

# Naviko imuninės mikroaplinkos įtaka sergant nesmulkiųjų ląstelių plaučių vėžiu

THE ROLE OF TUMOR IMMUNE MICROENVIRONMENT IN NON-SMALL CELL LUNG CARCINOMA

GIEDRĖ GUREVIČIENĖ<sup>1</sup>, BRIGITA ŠITKAUSKIENĖ<sup>2</sup>, MARIUS ŽEMAITIS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LSMU MA Pulmonologijos klinika, <sup>2</sup>LSMU MA Imunologijos ir alergologijos klinika

**Santrauka.** Plaučių vėžys išlieka aktuali problema visame pasaulyje. Moksliniais tyrimais patvirtinta, jog imuninė sistema turi didelę įtaką daugiapakopiame vėžio vystymosi procese. Remiantis šiais duomenimis, kasdienėje klinikinėje praktikoje jau taikomas imunoterapinis gydymas, tačiau susiduriama su nauju iššūkiu – veiksmingiausio gydymo parinkimu konkrečiam pacientui. Dėl šios priežasties tęsiami tyrimai vėžio imunologijos srityje siekiant nustatyti predikcinius biožymenis.

**Reikšminiai žodžiai:** nesmulkiųjų ląstelių plaučių vėžys, imuninė sistema, programuotos ląstelių žūties baltymas (PD-1), programuotos ląstelių žūties baltymo ligandas (PD-L1).

**Summary.** Lung cancer remains a significant problem around the world. According to scientific research data, immune system plays significant role in multistage cancer development process. Based on these discoveries immunotherapy is used in clinical practice, but new challenges has occurred – choosing the right treatment to the right patient. Scientific researches are being continued in the field of cancer immunology in order to identify predictive biomarkers.

**Keywords:** non-small cell lung cancer, immune system, programmed cell death protein-1 (PD-1), programmed cell death ligand-1 (PD-L1).

### ĮŽANGA

Plaučių vėžys – tai viena dažniausių onkologinių ligų, kurios išgyvenamumo rezultatai, lyginant su kitomis vėžinėmis ligomis, yra vieni mažiausių [1]. Vienas dažniausių plaučių vėžio histologinių tipų yra nesmulkiųjų ląstelių plaučių vėžys (NSLPV), sudarantis 80–85 proc. visų plaučių vėžio atvejų. Deja, šiandien nepakanka nustatyti histologinį plaučių vėžio tipą. Siekiant parinkti pacientui tinkamiausią ir veiksmingiausią gydymą, būtinas nuodugnus molekulinės vėžio sudėties tyrimas bei predikcinių veiksmų įvertinimas [2].

Dabartinė vėžio imunologijos teorija pagrįsta G. Dunn, L. Old ir R. Schreiber eksperimentinių ir klinikinių tyrimų rezultatais. Ji remiasi koncepcija, kad onkogenezės procese dalyvauja tarpusavyje sąveikaujantys navikas bei imuninė sistema, o jų sąveika, kitaip vadinama imuninės sistemos priežiūra (angl. *immunoediting*), kinta navikui augant ir plintant [3–5]. Išskiriami trys šios sąveikos etapai: eliminacijos, pusiausvyros ir išvengimo [6, 7].

Atrasti imuninės sistemos kontrolės taškai (angl. *immune check points*), tokie kaip, citotoksinis T limfocitų baltymas 4 (angl. *cytotoxic T-lymphocyte protein 4*, CTLA4), programuotos ląstelės žūties baltymas 1 (angl. *programmed cell death protein 1*, PD-1), programuotos ląstelės žūties baltymo ligandas 1 (angl. *programmed cell death ligand 1*, PD-L1), lėmė tikrą proveržį onkologinių ligų gydyme, o jų atradėjai J. P. Allison ir T. Honju 2018 m. buvo įvertinti Nobelio premija. Nustatyti

imuninės sistemos kontrolės mechanizmai lėmė naujų imunoterapinių vaistų sukūrimą, kurie jau vartojami klinikinėje praktikoje. Nors nustatytas reikšmingas ryšys tarp imunohistocheminės PD-L1 raiškos ir klinikinio atsako į anti PD-1 ir anti PD-L1 antikūnus, vien PD-L1 žymens nustatymu negalima patikimai atrinkti pacientus, kuriems imunoterapija būtų veiksmingiausia [9]. Tęsimų klinikinių tyrimų duomenimis, atsaką į imunoterapinį gydymą lemia ne tik PD-L1 raiška, bet ir aktyvios imuninės ląstelės bei jų pasiskirstymas navikiniame audinyje – naviko imuninė mikroaplinka (angl. *tumor immune microenvironment*) [10].

### NAVIKAS IR IMUNINĖ SISTEMA

Imuninė sistema atlieka pirminę gynybinę funkciją atpažįstant ir sunaikinant navikines ląsteles, užkertant kelią vėžio vystymuisi bei augimui. Išskiriami trys imuninės sistemos priežiūros etapai: sunaikinimo, pusiausvyros ir išvengimo [6, 7].

Navikinių ląstelių sunaikinimo (angl. *elimination*) etape, dalyvaujant įgimto ir įgyto imuniteto komponentams (ląstelėms natūralioms žudikėms, angl. *natural killer cells*, NK; makrofagams, citotoksiniams T limfocitams) sunaikinamos pakitusios organizmo ląstelės. Imuninei sistemai nepavykus sunaikinti visų navikinių ląstelių, tarp imuninių ir navikinių ląstelių nusistovi pusiausvyra (angl. *equilibrium*). Šiame etape vėžinės ląstelės nesunaikinamos, tačiau imuninė sistema stabdo tolesnį jų dauginimąsi. Lygiagrečiai navikas

formuoja sau palankią – imuninę sistemą slopinamąją mikroaplinką: vyksta naviko sukeltų specifinių priešnavikinių reakcijų slopinimas, navikinių antigenų toleravimas, reguliacinių ląstelių stimuliacija. Ilgainiui navikinėse ląstelėse kaupiasi mutacijos ir susiformuoja tokie ląstelių klonai, kurių imuninė sistema jau negali kontroliuoti – navikinės ląstelės „pabėga“ nuo imuninės sistemos priežiūros ir prasideda naviko progresavimas ir klinikinis naviko formavimasis (angl. *evasion*). Taigi, gebėjimas išvengti imuninės sistemos priežiūros – viena svarbiausių navikinio proceso savybių, lemianti onkologinių ligų vystymąsi ir progresavimą [6, 7].

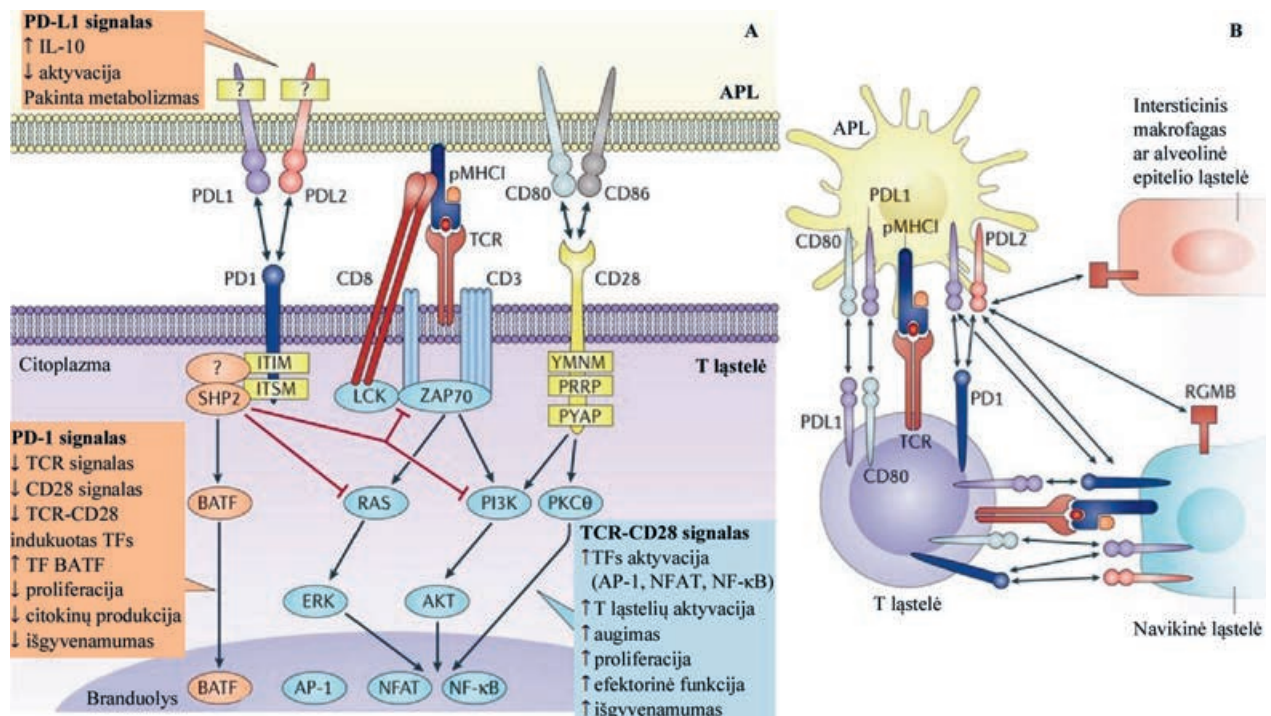
## IMUNINĖS SISTEMOS KONTROLĖS TAŠKAI

Efektorinės ląstelės atsakingos už įgytą imunitetą (pagrindė T ir B ląstelės) geba atskirti savas ir svetimas ląsteles, tačiau dėl atpažinimo klaidos kartais užpuolamos ir nepakitusios organizmo ląstelės. Siekiant išvengti per didelio imuninės sistemos aktyvumo, išsivystė imuninės sistemos kontrolės taškai, tokie kaip, CTLA-4, PD-1, PD-L1 ir daugelis kitų [8].

PD-1 yra vienas svarbiausių imuninės sistemos kontrolės taškų. Jis gali būti ekspresuojamas plataus veikimo imuninių ląstelių (monocitų, dendritinių, NK ląstelių, B limfocitų), tačiau didžiausia raiška nustatoma ant aktyvuotų T limfocitų [11]. Nustatyti du PD-1

ligandai (angl. *programmed cell death ligand*): PD-L1 ir PD-L2, kurie veikia kaip koinhibitoriai. PD-L1 savo amino rūgščių struktūra yra panašus į PD-1 ir gali būti ekspresuojamas ne tik plataus veikimo hemopoetinių ląstelių (T pagalbininkų (CD4+), T citotoksinių (CD8+), T reguliacinių ląstelių, B limfocitų, NK ląstelių, makrofagų, dendritinių ląstelių), bet ir nehemopoetinių ląstelių (endotelio, epitelio, navikinių ląstelių) [12]. Jo raiška būdinga įvairiems vėžio tipams, tarp jų ir NSLPV, tačiau nustatoma ne visais jų atvejais. Tuo tarpu PD-L2 raiška yra žymiai mažiau paplitusi tarp įvairių navikų ir nustatoma tik ant makrofagų ir dendritinių ląstelių. PD-L2 veikimas siejamas su T ląstelių aktyvavimu ir poliarizacija. PD-L1 dėl savo plataus pasiskirstymo įvairaus tipo ląstelėse yra siejamas su bendresnio tipo vaidmeniu apsaugant audinio ląsteles nuo per daug išreikšto uždegimo [13]. Vėžio atveju gali būti ekspresuojami dideli PD-L1 ir PD-L2 kiekiai [12].

PD-L1 raišką kontroliuoja keletas mechanizmų. PD-L1 yra aktyvinamas uždegimą skatinamųjų molekulių, kurias išskiria naviko stromos bei aktyvuotos T ląstelės. Naviko ląstelės ir jo mikroaplinka, aktyvindamos PD-L1 raišką kaip atsaką į aktyvuotų T ląstelių išskiriamą IFN $\gamma$ , apsisaugo nuo imuninės sistemos sunaikinimo – įgyja imuninį atsparumą. PD-L1 veikla reguliuojama ir onkogenų: normos atveju PTEN – vėžio vystymąsi



**1 pav. Programuotos ląstelės žūties baltymo 1 (PD-1) ir programuotos ląstelės žūties baltymo ligando 1 (PD-L1) signalo kelias T ląstelėse (modifikuota pagal Sharpe A.H., 2018) [14]: (A) PD-1/PD-L1 signalo kelias T ląstelėse; (B) PD-1, PD-L1 jungimosi galimybės.**

AP-1 – aktyvuojantis baltymas 1; APL – antigeną pateikianti ląstelė; BATF – į ATF panašus leukino transkripcijos faktorius; IL – interleukinas; NF-κB – branduolio transkripcijos faktorius –κB; PD-1 – programuotos ląstelės žūties baltymas 1; PD-L1 – programuotos ląstelės žūties baltymo ligandas 1; PD-L2 – programuotos ląstelės žūties baltymo ligandas 2; PI3K – fosfoinozitolido 3 – kinazė; pMHC1 – MHC klasės I kompleksas; TCR – T ląstelių receptorius; TF – transkripcijos faktorius; NFAT – aktyvuotų T ląstelių branduolio transkripcijos faktorius.

# Moksliniai darbai ir apžvalgos

slopinantis genas slopina PD-L1 raišką, tačiau vėžio atveju, įvykus šio geno mutacijai, sukeliamas priešingas poveikis – aktyvinama ir didėja PD-L1 matricinė ribonukleorūgštis (mRNR) transliacija ir plazminės membranos PD-L1 raiška. Taip pat nustatyta, jog PD-L1 raiška yra glaudžiai susijusi su CD8+ T ląstelėmis, nepriklausomai nuo onkogenų reguliacijos. PD-L1 gali jungtis su T ląstelių ekspresuojamu CD80 ir sukelti neigiamą reguliuojamą signalą. PD-1, PD-L1 jungimosi galimybės pavaizduotos 1 paveiksle [13, 14].

Remiantis tuo, kad navikinės ląstelės gali išvengti šeimininko imuninės sistemos priežiūros ekspresuojant PD-L1, kuris, jungdamas su PD-1, esančiu ant T ląstelių, sukelia imuninės sistemos slopinimą, sukurti imunoterapiniai preparatai – PD1 ir PD-L1 antagonistai [11]. Jų veikimas pagrįstas PD-1/PD-L1 kelio blokavimu. Naudojant žmogaus monokloninius antikūnus – PD-1/PD-L1 antagonistus, padidėja funkcionuojančių navikui specifinių T ląstelių kiekis [14]. Nepaisant to, kad imunoterapinis gydymas yra daug žadantis, susiduriama su naujais iššūkiais – pacientų atranka, kuriems šis gydymas suteiktų didžiausią naudą [15].

## NAVIKO IMUNINĖ MIKROAPLINKA

Navikinis audinys sudarytas ne tik iš navikinių ląstelių. Jas supa stroma, kurią sudaro nenavikinės ląstelės ir ekstraląstelinis matriksas (2 pav.) [16, 17]. Klinikiniais tyrimais įrodyta, jog ir minėtos naviko stromos ląstelės bei jų išskiriamos medžiagos dalyvauja navikinių audinių vystymosi, augimo ir plitimo procesuose [18].

Histologiškai navikai gali būti skirstomi į uždegiminius ir neuždegiminius. Uždegiminio naviko atveju yra aktyvus priešvėžinis imuninis atsakas: navikiniame audinyje gausu naviką infiltruojančių limfocitų (angl. *tumor-infiltrating lymphocytes*, TIL), IFN $\gamma$  gaminančių CD8+ T ląstelių, dažnai nustatoma PD-L1 raiška ir

galimas genomo nestabilumas. Neuždegiminio naviko atveju priešvėžinio imuninio atsako nėra arba jis silpnas. Šios grupės navikuose PD-L1 raiška nustatoma retai, TIL – tik pavieniai, žema antigenų pateikiančių žymenų, įskaitant pagrindinio audinių suderinamumo komplekso (angl. *major histocompatibility complex*, MHC) klasę I, raiška, mažas naviko mutacijų kiekis [19].

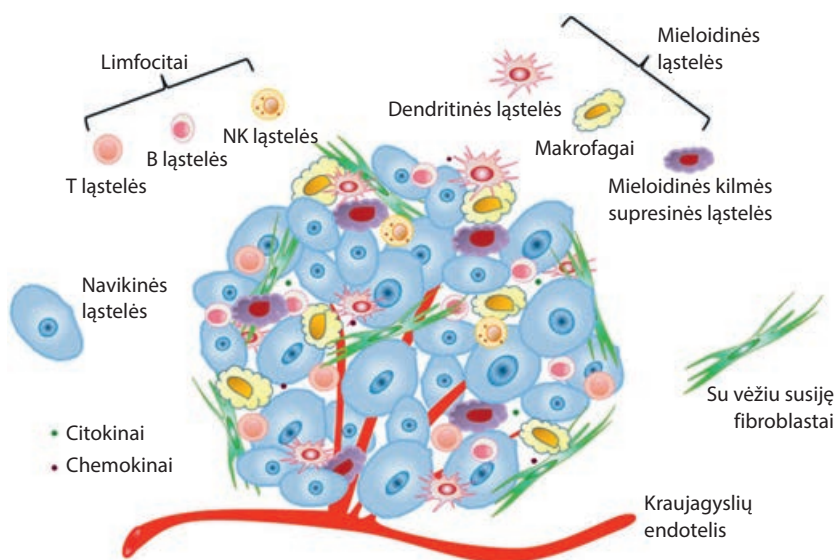
Šiuo metu galima išskirti tris dideles naviko imuninės mikroaplinkos klases:

Imuninio atribojimo (angl. *infiltrated-excluded*, IE) naviko mikroaplinkai būdingas didelis imuninių ląstelių kiekis šerdyje, tačiau citotoksiniai limfocitai (angl. *cytotoxic lymphocytes*, CTLs) svarbūs navikinių ląstelių sunaikinime, dėstosi ne naviko centre, bet jo kraštuose arba fibroziniuose lizduose. Imuninio atribojimo naviko mikroaplinka laikoma silpnai imunogeniška. Manoma, jog su naviku susiję makrofagai (angl. *tumor-associated macrophages*), išsidėstę navikinio audinio kraštuose, gali apsaugoti likusį navikinį audinį nuo CTLs patekimo į naviko šerdį. Susiformuoja tokia imunologinė būklė, kurios atveju įgytas imunitetas negeba atpažinti piktybinių ląstelių, ar atpažinus negeba sukelti adekvačios imuninės reakcijos [10].

Uždegiminės naviko mikroaplinkos (angl. *infiltrated-inflamed*, II) atveju navikinis audinys yra gausiai infiltruotas imuninių ląstelių su aktyvia PD-1 ir PD-L1 raiška. Šio tipo navikai vertinami kaip imunogeniški navikai [7]. Tretinės limfoidinės struktūros (angl. *tertiary lymphoid structures*) naviko imuninė mikroaplinka – tai uždegiminės naviko imuninės mikroaplinkos poklasis. Šiuo atveju naviką infiltruojančių ląstelių sudėtis yra panaši į limfmazgių, o tretinės limfoidinės struktūros daugiausia išsidėsto invaziniuose naviko kraštuose bei jo stromoje ir susiję su imuninio atsako aktyvacija [10].

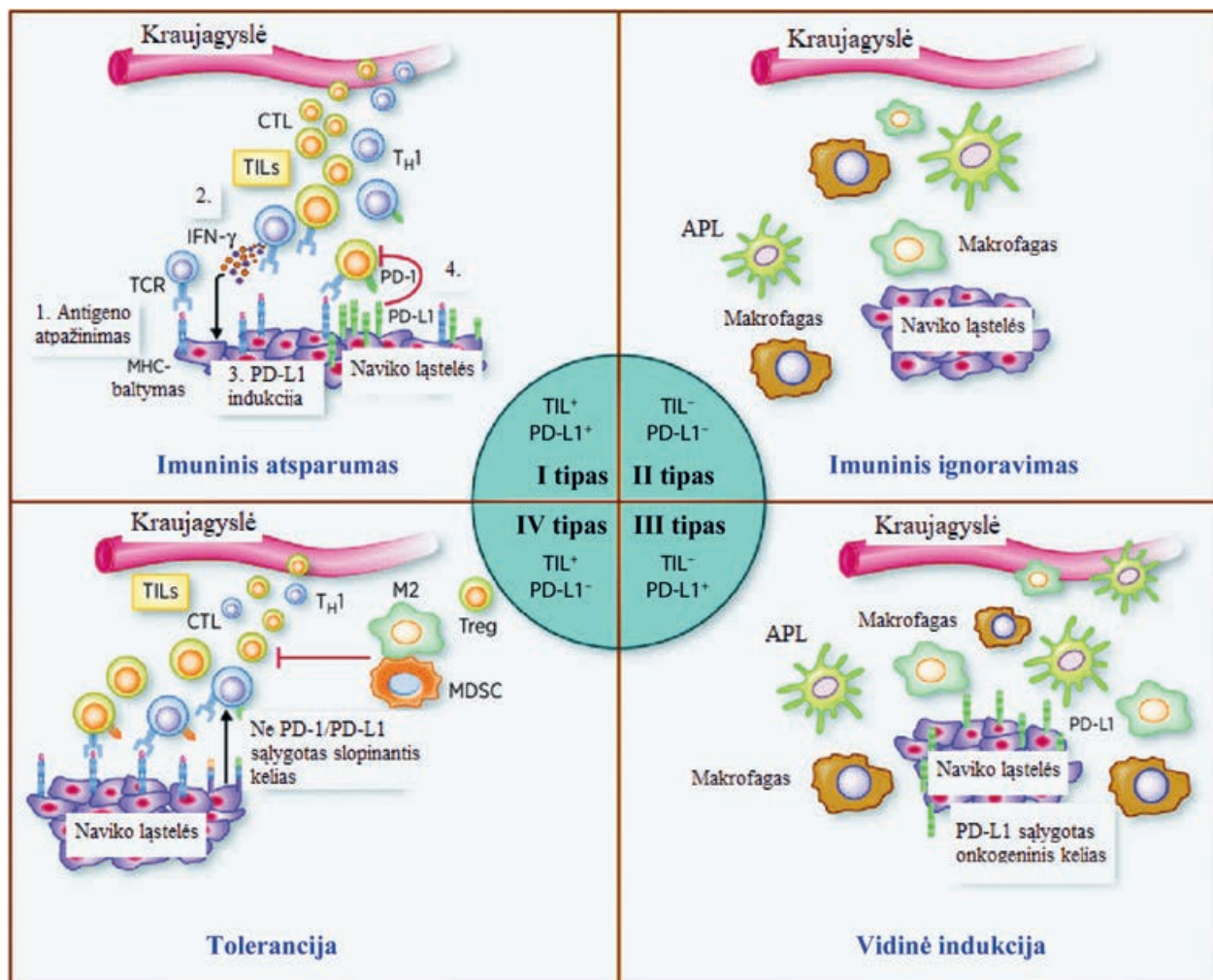
Imuninės „dykumos“ (angl. *immune desert*, ID) atveju imuninių ląstelių navikiniame ir jį supančiame audinyje nenustatoma arba randami minimalūs jų kiekiai [20].

Remiantis TILs pasiskirstymu bei PD-L1 raiška, navikus galima skirstyti į keturis tipus (3 pav.) [18]: I tipas – prisitaikančio imuninioatsparumo (angl. *adaptive immune resistance*), esant PD-L1+/TILs+; II tipas – imuninio ignoravimo (angl. *immunological ignorance*), esant PD-L1-/TILs-; III tipas – vidinės indukcijos (angl. *intrinsic induction*), esant PD-L1+/TILs-; IV tipas – tolerancijos (angl. *tolerance*), esant PD-L1-/TILs+. Šis skirstymas yra paprastas, tačiau informatyvus renkantis tinkamiausią gydymo variantą konkrečiam pacientui prognozuojant atsaką į gydymą.



2 pav. Naviko imuninė mikroaplinka (modifikuota pagal Cui Y. ir kt., 2016) [17]





**3 pav. Naviko mikroaplinkos potipiai, atsižvelgiant į TILs pasiskirstymą ir PD-L1 raišką (modifikuota pagal Teng M. W. ir kt., 2015) [21]**

TILs – naviką infiltruojantys limfocitai; PD-L1 – programuotos ląstelės mirties ligandas 1. APL – antigeną pateikianti ląstelė; M2 – M2 makrofagai; MDSC – mieloidinės kilmės supresinės ląstelės; PD-1 – programuotos ląstelės mirties baltymas 1; PD-L1 – programuotos ląstelės mirties ligandas 1; Th1 – T pagalbininkai 1; TILs – naviką infiltruojantys limfocitai; Treg – regulatorinės T ląstelės.

Tęsiant klinikinius tyrimus, nustatyta, jog svarbų vaidmenį atlieka ne tik TILs, bet ir kitos naviko imuninė aplinka sudarančios imuninės ląstelės. Dar daugiau, ne tik minėtų ląstelių buvimas, tačiau ir jų lokalizacija – pasiskirstymas stromoje arba navikiniame audinyje, yra susijęs su pacientų prognoze [22]. Tačiau rezultatai nėra vienareikšmiai, stinga išsamesnių tyrimų.

## IMUNINIŲ LĄSTELIŲ VAIDMUO SERGANT NSLPV

### Neutrofilai

Neutrofilai – tai įgimto imuniteto ląstelės, išskiriančios proteinazes, pažeidžiančias supančius audinius bei gaminančios citokinus ir chemokinus, kurie aktyvina kitas uždegimines ląsteles ir taip sukelia imuninį atsaką [3, 23, 24]. Su naviku susiję neutrofilai (angl. *tumor associated neutrophils*, TANs) pagal savo fenotipus gali būti skirstomi į N1 ir N2. N1 TANs rodo uždegimą skatinamąjį ir priešnavikinį veikimą [3]. Tačiau, navikui

progresuojant, citokinai, predominuojantys TGFβ, ir uždegiminė mikroaplinka skatina TANs diferencijuotis į N2 fenotipą, kuris yra navikui palankus [25]. Šie N2 TANs, išskirdami VEGF, aktyvina angiogenezę, ekspresuodami arginazę 1, slopina citotoksinių T ląstelių priešnavikinį poveikį ir taip skatina naviko progresavimą bei metastazavimą [3, 26]. Neutrofilų gaminamos aktyviosios deguonies formos (angl. *reactive oxygen species*, ROS) geba inicijuoti navikinių ląstelių naikinimą ir yra svarbūs ankstyvosiose naviko vystymosi stadijose. Tačiau tais atvejais, kai neutrofilų išskirtos ROS nepakanka nužudyti navikines ląsteles, jie gali netiesiogiai skatinti naviko augimą per deoksiribonukleorūgščių (DNR) pažeidimą ir genų toksiškumą [3, 24].

### T ląstelės

#### Reguliacinės T ląstelės

Reguliacinės T ląstelės (angl. *regulatory T cells*, Tregs) – tai immunosupresinės ląstelės, atliekančios pagrindinį

# Moksliniai darbai ir apžvalgos

vaidmenį palaikant toleranciją nuosavoms ląstelėms ir imuninę homeostazę. Jos infiltruoja naviko stromą ir siejamos su navikui palankiu poveikiu. CTLA4 raiška ant Tregs blokuoja T ląstelių aktyvaciją. TGF- $\beta$  raiška taip pat susijusi su citotoksinės T ląstelių funkcijos slopinimu. Tregs taip pat ekspresuoja didelius IL-2 receptorių kiekius, kurie sudaro jungtis su serumo IL-2 – citokinu, svarbiu CD8+ ląstelių proliferacijai ir diferenciacijai. Taigi, Tregs buvimas sąlygoja serumo IL-2 sunaudojimą, dėl to ribojama nesubrendusių efektorinių T ląstelių diferenciacija. Be to, Tregs gali netiesiogiai trukdyti CD8+ T ląstelių diferenciaciją slopindamas su naviku susijusių dendritinių ląstelių raišką ir imunogeniškumą, dėl to sumažėja IFN $\gamma$  sekrecija ir naviko kontrolė tampa nepakankama [3].

## CD4+ T ląstelės

Vienos iš Tregs – CD4+ ląstelės, kitaip – T<sub>H</sub> limfocitai (angl. *helper*, padėjėjas) atpažįsta antigenus, kuriuos išskiria MHC II klasės molekulės, ekspresuojamos ant antigeną išskiriančių ląstelių (angl. *antigen presenting cells*, APCs). CD4+ ląstelės, esančios naviko aplinkoje, gali tiesiogiai paveikti MHC II klasės molekules ekspresuojančias navikines ląsteles ir taip sukelti jų žūtį, arba netiesiogiai – išlaisvinant citokinus, kurie aktyvuoja imunines ląsteles, turinčias naviką žudomąjį poveikį. Šių ląstelių poveikis navikui nepalankus [3].

## CD8+ T ląstelės

CD8+ ląstelės, kitaip – T<sub>C</sub> limfocitai (angl. *cytotoxic* – citotoksinis) atpažįsta antigenus, kuriuos išskiria MHC I klasės molekulės, ekspresuojamos visų organizmo ląstelių, ir, susijungę su jais, išlaisvina citotoksinius, tokius kaip, perforinas arba granzimas B (GZMB), dėl to sukeliama ląstelės taikinio žūtis [27].

Navikinės ir aktyvuotos CD8+ ląstelės kaip energijos šaltinį paprastai naudoja aerobinį glikolizės kelią ir konkuruoja tarpusavyje, o gliukozės stygius naviko mikroaplinkoje sąlygoja silpnesnį uždegiminį CD8+ T ląstelių sukliamą atsaką. Be to, vyraujant aerobinei glikolizei, stromoje taip pat susikaupia didelis toksiškų metabolitų kiekis, dėl to sutrikdoma T ląstelių veikla [3].

Svarbu pažymėti, kad, esant užsitęsusiai antigenų ekspozicijai, CD8+ ląstelės gali būti išsekusios. Tai apsauginis organizmo mechanizmas, kuriuo pasinaudojusios vėžinės ląstelės geba „pergudrauti“ imuninę sistemą nukreipdamos ją savo naudai. Ilgalais T ląstelių poveikis gausybei panašių antigenų sukelti signalus, kuriais skatinama inhibuojamųjų molekulių, tokių kaip, CTLA4 ir PD-1 raiška. CTLA4, sudarydamas stiprią jungtį su CD28, sutrikdo T ląstelių aktyvaciją. Didėjant T ląstelių aktyvacijos slenksčiui, silpni antigenai, pvz., navikinių ląstelių, negali sukelti T ląstelių aktyvacijos. Tuo tarpu PD-1, sąveikaudamas su PD-L1, PD-L2, savo ruožtu slopina efektorinę T ląstelių funkciją ir skatina jų apoptozę [3].

## B ląstelės

Klinikinių tyrimų su žmonėmis ir pelėmis rezultatai parodė, jog yra B reguliacinių ląstelių (angl. *B regulatory cells*, Bregs) poklasis, sukeliantis navikui palankų poveikį. Bregs išskiria imunosupresinius citokinus (pvz., TGF-beta, IL-10), taip palaikydamos imuninę toleranciją ir slopindamos autoimuninį bei uždegiminį atsaką. Be to, Bregs, ekspresuodamos imuninės sistemos kontrolės taškus (pvz., PD-L1), slopina NK ir T ląsteles, o sąlygodamos CD4+ virtimą į Tregs skatina naviko metastazavimą.

Kita vertus, nustatytas B ląstelių pogrupis, turintis ir priešnavikinį poveikį. Šiuo atveju B ląstelės tarnauja kaip antigeną išskiriančios ląstelės (angl. *antigen presenting cells*, APCs), kurios prisideda prie naviką infiltruojančių T ląstelių išgyvenimo ir proliferacijos [3].

## NK ląstelės

NK ląstelės priklauso įgimtam imunitetui ir atlieka citotoksinę funkciją. NK ląstelės aktyvuojamos, kai tiesiogiai atpažįsta pakitusias molekules navikinių ląstelių paviršiuje arba sąveikauja su jų antikūnais [3]. Tačiau tai įvyksta tik tada, jei negaunamas slopinamasis signalas, kuris perduodamas inhibuojantiems NK ląstelių receptoriams, sąveikaujant su ląstelės „taikinio“ paviršiuje ekspresuojamomis MHC-I klasės molekulėmis [28, 29]. Navikinės ląstelės paprastai slopina MHC I raišką tam, kad išvengtų T ląstelių citotoksiško poveikio ir tampa jautrios NK ląstelių inicijuotai ląstelės mirčiai [3]. Tą parodė ir M. Burnet bei L. Thomas atlikti tyrimai su imunosupresinėmis pelėmis. Pelių, turinčių mažą T limfocitų kiekį, tačiau normalių NK ląstelių kiekį bei išlikusia gera jų funkcija, navikų vystymosi dažnis nebuvo didesnis nei pelių, kurių imuninė sistema būna nepakitusi [4].

## Makrofagai

Makrofagai randami beveik visuose audiniuose, jie turi didelę įtaką audinio homeostazės palaikyme. Aukštas šių ląstelių plastiškumas ir įvairovė leidžia su naviku susijusiems makrofagams keisti fenotipą ir dalytis į du skirtingus potipius: klasikiniu keliu aktyvuotus (angl. *classically activated*) M1 makrofagus – uždegiminį fenotipą ir alternatyviu keliu aktyvuotus M2 makrofagus – neuždegiminį fenotipą [3].

Su naviku susijusių M1 makrofagų vystymąsi indukuoja IFN $\gamma$  savarankiškai arba kartu su kitais stimuliuojamaisiais faktoriais [30]. Šie makrofagai produkuoja uždegimą skatinamuosius citokinus azoto oksidą ir (arba) reaktyvieji deguonies tarpiniai produktai (angl. *reactive oxygen intermediates*, ROI), kurie skatina imuninės sistemos atsaką prieš navikines ląsteles. Su naviku susiję M2 makrofagai susidaro, kai monocitus stimuliuoja IL-4 ir IL-13 su imuniniais kompleksais arba su IL-10 ir gliukokortikoidais. M2

makrofagai gamina uždegimą slopinamuosius citokinus ir dalyvauja žaizdų gijime, slopindami uždegimines reakcijas, aktyvuodami angiogenezę ir sukeldami jungiamojo audinio remodeliaciją. Taigi, šios ląstelės sąlygoja slopinamąjį imuninį atsaką ir prieš navikines ląsteles [3].

Su naviku susiję makrofagai gali padėti išvengti imuninės sistemos priežiūros dviem būdais: tiesiogiai stabdant citotoksinį CD8+ T ląstelių atsaką per PD-L1/PD-L2 raišką arba išskiriant imunosupresinius citokinus ir proteazes, tokius kaip, arginazė-1, IL-10, TGF- $\beta$  ir prostaglandinai, kurie slopina T ląstelių aktyvaciją [3].

## KLINIKINĖ NAVIKO IMUNINĖS MIKROAPLINKOS REIKŠMĖ

Plečiantis gydymo pasirinkimo galimybėms, predikcinių biožymenų nustatymas tampa vienu svarbiausių tikslų. Nustatyta sąsaja tarp imunohistocheminės PD-L1 raiškos ir klinikinio atsako į anti PD-1, anti PD-L1 antikūnus [16]. I fazės klinikinio tyrimo duomenimis, iš pacientų, kuriems nustatyta PD-L1 raiška navikiniame audinyje  $\geq 5$  proc., 36 proc. konstatuotas objektyvus atsakas (angl. *objective response*, OR) taikant imunoterapinį gydymą anti PD-1 antikūnais [31]. Tačiau kito tyrimo duomenimis, taikant gydymą anti PD-L1 antikūnais pacientams, kuriems nustatyta teigiama PD-L1 raiška, OR konstatuotas tik 13 proc. tiriamųjų [32]. Prieštaringus rezultatus gali lemti keletas veiksnių: skirtingi antikūnai ir platformos PD-L1 nustatyti, skirtingi PD-L1 raiškos slenksčiai ir vertinimas, skirtingas tyrimo objektas (navikinės ar imuninės ląstelės), kiti veiksniai, turintys įtakos imunotolerancijai [9, 15, 33].

Remiantis III fazės klinikinio tyrimo rezultatais, gydant anti PD-1 antikūnais, esant NSLPV ir PD-L1 raiškai  $\geq 50$  proc., OR siekė 45 proc. Taip pat nustatytas statistiškai reikšmingas bendrojo išgyvenamumo bei išgyvenamumo be ligos progresavimo prailgėjimas taikant imunoterapiją, lyginant su gydymu platinos pagrindu [34]. Remiantis kitų klinikinių tyrimų duomenimis, teigiamas klinikinis poveikis gydant NSLPV anti PD-1 arba anti PD-L1 taip pat nustatytas iki 40–50 proc. [9]. Tačiau yra ir prieštaringų rezultatų: nepaisant aukštos PD-L1 raiškos, nesulaukiama teigiamo klinikinio atsako, tuo tarpu netgi esant neigiamai PD-L1 raiškai, užregistruoti teigiamo klinikinio atsako atvejai. III fazės klinikinio tyrimo metu, taikant gydymą anti PD-L1 antikūnais, esant NSLPV progresavimui po taikyto chemoterapinio gydymo platinos pagrindu, OR siekė nuo 0 iki 33 proc.: nenustačius PD-L1 raiškos – 8 proc., esant PD-L1  $\geq 50$  proc. – 31 proc. [9, 13, 35]. Tęsiant klinikinius tyrimus, patvirtinta, jog atsaką į imunoterapinį gydymą sąlygoja ne tik PD-L1 raiška, tačiau ir raiškos pobūdis bei imuninių ląstelių buvimas navikiniame audinyje – naviko imuninė mikroaplinka [15].

Remiantis navikų klasifikacija, kuri paremta TILs pasiskirstymu bei PD-L1 raiška, galima tikėtis, jog anti PD-1, anti PD-L1 gydymas bus veiksmingiausias esant aukštai PD-L1 raiškai ir TLS pasiskirstymui navikiniame audinyje arba naviko riboje – imuniniam arba imuninės atskirties fenotipui. Priešingai – nenustačius PD-L1 raiškos ir TLS, esant imuninės „dykumos“ fenotipui, atsakas į imunoterapinį gydymą abejotinas [21]. Taigi, TLS nustatymas navikiniame audinyje ir teigiama PD-L1 raiška gali būti susiję su geresne sergančiųjų vėžiu prognoze, tačiau dalis klinikinių tyrimų pateikia prieštarigus rezultatus, kuomet minėto ryšio nenustatoma [10].

Tęsiant klinikinius tyrimus, nustatyta ir kitų imuninių ląstelių pasiskirstymo naviko mikroaplinkoje reikšmė. Klinikinių tyrimų duomenimis, tarp pacientų, sergančių NSLPV, didesnis CD4+ T ląstelių kiekis navikinio audinio stromoje ir didesnis CD8+ T ląstelių kiekis navikiniame audinyje yra susiję su geresne prognoze [35]. Tačiau vien CD8+ T ląstelių buvimas naviko audiniuose neužtikrina navikinių ląstelių sunaikinimo, taip yra dėl nuolatinės CD8+ ir navikinių ląstelių sąveikos [3, 36]. Atliekant klinikinius tyrimus su plaučių vėžiu, vertinant PD-L1 ir CD8+ prognostinę reikšmę, rezultatai nėra vienareikšmiai. Vienų klinikinių tyrimų duomenimis, nustatytas statistiškai reikšmingas ryšys tarp PD-L1 raiškos, CD8+ kiekio ir išgyvenamumo be ligos progresavimo taikant gydymą PD-1 inhibitoriumi [37]. Tuo tarpu tiriant pacientus, kuriems taikytas ne imunoterapinis, bet sutaptinis chemospindulinis gydymas, nustatytas ryšys tarp CD8+ TILs ir geresnių bendro išgyvenamumo rezultatų, tačiau nerasta ryšio tarp PD-L1 ir bendrojo išgyvenamumo [38].

Pagrindinis Tregs poveikis navikui yra palankus. Nustatytas ryšys tarp Tregs esančių navikinio audinio stromoje ir blogesnės prognozės pacientams, sergantiems NSLPV [27]. Taip pat nustatytas ryšys tarp mažo CD8+ ir Tregs kiekio bei blogesnių baigčių ir trumpesnio išgyvenamumo sergant kiaušidžių, krūties ir šlapimo pūslės vėžiu [3]. Yra klinikinių tyrimų, kurių duomenimis, sergant storosios žarnos vėžiu arba Hodžkino limfoma, Tregs buvimas navikiniame audinyje yra susijęs su geresne prognoze. Tuo tarpu LSMU MA Pulmonologijos klinikoje neseniai atlikto tyrimo rezultatai parodė, jog didesnis Tregs (Foxp3+CD4+) kiekis navikiniame audinyje buvo susijęs su geresniu sergančiųjų NSLPV išgyvenamumu [39]. Šis paradoksas gali būti sąlygotas Tregs populiacijos heterogeniškumo, todėl svarbu Tregs poveikį įvertinti kiekvieno vėžio tipo atveju [3].

Kitų imuninių ląstelių, tokių kaip neutrofilai ir makrofagai, vaidmuo nėra vienareikšmis. Jis priklauso nuo naviko imuninės mikroaplinkos ir joje esančių ląstelių išskiriamų medžiagų [3]. Tiek TANs, tiek



# Moksliniai darbai ir apžvalgos

makrofagai skirstomi į du fenotipus – navikui palankų ir navikui nepalankų [3, 24]. Su naviku susiję M1 makrofagai geba žudyti navikines ląsteles, tuo tarpu M2 makrofagai, aktyvuodami angiogenezę ir matrikso remodeliaciją, sudaro sąlygas naviko progresavimui ir metastazavimui [3, 40]. Klinikinių tyrimų duomenimis, nustatytas ryšys tarp makrofagų, susijusių su navikais ir blogos prognozės esant krūtų, prostatos, kiaušidžių, endometriumo, šlapimo pūslės ir stemplės vėžiui. M2 makrofagai naviko stromoje siejami su bloga prognoze esant NSLPV [27]. Tačiau šis suskirstymas į du fenotipus nėra pakankamas, nustatyta, kad su naviku susiję makrofagai rodo ir mišrų M1/M2 makrofagų fenotipą, ekspresuojant ir M1, ir M2 būdingus žymenis [3].

Priešingai nei makrofagai ir neutrofilai, NK ląstelės turi aiškų priešnavikinį poveikį. Nustatytas ryšys tarp mažo NK aktyvumo ir blogesnių išgyvenamumo rezultatų esant gerklų ir skrandžio vėžiui [3]. Esant padidėjusiam NK ląstelių kiekiui navikiniame audinyje, nustatytos geresnės baigtys tarp NSLPV sergančiųjų [27]. Tačiau savaiminis NK ląstelių buvimas naviko imuninėje mikroaplinkoje dar nereiškia, kad navikinės ląstelės bus sunaikintos, nes šios įvairiais keliais geba slopinti NK ląstelių veiklą [41].

Manoma, jog Bregs poveikis yra navikui palankus, tačiau dar neaišku, ar jos aktyviai skatina naviko augimą, ar jų skaičiaus augimas rodo natūralų imuninės sistemos atsaką. Be to, nustatyta, jog naviką infiltruojančių B ląstelių buvimas naviko imuninėje mikroaplinkoje yra susijęs su geresnėmis klinikinėmis baigtimis esant krūtų vėžiui ir NSLPV. Pelių modelyje B ląstelės, praradusios savo aktyvumą, sumažino CD4+ T ląstelių aktyvumą ir dauginimąsi, taigi galima daryti prielaidą, jog optimalus antigenui specifinių T ląstelių veikimas pasiekiamas per B ląsteles [3].

## IŠVADA

Predikcinių ir prognostinių veiksnių nustatymas sergantiesiems onkologinėmis ligomis, tarp jų NSLPV, išlieka vienas didžiausių iššūkių. Šių veiksnių nustatymas palengvintų individualizuoto optimaliausio ir didžiausią klinikinę naudą teiksiančio gydymo pasirinkimą. Šiandien neabejojama, jog vėžio vystymasis – tai daugiapakopis procesas, kuris vyksta betarpiškai sąveikaujant navikinėms ir naviko imuninės mikroaplinkos ląstelėms. PD-L1 tyrimas jau taikomas klinikinėje praktikoje, sprendžiant dėl tolesnės NSLPV gydymo taktikos, tačiau, vertinant gydymo rezultatus, prieita vieningos nuomonės, jog vien PD-L1 raiškos vertinimas nepakankamas, tęsiama kitų žymenų paieška, tačiau rezultatai kol kas išlieka prieštaringi, todėl tikslingas klinikinių tyrimų tęsimas.

Gauta 2019 08 19

Priimta 2019 08 28

## LITERATŪRA

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. CA: Cancer J clin. 2019; 69:7-34.
2. Damagala-Kukawik J, Osinska I, Hoser G. Mechanisms of immune response regulation in lung cancer. Transl Lung Cancer Res. 2014; 3(1):15-22.
3. Gun SY, Lee SWL, Sieow JL, Wong SC. Targeting immune cells for cancer therapy. Redox Biol. 2019; 20:101174.
4. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DE, Merad M et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. Nature medicine. 2018; 24:541-50.
5. Chen DS, Mellman I, Oncology Meets. Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. Immunity. 2013; 39(1):1-10.
6. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoeediting. Annu Rev Immunol. 2004; 22:329-60.
7. Vesely MD, Schreiber RD. Cancer immunoeediting: antigens, mechanisms and implications to cancer immunotherapy. Ann N Y Acad Sci. 2013; 1284(1):1-5.
8. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science. 2011; 331(6024):1565-70.
9. Ribatti D. The concept of immune surveillance against tumors: The first theories. Oncotarget. 2017; 8(4): 7175-80.
10. Vareki SM, Garrigos C, Duran I. Biomarkers of response to PD-1/PD-L1 inhibition. Crit Rev Oncol Hematol. 2017; 116:116-24.
11. Tsao MS (Editor), Kerr KM (Editor), Dacic FS (Editor). IASLC Atlas of PD-L1 Immunohistochemistry Testing in Lung cancer. Editorial RX press. 2017.
12. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. Front Immunol. 2016; 7(550):1-17.
13. Teng F, Meng X., Kong L, Yu I. Progress and challenges of predictive biomarkers of anti PD-1/PD-L1 immunohistochemistry: A systematic review. Cancer Lett. 2018; 414:166-73.
14. Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. Exp Cell Res. 2010; 316(8):1324-31.
15. Teng MWL, Ngiew SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. Cancer Res. 2015; 75(11):2139-45.
16. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. Nat Med. 2018; 24(5):541-50.
17. Schiavoni G, Gabriele L, Mattei F. The tumor microenvironment: a pitch for multiple players. Front Oncol. 2013; 3(90):1-15.
18. Treffers LW, Hiemstra IH, Kuijpers TW, van den Berg TK, Matlung HL. Neutrophils in cancer. Immunol Rev. 2016; 273(1):312-28.
19. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. N. Engl. J. Med. 2012; 366(26):2455-65.
20. Granot Z, Jablonska J. Distinct Functions of Neutrophil in Cancer and Its Regulation. Mediators Inflamm. 2015; 2015(701067):1-11.
21. Ostroumov D, Fekete-Drimusz N, Saborowski M, Kühnel F, Woller N. CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. Cell Mol Life Sci. 2018; 75(4):689-713.
22. Tokito T, Azuma K, Kawahara A. Predictive relevance of PD-L1 expression combined with CD8+ TIL density in stage III non-small cell lung cancer patients receiving concurrent chemoradiotherapy. Eur J Cancer. 2016; 55:7-14.
23. Fumet JD, Richard C, Ledys F, Klopfenstein Truntzer C, Caudert BP et al. CD8 and PD-L1 determination in lung tumor tissue as prognostic biomarker and a predictive marker of anti PD-1 efficacy. J Clin Oncol. 2018; 36(15):3021-21.
24. Tanaka Y, Kobayashi H, Tanabe K, Minato N. Human  $\gamma\delta$  T cells: Application to Cancer Immunotherapy. Clin Immunol. 2009; 131(1):S38-9.
25. Wennerberg E, Pfefferle A, Ekblad L, Yoshimoto Y, Kremer V, Kaminsky VO et al. Human anaplastic thyroid carcinoma cells are sensitive to NK cell-mediated lysis via ULBP2/5/6 and chemoattract NK cells. Clin Cancer Res. 2014; 20(22):5733-44.

26. **Jackute J, Zemaitis M, Pranys D, Sitkauskienė B, Miliuskas S, Vaitkienė S et al.** Distribution of M1 and M2 macrophages in tumor islets and stroma in relation to prognosis of non-small cell lung cancer. *BMC Immunol.* 2018; 19:3.
27. **Soo RA, Chen Z, Yan Teng RS, Tan HL, Iacopetta B, Tai BC et al.** Prognostic significance of immune cells in non-small cell lung cancer: meta-analysis. *Oncotarget.* 2018; 9(37):24801-20.
28. **Sharpe AH, Pauken KE.** The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol.* 2018; 18(3):153-67.
29. **Cui Y et Guo G.** Immunomodulatory Function of the Tumor Suppressor p53 in Host Immune Response and the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(11):1942.
30. **Terabe M, Berzofsky JA.** NKT cells in immunoregulation of tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *Trends Immunol.* 2007; 28(11):491-6.
31. **Mócsai A.** Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med.* 2013; 210(7):1283-99.
32. **Sionov RV, Fridlender ZG, Granot Z.** The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron.* 2015; 8(3):125-58.
33. **McLaughlin J, Han G, Schalper KA, Carvajal-Hausdorf D, Pelekanou V, Rehman J et al.** Quantitative Assessment of the Heterogeneity of PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* 2016; 2(1):46-54.
34. **Hegde PS, Karanikas V, Evers S.** The Where, the When, and the How of Immune Monitoring for Cancer Immunotherapies in the Era of Checkpoint Inhibition. *Clin Cancer Res.* 2016; 22(8):1865-74.
35. **He J, Hu Y, Hu M, Baolan Li.** Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. *Sci Rep.* 2015; 5(13110):1-9.
36. **Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csösz T, Fülöp A et al.** Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2016; 375:1823-33.
37. **Jackute J, Zemaitis M, Pranys D, Sitkauskienė B, Miliuskas S, Bajoriūnas V et al.** The prognostic influence of tumor infiltrating Foxp3(+)/CD4(+), CD4(+) and CD8(+) T cells in resected non-small cell lung cancer. *J Inflamm (Lond).* 2015; 12:63.
38. **Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J et al.** Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet.* 2017; 389:255-65.
39. **Chen DS, Mellman I.** Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature.* 2017; 541(7637):321-30.
40. **Jackutė J, Žemaitis M., Pranys D, Šitkauskienė B, Miliuskas S, Bajoriūnas V et al.** Distribution of CD4+ and CD8+ T cells in tumor islets and stroma for patients with non-small cell lung cancer in association with COPD and smoking. *Medicina (Kaunas).* 2015; 51(5):263-271.
41. **Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF et al.** Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366(26): 2443-54.