

# Imunosni odgovor tijela na tumorske stanice

---

Krstulović, Anja

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:828675>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

---

# IMUNOSNI ODGOVOR TIJELA NA TUMORSKE STANICE IMMUNE RESPONSE TO CANCER CELLS

---

Završni seminar

Studentica: Anja Krstulović  
Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate study of Molecular Biology)  
MENTOR: Petra Korać, izv. prof. dr. sc.

Zagreb, 2021.

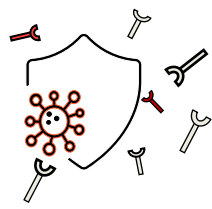
Ovaj rad je izrađen na Biološkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom Petre Korać, izv. prof. dr. sc.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	4
2. IMUNOSNI SUSTAV .....	4
2.1. SASTAVNICE IMUNOSNOG SUSTAVA.....	4
2.1.1. Primarni limfni organi.....	4
2.1.2. Sekundarni limfni organi .....	5
2.2. IMUNOST.....	6
2.2.1. Nespecifična imunost .....	6
2.2.2. Specifična imunost .....	8
2.2.3. Posredničke tvari.....	9
3. RAZVOJ TUMORA.....	10
3.1. OBILJEŽJA TUMORSKIH STANICA I NJIHOVA OKOLIŠA .....	11
4. STANIČNI MIKROOKOLIŠ TUMORA .....	15
4.1. SASTAVNICE TUMORSKOG MIKROOKOLIŠA .....	16
4.2. INTERAKCIJE TUMORA I IMUNOSNOG SUSTAVA.....	20
4.2.1. Imunosno uređivanje tumora .....	20
4.2.2. Ključni uvjeti za postizanje tumorskog bijega .....	24
4.2.3. Signalni putovi i komunikacije koje omogućuju tumorski bijeg.....	25
5. ZAKLJUČAK .....	30
6. LITERATURA.....	30
7. SAŽETAK .....	33
8. SUMMARY.....	33
9. ŽIVOTOPIS .....	34



Preuzeto s :<https://www.sciencemag.org/custom-publishing/webinars/deciphering-cancer-understanding-tumor-invasion-and-metastatic>



## 1. Uvod

Do nedavno se vjerovalo da tumori nastaju zato što ih imunosni sustav nije sposoban prepoznati kao nešto strano i potencijalno opasno te reagirati kako bi se zaustavio njihov nastanak. Međutim, danas znamo, da ne samo da imunosni sustav ima sposobnost detekcije tumora kao nečeg stranog i štetnog, već da tumori tijekom svog razvoja mogu iskoristiti imunosne mehanizme obrane u svoju korist te da su se sposobni prilagoditi i postati neprepoznatljivi za imunosni sustav. Tumori raznim signalima mogu utjecati na obližnje netumorske stanice različitih tipova te na njih djelovati tako da pridonose njihovom napredovanju. S obzirom na tu činjenicu danas se posebno istražuje tumorski mikrookoliš (Swann i Smyth, 2007; Hanahan i Weinberg, 2011).

## 2. Imunosni sustav

Temeljna zadaća imunosnog sustava jest zaštita organizma od štetnih (mikro)organizama, tvari i izmijenjenih stanica te njihova djelovanja. Za razliku od ostalih sustava koji čine organizam, imunosni sustav nije jedinstvena anatomska cjelina, već ga čini mnoštvo raznovrsnih stanica i molekula, tkiva i organa raširenih po organizmu, čija je jedina poveznica njihova uloga u zaštiti organizma (Oršolić, 2007; Murphy i Weaver, 2017).

### 2.1. Sastavnice imunosnog sustava

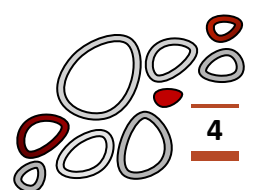
Imunosni odgovor na štetne elemente u organizmu odvija se putem stanica imunosnog sustava. Imunosne stanice nadziru organizam kružeći krvotokom i limfnim sustavom ili se pak raspršuju po tkivima. Razni organi ili tkiva, limfni organi, pružaju im potporu predstavljajući mjesta na kojima dolazi do organizacije imunosnog odgovora, skladištenja neaktivnih imunosnih stanica te njihova sazrijevanja. Prema svojim se ulogama dijele na primarne (središnje) i sekundarne (periferne) organe (Oršolić, 2007; Murphy i Weaver, 2017; Overview of the Immune System, 2021).

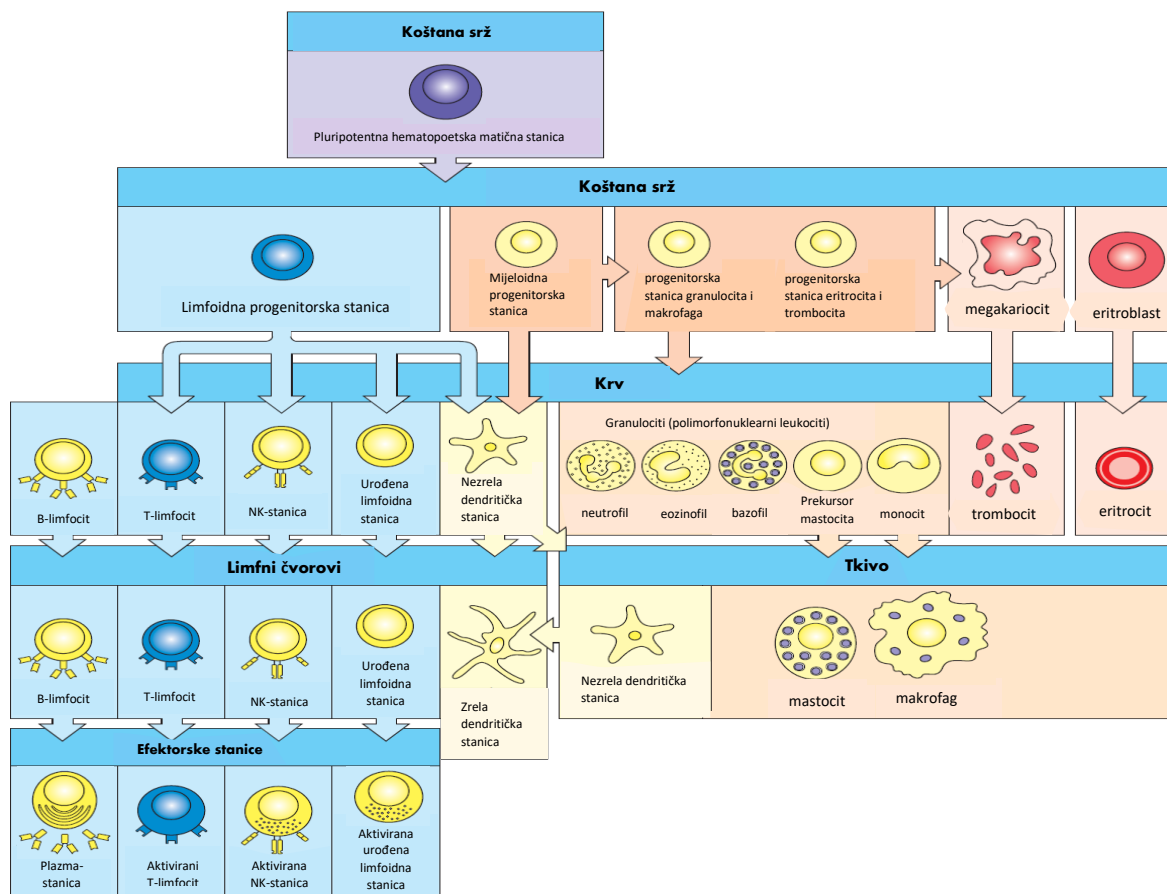
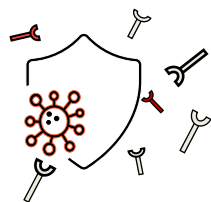
#### 2.1.1. Primarni limfni organi

Primarnim se smatraju oni organi u kojima dolazi do sazrijevanja i diferencijacije imunosnih stanica. U primarne organe spadaju koštana srž i prsna žlijezda (timus) (Oršolić, 2007; Murphy i Weaver, 2017).

##### Koštana srž

Sve su krvotvorne stanice podrijetlom iz koštane srži. Eritrociti, trombociti i leukociti nastaju u koštanoj srži iz pluripotentnih hematopoetskih matičnih stanica (HSCs, od engl. *hematopoietic stem cells*) odakle se njihovi diferencijacijski putovi razilaze (Slika 1.) (Oršolić, 2007; Murphy i Weaver, 2017).





Slika 1. Shematski prikaz razvoja krvnih i imunskih stanica. Preuzeto i prilagođeno iz Murphy i Weaver, 2017.

### Prsna žlijezda

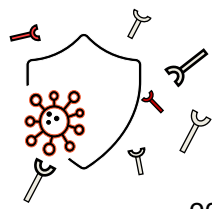
Prsna žlijezda (timus) je mali organ u gornjem dijelu prsnog koša. Nezrele preteče T-limfocita migriraju iz koštane srži prema timusu te u njemu dovršavaju svoj razvoj, sazrijevaju i diferenciraju se u pomoćničke, citotoksične, regulacijske i memorijske T-stanice (Oršolić, 2007; Murphy i Weaver, 2017).

### 2.1.2. Sekundarni limfni organi

Sekundarnima se smatraju oni organi u koje se imunosne stanice doseljavaju nakon svoga sazrijevanja, tu se skladište te ostvaruju specifični imunوسي odgovor. U sekundarne organe spadaju limfni čvorovi, slezena i limfno tkivo pridruženo sluznicama (MALT, od engl. *mucosa-associated lymphoid tissue*) (Oršolić, 2007; Murphy i Weaver, 2017).

### Limfni sustav i limfni čvorovi

Limfni sustav čini mreža limfnih žila koje povezuju limfne čvorove, organizirane nakupine limfnog tkiva, te završavaju svoj tok ulijevanjem u krvotok. Limfnim se žilama prenosi limfa, tekućina izvanstaničnih prostora koja se filtrira prije ponovnog utjecanja u krvotok. Filtracija se odvija u limfnim čvorovima, na križanjima limfnih žila. Limfni su čvorovi organizirani tako da se imunosnim stanicama olakšava interakcija s antigenima. Kora im je podijeljena u slojeve tako da T-limfociti i dendritičke stanice (DC,



od engl. *dendritic cells*) prvi reagiraju s antigenima, te nakon njih B-limfociti čiju aktivaciju pomažu dendritičke stanice i pomoćnički T-limfociti (Murphy i Weaver, 2017).

### Slezena

Slezena je hematopoetski i limfni organ. Za razliku od limfnih čvorova, nije povezana s limfnim sustavom, stoga se imunosni odgovor organizira na temelju antigena koji dolaze prenošeni krvlju. Srž slezene se dijeli na crvenu pulpu, gdje dolazi do razgradnje eritrocita i bijelu pulpu, ovoj oko arteriola ispunjen imunosnim stanicama. Bijela pulpa je podijeljena u više slojeva. Uzdužni je sloj, najbliži arterioli, većinom ispunjen naivnim T-limfocitima te se oko njega naizmjenično pružaju folikuli koji su ispunjeni neaktivnim B-limfocitima ili dendritičkim stanicama i makrofagima ili aktiviranim B-limfocitima (proizvode antitijela prema općim značajkama patogena) (Murphy i Weaver, 2017).

### Koža i sluznice organa

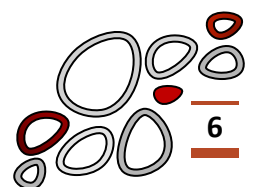
Površina kože i sluznice ostvaruju direktan kontakt s mikroorganizmima koji ulaze u organizam, te predstavljaju fizičku prepreku njihovu daljnjem širenju, što ih čini i prvom linijom obrane. U tkivima sluznica su se, kako bi se poboljšala obrana, razvila specijalizirana imunosna središta (MALT), dok se na površinu kože luče razne tvari koje otežavaju nastanjanje nepoželjnih (mikro)organizama. Imunosna središta nazivaju prema predjelima u kojima se nalaze, stoga razlikujemo središta unutar probavnog (GALT, od engl. *gut-associated lymphoid tissues*), respiratornog (u nazalnom predjelu NALT, od engl. *nasal-associated lymphoid tissue* i u dušniku BALM, od engl. *bronchus-associated lymphoid tissue*) i urogenitalnog sustava. U imunosna središta unutar probavnog trakta spadaju Peyerove ploče, adenoidi, tonzile i crvuljak. Peyerove se ploče nalaze unutar tankog crijeva te su zadužene za poticanje imunosnog odgovora prema antigenima prikupljenim iz probavnog trakta. U sloju epitelnih stanica se nalaze specijalizirane stanice M, koje prikupljaju antigene i prenose ih u subepitelni kupolasti predio u kojem se nalaze T-limfociti i dendritičke stanice te B-limfociti unutar folikula. Adenoidi i tonzila su nakupine limfnog tkiva na dnu usne šupljine, čijim se udruživanjem formira Waldeyerov prsten koji pruža zaštitu na ulazu probavnog i respiratornog trakta. Crvuljak se nalazi na prijelazu iz tankog u debelo crijevo te ima važnu ulogu pri zaštiti crijevne mikroflore (Oršolić, 2007; Kooij i sur., 2016; Murphy i Weaver, 2017).

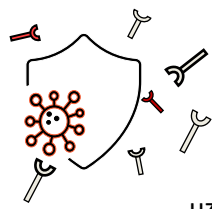
## 2.2. Imunost

Imunost je sposobnost organizma da uklanja za njega štetne tvari, a dijeli se na nespecifičnu (urođenu) i specifičnu (stečenu) (Oršolić, 2007; Murphy i Weaver, 2017).

### 2.2.1. Nespecifična imunost

Svojstvo nespecifične (urođene) imunosti je brza i nespecifična reakcija. Sastavnice urođene imunosti nisu specifično usmjerene prema jednom antigenu već mogu prepoznavati antigene i obrasce više

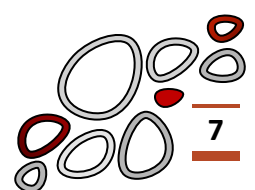




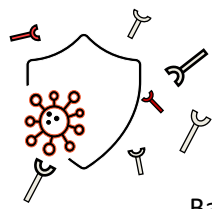
uzročnika upale te na njih djelovati. Urođena imunost je iznimno važna pri kontroli upale prije uspostave specifičnog odgovora (Oršolić, 2007; Murphy i Weaver, 2017).

### Stanice nespecifične imunosti

Stanice nespecifične imunosti ključne su za aktivaciju specifične imunosti. Nastaju iz pluripotentnih hematopoetskih stanica diferencijacijom tijekom mijelopoese. Mogu se svrstati u dvije kategorije, a to su fagocitne i posredničke stanice. Fagocitne se stanice dalje mogu razvrstati na polimorfonuklearne leukocite (granulocite) i mononuklearne leukocite. U polimorfonuklearne leukocite spadaju neutrofil, eozinofili i bazofili, dok u mononuklearne leukocite spadaju monociti, tkivni makrofagi i stanice koje prezentiraju antigene (APCs, od eng. *antigen-presenting cells*). Posredničke stanice luče tvari kojima pojačavaju imunosnu reakciju, a u ovu skupinu spadaju mastociti, bazofili i trombociti. Stanice nespecifične imunosti imaju receptore TLR (od engl. *toll-like receptors* koji spadaju u receptore PRRs, od engl. *pattern recognition receptors*) koji mogu prepoznati mnoštvo općih štetnih obrazaca (PAMPs, od engl. *pathogen-associated molecular patterns*) (Oršolić, 2007; Murphy i Weaver, 2017; Features of an Immune Response, 2021). Neutrofilni su najbrojnije stanice nespecifične imunosti. Stanice oštećenog tkiva ih raznim kemokinima privlače na mjesto upale. Neutrofilni izlučuju upalne citokine i proteolitičke enzime, koji pridonose pojačavanju imunosne reakcije. Uspostavljanjem neutrofilnih izvanstaničnih zamki (NETs, od engl. *neutrophil extracellular traps*), kromatinskih niti na kojima su vezane citotoksične tvari i peptidi antimikrobnih svojstava, olakšava se fagocitiranje uzročnika upale (Rungelrath, Kobayashi i DeLeo, 2019). Monociti nekoliko dana kruže krvotokom pa zatim migriraju u različita tkiva gdje se pretvaraju u makrofage. Sveprisutni su, a mogu biti pokretni ili nepokretni, specifični za određeno tkivo. Imaju više uloga, luče brojne tvari kojima utječu na tijek imunosne reakcije i komuniciraju s prisutnim stanicama, proždiru patogene te imaju sposobnost prezentacije antigena drugim stanicama (Oršolić, 2007; Varol, Mildner i Jung, 2015). Makrofagi su zaduženi i za recikliranje mrtvih stanica i njihovih ostataka zbog čega su od iznimne važnosti za održavanje imunosne homeostaze (LeBleu, 2015; Arneth, 2019). Dendritičke stanice predstavljaju poveznicu specifične i nespecifične imunosti. Svrstavaju se u stanice koje prezentiraju antigene te izlaganjem antigena na svojim receptorima omogućavaju aktivaciju limfocita i njihovu specijalizaciju za određeni antigen. Razlikujemo nekoliko podvrsta dendritičkih stanica: plazmacitoidne dendritičke stanice (pDCs, od engl. *plasmacytoid dendritic cells*), upalne dendritičke stanice, one koje se razvijaju iz monocita (moDC, od engl. *monocyte-derived dendritic cells*) i klasične dendritičke stanice (cDCs, od engl. *classical dendritic cells*) koje dalje mogu podijeliti na cDC1 i cDC2. Klasične dendritičke stanice tipa cDC1 su sposobne križno prezentirati antigene, što znači da prezentiraju i endogene i egzogene antigene, dok klasične dendritičke stanice tipa cDC2 prezentiraju samo egzogene antigene. Uvjeti u kojima se nalaze mogu diktirati njihovo sazrijevanje i diferencijaciju (LeBleu, 2015; Murphy i Weaver, 2017; Arneth, 2019).







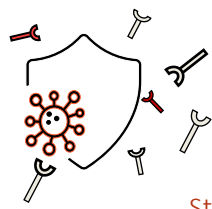
Bazofili, eozinofili i mastociti sadrže odjeljke unutar citoplazme koje sadrže razne citotoksične tvari i enzime koji se oslobađaju kad su stanice aktivirane. Važni su za obranu organizma od parazita, koji su preveliki za fagocitne stanice, te potiču stvaranje alergijske reakcije (histamin) (Oršolić, 2007; Murphy i Weaver, 2017). Stanice urođene imunosti nastale diferencijacijom tijekom limfopoeze (ILCs, od engl. *innate lymphoid cells*) imaju odlike nespecifične i specifične imunosti. Prema citokinima koje luče mogu se podijeliti na manje grupe (ILC1s, ILC2s, ILC3s). Najpoznatije među njima su prirođenoubilačke stanice (NK-stanice, od engl. *natural killer cells*) koje pripadaju grupi ILC1, iako imaju i karakteristike prema kojima su sličnije citotoksičnim T-limfocitima. Prirođenoubilačke stanice imaju sposobnost nespecifičnog prepoznavanja i ubijanja stanica obloženih antitijelima, tumorskih te zaraženih stanica. Nemaju receptore (TCR i CD8) koji bi im osiguravali specifičnost prema jednom antigenu (Spits i sur., 2013; Murphy i Weaver, 2017).

### 2.2.2. Specifična imunost

Svojtvenost specifične (stečene) imunosti je sposobnost pamćenja i jedinstvenog djelovanja prema točno određenom antigenu. Za razliku od nespecifične, ova se imunost stječe tijekom cijelog života uslijed interakcija s raznim antigenima. Sastoji se od dva mehanizma obrane, a to su humoralni i stanični tip specifične imunosti (Oršolić, 2007; Murphy i Weaver, 2017).

#### Stanice specifične imunosti

Stanice specifične imunosti se razvijaju iz pluripotentnih hematopoetskih stanica diferencijacijom tijekom limfopoeze pa migriraju u krvotok kojim se prenose do perifernih limfnih organa i tkiva. Prema karakterističnim markerima razlikujemo B-limfocite i T-limfocite, koji imaju i različite funkcije. Specifičnost reakcije za određeni antigen limfocitima B i T omogućuju njihovi karakteristični receptori, za B-limfocite B-stanični receptori (BCR, od engl. *B-cell receptors* ili površinski imunoglobulini mIg, od engl. *membrane immunoglobulin*), a za T-limfocite T-stanični receptori (TCR, od engl. *T-cell receptors*). Receptori prepoznaju antigene što im stanice koje prezentiraju antigene predaju pomoću molekula glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC, od engl. *major histocompatibility complex*) te su nasumično raspoređeni kako bi došlo do što veće raznolikosti specifičnosti. Postoje dva tipa molekula glavnog sustava tkivne podudarnosti, klasa I i klasa II. Molekule klase I glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC-I) nalaze se na svim stanicama, osim na eritrocitima, dok se molekule klase II glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC-II) nalaze samo na stanicama koje prezentiraju antigene (makrofagi, B-limfociti, dendritičke stanice) (Murphy i Weaver, 2017; Features of an Immune Response, 2021).



### Stanice humoralnog tipa obrane

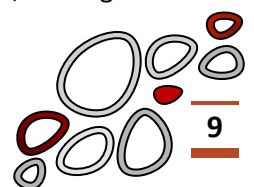
Humoralni se tip obrane temelji na djelovanju antitijela koja se slobodno kreću u krvi ili drugim tjelesnim tekućinama. Antitijela (imunoglobulini) su proteini koji se specifično vežu za uzročnika upale onesposobljavajući ga za daljnje širenje te ga označavaju za razgradnju fagocitnim stanicama. Proizvodnju antitijela omogućava diferencijacija B-limfocita u plazma-stanice. Dovodeći B-limfocite u kontakt s antigenom, stanice koje prezentiraju antigene potiču njihovu proliferaciju, dok pomoćnički T-limfociti lučenjem citokina potiču njihovu diferencijaciju. B-limfociti se mogu diferencirati i u memorijske stanice, koje se pohranjuju u slučaju ponovnog susreta s istim antigenom. Razlikujemo imunoglobuline M (IgM), koji aktiviraju sastavnice sustava komplementa; imunoglobuline D (IgD), koji ulaze u interakciju s antigenom, receptore B-limfocita; imunoglobuline G (IgG), koji su odgovorni za neutralizaciju, opsonizaciju i aktivaciju sastavnica sustava komplementa; imunoglobuline A (IgA), koji su odgovorni za neutralizaciju; imunoglobuline E (IgE), koji posreduju aktiviranju mastocita i eozinofila (Murphy i Weaver, 2017).

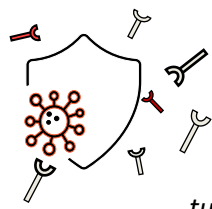
### Stanice staničnog tipa obrane

Stanični tip obrane temelji se na djelovanju T-limfocita, stanica sa specifičnim receptorima za određeni antigen. Njihove se uloge mogu odrediti prema koreceptorima CD4 i CD8 koje imaju eksprimirane na membrani, a koji omogućuju receptorima TCR prepoznavanje molekula MHC. T-limfociti CD8<sup>+</sup> se nazivaju citotoksičnim T-limfocitima (CTLs, od engl. *cytotoxic T lymphocytes*). Imaju sposobnost uništavanja stanica čije antigene prepoznaju svojim receptorima lučenjem citokina i raznih litičkih proteina koji izazivaju apoptozu stanica. Receptori CD8 citotoksičnim T-limfocitima omogućuju prepoznavanje molekula MHC-I. T-limfociti CD4<sup>+</sup> se mogu podijeliti u više skupina ovisno o citokinima koje luče, osnovne podskupine su pomoćnički T-limfociti (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17) i regulacijskih T-limfociti (T<sub>reg</sub>). Pomoćnički T-limfociti T<sub>H</sub>1 lučeći citokine (IFN- $\gamma$ , IL-2 i TNF- $\alpha$ ) aktiviraju citotoksične T-limfocite i makrofage, dok pomoćnički T-limfociti T<sub>H</sub>2 lučeći interleukine (IL-4, IL-5, IL-13) potiču proliferaciju i diferencijaciju B-limfocita, proizvodnju antitijela te potiču aktivaciju eozinofila. Limfociti T<sub>H</sub>17 luče interleukin 17 (IL-17), čime potiču regrutaciju neutrofila. Regulacijski T-limfociti nadgledaju djelovanje ostalih T-limfocita, uspoređujući imunosni odgovor i sprečavajući potencijalne reakcije na vlastite stanice te moguća oštećenja. Receptor CD4 pomoćničkim T-limfocitima omogućava prepoznavanje molekula MHC-II (Hohl, 2015; Murphy i Weaver, 2017).

### 2.2.3. Posredničke tvari

Citokini su mali polipeptidi koji posreduju u staničnim interakcijama i međustaničnim komunikacijama. Njihovim lučenjem regulira se jačina upalnog i imunosnog odgovora. Mogu se razvrstati u nekoliko kategorija (Tablica 1.), a to su kemokini, interleukini (IL), faktori stimulacije hematopoetskih kolonija (CSF, od engl. *colony stimulating factors*), interferoni (IFN), faktori tumorske nekroze (TNF, od engl.





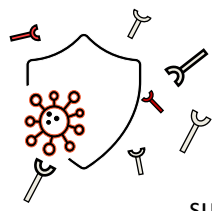
tumor necrosis factor) i transformirajući faktor rasta beta (TGF- $\beta$ ) (Zhang i An, 2007; Murphy i Weaver, 2017).

Tablica 1. Skupine citokina. Prilagođeno prema Murphy i Weaver, 2017.

Vrsta citokina	Stanice koje ga proizvode	Djelovanje
<b>Interleukini</b> posreduju interakcije između leukocita, označavaju se brojevima (IL-1,...), a zabilježeno ih je šezdesetak.		
<b>Kemokini</b> su kemoatraktanti kojima se imunosne stanice privlače na mjesta upale.		
<b>CC</b>	Velik broj stanica	privlače T-limfocite, monocite, prirodnoubilačke i dendritičke stanice
<b>CXC</b>	Velik broj stanica	privlače neutrofile
<b>Faktori stimulacije hematopoetskih kolonija</b>		
<b>G-CSF</b>	monociti i fibroblasti	potiče razvoj i diferencijaciju neutrofila
<b>GM-CSF</b>	makrofagi i T-limfociti	potiče rast i diferencijaciju monocita, granulocita i dendritičkih stanica
<b>M-CSF</b>	stanice strome koštane srži, T-limfociti, osteoblasti	potiče rast i diferencijaciju monocita
<b>Interferoni</b>		
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	leukociti i dendritičke stanice	inhibira virusnu replikaciju i potiče povećanu ekspresiju molekula MHC-I
<b>IFN-<math>\beta</math></b>	fibroblasti	inhibira virusnu replikaciju i potiče povećanu ekspresiju molekula MHC-I
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	prirodnoubilačke stanice, T-limfociti, neutrofile i ILCs	potiče aktivaciju makrofaga, povećanu ekspresiju molekula MHC, inhibiciju proliferacije limfocita T <sub>H</sub> 2 i T <sub>H</sub> 17
<b>Faktori tumorske nekroze</b>		
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	makrofagi, prirodnoubilačke stanice i T-limfociti	potiče stvaranje upalnog okruženja, ekspimiranje adhezijskih molekula E-selektina na endotelnim stanicama
<b>TNF-<math>\beta</math></b>	T-limfociti i B-limfociti	potiče povećanje stope citotoksičnosti i fagocitoze, ekspimiranje adhezijskih molekula na endotelnim stanicama i razvoj limfnih čvorova
<b>Transformirajući faktor rasta</b>		
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	monociti, T-limfociti	potiče proliferaciju T <sub>reg</sub> -limfocita i proizvodnju antitijela IgA

### 3. Razvoj tumora

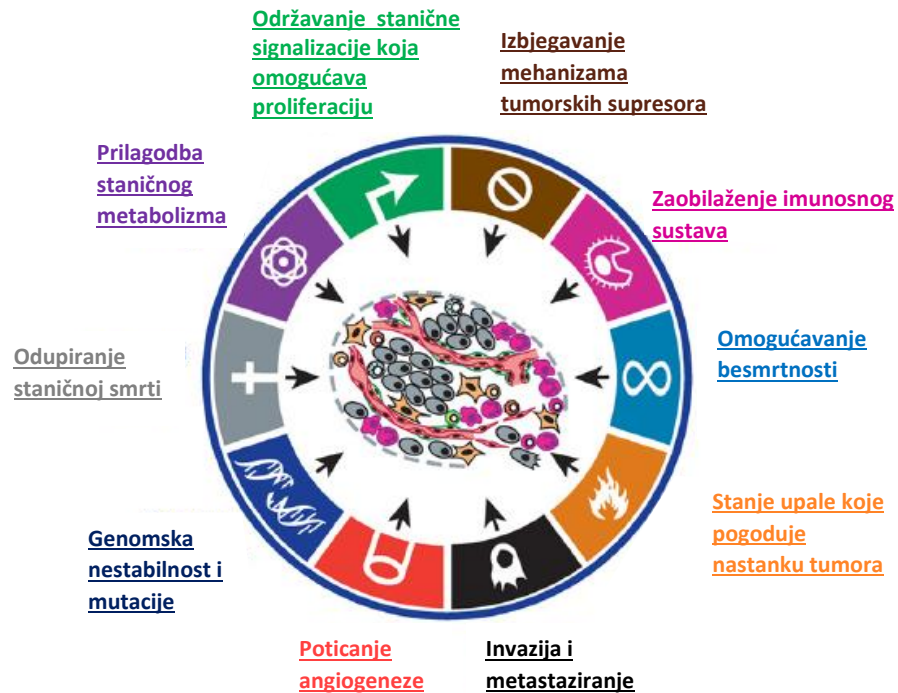
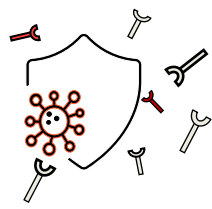
Tumor je nakupina tkiva čije su stanice stekle sposobnost neograničenog rasta pa tumorsko tkivo nadmašuje rast i narušava organizaciju i skladnost normalnog tkiva. Tumorsko tkivo nema nikakvu fiziološku funkciju. Normalne se stanice u tumorske pretvaraju složenim i stupnjevitim procesom tumorigeneze. Tumori mogu biti benigni ili maligni. Benigni tumori mogu rasti, ali se ne šire u obližnja tkiva niti po ostatku organizma. Maligni se tumori mogu širiti u obližnja tkiva ili u ostatak organizma pomoću krvotoka i limfnog sustava. Međutim, na tumore se ne može gledati samo kao na nakupine istovrsnih proliferirajućih stanica, već kao na kompleksna tkiva sazdana od mnoštva raznovrsnih stanica koje ostvaruju složene međusobne odnose. Stroma tumora utječe na razvoj i ekspresiju određenih tumorskih obilježja, stoga su sastav staničnog tumorskog mikrokoliša i uspostava međustanične signalizacije unutar njega od iznimne važnosti za razvoj i napredovanje tumora. Uspostavljeni imunosupresivni stanični mikrokoliš tumora može predstavljati i učinkovitu prepreku imunosnom



sustavu (Whiteside, 2008; Hanahan i Weinberg, 2011; LeBleu, 2015; Arneth, 2019; NCI Dictionary of Cancer Terms, 2021).

### 3.1. Obilježja tumorskih stanica i njihova okoliša

Pretvorbom normalnih stanica u tumorske dolazi do stjecanja zbira tumorskih obilježja i mehanizama koji se međusobno nadopunjavaju kako bi se omogućila formacija i održavanje tumora. Smatra se da su glavne značajke koje omogućuju stjecanje tumorskih obilježja, genetska nestabilnost i sposobnost iskorištavanja upalnih procesa (Slika 2.). Razvoj genetske nestabilnosti u normalnim stanicama omogućuje pojavu slučajnih mutacija. Neke se mutacije smatraju karakterističnim tumorskim obilježjima te omogućuju zaobilazanje nekoliko regulacijskih staničnih mehanizama, što ih čini ključnima za uspješnost formacije tumora. Stanice u kojima je došlo do takvih karakterističnih mutacija se smatraju sposobnijima za daljnji razvoj tumorskog fenotipa te mogu iskorištavati imunوسي odgovor u korist svog daljnjeg napredovanja. Iskorištava se stanje upale koje, ukoliko je dugotrajno, može biti opasno za organizam jer upalne stanice kako bi eliminirale prijetnju luče citotoksične tvari koje mogu naštetiti i stanicama okolnog netumorskog tkiva. Tumorske stanice mogu utjecati na upalne stanice raznim citokinima te tako poticati povećanu proizvodnju aktivnih štetnih tvari. Na području upale se stvara citotoksično okruženje koje se sastoji i od tvari koje luče upalne stanice i onih koje se oslobađaju tijekom uništenja tumorskih stanica. Takvo okruženje može dovesti do pojave mutacija kod stanica netumorskog tkiva. Stvaranjem takvog okruženja i dugog upalnog odgovora upalne stanice mogu utjecati na povećanje stope mutageneze i broja stanica koje razvijaju prilagodbe i obilježja karakteristična za tumorske stanice, čime se povećava broj tumorskih stanica i ostvaruje dobra podloga za razvoj tumora. Smatra se da su stanice pogodne za razvoj tumora nestabilne i sklone mutacijama kojima održavaju staničnu signalizaciju koja omogućava proliferaciju, izbjegavaju mehanizme tumorskih supresora, zaobilaze imunوسي sustav i iskorištavaju stanje upale, postižu replikacijsku besmrtnost, izbjegavaju staničnu smrt, mogu prilagoditi stanični metabolizam anaerobnim uvjetima i inducirati angiogenezu te su sposobne invadirati i metastazirati (Hanahan i Weinberg, 2011).



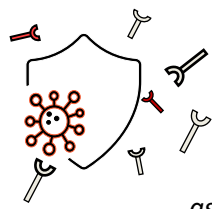
Slika 2. Obilježja tumorskih stanica. Preuzeto i prilagođeno iz Hanahan i Weinberg, 2011.

### Poticanje i održavanje stanične signalizacije koja omogućava proliferaciju

Zdrava tkiva imaju reguliranu proizvodnju i otpuštanje proliferacijskih signala koji kontroliraju stanični ciklus, čime održavaju odgovarajući broj stanica u određenom vremenskom periodu, kako se ne bi narušila funkcija i struktura pripadnog tkiva. Narušavanjem rada ovih signala tumorske stanice osiguravaju neovisnost i slobodu te mogućnost nekontroliranog rasta. Sposobnost održavanja proliferativne signalizacije tumorske stanice postižu uspostavom autokrine signalizacije, što znači da na svoju proliferaciju utječu vlastitim faktorom rasta; lučenjem raznih signala koji djeluju na stanice tumorske strome kako bi im one stvorile uvjete pogodne za daljnju proliferaciju ili povećanjem broja eksprimiranih receptora specifičnih za razne faktore rasta i proliferaciju, kako bi postale što senzibilnije. Međutim, može se razviti i neovisnost o faktoru rasta, eksprimiranjem receptora kojima za aktivaciju nije potrebna interakcija s ligandom ili može doći i do konstitutivne aktivacije određenih signalnih putova (Hanahan i Weinberg, 2011).

### Izbjegavanje mehanizama tumorskih supresora

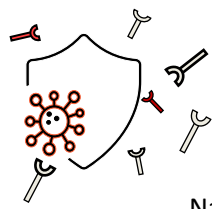
Osim regulacijskih mehanizama koji potiču proliferaciju u stanicama postoje mehanizmi koji ograničavaju rast i stanične diobe. Stoga tumorske stanice kako bi si osigurale beskonačnu proliferaciju, moraju zaobići i mehanizme negativne regulacije proliferacije stanica. Rast se i proliferacija stanica ograničavaju na razne načine, dok su mnogi od njih ovisni o genima za tumorske supresore. Dva su najistraživanija puta tumorskih supresora ona kojima upravljaju proteini pRb (od engl. *retinoblastoma-*



*associated protein*) i p53. Ovi tumorski supresori djeluju kao kontrolni centri unutar dvaju ključnih komplementarnih staničnih regulacijskih sklopova. Donose odluke o sudbini stanica, hoće li dalje proliferirati ili će se aktivirati procesi starenja i apoptoze, programirane stanične smrti. Protein pRb obrađuje različite izvanstanične i unutarstanične signale te prema stanju u stanici i njezinom okolišu odlučuje hoće li stanica nastaviti svoj ciklus diobe. Protein p53, prozvan je „čuvarom genoma“, analizira stresne signale i određuje razinu oštećenosti nasljedne upute. Protein p53 može pokrenuti proces apoptoze ili zaustaviti napredovanje staničnog ciklusa do uspostave povoljnijih uvjeta. Proces koji će protein pokrenuti ovisi o težini stečenih oštećenja u genomu, količini nukleotida dostupnih za replikaciju DNA, dostupnosti hranjivih tvari ili kisika te o proliferacijskim signalima. Kontrola proliferacije može se sprovesti i pomoću mehanizma kontaktne inhibicije, koji je primijećen u kulturama *in vitro*, te je prisutan samo kod normalnih zdravih stanica. Mehanizam kontaktne inhibicije onemogućuje neograničeno dijeljenje i povećanje broja stanica, tako što si stanice koje dolaze u kontakt međusobno inhibiraju proliferaciju. Do provođenja kontaktne inhibicije može doći pomoću proizvoda gena *NF2*, Merlina, koji omogućuje povezivanje dvaju stanica spajanjem adhezijskih molekula na površini stanica, čime se povećava povezanost stanica i smanjuje izloženost receptora za faktor rasta, što onda dalje utječe na mogućnost izlučivanja mitogenih signala povezanih stanica. Kontaktna se inhibicija može osigurati i pomoću proteina LKB1 koji pomaže pri održavanju polariteta epitelnih stanica čime se pridonosi očuvanju kompaktnosti i strukture određenog tkiva te sprečava proliferacija koja bi rezultirala nepravilnostima. Geni *NF2* i *LKB1* se, također, smatraju tumorskim supresorima jer je u dosadašnjim istraživanjima potvrđena njihova odsutnost u tumorskim stanicama. Kako bi se zaobišli mehanizmi supresije proliferacije dijele se one tumorske stanice kod kojih je došlo do mutacija u genima za tumorske supresore ili izbjegavanja kontaktne inhibicije gubitkom za nju specifičnih receptora (Hanahan i Weinberg, 2011).

### Odupiranje staničnoj smrti

S obzirom na to da su tumorske stanice izmijenjene u odnosu na normalne moraju se dodatno prilagoditi kako bi izbjegle razne stanične sustave koji bi utjecali na njihovo uklanjanje iz organizma. Takvi su sustavi razvijeni kako bi primali i obrađivali signale koje stanice oslobađaju pod stresom da se obrana od potencijalno štetnih stanica može što prije pokrenuti i ukoliko je potrebno potaknuti programirana smrt promijenjenih stanica. Pokretanjem apoptoze dolazi do aktivacije inače latentnih proteaza, kaspaza 8 i 9 koje uspostavljaju niz proteolitičkih kaskada. Djelovanjem raznih proteaza dolazi do razgradnje stanica na apoptotska tjelešaca kako bi lakše mogle biti fagocitirane ili razgrađene obližnjim stanicama i fagocitima. S obzirom da se smatra da tumorske stanice iz normalnih mogu nastati uslijed oštećenja nastalih tijekom upalnih reakcija, koja mogu dovesti i do pokretanja procesa apoptoze, opstaju samo one koje su razvile razne strategije za njezino ograničavanje ili zaobilaženje.



Najčešća je prilagodba gubitak tumorskog supresora p53. Poznate su i promjene koje uključuju prekomjerne ekspresije antiapoptotskih regulacijskih proteina (BCL-2, BCL-X<sub>L</sub>) ili signala za preživljavanje (IGF-1, IGF-2), kao i smanjenje ekspresije proapoptotskih faktora (BAX, BIM, PUMA) ili zaustavljanje unutarstaničnih putova koji potiču apoptozu (Hanahan i Weinberg, 2011).

### Omogućavanje besmrtnosti

Normalne stanice imaju ograničen životni vijek, tj. točno određen broj uzastopnih staničnih ciklusa kroz koje prolaze prije nego se potakne proces senescencije (starenja) i stanične smrti. Tumorske stanice teže ostvarivanju mogućnosti neograničene diobe i besmrtnosti što im omogućuje sposobnost održavanja telomerne DNA dovoljno dugom da se izbjegne aktiviranje senescencije ili apoptoze. Potrebna duljina telomera se najčešće zadržava promjenom regulacije ekspresije telomerase ili rekombinacijom. Međutim, mogu se razviti i razni onkogeni signalni putovi kojima se onemogućuju putovi koji potiču senescenciju i apoptozu (Hanahan i Weinberg, 2011).

### Prilagodba staničnog metabolizma

Kontinuirani rast i proliferacija stanica iziskuju velike količine energije, stoga im je potreban njen brz izvor. Kako bi se zadovoljila potreba za energijom tih neprestano proliferirajućih stanica, dolazi do prilagodbe i reprogramiranja staničnog metabolizma, najčešće prebacivanja na glikolitički put. Tada se čak i u prisutnosti kisika tumorske stanice oslanjaju na glikolitički ciklus (aerobnu glikolizu) kao glavni izvor energije, iako je oksidacijska fosforilacija energijski izdašniji proces (Hanahan i Weinberg, 2011).

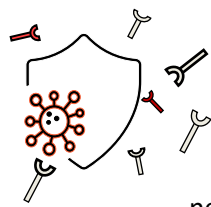
### Zaobilaženje imunskog sustava

Nakon što su osigurani unutarstanični uvjeti potrebni za daljnju proliferaciju i preživljavanje tumorskih stanica, prepreka razvoju tumora je imunski sustav. Tumorske stanice zato razvijaju razne mehanizme koji im omogućuju izbjegavanje napada i uništavanja od strane imunskih stanica, limfocita T i B, makrofaga i prirodenoubilačkih stanica. U takvim okolnostima do izražaja dolazi dvojaka uloga imunskog sustava koji može djelovati tako da usporava ili da potiče razvoj i napredovanje tumora (Hanahan i Weinberg, 2011).

### Poticanje angiogeneze

Tumorima su, kao i normalnim tkivima, za održavanje svih životnih funkcija potrebne hranjive tvari, isto tako se trebaju ukloniti svi nepotrebni nusprodukti metabolizma i ugljikov dioksid, stoga im je potreban pristup krvožilnom sustavu. Tumorske i okolne regrutirane stanice mogu poticati angiogenezu, proces stvaranja novih ogranaka krvožilnog sustava iz već postojećih. Inače, do razvoja i proširenja krvožilnog sustava dolazi samo u procesu embriogeneze u kojem se razvija cijela krvožilna mreža procesom vaskulogeneze, razvoja žilnog sustava povezivanjem novih endotelinih stanica, uz proces angiogeneze. Tijekom napredovanja tumora uključuje se „angiogenetski prekidač“, što pokreće





neprestanu proizvodnju novih ogranaka kako bi se zadovoljile potrebe novonastalog tumorskog tkiva (Hanahan i Weinberg, 2011). Angiogenetskim se prekidačem smatra događaj tijekom razvoja tumora u kojem inače održavana ravnoteža između proangiogenetski i antiangiogenetskih faktora prevagne na stranu faktora koji potiču uspostavu angiogeneze. U normalnim se tkivima vaskularna mreža ustali i održava konstantnom te nakon njezine potpune formacije nema promjena u njenoj duljini ili razgranatosti. Takvo se stanje održava raznim antiangiogenetskim faktorima koji poništavaju učinke proangiogenetskih. Međutim, tijekom razvoja tumora pojačava se rad proangiogenetskih faktora, bilo povećanjem ekspresije njihovih gena, bilo smanjivanjem proizvodnje inhibitora angiogeneze. Ti poremećaji ravnoteže se pojavljuju usred genetske nestabilnost. Neke mutacije utječu na pokretanje signalnih putova koji upravljaju oslobađanjem proangiogenetskih faktora (VEGF, od engl. *vascular endothelial growth factor*; IL-8, FGF-2, od engl. *fibroblast growth factor-2*), dok neke utječu na poticanje privlačenja i regrutacije stanica koje će ih proizvoditi (Ribatti i sur., 2006; Baeriswyl i Christofori, 2009).

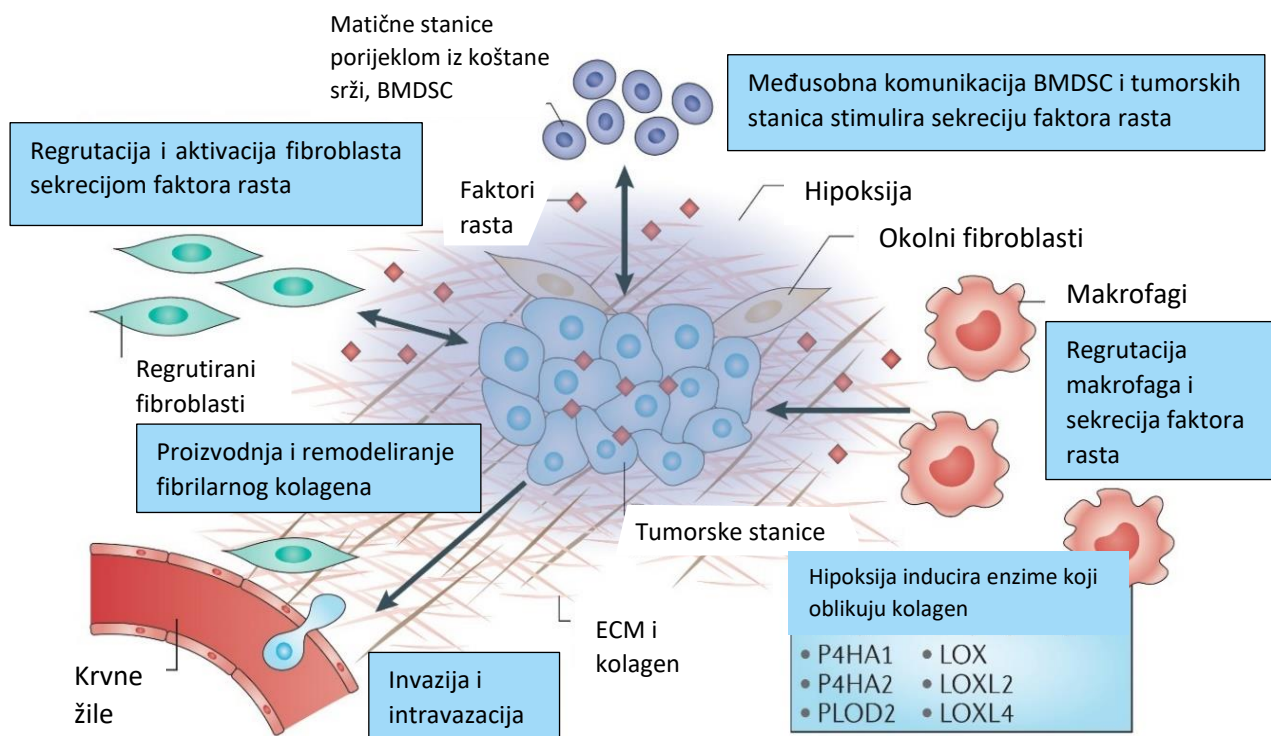
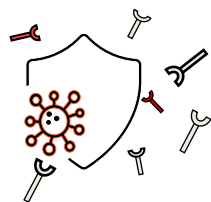
#### Invazija i metastaziranje

Dobra prokrvljenost tumora, koja se ostvaruje pokretanjem procesa angiogeneze, utječe na brzinu povećanja tumorske mase i omogućava tumorskom tkivu daljnje širenje po organizmu, invaziju. Proces invazije i metastaziranja može se razlučiti na više koraka. Prvo se moraju stvoriti uvjeti koji bi stanicama omogućili migraciju. Okolne stanice tumorskima pružaju strukturnu potporu pri kretanju i potiču ostvarivanje poželjnog pokretnog oblika te omogućuju intravazaciju, ulazak tumorskih stanica u obližnje krvne i limfne žile, čime se olakšava rasprostranjivanje po organizmu. Tumorske stanice s vremenom napuštaju krvne žile (ekstravazacija) te u tkivima do kojih se prenesu stvaraju se mikrometastaze, male nakupine, iz kojih se mogu razviti veći tumori (Hanahan i Weinberg, 2011).

## 4. Stanični mikrookoliš tumora

Stanični tumorski mikrookoliš je jedinstveno okruženje koje se tijekom razvoja tumora pojavljuje kao rezultat njegovih interakcija s imunskim sustavom i okolnim stanicama. Predstavlja raznoliko dinamično okruženje staničnih i složenih nestaničnih sastavnica, čije međusobne interakcije omogućuju napredovanje tumora (Slika 3.) (Whiteside, 2008; Hanahan i Weinberg, 2011; LeBleu, 2015).





Slika 3. Shematski prikaz staničnog tumorskog mikrookoliša i njegove uloge u razvoju tumora. Preuzeto i prilagođeno sa <https://wirtzlab.johnshopkins.edu/research/tumor-microenvironment/>.

#### 4.1. Sastavnice tumorskog mikrookoliša

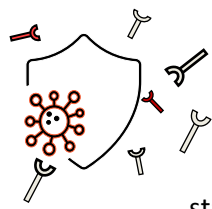
Građa tumorskog staničnog mikrookoliša ovisi o fazi napredovanja u kojoj se tumor nalazi (Bussard i sur., 2016). Sastavnice se tumorskog mikrookoliša mogu svrstati na stanične i molekularne (nestanične) te one zajedno oblikuju okruženje i osiguravaju uvjete pogodne za razvoj i širenje tumora. Pri oblikovanju staničnog tumorskog mikrookoliša važne su i fiziološke komponente kao što su parcijalni tlak i dostupnost kisika te pH-vrijednost okoliša (Whiteside, 2008; Hanahan i Weinberg, 2011; Ge i sur., 2012; LeBleu, 2015; Arneth, 2019; Hinshaw i Shevde, 2019).

##### Stanične sastavnice tumorskog mikrookoliša

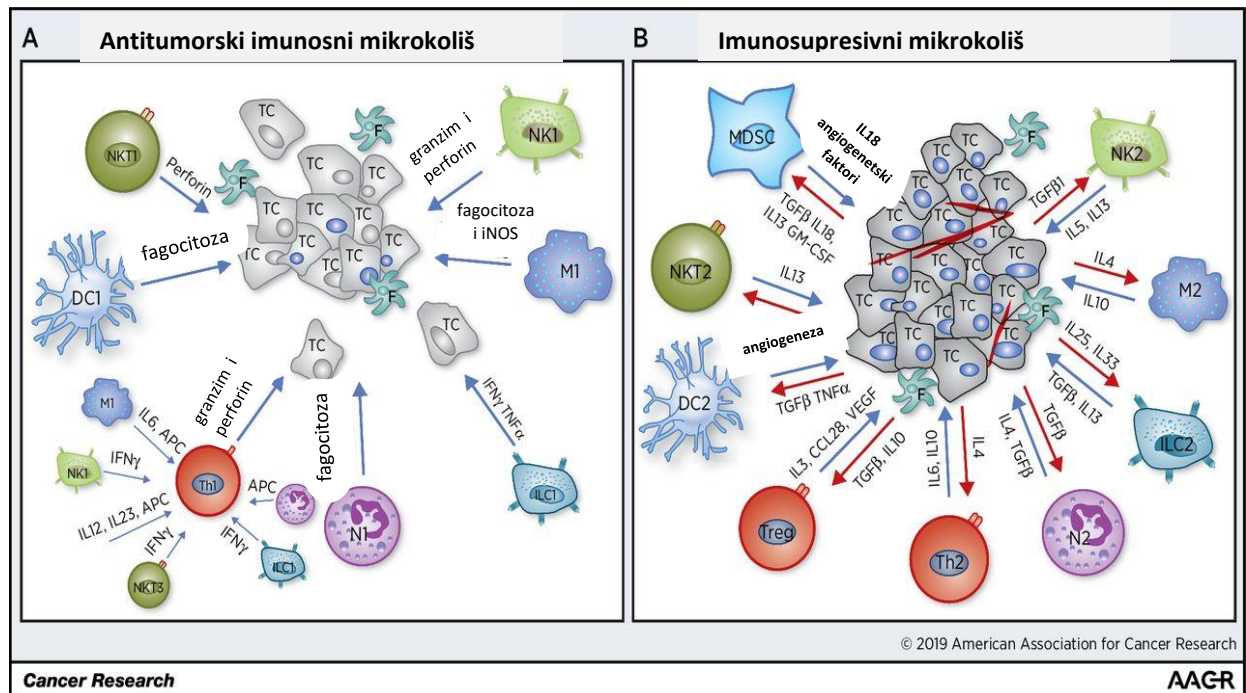
Tumorske stanice, lučenjem raznih kemokina i proupalnih tvari, mogu iskoristiti mogućnost okolnih stanica strome da u uvjetima upale uspostavlja reaktivniji fenotip kako bi pridonosile napredovanju tumora. Stanice strome povezane s tumorom reaktivnijeg fenotipa (TASC, od engl. *tumor-associated stromal cells*) na površini imaju eksprimirane proteine i izlučuju citokine koji stimuliraju obližnje i infiltrirajuće imunosupresivne upalne stanice kako bi se stvarali uvjeti pogodni za razvoj tumora i nastavila njihova regrutacija (Whiteside, 2008; Hanahan i Weinberg, 2011; Bussard i sur., 2016).

##### Stanice imunskog sustava u tumorskom mikrookolišu

U staničnom tumorskom mikrookolišu su prisutne stanice specifične i nespecifične imunosti, T-limfociti, dendritičke stanice, B-limfociti, makrofagi, polimorfonuklearni leukociti i prirodenoubilačke



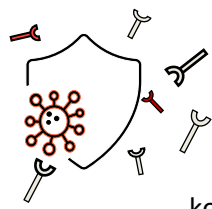
stanice. Imunosne stanice unutar tumorskog mikrookoliša mogu imati antitumorsko djelovanje pri čemu se udružuju stanice specifične i nespecifične imunosti kako bi eliminirale tumorske stanice ili mogu biti reprogramirane i eksprimirati imunosupresivni fenotip kako bi pomagale regrutiranim stanicama strome, i na taj način omogućili rast i širenje tumorskih stanica te ublažavanje specifičnog antitumorskog odgovora (Slika 4.) (Whiteside, 2008; LeBleu, 2015; Hinshaw i Shevde, 2019; Arneth, 2019).



Slika 4. Stanice imunskog sustava s eksprimiranim antitumorskim (A) i imunosupresivnim fenotipom (B). Preuzeto i prilagođeno iz Hinshaw i Shevde, 2019.

Najučinkovitije stanice antitumorskog odgovora među limfocitima koji infiltriraju tumor (TILs, od engl. *tumor infiltrating lymphocytes*) su citotoksični T-limfociti koji uništavaju tumorske stanice čije antigene specifično prepoznaju. Pomoćnički T<sub>H</sub>1-limfociti podržavaju citotoksične limfocite lučeći citokine (IFN- $\gamma$  i IL-2), dok pomoćnički T<sub>H</sub>2-limfociti lučenjem raznih interleukina (IL-4, IL-5, IL-13) podržavaju rad B-limfocita. T<sub>H</sub>17-limfociti potiču održavanje upalnih uvjeta lučeći određene interleukine (IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22) te tako olakšavaju rast i napredovanje tumora. Regulacijski T-limfociti imaju imunosupresivno djelovanje, onemogućuju proliferaciju drugih T-limfocita raznim mehanizmima ovisnim o kontaktu ili lučenjem citokina (IL-10 i TGF- $\beta$ ) (Whiteside, 2008; Arneth, 2019; Hinshaw i Shevde, 2019).

Prirođenoubilačke stanice eksprimiraju „receptore smrti“ kojima potiču apoptozu stanica s kojima dolaze u kontakt, a uz to luče i citotoksične tvari (perforin, granzim) kojima ograničavaju proliferaciju tumorskih stanica. Tumori, s obzirom na veliku efikasnost ubijanja prirođenoubilačkih stanica, razvijaju razne strategije kako bi ih izbjegli. Kako bi onemogućili kontakt s „receptorima smrti“ mogu se oblagati

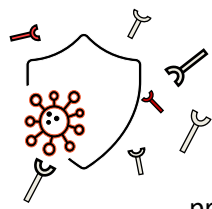


kolagenom ili trombocitima (Hinshaw i Shevde, 2019; Whiteside, 2008). Međutim, unutar tumorskog mikrokoliša mogu se naći i prirodenubilačke stanice povezane s tumorom (TANKs, od engl. *tumor-associated natural killer cells*), kod kojih dolazi do promjene proizvodnje citokina te se potiču na lučenje proangiogenetskih faktora (Bussard i sur., 2016).

Upalno djelovanje neutrofila u početnim stadijima razvoja tumora povećava nestabilnost zdravih okolnih stanica i stopu mutagenoze. Tvari koje neutrofilni luče imaju citotoksične učinke te mogu uzrokovati oštećenja u genomu. Kako razvoj tumorskih stanica napreduje, potiče se stvaranje neutrofilnog imunosupresivnog fenotipa da tvari koje neutrofilni luče ne bi naštetile tumorskim stanicama. Prema utjecaju tumorskih stanica na neutrofile razlikuju se dva fenotipa N1 i N2 (TANs, od engl. *tumor-associated neutrophils*) (Hinshaw i Shevde, 2019; Whiteside, 2008). Neutrofilni fenotipa N1 imaju antitumorsko djelovanje, luče citotoksične tvari (reaktivne kisikove vrste, ROS, od engl. *reactive oxygen species*; i NO, dušikov oksid), koje mogu oštetiti i zdrave, a ne samo tumorske stanice. Tumorskim stanicama stvaraju što nepovoljnije uvjete oblikujući izvanstanični matriks raznim proteazama (neutrofilnim elastazama, matriksnim metaloproteazama) i formirajući neutrofilne izvanstanične zamke (Hinshaw i Shevde, 2019). Neutrofilni fenotipa N2 se razvijaju tijekom napredovanja tumora. Djelovanjem faktora TGF- $\beta$  neutrofilni se potiču na diferencijaciju i polarizaciju u imunosupresivni fenotip N2, čime se postiže smanjenje lučenja citotoksičnih tvari i antitumorskog djelovanja. Promijenjeni neutrofilni lučenjem citokina potiču angiogenezu (IL-6), napredovanje tumora (prostaglandin E2) i posreduju stvaranju uvjeta koji omogućuju invaziju. Njihove se izvanstanične zamke iskorištavaju kako bi proteaze koje sadrže razgrađivale proupalne citokine. Neutrofilni lučenjem raznih kemokina utječu i na diferencijaciju makrofaga u protumorske stanice (Hinshaw i Shevde, 2019; Whiteside, 2008).

Mastociti mogu imati protumorsko djelovanje, potiču proces angiogeneze i oblikuju stromu tumora, ali kod nekih tumora je uočeno da mogu poticati i infiltraciju eozinofila te apoptozu tumorskih stanica (Hinshaw i Shevde, 2019).

Razlikujemo dvije vrste makrofaga prisutnih u tumorskom okruženju, makrofagi M1 i M2 (TAMs, od engl. *tumor-associated macrophages*). Makrofagi M1 imaju antitumorsko djelovanje, luče razne upalne citokine (TNF- $\alpha$ , CXCL10, IL-1 $\beta$ ) te na membranama imaju eksprimirane antigene glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC-I i MHC-II) potrebne za prezentiranje tumorskih antigena (Arneth, 2019; Hinshaw i Shevde, 2019). Makrofagi M2 imaju protumorsko i protuupalno djelovanje, luče protuupalne citokine koji smanjuju upalne procese. Fenotip makrofaga M2, uspostavljen primanjem polarizacijskih signala tumorskih stanica i hipoksičnim uvjetima, tumorskim stanicama omogućuje proliferaciju i potiče angiogenezu, epitelno-mezenhimsku tranziciju (EMT) te lučenjem citokina (IL-10 i



prostaglandina E2) inhibira limfocite. Također, može sudjelovati u preoblikovanju tkiva lučenjem raznih proteaza (MMP9, MT1-MMP, MMP2) čime omogućava pogodne uvjete za invaziju. U tumorskom su mikrokolišu prisutni makrofagi oba fenotipa, ali je fenotip M2 povoljniji za razvoj tumora (Hinshaw i Shevde, 2019; Whiteside, 2008; Arneth, 2019).

Mijeloidne supresorske stanice (MDSCs, od engl. *myeloid-derived suppressor cells*) su nezrele dendritičke stanice. Potiču rast i razvoj tumora te lučenjem raznih enzima (npr. arginaze 1), kojima utječu na povećanje proizvodnje superoksida i dušikova oksida, inhibiraju rad imunskih stanica. Enzim arginaza 1 u suradnji sa sintazom dušikova oksida (iNOS, od engl. *inducible nitric oxide synthase*) katalizira proizvodnju dušikovog oksida iz aminokiseline L-arginina. Tumorske stanice luče brojne faktore (IL-10, VEGF, GM-CSF) kojima potiču razvoj i nakupljanje mijeloidnih supresorskih stanica unutar mikrokoliša, a blokiraju sazrijevanje dendritičkih, čime narušavaju stvaranje specijaliziranih limfocita (Hinshaw i Shevde, 2019; Whiteside, 2008).

Dendritičke stanice patrolirajući tumorskim mikrokolišem susreću se s raznim citokinima i imunosupresivnim faktorima (VEGF, IL-10, TGF- $\beta$ , prostaglandin E2) koji inhibiraju njihovo sazrijevanje u funkcionalne imunostanice, što dovodi do stvaranja tolerantnog fenotipa. Razvojem tolerantnog fenotipa dendritičkih stanica onemogućuje se njihovo sudjelovanje u imunom odgovoru jer gube sposobnost aktivacije limfocita  $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$  i  $T_{reg}$  (Hinshaw i Shevde, 2019; Whiteside, 2008).

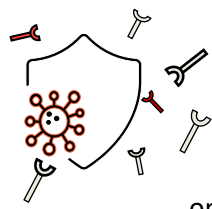
### Stanice strome tumora

Regrutirane stanice strome mogu biti različitog tipa: fibroblasti, adipociti, vaskularne endotelne, perivaskularne ili mezenhimske stanice (Whiteside, 2008; Hanahan i Weinberg, 2011; LeBleu, 2015; Bussard i sur., 2016).

Endotelne stanice imaju važnu ulogu u razvoju i zaštiti tumora od imunskog sustava. Povezivanjem s krvotokom sudjeluju u procesu angiogeneze pa tako tumoru omogućuju izvor nutrijenata potrebnih za razvoj i rast, ali i potencijalno širenje po organizmu (Whiteside, 2008; Hinshaw i Shevde, 2019; Arneth, 2019).

Mezenhimske stanice su važne za ostvarivanje međustaničnih komunikacija između tumora i staničnog tumorskog mikrokoliša. Poticane raznim signalima mogu se diferencirati u pericite i fibroblaste (Whiteside, 2008; Arneth, 2019).

U zdravim tkivima fibroblasti imaju važnu ulogu pri održavanju strukture tkiva i zacjeljivanju rana, stoga ih tumorske stanice aktiviraju kako bi pridonosili proliferaciji i signalima utjecali na okolne stanice. Fibroblasti povezani s tumorima (CAF, od engl. *cancer-associated fibroblast*) stanicama u svom okruženju omogućuju migracije, pomažu pri razmještanju endotelnih stanica u procesu angiogeneze, a



omogućuju i invaziju tumorskih stanica u krvotok (Whiteside, 2008; Bussard i sur., 2016; Arneth, 2019; Hinshaw i Shevde, 2019).

Adipociti povezani s malignim tumorima (CAA, od engl. *cancer-associated adipocytes*), stanice masnog tkiva, pod utjecajem tumorskih stanica mogu eksprimirati reaktivniji fenotip. Tumorske ih stanice potiču na proizvodnju interleukina (IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ ) koji posreduju regrutaciju okolnih stanica i raznih proteaza koje preuređuju izvanstanični matriks. Uočeno je kako ih tumorske stanice mogu iskorištavati i kao izvor energije potičući njihovu lipolizu (Bussard i sur., 2016).

### Nestanične sastavnice tumorskog mikrookoliša

Velik broj nestaničnih sastavnica tumorskog mikrookoliša čini izvanstanični matriks (ECM, od engl. *extracellular matrix*), mrežu makromolekula (glikoproteina, fibrilarnog kolagena) koji omogućavaju biomehaničke aktivnosti. Uvjeti u izvanstaničnom matriksu utječu na komunikaciju stanica mikrookoliša, oslobađanje i iskorištavanje prisutnih faktora rasta. Unutar matriksa se formiraju posebni odjeljci gdje se održavaju uvjeti povoljni za provođenje određenih bioloških procesa značajnih za razvoj tumora. Ustroj izvanstaničnog matriksa je podložan neprestanim preuređivanjima proteazama, što utječe na njegovu propusnost koja je od iznimne važnosti jer izvanstanični matriks unutar svoje mreže kolagenskih niti pruža zaštitu tumorskim stanicama (Whiteside, 2008; Hanahan i Weinberg, 2011; Arneth, 2019; Hinshaw i Shevde, 2019).

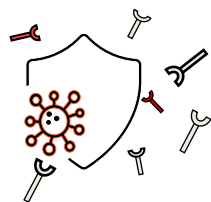
## 4.2. Interakcije tumora i imunskog sustava

Stanice imunskog sustava pripadnici su stanične populacije tumorskog mikrookoliša, stoga imaju utjecaja na razvoj tumora. S obzirom na njegovu ulogu u obrani organizma, imunski sustav ima tri glavne uloge u prevenciji nastanka tumora. Štiti organizam uklanjanjem ili suzbijanjem virusnih upala koje mogu potaknuti nastanak tumora; brzim uklanjanjem uzročnika upale i razrješavanjem upalnog okruženja onemogućuje stvaranje uvjeta pogodnih za tumorigenezu te specifičnim prepoznavanjem eksprimiranih tumorskih antigena ili molekula eksprimiranih pod utjecajem staničnog stresa uklanja tumorske stanice. Međutim, iako se dugo istraživao ovaj aspekt interakcija s tumorskim stanicama novija istraživanja veliku važnost pridaju i komunikaciji imunskog sustava i tumorskih stanica kod koje imunski sustav ne uspijeva obraniti organizam od tumora. Tako je razvijena aktualna hipoteza imunskog uređivanja (Dunn i sur., 2002; Swann i Smyth, 2007; Hanahan i Weinberg, 2011; Schreiber, Old i Smyth, 2011).

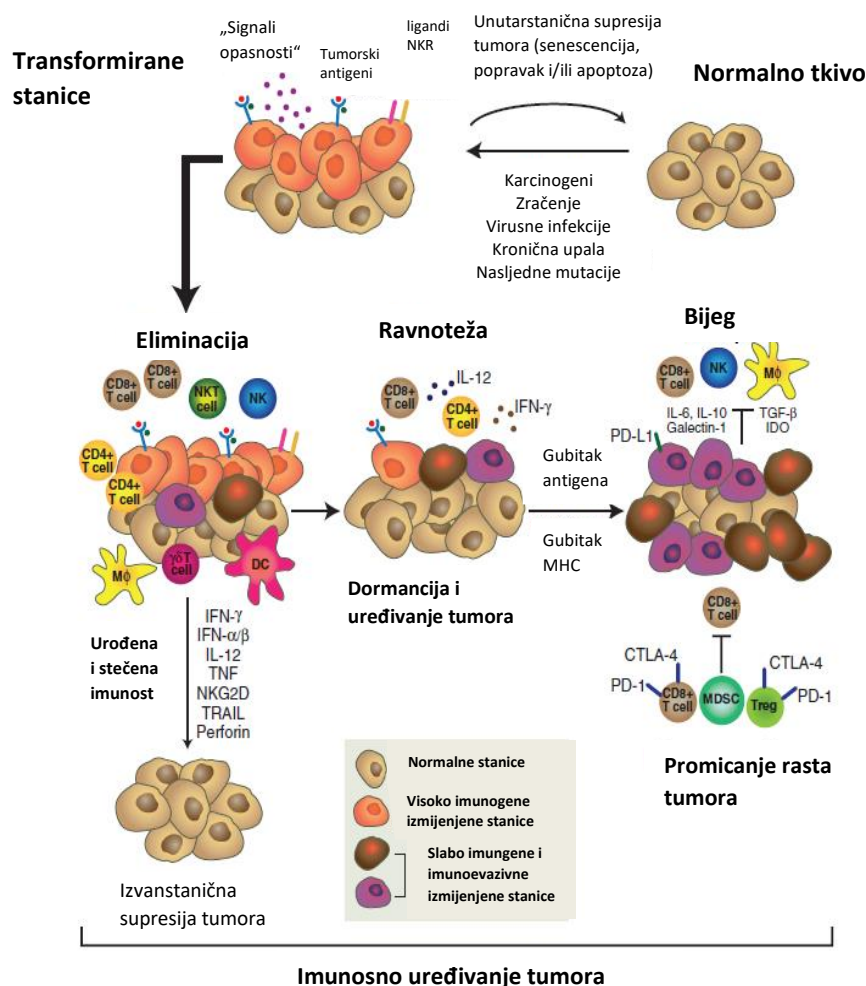
### 4.2.1. Imunosno uređivanje tumora

Imunosno uređivanje tumora (od engl. *cancer immunoediting*) je hipoteza prema kojoj se smatra da imunski sustav utječe na ekspresiju antigena tumorskih stanica (imunogenost), a ne samo na njihovu proliferaciju. Prema tome imunski sustav ima dvojaku ulogu u interakciji s tumorskim stanicama,





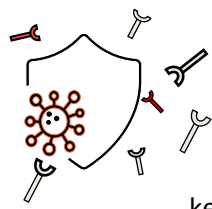
uništava ih, ali im isto tako omogućava da se razvijaju do stanica koje imunostni sustav sam više ne može detektirati. Smatra se da se imunostno uređivanje tumora odvija u tri faze: uklanjanje, ravnoteža i bijeg (Slika 5.). Ukoliko dođe do eliminacije tumora već u fazi uništenja, ostale se faze neće dogoditi (Dunn i sur., 2002; Hanahan i Weinberg, 2011; Vesely i Schreiber, 2013; Juretić i Bašić-Koretić, 2017).



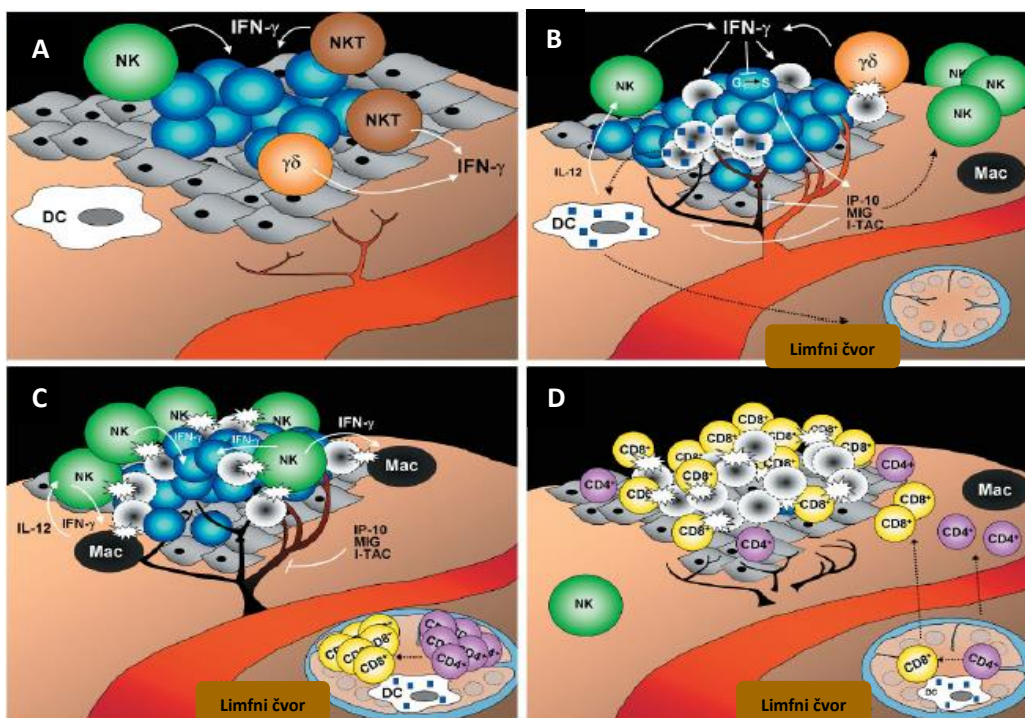
Slika 5. Shematski prikaz imunostnog uređivanja tumora. Imunosno uređivanje tumora nastupa kao proces kojim se nastoji ukloniti štetno djelovanje tumora, nakon što tumorske stanice nadvladaju unutarstanične mehanizme supresije. Preuzeto i prilagođeno iz Schreiber, Old i Smyth, 2011.

### Imunosni nadzor i faza uklanjanja

Imunosnim se nadzorom (od engl. *immunosurveillance*) naziva fiziološka funkcija imunostnog sustava nadgledanja vlastitih stanica, što znači da ima sposobnost prepoznavanja i uništavanja vlastitih transformiranih stanica. Uslijed detekcije nepravilnosti imunostnim nadzorom pokreće se imunostni odgovor i faza uklanjanja (od engl. *tumor elimination phase*). Stanice nespecifične i specifične imunosti se udružuju kako bi se što učinkovitije uklonile stanice koje bi mogle biti opasne za organizam. Imunosna se reakcija odvija određenim redosljedom. Stanice nespecifične imunosti prepoznaju razne obrasce koji predstavljaju opasnost za organizam. Glavnu ulogu tu imaju prirodne ubilačke stanice čime se pokreće lučenje citokina i proupalnih tvari (Slika 6. A). Citokini dovode do poticanja proizvodnje

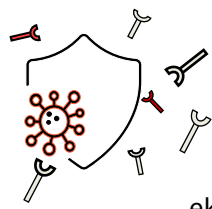


kemokina (CXCL10 ili IP-10, od engl. *interferon-inducible protein-10*; CXCL9 ili MIG, od engl. *monokine induced by IFN- $\gamma$* ; CXCL11 ili ITAC, od engl. *interferon-inducible T cell  $\alpha$  chemoattractant*) koji mogu imati i negativan učinak na angiogenezu, čime je otežana daljnja proliferacija tumora. Lučenjem citokina IFN- $\gamma$  NK-stanice aktiviraju makrofage i dendritičke stanice, koje sakupljajući i prerađujući tumorske antigene mrtvih stanica, pospješuju aktivaciju specifične imunosti (Slika 6. B). Stanice koje prezentiraju antigene putuju do obližnjih limfnih čvorova, gdje prema predočenom antigenu posreduju aktivaciji T-limfocita (Slika 6.C). Uspješna aktivacija T-limfocita CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> specifičnih za transformirane stanice omogućuje organizmu bolju obranu (Slika 6.D) (Dunn i sur., 2002; Dunn, Old i Schreiber, 2004; Hanahan i Weinberg, 2011; Schreiber, Old i Smyth, 2011; Vesely i Schreiber, 2013; Juretić i Bašić-Koretić, 2017)

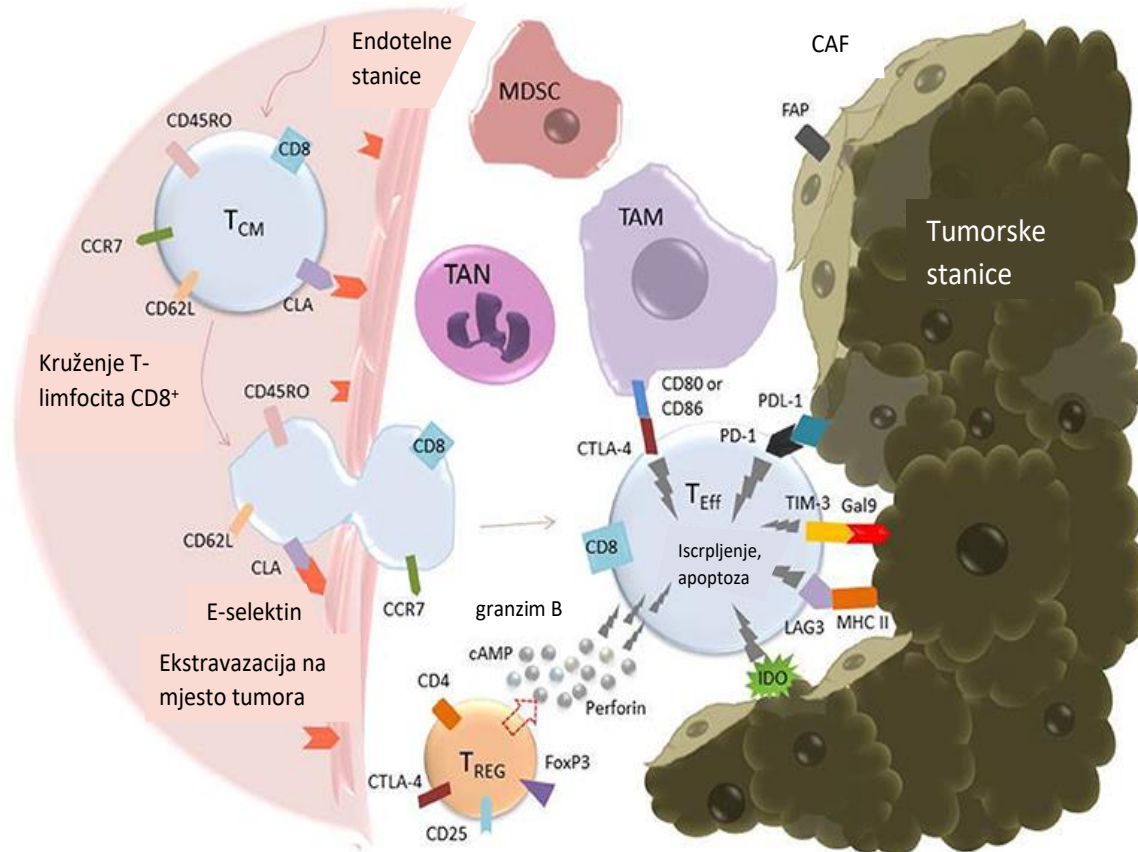


Slika 6. Shematski prikaz slijeda imunskog odgovora u fazi uklanjanja. A)prepoznavanje tumorskih stanica od strane pripadnika nespecifične imunosti; B)priprema dendritičkih stanica za prezentiranje antigena; C)aktivacija T-limfocita CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> specifičnih za transformirane stanice unutar limfnih čvorova; D)mobilizacija T-limfocita CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> specifičnih za transformirane stanice na mjesto gdje se nalazi tumor. Preuzeto i prilagođeno iz Dunn i sur., 2002.

Određeni citokini mogu djelovati na endotelne stanice upalnog područja tako da na površini ekspimiraju adhezijske molekule (selektine, VCAM-1, adhezijske molekule vaskularnih stanica-1; ICAM-1, adhezijske međustanične molekule) pomoću kojih ulaze u interakcije s nadzornim imunskim stanicama koje cirkuliraju u krvi (Slika 7.). Adhezijske se molekule endotelnih stanica povezuju s limfocitnim antigenima ekspimiranim na aktiviranim T-limfocitima (selektini P i E vežu antigen CLA, od engl. *cutaneous lymphocyte antigen*; VCAM-1 veže antigen VLA-4, od engl. *very late antigen-4*; ICAM-1 veže antigen LFA-1, od engl. *lymphocyte function-associated antigen-1*), što T-limfocitima omogućuje



ekstravazaciju u upalno područje i tumorski mikrookoliš. Ukoliko dođe do mutacija, bilo adhezijskih molekula, bilo receptora na T-limfocitima, onemogućuje se infiltracija, što može biti i način onesposobljavanja T-limfocita od strane tumorskih stanica. Tumorske stanice koje prežive fazu uništavanja ulaze u fazu ravnoteže (od engl. *equilibrium state*) (Dunn i sur., 2002; Dunn, Old i Schreiber, 2004; Hanahan i Weinberg, 2011; Schreiber, Old i Smyth, 2011; Vesely i Schreiber, 2013; Juretić i Bašić-Koretić, 2017; Martinez i Moon, 2019).

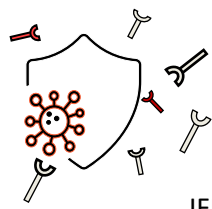


Slika 7. Infiltracija T-limfocita u stanični tumorski okoliš i njihove interakcije. Preuzeto i prilagođeno iz Martinez i Moon, 2019.

### Faza ravnoteže

Imunosni sustav u fazi ravnoteže tumorske stanice drži pod strogom kontrolom, daljnji im se rast sprečava specifičnim imunskim odgovorom stvorenim u fazi uništenja. Kako bi tumor preživio i naredne faze uklanjanja opstaju one njegove stanice kod kojih je došlo do oblikovanja imunogenosti. Interakcije s imunskim stanicama stvaraju selektivni pritisak nad tumorskim stanicama te preživljavaju samo one koje su raznim mutacijama izgubile antigene za koje je razvijen specifičan imunski odgovor te tako postaju nevidljive i neprepoznatljive imunskom sustavu. Smatra se da je faza ravnoteže najdulja faza imunskog uređivanja tumora te može trajati dokle god se ne stvori dovoljna količina tumorskih stanica koje su stekle potrebne mutacije za izbjegavanje imunskog sustava. Za održavanje ravnoteže su ključni T-limfociti CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> te citokini interleukin 12 (IL-12) i





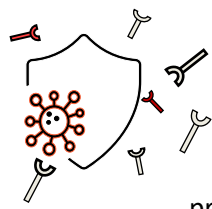
IFN- $\gamma$ , koji posreduju u povećanju citotoksičnosti i regrutaciji imunskih stanica (Dunn i sur., 2002; Dunn, Old i Schreiber, 2004; Hanahan i Weinberg, 2011; Schreiber, Old i Smyth, 2011; Juretić i Bašić-Koretić, 2017).

### Faza bijega tumorskih stanica

U fazu bijega (od engl. *tumor escape phase*) od imunskog sustava ulaze tumorske stanice koje su stekle sposobnost zaobilaznja imunskog sustava pa budući da su neprepoznatljive, više se ne mogu ukloniti. S obzirom da u fazi ravnoteže dolazi do uređivanja populacija tumorskih stanica pri interakcijama s imunskim sustavom, tumorske se stanice faze bijega razlikuju od početnih time što su manje imunogene. Gubitak tumorskih antigena je stoga najbolje istražen mehanizam bijega. Predložena su tri načina prema kojima bi se mogao odvijati: prevladavanjem i umnožavanjem onih stanica koje se pojavljuju, a nemaju eksprimirane antigene koji potiču imunsku reakciju; gubitkom antigena glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC-I) kojim ostvaruju interakcije s T-limfocitima; ili inhibicijom stanica koje mogu obrađivati i prezentirati antigene. Smatra se da su izmjene tumorskih stanica pokrenute kombinacijom procesa imunoselekcije i genetske nestabilnosti, sklonosti ka mutiranju. Do faze bijega tumora može doći nizom mehanizama, ne samo promjenama u ekspresiji gena, već i uspostavljanjem imunosupresivnih uvjeta unutar staničnog mikrookoliša tumora čime dolazi do slabljenja imunskog odgovora i povećanja otpornosti na obrambene citotoksične tvari, što dovodi do iscrpljivanja imunskih stanica. Tumorskim je stanicama zadnja prepreka imunski sustav, stoga su tumorske stanice u fazi bijega, one kojima imunski sustav više nije prijetnja, sposobne formirati vidljive tumore. Uspješnost se tumorskog bijega osigurava i održavanjem uvjeta u kojima samo uređene tumorske stanice mogu preživjeti, stoga prerastaju normalne stanice (Dunn i sur., 2002; Dunn, Old i Schreiber, 2004; Gajewski i sur., 2006; Hanahan i Weinberg, 2011; Schreiber, Old i Smyth, 2011).

#### 4.2.2. Ključni uvjeti za postizanje tumorskog bijega

Promjene kroz koje prolaze tumorske stanice dovode i do izmjena njihovog okoliša. Uslijed prilagodbe staničnog metabolizma tumorskih stanica i djelovanja nusproizvoda glikolitičkog puta u tumorskom se staničnom mikrookolišu uspostavljaju hipoksični i kiseli uvjeti, dok nekontrolirani rast i velika stopa proliferacije iziskuju velike količine energije, što dovodi do osiromašenja zaliha dostupnih hranjivih tvari u tumorskom mikrookolišu čime se povećava sklonost oksidacijskom stresu. Takvi nepovoljni uvjeti stvaraju snažan selekcijski pritisak, tako da preživljavaju samo genetski nestabilne i invazivne stanice te one koje mogu prilagoditi svoj metabolizam novostvorenim uvjetima. Preživljavaju stanice u kojima je došlo do izmjena metabolizma, koje su izmijenjene tako da glukozu razgrađuju procesom glikolize umjesto oksidacijskom fosforilacijom, čak i u aerobnim uvjetima, kako bi bile sposobne opstati u hipoksičnim uvjetima (Ge i sur., 2012). Makrofagi i granulociti upalne su stanice koje mogu koristiti glikolitički put što im omogućuje preživljavanje u hipoksičnom okruženju kojem dodatno pridonose



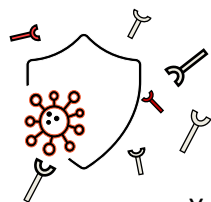
proizvodnjom reaktivnih kisikovih vrsta. Zbog velike stope apoptoze tumorskih stanica uzrokovane takvim citotoksičnim tvarima, fagociti su izloženi raznim aktivacijskim i polarizacijskim signalima koji mogu izazvati njihovu polarizaciju prema protumorskom i imunosupresivnom fenotipu. Prekomjerne količine reaktivnih kisikovih vrsta prisutnih u okolišu mogu biti toksične i za limfocite (Whiteside, 2008.). Citotoksični T-limfociti se pri aktivaciji metabolički reprogramiraju i prelaze na glikolitički put što im omogućava bržu proliferaciju, dok memorijski i regulacijski T-limfociti za proizvodnju energije koriste put oksidacijske fosforilacije i oksidaciju masnih kiselina pa teško opstaju u hipoksičnim uvjetima. S obzirom da su hranjive tvari u tumorskom mikrookolišu u oskudnim količinama, a za glukozu se potrebno natjecati s tumorskim stanicama, dolazi i do izgladnjivanja T-limfocita (Martinez i Moon, 2019). Prelazak na glikolitički put pridonosi kiselosti mikrookoliša usred velike količine prisutnih laktata, nusproizvoda glikolitičkih reakcija, i dovodi do zakiseljavanja citoplazme tumorskih stanica, što je nepogodno s obzirom da je pH-vrijednost presudna za normalno odvijanje mnogih staničnih biokemijskih procesa. Tumorske stanice, stoga mobiliziraju protonske pumpe koje izlučuju vodikove ione u izvanstanične prostore, nastojeći održati vlastitu pH-vrijednost idealnom te tako posreduju dodatnom zakiseljavanju izvanstaničnih prostora. Snižavanje pH mikrookoliša narušava pravilno funkcioniranje T-limfocita. Uspostavom ovakvih nepovoljnih uvjeta potiče se mutiranje različitih signalnih putova koji omogućuju daljnje napredovanje tumora (Gajewski i sur., 2006; Ge i sur., 2012).

#### 4.2.3. Signalni putovi i komunikacije koje omogućuju tumorski bijeg

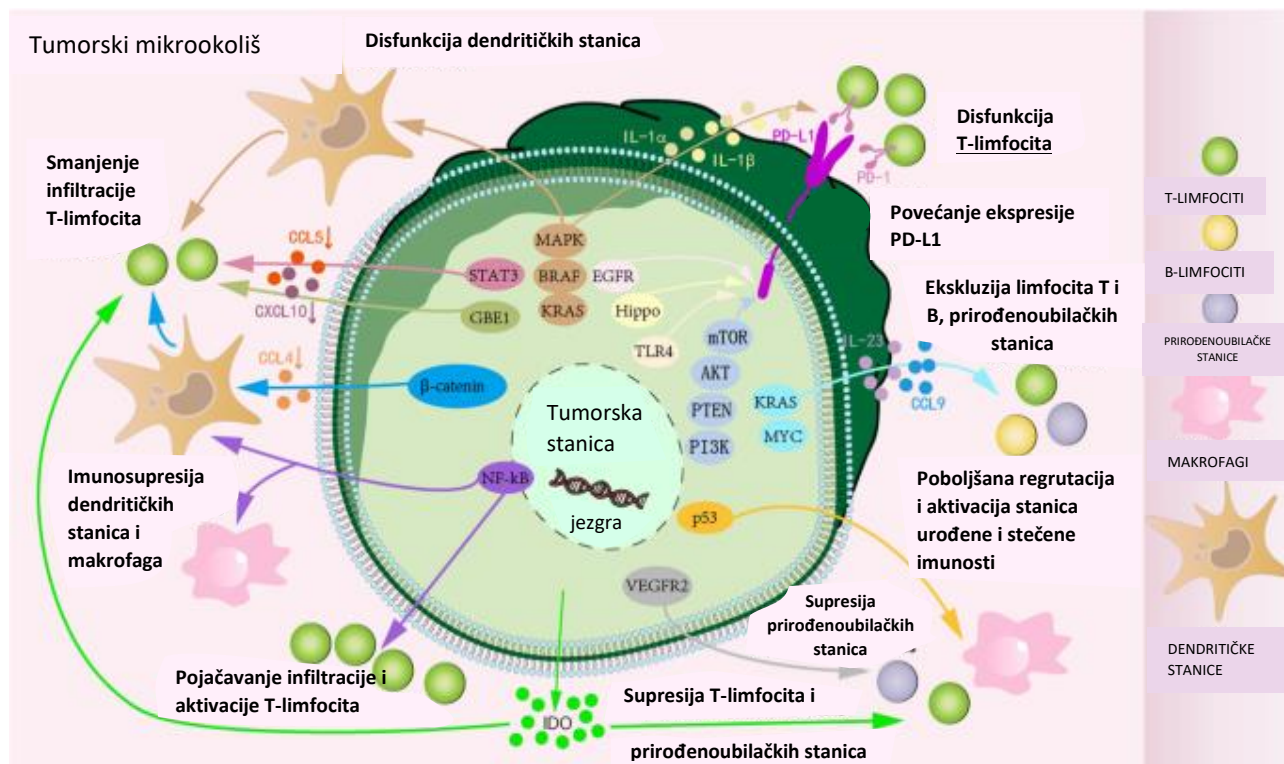
Tumorski mikrookoliš je jedinstvena cjelina koja ovisi o međustaničnim komunikacijama i interakcijama, koje mogu biti antitumorske ili imunosupresivne. Prevladavanje imunosupresivnih i protumorskih interakcija može potaknuti pojave mutacija koje dovode do aktivacija onkogenih signalnih putova koji pospješuju uvjete pogodne za tumorski bijeg (Nguyen i Springer, 2019).

##### Ključne imunosupresivne interakcije ili komunikacije tumorskog bijega

Imunosne stanice surađuju i komuniciraju s ostalim sastavnicama tumorskog staničnog mikrookoliša posredničkim tvarima ili direktnim kontaktom posredovani receptorima i adhezijskim molekulama. Potaknut raznim citokinima i proteazama izvanstanični matriks tumorskog mikrookoliša može biti organiziran kako bi imunosnom sustavu olakšavao infiltraciju i pružao migracijske putove do štetnog tumorskog tkiva ili pak može inhibirati proliferaciju i infiltraciju T-limfocita. Fibroblasti tumorske strome predstavljaju fizičku barijeru između tumorskih stanica i T-limfocita te luče citokine kojima polariziraju makrofage prema imunosupresivnom fenotipu M2. Krvne i limfne žile mogu osiguravati putove kojima imunosne stanice dolaze u mikrookoliš, a mogu i tumorske stanice opskrbljivati hranjivim tvarima (Whiteside, 2008; Arneth, 2019; Hinshaw i Shevde, 2019). Stanice strome luče imunosupresivne citokine koji posreduju u aktivaciji i novačenju imunosnih stanica imunosupresivna fenotipa ( $T_{reg}$ -limfociti, tolerantnih dendritičkih stanica, MDSCs, TAMs, TANS) (Kawakami i sur., 2013;



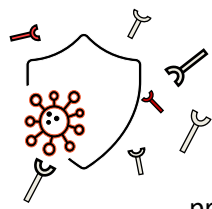
Yang i sur., 2019). Citotoksični T-limfociti tako unutar tumorskog mikrookoliša ulaze u interakcije s raznim imunskim stanicama koje imaju imunosupresivni fenotip (Slika 8.).



Slika 8. Onkogeni signalni putovi. Preuzeto i prilagođeno iz Yang i sur., 2019.

Imunosupresivne stanice imaju eksprimirane antigene koji ulaze u interakciju s receptorom inhibicije CTLA-4 i luče inhibicijske spojeve kojima potiču apoptozu CD8<sup>+</sup>-T-limfocita ili im onemogućuju izazivanje apoptoze, čime doprinose njihovu iscrpljivanju. Eksprimirani iscrpljeni fenotip T-limfocita potiče povećanje ekspresije receptora inhibicije, gubitka citotoksičnosti i apoptozu samih limfocita. Tumorske stanice, kao i imunosupresivne stanice, na membranama eksprimiraju molekule koje se vežu na receptore inhibicije T-limfocita; molekula galektin-9 se veže na receptor TIM-3, a molekula PD-L1 (od engl. *programmed cell death ligand 1*) se veže na receptor PD-1 (Slika 7.). Stanice tumorske strome i tumorske stanice dodatno otežavaju rad T-limfocita lučeći faktore, kao što su vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), indolamin 2,3-dioksigenaza (IDO), prostaglandin E2 (PGE2), adenzin i citokini (IL-6, TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ ) (Gajewski i sur., 2006; Martinez i Moon, 2019).

Uspostavom hipoksičnih uvjeta u tumorskom mikrookolišu povećava se proizvodnja vaskularnog endotelnog faktor rasta. Faktor VEGF se smatra glavnim posrednikom procesa angiogeneze i potiče polarizaciju makrofaga prema fenotipu M2 te je uočeno da utječe na smanjenje stope apoptoze tumorskih stanica. Može se vezati na tirozin-kinazne receptore VEGFR-1 ili VEGFR-2. Ukoliko kod imunskih stanica dolazi do eksprimiranja neispravnih receptora VEGFR-2 ili dolazi do njihova blokiranja kako se VEGF ne bi mogao vezati, dolazi do pojačanja imunskog odgovora predvođenog



prirođenoubilačkim stanicama (Carmeliet, 2005; Ge i sur., 2012; Martinez i Moon, 2019; Yang i sur., 2019).

Indolamin 2,3-dioksigenaza (IDO), enzim je koji sudjeluje u katalizi kataboličkih reakcija metabolizma aminokiseline triptofana. Tumorske stanice potiču njegovo prekomjerno eksprimiranje što izaziva smanjenje dostupne zalihe te aminokiseline čime se otežava preživljavanje citotoksičnih T-limfocita CD8<sup>+</sup>. Uz to, međuprodukt reakcije kinurenin ima sposobnost supresije imunskih stanica (Egen i sur., 2020). Enzim indolamin 2,3-dioksigenaza tako suzbija djelovanje citotoksičnih limfocita i prirođenoubilačkih stanica, a može uzrokovati aktivaciju imunosupresivnih stanica (MDSCs i T<sub>reg</sub>-limfocita) (Yang i sur., 2019).

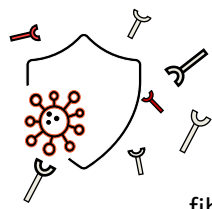
Prostaglandin E2 (PGE2), proupalni prostanoid, kojeg proizvodi enzim ciklooksigenaza (COX-1, COX-2) oslabljuje antitumorski imunski odgovor utječući na razvoj prirođenoubilačkih i dendritičkih stanica CD103<sup>+</sup> tako što utječe na njihovu sposobnost aktivacije T-limfocita CD8<sup>+</sup>. Prostaglandin E2 u suradnji s vaskularnim endotelnim faktorom rasta potiče eksprimiranje receptora smrti liganda Fas (FasL) na endotelnim stanicama koji se veže s proteinom Fas eksprimiranim na aktiviranim T-limfocitima CD8<sup>+</sup>. Uslijed te interakcije dolazi umiranja limfocita (Nguyen i Spranger, 2019).

Hipoksični uvjeti omogućuju nakupljanje adenoзина, koji ima imunosupresivno djelovanje, unutar izvanstaničnih prostora. U stanice ulazi pomoću receptora A2AR i potiče proizvodnju cikličkog adenzin-monofosfata (cAMP), koji inhibira proliferaciju i umanjuje citotoksičnost T-limfocita i prirođenoubilačkih stanica. On izaziva i poremećaje u proizvodnji citokina kod T-limfocita, makrofaga i dendritičkih stanica te utječe na njihovu sposobnost prezentiranja antigena, dok kod neutrofila izaziva oksidacijsku eksploziju (Martinez i Moon, 2019; Ohta, 2016; Gulfo, 2021; Ge, Tan, Sharghi-Namini i Asada, 2012).

Upalni citokin IL-6 posreduje kod prijelaza normalnih fibroblasta u njihov reaktivniji s tumorom povezani fenotip (CAF), koji potpomaže migraciju tumorskih stanica. Citokini TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  posreduju kod prijelaza mezenhimskih stanica u fibroblaste povezane s tumorima te reguliraju lučenje interleukina IL-8 (CXCL8) i upalnih citokina MCP-1 (od engl. *monocyte chemotactic protein-1*; CCL2) i CCL5, koji u tumorski mikrookoliš privlače monocite i makrofage imunosupresivna fenotipa (Kawakami i sur., 2013; Bussard i sur., 2016; Yang i sur., 2019).

### Signalni putovi promijenjeni kod tumorskog bijega

Uslijed povećane stope međusobne komunikacije na mjestima razvoja tumora dolazi do povećavanja koncentracije različitih citokina pod čijim utjecajem u tumorskim stanicama dolazi do trajne aktivacije ili mutacije nekih signalnih putova, što utječe na stvaranje imunosupresivnog okoliša (Slika 8.). Tako



fibroblasti povezani s tumorom lučenjem interleukina IL-1 $\beta$  mogu potaknuti aktivaciju signalnih putova fosfoinozimid 3-kinaze (PI3K) i NF- $\kappa$ B unutar tumorskih stanica (Bussard i sur., 2016).

#### Signalni put PI3K/PTEN/AKT/mTOR

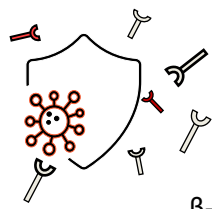
Razni citokini prisutni u mikrookolišu utječu na aktivaciju fosfoinozimid-3-kinaze, koja aktivira proteinsku kinazu B (AKT) što sudjeluje u proteinskoj kaskadi koja je u doticaju s regulatorima ekspresije gena bitnih za preživljavanje i proliferaciju. Tumorski supresor PTEN blokira djelovanje PI3K čime utječe na smanjenje stope aktivacije proteina AKT. Odsutnost inhibitora PTEN uzrokuje trajnu aktivaciju PI3K, što može rezultirati povećanjem ekspresije receptora PD-L1, inhibitora T-limfocita (Lastwika i sur., 2015). Gubitkom PTEN-a i trajnom aktivacijom PI3K/AKT/mTOR signalnog puta u tumorskim stanicama dolazi do smanjenja broja T-limfocita i ubilačkih stanica unutar tumorskog mikrookoliša, čime se postiže smanjenje koncentracije IFN- $\gamma$  i granzima B, a omogućuje se povećanje koncentracije citokina (CCL2, TNF, IL-6, IL-8, CSF-1 i VEGF-A) koji posreduju regrutiranju stanica imunosupresivna fenotipa te polarizaciji makrofaga prema fenotipu M2. Aktivacija ovog signalnog puta stoga pridonosi stvaranju imunosupresivnog mikrookoliša (Nguyen i Spranger, 2019; Zou i sur., 2020).

#### Signalni put NF- $\kappa$ B

Transkripcijski faktori nuklearnog faktora- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) upravljaju mnoštvom fizioloških procesa, staničnom proliferacijom, smrti i upalom. Za aktivaciju signalnog puta NF- $\kappa$ B mogu biti odgovorni i hipoksični uvjeti. Aktivacija signalnog puta NF- $\kappa$ B može izazvati antitumorski i imunosupresivni odgovor. U skladu s tim je u nekim tumorskim mikrookolišima njegovom aktivacijom zabilježeno povećano lučenje citokina (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 i IL-8) i enzima arginaze, što dovodi do supresije imunskog odgovora onesposobljavanjem dendritičkih stanica i regrutacijom te polarizacijom makrofaga. Aktivacija signalnog puta NF- $\kappa$ B unutar tumorskih stanica može poticati prekomjernu ekspresiju antiapoptotskih regulacijskih proteina što im omogućuje preživljavanje upalnih uvjeta. Tumorske stanice onda utječu na stanice strome kako bi proizvodile TNF- $\alpha$ , koji omogućuje proliferaciju i diferencijaciju stanica; razne metaloproteaze, koje omogućuju preuređenje izvanstaničnog matriksa; te faktora VEGF, koji potiče angiogenezu. U drugim slučajevima aktivacija signalnog puta NF- $\kappa$ B rezultira povećanim lučenjem kemokina koji privlače citotoksične T-limfocite i ekspresijom adhezijskih molekula koje im omogućuju infiltraciju na mjesto upale, čime se postiže jači antitumorski odgovor (Whiteside, 2008; Hoesel i Schmid, 2013; Yang i sur., 2019).

#### Signalni put WNT- $\beta$ -katenina

Signalni put WNT- $\beta$ -katenina sudjeluje u regulaciji važnih staničnih procesa, kao što su proliferacija, diferencijacija te održavanje genetske stabilnosti i putova koji potiču apoptozu. Protein  $\beta$ -katenin je važna komponenta proteinskog kompleksa o kojem signalni put ovisi. Aktivacijom signalnog puta WNT-



$\beta$ -katenin unutar tumorskih stanica dolazi do smanjenja proizvodnje kemokina CCL4, koji utječe na mobilizaciju dendritičkih stanica CD103<sup>+</sup> koje su sposobne križno prezentirati tumorske antigene T-limfocitima. Dendritičke stanice luče i kemokine CXCL9 i CXCL10 koji privlače T-limfocite, stoga njihovim onesposobljavanjem dolazi do slabije regrutacije T-limfocita u tumorski mikrookoliš. Smanjenjem populacije citotoksičnih T-limfocita dolazi do smanjena proizvodnje IFN- $\gamma$  i povećanja proizvodnje enzimaIDO u dendritičkim stanicama, što omogućava veću stopu preživljavanja tumorskih stanica (Pai i sur., 2017; Nguyen i Springer, 2019; Yang i sur., 2019).

### Signalni put STAT3

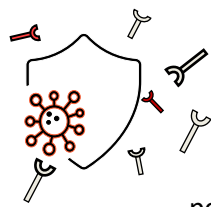
Aktivacija signalnog puta STAT3 (od engl. *signal transducer and activator of transcription 3*) ima važnu ulogu u uspostavi imunosupresivnog tumorskog mikrookoliša. Konstitutivno aktivni signalni put STAT3 unutar tumorskih stanica dovodi do smanjenja ekspresije proupalnih faktora, kao što su kemokini CCL5 i CXCL10, koji su odgovorni za regrutaciju i infiltraciju T-limfocita u tumorski mikrookoliš (Rébé i sur., 2013; Nguyen i Springer, 2019; Yang i sur., 2019).

Enzim za grananje glikogena (GBE1, od engl. *1,4-alpha-glucan branching enzyme 1*) posreduje u supresiji imunosnog antitumorskog odgovora. Inhibira proizvodnju kemokina CCL5 i CXCL10 koji su odgovorni za regrutaciju T-limfocita CD8<sup>+</sup> u tumorsko okružje aktivacijom signalnog puta IFN-I / STING, prilikom čega dolazi do povećane ekspresije receptora PD-L1 na tumorskim stanicama (Yang i sur., 2019).

### Signalni put Ras/Raf/ MEK/ERK

Signalni put RAS/RAF/MEK/ERK regulira ekspresiju gena bitnih za stanični ciklus, diferencijaciju te gena koji reguliraju aktivnost proteina vezanih za apoptozu. Reguliran je G-proteinima Ras i trima kinazama Raf (MAPKKK, od engl. *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*), MEK (od engl. *ERK kinase*, MAPKK), ERK (od engl. *extracellular-signal-regulated kinase*) koje se uzastopno fosforiliraju te tako aktiviraju i pojačavaju prenošeni signal. G-protein Ras može utjecati i na aktivaciju signalnog puta PI3K/AKT (Kolch, 2000). Ukoliko se unutar signalnog puta RAS/RAF/MEK/ERK nalazi mutirani protein K-Ras zabilježeno je povećanje ekspresije receptora PD-L1, dok se inhibicijom kinaze ERK otežava preživljavanje dendritičkih stanica i narušava njihova sposobnost osposobljavanja T-limfocita te se suzbija njihova proizvodnja citokina IL-12 i TNF- $\alpha$ . Također je uočeno da mutirani protein K-Ras pospješuje aktivaciju T<sub>reg</sub>-limfocita i neutrofila, čije citotoksične tvari mogu pridonijeti iscrpljenosti T-limfocita te tako dovesti do smanjenja antitumorskog odgovora. Kombinacijom mutiranog protein K-Ras unutar kaskade signalnog puta RAS/RAF/MEK/ERK i aktivacijom transkripcijskog faktora MYC, bitnog za regulaciju stanične proliferacije i diferencijacije uzrokuje se supresija imunosnog odgovora





poticanjem ekspresije receptora PD-L1 i povećanim lučenjem citokina IL-23 i CCL9 (Kolch, 2000; McCubrey i sur., 2007; Nguyen i Spranger, 2019; Yang i sur.,2019).

### Tumorski supresor p53

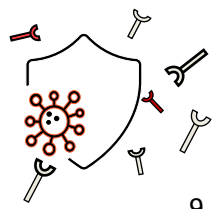
Mutacija u genu za tumorski supresor p53 jedno je od glavnih obilježja tumorskih stanica, stoga se stjecanjem funkcionalnog tumorskog supresora p53 pojačava antitumorski imunološki odgovor. Postiže se pojačana signalizacija pomoću proupalnih kemokina i citokina (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL1, CXCL2). Kemokin CCL2 u tumorski mikrookoliš privlači monocite, makrofage i prirođenoubilačke stanice koje svojim djelovanjem pomažu dendritičkim stanicama pri prikupljanju antigena prema kojima će specijalizirati T-limfocite (Nguyen i Spranger, 2019).

## 5. Zaključak

Imunosni sustav može prepoznati tumorske stanice kao nešto strano i štetno, ali ih nije uvijek u mogućnosti ukloniti. Tumori u interakciji s imunosnim sustavom stječu niz prilagodbi koje ih čine neprepoznatljivim i neuništivima. Stjecanjem sve više informacija o načinu funkcioniranja tumorskih stanica i njihovog mikrookoliša razvijaju se strategije za primjenu tih znanja u terapijskim postupcima.

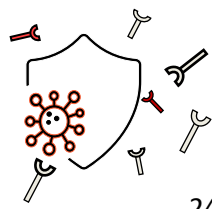
## 6. Literatura

1. Arneth, B. 2019. Tumor Microenvironment.
2. Baeriswyl, V. and Christofori, G. 2009. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 19(5), str.329-337.
3. Bussard, K., Mutkus, L., Stumpf, K., Gomez-Manzano, C. i Marini, F. 2016. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Research*, 18(1).
4. Carmeliet, P. 2005. VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. *Oncology*, 69(3), str.4-10.
5. Dunn, G., Bruce, A., Ikeda, H., Old, L. i Schreiber, R. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), str.991-998.
6. Dunn, G., Old, L. i Schreiber, R. 2004. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*, 21(2), str.137-148.
7. Egen, J., Ouyang, W. and Wu, L. 2020. Human Anti-tumor Immunity: Insights from Immunotherapy Clinical Trials. *Immunity*, 52(1), str.36-54
8. Gajewski, T., Meng, Y., Blank, C., Brown, I., Kacha, A., Kline, J. and Harlin, H. 2006. Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. *Immunological Reviews*, 213(1), str.131-145.

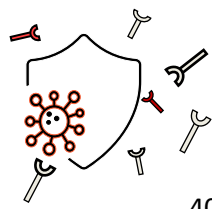


9. Ge, R., Tan, E., Sharghi-Namini, S. and Asada, H. 2012. Exosomes in Cancer Microenvironment and Beyond: have we Overlooked these Extracellular Messengers?. *Cancer Microenvironment*, 5(3), str.323-332.
10. Gulfo, J., 2021. *Adenosine – a critical checkpoint in the tumor microenvironment* | *Cancer Biology*. [online] Blogs.shu.edu. Preuzeto s: <<http://blogs.shu.edu/cancer/2018/02/21/adenosine-a-critical-checkpoint-in-the-tumor-microenvironment/>> [Datum pristupa: 14.06.2021.].
11. Hanahan, D. i Weinberg, R. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), str.646-674.
12. Hinshaw, D. i Shevde, L. 2019. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Research*, 79(18), str.4557-4566.
13. Hoesel, B. and Schmid, J. 2013. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer*, 12(1), str.86.
14. Hohl, T. 2015. Cell-Mediated Defense against Infection. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, str.50-69.
15. <https://wartzlab.johnshopkins.edu/research/tumor-microenvironment/> (zadnje pristupljeno 27.8.2021.)
16. Juretić, A., i Bašić-Koretić, M. 2017. Klinička imunoterapija raka blokadom molekularnih interakcija negativne povratne sprege. *Liječnički vjesnik*, 139(5-6).
17. Kawakami, Y., Yaguchi, T., Sumimoto, H., Kudo-Saito, C., Tsukamoto, N., Iwata-Kajihara, T., Nakamura, S., Nishio, H., Satomi, R., Kobayashi, A., Tanaka, M., Park, J., Kamijuku, H., Tsujikawa, T. and Kawamura, N. 2013. Roles of Signaling Pathways in Cancer Cells and Immune Cells in Generation of Immunosuppressive Tumor-Associated Microenvironments. *The Tumor Immunoenvironment*, str.307-323.
18. Kolch, W. 2000. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochemical Journal*, 351(2), str.289-305.
19. Kooij, I., Sahami, S., Meijer, S., Buskens, C. and te Velde, A., 2016. The immunology of the vermiform appendix: a review of the literature. *Clinical & Experimental Immunology*, 186(1), str.1-9.
20. Lastwika, K., Wilson, W., Li, Q., Norris, J., Xu, H., Ghazarian, S., Kitagawa, H., Kawabata, S., Taube, J., Yao, S., Liu, L., Gills, J. and Dennis, P. 2015. Control of PD-L1 Expression by Oncogenic Activation of the AKT–mTOR Pathway in Non–Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research*, 76(2), str.227-238.
21. LeBleu, V. 2015. Imaging the Tumor Microenvironment. *The Cancer Journal*, 21(3), str.174-178.
22. Martinez, M. and Moon, E. 2019. CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 10.
23. Murphy, K., Weaver, C. (2017): *Janeway's immunobiology*. 9th ed. Garland Science, New York





24. National Cancer Institute. 2021. NCI Dictionary of Cancer Terms. [online] Preuzeto s: <<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/tumor>> [Datum pristupa: 28.05.2021.].
25. Nguyen, K. and Spranger, S., 2019. Modulation of the immune microenvironment by tumor-intrinsic oncogenic signaling. *Journal of Cell Biology*, 219(1).
26. Niaid.nih.gov. 2021. *Features of an Immune Response*. [online] Preuzeto s: <<https://www.niaid.nih.gov/research/immune-response-features>> [Datum pristupa: 23.05.2021.].
27. Niaid.nih.gov. 2021. *Overview of the Immune System*. [online] Preuzeto s: <<https://www.niaid.nih.gov/research/immune-system-overview>> [Datum pristupa: 10.04.2021.].
28. Ohta, A., 2016. A Metabolic Immune Checkpoint: Adenosine in Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 7.
29. Oršolić, N. 2007. Interna skripta iz imunologije.
30. Pai, S., Carneiro, B., Mota, J., Costa, R., Leite, C., Barroso-Sousa, R., Kaplan, J., Chae, Y. and Giles, F. 2017. Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *Journal of Hematology & Oncology*, 10(1).
31. Rébé, C., Végran, F., Berger, H. and Ghiringhelli, F. 2013. STAT3 activation. *JAK-STAT*, 2(1).
32. Ribatti, D., Nico, B., Crivellato, E., Roccaro, A. and Vacca, A. 2006. The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia*, 21(1), str.44-52.
33. Rincón-Riveros, A., Lopez, L., Villegas, E. and Antonia Rodriguez, J. 2021. Regulation of Antitumor Immune Responses by Exosomes Derived from Tumor and Immune Cells. *Cancers*, 13(4), str.847.
34. Rungelrath, V., Kobayashi, S. and DeLeo, F. 2019. Neutrophils in innate immunity and systems biology-level approaches. *WIREs Systems Biology and Medicine*, 12(1).
35. Schreiber, R., Old, L. i Smyth, M. 2011. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*, 331(6024), str.1565-1570.
36. Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R., McKenzie, A., Mebius, R., Powrie, F. and Vivier, E. 2013. Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews Immunology*, 13(2), str.145-149.
37. Varol, C., Mildner, A. i Jung, S. 2015. Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annual Review of Immunology*, 33(1), str.643-675.
38. Vesely, M. i Schreiber, R. 2013. Cancer immunoediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1284(1), str.1-5.
39. Whiteside, T. 2008. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27(45), str.5904-5912.



40. Yang, L., Li, A., Lei, Q. and Zhang, Y. 2019. Tumor-intrinsic signaling pathways: key roles in the regulation of the immunosuppressive tumor microenvironment. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1).
41. Zhang, J., An, J. 2007. Cytokines, Inflammation, and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), str.27-37.
42. Zou, Z., Tao, T., Li, H. and Zhu, X. 2020. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. *Cell & Bioscience*, 10(1).

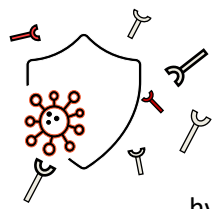
## 7. Sažetak

Imunosni je sustav zadužen za obranu organizma od štetnih mikroorganizama. Imunost je sposobnost imunskog sustava da uklanja štetne tvari i organizme te protiv njih pokreće obrambenu reakciju. Dijeli se na dva tipa, specifičnu (stečenu) i nespecifičnu (urođenu) imunost. Specifičnu imunost karakterizira proizvodnja antitijela ili stanica koje su specijalizirane za točno određeni antigen i njemu pripadnog uzročnika upale. Nespecifičnu imunost karakterizira brza reakcija na široki spektar uzročnika. Zajedničkim djelovanjem usporavaju i uklanjaju rast i razvoj tumora. Uspješnost razvoja tumora usko je povezana s njegovom sposobnošću uređivanja vlastitog mikrookoliša, mobilizacije okolnih stanica i polarizacije imunskih ka imunosupresivnom fenotipu. Značajnost uloge tumorskog mikrookoliša vidi se iz hipoteze imunskog uređivanja tumora koja se dijeli na tri glavne faze: faze uništavanja, ravnoteže i bijega tumora. Bijeg od imunskog sustava tumorske stanice osiguravaju aktivacijom ili promjenom raznih signalizacijskih putova i interakcija koje ublažavaju učinak imunskog odgovora ili onemogućuju njegovu funkciju. Uspostavom dominacije nad okolnim tkivom na mjestu nastanka tumorske stanice osiguravaju uvjete za širenje po organizmu, invaziju i metastaziranje.

**Ključne riječi:** imunosne stanice, citokini, imunosni odgovor, specifična i nespecifična imunost, tumorski stanični mikrookoliš, imunosno uređivanje tumora, tumorski bijeg, onkogeni signalni putovi

## 8. Summary

The role of the immune system is to protect the body by eliminating harmful substances and invading microorganisms. Its ability to do so is called immunity which can be divided into two types: innate and adaptive. The main attribute of innate immunity is the ability to swiftly respond to a wide range of pathogens, whereas adaptive immunity forms its response via the production of antibodies and cells that are specifically developed to recognize certain antigens and destroy their carriers. By coming together they interfere with the tumor development. Tumors are clusters of immortal cells which have acquired the ability of infinite growth. The success of their development lies in their proficiency in the manipulation of their microenvironment. The role of the tumor microenvironment is presented in the



hypothesis of cancer immunoediting, which is divided into three phases: elimination phase, equilibrium state, and tumor escape phase. The immunosuppressive conditions of the microenvironment that are imposed by cancer cells and their recruited cells facilitate tumor escape by activating or changing various signaling pathways which allow them further mitigation of the immune response. By establishing sheer dominance over the surrounding tissue the tumor ensures the conditions fit for the invasion.

**Keywords:** immune cells, cytokines, immune response, innate and adaptive immunity, tumor microenvironment, immunoediting, tumor escape, oncogenic signaling pathways

## 9. Životopis



### OSOBNI PODACI

**Ime i prezime:** Anja Krstulović

Rođena u Splitu, 8. srpnja 1999. godine. Osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje stečeno u Splitu. Trenutno studiram u Zagrebu.



### OBRAZOVANJE

Preddiplomski studij molekularne biologije | Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet

RUJAN 2018. – DANAS

Dobitnica državne STEM stipendije

Prosjek: 4,625

Srednja škola | Prirodoslovno-matematička gimnazija

RUJAN 2014. – SVIBANJ 2018.

1. nagrada na srednjoškolskom županijskom natjecanju iz biologije 2016. godine

2. nagrada na srednjoškolskom županijskom natjecanju iz biologije 2017. godine

2. nagrada na srednjoškolskom županijskom natjecanju iz hrvatskog jezika 2017. godine

2. nagrada na srednjoškolskom županijskom natjecanju iz biologije 2018. godine

1. nagrada na srednjoškolskom županijskom natjecanju iz hrvatskog jezika 2018. godine

Prosjek ocjena 4,94

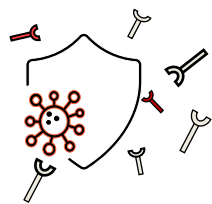
Dobitnica stipendije grada Splita

Osnovna škola | OŠ „Manuš“

RUJAN 2006. – LIPANJ 2014.



### VJEŠTINE



- Razina poznavanja engleskog jezika C1 (položen FCE i CAE)
- Iskusna u Microsoft Officeu
- Poznavanje programskog jezika C++ i C#