

Univerzita Karlova v Praze Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie



Monika Košťálová

Myeloidní supresorové buňky v kontextu nádorového mikroprostředí

**Myeloid – Derived Suppressor Cell in the Context of Tumor
Microenvironment**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Milada Šírová, Ph.D.
Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i.

Praha, 2014

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně z uvedené literatury a na základě konzultací se svou školitelkou a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 12.8.2014

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Miladě Šírové, Ph.D. za neuvěřitelnou trpělivost, cenné připomínky a pomocnou ruku při zpracovávání této bakalářské práce. Velké díky rovněž patří celé mé rodině, která se mnou celé studium prožívala a vždy mě ve všem podporovala.

Abstrakt:

Na nádory se dnes nepohlíží jen jako na útvar geneticky změněných buněk s patologickou schopností nadměrné proliferace, invazivity a zvýšené životnosti, ale stále větší váha se přičítá také mikroprostředí, které si nádor vytváří. Toto mikroprostředí generuje podmínky, které jsou odlišné od podmínek v normálních tkáních. Příkladem je lokální hypoxie, laktátová acidóza či nádorem indukovaná imunosuprese – všechny tyto abnormality vedou k vyšší životaschopnosti nádorové tkáně. Ukazuje se, že jedním z nejvýznamnějších mediátorů úniku imunitnímu dozoru v nádorech jsou myeloidní supresorové buňky (MDSCs). Jedná se o heterogenní populaci buněk myeloidního původu. V aktivovaném stavu MDSCs produkují zvýšené množství kyslíkových radikálů, sloučenin dusíku a arginázy, což představuje mechanismy, kterými MDSCs potlačují protinádorovou imunitní odpověď. MDSCs tedy představují slibný terapeutický cíl. Recentní studie však ukazují i jejich fyziologickou roli, což je třeba při každé terapii, cílené na MDSCs, zohlednit.

Klíčová slova:

Nádorové mikroprostředí, teorie imunitního dozoru, imunoeditace, myeloidní supresorové buňky, imunosuprese v nádorech, terapeutické ovlivnění MDSCs, fyziologická role MDSCs

Abstract:

Today, tumors are considered not only as a complex of genetically mutated cells with pathological function of excessive proliferation, invasiveness and increased viability, but increased attention is paid for the tumor microenvironment created by the tumor itself. This microenvironment generates conditions, which differ from the normal tissues – for example local hypoxia, lactic acidosis and tumor-induced immunosuppression – all these abnormalities lead to increased viability of the tumor tissue. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) seem to be one of the main mediators of the escape from immunosurveillance. MDSCs represent a heterogeneous cell population of myeloid origin. In active state, MDSCs produce enhanced amount of reactive oxygen species, nitrogen compounds and arginase, which represent the mechanisms of the suppression of the anti-tumor immune response. That makes MDSCs a promising therapeutic target. However, recent studies also point out the physiological role of MDSCs, which seems to be essential to consider for successful MDSCs targeting.

Key words:

Tumor microenvironment, immunosurveillance theory, immunoediting, myeloid-derived suppressor cells, immunosuppression in tumors, therapeutic targeting of MDSCs, physiological role of MDSCs

Obsah

I. ÚVOD:	10
II. Nádorové mikroprostředí.....	11
2.1 Nádorové stroma	11
2.1.1 Fibroblasty	11
2.1.2 Angiogeneze v nádorech	12
2.1.3 Hypoxie	13
2.1.4 Buňky imunitního systému	14
III. Teorie imunitního dozoru a imunoeditace.....	16
IV. Imunitní buňky v nádorovém mikroprostředí.....	17
4.1 T lymfocyty.....	17
4.1.1 CD4 ⁺ a CD8 ⁺ T lymfocyty	17
4.1.2 Pomocné T buňky: Th1 / Th2 rovnováha.....	18
4.1.3 Regulační T lymfocyty (Treg)	18
4.2 Makrofágy	18
4.3 Dendritické buňky (DCs).....	19
V. Myeloidní supresorové buňky (MDSCs)	19
5.1 Fenotyp myších MDSCs	20
5.2 Fenotyp lidských MDSCs	20
5.3 MDSCs za fyziologických podmínek	20
5.4 MDSCs v patologických podmínkách	21
5.5 Expanze a aktivace MDSCs.....	21
5.5.1 Expanze.....	22
5.5.2 Aktivace	22
5.6 Diferenciace MDSCs	23
5.7 Imunosupresivní účinky MDSCs	23
5.7.1 Argináza 1	23
5.7.2 Syntáza oxidu dusnatého 2.....	23
5.7.3 Vzájemný vztah ARG1 a NOS2 a vznik peroxynitritu	24
5.7.4 Cysteinová deprivace.....	24
5.8 Interakce MDSCs s hlavními subpopulacemi imunitních buněk	25
5.9 Terapeutické ovlivnění MDSCs.....	25
VI. Závěr:.....	29
VII. Použité prameny a literatura:	30

Seznam použitých zkratk:

ANG1	Angiopoetin 1
APCs	Antigen Presenting Cells (antigen prezentující buňky)
ARG1	Arginase 1 (argináza 1)
ATP	Adenosin Triphosphate (adenosin trifosfát)
ATRA	All-Trans Retinoic Acid (kyselina all-trans retinová)
CAFs	Cancer-Associated Fibroblasts (fibroblasty asociované s nádorem)
CAM-1	Cellular Adhesion Molecule 1 (buněčná adhezivní molekula 1)
cdk4	Cyclin-dependent Kinase 4 (cyklin-dependentní kináza 4)
cFLIP	Cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-Inhibitory Protein (buněčný protein inhibující FLICE)
COPD/CHOPN	Chronic Obstructive Pulmonary Disease/ chronická obstrukční plicní nemoc
COX2	Cyclooxygenase 2 (cyklooxygenáza 2)
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Protein 4 (s cytotoxickými buňkami asociovaný protein 4)
CTLs	Cytotoxic T lymphocytes (cytotoxické T lymfocyty)
DCs	Dendritic Cells (dendritické buňky)
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (experimentální autoimunitní encefalomyelitida)
EGF	Epidermal Growth Factor (epidermální růstový faktor)
EGF	Epithelial Growth Factor (epiteliální růstový faktor)
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition (epitelo-mezenchymální přechod)
FGF	Fibroblast Growth Factor (fibroblastový růstový faktor)
FSP1	Fibroblast Specific Protein 1 (fibroblastový specifický protein 1)
gMDSCs	Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells (granulocytární myeloidní supresorové buňky)
GM-SCF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů)
HGF	Hepatocyte Growth Factor (růstový faktor hepatocytů)
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor (faktor indukovaný hypoxií)
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen-DR (lidský leukocytární antigen DR)

hTERT	Human Telomerase Reverse Transcriptase (katalytická podjednotka reverzní telomerázy)
IDO1	Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (indolamin 2,3-dioxygenáza)
IFN- γ	Interferone- γ (interferon- γ)
IGF	Insulin-like Growth Factor (růstový faktor inzulinového typu)
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase (inducibilní syntáza oxidu dusnatého)
IRF-8	Interferon Regulatory Factor-8 (interferon-regulující faktor 8)
LPS	Lipopolysaccharide (lipopolysacharid)
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor (faktor stimuluující kolonie makrofágů)
MDR1	Multidrug Resistance Gen 1 (gen mnohočetné rezistence 1)
MDSCs	Myeloid-Derived Suppressor Cells (myeloidní supresorové buňky)
MHC	Major Histocompatibility Complex (hlavní histokompatibilní komplex)
mMDSCs	Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells (monocytární myeloidní supresorové buňky)
MMPs	Matrix Metalloproteinases (matrixové metaloproteinázy)
NK	Natural Killer (přirození zabíječi)
NKT	Natural Killer T lymphocytes
NO	Nitric Oxide (oxid dusnatý)
nor-NOHA	N-hydroxy-nor-L-arginine
PD1	Programmed Death-1 Receptor (receptor programované buněčné smrti 1)
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor (růstový faktor odvozený z krevních destiček)
PGE2	Prostaglandine E2
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts (receptor pro konečné produkty pokročilé glykosylace)
RNI	Reactive Nitrogen Intermediates (reaktivní dusíkaté meziprodukty)
ROS	Reactive Oxygen Species (kyslíkové radikály)
SCF	Stem Cell Factor (faktor kmenových buněk)
SDF-1	Stromal Cell-Derived Factor 1 (stromální buněčný faktor 1)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription (signální transduktor a aktivátor transkripce)
TAMs	Tumor-Associated Macrophages (makrofágy asociované s nádorem)
TCR	T cell Receptor (T buněčný receptor)
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta (transformující růstový faktor beta)
Th1/2	T helper cell 1/2 (pomocné T buňky 1/2)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor Alpha (tumor nekrotizující faktor alfa)
Treg	Regulatory T cell (regulační T lymfocyt)

VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Protein 1 (vaskulární adhezní protein 1)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (vaskulární endoteliální růstový faktor)
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru)
α -SMA	Alpha Smooth Muscle Actin (alfa aktin hladké svaloviny)

I. ÚVOD:

Nádorová onemocnění představují jednu z nejdůležitějších civilizačních chorob moderní doby. Jedná se o heterogenní skupinu chorob, jejichž společným rysem je především nekontrolované buněčné dělení. Ačkoliv jsou známy určité rizikové faktory, jako je např. genetická zátěž nebo kontakt s nejrůznějšími chemickými, fyzikálními či biologickými karcinogeny a mutageny, rakovina je v podstatě nepredikovatelné onemocnění, postihující jednotlivce bez ohledu na pohlaví a věk. Hanahan a Weinberg definovali v roce 2000 šest základních znaků rakoviny: 1, Nádorové buňky stimulují svůj vlastní růst; 2, Jsou rezistentní vůči faktorům zastávujícím růst; 3, Mají schopnost odolávat programované buněčné smrti (apoptóze); 4, Indukují angiogenezi; 5, Nemají nastavený limit buněčných dělení – mají neomezenou schopnost proliferace; 6, Mají schopnost invazivity a metastáze [1].

O 11 let později však musel být tento koncept na základě nových poznatků rozšířen, a sice o deregulaci buněčného energetického metabolismu a schopnosti unikat destrukci imunitním systémem [2]. Právě poslední zmíněný mechanismus bude stěžejním tématem této práce.

V nádorovém mikroprostředí existují určité mechanismy, které zabraňují efektivní likvidaci nádoru imunitním systémem. Jedná se o změnu exprese markerů sloužících k rozpoznání patogenních nebo poškozených buněk, o získání rezistence vůči apoptotickým a nekrotickým mechanismům či o přímé potlačení adaptivní a přirozené imunitní odpovědi aktivovaných T buněk a cytotoxických imunitních buněk. Dalším, velmi důležitým mechanismem snižování imunitní odpovědi v nádoru může být i změna v zastoupení různých druhů buněk přirozené i adaptivní imunity v nádorovém mikroprostředí [3].

Ačkoliv v imunosupresivním nádorovém mikroprostředí operuje poměrně velký počet mechanismů obcházejících fyziologickou imunitní reakci, současné studie naznačují, že by mezi nimi mohlo figurovat několik stěžejních, na které má především význam zaměřit léčbu. Jeden z takových mechanismů reprezentují imunosupresivní účinky myeloidních supresorových buněk (MDSCs).

Cílem této práce bude vytvořit přehled nejdůležitějších imunosupresivních mechanismů v nádorovém mikroprostředí se zvláštním zřetelem na MDSCs. Dále se práce bude zabývat možnostmi terapie cílené na populaci MDSCs a zhodnocením případných rizik a nedostatků takovéto léčby.

II. Nádorové mikroprostředí

Současné moderní léčebné přístupy již nepohlížejí na nádory jen jako na útvary tvořené pouze rakovinnými buňkami, ale berou v potaz celé jejich mikroprostředí. Fakt, že nádory tvoří heterogenní populace buněk, které různými mechanismy přispívají k nádorové rezistenci vůči léčivům, proliferaci a případné metastázi nádorů, může zásadním způsobem ovlivňovat terapeutický přístup.

Mikroprostředí nádorové tkáně zahrnuje dvě základní struktury: nádorový parenchym a nádorové stroma. První zmíněnou složku tvoří samotné nádorové buňky. Typ parenchymálních nádorových buněk určuje i název tumoru. Charakter parenchymu také určuje stupeň diferenciaci nádoru vzhledem k původní tkáni. Poměr mezi parenchymem a stromatem nádoru určuje celkovou konzistenci nádoru – pokud převažuje stroma, jedná se o tuhý až tvrdý, skirhotický nádor. Pokud naopak převažuje parenchym, mluvíme o tzv. měkkém (medulárním) nádoru.

2.1 Nádorové stroma

Nádorové stroma se skládá z vesměs nemaligních buněk a nebuněčných komponent. Buňky stromatu ale pod vlivem svého okolí, nestandardních interakcí s ostatními buněčnými populacemi v nádorovém stromatu a přímého či nepřímého kontaktu s nádorovými buňkami vykazují abnormální fenotyp a funkce [5].

Nádorové stroma vzniká paralelně s proliferací nádorových buněk, přičemž iniciátorem vzniku je cytokin VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor), uvolňovaný nádorovými i nenádorovými buňkami v prostředí nádorového ložiska. VEGF indukuje zvýšenou kapilární permeabilitu, a tím akumulaci koagulačních faktorů. Vzniká extracelulární fibrinový gel tvořící prostředí pro vcestování fibroblastů, které posléze pod vlivem dalších faktorů proliferují a spoluvytvářejí nádorové stroma [4]. Cílem této kapitoly bude stručně vyjmenovat hlavní složky tvořící nádorové stroma a nastínit tak důležitost znalosti interakcí mezi různými buněčnými populacemi v nádorovém mikroprostředí pro nádorovou terapii.

2.1.1 Fibroblasty

V normálních pojivových tkáních představují fibroblasty nejběžnější buněčný typ. Produkují extracelulární matrix, zejména kolagen typu I, III, V a fibronektin. Produkci kolagenu IV a lamininu přispívají k tvorbě bazální membrány na přechodu pojivové tkáně a epitelů [5]. Prostředí extracelulární matrix a pojivových tkání je neustále přestavováno. Remodelace extracelulární matrix je nezbytná pro mnoho fyziologických pochodů (buněčný růst, proliferace, diferenciaci, buněčná migrace), ale vyskytuje se i v mnoha patologických (metastáze, tumorigeneze) procesech. Za přestavbu matrix jsou zodpovědné především proteázy ze skupiny metalloproteáz (MMPs) [6].

Fibroblasty rovněž mají nezastupitelnou funkci při hojení ran. Jsou prekurzory myofibroblastů, které produkcí α -SMA umožňují stažení rány.[7,8]. Fibroblasty samy potom přispívají k regeneraci poškozené tkáně zvýšenou sekrecí proteinů extracelulární matrix, růstových a chemotaktických faktorů, které koordinují akumulaci zánětlivých buněk a cévních progenitorových buněk v místě zranění [5]. Aktivace tohoto hojícího procesu probíhá pod vlivem několika regulačních molekul. Jedná se například o přímý kontakt s infiltrovanými imunitními buňkami prostřednictvím adhezních molekul intersticiálních buněk ICAM-1 (CD54) a VCAM-1 (CD106) [9]. Aktivace může probíhat dále jako přímá odpověď na faktory sekretované z poškozené mukosy – zejména FGF2, PDGF, EGF a TGF- β [10].

Fibroblasty tvoří hlavní komponentu nádorového stromatu. Počet fibroblastů v nádoru může někdy dokonce převyšovat počet samotných nádorových buněk [5]. S nádorem asociované fibroblasty (CAFs) jsou aktivované, stejně jako fibroblasty v místě poranění tkáně, avšak mají odlišný fenotyp a funkci než fibroblasty v odpovídající normální tkáni. CAFs se vyznačují velkou heterogenitou, což velmi ztěžuje studium jejich biologických aktivit a možnosti ovlivnění, neboť se dá jen obtížně definovat, jaké procento v nádoru tvoří fibroblasty s funkcí CAFs na pozadí fibroblastů s fyziologickou aktivitou [11]. Rozdíl oproti “normálním” fibroblastům je ten, že CAFs nepodléhají apoptóze ani žádné jiné eliminaci imunitním systémem a jsou permanentně aktivované. Markerů pro detekci přítomnosti CAFs je několik– typická je produkce α -SMA, vimentinu, kolagenu typu I a S100A4 proteinu / FSP1 [12].

Vznik CAFs není uspokojivě objasněn. Existuje ale několik hypotéz, které se ovšem nemusí vzájemně vylučovat. Patří mezi ně například diferenciaci z residentních tkáňových fibroblastů, epitel-mezenchymový přechod (EMT) – tedy diferenciaci CAFs z epiteliálních a endotelových buněk a možná je i migrace a aktivace buněk z kostní dřene [11, 13].

CAFs se vyznačují především tím, že produkují množství růstových faktorů (např. faktory ze skupiny FGF, IGF, EGF, HGF a TGF- β [15]), chemotaktických látek, faktorů podporujících angiogenezi a metaloproteáz, což souhrnně podporuje rozšiřování nádoru [5]. Právě množství produkovaných růstových faktorů činí z nádorově asociovaných fibroblastů atraktivní cíl pro potenciální terapii [16].

2.1.2 Angiogeneze v nádorech

Vaskulatura asociovaná s nádorovým stromatem zahrnuje endotelové buňky, pericyty a buňky hladké svaloviny [15]. Vzhledem k neomezené proliferaci nádorových buněk je vcelku logické, že tumory mají zvýšené metabolické a nutriční nároky. Proto ložiska nádoru obvykle obklopuje velmi hustá cévní síť s netypickými vlastnostmi. K takovým vlastnostem patří například nerovnoměrná distribuce cév, nepravidelné tvarování, nesprávné větvení nebo častý výskyt slepě končících cév. Vaskulatuře nádorů rovněž schází klasická hierarchie muskulárních artérií, arteriol, kapilár, postkapilárních venul a malých a velkých žil [17].

Cévy jsou také na mnoha místech proděravělé, což vede k suboptimálnímu proudění krve a tudíž k podpoře hypoxie, typické pro nádorové mikroprostředí [18]. Za výše zmíněné jevy je zodpovědný v první řadě cytokin VEGF. Tento cévní endoteliální růstový faktor je v nepatogenních tkáních nezbytným mediátorem pro embryonální vývoj a také má nezastupitelnou roli v procesu hojení ran u dospělých. Zároveň však hraje důležitou roli při nádorové angiogenezi.

V nádorovém mikroprostředí se zdá být nejdůležitějším faktorem VEGF-A [4]. Jedná se o multifunkční cytokin, který je hojně exprimován také nádorovými buňkami. Funguje přes receptory VEGFR-1, VEGFR-2 a neuropilin-1, které se nacházejí převážně na cévním endotelu. Mezi funkce VEGF-A patří zvyšování mikrovaskulární permeability, indukce migrace buněk endotelu, přeprogramování genové exprese, prevence senescence a indukce angiogeneze. Nagy *et al.* ukázali také jeho schopnost navodit lymfangiogenezi prostřednictvím interakce s VEGFR-2 [20].

2.1.3 Hypoxie

V nádorovém mikroprostředí se typicky vyskytuje hypoxické prostředí. Pro normální tkáň se běžný tlak kyslíku pohybuje mezi 54-65 mmHg, přičemž v nádorech je to zhruba o polovinu méně, tedy kolem 23-28 mmHg [21]. Měření parciálního tlaku kyslíku ve tkáni prsního karcinomu ukázalo ještě výraznější rozdíly mezi nádorem a fyziologickou tkání. V normální tkáni se pO_2 pohyboval mezi 65-67 mmHg. V oblasti nádoru činila průměrná hodnota pO_2 30 mmHg a v silně hypoxických oblastech se hodnoty pohybovaly až mezi 0-2,5 mmHg [22]. Vaupel *et al.* ale rovněž ukázali, že u nádorů stejného původu a ve stejném stupni progresu existuje poměrně vysoká variabilita v intenzitě hypoxie v různých místech nádoru [22].

V nádorech tedy panuje silně hypoxické prostředí, což vede k aktivaci proteinu p53, a tedy k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi – buňky v hypoxickém prostředí tedy mnohem méně proliferují [23]. Hypoxie také indukuje angiogenezi, za což je zodpovědný již výše zmíněný VEGF [24]. Zhuštěná vaskulatura může mimo jiné vést i k vyššímu riziku metastáze z důvodu snadnějšího přístupu nádorových buněk k cévám a tím i migraci buněk [25].

Dalším produktem hypoxického prostředí je HIF-1 [26]. Je to transkripční faktor, který se ve fyziologických podmínkách podílí na stresových odpovědích. Strukturně se jedná o heterodimer s dvěma podjednotkami HIF-1 α a HIF-1 β , přičemž aktivita celého dimeru HIF-1 je určována stabilitou podjednotky HIF-1 α , která je za normálních podmínek v buňce rychle degradována, ale ve stavu hypoxie je tato degradační dráha blokována. Stabilita HIF-1 β na koncentraci kyslíku závislá není [27,28].

Transkripční faktor HIF-1 má vliv například také na expresi MDR1 genu a jeho produktu P-glykoproteinu, což vede ke zvýšení rezistence nádorových buněk vůči chemoterapeutikům [29], dále ovlivňuje produkci IGF-2 [30], chemokinu SDF-1 [31] a také přispívá k indukci telomerázové aktivity prostřednictvím hTERT [32].

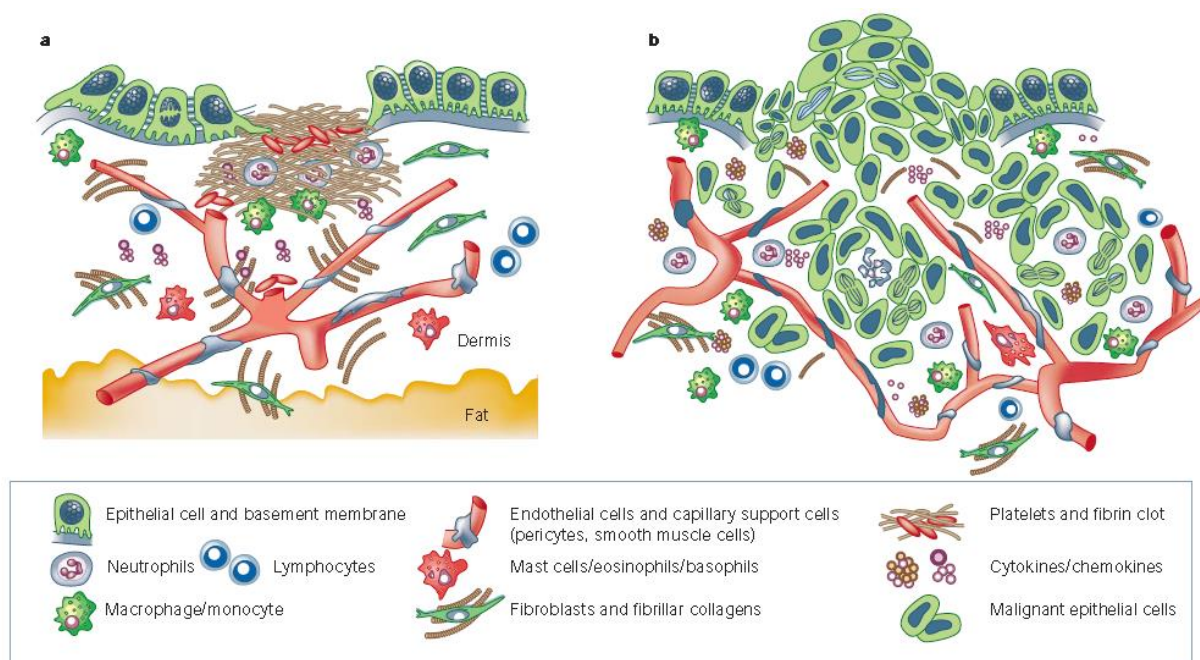
Hypoxie v nádorovém mikroprostředí souvisí s určitými metabolickými abnormalitami. Například zvýšená míra glykolýzy je chápána jako jistá forma adaptace na prostředí se sníženým obsahem kyslíku a je v nádorových buňkách uplatňována mnohem častěji než v normálních tkáních [33]. Glykolýza je podstatně méně efektivní forma metabolické dráhy generující buněčnou energii ve formě ATP v porovnání s mitochondriální respirací. Na jednu molekulu glukózy, zpracovanou glykolýzou, připadají dvě molekuly ATP. Oproti tomu v respiračním mitochondriálním řetězci se z jedné molekuly glukózy vygeneruje 36 molekul ATP, což znamená 18 krát efektivnější metabolismus.

Glykolýzou je ve fyziologické tkáni produkováno 10 % ATP oproti 90 % ATP z mitochondrií. V nádorové tkáni je dle Warburga tato rovnováha posunuta zhruba na 50:50. Preference anaerobní glykolýzy nastává v nádorové tkáni dokonce i za přítomnosti kyslíku (Warburgův efekt). Jedná se tak zřejmě o adaptaci buněk na střídavou hypoxii v průběhu vývoje nádoru [35]. Vlivem zvýšeného využívání glykolýzy jako zdroje energie dochází ve tkáni nádoru k akumulaci konečného produktu glykolýzy, a sice laktátu. Dochází tím k okyselení prostředí, což je další z charakteristik nádorového mikroprostředí. Vedle hypoxického prostředí, nedostatku živin a energie charakterizuje nádor tedy i tzv. laktátová acidóza.

2.1.4 Buňky imunitního systému

Buňky specifické i nespecifické imunity jsou do prostředí nádoru přitahovány aktivitou určitých cytokinů a chemokinů. Existuje podobnost mezi akutním zánětlivým prostředím a nádorovou tkání. Této skutečnosti si všiml už v roce 1863 německý lékař a politik Rudolf Virchow. Navrhl hypotézu, že určité dráždivé skupiny látek spolu s poškozením tkáně a následným zánětem vyvolávají dělení buněk [36]. Ačkoliv je nyní jasné, že samotná buněčná proliferace nestačí ke vzniku rakovinného nádoru, ostatní faktory, působící v zánětlivém prostředí mají na vznik nádorového onemocnění skutečně nezanedbatelný vliv. Jedná se především o hojnost zánětlivých buněk, růstových faktorů a přítomnost faktorů poškozujících buněčnou DNA. V zásadě bychom mohli použít výstižné vyjádření H.F.Dvořáka v článku z roku 1986: nádory jsou "zranění, která se nehojí" [37]. Při poškození normální tkáně dochází v procesu její reparace k masivnímu dělení buněk, ale jakmile je tkáň "spravená", proliferace se opět vrátí do normálních hodnot. V případě nádorů jsou regulační mechanismy nefunkční a nádorové buňky tak ve vhodném mikroprostředí, plném zánětlivých buněk a růstových faktorů, proliferují neomezeně. Ačkoliv je mechanismus zánětu u poraněných normálních tkání a nádorových tkání velmi podobný, existují některé odlišnosti, zejména ve struktuře zánětlivého prostředí. Tyto odlišnosti shrnuje obrázek 1.

Obrázek 1; převzato z [38], upraveno



A, Normální tkáň se vyznačuje vysoce organizovanou strukturou. Epiteliální buňky nasedají na bazální membránu a jsou tak odděleny od prostředí vaskularizované dermis. Pokud dojde k poškození tkáně, jsou aktivovány krevní destičky, které vytvoří krevní sraženinu a uvolňují vasoaktivní mediátory. Ty regulují vaskulární permeabilitu, aktivují fibrinogen a formaci fibrinové krevní sraženiny. Chemotaktické faktory, jako jsou TGF- β a růstové faktory odvozené z krevních destiček (PDGF), iniciují formování granulační tkáně, aktivaci fibroblastů a indukci a aktivaci proteolytických enzymů nezbytných pro remodelaci extracelulární matrix.

Dochází ke vstupu granulocytů, monocytů a fibroblastů, cévní systém je postupně obnovován a epitelová tkáň v je místě zranění postupně reparována. Epiteliální a stromální buňky spolu kooperují za účelem usnadnění procesu hojení. Jakmile je rána zahojená, zmíněné procesy opět ustupují.

B, Invazivní karcinom vykazuje méně organizovanou strukturu. Neoangiogeneze a lymfangiogeneze produkuje neuspořádanou síť krevních a mízních cév, kde mohou nádorové buňky interagovat s jinými buněčnými typy (mesenchymálními, hematopoetickými a lymfoidními). Mezi normálním poraněním a zánětlivým prostředím nádoru lze pozorovat jisté paralely. Neoplastické buňky produkují celou škálu mitogenních cytokinů a chemokinů a/nebo chemoatraktanty pro granulocyty, žírné buňky, monocyty/makrofágy, fibroblasty a endoteliální buňky. Navíc, aktivované fibroblasty a infiltrované zánětlivé buňky sekretují proteolytické enzymy, cytokiny a chemokiny, které mají mitogenní účinek na neoplastické buňky, stejně jako mají u normálního poranění endoteliální buňky roli v aktivaci neoangiogeneze a lymfangiogeneze. V nádorovém mikroprostředí mají tyto mitogenní faktory vliv na podporu nádorového růstu, stimulují angiogenezi, způsobují migraci fibroblastů a umožňují šíření nádoru.

III. Teorie imunitního dozoru a imunoeditace

Počátky dohadů o tom, že imunitní systém může mít nějakou dozorující roli nad nádorovou tkání, můžeme najít již v roce 1909. Konkrétně se o tom zmiňuje známý německý chemik a lékař, nositel Nobelovy ceny, Paul Ehrlich. Tato hypotéza však na dlouhá léta upadla v zapomnění, neboť chyběly technologické postupy, které by ji prokázaly a dále rozvíjely. Znovuobjevení přišlo až v padesátých letech minulého století. Sir MacFarlane Burnet a Lewis Thomas koncipovali tzv. teorii imunitního dozoru, která se zabývá tím, že nádorové buňky vznikají přirozeně v tkáních a imunitní systém má schopnost je odstraňovat. Této hypotéze připravil pole působení především objev nádorově asociovaných antigenů, bez jejichž existence by teorie imunitního dozoru zcela ztrácela své opodstatnění [39].

Nicméně vzhledem k tomu, že výsledky testování těchto hypotéz nebyly zcela průkazné a přinášely protichůdné výsledky, tato teorie byla již v sedmdesátých letech prakticky zapomenuta.

Znovuzrození teorie imunitního dozoru přinesla opět 90. léta. Na základě nových objevů, kdy byl pozorován zejména vliv IFN- γ [40], perforinu [41] a interakce TCR s antigeny, vázanými na povrch APCs prostřednictvím MHC glykoproteinů [42] na imunitní odpovědi v nádorech, se opět začalo hovořit o tom, že imunitní systém skutečně nějakou roli sehrává. Hlavními činiteli při vykonávání role imunitního dozoru jsou CD8⁺ cytotoxické T lymfocyty (CTLs), včetně $\alpha\beta$ T buněk a $\gamma\delta$ T buněk, dále NK buňky, NKT buňky a efektorové CD4⁺ T buňky. [43] Tato fáze imunitního dozoru, kdy je nádor imunitním systémem cíleně likvidován, nazvaná *elimination* (eliminace) sestává ze čtyř fází. V první fázi dochází k iniciaci imunitní odpovědi. Buňky imunitního systému vcestovávají do nádoru, kde vzniká zánět. NK buňky a NKT buňky začínají produkovat IFN- γ .

Ve druhé fázi indukuje IFN- γ smrt nádorových buněk a zároveň podporuje produkci chemokinů CXCL9,10 a 11, které významně přispívají k likvidaci nádoru prostřednictvím blokáce angiogeneze. Odumřelé nádorové buňky jsou poté fagocytovány dendritickými buňkami (DCs), které dále putují do lymfatických uzlin.

Třetí fáze je typická transaktivací NK buněk a makrofágů produkovaným IFN- γ a IL-12. To má za následek produkci kyslíkových radikálů a dusíkových intermediátů a další apoptotický zánik nádorových buněk. V lymfatických uzlinách dochází pomocí DCs k diferenciaci Th1 buněk, které následně podporují vývoj CD8⁺ T lymfocytů.

V poslední fázi *elimination* vstupují CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocyty do nádorového stromatu, kde dokončují likvidaci nádorových buněk [44].

Koncept teorie imunitního dozoru se však zdaleka neprokázal jako dostačující, proto byla vytvořena nová teorie, a sice teorie imunoeditace. Sestává z konceptu "tří E" – *elimination*, *equilibrium*, *escape* (eliminace, rovnováha, únik). První fáze odpovídá teorii imunitního dozoru a byla již popsána výše. Druhá fáze, *equilibrium*, vychází z představy darwinovské selekce a předpokládá,

že postupem času se mezi nádorem a buňkami imunitního systému vytvoří pod vlivem mutací jakýsi rovnovážný stav, kdy má imunitní systém sice buňky pod kontrolou, nicméně je už není schopen úplně eliminovat. Poslední fáze, *escape*, znamená jakési vyvrcholení změn naakumulovaných v předchozí fázi – tedy k rozvoji imunosupresivních mechanismů vedoucích k úniku nádorových buněk zpod vlivu imunitního systému. V této fázi dochází ke vzniku klinicky detekovatelných nádorů [39, 45].

IV. Imunitní buňky v nádorovém mikroprostředí

V nádorovém mikroprostředí se vyskytují různé buňky imunitního systému, které nějakým způsobem působí buď ve prospěch nádorového růstu nebo přispívají k jeho eliminaci. Do první kategorie patří $CD8^+$ a $CD4^+$ T lymfocyty, NK buňky, NKT buňky typu I, M1 makrofágy a DCs. Mezi buňky účastníci se imunosupresivních reakcí spadají hlavně regulační T lymfocyty (Treg), NKT buňky typu II, M2 makrofágy a MDSCs [46]. Jedním z nejdůležitějších mechanismů imunosuprese je právě schopnost nádoru posouvat rovnováhu poměrného zastoupení jednotlivých skupin buněk ve prospěch svého růstu. V nádorech se tedy výrazně zvyšuje zastoupení skupin buněk s imunosupresivními účinky [3].

4.1 T lymfocyty

4.1.1 $CD4^+$ a $CD8^+$ T lymfocyty

Aktivace adaptivní imunitní odpovědi probíhá na základě dvou oddělených signálů. První je vazba T buněčných receptorů naivních T lymfocytů a antigenu exprimovaného na povrchu antigenprezentujících buněk, přičemž hlavní roli zde mají DCs. $CD4^+$ T buňky se váží na MHC glykoproteiny II. třídy, exprimované především na antigen prezentujících buňkách (APCs), jako jsou DCs, makrofágy nebo B lymfocyty. T buněčné receptory a $CD8^+$ na cytotoxických T buňkách (CTLs) se váží na MHC glykoproteiny I. třídy, které jsou exprimovány na všech savčích buněčných typech kromě červených krvinek. Druhý signál je zprostředkován vazbou molekuly CD28 na T buňkách s molekulami B7-1 (CD80) nebo B7-2 (CD86) na povrchu APCs. Tento druhý signál může být zablokován vazbou kompetitivní molekuly CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocytes-associated protein 4) na molekuly B7-1 nebo B7-2 nebo vazbou T lymfocytárního PD-1 (programmed death-1 receptor) s ligandem PD-L1 lokalizovaným na APCs. Vazba těchto alternativních molekul na receptory druhého signálu vede k potlačení signalizace, což představuje mechanismus, který reguluje imunitní odpověď a brání vzniku autoimunitních chorob. Vzhledem k tomu, že molekulu CTLA-4 hojně exprimují zejména Treg, které tak tlumí imunitní odpověď proti nádoru, představuje cílená blokáda CTLA-4 slibný cíl v imunoterapii nádorů [55]. Byla vyvinuta monoklonální protilátka ipilimumab (anti-CTLA-4), vyráběná

pod komerčním názvem Yervoy®. Tato protilátka se poměrně úspěšně používá při léčbě maligních melanomů [14]. Samotný výrobce udává, že léčba látkou Yervoy® snižuje riziko úmrtí o jednu třetinu oproti pacientům s klasickou chemoterapeutickou léčbou [34].

K přímým cytotoxickým účinkům CD8⁺ T lymfocytů proti nádorovým buňkám dochází prostřednictvím dvou mechanismů. Prvním, majoritním, je Ca²⁺ dependetní mechanismus perforin - granzym B dráhy a druhým je dráha Fas-Fas ligand [47].

4.1.2 Pomocné T buňky: Th1 / Th2 rovnováha

Th1 (T helper) a Th2 buňky jsou subpopulace CD4⁺ T lymfocytů, diferencované z naivních Th0 buněk. Cytokiny produkované Th1 buňkami napomáhají cytotoxické funkci M1 makrofágů, CTLs, NK buněk a NKT buněk (jedná se o TNF- α , IFN- γ , IL-2 a IL-12). Th2 buňky jsou spojované především s astmatem a alergickými reakcemi a produkují interleukiny IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 a IL-13. Obě tyto subpopulace se vzájemně ovlivňují – cytokiny uvolňované jednou subpopulací potlačují diferenciaci druhé.

Role Th2 buněk v nádorovém prostředí spočívá především v inhibici T buňkami mediované cytotoxické imunitní odpovědi. Th2 také podporují humorální odpověď B lymfocytů a vznik makrofágů M2 (TAMs, tumor-associated macrophages, viz kapitola 4.2) [3]. Obecně se má však za to, že humorální imunitní odpověď nemá v potlačování růstu nádorů žádný významnější efekt.

4.1.3 Regulační T lymfocyty (Treg)

Treg jsou buňky adaptivní imunitní odpovědi exprimující glykoproteiny CD4⁺ a CD25⁺ a transkripční faktor FoxP3. Eliminují autoreaktivní buňky, které unikly selekci v brzlíku a navozují tak periferní toleranci vůči tělu vlastním tkáním. Jsou nezastupitelnou skupinou buněk imunitního systému, která brání vzniku autoimunitních onemocnění. Vlivem své schopnosti blokovat efektorové T buňky jsou však i jedním z klíčových mediátorů nádorové imunoprese. Jak již bylo zmíněno výše, na inhibici CD8⁺ T buněčné odpovědi má zřejmě vliv především exprese CTLA-4, molekuly, která kompetitivně potlačuje druhý signál při aktivaci T lymfocytární imunitní reakce.

4.2 Makrofágy

Makrofágy jsou mononukleární buňky vrozené, nespecifické imunity. V raných fázích tumorigeneze se makrofágy fenotypu M1 běžně dostávají do zánětlivého prostředí nádorového stromatu, kde potlačují růst vznikajícího nádoru. Podobně jako neutrofily jsou i makrofágy vyzbrojené inducibilní syntázou oxidu dusnatého (iNOS), která po aktivaci zejména interferonem gama (IFN- γ) a bakteriálními lipopolysacharidy [48] syntetizuje z L-argininu oxid dusnatý [49], který má významnou cytotoxickou funkci a napomáhá tak destrukci nádorových buněk. Mezi negativní regulátory funkce makrofágů patří hlavně cytokiny TGF- β , který brání buněčnému dělení těchto buněk a také omezuje

produkci superoxidového radikálu a NO, a IL-10, který blokuje produkci jiných cytokinů, účastnících se zánětlivého procesu [50,51].

V nádorovém prostředí se však vyskytují také TAMs (tumor-associated macrophages), což je typ odpovídající fenotypu makrofágů M2. Ty jsou ovlivňovány a přitahovány do nádorového prostředí nejrůznějšími chemoatraktanty, produkovanými nádorovými buňkami, CAFs a dalšími s nádorem asociovanými buňkami [52]. TAMs vcestovávají zejména do hypoxických oblastí nádoru, kde prostřednictvím produkce VEGF, angiopoetinu 1 (ANG1) a ANG2 stimulují angiogenezi. Také rekrutují do nádoru žírné buňky a neutrofilů, které posléze plní podobnou funkci. TAMs dále podporují invazivitu nádoru produkcí metaloproteinázy 9 (MMP9) a dalších faktorů, které mají schopnost přestavby stromální matrix. Metastázi podporují TAMs prostřednictvím produkce nejrůznějších růstových faktorů a chemokinů – EGF, TGF- β , TNF- α a IL-8. Mohou také přímo přispívat k mutagennímu prostředí prostřednictvím produkce reaktivních kyslíkových a dusíkových radikálů [53,54].

4.3 Dendritické buňky (DCs)

DCs jsou významnými antigen-prezentujícími buňkami. Při imunoeditaci nádorů se podílejí na likvidaci nádoru tím, že fagocytují rozpadlé nádorové buňky a následně prezentují nádorové antigeny buňkám adaptivní imunitní odpovědi. Přítomnost vyššího počtu DCs k v periferní krvi také příznivě koreluje s lepší prognózou pacientů [56,57].

V zánětlivém prostředí nádoru však dochází k poškození antigen-prezentující funkce DCs prostřednictvím cyklooxygenázy 2 (COX2). Ta dává vzniknout prostaglandinu E₂ (PGE₂), který zvyšuje produkci IL-10, což vede ke snížení funkce DCs [58].

V. Myeloidní supresorové buňky (MDSCs)

MDSCs jsou heterogenní buněčnou populací, která vzniká z myeloidní linie, do které dále patří DCs, makrofágy a neutrofilů. V aktivovaném stavu se MDSCs vyznačují zvýšenou produkcí kyslíkových radikálů, sloučenin dusíku a arginázy, což vede k jejich hlavní funkci - indukci imunosuprese. Nezralé myeloidní buňky se normálně vyskytují v kostní dřeni i za fyziologických podmínek. Do sekundárních lymfoidních orgánů však v hojnějším množství vcestovávají až při zánětu. Nejvýznamnější souvislost mezi MDSCs a imunosupresivními efekty je popsána u nádorového onemocnění. Vzhledem k tomu, že jde o heterogenní populaci buněk, jsou spíše než morfologicky charakterizovány svou biologickou funkcí, která obecně spočívá v imunosupresi. Přesto však lze najít společné membránové markery, kterými můžeme MDSCs charakterizovat, přičemž existují rozdíly mezi myším a lidským modelem.

5.1 Fenotyp myších MDSCs

U myší se MDSCs vyznačují současnou expresí povrchových markerů CD11b (monocytární marker) a Gr-1 (granulocytární marker) [60]. Dále bylo zjištěno, že MDSCs se dělí na dvě skupiny, odlišné fenotypem i svými biologickými funkcemi. Granulocytární (polymorfonukleární) CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low}, které se vyznačují vysokou produkcí kyslíkových radikálů a nízkou produkcí oxidu dusnatého a monocytární CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high}, které se naopak charakterizuje významná produkce NO a nedetekovatelné ROS [61]. Monocytární MDSCs (mMDSCs) mají oproti granulocytárním MDSCs (gMDSCs) schopnost relativně silnějšího útlumu imunitní odpovědi [62].

Ve většině nádorů jsou gMDSCs majoritní skupinou – tvoří 70-80 % všech nádorem asociovaných MDSCs [61]. Recentní studie však naznačují, že granulocytární a monocytární MDSCs jsou spíše než plně diferencované, zcela odlišné subpopulace, pravděpodobněji pouze buňky nacházející se v různých stupních diferenciačního vývoje.

5.2 Fenotyp lidských MDSCs

Ačkoliv fenotyp lidských MDSCs není zcela přesně určen, pravděpodobně se jedná o buňky CD33⁺CD11b⁺HLA-DR^{low/-} [62]. MDSCs zároveň neexprimují žádný z typických znaků hlavních lymfocytárních linií, jako jsou např. znaky T a B buněk.

Různé studie se však mohou lehce lišit. Například Eruslanov *et al.* ve své studii zabývající se uroteliálním karcinomem definují myeloidní buňky infiltrované v nádoru jako CD11b⁺HLA-DR⁺ pro monocytární typ a CD11⁺CD15⁺HLA-DR⁻ pro typ granulocytární. V periferní krvi potom detekovali granulocytární myeloidní buňky jako CD15^{high}CD33^{low} a monocytární jako CD15^{low}CD33^{high}. Obě skupiny exprimovaly také klasický marker myeloidních buněk CD11b [64].

5.3 MDSCs za fyziologických podmínek

MDSCs mají svou nejznámější roli při indukci útlumu imunitní reakce. V nádorovém mikroprostředí tato populace zahrnuje nezralé prekurzory DCs a makrofágů, jejichž další diferenciaci zde brání patologické podmínky chronického zánětu. Je však vysoce pravděpodobné, že MDSCs mají v imunitním systému i fyziologickou funkci, kdy zabraňují nadměrné imunitní reakci. GM-CSF (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor) je významný aktivační a diferenciační cytokin, který se také podílí na stimulaci APCs, podporuje tedy vznik imunitní odpovědi [70]. Serafini *et al.* však ukázali, že při překročení určité prahové dávky GM-CSF dochází k aktivaci MDSCs, které následně nadměrně aktivovanou imunitní odpověď utlumí [73]. Skutečně, myši, kterým byla zablokována signalizační dráha pro aktivaci MDSCs a byla u nich vyvolána polymikrobiální sepse, vykazovaly mnohem vyšší mortalitu v důsledku sepse spojené se zvýšenou produkcí zánětlivých cytokinů než naivní myši [75].

Vedle předpokládané funkce MDSCs jako regulačního mechanismu zabraňujícímu nadměrné imunitní odpovědi je však pravděpodobný ještě jeden mechanismus fyziologického účinku MDSCs. Některé studie ukazují, že zatímco omezení funkce MDSCs u nádorových onemocnění může být slibným terapeutickým nástrojem, v jiných případech, zejména u traumat a sepsí, mohou být MDSCs naopak při léčbě žádoucí díky tomu, že produkují kyslíkové a dusíkové radikály, což jsou mechanismy, které využívá přirozená imunitní odpověď – podporují tedy aktivní imunitní odpověď organismu proti infekcím [77].

5.4 MDSCs v patologických podmínkách

MDSCs jsou nejvíce prostudovány u nádorových onemocnění a při chronickém zánětu. Četné studie dokazují, že při výskytu nádoru se zvyšuje hladina MDSCs nejen v okolí nádoru, ale i v periferní krvi [65]. V přítomnosti nádorového onemocnění tvoří MDSCs u myši až 20-40 % všech jaderných splenocytů. V porovnání s normální slezinou je to zhruba 10 násobný nárůst [66].

Mnohé práce však ukazují, že MDSCs se nevyskytují pouze u nádorových onemocnění, ale také při jiných patologických stavech spojených s akutním a chronickým zánětem, traumatickým stresem a bakteriální a parazitickou infekcí. Zvýšená hladina MDSCs byla například nalezena u Chagasovy nemoci (tj. infekce prvokem *Trypanosoma cruzi*) [67], toxoplazmózy (*Toxoplasma gondii*) [68] a kandidózy (*Candida albicans*) [69]. Dále se ukazuje, že zvýšená hladina MDSCs se vyskytuje i u autoimunitních chorob, například u experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (EAE), traumatických sepsí a popálenin. [71,74,77] Existují však i výjimky – u některých patologických stavů asociovaných se zánětlivým prostředím zvýšená hladina MDSCs není. Jedná se například o chronickou obstrukční plicní nemoc (CHOPN/COPD – Chronic Obstructive Pulmonary Disease) [72].

Zatímco v chronickém zánětlivém prostředí dochází k nežádoucí imunopresi, v akutním zánětu, který má jen relativně krátké trvání, zanikne imunopresivní role MDSCs v celkovém rozsahu imunitní reakce [66].

5.5 Expanze a aktivace MDSCs

Nezralé myeloidní buňky se vyskytují v kostní dřeni i za fyziologických podmínek. Pokud se však v těle objeví zánět, dochází k produkci různých faktorů, které vedou k expanzi a aktivaci MDSCs. Tyto faktory mohou být produktem různých typů buněk, například je mohou uvolňovat nádorové buňky, nádorové stromální buňky, aktivované T lymfocyty a makrofágy a patogeny infikované buňky. Lze je rozdělit do dvou skupin. První skupina jsou faktory, které jsou produkovány především nádorovými buňkami a vedou k expanzi MDSCs skze stimulaci myelopoézy a inhibici diferenciaci nezralých myeloidních buněk. Druhá skupina faktorů je produkována hlavně aktivovanými T lymfocyty a buňkami nádorového stromatu a účastní se přímo aktivace MDSCs [66].

5.5.1 Expanze

Faktory indukující expanzi MDSCs zahrnují například COX2, různé prostaglandiny, SCF (stem-cell factor), M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), IL-6, GM-CSF a VEGF [73, 78, 80, 81, 82]. Všechny signální dráhy iniciované těmito různými faktory posléze využívají dvou stejných činitelů, a sice Janusovy kinázy (JAK) a transkripčního faktoru STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) [84], což jsou molekuly zahrnuté mj. v signalizaci při indukci buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy. MDSCs mají v porovnání s normálními nezralými myeloidními buňkami mnohem větší podíl fosforylované formy STAT3 [83]. Kultivace hematopoetických progenitorových buněk v médiu simulujícím prostředí nádoru vede k aktivaci JAK2 a STAT3 a následné expanzi MDSCs, zatímco inhibice exprese STAT3 v hematopoetických progenitorech vede k blokaci této expanze [85]. Recentní studie ukazují navíc další možnosti této aktivační osy, nedávno byl například popsán IRF-8 (interferon regulatory factor-8) jako negativní regulátor expanze myeloidních supresorových buněk a označen tedy jako možný terapeutický cíl [86].

Ukazuje se, že k cílovým genům STAT3 patří geny pro proteiny z rodiny S100 vápník vázajících proteinů, konkrétně S100A8 a S100A9 proteiny, které mají v normálních podmínkách četné důležité funkce v dynamice cytoskeletu, buněčném růstu a diferenciaci a také v zánětlivém prostředí [87]. MDSCs mají navíc na svém povrchu receptory pro tyto proteiny. STAT3 dependentní zvýšení exprese S100A8 a S100A9 vede k expanzi MDSCs u myši s nádorem, zatímco naopak myši s deficitem těchto proteinů žádné zvýšení počtu MDSCs v periferní krvi a slezině nevykazují. Tyto proteiny mají dále roli v blokaci diferenciace myeloidních nezralých buněk na dendritické buňky [88,89]. Recentní studie ukazují, že význam v tomto fenoménu má zřejmě TNF- α , který má vliv na zvýšení exprese proteinů S100A8 a S100A9 a jejich receptoru RAGE [90].

5.5.2 Aktivace

Na aktivaci MDSCs se podílejí zejména faktory uvolňované z aktivovaných T buněk a z komponent nádorového stromatu. Tyto faktory zahrnují IFN- γ , IL-13, IL-4 a TGF- β . Aktivují několik různých signálních drah v MDSCs, které zahrnují STAT6, STAT1 a nukleární faktor κ B (NF- κ B) [66].

IFN- γ je cytokin produkovaný aktivovanými T-lymfocyty. Prostřednictvím aktivace transkripčního faktoru STAT1 dochází k zvýšení exprese ARG1 a iNOS, což vede k potlačení T buněčné imunitní odpovědi [91]. V synergii s touto signální dráhou je i dráha IL-4R α – STAT6. Receptor IL-4R α může být aktivován interleukinem IL-4 i IL-13. Tato signální dráha vede stejně jako v případě IFN- γ – STAT1 ke zvýšení exprese ARG1 [92]. Tento mechanismus může navíc zvyšovat produkci interleukinem-IL-13-indukovanou produkci TGF- β 1 prostřednictvím MDSCs, což vede k oslabení imunitního dozoru [93].

5.6 Diferenciace MDSCs

Diferenciace myeloidních buněk je v podmínkách chronického zánětu v nádorech odlišná od dráhy, která v normálních tkáních vede k terminální diferenciaci zralých makrofágů, DCs a granulocytů. V nádorech je upřednostněn vznik MDSCs. Jedny z hlavních mediátorů jsou PGE₂, bakteriální LPS (v případě bakteriálních infekcí), prozánětlivý IL-1 β a IFN- γ . Tyto mediátory aktivují expresi monocytární COX2, což vede k blokování diferenciaci monocytů ve zralé DCs a indukci PGE₂, IL-4 α , IDO1, iNOS a IL-10, což jsou typické faktory asociované s MDSCs [66]. Dalším mediátorem vzniku MDSCs je extracelulární cytokin TNF- α , působící skrze indukci S100A8 a S100A9 proteinů a jejich koreceptoru RAGE [90].

5.7 Imunosupresivní účinky MDSCs

5.7.1 Argináza 1

Argináza 1 (ARG1) je enzym, který konvertuje L-arginin na ureu a L-ornitin [94]. Aktivované MDSCs jsou schopné produkovat značné množství tohoto enzymu, stejně jako L-argininového transportéru CAT2B. Zvýšené množství ARG1 tak zároveň znamená zvýšení intenzity katabolismu L-argininu. L-arginin je aminokyselina, která je potřebná pro správnou funkci T lymfocytů, její nedostatek snižuje expresi ζ -řetězce CD3 komplexu, což je hlavní signál-transdukující komponenta TCR komplexu nezbytná pro jeho správné složení [62]. Zdá se, že ARG1-indukovaná deregulace CD3 ζ -řetězce koreluje s inaktivací T buněk a je zásadní pro únik nádoru imunitnímu dozoru. Podání inhibitoru pro ARG1, nor-NOHA (N-hydroxy-nor-L-arginine), vedlo k obnově funkce TCR receptoru a tedy k vyšší aktivitě T buněk a v důsledku ke zpomalení nádorového růstu u modelu plicního karcinomu [95].

Další funkcí L-argininu v T-lymfocytech je jeho role při proliferaci. Absence L-argininu vedla k neschopnosti zvýšit regulaci exprese cyklinu D3 a cdk4 (cyklin dependentní kináza). Naopak došlo ke zvýšení exprese cdk6. Buňky tak byly uvězněny v G₀-G₁ fázi buněčného cyklu. [96] Tento mechanismus je zřejmě zapříčiněn sníženou stabilitou mRNA [97]. Deplece MDSCs u pacienta s renálním karcinomem vedla k znovuoobnovení proliferace T-buněk a exprese CD3 ζ -řetězce [106]. Exprese ARG1 je v MDSCs zvyšována prostřednictvím IL-4 [105].

5.7.2 Syntáza oxidu dusnatého 2

Syntáza oxidu dusnatého 2 (NOS2) oxiduje L-arginin na oxid dusnatý (NO) a citrulin [94]. Obecně je indukována IFN- γ a normálně je asociována s makrofágy typu M1, kde se účastní akutního zánětu [98, 99] Neméně důležitá je však její role v nádorové imunosupresi. Mechanismus tlumení imunitní

odpovědi spočívá v interferenci se signální kaskádou interleukinu IL-2 [100], cytokinu, který je při zánětu produkován pomocnými T buňkami a má roli ve vyvolání masivní proliferace dalších T lymfocytů a B lymfocytů. Vysoká koncentrace NO může mít navíc na T lymfocyty přímý pro-apoptotický efekt [62].

5.7.3 Vzájemný vztah ARG1 a NOS2 a vznik peroxynitritu

Ačkoliv se dlouho myslelo, že ARG1 a NOS2 jsou enzymy, které mohou být vzhledem ke stejnému substrátu jen velmi řídkce exprimovány společně, tato domněnka byla později vyvrácena. [62] ARG1 a NOS2 se při nízké hladině L-argininu vzájemně ovlivňují, ale svou přítomnost nevyklučují. Pokud v daném prostředí klesne za přítomnosti obou těchto enzymů hladina L-argininu, ARG1 "přepne" aktivitu NOS2. Ta pak produkuje místo NO superoxidové radikály [101].

Superoxidový radikál spontánně reaguje s dalšími molekulami a generuje reaktivní dusíkové intermediáty (RNI, reactive nitrogen intermediates). Pokud například zreaguje s NO, vznikne jeden z nejučinnějších oxidantů, peroxynitrit (ONOO^-), který indukuje nitraci cysteinu, methioninu, tryptofanu a především tyrosinu. Schopnost peroxynitritu modifikovat a inaktivovat různé proteiny (nitrací aminokyselin) z něj činí faktor, který skrze tento mechanismus přímo podporuje progresi nádoru [105].

Dalším významným produktem spontánních reakcí superoxidových radikálů jsou ROS (reactive oxygen species). Myeloidní buňky představují nejvýznamnější zdroj těchto kyslíkových radikálů. MDSCs způsobují produkci ROS oxidativní stres, který působí zejména jako inhibiční faktor antigenem indukované proliferace T buněk [107] a v naivních T lymfocytech může inhibovat CD3 ζ -řetězec [103]. Mezi aktivátory produkce ROS patří široká škála cytokinů vyskytujících se v nádorovém mikroprostředí, mezi nejznámější patří například TGF- β , IL-10 a IL-6 [105]. U mnoha nádorových onemocnění byla zvýšená hladina ROS pozorována v přímém vztahu s zvýšenou tumorigenezí, metastázami a neoangiogenezí [108,109].

5.7.4 Cysteinová deprivace

Cystein je další aminokyselina nezbytná pro aktivaci T lymfocytů. T buňky postrádají cystathionázu, enzym odpovědný za konverzi methioninu na cystein. Nemají ani x_c přenašeč pro import cystinu, který by mohly intracelulárně redukovat na cystein [102]. Jsou tedy plně závislé na exportu cysteinu z APCs do extracelulárního prostředí. Exportovaný cystein potom T lymfocyty importují pomocí přenašeče neutrálních aminokyselin z rodiny ASC (ASC neutral amino acid transporter) [62].

MDSCs buňky mají schopnost exprimovat x_c přenašeč, mohou tedy importovat cystin, který posléze konvertují na cystein. Postrádají však ASC přenašeč, nejsou tedy schopné exportovat vzniklý cystein do extracelulárního prostředí. Přítomnost MDSCs buněk je tedy pro hladinu cysteinu v extracelulárním prostředí kritická. MDSCs kompetují s APCs o extracelulární cystein, což vede k cysteinové deprivaci a k limitaci jejich aktivace a funkce [104].

5.8 Interakce MDSCs s hlavními subpopulacemi imunitních buněk

V předchozí kapitole bylo zmíněno několik mechanismů, kterými MDSCs přispívají (ať už přímou či nepřímou cestou) k imunosupresivnímu charakteru nádorového mikroprostředí. Mezi ty přímé mechanismy patří zejména produkce radikálů, a tím vytváření mutagenního prostředí. Naopak mezi ty nepřímé patří ovlivňování vzájemného poměru subpopulací imunitních buněk v nádoru prostřednictvím interakce s jednotlivými buněčnými typy a posun jejich poměrného zastoupení ve prospěch imunosuprese, což je prakticky nejvýznamnější způsob úniku imunitnímu dohledu.

Inhibice proliferace CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů již byla zmíněna v předchozích kapitolách, stejně jako mechanismy, kterými MDSCs proti těmto buněčným liniím působí. Kromě přímého ovlivnění však MDSCs dále posouvají rovnováhu Th1/Th2 buněk ve prospěch tumorigenní populace Th2. Vliv mají i na blokaci funkce NK buněk [3].

Dalším příkladem vlivu MDSCs na vzájemný poměr buněčných subpopulací je dysbalance mezi M1/M2 makrofágy [110]. Jak již bylo zmíněno dříve, M1 fenotyp má protinádorové účinky, zatímco M2 makrofágy k růstu nádoru spíše přispívají. M1 makrofágy produkují po aktivaci za normálních podmínek nízkou hladinu IL-10 a naopak významné množství IL-12, což vede k podpoře Th1 lymfocytů a má také vliv na maturaci DCs. Ačkoliv exprese MHC-II není u makrofágů tak vysoká jako u DCs, v antigenní prezentaci makrofágů mají rovněž nezanedbatelné uplatnění. V přítomnosti vyšší hladiny IL-10 však vlivem přímého kontaktu mezi MDSCs a M1 makrofágy dochází k dramatickému snížení APC aktivity, z důvodu snížení transkripce IL-12 a MHC-II. To ve svém důsledku vede k oslabení specifické imunitní odpovědi v nádorovém mikroprostředí. IL-12 je zřejmě natolik rozhodujícím faktorem, že jeho přítomnost byla schopna vyvolat transformaci TAMs na funkční makrofágy s protinádorovou aktivitou [111].

Interakce MDSCs s DCs je spíše teoretická. Vzhledem k tomu, že MDSCs představují *de facto* nezralé vývojové stádium myeloidní linie (viz kapitola 5.6), lze předpokládat, že bude existovat možnost, jak donutit MDSCs vývojovou řadu dokončit. Skutečně, bylo zjištěno, že transformaci MDSCs na DCs vyvolává kyselina all-trans retinová (ATRA) [112]. Zjednodušeně můžeme tedy říci, že interakce MDSCs s DCs spočívá ve vzájemném poměru jejich zastoupení – MDSCs tedy “zmenšují” počet DCs tím, “že se jimi samy nestávají”.

Důležitý vztah probíhá rovněž mezi MDSCs a Treg. Proliferace Treg totiž závisí na přítomnosti cytokinů TGF- β a IL-10. Tyto látky jsou MDSCs hojně produkovány, v jejich přítomnosti tedy dochází k nárůstu množství Treg v nádorových tkáních i periferní krvi [113].

5.9 Terapeutické ovlivnění MDSCs

Nádorová terapie zahrnuje několik typů léčby. Mezi nejznámější patří chemoterapie, radioterapie nebo imunoterapie, která se dnes používá spíše jako podpora klasické chemoterapeutické léčby.

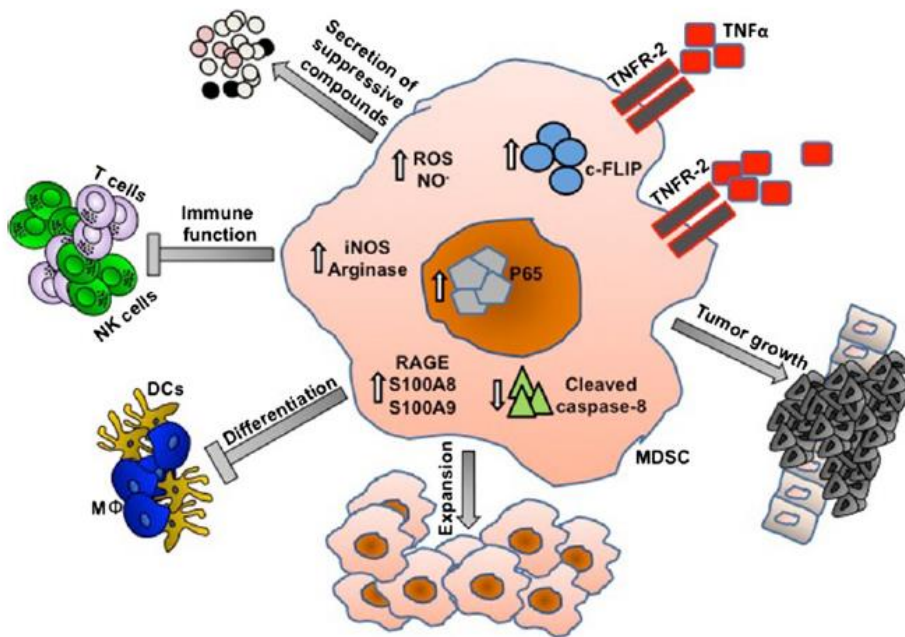
Chemoterapii lze dále dělit podle cíle svého působení. Léčiva tak lze dělit například na ta, která způsobují přímou smrt nádorových buněk, na léčiva blokující angiogenezi, na léčiva, která blokují pro-tumorigenní faktory, jako jsou například IL-6, TGF- β a za určitých podmínek i TNF- α . Další možnosti léčby nádorových onemocnění spočívají v podpoře buněk imunitního systému asociovaných s nádorovým mikroprostředím či v potlačení potlačení buněk s imunosupresivním charakterem. Do poslední skupiny řadíme i cílení na MDSCs [115].

MDSCs mají prokazatelně velký vliv na charakter nádorového mikroprostředí. Zvýšený počet těchto buněk koreluje se špatnou prognózou a úmrtností pacientů s různými typy nádorů [114]. Není tedy divu, že se v poslední době objevil významný počet studií, které se snaží vyvinout terapii cílenou přímo na MDSCs.

Jedním ze zajímavých způsobů terapie je nepřímé ovlivňování MDSCs pomocí cíleného snížení hladiny TNF- α . Tento cytokin byl poprvé izolován v sedmdesátých letech minulého století a popsán jako faktor, způsobující nekrotizaci nádorové tkáně [116]. Později se však začaly ukazovat jeho četné role. Zjistilo se, že TNF- α přímou či nepřímou cestou ovlivňuje maligní buňky – zvyšuje proliferaci a přežívání nádorových buněk, hraje roli při poškozování DNA, zvyšuje angiogenezi, nádorový růst a schopnost metastáze [117]. TNF- α se tedy záhy stal potenciálním cílem pro nádorovou terapii. Otázkou však i nadále zůstávalo, zda má tento cytokin vliv také na imunosupresivní charakter nádoru. V roce 2012 ukázal Zhao *et al.*, že pod vlivem TNF- α dochází k akumulaci MDSCs v místě nádoru [118]. Signalizace TNF- α přes receptor TNFR-2 vedla ke zvýšení exprese anti-apoptotických FLICE inhibičních proteinů (c-FLIP), což mělo za následek inhibici aktivace apoptotické kaspázy-8, a tedy zvýšenou akumulaci MDSCs v místě nádoru. Skutečně, další výzkum prokázal, že při podání etanerceptu, inhibitoru TNF- α , v raných fázích chronického zánětu došlo k redukci imunosuprese způsobené MDSCs a zároveň byla patrná tendence MDSCs k dozrávání na DCs a makrofágy [119]. Četné účinky TNF- α na MDSCs shrnuje obrázek 2.

Obrázek 2, převzato z [115], upraveno

TNF- α je v prostředí chronického zánětu hlavní regulátor MDSCs. Tento cytokin podporuje prostřednictvím signalizace přes TNFR-2 aktivitu MDSCs tím, že zvyšuje expresi anti-apoptotických FLICE-inhibitorních proteinů (c-FLIP). Tyto proteiny inhibují aktivitu pro-apoptotické kaspázy-8 a silně tak omezují programovanou buněčnou smrt v MDSCs. TNF- α také kontroluje diferenciaci a aktivaci MDSCs tím, že inhibuje zrání MDSCs na makrofágy a DCs zvýšením exprese pro-zánětlivých proteinů S100A8/9 a jejich receptoru RAGE. TNF- α také kontroluje produkci imunopresivních komponent, jako je NO a ROS.



Na druhou stranu, pacienti trpící revmatoidní artritidou (zánětlivé autoimunitní onemocnění), kteří byli léčeni protilátkami proti TNF- α , vykazovali mnohem vyšší náchylnosti k onemocnění oportunními infekcemi ve srovnání s pacienty léčenými jinými metodami [120]. Cílená eliminace MDSCs je tedy zřejmě záležitostí individuálního přístupu. Další otázkou je i efektivita samotné inhibice MDSCs. Deplece MDSCs pomocí monoklonálních protilátek anti-Gr-1 nebo anti-Ly6G (v myším modelu) sice vede k omezení růstu nádoru, ale nikoliv k jeho úplnému vymizení. Z hlediska léčby nádorů se však zdá být dlouhodobější eliminace MDSCs neproveditelná, vzhledem k neustálemu rekrutování nových MDSCs z kostní dřeně v přítomnosti nádoru. Konvenční léčba doprovázená deplecí MDSCs se zdá být ale na druhou stranu naopak velmi účinná. Podpurná imunoterapie je navíc zřejmě zcela zásadní pro trvalou eradikaci nádoru. Optimálním řešením se tedy zdá být kombinace klasické chemoterapie a imunoterapeutické deplece MDSCs [19].

Mezi další léčiva zasahující přímo MDSCs patří například Sunitinib, inhibitor receptoru tyrosin kinázy, a Axitinib, inhibitor tyrosin kinázy VEGFR [115]. Inhibiční účinky na MDSCs mají však i některá

konvenčně používaná chemoterapeutika. Počet MDSCs snižuje například pyrimidinový analog 5-fluoruracil (5FU) nebo gemcitabin, analog cytidinu [121, 79]. Naopak, některá chemoterapeutika vliv na MDSCs nevykazují, příkladem může být cyklofosfamid [76].

Alternativní přístup k ovlivnění populace MDSCs může představovat podpora jejich diferenciaci. Výše již byla zmíněna schopnost ATRA navozovat diferenciaci MDSCs v granulocytární buňky, a tím snižovat jejich schopnost tlumit imunitní reakce [112]. Funkci navozování diferenciaci MDSCs mají také nemetylované CpG oligonukleotidy [59].

VI. Závěr:

V dnešní době čím dál tím víc nahlížíme na nádory jako na komplexní onemocnění, spíše než jen jako na proces probíhající lokálně v abnormální tkáni. Nádory si vytvářejí specifické mikroprostředí s charakteristickými vlastnostmi (hypoxie, nadměrná angiogeneze, apod.). Ukazuje se, že abychom byli schopni nádorové onemocnění správně popsat a být tak schopni nalézt efektivní léčbu, musíme uvažovat celé toto mikroprostředí se všemi jeho specifickými vlastnostmi. Jedním ze stěžejních rysů nádorového mikroprostředí jsou i změny ve vlastnostech buněk a mechanismů imunitního systému. Nádory jsou schopny modifikovat vlastnosti imunitního systému a potlačovat imunitní odpověď vůči vznikajícímu nádoru.

MDSCs jsou heterogenní populací buněk myeloidní řady, které k supresi imunitních reakcí v nádorech výrazně přispívají. Deplece MDSCs má při terapii nádorů významný, ale časově omezený efekt. Vlivem neustálého vycestovávání myeloidních buněk z kostní dřeně do nádoru však nemá tento druh léčby trvalejší efekt a samotná terapie cílená na MDSCs na eradikaci nádoru nestačí. V kombinaci s konvenční chemoterapií ale naopak může blokáda aktivity MDSCs představovat slibný posun v nádorové terapii.

Množství nezodpovězených otázek stále nabízí fyziologická role MDSCs. Recentní studie ukazují jejich podpůrnou funkci při regulaci akutního zánětu a MDSCs mají zřejmě roli i v tlumení nadměrné imunitní odpovědi. K využití ovlivňování počtu nebo aktivity populace MDSCs pro zlepšení léčby nádorových onemocnění je tedy nejprve potřeba plně pochopit jejich fyziologickou roli, abychom byli schopni vyloučit rizika spojená s dlouhodobým potlačováním funkce těchto buněk.

VII. Použité prameny a literatura:

- [1] Hanahan, D.; Weinberg, R.A.: The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1): 57-70. Review.
- [2] Hanahan, D.; Weinberg, R.A.: The next generation. *Cell*. 2011; 144(5):646-674. Review.
- [3] Burkholder, B.; Huang, R.Y.; Burgess, R.; Luo, S.; Jones, V.S.; Zhang, W., Lv, Z.Q.; Gao, C.Y.; Wang, B.L.; Zhang, Y.M. et.al.: Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochemica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer*. 2014; 1845(2):182-201. Review.
- [4] Dvorak, H.F.: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2002; 20(21):4368-4380, Review.
- [5] Li, H.; Fan, X.; Houghton, J.M.: Tumor microenvironment: The role of the tumor stroma in cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2007; 101(4):805-815
- [6] Pytliak, M.; Vargová, V.; Mechírová, V.: Matrix metalloproteinases and their role in oncogenesis: a review. *Onkologie*. 2012; 35(1-2):49-53. Review.
- [7] Eddy, R.J.; Petro, J.A.; Tomasek, J.J.: Evidence for the nonmuscle nature of the "myofibroblast" of granulation tissue and hypertrophic scar. An immunofluorescence study. *American Journal of Pathology*. 1988; 130(2):252-60
- [8] Darby, I.; Skalli, O.; Gabbiani, G.: Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound-healing. *Laboratory Investigation*. 1990; 63(1):21-29
- [9] Clayton, A.; Evans, R.A.; Pettit, E., Hallet, M.B.; Williams, J.D.; Steadman, R.: Cellular activation through the ligation of intercellular adhesion molecule-1. *Journal of Cell Science*. 1998; 111(4):443-453
- [10] Zeisberg, M.; Strutz, F.; Muller, G.A.: Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. *Journal of Nephrology*. 2000; 13(3):111-120
- [11] Haviv, I.; Polyak, K.; Qiu, W.; Hu, M.; Campbell, I.: Origin of carcinoma associated fibroblasts. *Cell Cycle*. 2009; 8(4):589-595. Review.
- [12] Sugimoto, H.; Mundel, T.; Kieran, M.; Kalluri, R.: Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biology & Therapy*. 2006; 5(12): 1640-1646
- [13] Anderberg, Ch.; Pietras, K.: On the origin of cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle*. 2009; 8(10):1461-1462
- [14] Hodi, F.S.; O'Day, S.J.; McDermott, D.F.; Weber, R.W.; Sosman, J.A.; Haanen, J.B.; Gonzalez, R.; Robert, C.; Schadendorf, D.; Hassel, J.C. et al.: Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2010; 363(8): 711-723

- [15] Bhowmick, N.A.; Neilson, E.G.; Moses, H.L.: Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 2004; 432(7045):332-337
- [16] Pietras, K.; Pahler, J.; Bergers, G.; Hanahan, D.: Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *Plos Medicine*. 2008; 5(1):10.1371
- [17] Dvorak, H.F.: Angiogenesis: update 2005. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005; 3(8):1835-1842
- [18] Carmeliet, P.: VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 2005; 69(3):4-10
- [19] Srivastava, M.K.; Zhu, L.; Harris-White, M.; Kar, U.; Huang, M.; Johnson, M.F.; Lee, J.M.; Elashoff, D.; Strieter, R.; Dubinett, S.; Sharma, S.: Myeloid suppressor cell depletion augments antitumor activity in lung cancer. *Plos One*. 2012; 7(7)
- [20] Nagy, J.A.; Vasile, E.; Feng, D.; Sundberg, C.; Brown, L.F.; Detmar, M.J.; Lawitts, J.A.; Benjamin, L.; Tan, X.; Manseau, E.J. et al.: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *Journal of Experimental Medicine*. 2002; 196(11):1497-506.
- [21] Williams, K.J.; Cowen, R.L.; Stratford, I.J.: Hypoxia and oxidative stress in breast cancer - Tumour hypoxia - therapeutic considerations. *Breast Cancer Research*. 2001; 3(5):328-331. Review.
- [22] Vaupel, P.; Schlenger, K.; Knoop, C.; Hockel, M.: Oxygenation of human tumors – evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Research*. 1991; 51(12):3316-3322
- [23] Graeber, T.G.; Peterson, J.F.; Tsai, M.; Monica, K.; Fornace, A.J.; Giaccia, A.J.: Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G(1)-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Molecular and Cellular Biology*. 1994; 14(9):6264-6277
- [24] Shweiki, D.; Itin, A.; Soffer, D.; Keshet, E.: Vascular endothelial growth-factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992; 359(6398):843-845
- [25] Weidner, N.; Carroll, P.R.; Flax, J.; Blumenfeld, W.; Folkman, J.: Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *American Journal of Pathology*. 1993; 143(2):401-409
- [26] Wang, G.L.; Jiang, B.H.; Rue, E.A.; Semenza, G.L.: Hypoxia-inducible factor-1 is a basic-helix-loop-helix-pas heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995; 92(12):5510-5514
- [27] Wang, G.L.; Semenza, G.L.: Purification and characterization of hypoxia-inducible factor-1. *Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270(3):1230-1237

- [28] Huang, L.E.; Arany, Y.; Livingston, D.M.; Bunn, H.F.: Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271(50):32253-32259
- [29] Comeford, K.M.; Wallace, T.J.; Karhausen, J.; Louis, N.A.; Montalto, M.C.; Colgan, S.P.: Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Research*. 2002; 62(12):3387-3394
- [30] Feldser, D.; Agani, F.; Iyer, N.V.; Pak, B.; Ferreira, G.; Semenza, G.L.: Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Research*. 1999; 59(16):3915-3918
- [31] Ceradini, D.J.; Kulkarni, A.R.; Callaghan, M.J.; Tepper, O.M.; Bastidas, N.; Kleinman, M.E.; Capla, J.M.; Galiano, R.D.; Levine, J.P.; Gurtner, G.C.: Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature Medicine*. 2004; 10(8):858-864
- [32] Nishi, H.; Nakada, T.; Kyo, S.; Inoue, M.; Shay, J.W.; Isaka, K.: Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT). *Molecular and Cellular Biology*. 2004; 24(13):6076-6083
- [33] Smallbone, K.; Gatenby, R.A.; Gillies, R.J.; Maini, P.K.; Cavaghan, D.J.: Metabolic changes during carcinogenesis: Potential impact on invasiveness. *Journal of Theoretical Biology*. 2007; 244(4):703-713
- [34] www.yervoy.com
- [35] Gatenbey, R.A.; Gillies, R.J.: Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer*. 2004; 4(11):891-899. Review.
- [36] Balkwill, F.; Mantovani, A.: Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001; 357(9255):539-545. Review.
- [37] Dvorak, H.F.; Flier, J.; Frank, H.: Tumors – wounds that do not heal – similarities between tumor stroma generation and wound-healing. *New England Journal of Medicine*. 1986; 315(26):1650-1659. Review.
- [38] Coussens, L.M.; Werb, Z.: Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420(6917):860-867. Review.
- [39] Dunn, G.P.; Bruce, A.T.; Ikeda, H.; Old, L.J.; Schreiber, R.D.: Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*. 2002; 3(11):991-998. Review.
- [40] Kaplan, D.H.; Shankaran, V.; Dighe, A.S.; Stockert, E.; Aguet, M.; Old, L.J.; Schreiber, R.D.: Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998; 95(13):7556-7561
- [41] VandenBroek, M.F.; Kagi, D.; Ossendorp, F.; Toes, R.; Vamvakas, S.; Lutz, W.K.; Melief, C.J.M.; Zinkernagel, R.M.; Hengartner, H.: Decreased tumor surveillance in perforin – deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*. 1996; 184(5):1781-1790

- [42] Banchereau, J.; Steinman, R.M.: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*.1998; 392(6673):245-252. Review.
- [43] DeNardo, D.G.; Andreu, P.; Coussens, L.: Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2010; 29(2):309-316. Review.
- [44] Dunn, G.P.; Old, L.J.; Schreiber, R.D.: The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology*. 2004; 22:329-360. Review.
- [45] Dunn, G.P.; Old, L.J.; Schreiber, R.D.: The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004; 21(2):137-148. Review.
- [46] Ostrand-Rosenberg, S.: Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2008; 18(1):11-18. Review.
- [47] Ribas, A.; Butterfield, L.H.; Glaspy, J.A.; Economou, J.S.: Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2003; 21(12):2415-2432. Review.
- [48] Stuehr, D.J.; Marletta, M.A.: Mammalian nitrate biosynthesis – mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985; 82(22):7738-7742
- [49] Cifone, M.G.; Cironi, L.; Meccia, M.A.; Roncaioli, P.; Festuccia, C.; DeNuntiis, G.; D'Alò, S.; Santoni, A.: Role of nitric oxide in cell – mediated tumor cytotoxicity. *Advances in Neuroimmunology*. 1995; 5(4):443-461. Review.
- [50] Cunha, F.Q.; Moncada, S.; Liew, F.Y.: Interleukin -10 (IL-10) inhibits the induction of nitric-oxide synthase by interferon – gamma in murine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1992; 182(3):1155-1159
- [51] Ding, A.; Nathan, C.F.; Graycar, J.; Derynck, R.; Stuehr, D.J.; Srinivasan, S.: Macrophage deactivating factor and transforming growth factor-beta-1, factor-beta-2, and factor-beta-3 inhibit induction of macrophage nitrogen-synthesis by IFN-gamma. *Journal of Immunology*. 1990; 145(3):940-944
- [52] Sica, A.; Schioppa, T.; Mantovani, A.; Allavena, P.: Tumour – associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. *European Journal of Cancer*. 2006; 42(6):717-727. Review.
- [53] Pollard, J.W.: Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer*. 2004; 4(1):71-78. Review.
- [54] Ono, M.: Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer Science*. 2008; 99(8):1501-1506. Review.
- [55] Phan, G.Q.; Yang, J.C.; Sherry, R.M.; Hwu, P.; Topalian, S.L.; Schwartzentruber, D.J.; Restifo, N.P.; Haworth, L.R.; Seipp, C.A.; Freezer, L.J. et al.: Cancer regression and autoimmunity

- induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100(14):8372-8377.
- [56] Coventry, B.J.; Morton, J.: CD1a-positive infiltrating-dendritic cell density and 5-year survival from human breast cancer. *British Journal of Cancer*. 2003; 89(3):533-538
- [57] Cai, X.Y.; Gao, Q.; Qiu, S.J.; Ye, S.L.; Wu, Z.Q.; Fan, J.; Tang, Z.Y.: Dendritic cell infiltration and prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2006; 132(5):293-301
- [58] Harizi, H.; Juzan, M.; Pitard, V.; Moreau, J.F.; Gualde, N.: Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin E-2 enhances the production of endogenous IL-10, which down – regulates dendritic cell functions. *Journal of Immunology*. 2002; 168(5):2255-2263
- [59] Zoglmeier, C.; Bauer, H.; Noerenberg, D.; Wedekind, G.; Bittner, P.; Sandholzer, N.; Rapp, M.; Anz, D.; Endres, S.; Bourquin, C.: CpG blocks immunosuppression by myeloid – derived suppressor cells in tumor – bearing mice. *Clinical Cancer Research*. 2011; 17(7):1765-1775
- [60] Bronte, V.; Apolloni, E.; Cabrelle, A.; Ronca, R.; Serafini, P.; Zamboni, P.; Restifo, N.P.; Zanovello, P.: Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood*. 2000; 96(12):3838-3846
- [61] Youn, J.I.; Nagaraj, S.; Collazo, M.; Gabrilovich, D.I.: Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of Immunology*. 2008; 181(8):5791-5802
- [62] Serafini, P.: Myeloid derived suppressor cells in physiological and pathological conditions: the good, the bad, and the ugly. *Immunologic Research*. 2013;57(1-3):172-184. Review.
- [63] Youn, J.I.; Kumar, V.; Collazo, M.; Nefedova, Y.; Condamine, T.; Cheng, P.Y.; Villagra, A.; Antonia, S.; McCaffrey, J.C.; Fishman, M. et al.: Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nature Immunology*. 2013; 14(3):211-220
- [64] Eruslanov, E.; Neuberger, M.; Daurkin, I.; Perrin, G.O.; Algood, C.; Dahm, P.; Rosser, C.; Vieweg, J.; Gilbert, S.M.; Kusmartsev, S.: Circulating and tumor – infiltrating myeloid cell subsets in patients with bladder cancer. *International Journal of Cancer*. 2012; 130(5):1109-1119
- [65] Khaled, Y.S.; Ammori, B.J.; Elkord, E.: Increased Levels of Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Peripheral Blood and Tumour Tissue of Pancreatic Cancer Patients. *Journal of Immunology Research*. 2014
- [66] Gabrilovich, D.I.; Nagaraj, S.: Myeloid – derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2009; 9(3):162-174. Review.

- [67] Arocena, A.R.; Onofrio, L.I.; Pellegrini, A.V.: Myeloid-derived suppressor cells are key players in the resolution of inflammation during a model of acute infection. *European Journal of Immunology*. 2014; 44(1):184-194
- [68] Voisin, M.B.; Buzoni-Gatel, D.; Bout, D.: Both expansion of regulatory GRI(+) CD11b(+) myeloid cells and anergy of T lymphocytes participate in hyporesponsiveness of the lung-associated immune system during acute toxoplasmosis. *Infection and Immunity*. 2004; 72(9):5487-5492
- [69] Mencacci, A.; Montagnoli, C.; Bacci, A.; Cenci, E.; Pizzurra, L.; Spreca, A.; Kopf, M.; Sharpe, A.H.; Romani, L.: CD80(+)Gr1(+) myeloid cells inhibit development of antifungal Th1 immunity in mice with candidiasis. *Journal of Immunology*. 2002; 169(6):3180-3190
- [70] Serafini, P.; Borrello, I.; Bronte, V.: Myeloid suppressor cells in cancer: Recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Seminars in Cancer Biology*. 2006; 16(1):53-65. Review.
- [71] Zhu, B.; Bando, Y.; Xiao, S.; Yang, K.Y.; Anderson, A.C.; Kuchroo, V.K.; Khoury, S.J.: CD11b(+)Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology*. 2007; 179(8):5228-5237
- [72] Tan, D.B.A.; Fernandez, S.; Price, P.; Moodley, Y.P.: The proportion and function of peripheral myeloid-derived suppressor cells do not correlate with systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Human Immunology*. 2014; 75(1):5-9
- [73] Serafini, P.; Carbley, R.; Noonan, K.A.; Tan, G.; Bronte, V.; Borello, I.: High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Research*. 2004; 64(17):6337-6343
- [74] Makarenkova, V.P.; Bansal, V.; Matta, B.M.; Perez, L.A.; Ochoa, J.B.: CD11b(+)/Gr-1(+) myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress. *Journal of Immunology*. 2006; 176(4):2085-2094
- [75] Sander, L.E.; Sackett, S.D.; Dierssen, U.; Beraza, N.; Linke, R.P.; Muller, M.; Blander, J.M.; Tacke, F.; Trautwein, C.: Hepatic acute – phase proteins control innate immune response during infection by promoting myeloid – derived suppressor cell function. *Journal of Experimental Medicine*. 2010; 207(7):1453-1464
- [76] Lutsiak, M.E.C.; Semnani, R.T.; De Pascalis, R.; Kashmiri, S.V.S.; Schlom, J.; Sabzevari, H.: Inhibition of CD4(+)25(+) T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood*. 2005; 105(7): 2862-2868
- [77] Cuenca, A.G.; Delano, M.J.; Kelly-Scumpia, K.M.; Moreno, C.; Scumpia, P.O.; LaFace, D.M.; Heyworth, P.G.; Efron, P.A.; Moldawer, L.L.: A paradoxical role for myeloid – derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Molecular Medicine*. 2011; 17(3-4):281-292. Review.

- [78] Pan, P.Y.; Wang, G.X.; Yin, B.J.; Ozazo, J.; Ku, T.; Divino, C.M.; Chen, S.H.: Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid – derived suppressor cell development by blockade of stem – cell factor function. *Blood*. 2008; 111(1): 219-228
- [79] Suzuki, E.; Kapoor, V.; Jassar, A.S.; Kaiser, L.R.; Albelda, S.M.: Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1(+)/CD11b(+) myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clinical Cancer Research*. 2005; 11(18): 6713-6721
- [80] Bunt, S.K.; Yang, L.; Sinha, P. ; Clements, V.K.; Leips, J.; Ostrand – Rosenberg, S.: Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Research*, 2007; 67(20):10019-10026
- [81] Gabrilovich, D.; Ishida, T.; Oyama, T.; Ran, S.; Kravtsov, V.; Nadaf, S.; Carbone, D.P.: Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood*. 1998; 92(11):4150-4166
- [82] Sinha, P.; Clements, V.K.; Fulton, A.M.; Ostrand – Rosenberg, S.: Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid – derived suppressor cells. *Cancer Research*. 2007; 67(9):4507-4513
- [83] Nefedova, Y.; Nagaraj, S.; Rosenbauer, A.; Muro-Cacho, C.; Sebti, S.M.; Gabrilovich, D.I.: Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic – selective inhibition of the Janus – activated kinase 2/ signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer Research*. 2005; 65(20):9525-9535
- [84] Yan, D.H.; Yang, Q.; Shi, M.H.; Zhong, L.M.; Wu, C.Y.; Meng, T.; Yin, H.Y.; Zhou, J.: Polyunsaturated fatty acids promote the expansion of myeloid-derived suppressor cells by activating the JAK/STAT3 pathway. *European Journal of Immunology*. 2013; 43(11):2943-2955
- [85] Nefedova, Y.; Huang, M.; Kusmartsev, S.; Bhattacharya, R.; Cheng, P.Y.; Salup, R.; Jove, R.; Gabrilovich, D.: Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *Journal of Immunology*. 2004; 172(1):464-474
- [86] Waight, J.D.; Netherby, C.; Hensen, M.L.; Miller, A.; Hu, Q.; Liu, S.; Bogner, P.N.; Farren, M.R.; Lee, K.P.; Liu, K.B.; Abrams, S.I.: Myeloid-derived suppressor cell development is regulated by a STAT/IRF-8 axis. *Journal of Clinical Investigation*. 2013; 123(10):4464-4478
- [87] Foell, D.; Wittkowski, H.; Vogl, T.; Roth, J.: S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage – associated molecular pattern molecules. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007; 81(1):28-37
- [88] Cheng, P.; Corzo, C.A.; Luetsteke, N.; Yu, B.; Nagaraj, S.; Bui, M.M.; Ortiz, M.; Nacken, W.; Sorg, C.; Vogl, T.; Roth, J.; Gabrilovich, D.I.: Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid – derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *Journal of Experimental Medicine*. 2008; 205(10):2235-2249

- [89] Sinha, P.; Okoro, C.; Foell, D.; Freeze, H.H.; Ostrand-Rosenberg, S.; Srikrishna, G.: Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *Journal of Immunology*. 2008; 181(7):4666-4675
- [90] Sade-Feldman, M.; Kanterman, J.; Ish-Shalom, E.; Enekaev, M.; Horwitz, E.; Baniyash, M.: Tumor necrosis factor-alpha blocks differentiation and enhances suppressive activity of immature myeloid cells during chronic inflammation. *Immunity*. 2013; 38(3):541-554
- [91] Kusmartsev, S.; Nagaraj, S.; Gabrilovich, D.I.: Tumor – associated CD8(+) T cell tolerance induced by bone marrow – derived immature myeloid cells. *Journal of Immunology*. 2005; 175(7):4583-4592
- [92] Rutschman, R.; Lang, R.; Hesse, M.; Ihle, J.N.; Wynn, T.A.; Murray, P.J.: Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *Journal of Immunology*. 2001; 166(4):2173-2177
- [93] Terabe, M.; Matsui, S.; Park, J.M; Mamura, M.; Noben-Trauth, N.; Donaldson, D.D.; Chen, W.J.; Wahl, S.M.; Ledbetter, S.; Pratt, B. et al.: Transforming growth factor – beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d – restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte – mediated tumor immunosurveillance: Abrogation prevents tumor recurrence. *Journal of Experimental Medicine*. 2003; 198(11):1741-1752
- [94] Wu, G.Y.; Morris, S.M.: Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*. 1998; 336: 1-17. Review.
- [95] Rodriguez, P.C.; Quiceno, D.G.; Zabaleta, J.; Ortiz, B.; Zea, A.H.; Piazuelo, M.B.; Delgado, A.; Correa, P.; Brayer, J.; Sotomayor, E.M. et al.: Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T – cell receptor expression and antigen – specific T – cell responses. *Cancer Research*. 2004; 64(16): 5839-5849
- [96] Rodriguez, P.C.; Quiceno, D.G.; Ochoa, A.C.: L – arginine availability regulates T – lymphocyte cell – cycle progression. *Blood*. 2007; 109(4): 1568-1573
- [97] Rodriguez, P.C.; Hernandez, C.P.; Morrow, K.; Sierra, R.; Zabaleta, J.; Wyczechowska, D.D.; Ochoa, A.C.: L – arginine deprivation regulates cyclin D3 mRNA stability in human T cells by controlling HuR expression. *Journal of Immunology*. 2010, 185(9):5198-5204
- [98] Lawrence, T.; Natoli, G.: Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nature Reviews Immunology*. 2011; 11(11):750-761. Review.
- [99] Fukumura, D.; Kashiwagi, S.; Jain, R.K.: The role of nitric oxide in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6(7): 521-534. Review.
- [100] Mazzone, A.; Bronte, V.; Visintin, A.; Spitzer, J.H.; Apolloni, E.; Serafini, P.; Zanovello, P.; Segal, D.M.: Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *Journal of Immunology*. 2002; 168(2): 689-695

- [101] Bronte, V.; Serafini, P.; De Santo, C.; Marigo, I.; Tosello, V.; Mazzoni, A.; Segal, D.M.; Staib, C.; Lowel, M.; Sutter, G. et al.: IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *Journal of Immunology*. 2003; 170(1): 270-278
- [102] Gmunder, H.; Eck, H.P.; Droge, W.: Low membrane – transport activity for cystine in resting and mitogenically stimulated human lymphocyte preparations and human T-cell clones. *European Journal of Biochemistry*. 1991; 201(1): 113-117
- [103] Kono, K.; Rensing, M.E.; Brandt, R.M.P.; Melief, C.J.M.; Potkul, R.K.; Andersson, B.; Petersson, M.; Kast, W.M.; Kiessling, R.: Decreased expression of signal - transducing zeta chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with cervical cancer. *Clinical Cancer Research*. 1996; 2(11): 1825-1828
- [104] Srivastava, M.K.; Sinha, P.; Clements, V.K.; Rodriguez, P.; Ostrand – Rosenberg, S.: Myeloid-Derived Suppressor Cells Inhibit T-Cell Activation by Depleting Cystine and Cysteine. *Cancer Research*. 2010; 70(1): 68-77
- [105] Nagaraj, S.; Gabilovich, D.I.: Regulation of suppressive function of myeloid-derived suppressor cells by CD4(+) T cells. *Seminars in Cancer Biology*. 2012; 22(4): 282-288. Review.
- [106] Zea, A.H.; Rodriguez, P.C.; Atkins, N.B.; Hernandez, C.; Signoretti, S.; Zabaleta, J.; McDermott, D.; Quiceno, D.; Youmans, A.; O’Neill, A. et al.: Arginase - producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: A mechanism of tumor evasion. *Cancer Research*. 2005; 65(8): 3044-3048
- [107] Otsuji, M.; Kimura, Y.; Aoe, T.; Okamoto, Y.; Saito, T.: Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93(23): 13119-13124
- [108] Mantovani, G.; Maccio, A.; Madeddu, C.; Mura, L.; Gramignano, G.; Lusso, M.R.; Massa, E.; Mocci, M.; Serpe, R.: Antioxidant agents are effective in inducing lymphocyte progression through cell cycle in advanced cancer patients: assessment of the most important laboratory indexes of cachexia and oxidative stress. *Journal of Molecular Medicine*. 2003; 81(10): 664-673
- [109] Agostinelli, E.; Seiler, N.: Non-irradiation-derived reactive oxygen species (ROS) and cancer: therapeutic implications. *Amino Acids*. 2006; 31(3): 341-355
- [110] Ostrand-Rosenberg, S.; Sinha, P.; Beury, D.W.; Clements, V.K.: Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Seminars in Cancer Biology*. 2012; 22(4): 275-281. Review.
- [111] Watkins, S.K.; Egilmez, N.K.; Suttles, J.; Stout, R.D.: IL-12 rapidly alters the functional profile of tumor-associated and tumor-infiltrating macrophages in vitro and in vivo. *Journal of Immunology*. 2007; 178(3): 1357-1362

- [112] Mirza, N.; Fishman, M.; Fricke, I.; Dunn, M.; Neuger, A.M.; Frost, T.J.; Lush, R.M.; Antonia, S.; Gabrilovich, D.I.: All-trans retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Research*. 2006; 66(18): 9299-9307
- [113] Ghiringhelli, F.; Puig, P.E.; Roux, S.; Parcellier, A.; Schmitt, E.; Solary, E.; Kroemer, G.; Martin, F.; Chauffert, B.; Zitvogel, L.: Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4(+)CD25(+) regulatory T cell proliferation. *Journal of Experimental Medicine*. 2005; 202(7): 919-929
- [114] Gabitass, R.F.; Annels, N.E.; Stocken, D.D.; Pandha, H.A.; Middleton, G.W.: Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2011; 60(10): 1419-1430
- [115] Baniyash, M.; Sade-Feldman, M.; Kanterman, J.: Chronic inflammation and cancer: suppressing the suppressors. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2014; 63(1): 11-20. Review.
- [116] Carswell, E.A.; Old, L.J.; Kassel, R.L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B.: Endotoxin – induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1975; 72(9): 3666-3670
- [117] Balkwill, F.: Tumour necrosis factor and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2009; 9(5): 361-371. Review.
- [118] Zhao, X.Q.; Rong, L.J.; Zhao, X.P.; Li, X.; Liu, X.M.; Deng, J.J.; Wu, H.; Xu, X.; Erben, U.; Wu, P.H. et al.: TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *Journal of Clinical Investigation*. 2012; 122(11): 4094-4204
- [119] Sade-Feldman, M.; Kanterman, J.; Ish-Shalom, E.; Elnekave, M.; Horwitz, E.; Baniyash, M.: Tumor necrosis factor-alpha blocks differentiation and enhances suppressive activity of immature myeloid cells during chronic inflammation. *Immunity*. 38(3): 541-554
- [120] Thompson, A.E.; Rieder, S.W.; Pope, J.E.: Tumor necrosis factor therapy and the risk of serious infection and malignancy in patients with early rheumatoid arthritis a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arthritis and Rheumatism*. 2011; 63(6): 1479-1485
- [121] Vincent, J.; Mignot, G.; Chalmin, F.; Ladoire, S.; Bruchard, M.; Chevriaux, A.; Martin, F.; Apetoh, L.; Rebe, C.; Ghiringhelli, F.: 5-Fluorouracil Selectively Kills Tumor-Associated Myeloid-Derived Suppressor Cells Resulting in Enhanced T Cell-Dependent Antitumor Immunity. *Cancer Research*. 2010; 70(8): 3052-3061