

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

**TUMORU-PRIDRUŽENI NEUTROFILI: NOVI CILJ U TERAPIJI
TUMORA**

**TUMOR-ASSOCIATED NEUTROPHILS: NEW TARGETS FOR
CANCER THERAPY**

SEMINARSKI RAD

Sanja Gagić

Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Zagreb, 2019.

POPIS KRATICA

8-OhdG – 8-hidroksi-2-deoksigvanozin (engl. *8-hydroxy-2'-deoxyguanosine*)

ADCC – stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima (engl. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*)

ARG1 – arginaza 1 (engl. *arginase 1*)

Bv8 – prokineticin 2

DMBA – 7,12-dimetilbenz[a]antracen (engl. *7,12-dimethylbenz[a]anthracene*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

ECM – izvanstanični matriks (engl. *extracellular matrix*)

FGF – čimbenik rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor*)

GCP-2/CXCL 6 – engl. *granulocyte chemotactic protein 2*

G-CSF – čimbenik rasta kolonija granulocita (engl. *granulocyte - colony stimulating factor*)

GM-CSF – čimbenik rasta kolonija granulocita i makrofaga (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

H₂O₂ – vodikov peroksid

HPRT – hipoksantin fosforiboziltransferaza (engl. *hypoxanthine phosphoribosyltransferase*)

HPV – ljudski papiloma virus (engl. *human papillomavirus*)

ICAM 1 – međustanične adhezijske molekule 1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*)

IFN – interferon (engl. *interferon*)

IL – interleukin (engl. *interleukin*)

IRS-1 – inzulin receptor supstrat 1 (engl. *insulin receptor substrate 1*)

MDSC – mijeloidne supresorske stanice (engl. *myeloid-derived suppressor cells*)

MIP2 α – makrofagni upalni protein 2 α (engl. *macrophage inflammatory protein 2-alpha*)

MMP – matriks metaloproteinaze (engl. *matrix metalloproteinases*)

MPO – mijeloperoksidaza (engl. *myeloperoxidase*)

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *messenger ribonucleic acid*)

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NE – neutrofilna elastaza (engl. *neutrophil elastase*)

NO – dušikov monoksid

PDGFR – receptori trombocitnog čimbenika rasta (engl. *platelet-derived growth factor receptors*)

PI3K – fosfoinozimid 3-kinaza (engl. *phosphoinositide 3-kinase*)

PMN – polimorfonuklearni neutrofili (engl. *polymorphonuclear neutrophils*)

ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

shRNA – engl. *short hairpin RNA*

TAN – tumoru-pridruženi neutrofili (engl. *tumor-associated neutrophils*)

T-bet – T-box transkripcijski čimbenik (engl. *T-box transcription factor*)

TGF – transformirajući čimbenik rasta (engl. *transforming growth factor*)

TIMP – tkivni inhibitor metaloproteinaza (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinases*)

TNF – čimbenik tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor*)

VEGF – čimbenik rasta krvožilnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*)

SADRŽAJ

UVOD	5
NOVAČENJE NEUTROFILA U TUMORE.....	6
DJELOVANJE TUMORU-PRIDRUŽENIH NEUTROFILA PROTIV DOMAĆINA U TUMOROGENEZI	9
MEHANIZMI KOJIMA POLIMORFONUKLEARNI LEUKOCITI POSREDUJU PROGRESIJU TUMORA.....	10
Genotoksične reaktivne kisikove vrste.....	10
Dodatni mehanizmi direktne inhibicije	10
Neutrofilni integrini potpomažu metastaziranje.....	11
Proteinaze polimorfonuklearnih leukocita pomažu u progresiji tumora putem matriks-ovisnih ili neovisnih načina	11
Neutrofilna elastaza (NE).....	11
Matriks metaloproteinaze	12
Regulacija T-stanica i T-stanična supresija inducirana tumor-pridruženim neutrofilima	13
MOGU LI SE NEUTROFILI POLARIZIRATI U CITOTOKSIČNE FENOTIPOVE?	14
NEUTROFILI KAO CILJ U TERAPIJI TUMORA.....	16
LITERATURA.....	19
SAŽETAK.....	20
SUMMARY	20

UVOD

Prisustvo neutrofila u tumorima smatralo se pokazateljem poraza imunskog sustava u borbi s tumorima. Novija istraživanja nepobitno dokazuju kritičnu ulogu neutrofila u tumorogenezi. Neutrofili neizmjenjivo utječu na mikrookoliš tumora lučeći citokine i kemokine koji potiču novačenje i aktivaciju stanica upalnog puta. Također, drugi produkti neutrofila, primjerice reaktivne kisikove vrste i proteinaze utječu na metastaze, proliferaciju stanica tumora i angiogenezu. Broj neutrofila i čimbenici povezani s funkcijom neutrofila koriste se kao dijagnostički parametri. Međureakcija neutrofila i tumora još uvijek nije do kraja razjašnjena ali postoje istraživanja koja osim pro-tumorskog djelovanja neutrofila ukazuju na mogućnost manipulacije njihovim svojstvima u korist domaćina.

Tumorski mikrookoliš sastoji se od mnogih vrsta stanica (imunskih i neimunskih; limfociti, NK-stanice, makrofagi, fibroblasti...). Tu se nalaze i kratkoživući neutrofili koji su upravo zbog tog svojstva smatrani pasivnim promatračima. Prevladavalo je mišljenje da tako kratkoživuće stanice ne mogu utjecati na kroničnu, progresivnu bolest. Pozitivna regulacija kemotaktičnim tvarima koje luče polimorfonuklearni leukociti bi mogla osigurati konstantno obnavljanje tumoru – pridruženih neutrofila koji su u mogućnosti modificirati rast tumora i invazivnost.

Uobičajena uloga neutrofila je obrana od mikroorganizama i sudjelovanje pri zacijeljivanju rana. Invazivni patogeni koji uđu u organizam izazivaju upalnu reakciju u kojoj sudjeluju i neutrofili, obavijajući patogene i eliminirajući ih citotoksičnim spojevima. Neutrofili mogu također izlučivati proteinaze koje mogu dovesti do oštećenja tkiva domaćina (autoimune bolesti). Neutrofili lučenjem citokina i kemokina utječu na novačenje stanica upalnog procesa ali i na nepovoljnu progresiju tumorske bolesti za domaćina.

NOVAČENJE NEUTROFILA U TUMORE

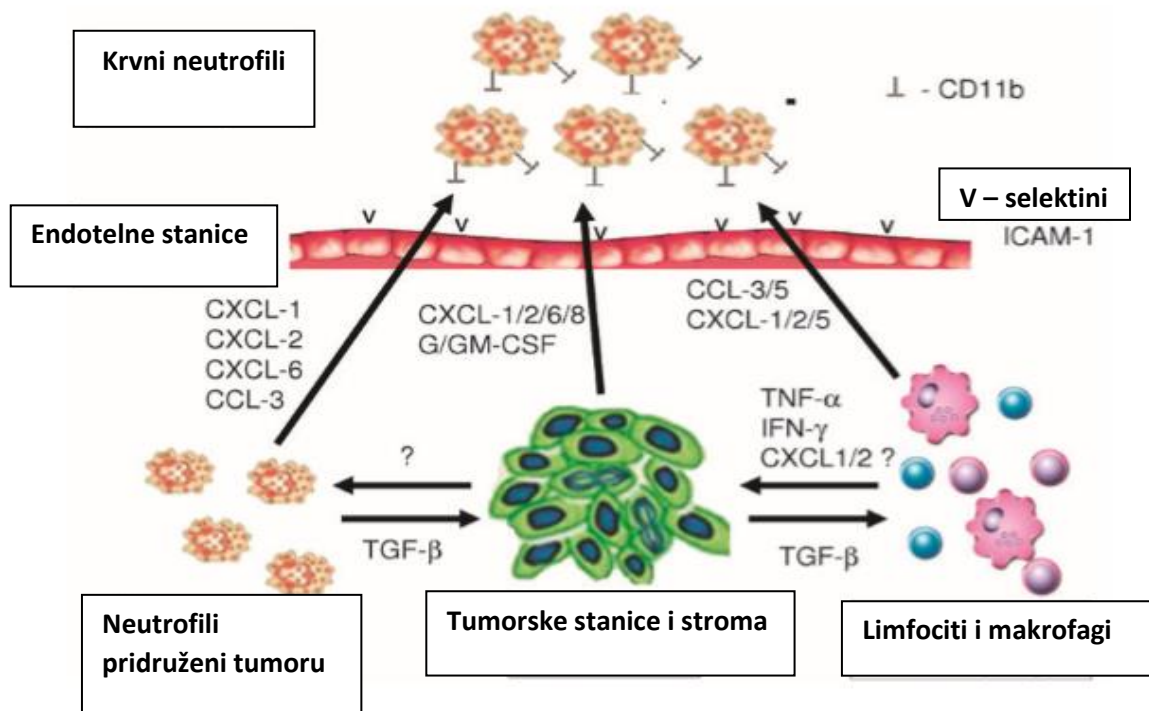
Neutrofili mogu činiti znatnu količinu upalnog staničnog infiltrata u mnogim tipovima tumora i dokazano je da tumorske stanice samostalno potiču novačenje neutrofila u tumore. Neutrofili pridruženi tumoru (engl. *tumor-associated neutrophils*, TAN) u miša nose specifične površinske biljege CD11b i Ly6G. Tumorske stanice induciraju jedinstvene fenotipske promjene u perifernim krvnim monocitima stvarajući mijeloidne supresorske (engl. *Myeloid Derived Suppressor Cells*, MDSC) stanice koje karakterizira CD11b+, CD33+, CD66+ biljeg. Dokazano je da MDSC ulaze u tumore i tamo se diferenciraju u TAN koji se razlikuju epigenetički i funkcionalno od naivnih ili klasično definiranih neutrofila. MDSC i TAN, prepisuju veće količine citokininske i kemokinske glasničke ribonukleinske kiseline (engl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) (međustanične adhezijske molekule 1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1), CXCL-1 i 2, CCL-17) od cirkulirajućih neutrofila.

Neutrofili kao i svi drugi leukociti sele iz krvi u tkiva pod utjecajem specifičnih kemokina (KC/CXCL1 i makrofagni upalni protein 2 α (engl. *macrophage inflammatory protein 2-alpha*, MIP2 α)/CXCL2 u miša), citokina (čimbenik tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor*, TNF) i interferon (engl. *interferon*, IFN)) i staničnih adhezijskih molekula na njihovoj vlastitoj površini (CD11b) i površini endotelnih stanica (selektini, unutarstanične adhezijske molekule 1 i trombocitno-epitelne stanične adhezijske molekule 1). Čimbenici rasta mogu također imati ulogu u kemotaksiji neutrofila u tumor. Za čimbenik rasta kolonija granulocita (engl. *granulocyte - colony stimulating factor*, G-CSF) je dokazano da indirektno potiče ekstravazaciju neutrofila u krvi preko aktiviranja CXCL2 - CXCR2 osi. Čimbenik rasta kolonija granulocita i makrofaga (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) ima antiapoptotički učinak na neutrofile, uzrokujući neutrofiliju. Mnoga novija istraživanja pokazuju da GM-CSF može također biti jak kemoatraktant za neutrofile *in vivo* iako još manjkaju dokazi koji ga specifično povezuju s novačenjem stanica u tumore. Nedavno su autori Ueha *i sur.* (1) pokazali da CXCR2 i CXCR4 kooperativno reguliraju otpuštanje neutrofila iz koštane srži, te da je infiltracija tumora neutrofilima bar djelomično vođena autokrinom produkcijom CXCL2. Fridlander *i sur.* (2) dokazali su da je ekspresija CXCL2 u TAN povećana 188 puta u odnosu na neutrofile koštane srži. Čini se da zbog toga neutrofili iniciraju pozitivnu povratnu spregu izlučivanjem neutrofilnih kemoatraktanata kako bi novačili još više neutrofila u tumor. Još jedan kemokin se pokazao važnim u novačenju neutrofila u melanomske tumore - GCP-2/CXCL 6 (engl. *granulocyte chemotactic protein 2*).

Primjena specifičnih anti – CXCL6 monoklonalnih protutijela dovodi do smanjenog novačenja na mjestu tumora i usporavanja rasta tumora u mišijim modelima.

Blokada receptora transformirajućeg čimbenika rasta β (engl. *transforming growth factor* β , TGF- β) povećava broj neutrofila u tumoru. Ovaj učinak se pojavljuje kroz sva tri dijela procesa novačenja uključujući povećanu ekspresiju mRNA za CXC kemokine, CC kemokine i aktiviranje citokina u tumoru kao i povećanu regulaciju ICAM-1 i proteinske ekspresije na endotelnim stanicama. Zanimljivo, neka istraživanja pokazuju da TGF- β inhibira endotelnu adhezivnost neutrofila i netrofilsku transmigraciju kroz endotel *in vitro* i u različitim upalnim stadijima bolesti.

Iako je poznato da smanjenje brojnosti CD8+ T-stanica smanjuje tkivni utok neutrofila u infektivnim bolestima, samo par istraživanja ispituje utjecaj CD8+ T-stanica na novačenje neutrofila u tumorima. U jednom istraživanju je pokazana korelacija između smanjenja brojnosti TAN i potrošnje CD8+ T-stanica na modelu tumora u kojem su stanice transducirane da izražavaju G-CSF. Mehanizam kojim T-stanice privlače i/ili aktiviraju neutrofile još uvijek nije poznat, ali uključuje sposobnost tumor-stimuliranih aktiviranih T-stanica da proizvode GM-CSF, KC/CXCL1 i MIP2 α /CXCL2 ili citokine kao što su TNF- α i IFN- γ . Ovi citokini mogu služiti novačenju neutrofila stimulirajući tumorske makrofage ili endotelne stanice da proizvode prikladne kemokine i stanične adhezijske molekule. Richards *i sur.* (3) su pokazali da T-regulatorne stanice mogu igrati ulogu u inhibiranju novačenja neutrofila na mjestu tumorske inokulacije. Ovaj učinak je postignut smanjenom ekspresijom neutrofilskih kemoatraktanata CXCL1 i CXCL2. Suprotno navedenom, prema radu Himmel *i sur.* (4) ljudske regulatorne T-stanice mogu zapravo promovirati novačenje neutrofila sekrecijom interleukin-8 (engl. *interleukin-8*, IL-8). U ljudi IL-8/CXCL8 je jaki neutrofilski kemoatraktant koji veže CXCR1 i CXCR2. Ekspimiran je u brojnim tipovima karcinoma uključujući leukemiju, karcinom dojke, karcinom cerviksa, melanom... Melanom čije su stanice transducirane s IL-8 je pokazivao povećanu TAN infiltraciju. Suprotno tomu, u IL-8 „knockdown“ linijama raka dojke (stanice s nedostatkom IL-8) došlo je do redukcije infiltracije neutrofila. Pojednostavljena shema čimbenika koji utječu na novačenje neutrofila prikazana je na Slici 1.



Slika 1. Pojednostavljeni shematski prikaz stanica i čimbenika koji utječu na novačenje neutrofila u tumore. (Preuzeto i prilagođeno iz Fridlender *i sur.* 2012.)

DJELOVANJE TUMORU-PRIDRUŽENIH NEUTROFILA PROTIV DOMAĆINA U TUMOROGENEZI

Istraživanja koja su primjenila uništavanje neutrofila koristeći Gr-1 protutijela pokazuju da dolazi do inhibicije rasta tumora, broja metastaza i redukcije novačenja epitelnih stanica u tumore što dokazuje da neutrofili djeluju protiv domaćina u tumorogenezi. Drugi istraživači su uspjeli inhibirati nakupljanje neutrofila u tumorskom mikrokolišu blokiranjem receptora za IL-8, CXCR-1 i 2 što vodi smanjenju tumora i njihovog napredovanje, bez jasnih mehanizama. CXCR 1 i 2 su smješteni na tumorskim stanicama (autokrini rast), endotelnim stanicama (angiogeneza) i neutrofilima (novačenje). Zbog toga relativni doprinos polimorfonuklearnih neutrofila (engl. *polymorphonuclear neutrophils*, PMN) IL-8 posredovanom rastu tumora zahtijeva više sofisticiranih istraživanja kako bi se specifično uklonili CXCR-2 s neutrofila.

Temeljem anti i pro-tumorogenih značajki TAN, dijelimo ih u dvije podklase; N1 i N2. Eksperimenti u mišijem karcinomu pluća pokazuju da intratumorski neutrofili inicijalno pokazuju anti-tumorski fenotip N1 a kako tumor napreduje TAN naseljavanjem tumorskog tkiva preuzimaju N2 fenotip. N1 TAN izazivaju upalu lučeći citokine (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12) i reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS) koje uzrokuju oštećenje tkiva. Kako god, ove funkcije su potisnute kako tumor napreduje i N2 fenotip postaje dominantan.

Klinička istraživanja ukazuju da prisustvo neutrofila označava lošu prognozu; npr. kvantifikacija TAN u pacijenata sa bubrežnim karcinomom pokazala je da što je više neutrofila veća je smrtnost. Drugi primjer; povećane razine PMN u bronhoalveolarnom prostoru ljudi sa bronhoalveolarnim karcinomom označavaju loš ishod. Zamjetno IL-8 razine su povezane sa PMN akumulacijom i smanjenim preživljavanjem pacijenata i to ima važne terapijske mogućnosti koje su dalje objašnjene.

MEHANIZMI KOJIMA POLIMORFONUKLEARNI LEUKOCITI POSREDUJU PROGRESIJU TUMORA

Neutrofili imaju ograničen broj načina kojima mogu djelovati, pozitivno ili negativno, na rast tumora kroz mehanizme koji uključuju citokine i/ili kemokine, reaktivne kisikove vrste i matriks-razarajuće proteinaze. TAN stanice koristeći navedene spojeve djeluju na imunosno nadziranje tumora, metastaziranje, angiogenezu i staničnu proliferaciju.

Genotoksične reaktivne kisikove vrste

Tumoricidna uloga neutrofila pripisuje se reaktivnim kisikovim vrstama. Fagolizosomi neutrofila sadrže nekoliko enzima (npr. nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) – oksidazu) sposobnih reducirati molekularni kisik u superoksidne radikale (O_2^-). Dodatno, superoksidni radikali mogu biti pretvoreni u vodikov peroksid (H_2O_2) koji potom može biti pretvoren u hipoklornu kiselinu (HOCl) posredstvom neutrofil-specifičnih enzima mijeloperoksidaza (engl. *myeloperoxidase*, MPO). Iako su se razvili da unište bakterijsku membranu (tj. naprave smetnju u njoj) kao dio obrane domaćina, ROS mogu također nespecifično djelovati na tkivo samog domaćina.

U slučaju karcinoma ROS u zajedništvu s infiltriranim neutrofilima izražavaju genotoksične učinke utječući na deoksiribonukleinsku kiselinu (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) tumora i citotoksične učinke koji vode ka regresiji tumora. Na primjer; u *in vitro* pokusima s plućnim epitelnim stanicama A549 dokazano je da je HOCl mutagen koji pri fiziološkim koncentracijama generira značajnu pojavu mutacija u hipoksantin fosforiboziltransferazi (engl. *hypoxanthine phosphoribosyltransferase*, HPRT). Također su uočene dodatne točkaste mutacije, pucanje lanaca DNA i 8-hidroksi-2-deoksigvanozin (engl. *8-hydroxy-2'-deoxyguanosine*, 8-OHG) premaligne lezije u kokulturi neutrofila s velikom raznolikošću ciljanih stanica. Sasvim suprotno, HOCl djeluje na tumorske stanice citotoksično direktnim razaranjem membrane što je dokaz dvojake i kontradiktorne uloge ROS-a u slučaju tumorskih bolesti.

Dodatni mehanizmi direktne inhibicije

Još dva mehanizma kojima su neutrofili sposobni izravno inhibirati tumorske stanice su Fas-ligand združena apoptoza (povezana s povećanim postotkom N1 TAN i Fas pozitivnih stanica) te stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima (engl. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) kao dio mehanizma vezanja monoklonalnih protutijela panitumubab i zalutumubab na receptor epidermalnog čimbenika rasta.

Neutrofilni integrini potpomažu metastaziranje

Neutrofilni, kao i druge upalne stanice sposobne razarati membrane, dugo se smatraju medijatorima tumorske invazije i formiranja udaljenih metastaza. Prije dva desetljeća je dokazano da neutrofilni enzimi za razgradnju bazalne membrane kao što su kolagenaza – IV i heparanaza pomažu rasprostanjivanje tumorskih stanica, točnije sudjeluju u procesu metastaziranja. Nedavno su Huh i sur. (5) dokazali da je broj metastaza melanoma u plućima povećan prisutnošću PMN u alveolarnim kapilarama. Stanice melanoma izlučuju IL-8 koji inducira adheziju PMN na krvožilni endotel i pojačanu ekspresiju $\beta 2$ integrina (CD11b/CD18). Stanice melanoma tada koriste svoje ICAM-1 molekule da se vežu na PMN i pobjegnu iz cirkulacije, prijeđu krvožilni endotel i emigriraju u plućno tkivo. Slični rezultati zabilježeni su i u modelima karcinoma dojke.

Dok su u cirkulaciji neutrofilni utječu na preživljavanje tumora potičući međustanično povezivanje i nakupljanje (engl. *cell-to-cell aggregation*) i na taj način zaštićuju membrane tumorskih stanica od imunskog odgovora. Animalni modeli ukazuju da injekcija staničnih nakupina tumorskih stanica rezultira u više metastaza nego injektiranje raspršenih tumorskih stanica. Nakupina tumorskih stanica smanjuju površinu membrana tumorskih stanica koje su izložene djelovanju imunskog sustava. U cirkulacijskoj fazi TAN se nakupljaju oko tumorskih stanica kako bi ih zaštitili od imunskih odgovora.

Proteinaze polimorfonuklearnih leukocita pomažu u progresiji tumora putem matriks-ovisnih ili neovisnih načina

Granule tumoru-pridruženih neutrofila sadrže serinske proteaze, neutrofilne elastaze, matriks metaloproteinaze i katepsin G. Svi navedeni enzimi igraju ulogu u pospješavanju tumorske proliferacije i metastaziranja. Kada su izlučene, neutrofilne proteinaze mogu obraditi i razgraditi širok spektar citokina, kemokina i njihovih receptora, uz dodatak njihove dobro opisane sposobnosti da preoblikuju izvanstanični matriks. Na ovaj način proteinaze mogu imati jak učinak na proliferaciju tumora, gustoću tkiva i metastatski potencijal. Karakteristike proteinaza navedene su u daljnjem tekstu.

Neutrofilna elastaza (NE)

Čini oko 2% suhe težine neutrofila i smatra se velikim efektorom njihove funkcije. Glavna fiziološka uloga NE je uklanjanje invazivnih mikroorganizama. Pokazuje širok opus supstrata što uključuje citokine i citokinske receptore, integrine, zapravo gotovo sve

komponente izvanstaničnog matriksa (engl. *extracellular matrix*, ECM) uključujući i uglavnom inertna elastična vlakna. *In vitro* istraživanja pokazuju da NE izražava različite učinke na tumorske stanice, ovisno o koncentraciji. Gregory i sur. (6) su pokazali da obrada sa skromnom količinom NE vodi prema proliferaciji A549 plućnih epitelnih tumorskih stanica, dok su više doze dovodile do stanične smrti. Eksperimenti kolokalizacije su zabilježili da NE ulazi u tumorske stanice putem klatrin-prekrivenih pora i putuje ranim endosomima. Kada uđe u ciljnu stanicu NE ima veliki raspon potencijalnih supstrata na raspolaganju među endosomskim i endosom-pridruženim proteinima. Među ovim potencijalnim supstratima Gregory i sur. (6) su otkrili inzulin receptor supstrat-1 (engl. *insulin receptor substrate 1*, IRS-1) kao metu za NE-provedenu razgradnju. IRS-1 je poznati vezajući partner p85 regulatorne podjedinice fosfoinozitida 3-kinaze (engl. *phosphoinositide 3-kinase*, PI3K). Zbog IRS-1 razgradnje količina dostupnih p85 je povećana i slobodna da povezuje s više potencijalnih čimbenika rasta, najvjerojatnije receptora trombocitnog čimbenika rasta (engl. *platelet-derived growth factor receptors*, PDGFR). Ova hiperaktivnost PI3K vodi ka nekontroliranoj proliferaciji tumora.

Matriks metaloproteinaze

Angiogeneza je ključna za kontinuirani rast tumora. Jednom kad tumor dosegne 2-3 mm² površine nove krvne žile su potrebne kako bi pružile dovoljno nutrijenata i kisika bez kojih se tumor ne može dalje razvijati. TAN potiču angiogenezu putem sekrecije proangiogenih čimbenika i posljedično povećana infiltracija TAN povezana je s povećanim intenzitetom angiogeneze.

Metaloproteinaze matriksa (engl. *matrix metalloproteinases*, MMP) su enzimi koji dijele široku specifičnost, zajedničke strukturalne domene i inhibirani su tkivnim inhibitorima metaloproteinaza (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinases*, TIMP)

Matriks metaloproteinaza 9 jedan je od ključnih čimbenika koji sudjeluju u neutrofilima posredovanoj angiogenezi. Ekspimirana je u mnogim staničnim tipovima u tumorskom mikrookolišu uključujući hematopoetske stanice i fibroblaste. U neutrofilima MMP-9 je smještena u sekundarne granule i zanimljivo; neutrofilna MMP-9 nema pridružen TIMP što je čini sklonijom aktivaciji. MMP-9 posredovano razaranje ECM oslobađa vezane angiogenetske čimbenike; čimbenik rasta krvožilnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) i čimbenik rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor*, FGF) iz ECM-a. Doprinos MMP-9 tumorskoj proliferaciji bio je prvi put opisan od strane Coussens i

sur. (7) koji su zapazili da miševi bez MMP-9 izražavaju reduciranu hiperproliferaciju keratinocita u ljudskom papiloma virusu (engl. *human papillomavirus*, HPV-16) epidermalnom modelu tumora. Uklanjanje neutrofila Gr-1 antitijelima dovodi do redukcije u displaziji pankreatičnih otoka u RIP1-Tag2 tumoru gušterače na modelu miša. Prateća redukcija u bioaktivnom VEGF-u i angiogenetske lezije također su zabilježene nakon ove obrade. Ovo istraživanje, (Gregory i sur. (6)) predlaže da su neutrofilili bili jedini proizvođači MMP-9 zato što je korišteno antitijelo specifično za neutrofile što dokazuje da su TAN izvor bioaktivnog MMP-9 u tumorskom mikrookolišu.

Opis povećanog tumora kože u miševa kojima nedostaje MMP-8 bio je prvi zabilježeni slučaj djelovanja MMP povoljnog za domaćina. Točan mehanizam kojim MMP-8 usporava rast tumora ostaje nepoznat. Npr. samo su miševi muškog spola bili zaštićeni od 7,12 – dimetilbenz(a)antracenom (engl. *7,12-dimethylbenz[a]anthracene*, DMBA) – inducirano raka kože. Miševi s nedostatkom MMP-8 su izražavali povišenu razinu neutrofila što potiče rast tumora u tom modelu iako točni načini na koje MMP-8 utječe na novačenje upalnih stanica još nije opisan. MMP-8 ima zaštitni učinak u Lewisovom karcinomu pluća potvrđujući za domaćina dobru prirodu enzima.

Regulacija T-stanica i T-stanična supresija inducirana tumor-pridruženim neutrofilima

Kako bi preživjeli, tumori moraju moći izbjeći imunodne odgovore posredovane T-staničnom aktivnošću. Jedan od mehanizama kojim ovo postižu je privlačeći infiltrirajuće imunodne stanice koje posreduju u imunosupresijskoj aktivnosti. Neutrofilili izolirani iz gušterače miševa nositelja tumora su inhibirali stvaranje efektorskih CD8+ T stanica. Neutrofilili su glavni proizvođači arginaze 1 (engl. *arginase 1*, ARG1) za koju je dokazano da je važan čimbenik u imunosupresiji imunodnih stanica povezanoj s nazočnošću tumora. U stanicama raka pluća, tumorski mikrookoliš potiče oslobađanje ARG1 iz neutrofilskih granula. Mijeloidne stanice izolirane iz mišijeg plućnog adenokarcinoma izražavaju visoku razinu ARG1 koja narušava funkciju T-stanica inhibirajući ekspresiju ζ-lanca CD3 nakon TCR-signalom izazvane internalizacije. Ekspresija reduciranih ζ-lanaca i reducirana citokinska produkcija T-stanica u pacijenata s metastazama adenokarcinoma gušterače, kolona i dojki povezana je s prisutnošću aktiviranih cirkulirajućih granulocita. Povećana proizvodnja H₂O₂ u granulocitima također narušava aktivnost stanica T i vodi supresiji T-stanica. Neutrofilima-posredovana supresija stanica T posljedično vodi smanjenom citotoksičnom učinku stanica T na tumor te osiguravajući preživljavanjnje i progresiju stanica tumora.

MOGU LI SE NEUTROFILI POLARIZIRATI U CITOTOKSIČNE FENOTIPOVE?

Usprkos protumorskim funkcijama istaknutim u gornjem tekstu, nekoliko istraživanja je ukazalo na antitumorsku ulogu neutrofila. Većina ovih istraživanja je koristila tumorske stanične linije modificirane da izlučuju prevelike razine citokina. Pretpostavlja se da neutrofilima možda izražavaju direktnu citotoksičnost prema tumorskim stanicama *in vitro* zbog toga što u prisutnosti antitumorskih protutijela neutrofilima mogu lizirati tumorske stanice putem stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima. Zbog toga u umjetnim sustavima u kojima su neutrofilima potencijalno aktivirani (npr. visokim količinama G-CSF ili protutijelo/FcR međureakcijom) neutrofilima mogu biti posrednici antitumorske imunosti. Nema dostatno dokaza o antitumorskoj ulozi neutrofila posredovanom proteinazama ili fagocitozom pri normalnim fiziološkim uvjetima *in vivo*. TAN su u suštini hiperaktivni u usporedbi s naivnim cirkulirajućim PMN, ali ovi „umjereno“ aktivirani PMN su tumor-promovirajući.

Iako malo podataka podupire tezu antitumorske citotoksičnosti neutrofila u tumorskom mikrokolišu bez imunostimulacije, nedavni podaci pokazuju da makrofagna (M1/M2) i T-stanična (Th1/Th2) polarizacija može također biti inducirana i u neutrofilima. Istraživanja Friedlander i *sur.* (2) pokazuje da neutrofilima mogu eksprimirati jedinstvena polarizacijska stanja koja reguliraju njihov učinak unutar tumorskog mikrokoliša. U ovom istraživanju inhibicija TGF- β u dva različita modela karcinoma u miša dovela je do spoznaje o prisutnosti jedinstvene populacije antitumorskih neutrofila koji su bili hipersegmentirani, proizvodili visoke razine protuupalnih citokina i bili citotoksični za tumorske stanice. Nestajanje antitumorskih neutrofila vodi ka inhibiciji T CD8⁺ aktivacije i povećanju tumora. Još jedan zaključak izveden iz ovog istraživanja je da antitumorske N1 stanice koje nastaju u nedostatku TGF- β proizvode više razine TNF- α , MIP1 α , H₂O₂ i dušikovog monoksida (NO) i citotoksičnije su prema tumorskim stanicama *in vitro* i *in vivo*. Međutim Gregory i *sur.* (6) smatraju da povećana proizvodnja citotoksičnih produkata sama po sebi ne predstavlja prebacivanje na jedinstven transkripcijski program, već jednostavno koriste različite razine aktivacije kao odgovor na različite podražaje, proizvodeći iste produkte u većim dozama za razliku od ireverzibilnih transkripcijskih promjena i ekspresije transkripcijskih čimbenika; T-box transkripcijski čimbenik (engl. *T-box transcription factor*, T-bet) (Th1) i GATA3 (Th2).

Podržavajući ideju da funkcija neutrofila može biti mjenjana *in vivo*, druga istraživanja navode sposobnost IFN- β da „naredi“ neutrofilima izražavanje antitumorskog fenotipa. Miševi s nedostatkom IFN- β pokazali su bržerastuće i više vaskularizirane tumore od kontrolnih miševa divljeg tipa. Ova razlika bila je dokinuta uklanjanjem neutrofila pomoću

protutijela. U ovom istraživanju tumor-infiltrirajući neutrofili dobiveni iz miševa bez IFN- β pokazivali su više razine proangiogeničnih čimbenika VEGF, MMP-9 i CXCR4. Izražaj ovih gena bio je reverzibilan obradom neutrofila *ex vivo* sa IFN- β i vratio izražaj ovih čimbenika na kontrolnu razinu. Slični podaci dobiveni su inhibicijom TGF- β tako da ireverzibilna polarizacija nije u potpunosti sigurna. Nadalje, proizvodnja visokoaktivnih i citotoksičnih neutrofila bez specifičnosti predstavlja veliku opasnost tkivu domaćina. Slično tome, aktivirani neutrofili, kao oni nađeni u sepsama često rezultiraju prekomjernim oštećenjem tkiva domaćina sa kobnim posljedicama, uključujući smrt, u obliku akutnih ozljeda u plućima i septičkog šoka.

NEUTROFILI KAO CILJ U TERAPIJI TUMORA

Kliničke opažanja i laboratorijska istraživanja pokazala su poveznicu između povećanog broja intratumorskih neutrofila i loše prognoze. Ova opažanja zabilježena su kod: melanoma, renalnog karcinoma, bronhoalveolarnog karcinoma, pankreatičnog adenokarcinoma, hepatocelularnog karcinoma, planocelularnog karcinoma glave i vrata itd.

Grupa Carus i *sur.* (8) iskoristila je TAN peritumorski izražaj CD66+ u odnosu na omjer stanica CD8+ kao prognostički indikator u izoliranom cervikalnom planocelularnom karcinomu, pokazujući da omjer $< 0,065$ vodi do petogodišnjeg povlačenja bolesti u 92% slučajeva. Kvantifikacije količine CD66+ i CD8+ stanica kao i lokalne razine IL-8 i MMP pokazale su se korisnima u kvantifikaciji TAN posredovane prognostičke informacije.

Iako brojni dokazi ukazuju na štetnu ulogu neutrofila u napredovanju tumora, neutrofilni kao terapijski cilj u terapiji tumora vode brojnim poteškoćama obzirom da su kritični medijatori obrane domaćia protiv infekcije i nestanak ovih stanica može rezultirati opasnom imunosupresijom. Autori Gregory i *sur.* (6) iznose 2 moguća pristupa:

1. Ciljanje CXCL-8/CXCR-1/CXCR-2 osovine i posljedično potpuno uklanjanje TAN iz tijela
2. Ciljanje specifičnih PMN-proizvedenih spojeva koje promoviraju rast tumora

Kao dokaz ovog pristupa, IL-8 antagonisti su uspješno iskorišteni u predkliničkim modelima kako bi se smanjio tumorski rast. Predklinički testovi s primjenom antagonista IL-8 pokazali su smanjeni rast tumora, angiogenezu i metastaze. Drugo istraživanje pokazalo je povećanje apoptoze, smanjenje angiogeneze i smanjenje broja metastaza koristeći antagonist za CXCR1/2 važan u signalizaciji TAN. Kolorektalni karcinom izražava CXCR1/2 receptore u većoj mjeri te je ovaj pristup potencijalni terapijski cilj. Blokiranje sinteze IL-8 ovisnih tumorskih ICAM-1 neutrofilskih integrina potencijalni je terapijski cilj za prevenciju metastaze u uvjetima reducirane ekstrasvazacije. Dokazano je da smanjena regulacija izražaja ICAM-1 u modelu mišijeg tumora putem shRNA (engl. *short hairpin RNA*) reducira invaziju kolorektalnog adenokarcinoma preko 45%.

Anti-VEGF terapija se koristi u pacijenata da bi blokirala angiogenezu i ograničila rast tumora. Terapija je osrednje učinkovita u klinici iako nove anti-VEGF terapije i protokoli stalno se pojavljuju. Neutrofilni su razlog tumorske otpornosti na anti-VEGF terapiju; akumulacija CD11b+Gr-1+ stanica i neutrofila (CD11b+Ly6G+) čini tumore otpornima na terapiju na što ukazuje i obrada miševa sa G-CSF te posljedični porast CD11b Gr-1 stanica koje reduciraju

tumorski odgovor na anti-VEGF obradu. Obrnuto, inhibicija mobilizacije neutrofila je povećala učinke anti-VEGF terapije. Kombinacija anti-VEGF i anti-G-CSF ili anti-prokineticin 2 (Bv8) terapije reducira broj CD11b+Gr-1+ stanica, angiogenezu i primarni rast tumora. Zbog toga, ciljanje G-CSF ili/i neutrofila u kombinaciji s anti-angiogenetskom terapijom može biti više učinkovit pristup.

Bolji učinak od ciljanja neutrofila je inhibiranje specifičnih neutrofil-proizvedenih enzima za koje znamo da potiču rast tumora i invazivnost. Istraživanja u laboratoriju grupe Gregory i *sur.* (6) pokazala su da obrada LsL-K-ras tumorskog modela u miša sa sintetskim NE inhibitorom ONO-5046 je smanjila rast tumora trostruko. Iako je poznato da je NE bitan medijator ubijanja bakterija neutrofilima. Istraživanje primjene inhibitora NE u ljudskoj akutnoj ozljedi pluća nije pokazalo jasan učinak na organizam. Zoledronska kiselina, je jak inhibitor MMP, blokira izražaj i aktivnost MMP-9 reducirajući angiogenezu i rast cervikalnog karcinoma.

Ciljanje tumorskih čimbenika koji novače neutrofilne stanice može također učiniti tumore osjetljivima na iscrpljujuću kemoterapiju. Tako primjerice primjena kombinacije CXCR-2 antagonista i kemoterapije je reducirala angiogenezu i tumorski rast u predkliničkim istraživanjima.

Primijena stimulacije anti-tumorskog fenotipa TAN pomoću IFN- β potiče citotoksični fenotip neutrofila u modelima melanoma i fibrosarkoma. U miševa kojima nedostaje IFN- β , neutrofilni su potakli tumorski rast. Ovaj fenotip je reverzibilan obradom neutrofila s IFN- β *ex vivo* što je obećavajući pristup. Međutim učinkovitost ovog oblika liječenja postiže se ravnotežom između inhibicije nekih čimbenika, a povećanja izražaja drugih. Višefunkcionalni lijekovi čiji je cilj više različitih čimbenika suočavaju se s brojnim razvojnim problemima, posebice dostave, učinkovitosti i toksičnosti.

Važno upozorenje je da primjena anti-neutrofilne terapije može voditi reduciranoj učinkovitosti drugih oblika terapije. Primjerice, u mišijem modelu raka prostate inhibicija tumorskog rasta genskom terapijom s IL-2 je bila smanjena učinkovitosti nakon nestanka neutrofila. Također nestanak neutrofila može smanjiti terapijske učinke alemtuzumab-a u modelu B stanica kronične limfocitne leukemije. Autori su našli da je zaštitna aktivnost alemtuzumab *in vivo* bila primarno ovisna o staničnoj citotoksičnosti ovisnoj o protutijelima posredovanoj neutrofilima. Slično tomu, rituximab, koji je također korišten pri terapiji leukemija i limfoma, je bio manje učinkovit nakon nestanka neutrofila u modelu B staničnog

limfoma. Neutropenija i osjetljivost na infekcije su druge moguće komplikacije koje nastaju kao rezultat nestanka neutrofila. Konačno, generacija visoko aktivnih, citotoksičnih neutrofila bez tumor-ciljane specifičnosti bi mogla rezultirati znatnim oštećenjem tkiva domaćina i voditi prema septičkom šoku.

LITERATURA

1. Ueha S, Shand FH, Matsushima K, 2011. Myeloid cell population dynamics in healthy and tumor-bearing mice. *International Immunopharmacology* **11**, 783–788.
2. Fridlender Z, Albeda S, 2012. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* **33**, 949-955.
3. Richards H, Williams A, Jones E, Hindley J, Godkin A, Simon A, Gallimore A, 2010. Novel role of regulatory T cells in limiting early neutrophil responses in skin. *Immunology* **131**, 583–592.
4. Himmel ME, Crome SQ, Ivison S, Piccirillo C, Steiner TS, Levings MK, 2011 Human CD4+ FOXP3+ regulatory T cells produce CXCL8 and recruit neutrophils. *European Journal of Immunology* **41**, 306–312.
5. Huh SJ, Liang S, Sharma A, Dong C, Robertson GP, 2010. Transiently entrapped circulating tumor cells interact with neutrophils to facilitate lung metastasis development. *Cancer Research* **70**, 6071–6082.
6. Gregory A, McGarry Houghton A, 2011. Tumor-Associated Neutrophils: New Targets for Cancer Therapy. *Cancer Research* **71**, 2411-2416.
7. Coussens LM, Werb Z, 2002. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860–867.
8. Carus A, Ladekarl M, Hager H, Pilegaard H, Nielsen PS, 2013. Tumor-associated neutrophils and macrophages in non-small cell lung cancer: No immediate impact on patient outcome. *Lung Cancer* **81**, 130–137.
9. Eruslanov E, Albelda S, Singhal S, 2014. Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *The Journal of Clinical Investigation* **214**, 5466-5480
10. Hurt B, Schulick R, Barish E, El Kasmi K, Barnett Jr. C, 2017. Cancer-promoting mechanisms of tumor-associated neutrophils. *The American Journal of Surgery* **214**, 938-944.
11. Shen M, Hu P, Donskov F, Wang G, Liu Q, Du J, 2014. Tumor-Associated Neutrophils as a New Prognostic Factor in Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* **9**(6). doi: 10.1371/journal.pone.0098259
12. Swierczak A, Mouchemore K, Hamilton J, Anderson R, 2015. Neutrophils: important contributors to tumor progression and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* **34**, 735-751.

SAŽETAK

Na tumorsku progresiju utječu brojni tipovi imunskih stanica domaćina, a važna uloga neutrofila nije još potpuno jasna. Iako rana istraživanja pokazuju da neutrofilima mogu ispoljavati citotoksičnost prema tumorskim stanicama preko regulacije citotoksičnih stanica T, noviji radovi pokazuju da neutrofilima promoviraju progresiju tumora razaranjem matriksa i pojačanom angiogenezom potiču proliferaciju tumorskih stanica i metastaziranje. Neka istraživanja pokazuju da neutrofilima mogu biti modificirani ili „polarizirani“ tako da postanu više citotoksični prema tumorskim stanicama. Međutim, visoko aktivni neutrofilima mogu predstavljati opasnost i za tkivo domaćina. Stoga novi pristup u terapiji temelji se na inhibiranju navačenja neutrofila ili neutrofil-izlučenih tvari za koje se zna da potiču rast tumora. Smatra se da je takav pristup učinkovitiji i bez opasnosti za domaćina.

SUMMARY

Tumor progression is modified with a wide range of immune cell types and important role of neutrophils is yet to be characterised. Although earlier studies indicated that neutrophils can express cytotoxicity towards tumor cells with their regulation of cytotoxic T-cells, recent studies have shown that neutrophils promote tumor progression via matrix degradation, and increased angiogenesis which enhances proliferation of tumor cells and metastasis. Some experiments have shown that neutrophils can be modified or polarised to become more cytotoxic towards tumor cells. However, highly activated neutrophils can also pose danger to host tissue. Therefore a new approach in therapy is based on inhibiting neutrophil recruitment or neutrophil-secreted substances which are known to promote tumor growth. It is considered that such approach is more effective and without danger for the host.