

Mechanizmy imunitného systému v boji proti nádorom a príčiny ich zlyhania

Doc. MUDr. Mária Bucová, CSc., MUDr. Kristína Klučková, prof. MUDr. Milan Buc, DrSc.

Imunologický ústav, Lekárska fakulta UK, Bratislava

Jednou z hlavných funkcií imunitného systému je zabezpečovanie dohľadu nad nežiaducimi zmenami v organizme, o. i. aj nad vznikom malígnych buniek. Dôležitú úlohu pri tom majú bunky imunitného systému, najmä aktivované M1-makrofágy, NK-bunky a cytotoxické T-lymfocyty, v menšej miere aj protilátky. Napriek tomu nádorové bunky v niektorých prípadoch svojmu zániku uniknú. Modulujú totiž svoje nádorové mikroprostredie – lákajú bunky s imunosupresívnou aktivitou, ako sú regulačné T-lymfocyty (Treg), M2-tyt makrofágov, MDSC; navyše aj samy produkujú látky s imunosupresívnou aktivitou, exprimujú určité kontrolné body aktivácie a ďalšie mechanizmy. Problémom v boji proti nádorom je ich schopnosť metastázovať. Metastatický proces nie je náhodný, riadi sa určitými zákonitostami známymi pod skratkou EMT. Ide o uvoľnenie malígnej bunky z ložiska, získanie vretenovitého tvaru a vyššej mobility, schopnosti prenikať tkanivom a dostať sa do cirkulácie. Túto napokon opúšťajú na základe interakcie medzi adhezívnymi molekulami v membránach nádorových buniek a adhezívnymi molekulami na endotelových bunkách orgánu, v ktorom sa usídli. Metastatický proces sa môže diať aj prostredníctvom exozómov.

Kľúčové slová: adhezívne molekuly, CLTA-4, E-kadherín, EMT, MDSC, NK-bunky, PD-1, T-lymfocyty

Mechanisms of the immune system in fighting tumours and the causes of their failure

One of the principal biological function of the immune system is a surveillance over our integrity endangered by malignant process. The immune system is endowed by a spectrum of various effector mechanisms, which provide various cells of the immune system, especially activated M1 macrophages, NK cells and cytotoxic T cells, and, in less extent, also antibodies. Nonetheless, in some cases, tumour cells can escape of their demise. They modify their microenvironment, they recruit cells with immunosuppressive activities like MDSC (myeloid derived suppressor cells), regulatory T cells, M2 type of macrophages and they themselves produce immunosuppressive substances, express of immune-checkpoints for T cell activation, and others. The greatest problem on fighting tumours is ability of tumour cells to metastasize. Metastatic process is not an accidental process; contrariwise, it is regulated by mechanisms known as epithelial to mesenchymal transition. It comprises release of a malignant cell from neighbouring cells, transition from its epithelial to mesenchymal shape, receiving increased mobility and ability to penetrate through a tissue and entering the circulation. The principle role in this transmigration play interactions between adhesive molecule in membranes of tumour cells and those present in membranes on endothelial cells of the organ they wish to settle in. Metastatic process can be mediated by exosomes too.

Key words: adhesive molecules, CLTA-4, E-cadherin, EMT, MDSC, NK cells, PD-1, T cells

Onkológia (Bratisl.), 2018;13(2):87-93

Úvod

Bunky za fyziologických okolností proliferujú a plnia si svoje funkcie v závislosti od charakteru tkaniva či orgánu, v ktorom sa nachádzajú. Proliferácia buniek je geneticky regulovaná a počet novovznikajúcich buniek sa rovná počtu buniek, ktoré po splnení si svojej fyziologickej úlohy odumierajú. V prípade, že stimulačný podnet pre proliferáciu presiahne požiadavky fyziologickej náhrady, ako je to pri niektorých patologických stavoch, dochádza k hyperplázii, ktorá je výsledkom polyklonovej expanzie buniek. Odstránením stimulu sa proliferácia opäť dostáva do fyziologického rozpätia. Na rozdiel od tohto nemalígneho, polyklonového rastu buniek môže bunka získať proliferatívny potenciál bez potreby aké-

hokoľvek externého stimulu v dôsledku procesu, ktorý dnes ešte nie je úplne objasnený a ktorý označujeme pojmom malígna transformácia. Jej autonómny rast tvorí základ vzniku malígneho bujnenia. Malígne nádory rastú nekontrolovaným spôsobom, prenikajú do zdravého tkaniva a často metastázujú, rastú na miestach niekedy značne vzdialených od pôvodného miesta vzniku. Prirodzene, organizmus človeka je vybavený mechanizmami, ktoré sa snažia tento proces zastaviť už v jeho zárodku, resp. neskôr, po jeho vzniku, mobilizovať všetky svoje prostriedky, ktorý by vzniknutý nádor zlikvidoval. Hlavná ťarcha v tomto boji leží na imunitnom systéme. Cieľom tohto krátkeho článku je podať prehľad mechanizmov, ktoré má imunitný systém v svojej dispozícii

a, naopak, ako malígne bunky sa snažia uniknúť svojej záhube pred jednotlivými efektorovými mechanizmami imunity.

Efaktorové mechanizmy protinádorovej imunity

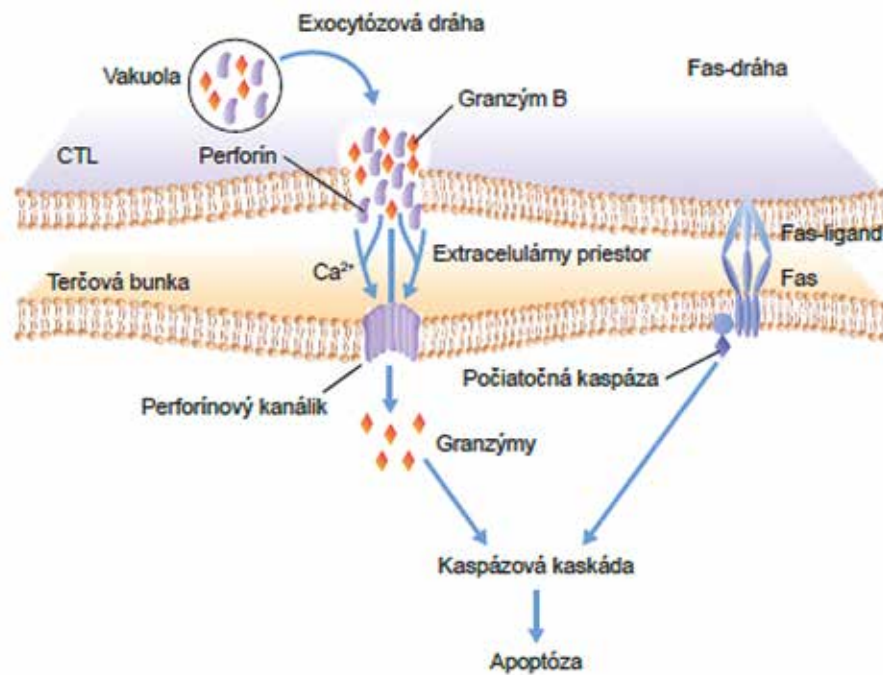
Hlavná funkcia zložiek imunitného systému je zabezpečovanie dohľadu nad nežiaducimi zmenami v organizme. Pôvodný koncept, prvýkrát postulovaný P. Ehrlichom a neskôr modifikovaný M. F. Burnetom, sa dotýkal imunitného dohľadu nad narušiteľmi celistvosti organizmu vyvolanom baktériami, vírusmi, parazitmi a pod. (1). Takto chápaný imunitný dohľad sa musel s rozvojom našich vedomostí o vzniku nádorov a mobilizácii obranných mechanizmov, ktoré zabraňujú ich vzniku a propagácii, rozšíriť aj o dohľad nad zme-

nami vo vnútornom prostredí organizmu, ktoré potenciálne vedú k vzniku malignity a ohrozujú život jedinca, podobne ako je to pri poruche integrity organizmu, ktorá má pôvod vo vonkajšom prostredí. Na imunitnom dohľade sa zúčastňujú zložky aj prirodzenej, aj adaptívnej imunity, a to najmä cytotoxické systémy.

Makrofágy sú súčasťou Th1 imunitnej odpovede, ktorá zabezpečuje špecifickú bunkami sprostredkovanú imunitu (proti vírusom, intracelulárne parazitujúcim mikroorganizmom a nádorom). Na protinádorovej aktivite sa podieľajú jednak prostredníctvom svojej antigéno- a prezentáčnej funkcie, produkciu cytokínov, reaktívnych produktov kyslíka (ROS – reactive oxygen species) a aktívacie pomocných (Th) a cytotoxických T-lymfocytov (CTL); pre tieto vlastnosti ich označujeme ako M1-makrofágy, na rozdiel od tých, ktoré pôsobia skôr inhibične a označujú sa ako M2-makrofágy a sú skôr súčasťou Th2 typu imunitnej odpovede (2). M1-makrofágy sa do cytotoxickej aktivity sa dostávajú po aktivácii cytokínmi, najmä IFN- γ a GM-CSF; produkujú ich aj pomocné aj cytotoxické T-lymfocyty. Aktivované makrofágy tvoria veľké množstvo včasných prozápalových cytokínov TNF, IL-1 β , IL-6, ale aj IL-12 a IL-23 (2, 3). Prozápalový TNF pôsobí duálne, na jednej strane indukuje trombózu ciev a ischemickú nekrózu vaskularizovaných nádorov (4) a na druhej strane podporuje rast nádoru, a to práve inhibíciou imunitnej odpovede (5).

Makrofágy tvoria aj ďalšie látky so silnou prozápalovou aktivitou, ako je TREM-1 (triggering receptor expressed on myelocytes) a neskorý prozápalový cytokín HMGB1 (high mobility group box protein). **TREM-1** sa nachádza na neutrofiloch, monocytoch a makrofágoch. Jeho ligandom je molekula PGLYRP1 (peptidoglycan /PGN/ recognition protein 1 /PGLYRP1/ (6). Po väzbe ligandu začnú uvedené bunky produkovať prozápalové cytokíny (IL-1 β , TNF) a chemokíny, najmä IL-8, MCP1 (macrophage chemotactic protein 1), MCP3 a MIP1 (macrophage inflammatory protein) (7, 8). V ostatnom čase sa poukazuje na úlohu zápalu v procese kancerogenézy a prozápalové cytokíny, TREM-1 ako aj HMGB1 majú v potenciácii vývoja nádorov dôležitú

Obrázok 1. Mechanizmus usmrcovania terčovej bunky cytotoxickým T-lymfocytom



Cytotoxický T-lymfocyt (CTL) svojím antigénovým receptorom (TCR) rozpoznáva na terčovej bunke antigén, ktorý mu prezentujú MHC-molekuly prvej triedy. Po aktivácii interferónom-gama začne uvoľňovať perforíny, ktoré vytvoria v membráne terčovej bunky kanálik, cez ktorý prejdú molekuly granzýmu B, ktorý indukuje jej apoptotickú smrť. Túto môže navodiť aj interakcia medzi molekulami Fas a Fas-ligandom.

úlohu. Vysoká expresia TREM-1 molekúl v membránach makrofágov infiltrujúcich nádory a zvýšená hladina solubilných TREM-1 molekúl sa spájajú s agresívnejším správaním nádoru a slúžia ako relevantný prediktor prežitia (9, 10).

HMGB1 je intranukleový proteín s množstvom funkcií; v extracelulárnom prostredí, kam sa dostane za patologických okolností, napr. po rozpade nekrotických buniek alebo aktívnou tvorbou monocytmi a makrofágmami, pôsobí ako molekula DAMPs (damage associated molecular pattern) alebo tzv. „alarmín“ a stimuluje rozvoj zápalu a imunitných procesov (11, 12). Na „*in vitro*“ a „*in vivo*“ modeli hepatocelulárneho karcinómu sa zistilo, že HMGB1 môže indukovať zápal, proliferáciu, diferenciáciu, angiogénu, metastázovanie a smrť bunky. A tak HMGB1 a jeho receptory RAGE (receptor for advanced glycation end products), TLR (toll like receptors) a TREM-1 by mohli byť potenciálnymi protinádorovými cieľmi (13).

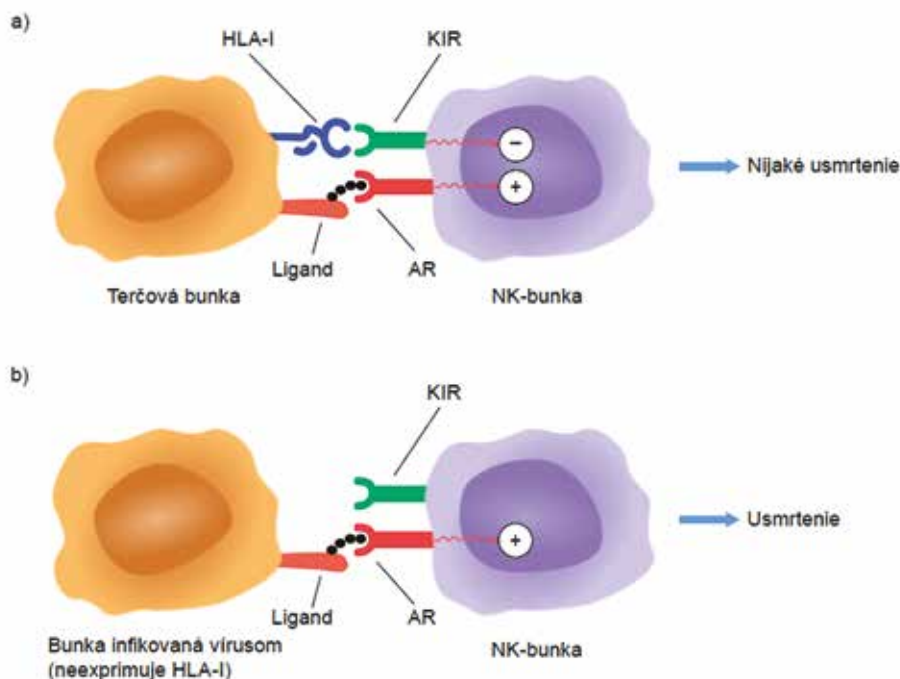
Medzi ďalšie bunky s protinádorovou aktivitou patria **cytotoxické T-lymfocyty (CTL)**. Nádorové bunky prezentujú v žliabku svojich HLA-molekúl prvej triedy (HLA-A, -B, -C) peptidy pochádzajúce z ich antigénov, ktoré CTL svojím antigénovým receptorom ($\alpha\beta$ TCR)

rozpoznávajú a následne ich zabíjajú prostredníctvom perforínov a granzýmov (14) (obrázok 1). Na zabíjaní nádorových buniek sa podieľa aj apoptóza mediovaná interakciou medzi molekulami FAS (CD95) a FASL (CD95L); rovnakú úlohu zohráva interakcia medzi TRAILR1 a TRAIL (15, 16).

V tejto súvislosti je zaujímavý šaperón **HSP96** (heat shock protein). Dokáže viazať rôzne proteíny a po uvoľnení z nekrotickej bunky do vonkajšieho prostredia sa viaže na svoj receptor CD91 v membránach buniek prezentujúcich antigén (APC) – makrofágov a dendritových buniek. Následne sa dostáva do vnútra týchto buniek a dopraví tak svoj náklad k HLA-molekulám prvej triedy, ktoré si ho preberú a následne prezentujú cytotoxickým T-lymfocytom. HSP96 súčasne v APC-bunkách zvyšuje expresiu kostimulačných molekúl a indukuje syntézu IL-12, čím dochádza k aktivácii kooperujúcich T-lymfocytov, ktoré následne môžu atakovať nádorové bunky (17).

Významnú úlohu v protinádorovej imunitě majú aj **NK-, LAK- a TIL-**bunky. NK-bunky sú lymfocyty, ktoré dokážu ničť celé spektrum nádorových a vírusmi infikovaných buniek, a to zdanlivo nešpecificky, čo viedlo aj k ich označeniu ako

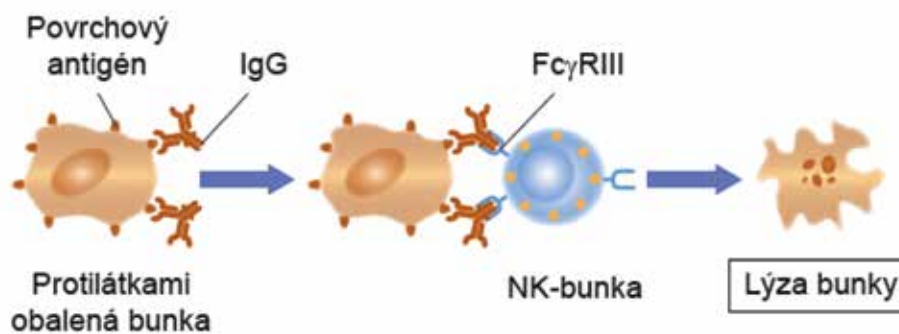
Obrázok 2. Mechanizmus rozoznávania terčových buniek NK-bunkami prostredníctvom inhibičných KIR-receptorov



Obrázok hore: NK-bunky svojimi inhibičnými KIR-receptormi rozoznávajú na terčových bunkách HLA-molekuly prvej triedy (HLA-I), ktoré každá zdravá jadrová bunka má vo svojej membráne. Ich rozpoznanie bráni aktivácii NK-buniek, tieto zostávajú pokojné a terčové bunky nezničia.

Obrázok dole: Bunky infikované vírusom alebo maligne transformované bunky HLA-I molekuly často nemajú. NK-bunky takto strácajú možnosť aktivácie svojich inhibičných signálov a NK-bunky takéto pozmenené terčové bunky rozoznávajú ako cudzie, ako bunky, ktoré treba zničiť, čo aj urobí po svojej aktivácii cez aktivačný receptor (AR).

Obrázok 3. Cytotoxicita sprostredkovaná bunkami závislá od protilátky



Na terčovú bunku sa nadviaže špecifická protilátka, ktorá v jej membráne rozoznáva svoj špecifický antigén. Na takto obalenú terčovú bunku sa nadviaže NK-bunka, pretože vlastní receptory pre protilátky. Aktivuje sa do bezprostrednej blízkosti terčovej bunky, uvoľní cytotoxické látky, ktoré ju zničia.

„prirodzené zabíjačské bunky“ (natural killer cells – NK cells). Najvýznamnejšou subpopuláciou NK-buniek sú cytotoxické bunky. Majú početné rôzne druhy receptorov, ktorými dokážu jednoznačne identifikovať nádorovú bunku a následne ju zabiť podobne ako CTL, t. j. jednak cytolyticky alebo apoptoticky. Najznámejšie receptory NK-buniek sú inhibičné, ktoré na našich bunkách orgánov a tkanív rozoznávajú HLA-molekuly prvej triedy; ak ich bunka exprimuje, čo je fyziologický stav, NK-bunka ju neatakuje. Naopak, ak

terčová bunka HLA-molekuly v svojej membráne nemá, ako to býva pri nádorových bunkách (aby unikla útoku zo strany CTL), NK-bunka získa aktivačný signál a takúto bunku zničí (18, 19) (obrázok 2). NK-bunky majú aj aktivačné receptory, ktoré rozoznávajú stresové proteíny MICA („MHC class I polypeptide-related sequence A“), MICB („MHC class I polypeptide-related sequence B“) a ULBP („UL-binding proteins“; svoje pomenovanie ULBP získali na základe schopnosti viazať UL-glykoproteíny cytomegalového

vírusu) v membránach nádorových buniek a zabíjajú ich (20).

Ďalšia skupina buniek s nešpecifickou cytotoxickou aktivitou sa zahrňa pod pojem **LAK** (lymphokine-activated killer cells). Sú to bunky, ktoré vznikajú stimuláciou NK-buniek IL-2 (túto schopnosť má aj IL-12, IL-15 a IFN- γ) a lyzujú celé spektrum terčových buniek, aj citlivých aj rezistentných na lýzu sprostredkovanú NK-bunkami. Rozdiel medzi LAK-bunkami, ktoré vznikajú aktiváciou NK-buniek a tými, ktoré sú výsledkom aktivácie cytotoxických T-lymfocytov, je v rýchlosti indukcie ich cytotoxickéj aktivity – kým pri LAK-bunkách sa ju darí navodiť za 24 hodín, pri CTL až za 2 – 3 dni (18).

Aký je biologický význam existencie a pôsobenia LAK-buniek? Podľa ich základnej charakteristiky, t. j. vzniku pod vplyvom IL-2 a schopnosti nešpecifickéj lýzy, možno usudzovať, že sa zúčastňujú najmä na lokálnych „názarových“ obranných reakciách. Tieto procesy môžu vzniknúť v akomkoľvek orgáne či tkanive, kde sa vyvíja nádor. Nastáva pritom príchod pomocných T-lymfocytov, ich imobilizácia a stimulácia. Výsledkom sú zvýšené hladiny IL-2 a iných cytokínov, ktoré priťahujú a aktivujú NK-bunky. Pod vplyvom IL-2 vznikajú LAK-bunky, ktoré spolu s NK-bunkami nešpecificky, „promiskuitne“, lyzujú aberantné bunky. Takýto hrubý, neotesaný spôsob obransychopnosti organizmu zrejme potrebuje vtedy, keď musí intenzívne a všetkými dostupnými prostriedkami prekonať patologickú záťaž a nemá čas na vytvorenie a použitie jemných mechanizmov adaptívnej imunitnej odpovede. NK-bunkám v špeciálnych prípadoch sekundujú **NKT** (natural killer T cells) (21) a **MAIT** (mucosa-associated invariant T cells) bunky (22).

Protilátky samy osebe nemajú výkonnú moc, pôsobia ako „značkovače“, pričom cytotoxická aktivita sa uskutočňuje prostredníctvom aktivácie komplementu alebo tzv. K-buniek (killer). (K-bunka je akákoľvek bunka, ktorá má receptor pre Fc-fragment protilátky IgG izotypu; reakciu, ktorú sprostredkúva označujeme ako ADCC; obrázok 3). Protilátky hrajú významnú úlohu najmä v zabránení šírenia cirkulujúcich nádorových buniek, čím bránia vzniku metastáz (23).

Neutrofilné granulocyty sú principiálnymi bunkami prirodzenej imunity v boji proti baktériám a očakávalo by sa, že svojimi cídnymi mechanizmami, najmä závislými od kyslíka, budú zabíjať aj nádorové bunky. Žiaľ, opak je pravda, ich cídna aktivita je u onkologických pacientov nižšia, produkujú viac IL-1 β , IL-1RA (Interleukin 1 receptor antagonist), VEGF (vascular endothelial growth factor), IL-17 a menej IL-18. Navyše ich počet v periférnej krvi pacienta stúpa a spája sa s horšou prognózou (24, 25).

Mechanizmus úniku nádorových buniek z imunitného dohľadu

Jednou z úloh imunitného systému je „imunitný dohľad“ (immune surveillance), pomocou ktorého sa imunitný systém snaží o uchovanie rovnováhy a likvidáciu potenciálne škodlivých agens. Tento mechanizmus má úlohu aj v prevencii rozvoja nádorov a patria sem vlastne bunky a humorálne faktory, ktoré majú protinádorovú aktivitu. Vzťah medzi nádorom a imunitným systémom je však dynamický, plastický, a preto sa v súčasnosti upúšťa od pojmu „imunitný dohľad“ a nahrádza sa pojmom **imunokorekcie (cancer immunoediting)**. Jeho podstatou je, že imunitný systém okrem toho, že chráni hostiteľa pred vytvorením nádoru, „tvoruje“ aj imunogénnosť nádorových buniek (26 – 29). Počas tohto „tvarovania“ dochádza k zmene silných imunogénnych nádorovo-špecifických antigénov (TSA) na slabé. Má tri štádiá, ktoré dostali pomenovanie podľa začiatočných písmen anglických slov ako tri „E“: 1. „elimination“ (eliminácia), 2. „equilibrium“ (rovnováha) a 3. „escape“ (únik) (26). Počas prvého štádia imunitný systém rozpozná a rýchlo likviduje prekursorové bunky nádoru, a to skôr, než by sa klinicky prejavili v dôsledku imunoselekcie alebo tolerancie na TSA. Prežívajú len slabo imunogénne a slabo invazívne bunky vďaka tolerancii imunitného systému na slabé TSA. Druhé štádium je štádiom rovnováhy a dormancia nádoru – v tomto štádiu možno nájsť tzv. okultný alebo klinicky tichý nádor (28, 30). Fáza rovnováhy býva najdlhšia a môže trvať aj niekoľko rokov. Tretie štádium je štádiom úniku. Po odstránení

nádorových buniek sa tieto postupne nahradia imunorezistentnými genetickými variantmi, ktoré rýchlo proliferujú a podliehajú ďalším genetickým modifikáciám. Tieto sa dokážu vyhnúť imunitnému systému a okrem toho tlmením pôsobenia buniek imunitného systému ešte aj potláčajú protinádorovú odpoveď. Imunokorekcia fenotypu nádorových buniek im v tejto poslednej fáze dovoľuje uniknúť imunitnej deštrukcii (31, 32).

Významným cieľom nádorovej imunológie zostáva určiť faktory, ktorými nádory unikajú z imunitného dohľadu a potláčajú potenciálne účinnú imunitnú odpoveď. V súčasnosti poznáme niektoré z mechanizmov úniku malígneho bujnenia z dosahu pôsobenia imunitného systému. Patrí sem zníženie množstva nádorových a histokompatibilných antigénov, antigénová modulácia, imunitný enhancement, imunokomplexy, nešpecifická a špecifická supresia.

Niektoré nádory môžu byť **slabo imunogénne** len u niektorého jedinca v dôsledku toho, že nevlastní patričné HLA-molekuly, ktoré dokážu prezentovať imunogénny fragment nádorového antigénu. Podobne znížením expresie HLA-molekúl v membránach nádorových buniek sa znižuje ich imunogénnosť, čím sa sťažuje rozpoznávací a efektorový funkcia špecifických CTL. Pri **antigénovej modulácii** sa antigény po nadviazaní špecifických protilátok nahromadia na jednom póle bunky, kde vytvárajú akúsi čiapočku. Endocytózou zhluku sa antigén stratí z povrchu bunky a ďalšie efektorové mechanizmy imunity sú takto zbavené svojho terča. Pri **imunitnom enhancemente** sa protilátky nadväzujú na nádorové antigény, prekrývajú ich, čím zabraňujú uplatneniu sa protilátok aktivujúcich komplement alebo T-lymfocytov. Podobnú funkciu môže spĺňať veľmi bohatý glykokalyx nádorových buniek, ktoré tvoria mukopolysacharidy, ktoré prekrývajú povrchové antigény. Podobne niektoré nádory aktivujú koagulačný systém a kryjú sa fibrínovou vrstvou. Aktivitu cytotoxických systémov môžu blokovat aj **imunokomplexy** (nádorový antigén + protilátka), ktoré sa nadväzujú na Fc-receptory K-buniek, zablokujú ich, čím ich vyradia z účasti na obranných reak-

ciach typu ADCC. Malnutricia, ktorá je častým sprievodným znakom nádorového procesu, vedie k poklesu protilátkovej aj celulárnej imunitnej odpovede. Najdôležitejšiu úlohu pri úniku nádorov z imunitného dohľadu však zohráva **imunopresia**, ktorú indukujú priamo nádory. Poznáme viaceré molekuly, či už v membránach nádorových buniek alebo tie, ktoré sa uvoľňujú do mikroprostredia, ktoré blokujú efektorové mechanizmy imunity – ide o FasL, PD-L1, CTLA-4, IL-10, TGF- β , príp. niektoré prostaglandíny (33 – 35) a predovšetkým indolamín 2, 3-dioxygenáza (IDO). Ide o enzým, ktorý degraduje tryptofán, čím sa v danom mikroprostredí znižuje jeho koncentrácia. Tryptofán je nevyhnutný na proliferáciu T-lymfocytov, takže T-lymfocyty, ktoré sa snažia nádor zlikvidovať pre nedostatok tryptofánu, nemôžu rozvinúť svoju aktivitu (36).

Jednu z významných úloh má aj **CD200**. Ide o molekulu nádorových buniek, ktorá po interakcii so svojim receptorom indukuje zníženie syntézy IL-2 a IFN- γ , teda cytokínov, ktoré zodpovedajú za indukciu imunitných reakcií, ktoré sú v popredí boja proti nádorom. Navyše CD200 navodí aj vznik regulačných T-lymfocytov, čo opäť prispieva k potláčaniu efektívnej protinádorovej imunity. CD200 je aj znakom rakovinných kmeňových buniek, ktoré sú rádiorezistentné a ktoré aj po zdanlivo úspešnej rádio- či chemoterapii vedú k znovuobjaveniu sa nádoru. Expresia CD200 a v niektorých prípadoch aj CD133 je znakom zlej prognózy (37).

V ostatnom čase pritiahli na seba pozornosť najmä tzv. kontrolné body aktivácie T-lymfocytov, konkrétne PD-1 a CTLA-4. **PD-1** je homodimér, ktorý majú aktivované, ale nie pokojné, B-, T-lymfocyty a NK-bunky. Jeho ligandom sú molekuly PD-L1, ktoré exprimujú aj nádorové bunky. Interakcia PD-1 so svojimi ligandmi indukuje v T-lymfocytoch inhibíciu ich proliferácie a produkcie cytokínov, a to blokovaním G1-fázy bunkového cyklu; neindukuje však apoptózu, ako to názov tejto molekuly naznačuje (PD – programmed death) (35, 38). Táto skutočnosť sa v súčasnosti využíva v imunoterapii monoklonovými protilátkami anti-PD-1 (napr. nivolumab

či lambrolizumab) (34) alebo anti-PD-L1 (napr. avelumab) (39), ktoré bránia blokáde aktivity T-lymfocytov a umožňujú ich ďalšiu protinádorovú aktivitu.

Podobnú úlohu zohráva **CTLA-4** (CD152). Ide o molekulu, ktorá za fyziologických okolností pri interakcii s kostimulačnými molekulami CD80, resp. CD86 v membránach aktivovaných T-lymfocytov indukuje negatívnu signalizáciu, a tým utlmenie imunitnej odpovede. CTLA-4 exprimujú aj regulačné T-lymfocyty, ktoré infiltrujú nádory a podporujú ich rast blokádou pôsobenia efektorových T-lymfocytov. V liečbe niektorých nádorov (neskoré štádium melanómu) sa preto využívajú monoklonové protilátky anti-CTLA4 (napr. ipilimumab), ktoré Treg-lymfocyty ničia mechanizmom od protilátky závislej cytotoxicity (ADCC), čím umožnia pôsobenie cytotoxických T-lymfocytov (33).

Nie nepodstatnú úlohu v zábrane efektívnej imunitnej odpovede majú aj makrofágy, ktoré sa nachádzajú v danom nádore (TAM – tumour associated macrophages). TAM môžu byť typu M1 alebo M2, v prípade M2 typu majú TAM protumorigénny efekt, napr. vo zvýšenej miere produkujú imunosupresívne cytokíny IL-10 a TGF- β a angiogénne faktory (VEGF, EGF, semaforín 4D). Do nádoru ich priťahuje najmä hypoxické a nekrotické tkanivo (40, 41).

Napokon na tlmení efektívnej imunitnej odpovede proti nádorom sa podieľajú aj **MDSC-bunky** (myeloid-derived suppressor cells). MDSC-bunky predstavujú heterogénnu populáciu buniek, ktorá sa skladá z myeloidných progenitorových buniek a nezrelých myeloidných buniek (IMC – immature myeloid cells). U zdravých jedincov IMC-bunky sa rýchlo diferencujú na zrelé granulocyty, monocyty alebo dendritové bunky. Naopak, za patologických okolností, ako je to pri malígnych procesoch, dochádza k čiastočnému bloku diferenciácie IMC do zrelej populácie myeloidných buniek a, naopak, k expanzii IMC. Kým u zdravých osôb množstvo MDSC-buniek v periférnej krvi je asi 0,5 % zo všetkých periférnych mononukleárových buniek, u pacientov s malígnym procesom sa toto množstvo zvyšuje až 10-násobne (42 – 44).

MDSC nie sú jednotnou populáciou, morfológicky ich možno rozdeliť na bunky, ktoré sa viac podobajú granulocytom a bunky, ktoré sa viac podobajú monocytom. MDSC-bunky aktivujú viaceré stimuly, ktoré produkujú najmä aktivované T-lymfocyty, strómové bunky nádorov, IFN- γ , TLR-ligandy, IL-4, IL-13 a TGF- β . Svoju supresorovú aktivitu uplatňujú prostredníctvom zvýšenej aktivity arginázy 1, iNOS (inducible nitric oxide synthase) a tvorbou reaktívnych produktov kyslíka. Argináza 1 konvertuje L-arginín na ureu a L-ornitín. Jej zvýšená aktivita spôsobí zvýšený katabolizmus L-arginínu, ktorého nedostatok v danom mikroprostredí inhibuje proliferáciu T-lymfocytov. iNOS tvorí oxid dusnatý. NO potláča aktivitu T-lymfocytov rozdielnymi mechanizmami, ako je indukcia ich apoptózy, blokáda ich signálnych dráh a inými spôsobmi. Na potlačaní imunitnej odpovede sa podieľajú aj reaktívne produkty kyslíka, konkrétne peroxinitrit, ktorý vzniká pri interakcii NO so superoxidom. Nitráciou antigénového receptora T-lymfocytov blokuje ich aktiváciu (42, 45).

MDSC-bunky prispievajú k imunosupresívnemu prostrediu aj svojou schopnosťou indukovať vznik regulačných T-lymfocytov a aj svojou schopnosťou diferencovať sa na makrofágy asociované s tumormi (TAM – tumour associated macrophages), ktoré majú inhibičný účinok na efektorové mechanizmy imunity a podporujú rozvoj nádoru (46, 47). Ďalší ich imunosupresívny mechanizmus sprostredkujú molekuly CD39 a CD73. **CD39** je enzým (ektonukleozid trifosfát difosfo-hydroláza-1), ktorý hydrolyzuje nukleové kyseliny, ktoré sa z buniek uvoľňujú pri svojom zániku; konkrétne štípi ADP, resp. ATP na AMP. Tento ďalej spracúva **CD73**, čo je opäť enzým (ekto-5'-nukleotidáza) a z AMP vzniká adenosín. Adenosín po väzbe na svoj receptor, A2AR, v membránach efektorových buniek, najmä pomocných a cytotoxických T-lymfocytov, potláča ich aktivitu (48). Tento mechanizmus využívajú aj regulačné B-lymfocyty (Breg), o ktorých sa v nedávnom čase dokázalo, že sa dostávajú do nádorov a spoluvytvárajú imunosupresívne prostredie (49).

MDSC-bunky presadzujú svoje imunosupresívne vlastnosti aj antigénovo-nešpecifickým aj antigénovo-špecifickým spôsobom. Tento posledný spôsob inhibície dokazuje, že blokáda imunitnej odpovede v nádore neznamená celkovú blokádu imunitnej odpovede pacienta. Zistilo sa, že pacienti s malígnym procesom dokážu odpovedať aj na iné stimuly ako len na nádorovo-špecifické antigény, napr. na vírusy. Napokon táto skutočnosť zodpovedá aj klinickým skúsenostiam, ktoré ukazujú, že aj pacienti v pokročilom stave nádorového procesu, ak nedostávajú vysoké dávky chemoterapie alebo nie sú v terminálnom štádiu choroby, systémovú imunodeficienciu nemajú (44).

Nedávno vyšla práca, ktorá na základe intratumorového imunitného stavu rozlišuje 6 imunitných subtypov nádorov – C1 až C6. C1-skupina sa vyznačuje zvýšenou expresiou angiogénnych génov a prevahou Th2 lymfocytov v infiltráte. C2-typ (IFN- γ dominantný) má najvyššiu M1/M2 polarizáciu, C3-typ charakterizuje zvýšená expresia génov pre Th17- a Th1-lymfocyty, C4-typ je chudobný na lymfocyty, C5-typ predstavuje skupinu nádorov, v ktorých dominujú M2-makrofágy a napokon C6-typ charakterizuje vysoká produkcia TGF- β a značná infiltrácia lymfocytmi prvého aj druhého typu imunity (50). Uvedená klasifikácia zrejme zlepši diagnostickú a terapeutickú prax lekárov.

Metastatický proces

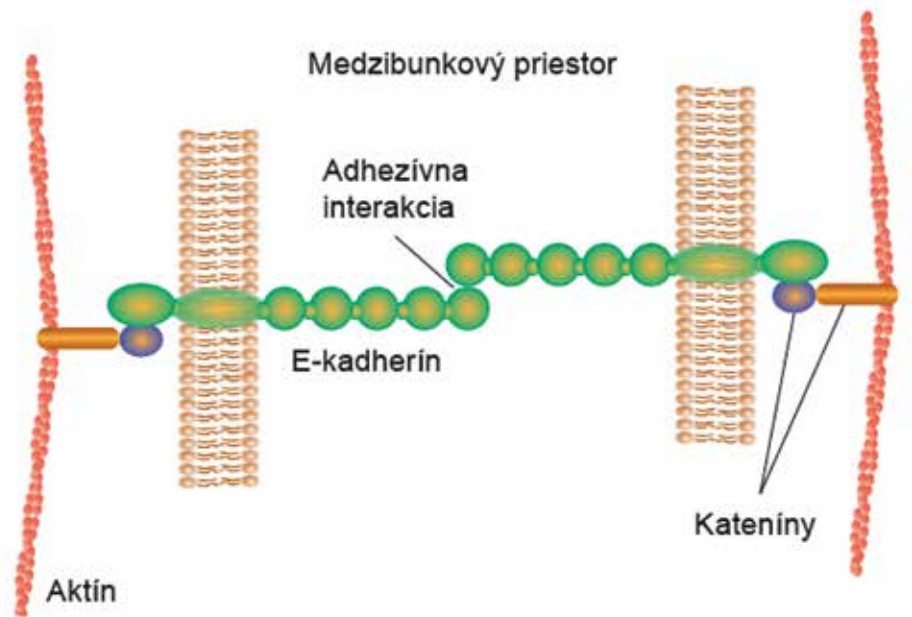
Najväčšou komplikáciou nádorového procesu je vznik a rast metastáz; zhubnosť nádoru je priamo úmerná s jeho schopnosťou metastázovať. Ukazuje sa, že metastatické bunky sa v nádore môžu nachádzať už od samého začiatku ako samostatná skupina buniek, ktorá je predurčená na metastázovanie (51). Invazívny charakter nie je špecifickou vlastnosťou len nádorových buniek, v obmedzenom rozsahu ju pozorujeme aj pri fyziologických okolnostiach. Ako príklad možno uviesť trofoblast, ktorý preniká do endometria, aby sa zabezpečil kontakt s krvným obehom matky. Podobne pri angiogenéze, endotelové bunky novovytváraných ciev musia prerážať bazálnymi membránami buniek a inter-

stíciom v tkanive, kde sa tvoria. Rozdiel medzi inváziou normálnych, zdravých buniek a inváziou malígnych buniek je v strate kontroly nad týmto procesom. Invázia nádorovej bunky závisí najmä od uvoľnenia sa z materského ložiska, penetrácie okolitým tkanivom tak, aby sa dostala do cirkulácie a od opustenia cievného riečiska a uchytenia sa v sekundárnom orgáne.

Proces uvoľňovania sa nádorových buniek z materského ložiska obyčajne sprevádza zníženie množstva adhezívnych molekúl, najmä **E-kadherínu**. Tento zabezpečuje homotropné adhezívne interakcie medzi bunkami a patrí k najvýznamnejším adhezívnym molekulám, ktoré sa zúčastňujú na morfogéneze, najmä počas embryonálneho vývoja. Je to glykoproteín, ktorého cytoplazmová časť sa spája s katenínmi, ktoré tvoria súčasť mikrofilamentovej siete bunky (obrázok 4). Poškodenie tejto siete spôsobí stratu typického vzhľadu epitelových buniek. Predpokladá sa, že práve znížením množstva alebo aj vymiznutia E-kadherínu z membrány bunky, čo sa potvrdilo pri mnohých karcinómoch, dochádza k uvoľneniu nádorovej bunky zo zväzku s inými bunkami. Navyše bunka nadobúda nediferencovaný tvar, stráca dezmozómy, stáva sa vretenovitou a mobilnejšou. Tento proces sa označuje ako **epitelovo-mezenchýmový prechod** (epithelial to mesenchymal transition – EMT) (52). Získanie mobility je zasa nevyhnutné na penetráciu nádorovej bunky do okolitého tkaniva.

Mobilita bunky sa zvyšuje ešte produkciou cytokínov indukujúcich pohyblivosť, ktoré pôsobia autokrinne. Tieto cytokíny pôsobia špecificky len na nádorové bunky, nezvyšujú napr. migračnú schopnosť leukocytov. Keď sa metastatická bunka uvoľní zo zväzku ostatných nádorových buniek, preniká okolitým tkanivom smerom k najbližšej cieve. Tento proces si zabezpečuje adhéziou k extracelulárnemu matrix a produkciou proteolytických enzýmov. Adhézia na medzibunkovú hmotu je opäť špecifická. Metastatické bunky vo zvýšenej miere exprimujú napr. antigén CD44, ktorého partnerská molekula v medzibunkovej hmote je kyselina hyalurónová. Postupom v tkanivom si metastatická bunka presa-

Obrázok 4. E-kadherín v adhezívnych intercelulárnych procesoch



E-kadherín zabezpečuje homotropné adhezívne interakcie medzi bunkami. Je to glykoproteín, ktorého cytoplazmová časť sa spája s katenínmi, ktoré tvoria súčasť mikrofilamentovej siete bunky. Poškodenie tejto siete spôsobí stratu typického vzhľadu epitelových buniek, bunka nadobúda nediferencovaný tvar, stráca dezmozómy, stáva sa vretenovitou a mobilnejšou. Získanie mobility je nevyhnutné na penetráciu nádorovej bunky do okolitého tkaniva.

dzuje syntézou proteolytických enzýmov, z ktorých najvýznamnejšie sú metaloproteinázy. Napokon sa dostáva do cirkulácie, ktorú však musí rýchlo opustiť, lebo ináč ju zničia protilátky s komplementom a NK-bunky, obyčajne do 30 minút. Snahou nádorovej bunky je uniknúť svojej záhube, takže sa aktívne snaží dostať z krvného riečiska von – priľne na endotel ciev a priestorom medzi endotelovými bunkami sa prekláza do parenchýmu sekundárneho orgánu či tkaniva. Prechod nádorových buniek sa deje na úrovni postkapilárnych venúl, pričom je špecifický. Ide v podstate o interakciu medzi adhezívnymi molekulami nádorovej bunky a adhezívnymi molekulami endotelových buniek, podobne ako je to pri fyziologických podmienkach, keď sa imunokompetentné bunky, napr. T-lymfocyty, potrebujú dostať z cievného riečiska do extravaskulárneho priestoru. Keďže táto interakcia je špecifická, miesto sekundárnej metastázy bude závisieť od typu adhezívnych molekúl v danom orgáne či tkanive. Vieme napríklad, že melanóm exprimuje VLA-4; jeho partnerskou molekulou je molekula VCAM-1 (CD106), ktorá sa nachádza najmä na endotelových bunkách pľúc. Interakcia VLA-4 s VCAM-1 takto zabezpečuje selektívnosť metastatického procesu mela-

nómu do pľúc. Podobne sa pri malígnom melanóme zistilo, že jeho bunky majú veľké množstvo $\alpha_v\beta_3$ -integrínu, ktorý sa viaže s vitronektinom a laminínom, proteínov, ktoré sú súčasťou bazálnych membrán najmä endotelových buniek pľúc. Aj karcinóm hrubého čreva má zabezpečenú selektívnosť metastatického procesu do pečene rovnakým mechanizmom – bunky rakoviny žalúdka sa viažu prostredníctvom svojich polysacharidových molekúl na E-selektín (CD62E), ktorý sa hojne vyskytuje na endotelových bunkách sínusov v pečeni (51, 53). Tieto fakty bude možné v budúcnosti využiť aj v liečbe nádorov. Zistením typu adhezívnych molekúl nádorových buniek bude možno predvídať terčový orgán prípadných metastáz, a tým sa naň diagnosticky a terapeuticky zamerať.

V poslednom čase sa zistilo, že na metastatickom procese sa môžu podieľať aj exozómy. **Exozómy** predstavujú malé membránové vezikuly endocytového pôvodu. Sú nositeľmi rôznych molekúl, ako sú DNA, mRNA, miRNA, proteíny, lipidy a iné molekuly. Exozómy sú schopné preniesť tieto bioaktívne molekuly z donorovej do recipientnej bunky, a tak ju priamo ovplyvniť. Vďaka štruktúre a schopnosti cirkulovať v telesných tekutinách exozómy umožňujú dopravu

niektorých molekúl do distálnych častí ľudského tela. Túto vlastnosť majú aj nádorové bunky a môžu tak predpripraviť mikroprostredie na vznik metastatického nádoru. Tak napr. exozómy exprimujúce integrín $\alpha\beta 5$ sa špecificky viažu na adhezívne molekuly Kupfferových buniek, čím je predurčený tropizmus daného nádoru pre pečeň. Podobne integríny exozómov $\alpha\beta 1$ a $\alpha\beta 4$ sa preferenčne viažu na adhezívne molekuly fibroblastov a epitelových buniek v pľúcach, čím je predurčený tropizmus nádorových buniek pre pľúca (54, 55).

Literatúra

1. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 1970;13:1-27.
2. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010;140(6):883-899.
3. Hao NB, Lu MH, Fan YH, et al. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:948098.
4. Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell.* 2015;27(4):462-472.
5. Chu WM. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett.* 2013;328(2):222-225.
6. Read CB, Kuijper JL, Hjorth SA, et al. Cutting Edge: identification of neutrophil PGLYRP1 as a ligand for TREM-1. *J Immunol.* 2015;194(4):1417-1421.
7. Bosco MC, Raggi F, Varesio L. Therapeutic Potential of Targeting TREM-1 in Inflammatory Diseases and Cancer. *Curr Pharm Des.* 2016;22(41):6209-6233.
8. Bucova M, Suchankova M, Dzurilla M, et al. Inflammatory marker sTREM-1 reflects the clinical stage and respiratory tract obstruction in allergic asthma bronchiale patients and correlates with number of neutrophils. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:628754.
9. Karapanagiotou EM, Pelekanou E, Charpidou A, T, et al. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) detection in cancer patients: a prognostic marker for lung metastases from solid malignancies. *Anticancer Res.* 2008;28(2B):1411-1415.
10. Saurer L, Zysset D, Rihs S, et al. TREM-1 promotes intestinal tumorigenesis. *Sci Rep.* 2017;7(1):14870.
11. Naglova H, Bucova M. HMGB1 and its physiological and pathological roles. *Bratisl Lek Listy.* 2012;113(3):163-171.
12. Pilzwegger C, Holdenrieder S. Circulating HMGB1 and RAGE as Clinical Biomarkers in Malignant and Autoimmune Diseases. *Diagnostics (Basel).* 2015;5(2):219-253.
13. Wang X, Xiang L, Li H, et al. The Role of HMGB1 Signaling Pathway in the Development and Progression of Hepatocellular Carcinoma: A Review. *Int J Mol Sci.* 2015;16(9):22527-22540.
14. Palucka AK, Coussens LM. The Basis of Oncoimmunology. *Cell.* 2016;164(6):1233-1247.
15. Heredia-Galvez B, Ruiz-Cosano J, Torres-Moreno D, E, et al. Association of polymorphisms in TRAIL1 and TRAILR1 genes with susceptibility to lymphomas. *Ann Hematol.* 2014;93(2):243-247.
16. Villa-Morales M, Fernandez-Piqueras J. Targeting the Fas/FasL signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2012;16(1):85-101.
17. Schild H, Rammensee HG. gp96--the immune system's Swiss army knife. *Nat Immunol.* 2000;1(2):100-101.
18. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(1):7-19.
19. Garcia-Beltran WF, Holzemer A, Martrus G, et al. Open conformers of HLA-F are high-affinity ligands of the activating NK-cell receptor KIR3DS1. *Nat Immunol.* 2016;17(9):1067-1074.
20. Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(1):41-49.
21. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, et al. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(4):239-252.
22. Ling L, Lin Y, Zheng W, et al. Circulating and tumor-infiltrating mucosal associated invariant T (MAIT) cells in colorectal cancer patients. *Sci Rep.* 2016;6:20358.
23. Kohrt HE, Houot R, Marabelle A, et al. Combination strategies to enhance antitumor ADCC. *Immunotherapy.* 2012;4(5):511-527.
24. Powell DR, Huttenlocher A. Neutrophils in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol.* 2016;37(1):41-52.
25. Dumitru CA, Moses K, Trellakis S, Let al. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61(8):1155-1167.
26. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoeediting. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:329-360.
27. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al. Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002;3(11):991-998.
28. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, S et al. New insights into cancer immunoeediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* 2014;27:16-25.
29. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011;331(6024):1565-1570.
30. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature.* 2007;450(7171):903-907.
31. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of „tumor escape“ phenotypes. *Nat Immunol.* 2002;3(11):999-1005.
32. Vesely MD, Schreiber RD. Cancer immunoeediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1284:1-5.
33. Ito A, Kondo S, Tada K, et al. Clinical Development of Immune Checkpoint Inhibitors. *Biomed Res Int.* 2015;2015:605478.
34. Hamid O, Robert C, Daud A, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med.* 2013;369(2):134-1344.
35. Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD. CTLA-4 and PD-1 Pathway Blockade: Combinations in the Clinic. *Front Oncol.* 2014;4:385.
36. Durr S, Kindler V. Implication of indolamine 2,3 dioxygenase in the tolerance toward fetuses, tumors, and allografts. *J Leukoc Biol.* 2013;93(5):681-687.
37. Kawasaki BT, Farrar WL. Cancer stem cells, CD200 and immunoevasion. *Trends Immunol.* 2008;29(10):464-468.
38. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol.* 2016;7:550.
39. Boyerinas B, Jochems C, Fantini M, et al. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of a Novel Anti-PD-L1 Antibody Avelumab (MSB0010718C) on Human Tumor Cells. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(10):1148-1157.
40. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol.* 2014;5:514.
41. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity.* 2014;41(1):49-61.
42. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(3):162-174.
43. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, et al. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(8):618-631.
44. Solito S, Bronte V, Mandruzzato S. Antigen specificity of immune suppression by myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol.* 2011;90(1):31-36.
45. Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(2):238-244.
46. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 2010;32(5):593-604.
47. Ma G, Pan PY, Eisenstein S, et al. Paired immunoglobulin-like receptor-B regulates the suppressive function and fate of myeloid-derived suppressor cells. *Immunity.* 2011;34(3):385-395.
48. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med.* 2013;19(6):355-367.
49. Sarvaria A, Madrigal JA, Saudemont A. B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cell Mol Immunol.* 2017;14(8):662-674.
50. Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, et al. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity.* 2018;48(4):812-810 e14.
51. Seyfried TN, Huysentruyt LC. On the origin of cancer metastasis. *Crit Rev Oncog.* 2013;18(1-2):43-73.
52. Canel M, Serrels A, Frame MC, et al. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 2):393-401.
53. Lafrenie RM, Buchanan MR, Orr FW. Adhesion molecules and their role in cancer metastasis. *Cell Biophys.* 1993;23(1-3):3-89.
54. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* 2015;527(7578):329-335.
55. Zdiriencikova M, Gronosova P, Cholujova D, Sedlak J. Potential biomarkers of exosomal cargo in endocrine signaling. *Endocr Regul.* 2015;49(3):141-150.

Doc. MUDr. Mária Bucová, CSc.

Imunologický ústav LF UK
Odborárske nám 14, 13 72 Bratislava
maria.bucova@fmed.uniba.sk