

# ZŁOŻONE PROBLEMY LECZENIA NOWOTWORÓW

## PROBLEMS OF CANCER TREATMENT

### CZEŚĆ I

#### PRZESŁANKI TEORETYCZNE WYNIKAJĄCE Z POZNANIA MECHANIZMÓW OBRONY PRZECIWNOWOTWOROWEJ

### PART I

#### THEORY OF TREATMENT BASED ON KNOWN MECHANISMS OF ANTICANCER IMMUNOLOGICAL RESPONSES

Jerzy KAWIAK<sup>1</sup>, Grażyna HOSER<sup>2</sup>, Joanna DOMAGAŁA-KULAWIK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęcz, PAN,  
Warszawa

<sup>2</sup>Pracownia Cytometrii Przepływowej,

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

<sup>3</sup>Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii,  
Warszawski Uniwersytet Medyczny

*Streszczenie:* Z kancerogenezą związanych jest wiele różnych procesów zachodzących zarówno w komórkach jak też i w ich środowisku. Celem obecnego opracowania jest przypomnienie złożonych mechanizmów onkogenezy z szczególnym z uwzględnieniem odpowiedzi układu immunologicznego. Obserwuje się wiele wspólnych etapów w rozwoju guzów litych oraz białaczek i chłoniaków. Choroby nowotworowe nie można zrozumieć biorąc pod uwagę jedynie zjawiska mutacji genetycznych komórek. Komórki nowotworowe charakteryzuje duża zmienność antygenowa oraz oporność na apoptozę. Komórki te tworzą wokół siebie mikrośrodowisko chroniące je przed aktywnością obronną organizmu. W pracy przedstawiamy poznane mechanizmy obrony przeciwnowotworowej ale także liczne elementy wymykania się nowotworów litych i białaczek spod nadzoru immunologicznego. Przyjęte ogólnie leczenie nowotworów dąży do zmniejszenia liczby komórek nowotworowych. Stwierdzono, że równoległym lub kolejnym po resekcji guza, radioterapii czy chemioterapii skutecznym etapem leczenia jest zwiększenie klonów komórek układu odpornościowego. Jedną z dróg aktywacji układu odpornościowego jest autoszczepienie własnymi komórkami nowotworowymi wprowadzonymi w apoptozę. Jednakże próby takiej terapii często nie przynoszą spodziewanych rezultatów z powodu zablokowania aktywności komórek cytotoksycznych. Dalszym etapem aktywacji układu odpornościowego powinno być usuwanie uruchomionej przez nowotwór blokady tego układu. Próby w tym

kierunku polegają na neutralizacji zablokowanych przez nowotwór cytotoksycznych właściwości komórek obronnych, głównie limfocytów T. Poznane mechanizmy blokowania aktywności komórek T w układzie PD-1/PD-L1 czy hamowania aktywacji przez cząsteczkę CTLA-4 dały podstawy do opracowania skutecznych sposobów immunoterapii nowotworów.

*Słowa kluczowe:* terapia celowana, rak płuca, białaczki, mikrośrodowisko guza, komórki supresorowe, markery nowotworowe

*Summary:* In cancerogenesis there are several processes following within cells and microenvironment. In the introduction were recalled basic processes of cancer development and immunological response. It was suggested that there are several common stages in tumor cancer development and leukemia/lymphomas. The cancer development cannot be understood analyzing only the genetic mutations of cancer cells. The appearing cancer cells are characterized by high antigen instability, and resistance to apoptosis. The cancer cells organize surrounding microenvironment protecting them from cells of immunological system of the organism. Some anticancer immunological mechanisms are known, and also escape mechanisms from immune control. Generally accepted cancer treatment is based on removal and decrease of cancer cell number by surgery, radiotherapy or/and chemotherapy. Parallel or following therapeutic activity is induction of several anticancer T cell clones of patient immunological system. One of possible ways of patient immunological activation is autovaccination with own apoptotic cancer cells. However, autovaccination do not give longterm results due to block of immunological cytotoxic cells activity. In this situation, the next step of immunotherapy should be based on removal of the immunological block of cytotoxic T cells. The blocking systems of T cells, PD-1/PD-L1 and CTLA-4 may be removed with special immunological treatment as described in part 2 of the publication.

*Key words:* targeted therapy, lung cancer, leukemia, tumor microenvironment, suppressor cells, tumor markers

*Wykaz stosowanych skrótów:* **ADCC** – *Antibody Dependend Cell Cytotoxicity* – zależna od przeciwciał cytotoksyczność komórkowa, **AML** – *Acute Myeloid Leukemia* ostra białaczka szpikowa, **APC** – *Antigen Presenting Cell* – komórka prezentująca antygen, **BAL** – *Bronchoalveolar Lavage* – płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe, **BTLA** – *B,T Lymphocyte Attenuator* – “spawalniacz” limfocytów B,T, CD272, **CLL** – *Chronic Myeloid Leukemia* – przewlekła białaczka limfocytowa, **CML** – *Chronic Myeloid Leukemia* – przewlekła białaczka szpikowa, **CRAM** – (znany również jako HCR lub CCRL2) *Chemokine Receptor on Activated Macrophages* – receptor chemokin na aktywowanych makrofagach, **CTLA-4** – *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4* – antygen-4 limfocytów cytotoksycznych, CD152, **CTLs** – *Cytotoxic T Lymphocytes* – limfocyty cytotoksyczne, **DAMPs** – *Danger (Damage) Associated Molecular Patterns* – cząsteczki związane z uszkodzeniem, **DCs** – *Dendritic Cells* – komórki dendrytyczne, **EGFR** – *Epidermal Growth Factor Receptor* – receptor naskórkowego czynnika wzrostu, **EMT** – *Epithelial Mesenchymal Transition* – przemiana mezenchymalno-nabłonkowa, **EOC** – *Epithelial Ovary Cancer* – nabłonkowy rak jajnika, **EpCAM** – *Epithelial Cell Adhesion Molecule* – cząsteczka adhezyjna komórek nabłonkowych, **Fc** – fragment stały łańcucha ciężkiego, **Foxp3** – *Forkhead box P3* – czynnik transkrypcyjny Foxp3, **HMGB 1** – *High-Mobility Group Box-1* – białko o dużej ruchliwości elektroforetycznej, **HSP** – *Heat Shock Protein* – białko szoku termicznego, **IL** – interleukina, **LAG-3** – *Lymphocyte Activation Gen-3* – gen-3 aktywacji limfocytu, **M1, M2** – subpopulacje makrofagów M1, M2, **MAGE – A3 melanoma associated antigen** – antygen związany z czerniakiem, **MDM2** – *Murine Double Minute2* – mysie białko MDM2 (E3 ligaza ubikwityny), **MDSCs** – *Myeloid Derived Suppressor Cells* – komórki supresorowe pochodzenia szpikowego, **MHC** – *Major Histocompatibility Complex* – główny układ zgodności tkankowej, **MMP** – *Metalloproteinase* – metaloproteinaza, **MUC1** – *Mucin 1, cell surface*

*associated* – mucyna błonowa 1, **NK** – *Natural Killer Cells* – komórki NK, **NKT** – *Natural Killer T Cells* – komórki NKT, **NO** – *Nitric Oxide* – tlenek azotu, **PD-1** – *Programmed cell Death protein1* – białko PD-1, CD279, **PD-L1**, **PD-L2** – ligand dla PD-1, **POChP** – przewlekła obturacyjna choroba płuc, **ROS** – *Radical Oxygen Species* – wolne rodniki tlenowe, **TAM** – *Tumor Associated Macrophages* – makrofagi towarzyszące guzowi, **TAN** – *Tumor Associated Neutrophils* – neutrofile towarzyszące guzowi, **TATE** – *Tumor Associated Tissue Eosinophils* – tkankowe eozynofile towarzyszące guzowi, **TCR** – *T Cell Receptor* – receptor limfocyta T, **TGFβ** – *Transforming Growth Factor B* – transformujący czynnik wzrostu β, **Th** – *T helper lymphocytes* – limfocyty T pomocniczne, **Tc** – *T cytotoxic lymphocytes* – limfocyty T cytotoksyczne, **TIL** – *Tumour Infiltrating Lymphocytes* – limfocyty naciekające guz, **Tim3** – *mucin domain-containing molecule-3* – transbłonowa immunoglobulina i mucyna 3, **TIMP-1** – *Tissue Inhibitors of Metalloproteinase-1* – tkanowy inhibitor metaloproteinyazy 1, **TNF** – *Tumor Necrosis Factor* – czynnik martwicy nowotworu, **Tregs** – *regulatory T lymphocytes* – limfocyty T regulatorowe

## WSTĘP

Nowotwór obok schorzeń układu krążenia jest najczęstszą przyczyną zgonów. Celem niniejszego omówienia jest podsumowanie dotychczasowych możliwości leczenia oraz przedstawienie podstaw immunoterapii, która może wspomagać klasyczną terapię nowotworów. Obecnie obserwuje się tendencję diagnozowania nie tylko typu nowotworu i jego markerów, ale też stanu układu odpornościowego pacjenta pod kątem indywidualnej prognozy przebiegu schorzenia [59]. Celem tego opisu nie jest podawanie szczegółów leczenia, ale ogląd problemów dotyczących terapii mających na celu kontrolę i aktywację układu odpornościowego chorych.

## JAK POWSTAJĄ NOWOTWORY NA PRZYKŁADZIE RAKA PŁUCA ORAZ BIAŁACZEK

Guzy nowotworowe rozwijają się w wielu etapach, dobrze opisanych np. dla raka jelita grubego człowieka czy dla czerniaka skóry u myszy [3, 16, 78].

Potranslacyjne modyfikacje histonów, metylacja i demetylacja zasad w kwasach nukleinowych podobnie jak zmiany w sekwencji nukleotydów, translokacje fragmentów chromosomów prowadzą do aktywacji lub inaktywacji szeregu genów. Zmiany epigenetyczne mogą stabilnie reprogramować komórki, które przyjmują fenotyp komórek nowotworowych [112]. Komórki z początkowymi mutacjami, transformowane, mogą ze sobą konkurować, zachodzi selekcja komórek, które stopniowo tworzą nieduże ognisko bądź zmiany wewnątrz nabłonkowe, np. dysplastyczne. Rozwinięte nowotwory składają się nie tylko z komórek transformowanych, ale zawierają liczne nietransformowane komórki podścieliska i układu immunologicznego. Układ odpornościowy gospodarza we wczesnych etapach onkogenezy rozpoznaje i odpowiada na obecność zmienionych komórek, a dalszy rozwój nowotworu

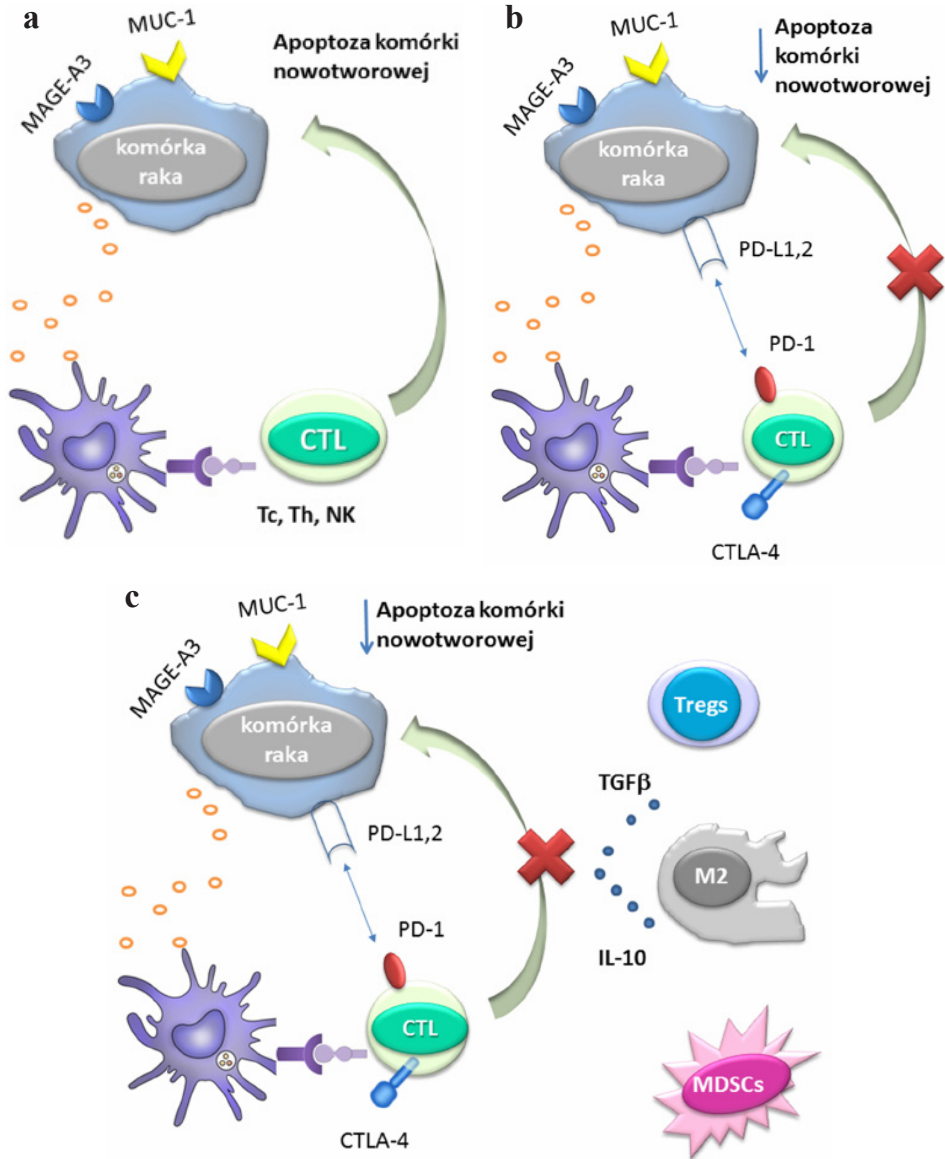
zależy od zmian w immunogennych własnościach komórek nowotworowych [92]. Przeżywanie komórek transformowanych jest związane z ich odpowiedzią adaptacyjną na warunki otoczenia [107].

Większość nowotworów zawiera różny procent komórek o cechach komórek macierzystych [114], ostatnio coraz częściej nazywanych komórkami propagującymi nowotwór. Komórki te cechują się niestabilnością genomową. Wysoki poziom reaktywnych form tlenu w tych komórkach jest przyczyną uszkodzeń DNA skutkujących kumulacją kolejnych aberracji chromosomowych [100]. Pochodzenie tych komórek nie jest jasne, a identyfikowane są powierzchniowymi markerami między innymi: CD133, CD44, CD29. Wobec dużej zmienności komórek nowotworowych dyskutuje się, czy można wyróżniać takie komórki [137].

## **UNIKANIE ROZPOZNANIA NOWOTWORU PRZEZ KOMÓRKI UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO NA PRZYKŁADZIE RAKA PŁUCA**

Rak płuca stanowi typowy rodzaj guza litego, na którego przykładzie można scharakteryzować wyżej wymienione zaburzenia. Również dane epidemiologiczne uzasadniają szerszą prezentację tego nowotworu. Guz ten zajmuje pierwsze miejsce wśród przyczyn zgonów z powodu nowotworów złośliwych u obu płci [31]. Liczba nowych zachorowań wynosi ponad 1 600 000 rocznie w skali świata, a walkę z chorobą wygrywa jedynie około 15% chorych. Bardzo szybki i niezwykle podstępny przebieg raka płuca sprawia, że w chwili rozpoznania ponad 70% guzów jest w znacznym stanie zaawansowania, uniemożliwiającym skuteczne leczenie przyczynowe, w szczególności operacyjne [20, 31]. Leczenie operacyjne pozostaje jedyną skuteczną metodą terapii większości guzów litych, w tym niedrobnokomórkowego raka płuca, poza nielicznymi przypadkami typów histologicznych wrażliwych na chemioterapię, jak na przykład rak drobnokomórkowy płuca [52, 57]. Brak możliwości oraz brak skuteczności klasycznych sposobów leczenia uzasadnia szerokie poszukiwanie innych metod, w tym terapii celowanej i immunomodulującej.

Podobnie, jak w innych guzach, w raku płuca pierwotna odpowiedź przeciwnowotworowa jest skuteczna w fazie bardzo wczesnej onkogenezy [1, 9]. Hipoteza nadzoru immunologicznego Burneta i Thomasa (1957) zakłada niszczenie komórek zmienionych, patologicznych i stałą obronę organizmu przed nowotworzeniem. Uważa się obecnie, że rozwój nowotworu jest istotnie modyfikowany przez układ odpornościowy. Ważną rolę w tym procesie przypisuje się komórkom zapalnym naciekającym guz [30]. Jednakże pierwotnie skuteczny nadzór immunologiczny zostaje przestrojony w bardzo wyrafinowany sposób przez osłabienie rozpoznawania komórek raka, osłabienie funkcji prezentacji antygeny oraz przewagę odpowiedzi immunologicznej hamującej nad aktywującą [1, 26]. Na schemacie (ryc. 1) przedstawiono główne mechanizmy wymykania się guza spod nadzoru immunologicznego.



**RYCINA 1.** Schemat mechanizmu cytotoksycznej reakcji przeciwnowotworowej i jej hamowania  
 a/ komórki cytotoksyczne (CTLs) po stymulacji indukują apoptozę komórki nowotworowej  
 b/ hamowanie limfocytów przez cząsteczki PD-1 i CTLA-4 zapobiega reakcji cytotoksycznej  
 c/ Dodatkowo następuje regulacja odpowiedzi cytotoksycznej i rozwija się tolerancja immunologiczna przy udziale komórek o funkcjach regulatorowych: Treg, M2 i MDSCs oraz cytokin TGFβ, IL-10

**FIGURE 1.** Mechanism of anticancer cytotoxic reaction and its suppression  
 a/ cytotoxic cells (CTLs) after stimulation induce cancer cell apoptosis  
 b/ the inhibition of lymphocytes by PD-1 and CTLA-4 molecules suppress cytotoxic reaction  
 c/ in addition the regulation of cytotoxic reaction and immunotolerance develops with participation of regulatory cells: Treg, M2 i MDSCs and TGFβ, IL-10 cytokines

Większość nowotworów litych, w tym w szczególności rak płuca, dotyczy chorych w wieku podeszłym, u których dochodzi również do kumulacji szkodliwego działania czynników zewnętrznych w tym dymu papierosowego, głównego czynnika ryzyka rozwoju raka płuca [22, 49]. Przedmiotem badań są również zjawiska związane z wpływem stresu oksydacyjnego, który przyspiesza fizjologiczne procesy starzenia wraz ze starzeniem się komórek układu odpornościowego, zwanym „inflamm-aging” [33]. Według sugestii Franceschi, w toku starzenia się obumierające komórki uwalniają czynniki stresu, które dodatkowo stymulują układ odpornościowy. Dochodzi do pewnego rodzaju wyczerpania funkcji obronnych. W toku starzenia układu odpornościowego zwiększa się stężenie IL-8, IL-6, TNF $\alpha$ , i jednocześnie obserwowany jest spadek stężenia IL-2 [33]. Zmienia się również polaryzacja limfocytów T w kierunku odpowiedzi typu Th2. Fenotyp komórek NK ulega zmianie, czemu towarzyszy zmniejszenie ich zdolności cytotoksycznych. Wyrazem starzenia układu odpornościowego jest utrata umiejętności rozpoznawania obcych i własnych antygenów. Krąg tych zaburzeń jest zbliżony do zmian obserwowanych w przebiegu chorób nowotworowych [33, 36].

## MARKERY KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA PRZYKŁADZIE RAKA PŁUCA

Komórki raka płuca charakteryzują się bardzo słabo zdefiniowaną i zmienną antygenowością, która jest przyczyną dużej heterogenności histopatologicznej. Najbardziej znane antygeny, których obecność jest powtarzalna, to MAGE-A3 (ang. *Melanoma Associated Antygen*) i MUC1. MAGE-A3 wykrywany jest u 35-50% chorych na raka niedrobnokomórkowego płuca, głównie o typie płaskonabłonkowym. Ekspresja tego antygeny wiąże się ze złym rokowaniem. MAGE-A3 rozpoznawany przez komórki cytotoksyczne jest podstawą produkcji licznych szczepionek [88]. W próbach klinicznych podkreśla się konieczność potwierdzenia ekspresji tego antygeny na komórkach guza przed leczeniem. Glikoproteina MUC1 obecna powszechnie na komórkach nowotworowych guzów o typie gruczołowym, też wiąże się ze złym rokowaniem. Domena zewnątrzkomórkowa MUC1 jest silnie immunogenna, proangiogenna, nasila migrację komórek guza i oporność na apoptozę [155]. Kolejnym celem terapeutycznym jest receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) powszechnie obecny na komórkach raka płuca [77]. Jego aktywność można hamować dzięki opracowaniu szczepionki CIMAvax, w której wykorzystano receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu EGFR [90]. Dotąd opisano nieliczne rozpoznawane epitopy komórek nowotworowych [122] jak np. peptydy u chorych z melanoma [21, 46] oraz w raku jajnika [115]. W wyniku zachodzących mutacji w komórkach nowotworowych, w toku rozwoju guza litego powstają dość dynamicznie nowe antygeny, dochodzi do zmiany markerów powierzchniowych lub ich ukrywania. Komórki raka

stają się „nierozpoznawalne” dla układu odpornościowego, nie ma warunków dla rozwoju mechanizmów odporności nabytej. Jednakże, jak ostatnio stwierdzono, stosowane w raku płuca terapie – chemioterapia, radioterapia a nawet terapia celowana – sprzyjają pobudzeniu odpowiedzi poprzez „odkrywanie” antygenów, oraz tworzenie neo-antygenów w wyniku pewnego stresu komórkowego [146]. Zjawisko to ma istotne implikacje terapeutyczne w obecnie prowadzonych próbach klinicznych, gdy immunoterapia łączona jest z chemioterapią [139].

## ROZWÓJ NOWOTWORÓW UKŁADOWYCH NA PRZYKŁADZIE BIAŁACZKI B-LIMFOCYTOWEJ

Również wymykają się spod kontroli immunologicznej nowotwory układowe typu białaczek/chłoniaków. Nie jest znany bardzo wczesny okres tych zmian, ale rozważając zachowania komórek jednej z białaczek (przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej) [91, 147], możemy stawiać pewne hipotezy. Prawidłowe limfocyty B subpopulacji CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> (B1b) stale produkują przeciwciała i nie wymagają aktywacji przez limfocyty T do tej funkcji. Komórki tej subpopulacji dają początek tej białaczce. Większość krążących limfocytów białaczkowych jest zatrzymana w cyklu komórkowym w fazie G0/G1, stąd uważa się, że gromadzenie się coraz większej liczby komórek białaczkowych jest spowodowane w większym stopniu ich opornością na indukowaną w nich apoptozę podczas prawidłowego starzenia się, niż częstymi podziałami [17, 19]. Wydłużanie się cyklu komórkowego prowadzi do kumulacji w tych komórkach mutacji i zyskiwania cech [69], charakteryzujących potem komórki białaczkowe. Zmutowane limfocyty B CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> konkurują między sobą i zwykle pozostają pojedyncze klony tych komórek stanowiących już rozrost białaczkowy.

Podczas prawidłowego rozwoju w mikrośrodowisku szpiku kostnego zachodzą oddziaływania limfocytów B z produkowanymi tam przez komórki podłoża ligandami utrzymującymi w niszy szpikowej komórki progenitorowe o ekspresji receptora CXCR4 oraz c-kit [32, 96]. Komórki białaczkowe, podobnie jak komórki progenitorowe, mają ekspresję receptora CXCR4 (CD184) [10, 86]. Komórki podłoża szpiku kostnego oraz komórki „pielęgnujące” szpiku kostnego (ang. *nurselike cells*) stale wydzielają ligand CXCL12 (SDF-1) [141] i tym sposobem przyciągają i zatrzymują w niszy szpiku kostnego limfocyty B białaczkowe oraz hamują ich apoptozę. Stałe zatrzymanie limfocytów CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> w szpiku kostnym powoduje, że po pewnym czasie komórki białaczkowe tracą zdolność do produkcji przeciwciał, ale w dalszym ciągu przeżywają w tym środowisku. Ponadto komórki podłoża chronią limfocyty białaczkowe przed apoptozą indukowaną np. chemioterapią. Podobne środowisko w węzłach chłonnych zapewniają limfocytom B-CLL receptory CRAM obecne na ich powierzchni [14, 75].

## ZMIANY ZACHODZĄCE W MIKROŚRODOWISKU GUZA

Zgromadzone w określonym miejscu komórki o zmienionym fenotypie zaczynają produkować proteazy hydrolizujące otaczającą macierz pozakomórkową (ang. *Matrix Metalloproteinases*, MMP) oraz inhibitory proteaz (ang. *Tissue Inhibitors of Metalloproteinase 1*, TIMP-1) [48, 80, 128], co prowadzi do progresji zmian w raku przedinwazyjnym (*carcinoma in situ*). Proteazy degradują składniki substancji międzykomórkowej i błon podstawnych nabłonka, co sprzyja inwazji komórek nowotworowych i ich pojawieniu się w krążeniu [39, 124]. MMP są endoproteazami syntetyzowanymi w formie prekursorowej i aktywowanymi proteazami takimi jak plazmina. Są wśród nich m.in. kolagenazy (MMP1), żelatynazy (MMP2, MMP9) oraz błonowe metaloproteazy MMP14. Nadekspresja tych proteaz często wiąże się ze złą prognozą dla chorego [68, 128].

Komórki guza indukują również wrastanie w tę okolicę naczyń krwionośnych. Unaczynienie guza nowotworowego warunkuje dopływ glukozy do komórek raka zwykle mających metabolizm glikolityczny [41], co jest ważnym etapem dalszego rozwoju tej zmiany. Wtedy obserwuje się szybszy wzrost guza oraz towarzyszące mu komórki przewlekłego procesu zapalnego: makrofagi i limfocyty. Można sądzić, że naciekające guz limfocyty T (ang. *Tumor Infiltrating Lymphocytes*, TILs) rozpoznają nowotworowe antygeny, ponieważ na ich powierzchni pojawiają się markery aktywacji – np. cytotoksyczne limfocyty T CD8<sup>+</sup> mają powierzchniową ekspresję HLA-DR oraz CD38 [71]. Jednak nie funkcjonują one efektywnie jako komórki zwalczające komórki nowotworowe.

Obserwuje się także obumieranie komórek nowotworowych. Obumierające komórki są wcześniej rozpoznawane i fagocytowane, w tym również przez komórki dendrytyczne mieloidalne (ang. *myeloid Dendritic Cells*, mDC). Komórki dendrytyczne mają zdolność do krzyżowej prezentacji antygenów [64, 93, 102, 109, 136], czyli prezentacji wraz z MHC klasy I epitopów komórek zfagocytowanych, w tym przypadku epitopów komórek nowotworowych [55, 103]. Inne komórki niż mDC nie mają takich właściwości. Jest to o tyle ważne, że często komórki nowotworowe mają zmieniony mechanizm prezentacji własnych antygenów i wtedy nie są rozpoznawane. Krzyżowa prezentacja jest więc sposobem omińnięcia tych zachowań komórek nowotworowych przez układ immunologiczny, a epitopy komórek nowotworowych mogą być prezentowane dziewiczym limfocytom T. Komórki dendrytyczne po zfagocytowaniu obumierających komórek nowotworowych przenoszą się do węzłów chłonnych [105] i tam wraz z MHC kl. I prezentują epitopy nowotworowe dziewiczym limfocytom T przepływającym przez węzeł [54]. Jednak okazuje się, że taka prezentacja antygenów przez mDC obecne w obrębie guza nowotworowego może być zablokowana [87, 143]. Na podstawie wyników własnych badań stwierdziliśmy, że zmiany w krążeniu systemowym różnią się istotnie od tych w otoczeniu guza [25]. Tak więc antygeny



komórek nowotworowych są dobrze rozpoznawane przez mechanizmy odporności wrodzonej jak i nabytej (swoistej) poza miejscem samego guza nowotworowego. Komórki nowotworowe istotnie zmieniają natomiast regulację przebiegu procesów immunologicznych w swoim otoczeniu [74] i tym sposobem chronią się przed atakiem komórek układu odpornościowego.

## PROCES APOPTOZY

Komórki nowotworowe są stosunkowo odporne na zewnątrzkomórkowe sygnały apoptozy. [40, 86, 120]. Apoptoza zachodzi dwiema głównymi drogami [35]: (a) drogą wewnątrzpochodną przy udziale rozpoznania zagrożenia z udziałem białka p53 i prowadzi do aktywacji procesu apoptozy z udziałem mitochondriów, hamowania ekspresji genów, których produkty mają działanie antyapoptotyczne np. Bcl2, surwiwiny [99] oraz (b) drogą zewnątrzpochodną z udziałem aktywacji proapoptotycznych powierzchniowych receptorów śmierci komórki (ang. *Death Receptors*, DR) [2, 65, 152]. Ta druga droga może być aktywowana z zewnątrz komórki przez proapoptotyczne ligandy nadrodziny białek TNF jak np. ligand Fas (FasL) i TRAIL [2, 94]. Ligandy te wiążą się z receptorami proapoptotycznymi na powierzchni komórek docelowych (nowotworowych) i przekazują sygnał do aktywacji prokaspazy-8, a ta aktywuje dalsze kaspazy odpowiadające za przebieg procesu apoptozy. Czasami ta zewnątrzpochodna sygnalizacja apoptozy, w komórce dołącza się do drogi wewnętrznej sygnalizacji apoptozy przez białka Bid rodziny Bcl2. Aktywowana na drodze zewnątrzpochodnej kaspaza 8 rozszczepia białko Bid, które w tej formie przemieszcza się do mitochondriów i inicjuje drogę wewnątrzpochodną apoptozy [156]. Obie te drogi zbiegają się na etapie kaspaz efektorowych, które proteolitycznie hydrolizują i/lub aktywują ważne białka komórkowe (np. DNazę powodującą fragmentację DNA).

## TRADYCYJNE SPOSOBY LECZENIA NOWOTWORÓW: CHEMIOTERAPIA, RADIOTERAPIA I ICH ROLA W IMMUNOTERAPII

Rutynowo guzy nowotworowe leczy się usunięciem chirurgicznym, stosowaniem chemioterapii i radioterapii. Dodatkowo u niektórych chorych stosowana jest immunoterapia, w której podawane są chorym przeciwciała monoklonalne skierowane na antygeny komórek nowotworowych. W obecności dopełniacza oraz komórek z receptorami dla fragmentu Fc immunoglobulin mogą one bezpośrednio aktywować śmierć tych komórek. Jest to ważny etap leczenia powodujący zmniejszenie liczby komórek

nowotworowych i u wielu pacjentów po tych zabiegach zachodzi chwilowa poprawa. Trzeba liczyć się jednak z dalszym namnażaniem się pozostawionych w organizmie komórek nowotworowych propagujących nowotwór, bądź rozwojem nowego nowotworu aktywowanego przez chemioterapeutyki czy radioterapię. Chemioterapeutyki, oraz radioterapia są przyczyną uszkodzeń DNA, jednak komórki nowotworowe mają sprawniejsze od „zdrowych” komórek mechanizmy naprawy DNA, co w konsekwencji może prowadzić do dalszych mutacji i rozwoju nowotworu [83], a także do oporności wielolekowej [50, 82, 126]. W trakcie rozwoju nowotworu ponad 50% komórek guza traci na drodze mutacji punktowych funkcję białka p53 [150, 151], bądź białka MDM2. Białko MDM2 (ang. *Murine Double Minute 2*) – represor p53, ulega deregulacji [145, 148] i z tego powodu pojawiają się różne typy nowotworów. Nie odpowiadają one na terapie indukujące wewnątrzpochodną drogę apoptozy wywołaną chemioterapeutykami bądź radioterapią. Natomiast zewnątrzpochodna droga apoptozy funkcjonuje niezależnie od aktywności białka p53. Stąd, można ją wykorzystać do indukcji programowanej śmierci w komórkach nowotworowych przez limfocyty T.

Chirurgiczne usunięcie guza często jest wspomagane chemioterapią i radioterapią. Radioterapię kieruje się w miejsce guza lub na węzły chłonne, które mogą być zajęte przez komórki nowotworowe. Zabiegi te mogą być precyzyjnie kierowane w ogniska nowotworowe i nie uszkadzają w sposób istotny układu odpornościowego chorego. Po lokalnym napromienianiu pojawiają się dodatkowe oddziaływania systemowe polegające na uwalnianiu antygenów nowotworowych oraz tzw. zespołów cząsteczek związanych z uszkodzeniami (ang. *Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMPs). Cząsteczki uwalniane z uszkodzonych komórek to między innymi DNA, ATP, białka szoku cieplnego (ang. *Heat-Shock Proteins*, HSP), grupa ruchliwych białek (ang. *high-mobility group box 1*, HMGB1), składniki mitochondriów i pozakomórkowe siarczany heparyny [73]. Radioterapia może też zwiększać pobieranie i prezentację krzyżową antygenów nowotworowych [37].

Innym sposobem terapii przeciwnowotworowej jest chemioterapia stosowana w guzach litych przed lub po zabiegu chirurgicznym (zwana neoadjuwantową i adjuwantową) oraz z wyboru – w chłoniakach i białaczkach. Opracowano wiele skutecznych zestawów chemioterapeutyków [11, 61] czasem prowadzących do całkowitego wyleczenia.

Zwykle chemioterapia jest powtarzana wielokrotnie. Głównym problemem jest mała swoistość najczęściej stosowanych chemioterapeutyków. Jednak w niektórych przypadkach chemioterapeutyki zwiększają odporność przeciwnowotworową [62, 125, 110]. Wiele energii poświęca się na poszukiwanie bardziej swoistych leków na podstawie znajomości zmian genetycznych, najczęściej zachodzących w określonych rodzajach nowotworów [106, 123, 153]. Na przykład w CML, gdzie w komórkach nowotworowych pojawia się translokacja prowadząca do powstania fuzyjnego genu BCR-ABL stosuje się specyficzny inhibitor kinazy tyrozynowej imatinib (nazwa firmowa Gleevec) dający dobre kliniczne efekty w fazie przewlekłej tej choroby. [7, 98,

157]. Ten kierunek terapii ma jednak ograniczenia wynikające z dużej zmienności genomu komórek nowotworowych [69] i u chorego mogą pojawić się komórki nowotworowe odporne na specyficzny lek [157]. Stosuje się wtedy nowe generacje leków oraz nowe sekwencje ich podawania, co czasem daje wyniki pozytywne. Jest to więc układ stałego poszukiwania nowych leków działających na stale modyfikujące się u chorego komórki nowotworowe.

W poszukiwaniu swoistości stosowanych leków wykorzystuje się przeciwciała monoklonalne zmniejszające masę nowotworu. Są one czasem chimeryczne (ludzko-mysie), bądź humanizowane (ludzkie z fragmentami mysimi w regionach hiperzmiennych wiążących się z antygenem), skierowane przeciw powierzchniowym antygenom (markerom) na komórkach nowotworowych. Cel jest podobny – zmniejszenie liczby komórek nowotworowych, przez swoiście kierowane przeciwciała i przy możliwie małym uszkodzeniu układu immunologicznego. Klasycznym przeciwciałem stosowanym w immunoterapii nowotworowej są immunoglobuliny skierowane przeciw białku CD20 obecnemu specyficznie na powierzchni limfocytów B nie zmienionych nowotworowo oraz nowotworowych (białaczki i chłoniaki B-komórkowe). Stosowane klinicznie monoklonalne przeciwciała anty CD20 to: rytuxymab ludzko-mysie chimeryczne przeciwciało (RTX) [111, 142], ofatumumab – ludzkie monoklonalne przeciwciało skierowane przeciw zarówno małej jak i dużej pętli zewnątrzkomórkowej antygeny CD20 [5], glikozylowane przeciwciała anty-CD20 [65, 101, 129].

Związanie przeciwciała z komórką nowotworową (czy prawidłową) w obecności białek dopełniacza w osoczu krwi i płynach międzykomórkowych indukuje w takiej komórce apoptozę drogą zewnątrzpochodną. Proces ten jest precyzyjnie kontrolowany. Również komórki układu odpornościowego rozpoznają komórki, które związały przeciwciała po obecności łańcuchów ciężkich immunoglobulin na ich powierzchni. Komórki „obronne” takie jak limfocyty NK, neutrofile, monocyty mają powierzchniowe receptory dla części Fc łańcuchów immunoglobulinowych, wiążą się z komórkami „oznakowanymi” przeciwciałami i je zabijają, co określamy zależną od przeciwciał cytotoksycznością komórkową (ang. *Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity*, ADCC). Przykładowe przeciwciała wykorzystywane w immunoterapii nowotworów przedstawiono w tabeli 1.

Jak można się zorientować, aktualnie lekarz w klinice dysponuje wieloma przeciwciałami przeciw różnym komórkom nowotworowym np. anty-CD52 (Alemtuzumab, białaczki, chłoniaki) [113], anty-HER2 (Herceptin, rak piersi, anty-receptorowi z rodziny ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) typu 2 (ErbB2) lub anty-receptorowi naskórkowego czynnika wzrostu EGFR1 (Cetuximab, Panitumumab, rak jelita grubego, rak płuca) [56]. Od dawna również stosuje się terapie, w których podawane chorym przeciwciała związane są z izotopami (Ibritumomab). Są również prowadzone próby wykorzystania toksyn bakteryjnych bądź wzmocnienia nimi działania przeciwciał [42, 134].

**TABELA 1.** Przykłady przeciwciał wykorzystywanych klinicznie do niszczenia komórek nowotworowych**TABLE 1.** Examples of antibodies used in the clinical practice for elimination of tumor cells

PRZECIWCIAŁO	ANTYGEN	NOWOTWÓR DOCELOWY	OPIS P-CIAŁA
Rutyksymab	CD20	B-CLL*, NHL	chimeryczne
Alemtuzumab	CD52	B-CLL	humanizowane
Ibritumomab tiuxetan	CD20	NHL	mysie z <sup>90</sup> Y albo <sup>111</sup> In
Tositumomab	CD20	NHL	humanizowane
Cetuksymab	EGFR	rak jelita grubego, rak głowy/szyji	chimeryczne
Panitumumab	EGFR	rak jelita grubego	humanizowane
Katumaksomab	CD3, EpCAM	wysięki EpCAM do otrzewnej z komórkami nowotworowymi	hybryda mysz/szczur
Ofatumumab	CD20	B-CLL	humanizowane
Pertuzumab	HER2	rak piersi	humanizowane
Obinutuzumab	CD20	B-CLL, chłoniaki B-komórkowe**	humanizowane, glikolizowane Fc

\* – działa cytotoksycznie głównie aktywując dopełniacz, \*\* – głównie działa cytotoksycznie w reakcji ADCC

Jak wspomniano, wstępne etapy leczenia mają na celu zmniejszenie masy nowotworu, co dodatkowo częściowo odblokowuje systemowe hamowanie obrony immunologicznej np. hamowanie dojrzewania limfocytów T w grasicy [63, 66, 67]. Jest to prawdopodobnie powodowane konkurencją limfocytów białaczkowych z prawidłowymi limfocytami o miejsce w grasicy [12, 85]. Grasicą jest miejscem dojrzewania limfocytów T w tym Treg, również w organizmie dorosłym [12, 97].

## **ZABURZENIA UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO W NOWOTWORACH LITYCH ORAZ BIAŁACZKACH I CHŁONIAKACH**

Po rutynowym leczeniu przeciwnowotworowym w organizmie często pozostają „resztkowe” komórki nowotworowe, które powinny być usunięte przez układ odpornościowy chorego, głównie przez limfocyty T. Jednak pozostające komórki nowotworowe blokują miejscowe skierowane przeciw nim działanie cytotoksycznych limfocytów.

Limfocyty T stale sprawdzają „poprawność” budowy białek komórkowych, co służy usuwaniu patogenów oraz utrzymaniu homeostazy organizmu. Aby limfocyty T były zdolne do rozpoznania prezentowanego epitopu (determinanty antygenowej), którą jest fragment 8-12 aminokwasowy białka wraz z MHC klasy I, muszą być aktywowane do efektorowej odpowiedzi. Potrzebują do tego dwu sygnałów. Jednym jest rozpoznanie epitopu i związanie przez receptor limfocyty T (TCR) prezentowanej przez komórki prezentujące antygen (ang. *Antibody Presenting Cells*, APC) determinanty antygenowej wraz z antygenami zgodności tkankowej. Drugim sygnałem jest równoczesne oddziaływanie między białkiem CD28 na limfocycie T z ligandami B7 (B7.1, CD80 i B7.2, CD860 na komórce APC [127]. Proces ten nazywamy kostymulacją [15]. Wynikiem tych oddziaływań jest aktywacja rozpoznających epitop limfocytów T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>, na którą składa się ich proliferacja oraz zdolność do indukcji apoptozy w komórkach docelowych, bądź aktywacja cytokinami komórek dendrytycznych (DC).

Przeciwnym do kostymulacji procesem jest hamowanie kostymulacji czyli koinhibicja zachodząca z udziałem co najmniej dwu grup cząsteczek: (a) nadrodziny receptorów immunoglobulin (ang. *Immunoglobulin Super Family*, IgSF) oraz (b) nadrodziny receptorów TNF (ang. *TNFR super family*) [15]. Pierwsza grupa cząsteczek (IgSF) ma budowę podobną do łańcuchów przeciwciał, w których można wyróżnić domeny IgV i IgFc [154]. Należą do niej koreceptory stymulujące CD28, ICOS, oraz koinhibitorowe: CTLA4, PD-1, LAG3, TIM3, BTLA, VISTA, CD160. Koreceptory drugiej grupy (TNFR SF) mają własności stymulujące i zaliczamy do nich cząsteczki GITR, OX-40, CD30, CD40 i 4-1BB [117]. Wspomniane koreceptory pełnią ważne funkcje również w zakażeniach wirusowych (CD40) np. podczas zakażenia grypą [158]. Obecnie są produkowane przeciwciała skierowane przeciw cząsteczkom kostymulującym (dacetuzumab, anty-CD40) i koinhibitorowym, celem ustalenia możliwości wpływania na regulowanie przez nie odpowiedzi immunologicznej [45]. Przeciwciała są testowane w modelach *in vitro* i zwierzęcych. Rozpoczęto również badania kliniczne u osób chorych. Takie miejscowe wpływanie na działanie układu immunologicznego nazywane jest w literaturze anglojęzycznej „checkpoint” co można tłumaczyć jako punkty kontrolne aktywacji limfocytów T.

Jak wspomniano, kostymulacja limfocyty T zachodzi z rozpoznaniem epitopu i jest konieczna do wywołania serii podziałów komórkowych rozpoznającego limfocyty, jego zdolności do indukcji apoptozy w komórce docelowej oraz ekspresji cytokin. Gdy sygnał rozpoznania przedłuża się w czasie np.: wskutek obecności komórek nowotworowych w pobliżu limfocytów T, to na powierzchni aktywowanych limfocytów T pojawia się białko CTLA-4 (ang. *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*, CD152). CTLA4 oddziałuje z cząsteczkami B7 na komórkach dendrytycznych i pozostałych APC i ma większe powinowactwo do nich niż białko CD28. Wiąże się więc preferencyjnie z tymi cząsteczkami blokując wiązanie CD28. Spoczynkowe limfocyty T mają niską ekspresję białka CTLA-4 albo jej nie mają, natomiast

większa ekspresja tych białek na limfocytach T pojawia się po ich aktywacji [38]. Oddziaływanie CTLA-4 jednak nie przekazuje sygnału kostymulacji, jak czynią to oddziaływania z CD28 i w tej sytuacji limfocyt T nie ma właściwości cytotoksycznych nakierowanych na komórki docelowe, nowotworowe [72, 120]. Pojawienie się CTLA-4 na limfocytach T aktywowanych jest procesem regulującym, hamującym przedłużającą się aktywację limfocytów T i zależy od wielu czynników [119]. W prawidłowych warunkach zapobiega procesom alergii, nadwrażliwości skutkiem przedłużonego w czasie procesu „obrony” immunologicznej. Jest to jednak również proces hamujący obronę przeciw nowotworowi przez liczne, podobne do CTLA-4 cząsteczki koinhibitorowe, pojawiające się na limfocytach T CD4<sup>+</sup>, na około połowy limfocytów T CD8<sup>+</sup>, na limfocytach Treg, ale również na limfocytach B oraz limfocytach NK [4, 15, 120, 135]. Cząsteczki CTLA4 są głównie gromadzone w cytoplazmie aktywowanych komórek. Pojawienie się tych cząsteczek na powierzchni limfocytów jest regulowane oddziaływaniami z mikrośrodowiskiem wokół komórki [149]. Opisano także inny układ hamujący aktywność limfocytów, układ PD-1/PD-L1. Limfocyty T aktywowane w procesie nowotworowym bądź nie nowotworowym uwalniają INF $\gamma$  co indukuje produkcję ligandów: PD-L1 (CD274) oraz PD-L2 (CD273) przez komórki nowotworowe, jeżeli są one w pobliżu [130]. Przyłączenie liganda PD-L1 albo PD-L2 do limfocytów T z ekspresją receptorów koinhibitorowych określanych jako PD-1 (ang. *Programmed cell Death protein 1*) [13], powoduje hamowanie stymulacji, prowadzi do zahamowania produkcji cytokin, mniejszej proliferacji limfocytów i osłabionej lizy komórek docelowych. Ten mechanizm powoduje miejscową anergię limfocytów T w guzach.

Do komórek cytotoksycznych tworzących pułę CTLs (ang. *Cytotoxic T Lymphocytes*) należą limfocyty Tc (CD8<sup>+</sup>), komórki NK, NKT a także niektóre limfocyty Th (CD4<sup>+</sup>). W badaniach własnych potwierdzono zmiany liczby limfocytów cytotoksycznych w obrębie płuc u chorych na raka płuca w odniesieniu do osób zdrowych. Dokonano analizy profilu komórek w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL), a subpopulacje limfocytów badano metodą cytometrii przepływowej. Istotnie większy był odsetek limfocytów T, limfocytów CD8<sup>+</sup>, a zmniejszony odsetek limfocytów CD4<sup>+</sup> i stosunek odsetka limfocytów T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> [25, 47]. U tych samych osób chorych badano populacje limfocytów we krwi obwodowej i obserwowano zmiany o odwrotnym charakterze: odsetek limfocytów CD8<sup>+</sup> we krwi był mniejszy u chorych na raka płuca niż u zdrowych, a stosunek Th/Tc większy [25, 47]. Podobne wyniki uzyskano na podstawie badania dużej grupy 140 chorych, w której typowanie limfocytów przeprowadzono techniką immunocytochemii [23]. Wydaje się, że można założyć, iż limfocyty określane w BAL odzwierciedlają obraz nacieku limfocytów TIL w guzie. Ważne jest też, że nasze obserwacje prowadzone były przed podjęciem leczenia i ilustrują stan, który prawdopodobnie zmienia się w toku rozwoju raka, a tym bardziej terapii. Wiele prac prowadzonych w przypadkach guzów litych, także w raku płuca, potwierdza pozytywne znacze-

nie prognostyczne obecności nacieków limfocytarnych CD8<sup>+</sup> w miejscu rozwoju nowotworu [28]. Wykazano również, że odpowiedź przeciwnowotworowa jest modyfikowana przez wpływ na możliwość wędrówki limfocytów w macierzy pozakomórkowej guza. W pracy H. Salmon i wsp. zilustrowano obecność niejako mechanicznej bariery wokół ogniska z komórek raka ograniczającej dostęp komórek zapalnych i funkcjonalną rolę macierzy pozakomórkowej w tym procesie [116].

Podobnie, jak w innych rozrostach nowotworowych, w raku płuca kluczowe jest prezentowanie antygenów przez komórki APC. Mechanizm aktywacji limfocytów jest podobny i podobna rola supresyjnej cząsteczki CTLA-4. CTLA-4 pojawia się na limfocytach T efektorowych w środowisku raka i blokuje przekazanie sygnału z komórki APC, przez co tłumi efekt cytotoksyczny. Natomiast inna jest funkcja CTLA-4 na komórkach T regulatorowych (Treg) w środowisku guza [8, 29, 76, 118]. CTLA-4 jest stale obecna na Treg i potęguje supresyjne funkcje tych komórek. Rola komórek regulatorowych została dobrze opisana i w wielu pracach dowiedziono, że komórki te występują bardzo licznie w naciekach nowotworowych i pełnią istotną funkcję hamującą odpowiedź przeciwnowotworową [27]. Z supresorową funkcją Treg w środowisku guza wiąże się aktywność czynnika transkrypcyjnego Foxp3, wykorzystywanego także do identyfikacji Treg. W licznych badaniach w raku płuca potwierdzono negatywne znaczenie rokownicze obecności komórek Treg z ekspresją Foxp3 [60, 104, 138]. Potwierdzenie ekspresji Foxp3 w okolicznych, nawet klinicznie wolnych od przerzutów, węzłach chłonnych jest negatywnym czynnikiem prognostycznym [43].

## **ROLA KOMÓREK NOWOTWOROWYCH W HAMOWANIU AKTYWNOŚCI UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO**

Odpowiedź przeciwnowotworowa jest aktywnie zmieniona przez komórki raka [34, 70, 71]. Zmiana odpowiedzi odbywa się przez mechanizm modyfikacji mikrośrodowiska, w którym rak się rozwija, poprzez wydzielanie cytokin supresyjnych, pobudzających komórki hamujące odpowiedź zapalną oraz poprzez zwiększenie ekspresji ligandów dla receptorów supresji lub apoptozy (PD-L1, PD-L2, Fas-L) komórek cytotoksycznych [53, 58, 140]. W hamowaniu odpowiedzi układu odpornościowego w przebiegu nowotworu istotny jest ubytek limfocytów cytotoksycznych i hamowanie ich funkcji. Dochodzi między innymi do nasilenia apoptozy komórek obronnych. Jednym z mechanizmów jest szlak receptorowy Fas/FasL. Krążące limfocyty CD4<sup>+</sup> oraz CD8<sup>+</sup> u chorych na raka wykazują znacznie zwiększoną ekspresję receptora Fas, co wskazuje na ich podatność na apoptozę, która następuje po połączeniu z ligandem Fas na komórkach raka [24, 51]. W badaniach wykazaliśmy zwiększoną liczbę limfocytów z ekspresją Fas u palaczy papierosów i chorych na POChP, co może wskazywać na supresję ukła-

du odpornościowego i nasilenie ryzyka rozwoju raka płuca [24]. Dotychczas jednak receptorowy szlak apoptozy limfocytów nie znajduje odbicia w próbach terapii.

W obronie przeciwnowotworowej, uczestniczą również komórki linii mieloidalnej, ale wykazują głównie funkcję supresorową. W ostatnich latach wyróżniono dwie populacje makrofagów: M1 i M2. Makrofagi M1 pełnią głównie funkcje immunostymulujące, jako komórki efektorowe, produkujące znaczne ilości cytokin prozapalnych (wytwarzają m.in. IL-12) i biorące udział w fagocytozie. Makrofagi określane jako M2, wykazują funkcje immunosupresyjne, promują angiogenezę i modelowanie otoczenia [84]. W środowisku guza litego makrofagi M1 stymulowane przez LPS i IFN- $\gamma$  aktywują odpowiedź przeciwnowotworową, ale niestety zdominowane są przez komórki M2 tworzące główną populację wśród makrofagów towarzyszących guzowi (ang. *Tumor Associated Macrophages*, TAM) i współgrają z cytokinami IL-4, IL-10, IL-13 i TGF $\beta$  [9, 81, 94]. Ponadto znany jest związek populacji M2 z komórkami regulatorowymi oraz interleukiną IL-17 o właściwościach regulujących odpowiedź immunologiczną [79]. Badanie populacji TAM jest możliwe w resekowanych guzach raka płuca, a w guzach zaawansowanych makrofagi mogą być pozyskiwane metodą BAL. Stosując tę metodę wykazano istotne „upośledzenie funkcji makrofagów w raku płuca w odpowiedzi na interferon” [18].

Silną funkcję supresorową w mikrośrodowisku guza wykazują komórki pochodzenia szpikowego MDSCs (ang. *Myeloid Derived Suppressor Cells*), aktywowane przez liczne miejscowo wydzielane cytokiny. Komórki MDSCs są zdolne do regulacji odpowiedzi immunologicznej, modulują funkcję limfocytów T poprzez wytwarzanie tlenku azotu (NO), wolnych rodników tlenowych (ROS), TGF $\beta$  i PGE2 oraz obniżają dostępność aminokwasów dla komórek efektorowych przez konkurencyjne zużywanie substratów [132, 133]. Funkcja MDSCs wiąże się również z przemianą nabłonkowo-mezenchymalną komórek nowotworowych (EMT) ułatwiającą penetrację komórek raka i anogenezę [131]. Jakkolwiek określono znaczenie makrofagów i komórek MDSCs w odpowiedzi immunologicznej, to nie ma specyficznego leczenia ograniczającego ich funkcje, a próby ich hamowania na drodze enzymatycznej są na etapie badań.

Komórki nowotworowe i komórki zapalne w środowisku guza zdolne są do wydzielania substancji o działaniu immunosupresyjnym. Jedną z najlepiej poznanych cytokin o takim działaniu jest transformujący czynnik wzrostu TGF $\beta$ , identyfikowany w zwiększonych stężeniach w guzach, w hodowlach komórek nowotworowych i w płynie z BAL od chorych na raka płuca [9]. Główne działanie supresyjne [44] polega na hamowaniu czynności komórek NK i limfocytów T cytotoksycznych, różnicowaniu polaryzacji limfocytów pomocniczych w kierunku Th2 oraz utrzymaniu różnicowania Treg [144]. Dodatkowo komórki nowotworowe ze względu na utratę receptorów dla tego czynnika, stają się niewrażliwe na jego hamujące działanie. Funkcja TGF $\beta$  jest labilna, zależna od miejscowych



warunków i w pierwszych stadiach rozwoju raka jest korzystna dla gospodarza [108]. Obecnie trwają próby wykorzystania nowych form modyfikacji immunologicznej w terapii bliżej opisane w części drugiej tego opracowania.

## PODZIĘKOWANIA

Artykuł jest finansowany z projektu „Innowacyjne metody wykorzystania komórek macierzystych w medycynie” 01.01.02-00-109/09-00 współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, POIG 2007-2013

## LITERATURA

- [1] AERTS JG, HEGMANS JP. Tumor-specific cytotoxic T cells are crucial for efficacy of immunomodulatory antibodies in patients with lung cancer. *Cancer Res* 2013; **73**(8): 2381-2388.
- [2] AMARANTE-MENDES GP, GRIFFITH TS. Therapeutic applications of TRAIL receptor agonists in cancer and beyond. *Pharmacol Ther* 2015; **155**: 117-31.
- [3] ARVELO F, SOJO F, COTTE C. Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalsecience* 2015; **9**: 520.
- [4] BERMAN D, KORMAN A, PECK R, FELTQUATE D, LONBERG N, CANETTA R. The development of immunomodulatory monoclonal antibodies as a new therapeutic modality for cancer: the Bristol-Myers Squibb experience. *Pharmacol Ther* 2015; **148**: 132-153.
- [5] BOLOGNA L, GOTTI E, DA RF, INTERMESOLI T, RAMBALDI A, INTRONA M ET AL. Ofatumumab is more efficient than rituximab in lysing B chronic lymphocytic leukemia cells in whole blood and in combination with chemotherapy. *J Immunol* 2013; **190**(1): 231-239.
- [6] BOLOGNA L, GOTTI E, MANGANINI M, RAMBALDI A, INTERMESOLI T, INTRONA M ET AL. Mechanism of action of type II, glycoengineered, anti-CD20 monoclonal antibody GA101 in B-chronic lymphocytic leukemia whole blood assays in comparison with rituximab and alemtuzumab. *J Immunol* 2011; **186**(6): 3762-3769.
- [7] BOLTON-GILLESPIE E, SCHEMIONEK M, KLEIN HU, FLIS S, HOSER G, LANGE T ET AL. Genomic instability may originate from imatinib-refractory chronic myeloid leukemia stem cells. *Blood* 2013; **121**(20): 4175-4183.
- [8] BRANDHORST G, PETROVA DT, WEIGAND S, EBERLE C, VON AN, SCHMITZ J ET AL. Lack of correlation between Treg quantification assays in inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol* 2015; **21**(11): 3325-3329.
- [9] BURKHOLDER B, HUANG RY, BURGESS R, LUO S, JONES VS, ZHANG W ET AL. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1845**(2): 182-201.
- [10] CALPE E, PURROY N, CARPIO C, ABRISQUETA P, CARABIA J, PALACIO C ET AL. ZAP-70 promotes the infiltration of malignant B-lymphocytes into the bone marrow by enhancing signaling and migration after CXCR4 stimulation. *PLoS One* 2013; **8**(12): e81221.
- [11] CAPELLETTI E, NOVELLO S, SCAGLIOTTI GV. First-line therapeutic options for advanced non-small-cell lung cancer in the molecular medicine era. *Future Oncol* 2014; **10**(6): 1081-1093.
- [12] CARAMALHO I, NUNES-CABACO H, FOXALL RB, SOUSA AE. Regulatory T-Cell Development in the Human Thymus. *Front Immunol* 2015; **6**: 395.
- [13] CARBOGNIN L, PILOTTO S, MILELLA M, VACCARO V, BRUNELLI M, CALIO A ET AL. Differential Activity of Nivolumab, Pembrolizumab and MPDL3280A according to the Tumor Expression of Programmed

- Death-Ligand-1 (PD-L1): Sensitivity Analysis of Trials in Melanoma, Lung and Genitourinary Cancers. *PLoS One* 2015; **10**(6): e0130142.
- [14] CATUSSE J, LEICK M, GROCH M, CLARK DJ, BUCHNER MV, ZIRLIK K ET AL. Role of the atypical chemoattractant receptor CRAM in regulating CCL19 induced CCR7 responses in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer* 2010; **9**: 297.
- [15] CHEN L, FLIES DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 2013; **13**(4): 227-242.
- [16] COLUSSI D, BRANDI G, BAZZOLI F, RICCIARDELLO L. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *Int J Mol Sci* 2013; **14**(8): 16365-16385.
- [17] CRASSINI K, MULLIGAN SP, BEST OG. Targeting chronic lymphocytic leukemia cells in the tumor micro-environment: A review of the in vitro and clinical trials to date. *World J Clin Cases* 2015; **3**(8): 694-704.
- [18] DABROWSKA M, GRUBEK-JAWORSKA H, HOSER G, DOMAGALA-KULAWIK J, KRENKE R, CHAZAN R. Effect of IFN-gamma stimulation on expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on alveolar macrophages in patients with non-small cell lung cancer. *J Interferon Cytokine Res* 2006; **26**(3): 190-195.
- [19] DANILOV AV, SODERQUIST RS, BATES DJ, EASTMAN A. Toward a cure for chronic lymphocytic leukemia: an attack on multiple fronts. *Expert Rev Anticancer Ther* 2013; **13**(9): 1009-1012.
- [20] DIDKOWSKA J, MANCZUK M, MCNEILL A, POWLES J, ZATONSKI W. Lung cancer mortality at ages 35-54 in the European Union: ecological study of evolving tobacco epidemics. *BMJ* 2005; **331**(7510): 189-191.
- [21] DILLON PM, OLSON WC, CZARKOWSKI A, PETRONI GR, SMOLKIN M, GROSH WW ET AL. A melanoma helper peptide vaccine increases Th1 cytokine production by leukocytes in peripheral blood and immunized lymph nodes. *J Immunother Cancer* 2014; **2**: 23.
- [22] DOMAGALA-KULAWIK J. Effects of cigarette smoke on the lung and systemic immunity. *J Physiol Pharmacol* 2008; **59** Suppl 6: 19-34.
- [23] DOMAGALA-KULAWIK J, GUZMAN J, COSTABEL U. Immune cells in bronchoalveolar lavage in peripheral lung cancer--analysis of 140 cases. *Respiration* 2003; **70**(1): 43-48.
- [24] DOMAGALA-KULAWIK J, HOSER G, DABROWSKA M, CHAZAN R. Increased proportion of Fas positive CD8+ cells in peripheral blood of patients with COPD. *Respir Med* 2007; **101**(6): 1338-1343.
- [25] DOMAGALA-KULAWIK J, HOSER G, DROSZCZ P, KAWIAK J, DROSZCZ W, CHAZAN R. T-cell subtypes in bronchoalveolar lavage fluid and in peripheral blood from patients with primary lung cancer. *Diagn Cytopathol* 2001; **25**(4): 208-213.
- [26] DOMAGALA-KULAWIK J, OSINSKA I. (Immune alterations in lung cancer – the new therapeutic approach). *Pneumonol Alergol Pol* 2014; **82**(3): 286-299.
- [27] DOMAGALA-KULAWIK J, OSINSKA I, HOSER G. Mechanisms of immune response regulation in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2014; **3**(1): 15-22.
- [28] DONNEM T, HALD SM, PAULSEN EE, RICHARDSSEN E, AL-SAAD S, KILVAER TK ET AL. Stromal CD8+ T-cell Density-A Promising Supplement to TNM Staging in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2015; **21**(11): 2635-2643.
- [29] DUMMER CD, CARPIO VN, GONCALVES LF, MANFRO RC, VERONESE FV. FOXP3+ regulatory T cells: from suppression of rejection to induction of renal allograft tolerance. *Transpl Immunol* 2012; **26**(1): 1-10.
- [30] DUNN GP, BRUCE AT, IKEDA H, OLD LJ, SCHREIBER RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; **3**(11): 991-998.
- [31] ERS. *European Lung White Book*. ERS ed. 2014.
- [32] FOSSATI V, KUMAR R, SNOECK HW. Progenitor cell origin plays a role in fate choices of mature B cells. *J Immunol* 2010; **184**(3): 1251-1260.
- [33] FRANCESCHI C, BONAFE M, VALENSIN S, OLIVIERI F, DE LM, OTTAVIANI E ET AL. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000; **908**: 244-254.

- [34] FRYDECKA I, KOSMACZEWSKA A, BOCKO D, CISZAK L, WOŁOWIEC D, KULICZKOWSKI K ET AL. Alterations of the expression of T-cell-related costimulatory CD28 and downregulatory CD152 (CTLA-4) molecules in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer* 2004; **90**(10): 2042-2048.
- [35] FULDA S, DEBATIN KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006; **25**(34): 4798-4811.
- [36] FULOP T, LARBI A, WITKOWSKI JM, McELHANEY J, LOEB M, MITNITSKI A ET AL. Aging, frailty and age-related diseases. *Biogerontology* 2010; **11**(5): 547-563.
- [37] GAMEIRO SR, JAMMEH ML, WATTENBERG MM, TSANG KY, FERRONE S, HODGE JW. Radiat ion-induced immunogenic modulation of tumor enhances antigen processing and calreticulin exposure, resulting in enhanced T-cell killing. *Oncotarget* 2014; **5**(2): 403-416.
- [38] GARDNER D, JEFFERY LE, SANSOM DM. Understanding the CD28/CTLA-4 (CD152) pathway and its implications for costimulatory blockade. *Am J Transplant* 2014; **14**(9): 1985-1991.
- [39] GIALELI C, THEOCHARIS AD, KARAMANOS NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* 2011; **278**(1): 16-27.
- [40] GOUNARI M, NTOUFA S, APOLLONIO B, PAPAKONSTANTINO N, PONZONI M, CHU CC ET AL. Excessive antigen reactivity may underlie the clinical aggressiveness of chronic lymphocytic leukemia stereotyped subset #8. *Blood* 2015; **125**(23): 3580-3587.
- [41] GRABINSKA K, PELAK M, WYDMANSKI J, TUKIENDORF A, D'AMICO A. Prognostic value and clinical correlations of 18-fluorodeoxyglucose metabolism quantifiers in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2015; **21**(19): 5901-5909.
- [42] GRYZIK M, GRZYWOCZ Z, WASILEWSKA D, KAWIAK J, STACHOWIAK R, BIELECKI J ET AL. Human lymphocytic B-leukemia cell line treatment with the bacterial toxin listeriolysin O and rituximab (anti-CD20 antibody): Effects of similar localization of their receptors. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2015; **28**(3): 329-340.
- [43] HANAGIRI T, SHIGEMATSU Y, SHINOHARA S, TAKENAKA M, OKA S, CHIKAIISHI Y ET AL. Clinical significance of the frequency of regulatory T cells in regional lymph node lymphocytes as a prognostic factor for non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2013; **81**(3): 475-479.
- [44] HARDER T, GUTTEK K, PHILIPSEN L, SIMEONI L, SCHRAVEN B, REINHOLD D. Selective targeting of transforming growth factor-beta1 into TCR/CD28 signalling plasma membrane domains silences T cell activation. *Cell Commun Signal* 2014; **12**: 74.
- [45] HASSAN SB, SORENSEN JF, OLSEN BN, PEDERSEN AE. Anti-CD40-mediated cancer immunotherapy: an update of recent and ongoing clinical trials. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2014; **36**(2): 96-104.
- [46] HODI FS, O'DAY SJ, McDERMOTT DF, WEBER RW, SOSMAN JA, HAANEN JB ET AL. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; **363**(8): 711-723.
- [47] HOSER G, DOMAGALA-KULAWIK J, DROSZCZ P, DROSZCZ W, KAWIAK J. Lymphocyte subsets differences in smokers and nonsmokers with primary lung cancer: a flow cytometry analysis of bronchoalveolar lavage fluid cells. *Med Sci Monit* 2003; **9**(8): BR310-BR315.
- [48] HOSER G, KAWIAK J. A trypsin inhibitor isolated from lymphatic leukemia cells. *Biomed Biochim Acta* 1986; **45**(9): 1127-1133.
- [49] HOSER G, KAWIAK J, DOMAGALA-KULAWIK J, KOPINSKI P, DROSZCZ W. Flow cytometric evaluation of lymphocyte subpopulations in BALF of healthy smokers and nonsmokers. *Folia Histochem Cytobiol* 1999; **37**(1): 25-30.
- [50] HOSER G, MAJSTEREK I, ROMANA DL, SŁUPIANEK A, BŁASIAK J, SKORSKI T. Fusion oncogenic tyrosine kinases alter DNA damage and repair after genotoxic treatment: role in drug resistance? *Leuk Res* 2003; **27**(3): 267-273.
- [51] HOSER G, WASILEWSKA D, DOMAGALA-KULAWIK J. Expression of Fas receptor on peripheral blood lymphocytes from patients with non-small cell lung cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2004; **42**(4): 249-252.

- [52] HOWINGTON JA, BLUM MG, CHANG AC, BALEKIAN AA, MURTHY SC. Treatment of stage I and II non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013; **143**(5 Suppl): e278S-e313S.
- [53] HUANG G, NISHIMOTO K, YANG Y, KLEINERMAN ES. Participation of the Fas/FasL signaling pathway and the lung microenvironment in the development of osteosarcoma lung metastases. *Adv Exp Med Biol* 2014; **804**: 203-217.
- [54] HUS I, KAWIAK J, HOSER G, TABARKIEWICZ J, RADEJ S, DMOZYNSKA A ET AL. SCID mice model in vivo evaluation of autologous and allogeneic dendritic cells activity on B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Folia Histochem Cytobiol* 2009; **47**(4): 563-570.
- [55] HUS I, SCHMITT M, TABARKIEWICZ J, RADEJ S, WOJAS K, BOJARSKA-JUNAK A ET AL. Vaccination of B-CLL patients with autologous dendritic cells can change the frequency of leukemia antigen-specific CD8+ T cells as well as CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells toward an antileukemia response. *Leukemia* 2008; **22**(5): 1007-1017.
- [56] HUTCHINSON RA, ADAMS RA, MCART DG, SALTO-TELLEZ M, JASANI B, HAMILTON PW. Epidermal growth factor receptor immunohistochemistry: new opportunities in metastatic colorectal cancer. *J Transl Med* 2015; **13**: 217.
- [57] JETT JR, SCHILD SE, KESLER KA, KALEMKERIAN GP. Treatment of small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013; **143**(5 Suppl): e400S-e419S.
- [58] JEWETT A, TSENG HC. Tumor induced inactivation of natural killer cell cytotoxic function; implication in growth, expansion and differentiation of cancer stem cells. *J Cancer* 2011; **2**: 443-457.
- [59] KALIA M. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism* 2015; **64**(3 Suppl 1): S16-S21.
- [60] KARANIKAS V, SPELETAS M, ZAMANAKOU M, KALALA F, LOULES G, KERENIDI T ET AL. Foxp3 expression in human cancer cells. *J Transl Med* 2008; **6**: 19.
- [61] KASPRZYK M, SLAWINSKI G, MUSIK M, MARCINIAK L, DYSZKIEWICZ W, PIWKOWSKI C ET AL. Completion pneumonectomy and chemoradiotherapy as treatment options in local recurrence of non-small-cell lung cancer. *Kardiocir Torakochirurgia Pol* 2015; **12**(1): 18-25.
- [62] KAWALEC M, SKORSKI T, HOSER G. Immunogenicity of cyclophosphamide-treated tumor cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1988; **36**(3): 345-350.
- [63] KAWIAK J, HOSER G, MALENDOWICZ LK, MIKS B, SKURZAK H. Thymocyte and splenocyte subpopulations in normal and leukemia-bearing mice after adrenalectomy. *Folia Histochem Cytobiol* 1996; **34**(2): 75-78.
- [64] KAWIAK J, HOSER G, MIKS B, POJDA Z, SOBICZEWSKA A, MACHAJ E ET AL. Populations of thymocytes and peripheral blood leucocytes in leukaemia-bearing mice treated with G-CSF. *Immunol Cell Biol* 1996; **74**(2): 163-166.
- [65] KAWIAK J, HOSER G, SKORSKI T. Apoptosis and some of its medical implications. *Folia Histochem Cytobiol* 1998; **36**(3): 99-110.
- [66] KAWIAK J, KAWALEC M. Leukemia L 1210 cells induce depletion of Lyt 2+ thymocytes. *Folia Histochem Cytobiol* 1990; **28**(1-2): 15-17.
- [67] KAWIAK J, KAWALEC M, HOSER G, MIKS B, SKORSKI T, POJDA Z ET AL. Changes of thymocyte subpopulations induced by activities diffusing from leukemia L1210 cells. *Thymus* 1991; **18**(3): 185-192.
- [68] KESSENBROCK K, PLAKS V, WERB Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; **141**(1): 52-67.
- [69] KIM TH, LESLIE P, ZHANG Y. Ribosomal proteins as unrevealed caretakers for cellular stress and genomic instability. *Oncotarget* 2014; **5**(4): 860-871.
- [70] KOSMACZEWSKA A, BOCKO D, CISZAK L, WŁODARSKA-POLINSKA I, KORNAFEL J, SZTEBLICH A ET AL. Dysregulated expression of both the costimulatory CD28 and inhibitory CTLA-4 molecules in PB T cells of advanced cervical cancer patients suggests systemic immunosuppression related to disease progression. *Pathol Oncol Res* 2012; **18**(2): 479-489.

- [71] KOVACSOVICS-BANKOWSKI M, CHISHOLM L, VERCELLINI J, TUCKER CG, MONTLER R, HALEY D ET AL. Detailed characterization of tumor infiltrating lymphocytes in two distinct human solid malignancies show phenotypic similarities. *J Immunother Cancer* 2014; **2**(1): 38.
- [72] KRUMMEL MF, ALLISON JP. Pillars article: CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *The journal of experimental medicine*. 1995. 182: 459-465. *J Immunol* 2011; **187**(7): 3459-3465.
- [73] KRYSKO DV, AGOSTINIS P, KRYSKO O, GARG AD, BACHERT C, LAMBRECHT BN ET AL. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol* 2011; **32**(4): 157-164.
- [74] KYI C, POSTOW MA. Checkpoint blocking antibodies in cancer immunotherapy. *FEBS Lett* 2014; **588**(2): 368-376.
- [75] LEICK M, CATUSSE J, FOLLO M, NIBBS RJ, HARTMANN TN, VEELKEN H ET AL. CCL19 is a specific ligand of the constitutively recycling atypical human chemokine receptor CCR4. *Immunology* 2010; **129**(4): 536-546.
- [76] LIN X, CHEN M, LIU Y, GUO Z, HE X, BRAND D ET AL. Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; **6**(2): 116-123.
- [77] LINDEMAN NI, CAGLE PT, BEASLEY MB, CHITALE DA, DACIC S, GIACCONE G ET AL. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol* 2013; **8**(7): 823-859.
- [78] LIU J, FUKUNAGA-KALABIS M, LI L, HERLYN M. Developmental pathways activated in melanocytes and melanoma. *Arch Biochem Biophys* 2014; **563**:13-21.
- [79] LIU L, GE D, MA L, MEI J, LIU S, ZHANG Q ET AL. Interleukin-17 and prostaglandin E2 are involved in formation of an M2 macrophage-dominant microenvironment in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012; **7**(7): 1091-1100.
- [80] LUGOWSKA I, KOWALSKA M, FUKSIEWICZ M, KOTOWICZ B, MIERZEJEWSKA E, KOSELA-PATERCZYK H ET AL. Serum markers in early-stage and locally advanced melanoma. *Tumour Biol* 2015; **36**(11): 8277-85.
- [81] MA J, LIU L, CHE G, YU N, DAI F, YOU Z. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer* 2010; **10**: 112.
- [82] MAJSTEREK I, BLASIAK J, MLYNARSKI W, HOSER G, SKORSKI T. Does the bcr/abl-mediated increase in the efficacy of DNA repair play a role in the drug resistance of cancer cells? *Cell Biol Int* 2002; **26**(4): 363-370.
- [83] MAJSTEREK I, SŁUPIANEK A, HOSER G, SKORSKI T, BLASIAK J. ABL-fusion oncoproteins activate multi-pathway of DNA repair: role in drug resistance? *Biochimie* 2004; **86**(1): 53-65.
- [84] MANTOVANI A, SOZZANI S, LOCATI M, ALLAVENA P, SICA A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002; **23**(11): 549-555.
- [85] MARTINS VC, BUSCH K, JURAEVA D, BLUM C, LUDWIG C, RASCHE V, LASITSCHKA F, MASTITSKY SE, BRORS B, HIELSCHER T, FEHLING HJ, RODEWALD HR. Cell competition is a tumour suppressor mechanism in the thymus. *Nature*. 2014 May22; **509**(7501): 465-70.
- [86] McCaig AM, Cosimo E, Leach MT, Michie AM. Dasatinib inhibits CXCR4 signaling in chronic lymphocytic leukaemia cells and impairs migration towards CXCL12. *PLoS One* 2012; **7**(11): e48929.
- [87] McCarthy BA, Boyle E, Wang XP, Guzowski D, Paul S, CATERA R ET AL. Surface expression of Bcl-2 in chronic lymphocytic leukemia and other B-cell leukemias and lymphomas without a breakpoint t(14;18). *Mol Med* 2008; **14**(9-10): 618-627.
- [88] McDonnell AM, Lesterhuis WJ, Khong A, Nowak AK, Lake RA, Currie AJ ET AL. Tumor-infiltrating dendritic cells exhibit defective cross-presentation of tumor antigens, but is reversed by chemotherapy. *Eur J Immunol* 2015; **45**(1): 49-59.
- [89] Mellstedt H, Vansteenkiste J, Thatcher N. Vaccines for the treatment of non-small cell lung cancer: investigational approaches and clinical experience. *Lung Cancer* 2011; **73**(1): 11-17.

- [90] MELLSTEDT H, VANSTEENKISTE J, THATCHER N. Vaccines for the treatment of non-small cell lung cancer: investigational approaches and clinical experience. *Lung Cancer* 2011; **73**(1): 11-17.
- [91] MILPIED P, NADEL B, ROULLAND S. Premalignant cell dynamics in indolent B-cell malignancies. *Curr Opin Hematol* 2015; **22**(4): 388-396.
- [92] MIMURA K, SHIRAIISHI K, MUELLER A, IZAWA S, KUA LF, SO J ET AL. The MAPK pathway is a predominant regulator of HLA-A expression in esophageal and gastric cancer. *J Immunol* 2013; **191**(12): 6261-6272.
- [93] MINTERN JD, MACRI C, CHIN WJ, PANOZZA SE, SEGURA E, PATTERSON NL ET AL. Differential use of autophagy by primary dendritic cells specialized in cross-presentation. *Autophagy* 2015; **11**(6): 906-917.
- [94] MLYNARCZUK I, MROZ P, HOSER G, NOWIS D, BIALY LP, ZIEMBA H ET AL. AAF-cmk sensitizes tumor cells to trail-mediated apoptosis. *Leuk Res* 2004; **28**(1): 53-61.
- [95] MURDOCH C, GIANNOUNDIS A, LEWIS CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 2004; **104**(8): 2224-2234.
- [96] NAGASAWA T. CXCL12/SDF-1 and CXCR4. *Front Immunol* 2015; **6**: 301.
- [97] NAZZAL D, GRADOLATTO A, TRUFFAULT F, BISMUTH J, BERRIH-AKNIN S. Human thymus medullary epithelial cells promote regulatory T-cell generation by stimulating interleukin-2 production via ICOS ligand. *Cell Death Dis* 2014; **5**: e1420.
- [98] NIEBOROWSKA-SKORSKA M, BIALEK AP, NICOLAIDES NC, IOZZO RV, KAWALEC M, CALABRETTA B ET AL. The influence of phosphorothioate oligodeoxynucleotides on various organs in vivo. *Folia Histochem Cytobiol* 1996; **34**(2): 69-73.
- [99] NIEBOROWSKA-SKORSKA M, HOSER G, KOSSEV P, WASIK MA, SKORSKI T. Complementary functions of the antiapoptotic protein A1 and serine/threonine kinase pim-1 in the BCR/ABL-mediated leukemogenesis. *Blood* 2002; **99**(12): 4531-4539.
- [100] NIEBOROWSKA-SKORSKA M, KOPINSKI PK, RAY R, HOSER G, NGABA D, FLIS S ET AL. Rac2-MRC-cIII-generated ROS cause genomic instability in chronic myeloid leukemia stem cells and primitive progenitors. *Blood* 2012; **119**(18): 4253-4263.
- [101] OWEN CJ, STEWART DA. Obinutuzumab for the treatment of patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: overview and perspective. *Ther Adv Hematol* 2015; **6**(4): 161-170.
- [102] PALUCKA K, BANCHEREAU J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**(4): 265-277.
- [103] PALUCKA K, BANCHEREAU J. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity* 2013; **39**(1): 38-48.
- [104] PETERSEN RP, CAMPA MJ, SPERLAZZA J, CONLON D, JOSHI MB, HARPOLE DH, JR. ET AL. Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer* 2006; **107**(12): 2866-2872.
- [105] PIZZURRO GA, TAPIA IJ, SGANGA L, PODHAJEC OL, MORDOH J, BARRIO MM. Cytokine-enhanced maturation and migration to the lymph nodes of a human dying melanoma cell-loaded dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 2015; **64**(11): 1393-1406.
- [106] POPOVIC R, SHAH MY, LICHT JD. Epigenetic therapy of hematological malignancies: where are we now? *Ther Adv Hematol* 2013; **4**(2): 81-91.
- [107] QUANTE M, TU SP, TOMITA H, GONDA T, WANG SS, TAKASHI S ET AL. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell* 2011; **19**(2): 257-272.
- [108] QUATROMONI JG, SUZUKI E, OKUSANYA O, JUDY BF, BHOJNAGARWALA P, VENEGAS O ET AL. The timing of TGF-beta inhibition affects the generation of antigen-specific CD8+ T cells. *BMC Immunol* 2013; **14**: 30.
- [109] RADEJ S, ROLINSKI J, RAWICZ-PRUSZYNSKI K, BURY P, BOROWSKI G, FURMAGA J ET AL. Immunomodelling Characteristics of Mature Dendritic Cells Stimulated by Colon Cancer Cells Lysates. *Pol Przegl Chir* 2015; **87**(2): 71-82.
- [110] RADOJCIC V, BEZAK KB, SKARICA M, PLETNEVA MA, YOSHIMURA K, SCHULICK RD ET AL. Cyclophosphamide resets dendritic cell homeostasis and enhances antitumor immunity through effects that extend beyond regulatory T cell elimination. *Cancer Immunol Immunother* 2010; **59**(1): 137-148.

- [111] REN YR, JIN YD, ZHANG ZH, LI L, WU P. Rituximab treatment strategy for patients with diffuse large B-cell lymphoma after first-line therapy: a systematic review and meta-analysis. *Chin Med J (Engl)* 2015; **128**(3): 378-383.
- [112] RIVENBARK AG, STOLZENBURG S, BELTRAN AS, YUAN X, ROTS MG, STRAHL BD ET AL. Epigenetic reprogramming of cancer cells via targeted DNA methylation. *Epigenetics* 2012; **7**(4): 350-360.
- [113] ROBAK P, SMOLEWSKI P, ROBAK T. Emerging immunological drugs for chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Emerg Drugs* 2015; **20**(3): 423-447.
- [114] RYCAJ K, TANG DG. Cell-of-Origin of Cancer versus Cancer Stem Cells: Assays and Interpretations. *Cancer Res* 2015; **75**(19): 4003-4011.
- [115] SABBATINI P, TSUJI T, FERRAN L, RITTER E, SEDRAK C, TUBALLES K ET AL. Phase I trial of overlapping long peptides from a tumor self-antigen and poly-ICLC shows rapid induction of integrated immune response in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2012; **18**(23): 6497-6508.
- [116] SALMON H, FRANCISZKIEWICZ K, DAMOTTE D, DIEU-NOSJEAN MC, VALIDIRE P, TRAUTMANN A ET AL. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest* 2012; **122**(3): 899-910.
- [117] SANMAMED MF, PASTOR F, RODRIGUEZ A, PEREZ-GRACIA JL, RODRIGUEZ-RUIZ ME, JURE-KUNKEL M ET AL. Agonists of Co-stimulation in Cancer Immunotherapy Directed Against CD137, OX40, GITR, CD27, CD28, and ICOS. *Semin Oncol* 2015; **42**(4): 640-655.
- [118] SCHMITT EG, WILLIAMS CB. Generation and function of induced regulatory T cells. *Front Immunol* 2013; **4**: 152.
- [119] SCHNEIDER H, RUDD CE. Diverse mechanisms regulate the surface expression of immunotherapeutic target ctla-4. *Front Immunol* 2014; **5**: 619.
- [120] SHEKARIAN T, VALSESIA-WITTMANN S, CAUX C, MARABELLE A. Paradigm shift in oncology: targeting the immune system rather than cancer cells. *Mutagenesis* 2015; **30**(2): 205-211.
- [121] SHEN X, ZHENG JY, SHI H, ZHANG Z, WANG WZ. Survivin knockdown enhances gastric cancer cell sensitivity to radiation and chemotherapy in vitro and in nude mice. *Am J Med Sci* 2012; **344**(1): 52-58.
- [122] SHIBATA T. Current and future molecular profiling of cancer by next-generation sequencing. *Jpn J Clin Oncol* 2015; **45**(10): 895-899.
- [123] SKIRECKI T, HOSER G, KAWIAK J, DZIEDZIC D, DOMAGALA-KULAWIK J. Flow cytometric analysis of CD133- and EpCAM-positive cells in the peripheral blood of patients with lung cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2014; **62**(1): 67-75.
- [124] SKORSKI T, NIEBOROWSKA-SKORSKA M, WŁODARSKI P, PERROTTI D, HOSER G, KAWIAK J ET AL. Treatment of Philadelphia leukemia in severe combined immunodeficient mice by combination of cyclophosphamide and bcr/abl antisense oligodeoxynucleotides. *J Natl Cancer Inst* 1997; **89**(2): 124-133.
- [125] SŁUPIANEK A, HOSER G, MAJSTEREK I, BRONISZ A, MAŁECKI M, BŁASIAK J ET AL. Fusion tyrosine kinases induce drug resistance by stimulation of homology-dependent recombination repair, prolongation of G(2)/M phase, and protection from apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002; **22**(12): 4189-4201.
- [126] SMEETS RL, FLEUREN WW, HE X, VINK PM, WIJNANDS F, GORECKA M ET AL. Molecular pathway profiling of T lymphocyte signal transduction pathways; Th1 and Th2 genomic fingerprints are defined by TCR and CD28-mediated signaling. *BMC Immunol* 2012; **13**: 12.
- [127] ŚMIGIELSKI J, PIŚKORZ L, TALAR-WOJNAROWSKA R, MAŁECKA-PANAS E, JABLONSKI S, BROCKI M. The estimation of metalloproteinases and their inhibitors blood levels in patients with pancreatic tumors. *World J Surg Oncol* 2013; **11**: 137.
- [128] SMOLEJ L. Targeted treatment for chronic lymphocytic leukemia: clinical potential of obinutuzumab. *Pharmgenomics Pers Med* 2015; **8**: 1-7.
- [129] SPRANGER S, SPAAPEN RM, ZHA Y, WILLIAMS J, MENG Y, HA TT ET AL. Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Sci Transl Med* 2013; **5**(200): 200ra116.
- [130] SRIVASTAVA MK, ANDERSSON A, ZHU L, HARRIS-WHITE M, LEE JM, DUBINETT S ET AL. Myeloid suppressor cells and immune modulation in lung cancer. *Immunotherapy* 2012; **4**(3): 291-304.
- [131] SRIVASTAVA MK, DUBINETT S, SHARMA S. Targeting MDSCs enhance therapeutic vaccination responses against lung cancer. *Oncoimmunology* 2012; **1**(9): 1650-1651.

- [132] SRIVASTAVA MK, ZHU L, HARRIS-WHITE M, KAR UK, HUANG M, JOHNSON MF ET AL. Myeloid suppressor cell depletion augments antitumor activity in lung cancer. *PLoS One* 2012; **7**(7): e40677.
- [133] STACHOWIAK R, LYZNAK M, GRABOWSKA M, ROESKE K, JAGIELSKI T, BIELECKI J ET AL. Cytotoxicity of purified listeriolysin O on mouse and human leukocytes and leukaemia cells. *BMC Biotechnol* 2014; **14**: 77.
- [134] SUNDAR R, SOONG R, CHO BC, BRAHMER JR, SOO RA. Immunotherapy in the treatment of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2014; **85**(2): 101-109.
- [135] TANAKA T, OKUYA K, KUTOMI G, TAKAYA A, KAJIWARA T, KANASEKI T ET AL. Heat shock protein 90 targets a chaperoned peptide to the static early endosome for efficient cross-presentation by human dendritic cells. *Cancer Sci* 2015; **106**(1): 18-24.
- [136] TANG DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res* 2012; **22**(3): 457-472.
- [137] TAO H, MIMURA Y, AOE K, KOBAYASHI S, YAMAMOTO H, MATSUDA E ET AL. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer* 2012; **75**(1): 95-101.
- [138] TARTOUR E, ZITVOGEL L. Lung cancer: potential targets for immunotherapy. *Lancet Respir Med* 2013; **1**(7): 551-563.
- [139] TAUBE JM, ANDERS RA, YOUNG GD, XU H, SHARMA R, McMILLER TL ET AL. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* 2012; **4**(127): 127ra37.
- [140] TEN HACKEN E, BURGER JA. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta* 2016; **1863**(3): 401-13.
- [141] TEO EC, CHEW Y, PHIPPS C. A review of monoclonal antibody therapies in lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; **97**: 72-84.
- [142] TRAN JANCO JM, LAMICHHANE P, KARYAMPUDI L, KNUTSON KL. Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis. *J Immunol* 2015; **194**(7): 2985-2991.
- [143] TRAVES PG, LUQUE A, HORTELANO S. Macrophages, inflammation, and tumor suppressors: ARF, a new player in the game. *Mediators Inflamm* 2012; **2012**: 568783.
- [144] URSO L, CALABRESE F, FAVARETTO A, CONTE P, PASELLO G. Critical review about MDM2 in cancer: Possible role in malignant mesothelioma and implications for treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; **97**: 220-30.
- [145] VACCHELLI E, ARANDA F, EGGERMONT A, GALON J, SAUTES-FRIDMAN C, CREMER I ET AL. Trial Watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers. *Oncoimmunology* 2014; **3**(1): e27878.
- [146] VARDI A, AGATHANGELIDIS A, STALIKA E, KARYPIDOU M, STORENTA A, ANAGNOSTOPOULOS A ET AL. Antigen Selection Shapes the T-cell Repertoire in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res* 2016; **22**(1): 167-74.
- [147] WADE M, LI YC, WAHL GM. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2013; **13**(2): 83-96.
- [148] WALKER LS, SANSOM DM. Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology. *Trends Immunol* 2015; **36**(2): 63-70.
- [149] WEI S, WANG H, LU C, MALMUT S, ZHANG J, REN S ET AL. The activating transcription factor 3 protein suppresses the oncogenic function of mutant p53 proteins. *J Biol Chem* 2014; **289**(13): 8947-8959.
- [150] WŁODARSKI P, WASIK M, RATAJCZAK MZ, SEVIGNANI C, HOSER G, KAWIAK J ET AL. Role of p53 in hematopoietic recovery after cytotoxic treatment. *Blood* 1998; **91**(8): 2998-3006.
- [151] WŁODKOWICZ D, SKOMMER J, DARZYŃKIEWICZ Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. *Exp Oncol* 2012; **34**(3): 255-262.
- [152] YAN W, HERMAN JG, GUO M. Epigenome-based personalized medicine in human cancer. *Epigenomics* 2016; **8**(1): 119-33.
- [153] YAO S, ZHU Y, CHEN L. Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. *Nat Rev Drug Discov* 2013; **12**(2): 130-146.



- [154] YONEZAWA S, HIGASHI M, YAMADA N, YOKOYAMA S, KITAMOTO S, KITAJIMA S ET AL. Mucins in human neoplasms: clinical pathology, gene expression and diagnostic application. *Pathol Int* 2011; **61**(12): 697-716.
- [155] ZANARDELLI M, MICHELI L, NICOLAI R, FAILLI P, GHELARDINI C, DI CESARE ML. Different apoptotic pathways activated by oxaliplatin in primary astrocytes vs. colo-rectal cancer cells. *Int J Mol Sci* 2015; **16**(3): 5386-5399.
- [156] ZOLNIEROWICZ J, AMBROZEK-LATECKA M, KAWIAK J, WASILEWSKA D, HOSER G. Monitoring cell proliferation in vitro with different cellular fluorescent dyes. *Folia Histochem Cytobiol* 2013; **51**(3): 193-200.
- [157] ZOU Q, WU B, XUE J, FAN X, FENG C, GENG S ET AL. CD8<sup>+</sup> Treg cells suppress CD8<sup>+</sup> T cell-responses by IL-10-dependent mechanism during H5N1 influenza virus infection. *Eur J Immunol* 2014; **44**(1): 103-114.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 20.04.2016*

*Przyjęto: 30.05.2016*

*Jerzy Kawiak*

*ul. S. Banacha 20 m18*

*email: jkawiak@ibib.waw.pl*

*tel.: 661850463*

