GRADA

PRINCIPY SYSTÉMOVÉ PROTINÁDOROVÉ LÉČBY

Pavel Klener jr.
Pavel Klener

PRINCIPY SYSTÉMOVÉ PROTINÁDOROVÉ LÉČBY

Pavel Klener jr.
Pavel Klener

GRADA Publishing

Upozornění pro čtenáře a uživatele této knihy
Všechna práva vyhrazena. Žádná část této tištěné či elektronické knihy nesmí být reprodukována ani šířena v papírové, elektronické či jiné podobě bez předchozího písemného souhlasu nakladatele. Neoprávněné užití této knihy bude ***trestně stíháno****.*

MUDr. Pavel Klener jr., Ph.D., prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc.

PRINCIPY SYSTÉMOVÉ PROTINÁDOROVÉ LÉČBY

TIRÁŽ TIŠTĚNÉ PUBLIKACE:

Recenzenti:
Prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D.
Prof. RNDr. Blanka Říhová, DrSc.

Vydání odborné knihy schválila Vědecká redakce nakladatelství Grada Publishing, a.s.

© Grada Publishing, a.s., 2013
Cover Design © Grada Publishing, a.s., 2013

Vydala Grada Publishing, a.s.
U Průhonu 22, Praha 7
jako svou 5345. publikaci
Odpovědná redaktorka Mgr. Jitka Straková
Sazba a zlom Antonín Plicka
Obrázky připravili MUDr. Pavel Klener jr., Ph.D. a Antonín Plicka.
Počet stran 200
1. vydání, Praha 2013

Vytiskly Tiskárny Havlíčkův Brod, a.s.

Autoři a nakladatelství děkují společnostem Roche s.r.o., Merck Sharp & Dohme s.r.o., Boehringer Ingelheim, spol. s r.o., Bristol-Myers Squibb spol. s r.o., Dialog Jessenius o.p.s., Bayer s.r.o., Egis Praha spol. s r.o., Novartis s.r.o., Česká asociace farmaceutických firem za podporu, která umožnila vydání publikace.

Publikace byla podpořena granty PRVOUK P24/LF1/3, PRVOUK P27/LF1/1, SVV-2013-266509, UNCE 204021, IGA MZ NT/13072-4.

Názvy produktů, firem apod. použité v této knize mohou být ochrannými známkami nebo registrovanými ochrannými známkami příslušných vlastníků, což není zvláštním způsobem vyznačeno.

Postupy a příklady v knize, rovněž tak informace o lécích, jejich formách, dávkování a aplikaci jsou sestaveny s nejlepším vědomím autorů. Z jejich praktického uplatnění ale nevyplývají pro autory ani pro nakladatelství žádné právní důsledky.

ISBN 978-80-247-4171-0

ELEKTRONICKÉ PUBLIKACE:

ISBN 978-80-247-8842-5 (pro formát PDF)
ISBN 978-80-247-8843-2 (pro formát EPUB)

Obsah

Předmluva 7

1 Úvod do problematiky nádorových onemocnění a protinádorové léčby 9
1.1 Nádorová tkáň a nádorové mikroprostředí 10
1.2 Nádorové kmenové buňky a jejich hnízdo (niche) 12
1.3 Nádor jako důsledek genetické a epigenetické deregulace 15
1.4 Nádor jako důsledek selhání imunologického dohledu 17
1.5 Nádor jako důsledek chronického zánětu či infekce 19
1.5.1 Fyziologické aspekty zánětlivé reakce ... 19
1.5.2 Zánět a nádorová onemocnění 19
1.6 Lymfoproliferativní choroby jako důsledek deregulace specifické imunity 20
1.7 Apoptóza a její regulace 23
1.7.1 Receptorová apoptóza 23
1.7.2 Mitochondriální apoptóza 24
1.7.3 Další buněčné apoptotické dráhy 25
1.7.4 Regulátory apoptózy 25
1.8 Autofagie 26
1.8.1 Regulátory autofagie 27
1.9 Dvojí role p53 v inhibici onkogeneze 27
1.10 Buněčný cyklus 31
1.11 Konvenční protinádorová léčba 32
1.12 Cílená protinádorová léčba 36
1.13 Biomarkery 40
1.14 Biologická protinádorová léčba 40
Literatura 41

2 Konvenční protinádorová léčba 43
2.1 Antimetabolity – inhibice klíčových enzymů metabolismu DNA 43
2.1.1 Antifoláty – analoga kyseliny listové 43
2.1.2 Antinukleotidy 46
2.2 Klasická genotoxická cytostatika – inhibice replikace a transkripce 51
2.2.1 Alkylační látky 51
2.2.2 Interkalační látky 52
2.2.3 Látky působící rozštěpení molekuly DNA 52
2.2.4 Inhibitory DNA-topoizomeráz 52
2.3 Zesílení účinku genotoxických cytostatik – inhibice opravy DNA 53
2.3.1 Inhibitory PARP 54
2.3.2 Inhibitory checkpoint kináz 56
2.4 Antimitotika – inhibice průchodu buněčným cyklem 56
2.4.1 Antimikrotubulární látky – poškození cytoskeletárních funkcí 57
2.4.2 Inhibitory aurora kináz 59
2.4.3 Inhibitory polo-like kináz 60
2.4.4 Inhibitory kinezinů – motorických proteinů mitotického vřeténka 60
2.4.5 Inhibitory cyklin-dependentních kináz ... 60
2.5 Inhibice proteosyntézy a degradace proteinů 61
2.5.1 Inhibice proteosyntézy 61
2.5.2 Inhibice degradace proteinů 61
2.6 Další možné mechanismy 63
2.6.1 Syntetické alkylfosfolipidy – modifikace buněčné membrány 63
2.6.2 Blokáda endotelinových receptorů 63
2.7 Nové formy konvenčních cytostatik – vazba na nosiče a vektory 63
2.7.1 Enkapsulovaná cytostatika – lipozomy/nanozomy 63
2.7.2 Konjugovaná cytostatika – vazba na makromolekuly, polymery, dendrimery či nanopartikule 65
2.8 Metronomická chemoterapie 66
2.9 Antidota a protektiva 66
Literatura 67

3 Epigenetická chemoterapeutika 69
3.1 Inhibitory DNA-metyltransferáz 70
3.2 Inhibitory histon-deacetyláz 71
Literatura 73

4 Diferenciační terapie 75
Literatura 77

5 Úloha hormonů v systémové protinádorové terapii 79
5.1 Principy hormonální léčby 79
5.1.1 Hormony a nádorový růst 79
5.1.2 Hormonální receptory 80
5.2 Různé modality hormonální léčby 80
5.3 Rezistence na hormonální léčbu 82
Literatura 83

6 Monoklonální protilátky 85
6.1 Mechanismus účinku monoklonálních protilátek .. 87
6.2 Klasifikace monoklonálních protilátek 87
6.2.1 Protilátky používané či zkoušené převážně v terapii hematologických malignit 87
6.2.2 Protilátky používané či zkoušené převážně v terapii solidních nádorů 89
6.2.3 Protilátky zaměřené na inhibici angiogeneze a metastazování 91
6.2.4 Imunomodulační protilátky 91
6.2.5 Protilátky k symptomatické léčbě nádorových onemocnění 93
6.3 Monoklonální protilátky druhé generace (s cíleně změněnou glykosylací) 93
6.4 Protilátkové fragmenty 94
6.5 Fc-fúzní proteiny a imunocytokiny 95
Literatura 96

7 Imunoterapie 97
7.1 Formy imunoterapie 100
7.1.1 Nespecifická stimulace imunitního systému 100
7.1.2 Pasivní (adoptivní) imunoterapie 100
7.1.3 Aktivní imunoterapie – nádorové vakcíny 102
7.2 Cytokiny 104
7.2.1 Interferony 104
7.2.2 Interleukiny 105
7.2.3 Hematopoetické růstové faktory 107
7.2.4 Biosimilars růstových faktorů 108
7.2.5 Smrtící ligandy 109
7.3 Thalidomid a imunomodulační látky 109
Literatura 111

8 Cílená léčba I: terapie cílená na nádorové buňky – inhibice růstu nádoru 113
8.1 Obecné zásady cílené léčby 113
8.2 Cílená léčba Ia: inhibice proliferace 117
8.2.1 Inhibice receptorových tyrozin-kináz ... 117
8.2.2 Inhibice nereceptorových proteinů s tyrozin-kinázovou aktivitou 121
8.2.3 Inhibice proteinu RAS 124
8.2.4 Inhibice signální dráhy RAF-MEK-ERK 126
8.2.5 Inhibice kaskády JAK-STAT 127
8.2.6 Inhibice signální dráhy PI3K-AKT-mTOR 128
8.2.7 Inhibice protein-kinázy C 130
8.2.8 Inhibice nukleárních faktorů kappa B .. 131
8.3 Cílená léčba Ib: inhibice sebeobnovy 132
8.3.1 Sebeobnova, proliferace, diferenciace .. 132
8.3.2 Inhibice telomeráz 133
8.3.3 Inhibice signálních kaskád podílejících se na regulaci sebeobnovy 135
8.4 Cílená léčba Ic: indukce apoptózy 138
8.4.1 Přímá indukce apoptózy 138
8.4.2 Nepřímá indukce apoptózy 139
8.4.3 Inhibice autofagie 141
Literatura 141

9 Cílená léčba II: terapie cílená na nádorové mikroprostředí – inhibice šíření nádoru 143
9.1 Inhibice angiogeneze 143
9.1.1 Nejdůležitější regulátory angiogeneze .. 145
9.1.2 Léčebné strategie zaměřené na angiogenezi 149
9.1.3 Inhibice lymfangiogeneze 155
9.1.4 Léky ovlivňující hypoxické prostředí .. 155
9.2 Inhibice invazivity a metastazování 155
9.2.1 Metastatická kaskáda 156
9.2.2 Inhibice metastatické kaskády 157
Literatura 161

10 Základy genové terapie 163
10.1 Různé modality genové terapie 163
10.2 Přímá a nepřímá posttranskripční regulace 164
Literatura 165

11 Rezistence k chemoterapii 167
11.1 Obecné mechanismy vzniku rezistence 167
11.2 Mnohočetná léková rezistence 167
Literatura 169

Přehled nejčastěji používaných zkratek 171
Rejstřík 181
Souhrn/Summary 195/197
O autorech 199

Předmluva

Předkládaná monografie navazuje na dřívější publikaci *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii* (vydanou nakladatelstvím Grada Publishing v roce 2010), ale liší se svým zaměřením. Je orientována především na mechanismy účinku protinádorových léčiv v kontextu nových poznatků molekulární biologie. Používaná a nově zaváděná léčiva jsou zde sice zmiňována, ale bez bližších charakteristik jejich terapeutického využití, pouze s připomínkou hlavních indikací.

Do textu jsme zařadili několik „boxů“ přinášejících doplňkové údaje. Literární odkazy jsme omezili pouze na přehledová sdělení nebo zásadní publikace v renomovaných časopisech, které jsou zárukou validních informací.

Autoři děkují oběma recenzentům prof. RNDr. Blance Říhové, DrSc., z AV ČR a prof. MUDr. Bohuslavu Melicharovi z Univerzity Palackého v Olomouci za péči, kterou věnovali čtení rukopisu, a za cenné připomínky. Náš dík patří také pracovníkům nakladatelství Grada Publishing za vysoce profesionální redakční a technické zpracování publikace.

Praha, říjen 2013

autoři

Přípravek YERVOY™ je určen k léčbě pokročilého melanomu (neresekovatelného nebo metastazujícího) u dospělých po předchozí léčbě.[1]

Síla imunitního systému

Důležité je dlouhodobé přežití

- YERVOY™: je prvním přípravkem, u nějž bylo prokázáno prodloužení celkového přežití pacientů s pokročilým melanomem.[2]
- YERVOY™: je nový lék, který stimuluje T-buňky a aktivuje imunitní systém a posiluje protinádorovou imunitu.[1]

ZKRÁCENÁ INFORMACE O PŘÍPRAVKU

Název: YERVOY 5 mg/ml koncentrát pro přípravu infuzního roztoku. Kvalitativní a kvantitativní složení: Jeden ml koncentrátu obsahuje 5 mg ipilimumabu. Ipilimumab je lidská monoklonální protilátka anti-CTLA-4 (IgG1κ) produkovaná ovariálními buňkami čínského křečka rekombinantní DNA technologií. **Terapeutické indikace:** léčba pokročilého (neresekovatelného nebo metastazujícího) melanomu u dospělých, kteří dostávali předcházející terapii. **Dávkování a způsob podání:** Doporučený indukční režim jsou 3 mg/kg intravenózně po dobu 90 minut každé 3 týdny, celkem 4 dávky. Pacienti by měli dostat celý indukční režim (4 dávky) dle tolerance, bez ohledu na vzhled nových lézí nebo růst existujících lézí. **Kontraindikace:** Hypersenzitivita na léčivou látku nebo na kteroukoli pomocnou látku. **Zvláštní upozornění*:** Imunitně podmíněné nežádoucí účinky, které mohou být závažné nebo život ohrožující, se mohou týkat gastrointestinálního traktu, jater, kůže, nervové, endokrinní nebo jiné orgánové soustavy. Pokud není identifikována jiná etiologie, je nutno průjem, zvýšenou frekvenci stolic, krvavou stolici, zvýšení jaterních testů, vyrážku a endokrinopatii považovat za zánětlivé a související s přípravkem YERVOY. U pacientů se závažnou aktivní autoimunitní chorobou, kde je další imunitní aktivace potenciálně bezprostředně život ohrožující, se přípravek nemá podávat. **Interakce s jinými léčivými přípravky a jiné formy interakce:** Ipilimumab je lidská monoklonální protilátka, která není metabolizována cytochromem P450 (CYP) ani jinými enzymy metabolizujícími léky, a proto se interakce založené na farmakokinetice neočekávají. Použití systémových kortikosteroidů před zahájením podávání přípravku YERVOY je třeba se vyhýbat kvůli jejich potenciální interferenci s farmakodynamickou aktivitou a účinností přípravku. Systémové kortikosteroidy nebo jiná imunosupresiva je však možné používat po zahájení podávání přípravku YERVOY za účelem léčby imunitně podmíněných nežádoucích účinků. Použití antikoagulancií zvyšuje riziko gastrointestinálního krvácení, což je nežádoucí účinek přípravku YERVOY, a proto musejí být pacienti se souběžnou léčbou antikoagulancii pečlivě monitorováni. **Těhotenství a kojení:** Podávání přípravku YERVOY se v těhotenství a u žen v reprodukčním věku, které nepoužívají účinnou antikoncepci, nedoporučuje. Není známo, zda se ipilimumab vylučuje do lidského mléka. **Účinky na schopnost řídit a obsluhovat stroje:** Kvůli nežádoucímu účinku - únava - je třeba opatrnosti při řízení nebo obsluze strojů. **Nežádoucí účinky:** *Velmi časté:* snížená chuť k jídlu, průjem, zvracení, nevolnost, vyrážka, pruritus, únava, reakce v místě injekce, pyrexie. *Časté:* nádorová bolest, anémie, lymfopenie, hypopituitarismus (včetně hypofyzitidy), hypotyreóza, dehydratace, hypokalemie, zmatenost, periferní senzorická neuropatie, závrať, bolest hlavy, letargie, rozmazané vidění, bolesti oka, hypotenze, zčervenání, návaly horka, dušnost, kašel, gastrointestinální krvácení, kolitida, zácpa, gastroezofageální refluxní choroba, bolesti břicha, abnormální jaterní funkce, dermatitida, erytém, vitiligo, kopřivka, alopecie, noční pocení, suchá kůže, artralgie, myalgie, muskuloskeletální bolest, svalové spasmy, třesavka, asténie, otok, bolest, zvýšená hladina alanin aminotransferázy, zvýšená hladina aspartát aminotransferázy, zvýšená hladina bilirubinu v krvi, snížení hmotnosti. *Další nežádoucí účinky – viz úplná informace o přípravku.* **Předávkování:** V případě předávkování se doporučuje pacienta důkladně monitorovat s ohledem na příznaky nežádoucích účinků a zahájit odpovídající symptomatickou léčbu. **Zvláštní opatření pro uchování:** Uchovávejte v chladničce (2 °C – 8 °C). Chraňte před mrazem. Uchovávejte v původním obalu, aby byl přípravek chráněn před světlem. **Druh obalu a velikost balení:** injekční lahvička (sklo typu I) s uzávěrem (potaženým butylovou gumou) a odklápěcím uzávěrem (aluminium). Velikost balení: 1 lahvička 10 ml nebo 1 lahvička 40 ml. **Držitel rozhodnutí o registraci:** Bristol-Myers Squibb Pharma EEIG,Uxbridge Business Park, Sanderson Road, Uxbridge, MiddlesexUB8 1DH, Velká Británie. **Registrační číslo:** EU/1/11/698/001-2. **Datum první registrace:** 13.07.2011. **Datum poslední revize textu**: 30. 5. 2013. Výdej léčivého přípravku je vázán na lékařský předpis. Přípravek není hrazen z veřejného zdravotního pojištění. Dříve než předepíšete tento lék, přečtěte si prosím úplné znění Souhrnu údajů o přípravku.
Podrobnéinformaceotomtopřípravkujsouuveřejněnynawebovýchstránkách Evropskélékovéagentury(EMA)http://ema.europa.eunebojsoudostupnénaadresáchzástupcedržitelerozhodnutí o registraci v ČR: Bristol-Myers Squibb spol. s r. o., Olivova 4/2096, 110 00 Praha 1, tel.: +420 221 016 111, www.b-ms.cz.

URČENO PRO ODBORNOU VEŘEJNOST.

* Všimněte si prosím změn v Souhrnu údajů o přípravku

Bristol-Myers Squibb

YERVOY™ (ipilimumab)
koncentrát pro přípravu infuzního roztoku

1. Souhrn údajů o přípravku YERVOY™
2. Hodi FS *et al.* N Engl J Med 2010 Aug 19;363(8):711-723

© Bristol-Myers Squibb - YERVOY™ je registrovaný obchodní název společnosti Brist - ol-Myers Squibb - Job 731CZ13PR05807-01 - Datum přípravy: červen 2013

Úvod do problematiky nádorových onemocnění a protinádorové léčby

Zhoubná nádorová onemocnění představují závažný celospolečenský problém. Ačkoliv paleoonkologické studie přinášejí svědectví o výskytu zhoubných nádorů již v době prehistorické, teprve v minulém století se nádorová onemocnění dostala do popředí zájmu. Medicína se dříve logicky soustřeďovala na léčbu nejrůznějších závažných a smrtících onemocnění, zejména infekcí, a tak se léčba nádorových onemocnění nacházela mimo hlavní zájem lékařů. Jedinou protinádorovou léčebnou metodou zůstávala až do dvacátých let 20. století **léčba chirurgická**, byť její možnosti byly značně omezené.

Zcela nový způsob protinádorové terapie představoval objev a využití rentgenových paprsků. Jak chirurgická léčba, tak **radioterapie** se postupně zdokonalovaly. Pokroky v operační technice a anesteziologii umožňovaly stále odvážnější a radikálnější výkony, zlepšovala se i ozařovací technika, postupně se zaváděly nové zdroje ionizujícího záření s větší účinností na nádor a s menším rizikem poškození normálních tkání, postupně se zdokonalovaly též metody plánování radioterapie.

Teprve ve čtyřicátých letech minulého století lze pozorovat nesmělé začátky uplatnění nového léčebného přístupu, tj. **chemoterapie**. Byl to objev alkylačních látek (dusíkatý yperit) a později antimetabolitů (metotrexát). Z původně doplňkové metody se chemoterapie v průběhu šedesátých let 20. století stala jednou z hlavních léčebných metod. Na rozdíl od dosavadních čistě lokoregionálních metod umožňovala chemoterapie systémový léčebný účinek.

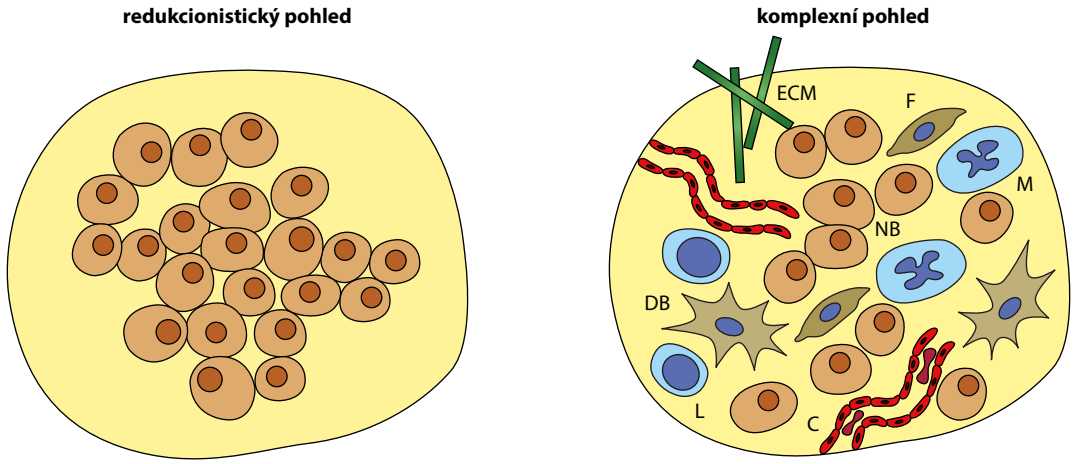
Od sedmdesátých let 20. století se začalo ve větší míře uvažovat též o posílení protinádorové imunity v protinádorové léčbě. Objevila se další léčebná disciplína – **imunoterapie**, nebo v širším smyslu tzv. **biomodulační léčba.**

Začaly se zveřejňovat i první příznivé zkušenosti se vzájemnou kombinací různých metod protinádorové léčby. Ukázalo se, že tzv. **multimodální léčba** má podstatně větší efektivitu než samostatně aplikované jednotlivé metody. Za mimořádný přínos lze považovat také postupné zdokonalování **podpůrné** a **doplňkové léčby**, která významně omezuje nebo i zcela eliminuje nežádoucí účinky, jež aplikaci všech metod protinádorové léčby provázejí, což vedlo ke snížení mortality.

Pokroky molekulární biologie a genetiky vedly ke stále hlubšímu poznání mechanismů kancerogeneze a patofyziologie nádorových onemocnění. S ohledem na tyto poznatky byly izolovány či syntetizovány chemické sloučeniny, které cíleně blokují nitrobuněčné pochody aberantně aktivované u nádorových buněk. Vznikla další nová disciplína – **cílená terapie**, jež se stala významnou součástí komplexní protinádorové léčby.

Dále se ukázalo, že růst nádoru není pouze výsledkem autonomní a neregulované proliferace, ale že velmi významným faktorem je též inhibice programované smrti buněk – apoptózy, která u některých typů nádorových onemocnění hraje dokonce významnější úlohu než vystupňovaná proliferace. Pro růst a šíření nádoru má mimořádný význam též indukce novotvorby cév – angiogeneze a vaskulogeneze, schopnost vytvářet aberantní vztahy s nenádorovými buňkami nádorového mikroprostředí a schopnost invazivního růstu a/nebo vytváření vzdálených metastáz. **Protinádorové látky ovlivňující mikroprostředí** se tak staly dalším obohacením léčebných možností.

Na nádor se přestalo pohlížet jako na masu homogenních nádorových buněk, které lze studovat a léčit *per se*, a pozvolna se začal prosazovat náhled na tumor jako na vysoce komplexní onemocnění, které je v jasném vztahu (vztazích) k „nenádorovým“ složkám mikroprostředí (obr. 1). Ukázalo se, že vlastní nádor je značně heterogenní soubor buněk. Později došlo k objevu tzv. **nádorových kmenových buněk**, které jsou jako jediné z celé



Obr. 1 *Redukcionistický vs. komplexní pohled na nádor*
NB – nádorová buňka, ECM – extracelulární matrix, F – fibroblast, M – makrofág, DB – dendritická buňka, L – lymfocyt, C – céva

nádorové tkáně nositeli nekonečné sebeobnovy (a tedy nesmrtelnosti) nádoru. Tato poznání vedla ke hledání nových možných přístupů protinádorové léčby.

Rozluštění lidského genomu a zdokonalování technologických postupů v oblasti genetiky, molekulární biologie a makromolekulární chemie vedly ke vzniku **biologické terapie**, založené na podávání strukturálních analog přirozených makromolekul, nejčastěji proteinů (např. monoklonálních protilátek či rekombinantních lidských proteinů). Rozvoj genové terapie, nanotechnologie a dalších disciplín otevírají další, zcela nové logistické, technologické a metodologické možnosti protinádorových strategií.

V předkládané monografii se budeme zabývat pouze metodami, které mají systémový účinek a do různé míry ovlivňují velmi komplexní pochody kancerogeneze a patobiologie nádorových onemocnění. Zatímco konvenční chemoterapií lze ovlivnit především proliferaci, replikaci a apoptózu nádorových buněk, cílená terapie může více či méně selektivně zasáhnout i do dalších deregulovaných procesů, jako je invazivita, metastazování, angiogeneze, sebeobnova, diferenciace aj.

1.1 Nádorová tkáň a nádorové mikroprostředí

Na nádor se až do nedávné minulosti pohlíželo jako na seskupení víceméně homogenních maligních buněk. Teprve poznatky posledních dvou dekád vedly k zásadní změně nazírání na maligní choroby, které se začaly zkoumat jako svého druhu „deregulované tkáně či orgány“, to znamená ve vztahu k **nádorovému mikroprostředí.**

Zatímco **parenchym** nádoru je tvořen samotnými nádorovými buňkami, nádorové **stroma** se skládá jednak z „nenádorových“ buněčných komponent, jednak z nebuněčných součástí. Je třeba zdůraznit, že nádorové stroma se může na složení nádoru podílet značně rozdílným způsobem. Zatímco difuzní velkobuněčný lymfom se obvykle skládá z výrazné převahy parenchymu (tj. lymfomových buněk), u Hodgkinova lymfomu mohou vlastní nádorové buňky (RS buňky) tvořit i méně než 1 % nádorové masy. A podobně – zatímco u chronické myeloidní leukemie jednoznačně převažuje podíl nádorového parenchymu (tj. masivní infiltrace kostní dřeně leukemickým klonem), v patogenezi primární myelofibrózy hraje hlavní roli deregulace nádorového stromatu (fibrotizace mikroprostředí kostní dřeně). Analogicky jako u časové osy kancerogeneze i v případě prostorového ohraničení bývá proto velmi obtížné určit přesné hranice nádoru ve smyslu „nádorového orgánu“, tedy vymezení, kde končí tkáň nádorová a kde začíná tkáň „zdravá“.

Mezi „nenádorové“ **buněčné komponenty** nádorového mikroprostředí patří například s nádorem asociované fibroblasty (*cancer-associated fibroblasts* – CAF), mezenchymové kmenové buňky (*mesenchymal stem cells* – MSC), endotelové buňky, pericyty a hladké svalové buňky cév, adipocyty nebo buňky imunitního systému: nádor infiltrující T-lymfocyty (*tumor-infiltrating lymphocytes* – TIL) či s nádorem asociované makrofágy (*tumor-associated macrophages* – TAM). **Nebuněčné komponenty** nádorového mikroprostředí jsou tvořeny zejména extracelulární matrix (ECM) a v ní impreg-

novanými cytokiny, růstovými a angiogenními faktory a dalšími bioaktivními molekulami produkovanými a sekretovanými nádorovými a nenádorovými buňkami mikroprostředí. Nádorové buňky, nenádorové buněčné složky a extracelulární matrix pak vytvářejí vlastní „tumor" – deregulovaný orgán, v němž jednotlivé komponenty nádorového mikroprostředí vstupují do vzájemných komplexních vztahů. Navíc zdaleka neplatí, že pouze nádorové buňky představují patologickou komponentu nádorové tkáně. Bylo prokázáno, že téměř všechny „nenádorové" buněčné komponenty bývají menší či větší měrou deregulované, a v důsledku toho více či méně podporují, umožňují, či dokonce indukují přežití, růst a šíření nádorového parenchymu (tj. vlastních nádorových buněk).

Příkladem může být splenický lymfom, u kterého „prosté" odstranění sleziny (splenektomie) vede v řadě případů k navození kompletní remise, tj. k vymizení lymfomových buněk z ostatních kompartmentů (z kostní dřeně, periferní krve, event. infiltrovaných uzlin).

Každý, kdo se v laboratorních podmínkách pokoušel vytvořit buněčnou linii z primárních nádorových buněk, ví, že nádorové buňky *in vitro* velmi špatně proliferují a dříve či později odumřou či diferencují. Nádorové buňky, které často nelze eradikovat v organismu ani agresivní kombinovanou chemoimunoradioterapií, odumírají spontánně v okamžiku, kdy jsou odstřiženy od komplexních podpůrných stimulů nádorového mikroprostředí. Tento fakt jednak potvrzuje nezastupitelnou úlohu mikroprostředí, jednak v sobě skrývá obrovský potenciál molekulárních cílů, proti nimž lze teoreticky zasáhnout v rámci experimentální terapie nádoru za účelem co největšího ochromení aberantních vztahů mezi nádorovým parenchymem a stromatem. Stroma karcinomu prsu je např. bohaté na fibroblasty a makrofágy, zatímco stroma normální prsní tkáně je na tyto buněčné typy chudé a obsahuje zejména adipocyty. S karcinomem asociované fibroblasty produkují SDF1 (*stroma-derived factor 1*), parakrinní růstový faktor a chemoatraktant pro nádorové buňky, které na svém povrchu exprimují receptor CXCR4/CD184. S nádorem asociované fibroblasty bývají ve srovnání s „normálními" fibroblasty aktivované (tzv. myofibroblasty), čímž se podobají aktivovaným fibroblastům v místě hojící se rány. Proto se z patofyziologického hlediska tumory někdy označovaly jako „rány, které se nikdy nezhojí".

Buňky imunitního systému velmi často místo toho, aby nádor eliminovaly, podporují jeho růst a invazivitu sekrecí prozánětlivých či proangiogenních faktorů (např. TNF-α, GM-SCF, CSF1, IL4, IL6, SCF, VEGF, PDGF, MMP) nebo inhibují protinádorovou složku imunity produkcí imunosupresivních molekul (např. IL10, TGF-β, indolamin-2,3-dioxygenázy – IDO). Nádorové buňky mohou např. atrahovat makrofágy v důsledku sekrece klíčového růstového faktoru monocytů CSF1 (*colony-stimulating factor 1*). Aktivované makrofágy (TAM – *tumor-associated macrophages*) pak působí mutagenně, neboť v místě rostoucího nádoru produkují vysoké množství kyslíkových radikálů (*reactive oxygen species* – ROS). Kyslíkové radikály navíc účinně inhibují signalizaci z T-buněčného receptoru v důsledku snížení exprese TCR-zeta řetězce. Makrofágy navíc produkují celou řadu cytokinů a růstových faktorů, které stimulují růst a proliferaci nádorových a nenádorových buněk mikroprostředí (FGF, EGF, PDGF, HGF aj.). Bylo prokázáno, že bazofilní polymorfonukleáry stimulují růst CML blastů produkcí růstového faktoru HGF.

Hlavní populace imunosupresivních leukocytů, které klíčovým způsobem interferují s protinádorovou imunitou, zahrnují **regulační T-lymfocyty** (*regulatory T-cells* – Tregs) a **myeloidní supresorové buňky** (*myeloid-derived suppressor cells* – MDSCs). Regulační T-lymfocyty (CD4+, CD25+, FOXP3+) inhibují nádor infiltrující cytotoxické T-lymfocyty (CD8+) jednak humorálně – produkcí imunosupresivních cytokinů (IL10, TGF-β), jednak kontaktně – expresí inhibičních molekul (CTLA4, PD-L1). Myeloidní supresorové buňky sekretují imunosupresivní molekuly, indukují populaci regulačních T-lymfocytů a přímo blokují funkci T-buněčných receptorů na nádor infiltrujících T-lymfocytech.

Komplexně deregulované jsou i nádorem indukované novotvořené cévy (podrobně viz kap. 11.1.2). Stejně tak i složení extracelulární matrix nádorů, vytvářející jednak mezibuněčnou výplň stromatu, jednak bazální membrány oddělující epiteliální a endoteliální buňky od stromatu, vykazuje značné odchylky v porovnání se zdravými tkáněmi. Stroma solidních nádorů bývá výrazně tužší ve srovnání se zdravou tkání, za což je odpovědná např. zvýšená depozice kolagenu, změněná struktura kolagenních vláken a/nebo zvýšená aktivita lysyl-oxidázy (která vytváří zkřížené vazby mezi jednotlivými kolagenními vlákny).

Složení bazálních membrán epiteliálních karcinomů je také výrazně odlišné v porovnání se zdravými tkáněmi. Vzhledem k tomu, že složení bazálních membrán je odpovědné za řadu klíčových dějů, včetně ukotvení epiteliálních buněk na stroma, signalizaci do nitra buněk přes integrinové receptory či udržování polarity epitelu, má změna složení bazálních membrán komplexní dopad na celou řadu buněčných funkcí včetně ztráty polarity, zvýšení migračních a lokomočních schopností až postupnou přeměnu z epiteliálního do mezenchymálního fenotypu (*epithelial to mesenchymal transition* –

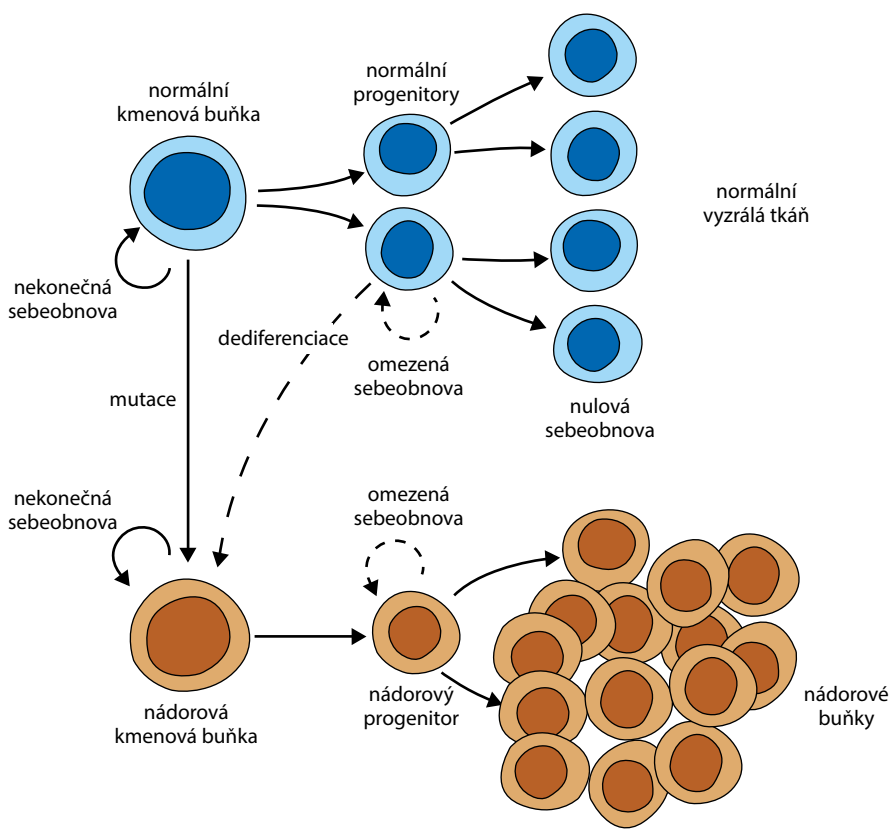
EMT). Změna složení ECM nádorového stromatu vede též ke komplexní změně v distribuci cytokinů a růstových faktorů impregnovaných v matrici.

Odhalení, že nádory nejsou tvořeny pouze nádorovými buňkami, v sobě skrývá zásadní dopad na koncipování nových přístupů protinádorové terapie, která může být zaměřena kromě samotných nádorových buněk též na „nenádorové" komponenty. Příkladem v praxi používané protinádorové terapie zaměřené proti „nenádorovým" komponentám nádorového mikroprostředí může být antiangiogenní terapie (např. bevacizumab), imunomodulační monoklonální protilátky (anti-CTLA4, ipilimumab, anti-PD-1) nebo tzv. imunomodulační látky (IMID) – thalidomid, lenalidomid.

1.2 Nádorové kmenové buňky a jejich hnízdo (niche)

Tkáňově specifické kmenové buňky (hematopoetické, jaterní, neuronální, kožní atd.) mají dvě vlastnosti, které je zásadním způsobem odlišují od ostatních buněk dané tkáně. Je to **pluripotence** a **schopnost nekonečné sebeobnovy** (tj. nesmrtelnost, imortalita). Schopnost nekonečné sebeobnovy teoreticky umožňuje vysokou pravděpodobnost vzniku mutací a zároveň akumulaci různých mutací v témže buněčném klonu během života jednotlivce. Nesmrtelnost představuje i jednu z hlavních charakteristik nádorových kmenových buněk.

Paradigma **nádorových kmenových buněk** předpokládá, že k maligní transformaci dochází na úrovni normálních, tkáňově specifických kmenových buněk, jak je znázorněno na obrázku 2. Nádorové kmenové buňky jsou zodpovědné za udržení malignity v organismu pacienta. Jejich asymetrickým dělením vznikají kromě dceřiných kmenových buněk také více či méně **diferencované nádorové buňky**, jejichž schopnost sebeobnovy je omezená a citlivost vůči terapii často vyšší v důsledku zvýšené mitotické aktivity a ztráty některých vlastností typických pro kmenové buňky (vyšší exprese anti-apoptotických molekul, efluxních kanálů či reparačních enzymů DNA aj.). Přežití nádorových kmenových buněk je zodpovědné za návrat



Obr. 2 *Normální a nádorová buněčná populace – vznik nádorových kmenových buněk maligní transformací normálních fyziologických protějšků a časných progenitorů*

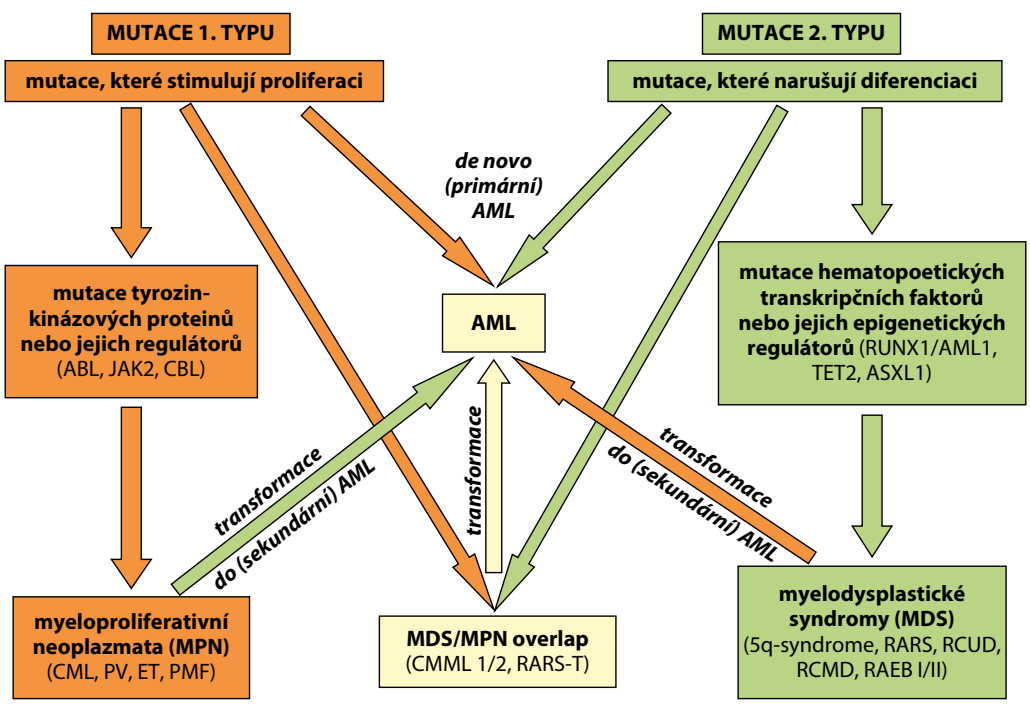
choroby po jinak „úspěšné“ léčbě, kdy je dosaženo kompletní remise onemocnění (podle standardních vyšetřovacích algoritmů, tedy zejména pomocí CT či PET-CT kritérií).

Výzkum nádorových kmenových buněk dosáhl nejhlubších poznatků v hematoonkologii. Leukemická kmenová buňka vzniká z normální hematopoetické kmenové buňky ziskem minimálně dvou komplementárních mutací (obr. 3). Velmi zjednodušeně lze konstatovat, že se jedná o mutaci, která zablokuje diferenciaci, a mutaci, která stimuluje proliferaci leukemických buněk. Leukemická populace je minimálně zpočátku onemocnění monoklonální (či maximálně oligoklonální), na rozdíl od silně polyklonální normální krvetvorby. Leukemická krvetvorba napodobuje normální krvetvorbu v tom, že je vertikálně hierarchizovaná. Na vrcholu pyramidy leukemické populace stojí nesmrtelné **leukemické kmenové buňky** (cca 1 : 10 000 až 1 : 1 000 000 leukemických buněk), které jako jediné jsou schopné udržovat nesmrtelný fenotyp tohoto maligního onemocnění. Leukemické kmenové buňky akutních myeloidních leukemií jsou charakterizovány specifickým imunofenotypem CD34+ CD38– CD90+ CD45RA–. Zbytek leukemické populace tvoří maligní buňky na různé úrovni diferenciace (leukemické blasty). Stupeň diferenciačního bloku leukemických blastů je v přímé závislosti na typu mutovaného hematopoetického transkripčního faktoru.

Leukemické blasty na rozdíl od leukemických kmenových buněk nejsou nesmrtelné (nemají schopnost nekonečné sebeobnovy, nekonečný klonogenní potenciál), ačkoliv mívají vystupňovanou mitotickou aktivitu. Leukemické blasty tudíž po určitém počtu dělení zákonitě podléhají procesu stárnutí, apoptózy, nekrózy, autofagie či jiné buněčné smrti.

Cílená eradikace populace leukemických kmenových buněk by teoreticky vedla ke spontánnímu odumření „zbytkové“ leukemické populace. To má zásadní dopad na vývoj nových anti-leukemických terapeutických strategií.

Kromě leukemie byly nádorové kmenové buňky odhaleny u celé řady solidních nádorů, jako je karcinom prsu, kolorektální karcinom, nádory CNS apod. Ačkoliv jejich morfologická identifikace bývá obvykle nemožná,



Obr. 3 *Zjednodušené schéma leukemogeneze za účasti dvou komplementárních mutací*
CML – chronická myeloidní leukemie, PV – polycythaemia vera, ET – esenciální trombocytemie, PMF – primární myelofibróza, AML – akutní myeloidní leukemie, MDS – myelodysplastický syndrom, MPN – myeloproliferativní neoplazmata, CMML – chronická myelomonocytární leukemie, RARS-T – refrakterní anemie s prstenčitými sideroblasty s trombocytemií, RCUD – refrakterní cytopenie s unilineární dysplazií, RCMD – refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií, RAEB – refrakterní anemie s excesem blastů

Tab. 1 *Markery kmenových buněk*

Nádorové onemocnění	Marker
karcinom prsu	CD44+ CD24– Lin– ALDH1+
nádory CNS	CD133+
maligní melanom	CD20+ ABCB5+
kolorektální karcinom	CD133+ CD44+ ALDH1+ EpCAM+
karcinom plic	CD24+ CD44+ CD133+
nádory hlavy a krku	CD44+ CD44+ CD133+ CD28+ CD29+
karcinom jater	CD133+ CD90+ CD44+
karcinom pankreatu	CD44+ CD24+ CD133+ a ESA+
sarkomy	CD44+ CD105+ Stro1+

ALDH1 – aldehyde dehydrogenase 1, Lin – lineage, ESA – epithelial specific antigen, Stro1 – stromal marker 1

byly odhaleny některé biochemické a povrchové markery preferenčně nacházené v populaci kmenových buněk určitých typů nádorových onemocnění. Markery kmenových buněk jsou uvedeny v tabulce 1.

Pro **nádorové kmenové buňky** platí analogie toho, co bylo řečeno o leukemických kmenových buňkách. Nádorové kmenové buňky vznikají transformací svých fyziologických protějšků, tedy normálních, tkáňově specifických kmenových buněk. V porovnání s diferencujícími či diferencovanými nádorovými buňkami vykazují zvýšenou schopnost opravy DNA a obvykle se nacházejí v klidovém stavu (v G_0 fázi). Obě tyto vlastnosti vedou k vysoké rezistenci nádorových kmenových buněk vůči chemoterapii a radioterapii. Nádorové kmenové buňky jsou tedy nesmrtelné (mají schopnost nekonečné sebeobnovy), ale obvykle vykazují velmi nízkou mitotickou aktivitu. Naopak zbytková nádorová populace může mít vystupňovanou mitotickou aktivitu, schopnost nekonečné sebeobnovy však postrádá. Přežití nádorových kmenových buněk je nejčastější příčinou návratu (relapsu) maligního onemocnění po léčbě.

Normální kmenové buňky přežívají díky signálům mnoha podpůrných buněk, které vytvářejí specifickou topografickou tkáňovou jednotku složenou z kmenových buněk, podpůrných buněk a extracelulární matrix – tzv. **hnízdo kmenových buněk** (*stem cell niche*, z franc. *niche [niš]* – hnízdo). Normální struktura zdravé tkáně vytváří podmínky pro existenci relativně malého počtu hnízd s přísně regulovaným počtem kmenových buněk. V hnízdě jsou kmenové buňky v důsledku exprese specifických povrchových molekul a příslušných receptorů topograficky soustředěny pouze do určitých míst, obvykle v pevné vazbě na podpůrné buňky, což umožňuje udržení polarity kmenových buněk, nezbytné pro jejich asymetrické dělení (z jedné kmenové buňky vznikají dvě dceřiné buňky, z nichž jedna vstupuje do diferenciace, zatímco druhá zůstává kmenovou buňkou). Na architektuře hnízda kmenových buněk se významně podílí též správné složení extracelulární matrix a bazálních membrán, které jsou odpovědné za optimální ukotvení kmenových buněk. Homeostáza kmenových buněk je regulována mimo jiné optimální tenzí kyslíku v hnízdě (tj. mírou hypoxie) a řadou parakrinně sekretovaných působků produkovaných podpůrnými buňkami.

Pro jeden typ kmenových buněk může existovat více typů hnízd. Například hematopoetická kmenová buňka přežívá minimálně ve dvou rozdílných hnízdech – jedná se o tzv. **endosteální niche** (s nízkou tenzí kyslíku, ve vazbě na osteoblasty) a tzv. **perivaskulární niche** (s vysokou tenzí kyslíku, ve vazbě na endoteliální buňky). Ukotvení krvetvorných kmenových buněk (*hematopoetic stem cells* – HSC) na podpůrné buňky (osteoblasty, endotelie) umožňuje udržení polarity HSC a je podkladem pro asymetrické dělení HSC.

Deregulace nádorového mikroprostředí (tj. „nenádorových“ buněčných komponent, ale též změny ve složení ECM či změny v tenzi kyslíku) mohou vytvářet permisivní hnízdo pro přežití, proliferaci a šíření nádorových kmenových buněk. Abnormální produkce proteáz (např. plazminu či MMP) vede postupně k remodelaci mikroprostředí včetně narušení bazálních membrán a buněčných interakcí (*cell-cell interactions*), které jsou nahrazeny interakcemi buňka-stroma (*cell--stroma interactions*), změněnou aktivací přes integrinové receptory a změněnou motilitou buněk. Vzniká **hnízdo nádorových kmenových buněk.**

1.3 Nádor jako důsledek genetické a epigenetické deregulace

Vznik nádorového onemocnění je složitý vícestupňový proces, během něhož se normální buňka mění akumulací řady klíčových genetických a epigenetických mutací na buňku nádorovou.

Genetické mutace (bodové mutace, chromozomální translokace apod.) mění primární strukturu DNA (tj. kód daný sekvencí nukleových bází) konkrétních genů či mikroRNA (miR), což obvykle vede ke strukturálnímu a funkčnímu narušení příslušných proteinů (v případě mutace genů) nebo ke změněné expresi cílových proteinů (v případě mutace miR).

Epigenetické mutace vedou k narušení sekundární (epigenetické) struktury DNA. Epigenetická struktura DNA je dána posttranslační úpravou histonů a/nebo DNA, z chemického hlediska se nejčastěji jedná o acetylaci a metylaci (i když existují i jiné formy posttranslační úpravy, např. ubikvitinace, sumoylizace, citrulinace aj.). Vzhledem k tomu, že acetylace/deacetylace histonů hraje v sekundárním uspořádání DNA hlavní roli, hovoří se někdy o tzv. **histonovém kódu** (jako doplňku ke genetickému kódu danému sledem nukleových bází). Výsledkem je změna prostorového uspořádání DNA (z heterochromatinu na euchromatin či naopak) a s tím spojená změna exprese příslušných genů či miR.

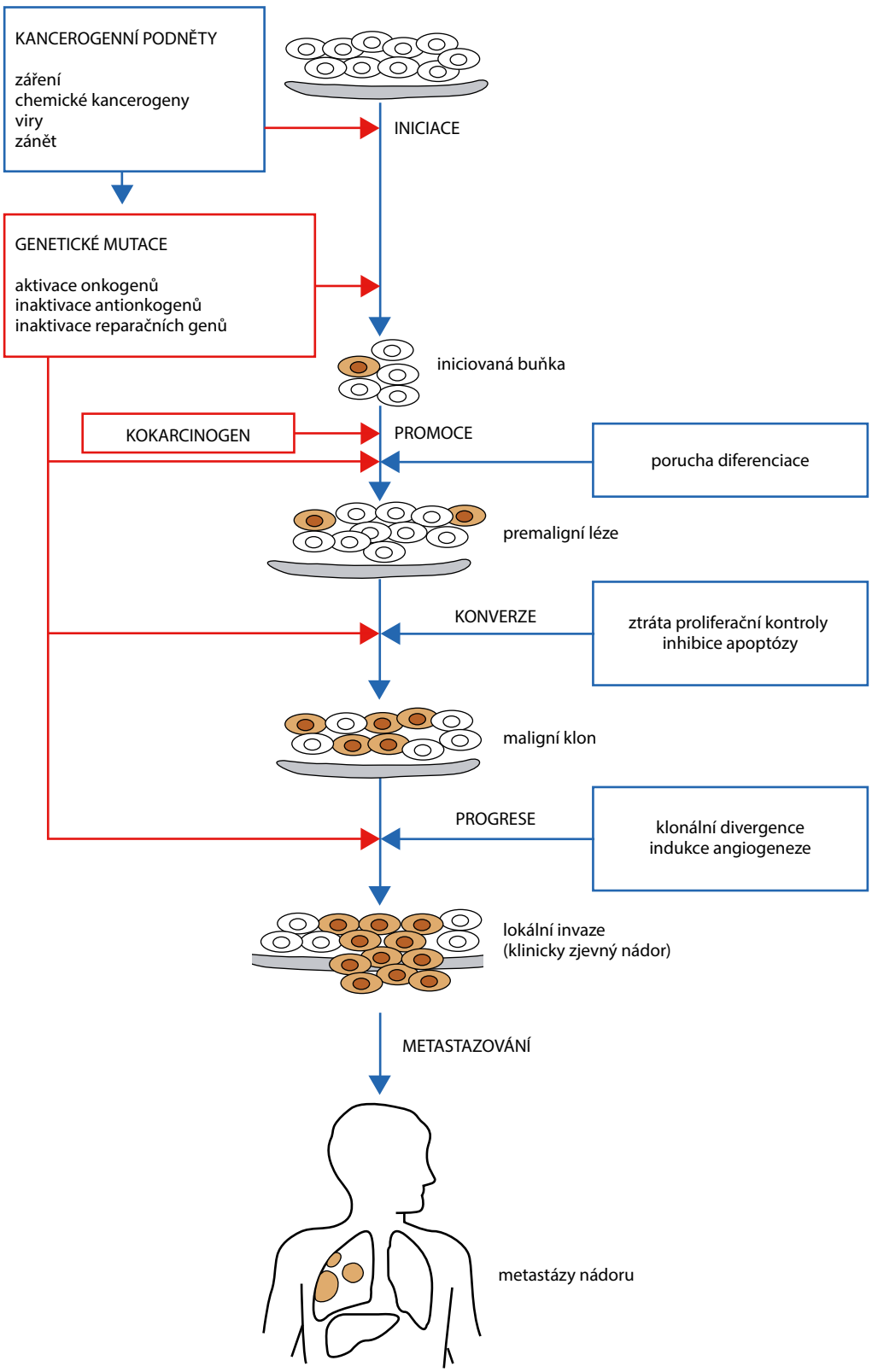
U nádorových onemocnění může docházet k utlumení exprese klíčových transkripčních faktorů či tumor supresorových genů, nebo naopak k obnovení exprese genů či miR, které nejsou v dospělém organismu za normálních podmínek exprimovány (např. geny účastnící se procesu embryogeneze apod.). Bylo prokázáno, že u solidních nádorů dochází v průběhu kancerogeneze k nahromadění v průměru šesti až osmi kritických mutací. U hematologických malignit je situace mírně odlišná, u akutních leukemií je třeba zisk minimálně dvou kritických mutací. Neznamená to ovšem, že v leukemických či nádorových buňkách nalezneme pouze výše zmíněný počet mutací – leukemické a nádorové buňky vykazují v době diagnózy nádorového onemocnění obvykle stovky až tisíce různých genetických a epigenetických změn, nicméně většinu z nich tvoří tzv. **sekundární mutace**, které vznikají následkem zvýšené genetické nestability nádorových buněk a na procesu kancerogeneze se pravděpodobně aktivně nepodílejí. Pouze některé mutace představují tzv. **kritické mutace**, které jsou přímým podkladem maligní transformace nádorových buněk. Mezi kritické mutace patří např. aktivace onkogenů, inaktivace tumor supresorových genů, zvýšení exprese inhibitorů apoptózy, mutace genů řídících průchod buněčným cyklem apod.

V průběhu kancerogeneze postupně premaligní a později maligní klon kooptuje celou řadu nenádorových buněk mikroprostředí včetně buněk imunitního systému, které následně usnadňují přežití, růst a šíření nádoru v organismu a metastazování lymfatickou či krevní cestou. Plně maligní metastatický kolorektální karcinom nevznikne během dnů či týdnů, ale ke kumulaci kritických mutací dochází obvykle v průběhu řady let. Přesně určit časový bod, kdy se ze zdravé sliznice tlustého střeva stává „nádor“, není možné. Poslední mezistupeň kancerogeneze, ze kterého je progrese do plně maligní formy již pouze otázkou času, označujeme jako **prekancerózu** (např. vilózní adenom jako prekanceróza kolorektálního karcinomu). U prekancerózy dosáhla deregulace homeostázy následkem akumulace kritických mutací již takového stupně, že samotný proces kancerogeneze už nelze zastavit. Schematicky je postupný vznik nádorového onemocnění znázorněn na obrázku 4.

Proces kancerogeneze je možno ještě zpomalit či zastavit jedině v jeho iniciálních etapách (iniciace a promoce) některými chemopreventivními přípravky. Nicméně již **iniciace** představuje nevratný proces počátečních genetických změn, v jejichž důsledku mohou iniciované buňky přežívat v morfologicky „zdravých“ tkáních celé roky. Iniciované buňky pak mohou být vystaveny **promoci** v souvislosti se setkáním s chemickými kancerogeny, ionizujícím zářením či s vlivem probíhajícího zánětlivého procesu. V průběhu promoce obvykle dochází k akcentaci buněčné proliferace a k potlačení apoptózy a oprav DNA, což usnadní vznik dalších genetických a epigenetických změn. V případě prekancerózy jde již o nevratné směřování do plně maligního fenotypu.

Plně maligní klon dává svým dělením vzniknout nádorové populaci, v níž od počátku probíhá klonální divergence vlivem různých selekčních tlaků. Selekční tlaky působí jednak zevnitř nádorové populace – genetickou nestabilitou nádorových buněk a z ní plynoucí akumulací genetických mutací (agresivnější klony tak postupně vytlačují původní nádorový klon), jednak zvnějšku – například vlivem protinádorové imunity či účinkem protinádorové terapie (klony rezistentní k léčbě postupně přerůstají původně citlivé nádorové buňky).

Nádorové onemocnění má tudíž v naprosté většině případů tendenci k postupnému zvyšování agresivity. Proto hlavní léčebnou strategií u většiny malignit zůstává co nečasnější eradikace maligního klonu. Kompletní eliminaci nádorových buněk však obvykle komplikuje systémová diseminace či metastatický rozsev nádoru. Avšak i takové komplexní procesy, jako je novotvorba



Obr. 4 *Schéma vícestupňového procesu kancerogeneze*

cév či tvorba vzdálených metastáz, představují vlastnosti, které nádorová buňka (či lépe nádorová tkáň) získává v průběhu progrese nádoru (nejedná se o vlastnosti, které by nádorové buňky měly od samého počátku).

1.4 Nádor jako důsledek selhání imunologického dohledu

Možnou roli (selhání) imunitního systému při vzniku a šíření nádorů předpokládal již Paul Ehrlich v roce 1909, ale vědecká hypotéza **imunologického dohledu nad nádory** (*cancer immune surveillance*) byla postulována až v padesátých letech 20. století Burnettem a Thomasem. V dalších dekádách byl vliv imunitního systému na vývoj nádorových onemocnění postupně zpochybňován, renesance zájmu o imunitní systém ve vztahu ke vzniku a vývoji nádorů nastala až v devadesátých letech 20. století, kdy bylo experimentálně prokázáno (zejména pomocí myších knock-out modelů), že vyřazení klíčových hráčů či regulátorů vrozené či získané imunity (např. perforinu, IFN-γ, STAT1, RAG2 aj.) je asociováno se zvýšenou tvorbou spontánních či chemicky indukovaných nádorů. Dalším důkazem pak byla zvýšená incidence některých typů nádorových onemocnění u imunokompromitovaných pacientů, např. pacientů po orgánových transplantacích či pacientů s AIDS. Poslední dvě dekády intenzivního výzkumu v imunologii nicméně přinesly důkazy pro **duální roli imunitního systému** v průběhu kancerogeneze. Imunitní systém může na jedné straně přispívat k eliminaci nově transformovaných buněk nebo k eradikaci zbytkové nádorové populace po léčbě, na druhou stranu byla v mnoha případech jasně demonstrována podpůrná role imunitního systému při přežití, růstu či šíření celé řady nádorů.

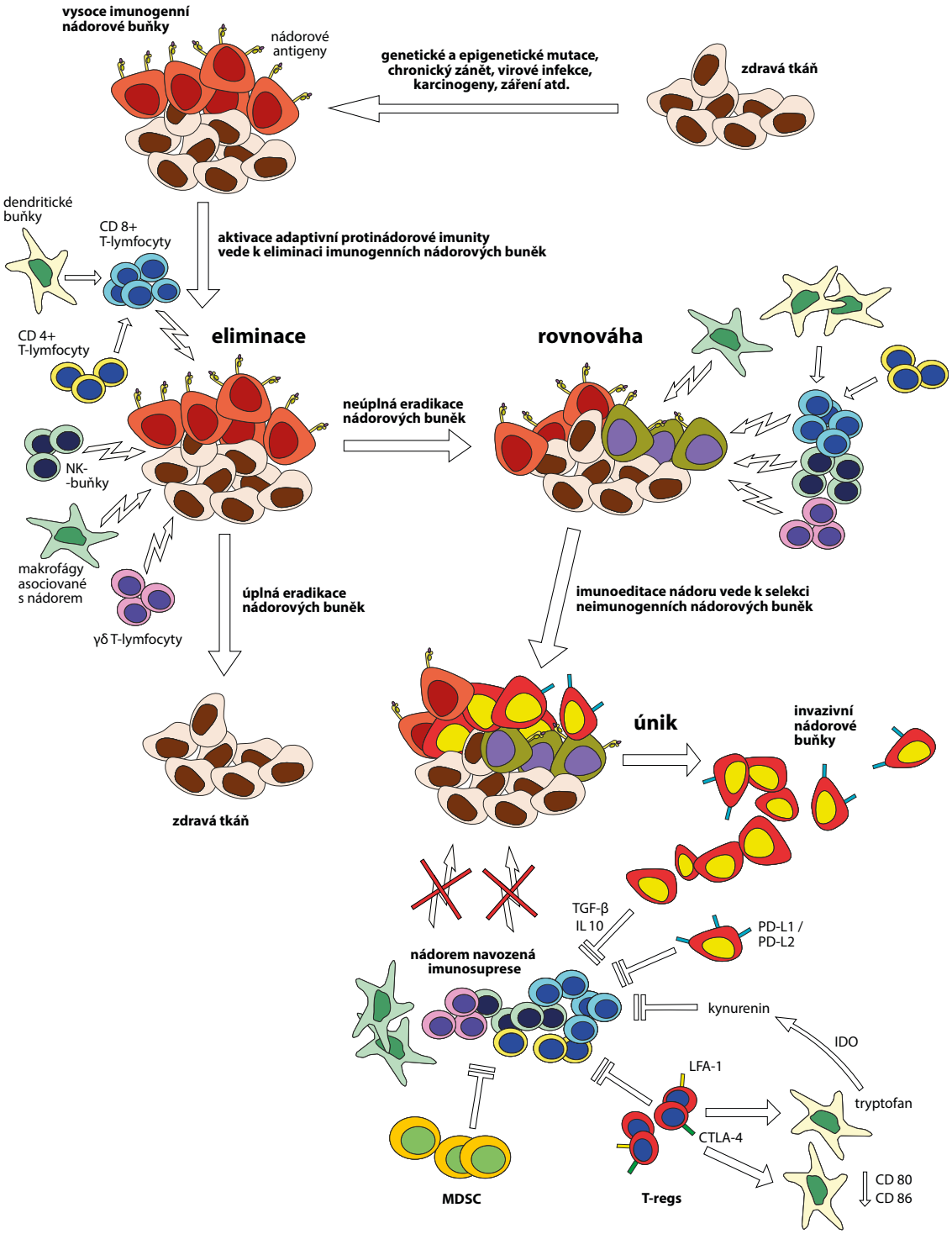
Předpokládá se, že hlavní roli v protinádorové imunitě hrají **cytotoxické T-lymfocyty**. Alogenní transplantace kostní dřeně za použití T-depletovaných štěpů byly spojeny se signifikantně vyšším rizikem relapsu akutní myeloidní leukemie ve srovnání s transplantacemi za použití štěpů, které T-lymfocyty obsahovaly.

Základním dogmatem protinádorové imunity je existence **nádorových antigenů**. První důkazy o jejich existence byly podány v šedesátých letech minulého století, kdy bylo experimentálně prokázáno, že imunizace imunokompetentních myší chemicky indukovanými nádory chrání tyto myši před vznikem stejných typů (chemicky indukovaných) nádorů.

Následné zjištění, že nádory formované v imunokompetentních myších jsou kvalitativně odlišné (neimunogenní) ve srovnání se stejnými typy nádorů formovaných v imunodeficitních myších (imunogenní), vedlo k postulaci hypotézy tzv. **editace nádoru imunitním systémem** (*cancer immunoediting*). Tato hypotéza předpokládá tři vzájemně provázané fáze: eliminaci, ekvilibrium a únik nádoru (obr. 5). V první fázi tzv. **eliminace** dochází k aktivnímu ničení nádorových buněk složkami imunitního systému. V případě, že některé nádorové buňky uniknou imunologickému dohledu, dochází k posunu do druhé (různě dlouhé) fáze – tzv. **ekvilibria** (rovnováhy), kdy imunitní systém aktivně brání růstu a/nebo šíření nádoru, ale již není schopen nádorové buňky zcela eradikovat. Fáze ekvilibria byla experimentálně prokázána u myšek s chemicky indukovanými sarkomy, u kterých byla latence růstu makroskopických nádorů významně zkrácena podáním monoklonálních protilátek eliminujících myší T-lymfocyty (tedy vyřazením specifické imunity). Nádorové buňky izolované z následně formovaných tumorů byly navíc vysoce imunogenní, čímž připomínaly nádory vzniklé v imunodeficitních myškách. V případě selhání ekvilibria dochází k rozvoji třetí fáze – tzv. **úniku nádorových buněk**, a k na něj navazujícímu růstu a šíření nádoru v organismu. K úniku nádorových buněk před imunitním systémem může docházet rozličnými mechanismy, které však lze obecně rozdělit do dvou velkých skupin:

1. mechanismy vycházející z nitra nádorových buněk neboli **intrinzický únik** („kamufláž“), kam patří např. ztráta exprese tumor specifických antigenů; ztráta exprese MHC gp I. třídy už znamená ztrátu molekul, které zajišťují prezentaci nádorového antigenu na povrchu nádorových buněk;
2. mechanismy vycházející z mikroprostředí nádoru neboli **extrinzický únik** („sabotáž“), kam řadíme např. sekreci imunosupresivních cytokinů a molekul (IL10, TGF-β, VEGF, indolamin-2,3-dioxygenáza) či zmnožení populací imunosupresivních leukocytů (např. regulační T-lymfocyty – Tregs), myeloidních imunosupresivních buněk (MDSC), nezralých dendritických buněk (iDC) aj. (viz dále kap. 7 Imunoterapie).

Pochopení významu imunitního systému pro přežití a růst nádoru se odrazilo v nových terapeutických přístupech v léčbě nádorů, ať už se jedná o aplikaci monoklonálních protilátek proti nádorovým antigenům (CD20 u B-lymfomů, HER2 u karcinomu prsu), adoptivní transfer tumor specifických cytotoxických T-lymfocytů (expandovaných *in vitro*, případně geneticky modifikovaných), aktivní imunizaci pomocí nádorových vakcín, či o modulaci nádorového mikroprostředí (např. monoklonální protilátky proti CTLA-4 či PD-1).



Obr. 5 *Imunologický dohled nad nádory a mechanismy jeho selhání – immune escape (volně podle Schreiber et al. Science, 2011; 331: 1565)*

PD-L – programmed death (programová smrt), MDSC – myeloid-derived suppressor cells (myeloidní supresorové buňky), T-regs – regulatory T-cells (regulační T-lymfocyty), CTLA-4 – cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4, IDO – indolamin-2,3--dioxygenáza

1.5 Nádor jako důsledek chronického zánětu či infekce

Zatímco akutní zánět vede k eliminaci patogenu a chrání organismus před poškozením včetně nádorové transformace (v případě celé řady virových infekcí), chronický zánět přispívá ke kancerogenezi na všech jejích úrovních. Podporuje iniciaci nádoru navozením chronického genotoxického stresu, podporuje promoci nádoru následkem stimulace buněčné proliferace a přispívá k progresi nádoru indukcí novotvorby cév a podporou migrace a invazivity. Chronický zánět (tj. imunitní složka nádoru podporující jeho vznik a následný růst) a imunologický dohled (tj. imunitní složka inhibující vznik, růst a šíření nádoru) mohou velmi pravděpodobně koexistovat i v rámci jedné konkrétní nádorové léze a vytvářet provázaný komplex vzájemně protichůdných vztahů.

1.5.1 Fyziologické aspekty zánětlivé reakce

Již v roce 1863 dával Wirchow vznik nádorových onemocnění do souvislosti s probíhajícím zánětem. Na tomto místě je vhodné si stručně připomenout jednotlivé fáze zánětlivé odpovědi.

V návaznosti na poranění či infekci dochází ke komplexní odpovědi organismu, která má za cíl zhojení poškozené či infikované tkáně. Ta zahrnuje především lokální depozici fibrinové zátky a bolusu celé řady bioaktivních molekul následkem degranulace trombocytů, vystupňované koagulace a aktivace komplementu v místě poškozené tkáně či probíhající infekce (leukotrieny, C3a, C5a, trombin, serotonin, heparin, faktor V, fibrinogen, von Willebrandův faktor, PDGF, bFGF, TGF-α, TGF-β aj.). Následkem působení cytokinů a chemoatraktantů dochází k aktivaci žírných buněk a tkáňových makrofágů v místě poškození a k aktivaci a transmigraci leukocytů (neutrofilů, monocytů, eozinofilů) do místa poškození.

Aktivace žírných buněk – např. vazbou meziproduktů aktivace komplementu (C3a C5a) na specifické receptory – má za následek degranulaci histaminu, serinových proteáz, tryptázy, proangiogenních molekul (bFGF), MMP a dalších klíčových molekul v místě zánětu či infekce. Aktivace leukocytů zahrnuje aktivaci selektinů a integrinů, imobilizaci a následnou extravazaci leukocytů do místa zánětu. Vcestovalé neutrofily a makrofágy fagocytují bakterie a produkují kyslíkové a dusíkové radikály (*reactive oxygen species* – ROS, *reactive nitrogen species* – NOS), které mohou působit genotoxicky (mutagenně). Vcestovalé monocyty se mění v tkáňové makrofágy a jsou producenty mnoha klíčových cytokinů, včetně TNF-α, IL1, TGF-β, PDGF, bFGF, IGF-1 a IGF-2. Cytokiny produkované aktivovanými makrofágy mění vlastnosti dalších buněčných typů, včetně endotelových, mezenchymových či epitelových buněk a hlavní měrou ovlivňují výslednou remodelaci hojící se tkáně, včetně její neovaskularizace. Aktivace fibroblastů v místě zánětu vede k akcentaci sekrece extracelulární matrix, která vytváří stroma granulační tkáně. Aktivované fibroblasty následně působí kontraktilně a hlavní měrou se podílejí na uzavření rány a tvorbě jizvy. Posledním krokem při hojení rány je reepitelizace.

1.5.2 Zánět a nádorová onemocnění

Předpokládá se, že až 15 % všech nádorových onemocnění vzniká v místě chronické infekce či zánětu. Delece či mutace *TP53* lze detekovat s vysokou frekvencí u mnoha chronických zánětlivých chorob, jako je revmatoidní artritida či nespecifické záněty střeva. Kolorektální karcinom vzniká často v terénu nespecifických zánětů střev (ulecrózní kolitidy či Crohnovy nemoci), hepatocelulární karcinom vzniká na podkladě chronické hepatitidy B a C, karcinom močového měchýře u schistosomiázy a karcinom či lymfom žaludku na podkladě chronické gastritidy vyvolané *Helicobacter pylori*. Eradikace této bakterie, která je odpovědná za chronickou gastritidu, vede u časných stadií MALT lymfomu žaludku ke spontánní involuci lymfomu (následkem odstranění stimulačního efektu chronicky probíhajícího zánětu) bez nutnosti podávání systémové chemoterapie.

Další důkaz poukazující na význam zánětu v průběhu nádorové transformace pochází z epidemiologických metaanalýz pacientů dlouhodobě užívajících nesteroidní protizánětlivé léky (*non-steroid anti-inflammatory drugs* – NSAID). Prokázalo se, že dlouhodobé užívání NSAID snižuje pravděpodobnost vzniku některých nádorů až o 50 % (kolorektální karcinom, karcinom plic, karcinom žaludku).

Molekulární podstata stimulačního efektu probíhajícího zánětu na proces nádorové transformace či progrese je předmětem intenzivního zkoumání. Bylo prokázáno, že nádorové buňky produkují spektrum cytokinů, chemokinů a růstových faktorů, které působí chemotaxi a aktivaci leukocytů (lymfocytů, monocytů, neutrofilů, eozinofilů, žírných buněk) do místa nádoru. Aktivované makrofágy produkují širokou škálu proangiogenních a lymfangiogenních molekul a mohou

působit imunosupresivně (např. produkcí IL10). Makrofágy také obvykle vylučují cytokiny, které parakrinně působí na nádorové buňky a pozitivně tím ovlivňují jejich přežití, proliferaci a migrační schopnosti (šíření nádoru). Například buňky melanomu mohou pod vlivem cytokinů a růstových faktorů produkovaných aktivovanými makrofágy sekretovat do okolí řadu biomolekul, včetně IL8 a VEGFA, čímž dochází k parakrinní stimulaci angiogeneze. Aktivní působky produkované aktivovanými makrofágy ovlivňují nejen nádorové buňky, ale také „nenádorové" buněčné komponenty mikroprostředí, včetně endotelových buněk, mezenchymových kmenových buněk či T-lymfocytů. Postupně tak v nádorové tkáni dochází ke komplexní remodelaci nádorového stromatu, které se stává zvýšeně permisivní k dalšímu růstu a šíření nádoru. Nádorové stroma plně vyvinutého tumoru může dokonce samo o sobě působit jako induktor či promotor kancerogeneze a podporovat např. transformaci zbylých normálních tkáňových kmenových buněk na buňky nádorové. Uzavírá se bludný kruh komplexních patologických vztahů mezi nádorovými a nenádorovými buňkami.

1.6 Lymfoproliferativní choroby jako důsledek deregulace specifické imunity

Lymfocyty (B-lymocyty a T-lymfocyty) jako jediné buňky v organismu exprimují na svém povrchu vysoce specifické povrchové receptory schopné vázat antigen – tzv. **imunokompetentní receptory: B-buněčný receptor (BCR)** a **T-buněčný receptor (TCR)**. Díky tomu jsou lymfocyty nositeli a vykonavateli tzv. **získané (adaptivní, specifické) imunity.**

Vývoj lymfocytů je poměrně složitý, probíhá v kostní dřeni, primárních lymfatických orgánech – kostní dřeň, thymus, a sekundárních lymfatických orgánech – uzliny, slezina, tonzily, Peyerské pláty střeva a další slizniční lymfatická tkáň – MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*) (obr. 6A, B).

V kostní dřeni dochází k vývoji pro-lymfocytu z krvetvorné kmenové buňky. V průběhu diferenciace lymfoidních progenitorů dochází postupně k vytvoření a následné povrchové expresi BCR a TCR receptorů. Je třeba si uvědomit, že jednotlivé receptory BCR (tj. imunoglobulinové receptory třídy IgM či IgD) a TCR nejsou kódovány jednotlivými geny, ale tzv. moduly označovanými V (*variable*), D (*diversity*) a J (*joining*). V-D-J úseky DNA podléhají během vývoje lymfocytu v kostní dřeni tzv. **rekombinaci**, kdy rozstřižením a následným spojením DNA pomocí enzymů RAG1 a RAG2 (*recombinase activating genes*) vznikají (zcela náhodně) různé výsledné molekuly povrchových imunoreceptorů (obr. 7). Vzhledem k tomu, že se jedná o náhodný proces, může při rekombinaci docházet k vytvoření takových molekul DNA, které nelze přepsat do výsledného proteinu (tzv. neproduktivní rekombinace). Na druhou stranu mohou vznikat takové imunokompetentní receptory, které silně vážou vlastní antigeny (tzv. autoreaktivní klony).

Aby nedocházelo k zahlcení organismu nereaktivními a/nebo autoreaktivními klony, musejí být takové klony eliminovány. Hlavní roli v tomto procesu hraje thymus. Vzhledem k tomu, že imunokompetentní receptory mají klíčový vliv na přežití lymfocytů, jsou nereaktivní klony s neproduktivní rekombinací BCR či TCR odsouzeny k apoptóze. Klony s příliš silnou afinitou k vlastním antigenům (autoreaktivní klony) jsou v thymu likvidovány (tzv. **negativní selekce**), a do organismu se tudíž dostávají pouze lymfocytární klony s funkčním imunokompetentním receptorem, které vykazují slabou afinitu k vlastním tkáňovým antigenům (tzv. **pozitivní selekce**) (viz obr. 6B).

Pozitivní selekce B-buněk a T-buněk je trochu odlišná. Pozitivní selekce T-buněk zaručuje, že dále budou vyzrávat jen ty T-lymfocyty, jejichž receptory rozpoznávají nejen vlastní MHC (u lidí HLA) molekuly, ale že také exprimují příslušné koreceptory (CD8 pro MHC gp I. třídy a CD4 pro MHC gp II. třídy). U B-linie vybírá pozitivní selekce takové buňky, které exprimují BCR. Principy negativní selekce jsou podobné u T- i B-linií – dochází při ní k eliminaci těch buněk, které vážou příliš silné vlastní antigeny.

Slabá signalizace z BCR či TCR do nitra buňky je nezbytná pro přežití lymfocytu v organismu. Tyto lymfocyty se označují jako tzv. **naivní lymfocyty.** Naivní lymfocyty následně recirkulují mezi krví a sekundárními lymfatickými orgány. V sekundárních lymfatických orgánech (např. uzlině) lymfocyty rolují po výběžcích folikulárních dendritických buněk, které vystavují na svých výběžcích nejrůznější exoantigeny, dopravené do uzliny tzv. antigen prezentujícími buňkami (např. monocyty) ze spádové oblasti dané uzliny. V případě, že se imunokompetentní receptor lymfocytu naváže na antigen vystavený např. v lymfatické uzlině, je daný lymfocyt v uzlině zadržen a prodělává další složitý vývoj, na jehož konci stojí zralá **imunokompetentní buňka** – cytotoxický T-lymfocyt nebo plazmatická buňka sekretující imunoglobuliny.

V průběhu diferenciace z naivního lymfocytu do imunokompetentní buňky dochází k několika komplexním dějům, které vysoce inklinují k mutagenezi (a tedy