

ZÁKLADY IMUNOLOGIE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

MUDr. Zbyněk Veselský, Ph.D.¹, MUDr. Petr Macek², doc. MUDr. Petr Morávek, CSc.²,
prof. Ing. Vladimír Mařha, DrSc.³, MUDr. Miroslav Förstl⁴, prof. MUDr. Peter Višňovský, CSc.⁵,
MUDr. Petr Prošvic², MUDr. Karel Odrážka, Ph.D.⁶, MUDr. Miloslava Vaculíková⁶, MUDr. Lukáš Holub²

¹Poradenská a konzultační činnost

²Urologická klinika FN a LF UK Hradec Králové

³Department Science and Research IVEX, United States of America

⁴Ústav klinické mikrobiologie FN a LF UK Hradec Králové

⁵Katedra farmakologie a toxikologie FaF UK Hradec Králové

⁶Klinika onkologie a radioterapie FN a LF UK Hradec Králové

Výzkum imunitního systému lidského organismu vede nejen k jeho pochopení jako samozřejmé části fyziologie člověka, ale také odhaluje pochody, jejichž přirozený nebo patologický průběh chrání nebo vyvolává řadu chorobných stavů. Schopnost vyvolat, usměrnit nebo ukončit imunitní pochod může znamenat ovlivnění řady chorob, které dosud umíme léčit pouze omezeně. Nádorová onemocnění stále patří mezi nejčastější příčiny úmrtí ve vyspělých zemích. Je zřejmé, že růst nádorů je od určitého množství buněk populační linie mimo kontrolu imunitního systému a dochází tak k růstu a progresi nádoru. Velikost buněčné populace a citlivost k jednotlivým (především komunikačním) složkám imunitního systému jsou pro prognózu nádorového onemocnění zcela zásadní. Dosavadní lokální (chirurgie, radioterapie) nebo systémová (chemoterapie, biologická terapie) léčba vede k úspěchu u některých malignit (např. zavedením cis – platiny a jejich derivátů jsou mužské germinální tumory léčitelné i ve vysokém klinickém stadiu), ale stále existuje řada malignit rezistentních k systémové chemoterapii (např. renální karcinom). Snad právě zde je pochopení imunologických pochodů základem k terapeutickému úspěchu.

Klíčová slova: nádorová onemocnění, imunitní mechanismy, protinádorová léčba.

BASICS OF IMMUNOLOGY OF TUMOROUS DISEASES

Research of human's organism immune system leads not only to its understanding as an obvious part of man's physiology, but it also reveals processes, which, in their natural or pathological course, can protect or cause a number of pathological processes. Ability to cause, to modulate or to terminate an immune process can mean the influence on many diseases, which we can treat until now only limitedly. Tumorous diseases still belong among the most frequent cause of death in well-developed countries. It is obvious that tumour growth is out of control of immune system from a certain number of cells in population line so the growth and progression of tumour arise. Extent of cell population and sensitivity to individual (communication above all) parts of immune system are completely essential for the prognosis of tumorous disease. Contemporary local (surgery, radiotherapy) or systemic (chemotherapy, biological therapy) therapy has success in some malignancies (e. g. with an introduction of cis-platin and its derivatives are male germ-cell tumours curable also in high clinical stage), but there is still an amount of malignancies resistant to the systemic therapy (e. g. a renal carcinoma). May be right there is the understanding to immune processes a key to therapeutic success.

Key words: malignant diseases, immune mechanisms, antitumour therapy.

Úvod

Nádorová (maligní) onemocnění postihují populaci v celém jejím věkovém i pohlavním rozvrstvení. I přes názory o případné protektivní funkci některých hormonů jde o postupy, které modulují procesy na buněčné úrovni a zásah na této úrovni je obvykle provázen četnými vedlejšími účinky (aplikace estrogenů u mužů s adenokarcinomem prostaty). Maligní onemocnění jsme schopni ovlivnit několika způsoby – chirurgicky, aplikací ionizujícího záření (teleradioterapie, brachyterapie), podáním chemoterapie, biologickou terapií nebo kombinací uvedených postupů.

Chirurgické postupy mohou být bioptické (získání materiálů k určení diagnózy, bez efektu na vlastní onemocnění), parciální (také:

cytoredukční – část nádoru zůstává in situ), nebo radikální (odstranění kompletního objemu nádoru a případně také spádových lymfatických uzlin). Z pohledu organismu se však vždy jedná o terapii lokální, která nevyklučuje komplikace z vlastního výkonu (např. krvácení s hypotenzí) nebo diseminace nádorových buněk při manipulaci s nádorem (stále rozporuplné), případně uvolnění látek – produktů nádorových buněk.

Teleradioterapie – zevní ozáření – prováděná řadou technik a schémat, dnes směřuje k cílenému podání vysoké dávky na vlastní nádor s vykrytím zdravé tkáně (IMRT = Intensity Modulated RadioTherapy). I zde se jedná o lokální terapii, jejíž zásah do imunitních pochodů je vysoký a to především indukci zánětlivé systémové odpovědi organismu.

Brachyterapie – zavedení zářiče do organismu prostřednictvím speciálních aplikátorů (prostata, hrdlo děložní) vede k přísně lokálnímu efektu s primárně lokální, později opět se systémovou zánětlivou reakcí.

Chemoterapie – ve smyslu systémového podání (lze aplikovat i regionálně) je významným modulátorem imunitní odpovědi a řada protokolů s těmito pozitivními efekty počítá. Zásadním efektem je však vliv na buňku (obvykle s vysokou mitotickou aktivitou) a imunitní stimulace je vedlejším efektem.

Biologická terapie (aktivní nebo pasivní) spočívá v aplikaci imunologicky aktivních látek a právě jejich efekt je považován za zásadní (3, 7). Biologická terapie může působit na různých stupních imunitní kaskády podle podané látky. Nejčastěji se aplikují cytokiny

(interferon = IFN, interleukin = IL), velké naděje jsou vkládány do aplikace dendritických buněk (6, 7, 11, 13).

Existuje řada důkazů, které svědčí o úloze imunity v iniciaci a progresi nádorových onemocnění. Imunosupresivní terapie u orgánových transplantací je zatížena vznikem nemelanomových nádorů kůže a hemoblastóz. Je prokázáno, že organismus reaguje v rámci specifické protinádorové odpovědi zvýšením produkce proteinu p53, případně proteinů (antigenů) jiné diferenciací linie (tyrozináza).

Imunitní odpověď organismu je nespecifická nebo specifická. K nespecifické řadíme systém komplementu, makrofágy/monocyty, granulocyty a trombocyty. Specifickou imunitou pak nazýváme pochody, které souvisejí s funkcí a změnami v lymfocytech – T a B (LyT, LyB). Sem patří jejich přímé působení (LyT) i tvorba protilátek (LyB). Jinak lze dělit imunitu na buněčnou a humorální.

Úloha leukocytů

Leukocyty jsou efekторы protinádorové imunitní odpovědi. V průběhu nádorového onemocnění dochází k jejich modifikaci a to jak ve funkci, tak ve struktuře, které jsme schopni ozřejmit cytoflowmetrií. Uplatňují se makrofágy/monocyty, granulocyty, dendritické buňky a lymfocyty.

Makrofágy (označení pro buňky, které vycestovaly do tkáně) vznikají z monocytů (cirkulují v periferní krvi) stimulací ve tkáních. Obsahují molekulu CD14 a HLA molekuly 2. třídy, což umožňuje rozpoznání a fagocytózu apoptotických buněk (5). Exprimují povrchové molekuly CD80 a CD86 (co-stimulated cells, kostimulační molekula) a mají jak cytotoxický, tak cytostatický efekt.

Granulocyty se uplatňují především v subtypu neutrofilním (neutrofilní granulocyty). Vliv eozinofilů a bazofilů není dosud zcela zřejmý. Neutrofilní granulocyty mají nejen schopnost fagocytózy, ale také tvorby kyslíkových radikálů.

Dendritické buňky – jsou nejvýznamnějšími tzv. antigen prezentujícími buňkami (APC = Antigen Presenting Cells). Jde o HLA-DR pozitivní buňky (exprimují HLA molekuly 1. i 2. třídy) s vysokou schopností exprese kostimulačních molekul (1). Kromě mozku lze jednotlivé subtypy nalézt ve všech orgánech.

Lymfocyty typu T exprimují molekulu CD3 a existují v subtypu helperů (pomáhačů) – na povrchu znak CD4 a supresorů se znakem CD8. Právě přítomnost povrchových molekul určuje afinitu k dané třídě HLA systému – CD4 k 2. třídě, CD8 k 1. třídě. Zmíníme ještě přítomnost dvou receptorů – CD28 a CD152. CD28 svou aktivací vede k pozitivní stimulaci, CD152

má efekt inhibiční. Exprimuje kostimulační molekuly CD80 a CD86 (2, 5, 12).

Lymfocyty typu B jsou odpovědné za protilátkovou imunitu. Exprimují HLA molekuly 2. třídy, kostimulační molekuly a patří k základním antigen prezentujícím buňkám (APC) (1).

NK buňky (Natural Killer) neexprimují molekulu CD3 a jsou charakterizované přítomností CD16 a CD56 (4).

Protektivní funkce imunitního systému ve vztahu k nádorovému bujení

Vznik imunitní (specifické) odpovědi je závislý na rozpoznání antigenů. Tuto reakci zprostředkovávají antigen prezentující buňky (APC). U APC buněk dojde k proteolýze s transportem jednotlivých peptidů do specifických kompartmentů, kde dochází k nekovalentní vazbě s molekulami HLA systému především 2. třídy. Tato vazba je pro rozpoznání antigenů zásadní a je zprostředkována LyT – helper (LyTH CD4). Tato skupina však není homogenní a podle schopností tvořit cytokiny rozeznáváme subtyp 1 a 2 (LyTH₁ a LyTH₂). Nutná je přítomnost kostimulačních molekul (2). LyTH₁ – IL-2, IL-12, INF- γ a LyTH₂ – IL-4, IL-10.

Mechanismy iniciace a progresie nádorů

Proti protinádorovým mechanismům imunitního systému existuje celá řada mechanismů, vesměs chemické povahy. Jejich cílem je ochránit nádorové buňky a vyjmout je z kontroly. Exprese molekul CD55 a CD59 inhibuje komplement a chrání buňku před lýzou. Nádorové buňky tvoří řadu komunikačních látek, které mají zmýlit imunitní systém – například transformující růstový faktor beta (TGF- β) a prostaglandin E₂. Jakmile nádorová buňka ztratí schopnost exprimovat HLA molekuly, je pro imunitní systém nerozpoznatelná (produkce látek blokujících imunitní systém) (6). Nádorové buňky produkují fas ligandy, které vyvolají apoptózu LyT po jeho navázání na jejich receptory (9).

Nádorové kompartmenty

Nejen u nádorových onemocnění pozorujeme, že se buňky, ale i farmaka chovají v různých oblastech rozdílně. Důvodem je nejen cévní zásobením, ale také tzv. mikroprostředí nádoru. Z tohoto pohledu je nutno chápat nádorové onemocnění jako jev, který probíhá minimálně ve dvou kompartmentech – ve vlastním nádoru a jeho stromatu (obvykle infiltrované lymfocyty) a v zevním (periferním) kompartmentu, které tvoří vlastní organismus. Zvláštní pozornost je věnována lymfocytům, které se nacházejí ve stromatu nádoru nebo

přímo v něm. Protože se jedná o lymfocyty, jejichž vlastnosti jsou poněkud rozdílné od vlastností lymfocytů z periferní krve, nazýváme je tumor infiltrující lymfocyty (TIL) (9). TIL jsou v experimentu účinnější než lymfocyty periferní krve. Většina prací zpracovává TIL z oblasti maligního ascitu (obvykle karcinomatóza peritonea s inhibovanou resorpcí, metastázy v játrech, obstrukce lymfatických cév) (8). Tyto TIL však nelze zcela převést na TIL solidních nádorů.

Studium TIL solidních nádorů je poměrně komplikované. Na získaných lymfocytech nacházíme odchylky v expresi cytokinů, a to jak ve smyslu inhibice, tak stimulace. Zatím víme, že dochází-li ke změně (snížená exprese) na theta řetězci receptorů LyT, je prognóza onemocnění horší. Jednotlivé změny fenotypu lymfocytů jsme schopni diagnostikovat průtokovou cytometrií (cytoflowmetrie) (10).

Princip průtokové cytometrie (cytoflowmetrie)

Buňky jsou uloženy v izotonické tekutině a ta je hnána tryskou do silnější kapiláry. Při průchodu je buňka nasvícena paprskem, který je jí rozptýlen. Tento světelný rozptyl je zachycen fotodetektory, které jej převádí na elektrický impuls. Ten je po zesílení graficky zpracováván. Každý typ buňky má svůj specifický rozptyl. Metoda je zpřesněna užitím protilátek proti specifickým receptorům (CD3, CD4 atd.), na které je navázán fluorochrom. Poté detekujeme fluorescenci (10).

Systémová zánětlivá odpověď v rámci protinádorové imunity organismu

Systémová zánětlivá odpověď organismu těsně souvisí s imunitními pochody. Je závislá na uvolňování cytokinů, které její průběh modulují a modifikují. Zánět hodnotíme jako obecnější a komplexnější reakci organismu na patologickou noxu, kdy imunitní reakce jsou řídící, ale nikoliv jediné. Zánět je ovlivněn cytokiny leukocytů, které zprostředkovávají nespecifickou imunitní odpověď (IL-1, IL-6, TNF- α). Tyto změny odrážejí reaktanty akutní zánětlivé fáze, kdy je v praxi nejčastěji užíván průkaz C – reaktivního proteinu (CRP). Úloha LyT je v klinické praxi důležitá pro určení prognózy onemocnění. Produkce interferonu- γ vede k tvorbě neopterinu z guanosin trifosfátu. Hladina neopterinu je spojena s negativní prognózou (8).

Tvorba zánětlivých markerů je obecně nepříznivým faktorem, který komplikuje možnosti biologické léčby. Jejich přesah a vliv především na endotel může mít vliv na fatální průběh onemocnění, kdy exitus letalis nastává v důsledku endotelální dysfunkce (selhání kardiovaskulárního systému).

Závěr

Je poměrně komplikované popisovat složité a často velmi komplexní reakce imunitního systému tak, aby byly přehledné pro poučení v běžné praxi, případně před atestační zkouškou. Již složení autorského týmu ukazuje, že jsme hledali konsenzuální vyjádření důležitého a méně významného a snažili jsme se komplikované názvy překládat do „logických“ jmen a pojmenování. Význam znalosti nádorové imunity je zřejmý. Bude-li to urolog, kdo zahrne do svých terapeutických kritérií i biologickou léčbu (specifickou = nádorové vakcíny, nespecifickou = cytokiny), bude dříve nebo později nucen znát její indikace a kontraindikace: například vzestup CD3+ HLA-DR+ LyT a CD3+ CD69+ LyT a nízké hodnoty CD3+ CD4+, CD3+ CD28+ LyT jsou známkou špatného efektu biologické terapie, zatím co pokles CD3+ CD4+ LyT ukazuje na omezenou dostupnost efektorů pro adoptivní imunoterapii a de facto stejně jsme na tom při snížené expresi CD8+ CD28+ LyT, protože dojde ke snížení exprese CD8+ LyT.

Stejně „komplikované“ je vyrobit specifický protinádorový lék (one drug), vezmeme-li v úvahu, jak imunologicky heterogenně se chovají histologicky identické tumory. Získávání dendritických buněk, jako nejvýznamnějších antigen prezentujících efektorů, je problematické nejen pro jejich namnožení in vitro, ale také proto, že autologní buňky již překonaly imunitní systém (odejmuli jsme je solidnímu tumoru) a mohou nést všechny problémy s prezentací antigenů a lýzou LyT.

V urologii se užívá nespecifických postupů, kdy po aplikaci cytokinů sledujeme vzestup NK buněk a obecně cytotoxické aktivity (11). Je-li však hladina fyziologická, nemůže vést tato stimulace k druhému extrému? Snaha o aktivaci komplementu je logická, avšak drtivě většina nádorových buněk exprimuje CD46, CD55 a CD59, které je chrání před navázáním a účinkem komplementu. „Výhodně“ se jeví tumory s jasně definovaným vnitřním kompartmentem (karcinom ovária), kdy jsme schopni aplikací autologních LAK buněk (Lymphokine

Activated Killer), TIL (Tumour Infiltrating Lymphocyte) a aktivovaných makrofágů do peritoneální dutiny zvýšit „cytotoxicitu“ protinádorových buněk.

Výzkumy v oblasti imunity pokračují a spolu s genetickými metodami vedou k neobyčejnému rozmachu našeho převážně „morfologického“ vědění. Urologie spojuje intelektuálnost interní medicíny, eleganci endoskopické operativy, razanci a rozhodnost otevřené operativy. Bazální imunologické znalosti budou naší další samozřejmou znalostí.

Literatura

1. Arina A, Tirapu I, et al. Clinical implications of antigens transfer mechanism from amlignant to dendritic cells exploiting cross-priming. *Exp Hematol*, 2002; 30(12): 1355-64.
2. Dredge K, Marriott JB, et al. Adjuvants and the promotion of Th1-type cytokines in tumour immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 2002; 51(10): 521-31.
3. Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer*, 2003; 3(9): 666-75.
4. Farag SS, VanDeusen JB, et al. Biology and clinical impact of human natural killer cells. *Int J Hematol*, 2003; 78(1): 7-17.
5. Ferenčík M, Rovenský J, Nyulassy Š. *Imunológia*. 2. vydanie, SAP, Bratislava, 2001, 348 s.
6. Cheng WF, Hung CF, et al. CD8+ T cells, NK killers and IFN-gamma are important for control of tumour with down-regulated MHC class I expression by DNA vaccination. *Gene Ther*, 2003; 10(16): 1311-20.
7. Jotereau F, Labarriere N, et al. Passive immunotherapy of melanoma. *Bull Cancer*, 2003; 90(7): 583-6.
8. Melichar B, Touskova M, et al. The phenotype of ascitic fluid lymphocytes in patients with ovarian carcinoma and other primaries. *Onkologie*, 2001; 24(2): 156-60.
9. Michael-Robinson JM, Pandeya N, et al. Fas ligand and tumour counter-attack in colorectal cancer stratified according to microsatellite instability status. *J Pathol*, 2003; 201(1): 46-54.
10. Ogino T, Wang X, Ferrone S. Modified flow cytometry and cell-ELISA methodology to detect HLA class I antigen processing machinery components in cytoplasm and endoplasmic reticulum. *J Immunol Methods*, 2003; 278(1-2): 33-44.
11. Oosterwijk-Wakka JC, Tiemessen DM, et al. Vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma with autologous dendritic cells pulsed with autologous tumour antigens in combination with interleukin-2: a phase 1 study. *J Immunother*, 2002; 25(6): 500-8.
12. Plautz GE, Cohen PA, et al. Consideration on clinical use of T cell immunotherapy for cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2003; 51(4): 245-57.
13. Sloan AE, Parajuli P. Human autologous dendritic cell-glioma fusion: feasibility and capacity to stimulate T cells with proliferative and cytolytic activity. *J Neurooncol*, 2003; 64(1-2): 177-83.