk mohou také hrát důležitou roli. Tyto buňky dokáží po aktivaci produkovat cytokiny jako IL-4, IL-10 nebo TGF- β , potlačovat proliferaci T lymfocytů a tím vytvořit regulační mechanismus, který může výrazně potlačit protinádorovou imunitní odpověď [21]. Vše rozhodně závisí na kontextu, jelikož V γ 9V δ 2 buňky mohou vykazovat funkce Th1, Th2, Th17 i Th1/reg-like funkce a syntetizovat jak INF- γ , IL-4 a IL-17, tak

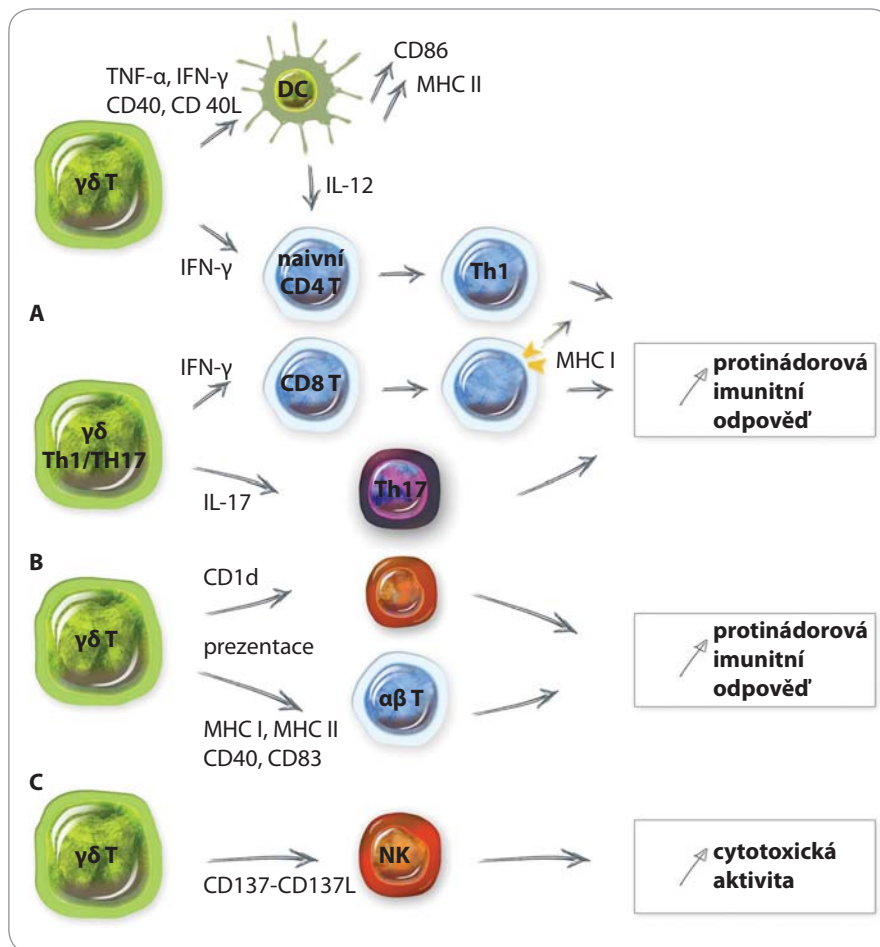
IL-10 nebo TGF- β . Poslední dva jmenované cytokiny mají imunosupresivní funkce a mohou být tím pádem zapojeny do pro-nádorových aktivit $\gamma\delta$ T lymfocytů. TGF- β hraje klíčovou roli v rozvoji nádoru díky schopnosti posílit invazivitu nádorových buněk a tvorbu metastáz prostřednictvím modulače imunitního prostředí v oblasti nádoru. Nejvýznamnější mechanismy podpory progresu nádoru spojené s TGF- β jsou epiteliálně-mezenchymální tranzice, únik imunitnímu systému a podpora proliferace nádorových buněk [22]. Exprese IL-10 a TGF- β je u různých typů nádorů často zvýšená. IL-10 přímo ovlivňuje funkce antigen prezentujících buněk prostřednictvím potlačení exprese MHC a kostimulačních molekul, což má za následek potlačení imunitní odpovědi, případně nastolení tolerance. IL-10 navíc potlačuje produkci Th1 cytokinů a podporuje T-regulační mechanismy.

$\gamma\delta$ T lymfocyty v protinádorové imunoterapii

$\gamma\delta$ buňky vykazují lytickou aktivitu nezávislou na MHC vůči nádorovým buňkám *in vitro* [23] a byla prokázána jejich schopnost infiltrovat různé typy nádorových tkání včetně karcinomu plic [24], karcinomu ledvin [25] a maligního melanomu [26]. Z tohoto důvodu se lidské V γ 9V δ 2 T lymfocyty jeví jako atraktivní cíl pro protinádorové terapie. Existují dva základní přístupy využití $\gamma\delta$ T lymfocytů v protinádorové terapii: 1. imunomodulace vedoucí k *in vivo* stimulaci $\gamma\delta$ buněk a jejich protinádorové aktivitě, 2. *in vitro* expanze a přímé podání $\gamma\delta$ T lymfocytů onkologickým pacientům.

$\gamma\delta$ lymfocyty jsou expandovatelné působením IL-2, a aminobisfosfonátů nebo fosfoantigenů *in vitro* [24,27], kde byla také prokázána jejich cytolytická aktivita vůči nádorovým buňkám [27]. Adoptivní transfer expandovaných $\gamma\delta$ T lymfocytů byl proveden u pacientů s metastatickým renálním karcinomem, mnohočetným myelomem a nemalobuněčným karcinomem plic [2,28–32]. Podání $\gamma\delta$ T lymfocytů bylo dobře tolerováno a u některých pacientů bylo dosaženo objektivní odpovědi.

K *in vivo* expanzi $\gamma\delta$ lymfocytů může být využit podobný přístup jako při



Obr. 1. Mechanismy protinádorové imunitní odpovědi prostřednictvím $\gamma\delta$ T lymfocytů.

A. Aktivace $\gamma\delta$ buněk vede k produkci TNF- α a IFN- γ a expresi CD40L. To napomáhá maturaci dendritických buněk a diferenciaci T lymfocytů do buněk Th1. $\gamma\delta$ Th17 buňky produkují IL-17 podporující vývoj efektorových Th17 buněk. Buňky Th1 a Th17 vykazují protinádorové funkce.

B. Aktivované $\gamma\delta$ buňky dokáží prostřednictvím trogocytózy získat a exprimovat molekulu CD1d a podporovat aktivaci iNKT buněk. Stejně tak vykazují funkce antigen prezentujících buněk (MHC I a II, CD40, CD83, CD86) a aktivují naivní i efektorové T lymfocyty s protinádorovou cytotoxickou aktivitou.

C. Aktivované $\gamma\delta$ buňky mohou poskytnout kostimulační signál NK buňkám prostřednictvím exprese molekuly CD137.

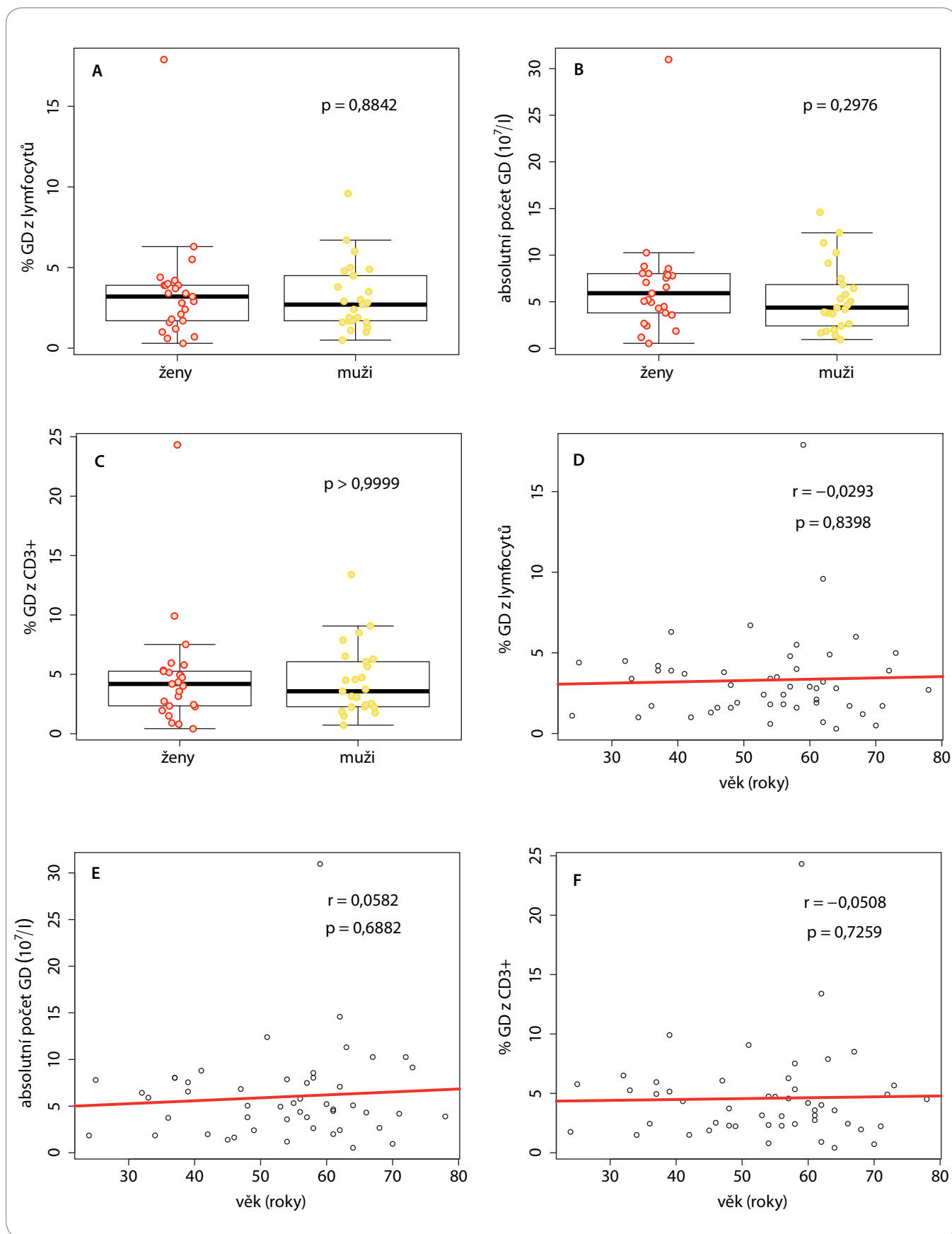
Adaptováno dle [19].

in vitro expanzi, tj. aplikace bisfosfonátů a IL-2 [33,34]. Při léčbě hormonálně refrakterního karcinomu prostaty bylo dosaženo lepší léčebné odpovědi ve skupině léčených IL-2 a zoledronátem oproti skupině se zoledronátem samotným [35]. Stimulace protinádorového efektu $\gamma\delta$ T lymfocytů může být také jedním z efektů imunoterapie prostřednictvím vakcinace mykobakteriálním preparátem [36,37], což je v současné době také předmětem klinických zkoušek [38].

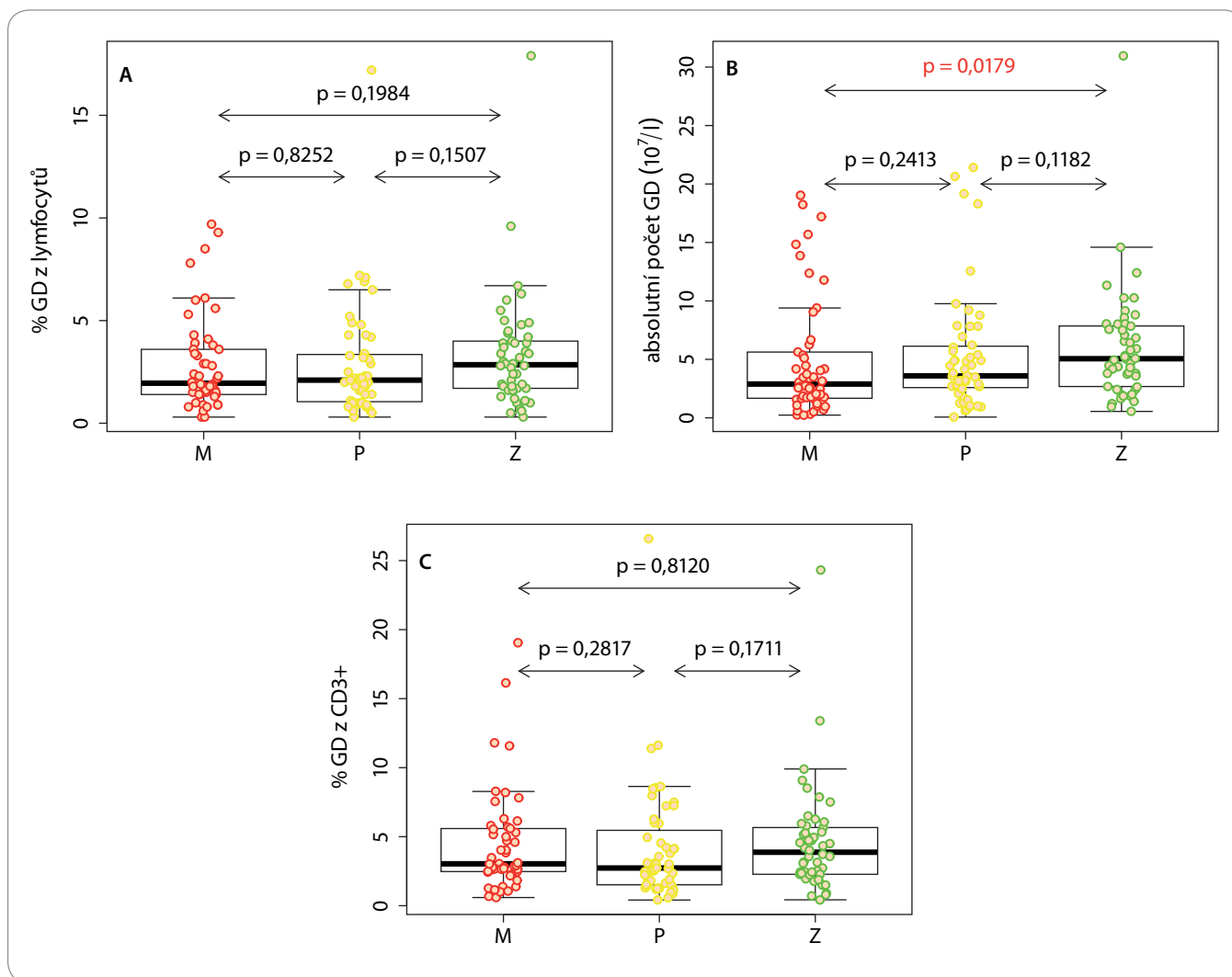
Materiál a metody

Biologický materiál

Při této studii byly průtokovou cytometrií vyšetřovány vzorky krve odebrané do K3EDTA. Vzorky byly analyzovány v den odběru nebo uchovány v lednici po dobu max. 48 hod. Celkem bylo analyzováno 50 vzorků pacientů s maligním melanomem, 50 vzorků pacientek s karcinomem prsu a 50 kontrol, pro které byly použity vzorky z preventivních vyšetření. Vzorky pacientů byly vybrány na základě diagnózy C43, resp. C50 v elektronické



Obr. 2. Kvantifikace $\gamma\delta$ T lymfocytů (GD) ve vzorcích periferní krve mužů a žen v referenční populaci.



Obr. 3. Kvantifikace cirkulujících $\gamma\delta$ lymfocytů u pacientů s maligním melanomem (M) a karcinomem prsu (P) ve srovnání s kontrolní populací (Z).

zdravotnické dokumentaci pacienta (NIS Grey Fox) a vzorky pacientů s nádorovou multiplicitou nebyly z analýzy vyloučeny. Věk kontrolních jedinců bez onkologické diagnózy se pohyboval od 24 do 78 let s mediánem 56 let. U pacientů s melanomem byl věkový rozptyl od 37 do 83 let s mediánem 67,5 let, u karcinomu prsu pak od 36 do 91 let s mediánem 61 let.

Průtoková cytometrie

Flowcytometrická analýza $\gamma\delta$ T lymfocytů byla provedena za použití značení protilátkami anti-CD3 PC5, anti-CD4 PC7 a anti- $\gamma\delta$ TCR FITC a pro detailní imunofenotyp anti-CD45RO ECD, anti-CD27 PE, anti-HLA-Dr PC5, anti-CD69 PC5, anti-CD25 PC5, anti-CD278 APC, anti-CD152 PE, anti-CD28 APC-Alexa fluor 750,

anti-CD279 PC7, anti-CD274 APC a anti-CD197 PE (vše Beckman Coulter). Nejdříve proběhla inkubace 50 μ l krve se směsí protilátek po dobu 15 min ve tmě a při pokojové teplotě, poté bylo přidáno 600 μ l lyzačního roztoku VersaLyse (Beckman Coulter) a ponecháno dalších 15 min ve stejných podmínkách. Takto připravené vzorky byly analyzovány flowcytometricky na přístroji Navios (Beckman Coulter). Absolutní počet $\gamma\delta$ T lymfocytů byl stanoven výpočtem z celkového počtu lymfocytů, který byl stanoven na hematologickém analyzátoru Sysmex XT-5000.

Statistická analýza

Statistické zhodnocení bylo provedeno v programu R (verze 3.0.2). Pro porov-

nání hladiny $\gamma\delta$ T lymfocytů ve dvou skupinách byl použit neparametrický Mannův-Whitneyho test. Vztah mezi věkem a hladiny $\gamma\delta$ T lymfocytů byl stanoven pomocí Spearmanova koeficientu korelace a jeho významnost byla testována příslušným testem. Všechny statistické testy byly oboustranné a byly provedeny na 5% hladině významnosti.

Výsledky

Hladiny $\gamma\delta$ T lymfocytů v periferní krvi jedinců bez onkologické diagnózy

U kontrolní populace nebyla u kvantitativních parametrů $\gamma\delta$ T lymfocytů pozorována statisticky významná závislost na pohlaví či věku (obr. 2). Medián procentuálního zastoupení $\gamma\delta$

ze všech lymfocytů byl 2,85 % (interkvartilové rozpětí – IQR 1,7–4 %), z toho u žen 3,2 % (IQR 1,7–3,9 %) a u mužů 2,7 % (IQR 1,7–4,5 %) (obr. 2A). Medián absolutních počtů γ T buněk v litru krve byl $5,05 \times 10^7$ (IQR $2,9$ – $7,84 \times 10^7$), z toho u žen $5,92 \times 10^7$ (IQR $3,8$ – $8,02 \times 10^7$) a u mužů $4,37 \times 10^7$ (IQR $2,41$ – $6,84 \times 10^7$) (obr. 2B). Co se týče procentuálního zastoupení γ T buněk mezi T lymfocyty, medián byl 3,9 % (IQR 2,3–5,6 %), z toho u žen 4,2 % (IQR 2,3–5,3 %), u mužů pak 3,6 % (IQR 2,3–6,1 %) (obr. 2C).

Hladiny γ T lymfocytů v periferní krvi nemocných s maligním melanomem a karcinomem prsu

Procentuální zastoupení cirkulujících γ T lymfocytů jak mezi T lymfocyty, tak mezi celkovými lymfocyty se neliší u pacientů s maligním melanomem a karcinomem prsu oproti zdravým kontrolám (obr. 3A, C). Absolutní počet γ T lymfocytů byl v periferní krvi pacientů s maligním melanomem nižší než u zdravých kontrol (obr. 3B). Mediány analyzovaných hodnot byly následující: procentuální zastoupení γ T buněk ze všech lymfocytů u melanomu 2 % (IQR 1,4–3,6 %), u karcinomu prsu 2,1 % (IQR 1,1–3,4 %) a u kontrol 2,9 % (viz výše). Absolutní počet γ T buněk v litru krve u melanomu $2,9 \times 10^7$ (IQR $1,69$ – $5,56 \times 10^7$), u karcinomu prsu $3,6 \times 10^7$ (IQR $2,59$ – $6,13 \times 10^7$) a u kontrol 5×10^7 (viz výše). Procentuální zastoupení γ T buněk mezi CD3 lymfocyty u melanomu 3 % (IQR 2,5–5,6 %), u karcinomu prsu 2,7 % (IQR 1,5–5,5 %) a u kontrol 3,9 % (viz výše).

V rámci pilotní analýzy byl proveden souhrn klinických dat pacientů s maligním melanomem i karcinomem prsu, jejichž hodnoty γ T lymfocytů byly výrazně vyšší než ostatní výsledky ze skupiny. Klinické údaje jsou aktuální k 4/2015. Čtyři pacienti s maligním melanomem s nejvyšší hodnotou procentuálního zastoupení γ T lymfocytů jsou:

Případ A. Pacient, ročník 1955, s onkologickou triplicitou – adenokarcinomem rekta, adenokarcinomem prostaty a maligním melanomem v bederní krajině. Diagnóza melanomu v 8/2013. Ložisko kompletně excidováno, histologická klasifikace pT4b pNX, v kompletní remisi. Adenokarcinom rekta dia-

gnostikován v 4/2013, T4b Nx Mx (LAP v dx třísele), inoperabilní, paliativní sigmoideostomie, 1. linie chemoterapie FOLFOX a konkomitantně radioterapie na oblast pánve, celkem absolvoval 10 sérií chemoterapie bez závažnějších nežádoucích účinků (NÚ), radioterapie ukončena předčasně pro rozvoj kožní toxicity. V 3/2014 onemocnění operabilní a v 4/2014 byla provedena exenterace pánve s ureteroileostomií. Vedlejším nálezem adenokarcinom prostaty, Gleason skóre 3 + 4, pT2c, L0 V0. Pacient dále sledován a léčen pro komplikace spojené s ureteroileostomií. Onkologické onemocnění se nyní jeví bez známek diseminace a bez lokální recidivy.

Případ B. Pacient, ročník 1968, s primárně metastatickým (lymfatické uzliny v proximální části stehna) maligním melanomem dg. 2/2011. Po rozšíření disekci uzlin ilioinguinální krajiny adjuvantní imunoterapie IFN- α , ukončena pro toxicitu v 6/2011. V 1/2012 lokoregionální recidiva a v 6/2012 vícečetné podkožní metastázy bez vzdálené diseminace, v 8/2012 provedena izolovaná hypertermická chemoperfuze levé dolní končetiny, v 10/2012 generalizace melanomu – podkožní metastázy levé dolní končetiny, metastázy lymfatických uzlin v páni a retroperitoneu, susp. jaterní metastázy. V 11/2012 zahájena léčba vemurafenibem v rámci klinické studie s efektem regrese kožních metastáz. Efekt léčby trvá a terapie vemurafenibem pokračuje.

Případ C. Pacient, ročník 1940, s onkologickou duplicitou – maligním melanomem a adenokarcinomem žaludku. Melanom diagnostikován v 1986. Řešen širokou excizí s disekcí levé axily. Po chirurgickém zákroku v kompletní remisi. Adenokarcinom žaludku dg. v 2009. Vzhledem k lokálnímu rozsahu onemocnění následovalo radikální odstranění tumoru s gastrektomií a omentektomií. Po resekci tumoru byl pacient sledován bez adjuvantní terapie. Relaps onemocnění nastal v 7/2014. Na CT objevena solitární metastáza v játrech. V 9/2014 byla odoperována metastatická část jater a horní okraj pankreatu. Pro histologicky pozitivní resekční okraje následovala konkomitantně pooperační radioterapie a chemoterapie v režimu FU/FA

de Gramont. Radioterapie ukončena plánovaně v lednu 2015. Nadále se pokračuje chemoterapií. Aktuálně podána 7. série.

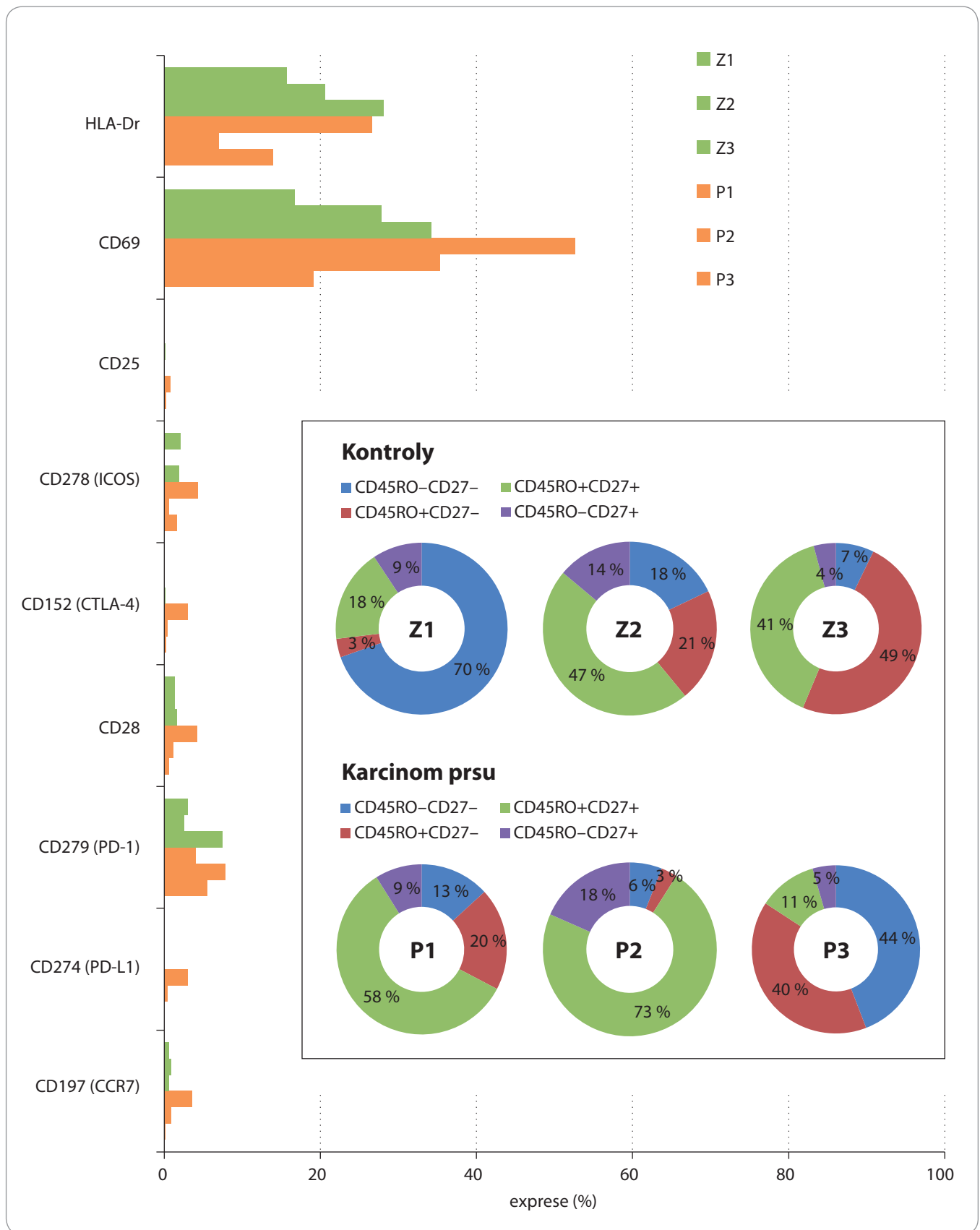
Případ D. Pacient, ročník 1935, s diseminací maligního melanomu. Primární ložisko melanomu diagnostikováno a excidováno v 9/2011. Mikroskopický nálezu ukázal na neúplnosti excize, proto reexcidováno v říjnu 2011. Pacient dále sledován. V 11/2014 se objevily metastázy v kalvě a v plicích, BRAF negativní. V 2/2015 zahájena 1. linie chemoterapie DTIC, nyní 3. série.

Pacientky s karcinomem prsu s nejvyšším absolutním i procentuálním zastoupením γ T lymfocytů jsou:

Případ A. Pacientka, ročník 1969, s diagnózou karcinom prsu vpravo, dg. 7/2012, HER2 1+, stav po parciální mastektomii a adjuvantní radioterapii (ukončena 6/2013) a hormonální adjuvantní terapii tamoxifenem. Nyní poradiační fibróza v pravém prsu, bez nálezu metastáz a bez známek recidivy. Nadále hormonoterapie tamoxifenem a 6/2014 a 12/2014 podány dvě dávky imunoterapie s nelipepimut-S (NeuVax™) v rámci studie PRESENT.

Případ B. Pacientka, ročník 1957, s diagnózou karcinom prsu vpravo z 9/2007. Histologicky se jedná o invazivní ductální karcinom, ER 80 %, PR 20 %, HER 3+, HER 2+ (FISH), T4b N2 M0, klinické stadium IIIB. Indikována chemoterapie a cílená léčba: 4krát AC, následně 4krát taxotere 3w a trastuzumab (1/2008–6/2009) s efektem dočasné regrese nádoru. Dále udržovací terapie letrozolem. Progrese onemocnění 9/2014, paliativní chemoterapie docetaxel a trastuzumab s progresí onemocnění v 12/2014, dále pokračováno eribulinem. Nyní metastázy v nadklíčku, podklíčku, na hrudníku vlevo a lehce i vpravo, v levé axile a v levém prsu – další progrese ve srovnání s 12/2014, progredující fluidotorax vlevo. Zahájena léčba s trastuzumab emtansin.

Případ C. Pacientka, ročník 1924, s diagnózou karcinom prsu vlevo 1/2015. Resekce v 2/2015, histologicky invazivní karcinom málo diferencovaný (G3). Bez nálezu metastáz, bez nálezu postižení uzlin (cT2 N0 M0). Od 3/2015 adjuvantní



Obr. 4. Imunofenotyp cirkulujících $\gamma\delta$ T lymfocytů u zdravých kontrol (Z1–Z3) a pacientek s karcinomem prsu (P1–P3).
 Vnitřní panel: diference paměťových subpopulací probíhá od fenotypu CD45RO–CD27+ (modrý) dále po směru hodinových ručiček.

hormonální terapie anastrozol s dobrou tolerancí.

Imunofenotyp $\gamma\delta$ T lymfocytů

V rámci imunofenotypizace $\gamma\delta$ buněk byly analyzovány tři kontrolní vzorky u tří pacientek s karcinomem prsu. Byl sledován výskyt znaků CD45RO a CD27 (jejich kombinace definuje rozdělení T lymfocytů na naivní, paměťové, efektorové a pozdní paměťové), HLA-Dr (MHCII), CD69 (transmembránový lektinový protein vyskytující se na aktivovaných T lymfocytech a NK buňkách), CD25 (α -řetězec receptoru pro IL-2, vyskytuje se na aktivovaných a regulačních T lymfocytech), CD278 (kostimulační molekula z rodiny CD28 – ICOS, vyskytující se na aktivovaných T lymfocytech), CD152 (CTLA-4, receptor na povrchu T lymfocytů, který je afinitní k molekulám B7 a hraje významnou roli v potlačení aktivity imunitního systému), CD28 (kostimulační receptor, který se společně s TCR podílí na aktivaci T lymfocytů), CD279 (programmed cell death protein – 1PD-1, receptor důležitý pro regulaci imunitního systému, zároveň indukuje apoptózu antigen-specifických T lymfocytů a inhibuje apoptózu regulačních T lymfocytů), CD274 (PD-L1 – jeden ze dvou ligandů pro PD-1) a CD197 (chemokinový receptor 7 – CCR-7, podílí se na kontrole migrace paměťových T lymfocytů a stimulaci maturace dendritických buněk). Výsledky jsou uvedeny v obr. 4.

Diskuze

Medián procentuálního zastoupení $\gamma\delta$ buněk mezi všemi cirkulujícími T lymfocyty byl u referenční populace 3,87 %, což je mírně nižší hodnota než v jiných studiích, kde se pohybuje okolo 5 % [39,40]. U pacientů s melanomem byl již dříve pozorován pokles cirkulujících $\gamma\delta$ buněk [41], což souhlasí i s našimi výsledky. V dřívější studii však autoři poukazují na jev opačný – zvýšení počtu cirkulujících cytotoxických $\gamma\delta$ buněk u pacientů s melanomem [42]. V této oblasti je třeba provést důkladnou analýzu s větším důrazem na stadium onemocnění a typ probíhající léčby. Celkově jsme nicméně nepozorovali u onkologických pacientů elevaci $\gamma\delta$ buněk, která by mohla být prostým odrazem aktivity

imunitního systému při onkologickém onemocnění ve smyslu reaktantu akutní fáze. Otázkou je pochopitelně vliv protinádorové terapie na potlačení tvorby a vývoje $\gamma\delta$ T lymfocytů. Zvýšené počty $\gamma\delta$ buněk u některých pacientů jak s maligním melanomem, tak s karcinomem prsu pozorované v této práci jsou nyní v rovině kazuistik a nelze je jednoznačně interpretovat. Zajímavostí nicméně je elevace $\gamma\delta$ buněk u pacientky na imunoterapii nonapeptidem nelipepimut-S a u pacienta s primárně metastatickým maligním melanomem s dlouhodobým efektem léčby vemurafenibem, v současné době více než čtyři roky od diagnózy.

Ve studii s expandovanými $\gamma\delta$ T lymfocyty, kde autoři definovali paměťový imunofenotyp absencí znaku CD45RA, byl dominantní imunofenotyp naivní CD27+CD45RA+ nebo CD27+CD45RA– paměťový, zatímco expandované buňky měly IF CD27–CD45RA– efektorový paměťový imunofenotyp [2]. Naše exploratorní analýza definující paměťový imunofenotyp jako CD45RO+ ukázala, že imunofenotyp v rámci kontrolní skupiny zdravých jedinců je variabilní. Zatímco u kontroly Z1 převažovaly pozdní paměťové CD27–CD45RO– buňky, u kontroly Z2 převažovaly efektorové CD27–CD45RO+ buňky a u kontroly Z3 dominoval paměťový CD27+CD45RO+ a efektorový CD27–CD45RO+ imunofenotyp podobně jako ve studii [2]. U pacientek s karcinomem prsu, které měly nízké zastoupení $\gamma\delta$ T lymfocytů, dominoval paměťový CD27+CD45RO+ imunofenotyp u pacientky P3 s vyšším počtem $\gamma\delta$ T lymfocytů v periferní krvi, byla většina $\gamma\delta$ T lymfocytů pozdní paměťová CD27–CD45RO– nebo efektorová CD27–CD45RO+. Expresí CD69 zcela chyběla u naivních buněk a byla rovnoměrně rozložena mezi paměťové, efektorové a pozdní paměťové subpopulace. Vzhledem k expresi HLA-Dr je zřejmé, že $\gamma\delta$ T lymfocyty mají schopnost prezentovat antigen. V naší studii exprese HLA-Dr korelovala se zastoupením efektorových buněk CD27–CD45RO+ podobně jako v práci [43], kde efektorové $\gamma\delta$ T lymfocyty sekretovaly nejen IFN- γ , ale také IL-17. U pacienta P1 jsme pozorovali

zvýšenou expresi znaků ICOS, CTLA-4, CD28, PD-L1 a CCR-7. Expresí PD-1 byla naopak menší než u pacientů P2 a P3. Již dříve bylo zjištěno, že s aktivací $\gamma\delta$ buněk přichází zvýšení exprese CTLA-4, CD28, PD-1 a PD-L1. Přičemž exprese PD-L1 byla po aktivaci vyšší než exprese PD-1, přestože před aktivací byla nižší než PD-1 [44]. V kontextu tohoto nálezu bychom mohli usuzovat, že u pacienta P1 proběhla stimulace $\gamma\delta$ T lymfocytů. Přičemž o aktivaci $\gamma\delta$ T lymfocytů u P1 vypovídá také zvýšená exprese znaků ICOS, CCR-7, HLA-Dr a CD69 v porovnání s ostatními testovanými vzorky. Ve vzorku P1 jsme též zachytili malou subpopulaci $\gamma\delta$ buněk, které exprimují zároveň markery CTLA-4, PD-L1 a CD25, a tedy se imunofenotypem blíží $\gamma\delta$ regulačním T lymfocytům [45].

Z preklinického i klinického výzkumu vyplývá, že $\gamma\delta$ buňky v závislosti na přesném fenotypu hrají určitou roli jak při indukci imunitní odpovědi, tak i potlačení jeho funkce. V závislosti na kontextu tak mohou v případě onkologického onemocnění nejen inhibovat, ale do jisté míry i podporovat progresi patofyziologických jevů. Naše studie ukazuje, že i když $\gamma\delta$ buňky tvoří jen minoritní část všech CD3+ T lymfocytů, existuje ještě mnoho podskupin, na které je možno tuto subpopulaci rozdělit a které se významně liší ve svých funkcích. Pro detailní charakteristiku a analýzu efektorových a regulačních funkcí $\gamma\delta$ T lymfocytů je potřeba provést další experimenty, korelovat nález v periferní krvi s nálezem v nádorové tkáni a klinickými údaji, jako je typ subtypu maligního onemocnění, druh léčby, efekt léčby.

Literatura

1. Morita CT, Beckman EM, Bukowski JF et al. Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity* 1995; 3(4): 495–507.
2. Kakimi K, Matsushita H, Murakawa T et al. Gammadelta T cell therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2014; 3(1): 23–33. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2013.11.01.
3. Groh V, Porcelli S, Fabbri M et al. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med* 1989; 169(4): 1277–1294.
4. Guzman E, Hope J, Taylor G et al. Bovine gammadelta T cells are a major regulatory T cell subset. *J Immunol* 2014; 193(1): 208–222. doi: 10.4049/jimmunol.1303398.
5. Hinz T, Wesch D, Halary F et al. Identification of the complete expressed human TCR V gamma repertoire by flow cytometry. *Int Immunol* 1997; 9(8): 1065–1072.

6. Holtmeier W, Pfänder M, Hennemann A et al. The TCR-delta repertoire in normal human skin is restricted and distinct from the TCR-delta repertoire in the peripheral blood. *J Invest Dermatol* 2001; 116(2): 275–280.
7. Groh V, Steinle A, Bauer S et al. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998; 279(5357): 1737–1740.
8. Rincon-Orozco B, Kunzmann V, Wrobel P et al. Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D. *J Immunol* 2005; 175(4): 2144–2151.
9. Das H, Groh V, Kujil C et al. MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity* 2001; 15(1): 83–93.
10. Kong Y, Cao W, Xi X et al. The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCRgamma9/delta2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCRgammadelta and NKG2D. *Blood* 2009; 114(2): 310–317. doi: 10.1182/blood-2008-12-196287.
11. Shojaei H, Oberg HH, Juricke M et al. Toll-like receptors 3 and 7 agonists enhance tumor cell lysis by human gammadelta T cells. *Cancer Res* 2009; 69(22): 8710–8717. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1602.
12. Modlin RL, Pirmez C, Hofman FM et al. Lymphocytes bearing antigen-specific gamma delta T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature* 1989; 339(6225): 544–548.
13. Dunne MR, Mangan BA, Madrigal-Estebas L et al. Preferential Th1 cytokine profile of phosphoantigen-stimulated human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Mediators Inflamm* 2010; 2010: 704941. doi: 10.1155/2010/704941.
14. Thedrez A, Sabourin C, Gerner J et al. Self/non-self discrimination by human gammadelta T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunol Rev* 2007; 215: 123–135.
15. Gibbons DL, Hague SF, Silberzahn T et al. Neonates harbour highly active gammadelta T cells with selective impairments in preterm infants. *Eur J Immunol* 2009; 39(7): 1794–1806. doi: 10.1002/eji.200939222.
16. Wesch D, Glatzel A, Kabelitz D. Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cell Immunol* 2001; 212(2): 110–117.
17. Casetti R, Agrati C, Wallace M et al. Cutting edge: TGF-beta1 and IL-15 Induce FOXP3+ gammadelta regulatory T cells in the presence of antigen stimulation. *J Immunol* 2009; 183(6): 3574–3577. doi: 10.4049/jimmunol.0901334.
18. Gober HJ, Kistowska M, Angman L et al. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med* 2003; 197(2): 163–168.
19. Lafont V, Sanchez F, Laprevotte E et al. Plasticity of gammadelta T cells: impact on the anti-tumor response. *Front Immunol* 2014; 5: 622. doi: 10.3389/fimmu.2014.00622.
20. Lu Y, Yang W, Qin C et al. Responsiveness of stromal fibroblasts to IFN-gamma blocks tumor growth via angiostasis. *J Immunol* 2009; 183(10): 6413–6421. doi: 10.4049/jimmunol.0901073.
21. Kuhl AA, Pawlowski NN, Grollich K et al. Human peripheral gammadelta T cells possess regulatory potential. *Immunology* 2009; 128(4): 580–588. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03162.x.
22. Drabsch Y, ten Dijke P. TGF-beta signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2012; 31(3–4): 553–568. doi: 10.1007/s10555-012-9375-7.
23. Dhar S, Chiplunkar SV. Lysis of aminobisphosphonate-sensitized MCF-7 breast tumor cells by Vgamma9Vdelta2 T cells. *Cancer Immunol* 2010; 10: 10.
24. Ferrarini M, Pupa SM, Zocchi MR et al. Distinct pattern of HSP72 and monomeric laminin receptor expression in human lung cancer infiltrating by gamma/delta T lymphocytes. *Int J Cancer* 1994; 57(4): 486–490.
25. Choudhary A, Davodeau F, Moreau A et al. Selective lysis of autologous tumor cells by recurrent gamma delta tumor-infiltrating lymphocytes from renal carcinoma. *J Immunol* 1995; 154(8): 3932–3940.
26. Cordova A, Toia F, La Mendolona C et al. Characterization of human gammadelta T lymphocytes infiltrating primary malignant melanomas. *PLoS One* 2012; 7(11): e49878. doi: 10.1371/journal.pone.0049878.
27. Liu Z, Guo BL, Gehrs BC et al. Ex vivo expanded human Vgamma9Vdelta2+ gammadelta-T cells mediate innate antitumor activity against advanced renal cell carcinoma in vitro. *J Urol* 2005; 173(5): 1552–1556.
28. Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J et al. Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using gamma-delta T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56(4): 469–476.
29. Bennouna J, Bompas E, Neidhardt EM et al. Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57(11): 1599–1609. doi: 10.1007/s00262-008-0491-8.
30. Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J et al. Phase I/II study of adoptive transfer of gammadelta T cells in combination with zoledronic acid and IL-2 to patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2011; 60(8): 1075–1084.
31. Nicol AJ, Tokuyama H, Mattarollo SR et al. Clinical evaluation of autologous gamma delta T cell-based immunotherapy for metastatic solid tumours. *Br J Cancer* 2011; 105(6): 778–786. doi: 10.1038/bjc.2011.293.
32. Abe Y, Muto M, Nieda M et al. Clinical and immunological evaluation of zoledronate-activated Vgamma9gammadelta T-cell-based immunotherapy for patients with multiple myeloma. *Exp Hematol* 2009; 37(8): 956–968. doi: 10.1016/j.exphem.2009.04.008.
33. Kunzmann V, Bauer E, Wilhelm M. Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *N Engl J Med* 1999; 340(9): 737–738.
34. Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S et al. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 2003; 102(1): 200–206.
35. Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F et al. Targeting human (gamma)delta T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2007; 67(15): 7450–7457.
36. Fowler DW, Copier J, Wilson N et al. Mycobacteria activate gammadelta T-cell anti-tumour responses via cytokines from type 1 myeloid dendritic cells: a mechanism of action for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61(4): 535–547. doi: 10.1007/s00262-011-1121-4.
37. Naoe M, Ogawa Y, Takeshita K et al. Bacillus Calmette-Guerin-pulsed dendritic cells stimulate natural killer T cells and gammadeltaT cells. *Int J Urol* 2007; 14(6): 532–538.
38. Dalgleish A. A Trial comparing gemcitabine with and without IMM-101 in advanced pancreatic cancer. NCT01303172.
39. Mann ER, McCarthy NE, Peake ST et al. Skin- and gut-homing molecules on human circulating gammadelta T cells and their dysregulation in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2012; 170(2): 122–130. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04649.x.
40. Su C, Jakobsen I, Nei M. Diversity and evolution of T-cell receptor variable region genes in mammals and birds. *Immunogenetics* 1999; 50(5–6): 301–308.
41. Petrini I, Scatena C, Naccarato AG et al. CD57 and gammadelta T-cell receptor expression in nodal metastatic spread of melanoma. *Eur J Clin Invest* 2012; 42(5): 575–576. doi: 10.1111/j.1365-2362.2011.02612.x.
42. Campillo JA, Martínez-Escribano JA, Minguela A et al. Increased number of cytotoxic CD3+ CD28– gammadelta T cells in peripheral blood of patients with cutaneous malignant melanoma. *Dermatology* 2007; 214(4): 283–288.
43. Hu C, Qian L, Miao Y et al. Antigen-presenting effects of effector memory Vgamma9Vdelta2 T cells in rheumatoid arthritis. *Cell Mol Immunol* 2012; 9(3): 245–254. doi: 10.1038/cmi.2011.50.
44. Peters C, Oberg HH, Kabelitz D et al. Phenotype and regulation of immunosuppressive Vdelta2-expressing gammadelta T cells. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71(10): 1943–1960.
45. Shibuya K, Nakano N. Interleukin-2 drives immature double negative thymocytes into gammadelta T cells expressing Foxp3 on a stromal cell line in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 452(4): 912–919. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.155.