

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

**ÚLOHA INTERLEUKINŮ
PŘI ROZVOJI NÁDOROVÉHO BUJENÍ**

Nguyen Ngoc Thuy

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2012

Zde bude vloženo zadání bakalářské práce

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci použila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákoník, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mě požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 22. 6. 2012

Nguyen Ngoc Thuy

PODĚKOVÁNÍ

Chci poděkovat vedoucí své bakalářské práce, Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D., za její připomínky a návrhy a její trpělivost. Dále chci poděkovat své rodině a přátelům za podporu během studia.

ANOTACE

Tato práce se zabývá interleukiny a jejich úlohou při nádorovém bujení. V první části je práce zaměřena na členění cytokinů, druhy jejich receptorů a nejčastější signalizační dráhy. V další části práce je stručně popsána imunologie nádorového bujení – vznik nádoru a rozpoznávání nádoru imunitním systémem. Poslední část práce obsahuje základní informace a zároveň nejnovější poznatky z klinické praxe, tato část se zabývá nejvíce diskutovanými interleukiny: IL-1, IL-2, IL-4, IL-8, IL-12, IL-17.

KLÍČOVÁ SLOVA

Cytokiny, interleukiny, signální dráha, imunitní systém, nádorové bujení, metastáze

ANNOTATION

This work deals with interleukins and their roles in cancer. The first part of the work is focused on classification of cytokines, their receptors and the most common signalling pathways. In the next part there is shortly described the immunology of tumor growth – tumor formation and its recognition by immune system. The last part of the work contains basic information and the latest findings from clinic, this part deals with the most discussed interleukins: IL-1, IL-2, IL-4, IL-8, IL-12, IL-17.

KEYWORDS

Cytokines, interleukins, signalling pathway, immune system, tumor growth, metastasis

OBSAH

Úvod.....	8
1. Cytokiny.....	9
1.1 Členění cytokinů	9
1.2 Cytokiny s chemoatraktivními vlastnostmi.....	10
1.3 Dělení cytokinů produkovaných Th buňkami	10
1.4 Receptory cytokinů	11
1.4.1 Cytokinové receptory typu I.....	12
1.4.2 Cytokinové receptory typu II	12
2. Signální dráhy cytokinů	13
2.1 JAK-STAT signální dráha	13
2.2 G proteinová signální dráha	14
2.3 Ostatní signální dráhy.....	15
3. Imunologie nádorového bujení.....	16
3.1 Vznik nádoru	16
3.2 Rozpoznávání nádorových buněk imunitním systémem.....	16
3.3 Únik nádoru z imunitního dozoru	19
4. Interleukiny a jejich úloha při nádorovém bujení	20
4.1 Interleukin 1	20
4.1.1 Rodina IL-1	20
4.1.2 Role IL-1 při nádorovém růstu a metastázi	20
4.2 Interleukin 2	21
4.2.1 IL-2 a jeho receptory	22
4.2.2 IL-2 a buňky imunitního systému	22
4.2.3 IL-2 v souvislosti s léčbou nádorů	23
4.3 Interleukin 4	23
4.3.1 Receptory a signalizace	23
4.3.2 IL-4 a buňky imunitního systému	24
4.3.3 IL-4 a nádorové buňky	24
4.4 Interleukin 8	25
4.4.1 IL-8R a zdroje	25
4.4.2 Vztah IL-8, VEGF a p53 u solidních nádorů	25
4.4.3 Úloha IL-8 při pankreatickém karcinomu	26
4.5 Interleukin 12	27
4.5.1 Biologické funkce a receptor IL-12	27
4.5.2 IL-12 a NK buňky	28

4.5.3 Přímý vliv na angiogenezi a nepřímá imunitní odpověď	29
4.6 Interleukin 17	29
4.6.1 Úloha IL-17 při rozvoji nádoru	29
4.6.2 Pro-nádorové aktivity IL-17	30
4.6.2.1 IL-17 podporuje angiogenezi	30
4.6.2.2 IL-17 a IFN- γ , IL-6	30
4.6.3 Protinádorové funkce IL-17	31
Závěr.....	32
LITERATURA	33

Úvod

Interleukiny řadíme k cytokinům. Tyto molekuly mají charakter proteinů a podílejí se na regulaci imunitní odpovědi. Nejprve byly objeveny jako produkty leukocytů – podle toho vzniklo jejich pojmenování. Později se zjistilo, že interleukiny jsou produkovány i jinými buňkami imunitního systému (např. makrofágy, monocyty, dendritickými buňkami) a i neimunitními buňkami (např. epiteliální buňky).

Interleukiny plní v organismu mnoho různých funkcí. Účastní se zánětlivých pochodů (např. IL-1, IL-6), podporují růst a diferenciaci prekurzorových buněk kostní dřeně (např. IL-2, IL-4), jiné zastávají funkci významných chemotaxinů (např. IL-8) nebo ovlivňují příznivě či nepříznivě angiogenezi (např. IL-17) atd. Svými funkcemi ovlivňují celou řadu buněk imunitního systému (T-lymfocyty, B-lymfocyty, NK buňky, makrofágy) a také např. epiteliální a endotelové buňky.

Z výše popsaného je zřejmé, že interleukiny mají v imunitním systému organismu své nezastupitelné místo. Bez nich by imunitní odpovědi vyvolané imunitním systémem nebyly plnohodnotné nebo by dokonce vůbec nemohly vzniknout.

1. Cytokiny

1.1 Členění cytokinů

Cytokiny byly původně rozděleny na lymfokiny a monokiny (dle své produkce v lymfocytech, resp. v monocytech). Toto rozdělení se již nepoužívá, protože se zjistilo, že cytokiny jsou produkovány i jinými buněčnými typy (např. fibroblasty, epiteliálními, endoteliálními buňkami). Pro zavedení jednotné nomenklatury se tyto molekuly začaly označovat jako interleukiny a podle pořadí, v jakém byly jejich struktury poznávány, získávaly příslušné očíslování. Nomenklatura však nebyla řádně dodržována. Některé molekuly si ponechaly své zavedené názvy (např. faktor nekrotizující nádory, interferony, faktory stimulující kolonie, růstové faktory aj.) Tyto důvody vedly k zavedení obecnějšího pojmu cytokiny [1]. Doposud byla identifikována primární struktura asi 200 různých cytokinů a je pravděpodobné, že tento počet se bude i nadále zvyšovat [2].

Cytokiny jsou buď sekretovány nebo jsou vázané na membránách. Sekretované cytokiny jsou produkovány leukocyty a jinými buňkami imunitního systému. Membránové formy cytokinů jsou na rozdíl od sekretovaných umístěny na transmembránové doméně hydrofobní sekvencí přibližně 20 aminokyselin. U membránově vázaných cytokinů nedochází k jejich zředování difúzí ani odplavování a je zajištěno jejich lokální působení [1].

Cytokiny plní funkci molekulárních posílů umožňují vzájemnou komunikaci převážně mezi buňkami imunitního systému. Tato komunikace je nezbytná k vyvolání dostatečně silné, avšak kontrolovatelné odpovědi vůči cílenému antigenu. Účinnost a působení jednotlivých cytokinů závisí na několika faktorech jako je místní koncentraci cytokinů, druhu cytokinových receptorů a integraci mnohonásobné signální dráhy v odpovídající imunitní buňce [2].

Většina cytokinů působí na několik různých druhů buněk, mají tedy pleiotropní účinek; působí v kaskádě, to znamená, že jeden cytokin vyvolává produkci druhého, a celý cytokinový systém je do určité míry redundantní - jeden cytokin je nahraditelný jinými cytokiny. Cytokiny působí autokrinně, parakrinně nebo endokrinně. Působí tedy buď na buňku, kterou byl produkován (nejčastěji), nebo na sousední buňku nebo na tkáň ve vzdálenějším okolí, ke které je transportován krevním řečištěm. V některých případech je třeba koordinovaného spolupůsobení několika různých cytokinů. Tyto synergické a antagonické interakce v cytokinovém komplexu jsou označovány jako cytokinová síť, která udržuje tělní homeostázu [2].

1.2 Cytokiny s chemoatraktivními vlastnostmi

Imunitní funkce cytokinů jsou výsledkem koordinované práce T lymfocytů, makrofágů a dendritických buněk. Množství vyplavených cytokinů má velký vliv na boj organismu s infekcí, zánětem a jinými patologickými stavy. Doprava buněk imunitního systému k místě zánětu a infekce je přísně řízena speciální třídou cytokinů s chemoatraktivními vlastnostmi. K této třídě cytokinů říkáme chemokiny. Chemokiny cíleně působí na mnoho typů buněk. Jsou produkovány téměř všemi buňkami imunitního systému (lymfocyty). Jejich typickou vlastností je navázání se na chemokinové receptory, které se nacházejí na povrchu mnoha typů buněk. Indukované chemokiny jsou stimulovány Th1 cytokiny (IFN- γ , IL-2) a prozánětlivými cytokiny (IL-1, TNF- α). Naopak Th2 cytokiny (IL-4) a Treg cytokiny (IL-10, TGF- β) snižují sekreci chemokinů. Byla zjištěna souvislost mezi interakcí receptorů chemokin-chemokin a různými chorobami jako jsou alergie, astma, ateroskleróza, roztroušená skleróza, lupénka, revmatoidní artritida, záněty kloubů, rakovina a HIV infekce [3].

1.3 Dělení cytokinů produkováných Th buňkami

Cytokiny, které jsou produkovány Th buňkami, jsou podle jednoho způsobu řazeny do jednotlivých kategorií podle jejich původu z odlišných Th buněk. (viz. Tab.1)

Tab.1. Typy Th a jejich cytokiny

Typ Th	Produkty Th
Th1	INF- γ , IL-2, IL-10, IL-15 a TNF- β
Th2	IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13
Th17	IL-17, IL-17, IL-22, IL-25, IL-6, TNF- α , IFN- γ

Zralé Th0 lymfocyty produkují oba dva typy cytokinů. Th1 cytokiny inhibují růst extracelulárních parazitů a tumorových buněk. Zesilují opožděnou přecitlivělost, fagocytózu, oxidativní a zánětlivé reakce a v neposlední řadě vyvolávají expresi molekul MHC (major histocompatibility complex) třídy I a II [3].

Th2 cytokiny inhibují růst extracelulárních parazitů a potlačují fagocytózu. Na druhou stranu zvyšují proliferaci B lymfocytů, jsou tedy nezbytným faktorem pro produkci

protilátek. Th2 cytokiny mají podíl na alergických reakcích a onemocněních zprostředkovanými IgE [3].

Kromě Th1 a Th2 buněk jsou cytokiny produkovány taktéž Th17 buňkami a regulačními T lymfocyty (dále Treg) (viz Tab.1). Buňky Th17 se zaměřují cíleně na bakterie a plísně. Mohou však přispět i k rozvoji alergické reakce, zánětu a autoimunitních onemocnění [3].

Hlavní funkcí Treg buněk je udržet auto-toleranci prostřednictvím inhibice efektorových T lymfocytů. Tyto buňky mají několik podtypů (např. viz. Tab. 2).

Tab. 2. Typy Treg buněk a jejich zdroje

Typ	Zdroj
Treg buňky typu 1	Převážně: IL-10, IFN- γ , IL-5; z malé části: TGF- β , IL-2
Treg buňky typu3	Převážně: TGF- β ; z malé části: IL-10

Regulační cytokiny IL-10 a TGF- β potlačují patologickou imunitní odpověď při autoimunitních chorobách a transplantaci. TGF- β i IL-10 negativně regulují produkci Th1 a Th2 cytokinů, a proto jejich nadprodukce může negativně ovlivnit imunitní mechanismy nezbytné pro boj s patogeny a nádorovými antigeny [3].

Cytokiny jsou produkovány nejen Th lymfocyty, ale i jinými buňkami imunitního systému. Žírné buňky jsou zdrojem několika cytokinů, které hrají roli při rozvoji lokální zánětu a jiných imunitních reakcí. Příkladem takovýchto cytokinů je TNF, TGF- β , IL-4, IL-5, IL-6. Makrofágy produkují interleukiny: IL-1 (α , β), IL-6, IL-10, IL-12, IL-27, IL-28, IL-29; faktory stimulující kolonie – GM-CSF; TNF a transformující růstové faktory – TGF- β . Dendritické buňky jsou zdrojem cytokinů, např. IL-23, IL-27. Také monocyty produkují cytokiny (IL-19, IL-20, IL-24, IL-27, některé cytokiny skupiny TNF) [1].

1.4 Receptory cytokinů

Cytokinové receptory se obvykle skládají ze dvou či tří podjednotek. Jedna z nich zprostředkovává specifickou vazbu cytokinu, druhá či třetí zajišťuje spojení se signalizačními intracelulárními molekulami. Po vazbě ligandu (cytokinu) na specifický povrchový receptor nastane v receptorové molekule konformační změna (agregace alespoň dvou receptorových molekul), která se projeví v intracelulární části molekul a dochází k

zahájení přenosu signálu do buňky. Většina cytokinových receptorů (receptory pro většinu interleukinů, interferony, G-CSF, GM-CSF, některé růstové faktory) je v intracelulární části nekovalentně asociována s cytoplazmatickými proteinkinázami. Tyto enzymy dokáží fosforylovat jiné proteiny. Po navázání cytokinu dojde k agregaci receptorových molekul, přiblížení asociovaných kináz, jejich vzájemné fosforylaci, a tím aktivaci. Aktivované kinázy fosforylují další proteiny, čímž se spustí signalizační kaskáda. Většina cytokinových receptorů spolupracuje s proteinkinázami skupiny JAK. Receptory pro chemokiny jsou asociovány s trimerními G proteiny [1].

Výsledky signalizace přes cytokinové receptory závisí na typu buňky, typu signálu a na spolupůsobení jiných signálů. Konečným důsledkem může být řada pochodů od stimulace buněčného dělení a diferenciaci přes spuštění efektorových mechanismů (degranulace, sekrece cytokinů a jiných mediátorů, aktivace membránových enzymů, chemotaxe) až po zablokování buněčného cyklu a indukci apoptózy [1].

Doposud je známo sedm receptorových rodin. Těmi jsou receptorová rodina typ I, receptorová rodina typ II, imunoglobulinové receptory, TNF receptory, dvojice G proteinových receptorů, TGF- β a nedávno popsán receptor IL-17. Největší klinický potenciál mají první dva zmíněné receptorové rodiny, čili typ I a typ II [2].

1.4.1 Cytokinové receptory typu I

Typ I, zahrnující receptory pro IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21, obsahuje společnou podjednotku - řetězec γ (CD132). Ten se naváže na cytokinovou specifickou skupinu a vyvolá intracelulární signály pomocí koordinované aktivity JAK 1 a 3 a pomocí signálních transdukci (STAT). Další receptor patřící do tohoto typu receptoru je GM-CSF a rodina receptoru IL-6, která obsahuje společnou podjednotku receptoru, a to gp130, jež zprostředkovává kompletní dráhu signální transdukce v cílené buňce [2].

1.4.2 Cytokinové receptory typu II

Tento typ receptoru zprostředkovává působení IFN- α , IFN- β , IFN- γ a IL-10. Receptory typu II jsou tvořeny signálním řetězcem a ligandem vázajícím se na řetězec. Sled tohoto typu receptoru je podobný imunoglobulinovým doménám. Intracelulární segmenty jsou sdružené s tyrosin kinázou a rodinou JAK [2].

2. Signální dráhy cytokinů

Vazba cytokinu na receptor vyvolá řadu nitrobuňkových změn zprostředkované tzv. signálními dráhy. Rozlišujeme JAK-STAT signální dráhu, dále G proteinovou signální dráhu a mnoho dalších signálních drah jako jsou SOCS, PIAS atd. Nejdůležitější ze všech výše uvedených je JAK-STAT signální dráha.

2.1 JAK-STAT signální dráha

Jednou z nejdůležitějších cytokinových signalizačních drah je transaktivační dráha JAK-STAT. Do tohoto procesu je zahrnuta především aktivace kináz uvnitř buňky. Členové JAK (Janus kinase) rodiny cytoplazmatické tyrosinkinázy (JAK1, JAK2, JAK3, TYK2) po navázání ligandu na receptor aktivují transkripční faktory STAT rodiny (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6) pomocí fosforylace volného tyrosinu. STAT se pak dimerují a vzniklé diméry se navážou na promotor cíleného genu a působí tak jako transkripční faktory [3].

Některé cytokinové receptory obsahují kinázu na svých cytoplazmatických doménách (receptorové kinázy). Vazba ligandu na receptor způsobí přímo fosforylaci intracelulárních signálních substrátů. Kromě receptoru pro TGF- β do tohoto typu receptorů patří i všechny tyrosinkinázy. Receptorové kinázy používají specifickou signalizační dráhu, využívají receptory typu I a II k vystavení serin-threoninkinázové aktivity v jejich intracelulární doméně. Receptory typu II fosforylují receptory typu I, to vede k aktivaci signální transdukční dráhy cytoplazmatických proteinů Smad. Smad komplexy se v jádře translokují, naváží se na DNA a přímo či nepřímo řídí genovou expresi [3].

Cytoplazmatické molekuly JAK jsou klíčovou součástí signální transdukční dráhy, která zajišťuje přežití buňky, její proliferaci, diferenciaci a apoptózu [4]. Tyto buněčné děje jsou nezbytné pro správnou hematopoézu, rozvoj imunitního systému, rozvoj prsní žlázy a laktace, adipogenezi, sexuální dimorfický růst a ostatní procesy [5].

Patologicky zvýšená aktivace JAK kináz má za následek tumorigenezi, zatímco ztráta JAK kinázové aktivity vede k propuknutí nemocí související s imunodeficiencí. Vyrovnaná JAK kinázová aktivita je kritickým poukazatelem na normální přenos cytokinového a růstového signálu [4].

STAT (signal transducer and activator of transcription) proteiny byly objeveny jako mediátory cytokinové signalizace savců i nesavců. STAT 1, 2 a 6 mají omezenou funkci, soustředěnou na rezistenci k chorobám. STAT 3 a 5 mají širší okruh funkcí. Savčí STAT

proteiny obsahují tři zachovalé domény: na DNA vázající se doména, SH2 doména a místo tyrozinové fosforylace [6].

Většina proteinů STAT může být aktivována mnoha různými ligandy. IL-2, IL-7, IL 9 a IL-15 aktivují STAT3 a STAT5, zatímco STAT6 je aktivován pouze IL-4. IL-21 aktivuje STAT1 a STAT3 a v menší míře i STAT5a a 5b [3].

Po navázání cytokinu na příslušný receptor jsou indukovány konformační změny – většinou oligomerizace a multimerizace, čímž se aktivuje JAK. Tyto aktivované tyrozinokinázy JAK autofosforylují nebo se transfosforylují a poté fosforylují receptory. Takto fosforylovaný receptor se naváže na SH2 domény STAT. Poté dojde k fosforylaci molekuly STAT a ke spuštění reakce, kdy se STAT monomery disociují od receptoru a dimerují se s jinou převrácenou SH2 doménou – fosfotyrozinová interakce. Homo- či heterodiméry STAT se přesunují do jádra a s pomocí nebo bez přídavných modulačních faktorů interagují s transkripčními co-aktivátory a s cílenou DNA. Výsledkem je aktivace transkripce [6].

2.2 G proteinová signální dráha

Receptory k G proteinům se nazývají receptory spřažené s G proteiny (GPCR, G protein-coupled receptors). Tyto receptory tvoří velmi důležitou rodinu membránových receptorů v eukaryotních buňkách. Můhly interagovat jak s vnějším okolím, tak s vnitřním prostředím buňky a mohou tak hrát zásadní roli při předávání stimulačních signálů z extracelulárního prostředí. Zajišťují indukci určitých buněčných odpovědí [7].

G proteinová signální dráha zprostředkovává velké množství fyziologických odpovědí a porucha regulace těchto cest vede k mnoha onemocněním zahrnující rakovinu, srdeční choroby, hypertenze, endokrinní poruchy a slepotu. Mezi extracelulární ligandy, které se váží a aktivují receptory GPCR, aby poté došlo k zahájení G proteinové signální dráhy, se řadí malé molekuly jako jsou chemokiny, neurotransmitery, peptidické hormony, lipidy a jiné [8].

Navázání ligandu na receptor (umístěný na extracelulárním buněčném povrchu) navodí konformační změnu GPCR receptoru. Molekula GDP navázaná na asociovaný G protein se vymění za GTP. Takto aktivovaný G protein se odpojí od receptoru a disociuje na α podjednotku (nesoucí GTP) a β/γ podjednotku. Takto disociované podjednotky se váží na jiné proteiny (efektory) a mění tím jejich aktivitu. Po určité době je GTP hydrolyzován na GDP, komplex α podjednotka a GDP se odpoutá od enzymu a opět se spojí s dimérem β/γ a s původním receptorem. Obnoví se tak původní stav [1].

Integrace aktivit G proteinu regulující signální síť má za úkol kontrolovat četné buněčné funkce, a proto porucha aktivity G proteinů a jejich cílených molekul může vést k rozvoji rakoviny a metastázím [9].

2.3 Ostatní signální dráhy

Kromě efektorů JAK/STAT dráhy, existují i tři hlavní třídy negativní regulace: SOCS (suppressors of cytokine signaling), PIAS (protein inhibitors of activated stat) a PTPs (protein tyrosine phosphatases). Zřejmě nejjednodušší inhibiční mechanismus vykazují tyrozinofosfatázy, které převrací aktivitu JAK molekul. Nejcharakterističtějším z těchto enzymů je SHP-1. SHP-1 obsahuje dva SH-2 domény a může se tak navázat na fosforylovanou molekulu JAK nebo fosforylované receptory a tím usnadňuje defosforylací těchto aktivovaných signálních molekul [5].

SOCS zprostředkovává jednoduchou negativní zpětnou vazbu v systému JAK/STAT. Transkripce SOCS proteinů je stimulována aktivovanými STAT molekulami a výsledné SOCS proteiny se naváží na fosforylované JAK a jejich receptory, aby tak inhibovaly signální dráhu. SOCS mohou ovlivnit jejich negativní regulaci dvěma způsoby. Prvním způsobem je navázání molekul SOCS na fosfotyroziny na receptorech, čímž blokují vstup signálních transduktorů do signální dráhy. Dalším způsobem je navázání SOCS přímo na molekuly JAK na receptory, aby specificky inhibovaly JAK kinázovou aktivitu [5].

Třetí třídou negativních regulátorů jsou PIAS proteiny. PIAS proteiny obsahují mimo jiné ve své molekule karboxylovou doménu, jež se zapojuje při cíleném navázání proteinu na aktivované STAT dimery, a zabraňují tak molekulám STAT jejich navázání se na DNA [5].

3. Imunologie nádorového bujení

Imunitní systém hraje základní roli v prevenci proti vzniku nádorů. Zprvé, imunitní systém chrání organismus před nádory indukované viry tím, že potlačuje vznik virových infekcí. Zadruhé, včasné eliminuje patogeny a dává podnět k likvidaci zánětu. Organismus je tedy chráněn před rozvojem zánětového ložiska, které by mohlo vést až k rozvoji nádoru. Zatřetí, imunitní systém může specificky rozeznat a eliminovat počet nádorových buněk na bázi mutací a expresi stresových ligandů. Imunitní systém je tedy vybaven imunitním dozorem nad nádory, prostřednictvím tohoto dozoru systém identifikuje kancerózní a pre-kancerózní buňky a likviduje je ještě před tím, než stihnou poškodit organismus. I přesto se však nádory mohou vyvíjet i v přítomnosti normálně fungujícího imunitního systému [10].

3.1 Vznik nádoru

Nádor vzniká na základě genetických poruch, které způsobí aktivaci protoonkogenů a inhibici antionkogenů. K poškození DNA mohou přispět fyzikální (např. UV záření) či chemické vlivy (např. aromatické aminy, benzol) nebo biologické agens (např. viry). Kromě vnějších vlivů může být DNA poškozena i vnitřními příčinami, např. velmi reaktivními kyslíkovými radikály vznikající při oxidační respiraci [11].

Ke vzniku nádoru dochází při poruše rovnováhy mezi buněčnou proliferací a apoptózou. V genomu normální buňky jsou přítomny tzv. protoonkogeny, které kontrolují buněčný cyklus a buněčnou diferenciaci. Při kvalitativních či kvantitativních změnách protoonkogenů dochází k aktivaci onkogenů. Kromě genetických abnormalit protoonkogenů je dále zapotřebí, aby došlo k poškození antionkogenů, což vede k selhání buněčné proliferace a diferenciaci. Nejvýznamnějším antionkogenem je protein p53, který je jedním z regulátorů buněčného cyklu a procesu apoptózy.

Chronická infekce a zánět mohou také přispět k rozvoji nádorového bujení. U těchto stavů dochází totiž ke zvýšené proliferaci buněk imunitního systému i buněk poškozených infekcí či zánětem, a tím se zvyšuje pravděpodobnost vzniku genetické chyby [11].

3.2 Rozpoznávání nádorových buněk imunitním systémem

Imunitní systém se skládá z přirozené a adaptivní imunity. Každý z těchto mechanismů je tvořen buněčnou a humorální částí. Přirozená imunita rozlišuje bezpečné struktury od nebezpečných, které mají na svém povrchu vzory patogenických molekul. Tyto

molekuly (např. endotoxiny charakteristické pro G- bakterie, peptidoglykany charakteristické pro G+ bakterie, produkty virové infekce atd.) jsou rozeznávány nescifickou cestou a jsou na ně použity nescifické efektorové buňky jako jsou makrofágy a NK buňky [12].

Adaptivní imunita je složitější systém, který se zaměřuje na likvidaci intracelulárních patogenů. Přirozená imunita prostřednictvím svých antigen prezentujících buněk (APC) předkládá adaptivní imunitě peptidové fragmenty pocházející z antigenu. Komplex peptidový fragment-MHC glykoprotein (gp) na APC je rozeznáván specifickými receptory na buňkách adaptivní imunity, které reagují na složitý systém stimulačních a kostimulačních signálů. Jak přirozená tak adaptivní imunita může přispívat k odpovědi na zhoubné bujení [12].

Aby nádorové buňky mohly být imunitním systémem rozeznávány, musí na svém povrchu obsahovat nádorově specifické antigeny. Nádorové antigeny se klasifikují do dvou kategorií: antigeny specifické pro nádory (TSA) a antigeny asociované s nádory (TAA). TSA se na fyziologických buňkách nevyskytují, jejich přítomnost tedy značí jistou patogenitu. Příkladem proteinů patřící do této kategorie jsou komplexy MHC s fragmenty proteinů onkogenních virů (nádory vyvolané viry), abnormální formy glykoproteinů (glykosylace povrchových proteinů nádorových buněk je odlišná od buněk zdravých) atd. TAA se vyskytují i na povrchu fyziologických buněk. Zdravá buňka od nádorové se liší především mírou exprese TAA. Mezi nejznámější TAA patří onkofetální antigeny, které se vyskytují v embryonálních buňkách. Příkladem onkofetálních antigenů je karcinoembryonální antigen (CEA) produkovaný např. buňkami karcinomu tlustého střeva. Dalším známým TAA je např. prostatický specifický antigen PSA, jehož zvýšená hladina značí rakovinu prostaty [1].

NK buňky

NK buňky hrají důležitou roli v imunologických procesech zahrnující včasnou obranu proti virovým infekcím a nádorovým transformacím. V lidském těle vytvářejí NK buňky třetí největší populaci lymfocytů tvořící 5-10% lymfocytů v periferní krvi [12]. Efektorové funkce NK buněk, zahrnující jejich cytotoxicitu a produkci různých cytokinů, jsou významné pro imunitní systém a patofyziologii obecně [13].

Dendritické buňky (DC)

Dendritické buňky patří společně s makrofágy do skupiny APC. Jsou nejlepšími APC díky vysoké koncentraci molekul MHC na svém povrchu. Mají tedy jedinečnou roli v

iniciaci imunitní odpovědi, jelikož prezentují velké množství antigenů naivním T lymfocytům. DC migrují do periferních orgánů a monitorují jejich prostředí. Nezralé dendritické buňky (iDCs) fungují jako hlídka, která detekuje a shromažďuje cizí antigeny, zatímco zralé dendritické buňky (mDC) prezentují zachycené antigeny T buňkám v lymfatické tkáni. Dendritické buňky jsou hlavními regulátory imunitního systému [14].

K vyvolání imunitní odpovědi jsou proteinové antigeny naštěpeny na krátké peptidy, přeneseny na MHC gp a prezentovány na povrchu APC. Komplexy peptid-MHC slouží jako ligandy pro antigen-specifické receptory na T lymfocytech, které jsou aktivovány s pomocí kostimulačních molekul (CD86 nebo CD40). MHC třídy I molekuly vážou mimo vlastních peptidů také peptidy virů; MHC třídy II jsou asociovány s cizími proteiny vytvořenými během endocytózy [14].

APC jsou přítomny ve velkém množství v kůži a sliznicích. Těmito místy totiž patogeny nejčastěji vstupují do organismu a jsou ochutnávány APC. Aktivace APC nevede jen k vyvolání exprese MHC třídy II na povrchu těchto buněk, ale také k přesouvání buněk z kůže a sliznice k oblastní lymfatické uzlině, kde dochází k rozvoji imunitních reakcí prostřednictvím efektorových T lymfocytů [17].

B lymfocyty

B lymfocyty mají jednu z hlavních rolí při specifické obraně organismu. Fungují jako dohlížeči nad přítomností nevlastních antigenů a vyvolávají imunitní odpověď předkládáním antigenů antigen-specifickým T lymfocytům. Také fungují jako efektorové buňky, které po diferenciaci produkují antigen-specifické protilátky [15].

Po rozeznání nativního, tj. nijak nezpracovaného antigenu, se B lymfocyty aktivují. Aktivované B lymfocyty se začínají dělit. Některé buňky se diferencují v plazmatickou buňku a později v paměťové buňky [16].

T lymfocyty

Zralé T lymfocyty jsou aktivovány interakcí antigeně specifického receptoru (TCR) s komplexem antigenní peptidy-MHC molekuly. CD8⁺ T lymfocyty mohou reagovat s peptidy na téměř každé buňce vyjadřující MHC I. třídy (HLA-A, HLA-B, HLA-C). MHC I. třídy tvoří komplex s endogenními peptidy a jsou asociovány s cytotoxickými T lymfocyty (CTL). Receptory CD4⁺ T lymfocytů vážou peptidy nesoucí MHC II. třídy (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP). MHC II. třídy neváží endogenní peptidové fragmenty, ale peptidové fragmenty získané štěpením antigenních proteinů. MHC II. třídy jsou asociovány s Th lymfocyty [17].

3. 3 Únik nádoru z imunitního dozoru

Imunitní systém má mechanismy, které dokáží rozeznávat nádorové buňky, a tvoří tak první linii v obraně proti rozvoji nádoru a jeho růstu. Navzdory těmto mechanismům, přibližně u jedné třetiny obyvatel v západním světě dojde k rozvoji rakoviny a z toho jedna polovina na tutu nemoc zemře. U těchto lidí dochází buďto k ignoraci nebo toleranci nádorů nebo se nádor dokáže vyhnout imunitnímu systému [18].

Při ignoraci adaptivní imunitní systém selhává při rozpoznávání nádorových buněk jako cizích a organismu nebezpečných buněk. Nádorové buňky dokáží v organismu hostitele indukovat toleranci, která vede k neschopnosti vyvolávat imunitní odpověď. Kromě indukce tolerance v antigen-reaktivních T lymfocytech dochází i k down regulaci při zpracování a prezentace antigenu, ztrácí se MHC I exprese pro nádorovou imunitu [18].

4. Interleukiny a jejich úloha při nádorovém bujení

Interleukiny mají hlavní roli při ovlivňování zhoubných procesů. Svými účinky přispívají k protinádorové odpovědi jak pozitivně tak i negativně. Mohou se zapojovat do karcinogeneze, maligní transformace, nádorového bujení, invaze a metastáze, avšak na druhou stranu mohou aktivovat imunitní efektorové mechanismy, které inhibují nádorový růst. Zdravé buňky organismu produkují interleukiny jako odpověď k sekretovaným produktům zhoubných buněk nebo jsou interleukiny produkovány při zánětlivých stavech, které často doprovázejí nádorový růst. Zhoubné buňky jsou rozeznávány imunitními buňkami na základě svých změn v genové expresi [19].

4.1 Interleukin 1

4.1.1 Rodina IL-1

Interleukin 1 (IL-1) představuje rodinu o dvou agonistických proteinech, IL-1 α a IL-1 β . Oba proteiny mají pleiotropní účinky a ovlivňují hemopoezu, zánětlivý proces a imunitu. IL-1 β je výhradně aktivní jen v jeho sekretované formě, zatímco IL-1 α je aktivní jako intracelulární prekurzor, cytokin asociovaný s membránou a také jako sekretovaná molekula, avšak s menším rozsahem účinku [19].

IL-1 α a IL-1 β se vážou na stejné receptory a mají velmi podobný rozsah aktivit. Tyto proteiny IL-1 můžeme rozlišovat na základě jejich odlišného výskytu v organismu. IL-1 α zůstává v cytosolu a jen velmi vzácně se vyskytuje v cirkulaci, kdežto IL-1 β je hojně vylučován aktivovanými makrofágy a monocyty a je přítomen v krevním oběhu pacienta prodávající infekční či zánětlivou odpověď [20]. Receptorem pro IL-1 je IL-1R, antagonistou IL-1R je IL-1Ra. IL-1 se vyskytuje v hojném množství v nádorovém prostředí, kde zřejmě ovlivňuje růst a invazi zhoubných buněk, ale může vyvolávat i protinádorovou imunitu [19].

4.1.2 Role IL-1 při nádorovém růstu a metastázi

Mnoho proteinů či jiné faktory vyskytujících se v nádorovém mikroprostředí ovlivňují přímo či nepřímo mechanismy nádorového růstu. Při experimentech se ukázalo, že místní produkce IL-1 ovlivňuje růst nádoru a metastáze buď přímo prostřednictvím jejich proliferativních vlivů nebo nepřímo podporováním zánětlivých a angiogenických procesů v hostitelských buňkách. IL-1 produkuje angiogenické fenotypy v endoteliální tkáni in vitro a

angiogenezi in vivo. Angiogenické aktivity jsou závislé na indukci proteinů např. z fibroblastů a imunitních buněk. A tyto buňky se typicky vyskytují v nádorovém mikroprostředí [21].

V myším experimentálním modelu IL-1Ra (receptorový antagonist IL-1) inhibuje jaterní metastázi a blokuje urychlování nádorového růstu. Souběžně s IL-1Ra je však produkován i exogenní IL-1, který naopak podporuje nádorový růst. Cílem je tedy potlačit produkci IL-1 a zároveň podpořit IL-1Ra. IL-1 se inhibuje s využitím geneticky zkonstruovaných buněk, které konstitutivně produkují IL-1Ra. Převaha počtu IL-1Ra nad IL-1 znamená i převahu jeho protinádorových účinků. Inhibice IL-1 vede v konečném důsledku k inhibici nádorové angiogeneze a růstu nádoru. Ukázalo se, že genová transdukce a exprese IL-1Ra znatelně potlačuje růst a metastatický potenciál lidského melanomu vyvolaný produkcí IL-1, zatímco v melanomních štěpech, které neprodukovaly IL-1, neměla exprese IL-1Ra žádný efekt. V klinice genová exprese IL-1 v prsní a žaludeční biopsii poukazuje na nepříznivý prognostický faktor [21].

Existuje hypotéza, že umístění molekul IL-1, resp. forma, ve které se vyskytují (membránově vázané nebo sekretované) má vliv na jejich biologické funkce. Membránově vázaný IL-1 α je imunostimulátorem, kdežto cytosolová pro-IL-1 α kontroluje homeostatické funkce jako jsou genová exprese, proliferace a diferenciace. Sekretovaný IL-1 (převážně IL-1 β) v malých dávkách vyvolává zánětlivé odpovědi doprovázené aktivací specifických imunitních reakcí, zatímco vysoké dávky při rozšířeném zánětu se zřejmě podílejí na ničení tkáně a invazi nádoru [22].

IL-1 se může zapojovat při počátečních fázích karcinogeneze. V procesu mutageneze aktivuje infiltrované fagocyty nebo buňky určené k transformaci, která vede k produkci mutagenního reaktivního kyslíku nebo oxidu dusnatého. Po počátečních mutagenních účincích, může IL-1 dále propagovat zhoubný proces stimulací proliferace pre-zhoubných buněk buď autokrinním nebo parakrinním způsobem. Rozsáhlá proliferace vede k nahromadění mutace v pre-maligních buňkách. IL-1 může také zvýšit invazivitu již existujících nádorových buněk spuštěním angiogeneze a indukcí zánětlivých molekul. Podpora angiogeneze a zánětlivých pochodů napomáhá rozšíření nádoru a metastázi [22].

4.2 Interleukin 2

IL-2 je molekula se známou protinádorovou a imunomodulační aktivitou. Tento cytokin představuje glykoprotein s nízkou molekulovou hmotností, který má hlavní roli v aktivaci, diferenciaci a proliferaci několika kmenů hematopoetických buněk [23]. Patří spolu

s dalšími interleukiny (IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 a IL-21) k rodině růstových faktorů T lymfocytů. Jeho receptorový signalizační systém vede k aktivaci a rozšíření CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů. Hlavním zdrojem IL-2 jsou Th lymfocyty, převážně Th1 lymfocyty (33). IL-2 stimuluje NK buňky a cytotoxickou aktivitu T lymfocytů a vytváří zabíječské buňky aktivované lymfokinem, které zabíjejí široké spektrum lidských nádorových buněk [23].

4.2.1 IL-2 a jeho receptory

Biologický efekt této molekuly je spuštěn navázáním IL-2 na jeho receptorový komplex (IL-2R), jež je exprimován na lymfoidních buňkách. Receptor IL-2 se skládá ze tří odlišných řetězců – α , β , γ . IL-2R α řetězec má nízkou afinitu, zatímco β a γ řetězce spolu fungují jako středně afinitní receptor. Proto je signální transdukce po interakci IL-2/IL-2R zprostředkována jen pomocí IL-2R β a IL-2R γ řetězce [23] a α řetězec se zúčastňuje pouze procesu navázání se na IL-2. β a γ řetězce jsou exprimovány na T lymfocytech, B lymfocytech a NK buňkách, α řetězec je exprimován pouze na T lymfocytech. Na rozdíl od T lymfocytů, NK buňky exprimují receptory IL-2 se střední afinitou. Vystavení NK buněk IL-2 vyústí v proliferaci, zvýšení cytolytické aktivity a sekreci jiných buněk. Také B lymfocyty dokáží exprimovat receptory IL-2 se střední afinitou a následně vyvolat sekreci IL-2 ve spolupráci s jinými cytokiny, což vede k proliferaci a diferenciaci B lymfocytů [2].

IL-2R je také exprimován v některých non-lymfoidních buňkách jako jsou epiteliální buňky. Zejména lidské karcinomy, např. karcinomy hlavy a krku, exprimují IL-2R β/γ v buněčné kultuře a in situ [23].

4.2.2 IL-2 a buňky imunitního systému

IL-2 působí in vivo autokrinně i parakrinně, podílí se na indukci jak získané tak i vrozené imunity. Hraje důležitou roli při zahájení diferenciaci, klonální expanzi a aktivaci cytotoxických a pomocných T lymfocytů, podílí se na stimulaci buněčné proliferace NK buněk a vyvolání protinádorových aktivit NK buněk i makrofágů. IL-2 podněcuje B lymfocyty k dělení a produkci protilátek. IL-2 hraje roli i při kontrolování imunitní odpovědi - rozvíjí regulační T lymfocyty (Treg) nebo potlačují efekty buněčné proliferace [24].

Existuje složitá souhra mezi IL-2 a IL-15. I přesto, že IL-2 a IL-15 používají identické receptorové podjednotky k přenesení signálů, projevují tyto interleukiny in vivo protikladné účinky. IL-2 také ovlivňuje expresi mnoho cytokinů a chemokinů nebo jejich receptory. Výsledek signalizace IL-2 závisí na koncentraci IL-2, koncentraci jiných cytokinů a typu cílových buněk [25].

4.2.3 IL-2 v souvislosti s léčbou nádorů

IL-2 se s oblibou používá v protinádorové léčbě díky svým protinádorovým účinkům – indukují imunitní odpověď zprostředkovanou T lymfocyty, aktivují NK buňky a makrofágy. Zvyšování koncentrace IL-2 v nádorovém prostředí pomáhá zvyšovat protinádorovou odpověď organismu a zároveň zmenšit toxicitu, která je nežádoucí součástí mnoha druhů léčeb. Právě snížení toxicity jako vedlejšího účinku protinádorové terapie je hlavní výhodou léčby IL-2. Léčba IL-2 vyvolala definitivní regresi nádoru u pacientů s pokročilou rakovinou jako je renální buněčný karcinom, melanom a kolorektální rakovina. Navíc byla prokázána in vitro inhibice růstu lidské solidní nádorové buněčné linie, včetně těch epitelálního původu, které exprimují receptory IL-2 se střední a vysokou afinitou, jež sugerují přímé působení nádorové proliferace [23].

4.3 Interleukin 4

IL-4 je produkován T lymfocyty, žírnými buňkami a bazofily a indukuje specifické biologické funkce mnoha imunitních buněk. IL-4 je nezbytný při diferenciaci prekurzorů T pomocných lymfocytů v Th2 lymfocyty. Th2 lymfocyty poté spouštějí aktivaci a proliferaci B lymfocytů, které se diferencují v plazmatické buňky produkující protilátky. IL-4 zvyšuje počet molekul MHC II. třídy a expresi kostimulačních molekul na B lymfocytech. Taktéž zvyšuje proliferaci CD4⁺ Th2 a CD8⁺ Tc2 T lymfocytů a podněcuje cytotoxickou funkci T lymfocytů [26].

4.3.1 Receptory a signalizace

Účinky tohoto interleukinu jsou závislé na signalizaci, která je zprostředkována receptory IL-4 (IL-4R). IL-4R je tvořen dvěma řetězci, a to α a γ . Výsledkem navázání IL-4 na receptor IL-4R je sled fosforylací (zprostředkované kinázami asociované s receptorem), které ovlivňují buněčný růst, rezistenci k apoptóze a genovou aktivaci a diferenciaci [27].

IL-4 interaguje s dvěma typy membránových receptorů, následně dochází k aktivaci JAK/STAT signální kaskády. Aktivace STAT6 hraje ústřední roli při imunitní odpovědi zprostředkované IL-4. Také stimulace PI3K signální dráhy má vliv na působení IL-4 na buněčné přežití a proliferaci [26]. Změny v aktivitě IL-4 a jeho receptorů způsobují změny buněčné proliferace a působí na signální transdukční dráhu. Zejména v lidských

kolorektálních nádorových buňkách je výskyt IL-4 a jeho receptoru IL-4R spojován s progresí adenomu a metastázami [28].

4.3.2 IL-4 a buňky imunitního systému

IL-4 zastupuje důležitou roli v řízení imunitní odpovědi B lymfocytů, T lymfocytů a makrofágů proti infekci a zhoubným buňkám [28]. IL-4 má přímé účinky na funkci Treg buněk. Treg buňky kultivované na médiu samovolně podléhají apoptóze. Po inkubaci IL-4 na médiu s Treg buňkami však došlo ke snížení počtu programovaných buněčných smrtí u těchto buněk. IL-4 tedy chrání Treg buňky před apoptózou [26].

Bylo prokázáno, že IL-4 je hlavním spouštěčem katepsinové aktivity v TAM (Tumor-Associated Macrophages) *in vivo* i *in vitro*. Zvýšená katepsin proteázová aktivita vyvolávaná v makrofázích byla vždy sledována s progresí rakoviny u pacienta a znamená špatnou prognózu, neboť vede ke zhoubným bujením, angiogenezi a invazi nádorových buněk (týká se především rakoviny pankreatu, prsu a plicních metastáz) [29].

4.3.3 IL-4 a nádorové buňky

IL-4 má protinádorový účinek na lidských nádorových buňkách, přímo inhibuje nádorový růst pomocí signalizace zprostředkované IL-4R. Lidské IL-4 mají přímý inhibiční účinek na růst lidského kolorektálního karcinomu, renálního karcinomu, zhoubného melanomu a rakoviny prsou. Tyto buňky exprimují receptory s vysokou afinitou k IL-4. V pěti ze sedmi kolorektálních nádorových buněčných linií byla pozorována redukce proliferace, neboť tyto buňky exprimovaly funkční receptory IL-4R. Potlačení růstu buněk prsní rakoviny je spojen i s apoptickou buněčnou smrtí indukovanou IL-4. Kromě toho se IL-4 podílí i na inhibici angiogeneze tím, že snižuje expresi receptorů pro VEGF (vascular endothelial growth factor) [27].

Nicméně, IL-4 může také podněcovat růst některých typů nádorových buněk, například u buněčných linií karcinomu hlavy a krku [27]. Bylo zjištěno, že signální dráha IL-4 podporuje zhoubné procesy vyvoláním imunosupresivních pochodů v T lymfocytech, zvyšováním proliferace nádorových buněk a přežití nádorových kmenových buněk. Zvýšená hladina exprese IL-4 v nádorových buňkách přispěla ke zhoubným procesům i několika dalších orgánů, příkladem jsou malignity prsu, tlustého střeva, slinivky břišní, vaječnicků a plic [29].

4.4 Interleukin 8

IL-8 je chemokin mající chemotaktické vlivy pro neutrofilny [31]. Je důležitým cytokinem podílejícím se při zánětlivých procesech a reparativních pochodech a je hojně exprimován nádorovými, endoteliálními a stromálními buňkami. Jeho autokrinní a parakrinní funkce hrají důležitou roli v angiogenezi, při nádorovém růstu a metastázi (např. melanomy pokusných myší, v lidských karcinomech tlustého střeva, hlavy a krku) [30].

4.4.1 IL-8R a zdroje

Jeho účinky se projevují po navázání se na receptory IL-8R (IL-8A a IL-8RB). IL-8RB je hodně exprimován i zdravými buňkami, a proto rozdíly v hladinách IL-8RB ve zdravé buňce a v nádorové buňce nejsou příliš velké. Zatímco IL-8 a IL-8RA nejsou za fyziologických podmínek znatelně exprimovány v exokrinních ani autokrinních tkáních pankreatu. Jejich zvýšená hladina tedy napovídá o malignitě buněk. IL-8 má prokazatelně pro-angiogenické účinky. Je produkován řadou imunologických i neimunologických buněk, např. monocyty, neutrofilny, T lymfocyty, fibroblasty, endoteliálními buňkami, hepatocyty, keratinocyty. IL-8 je takéž produkován různými nádorovými buňkami: melanomy, rakoviny prsu, tlustého střeva, vajíčníku, děložního čípku, žaludku, plic, prostaty, pankreatu a renální karcinomy [31].

Ukazuje se, že IL-8 je potencionálním angiogenickým faktorem, který může indukovat chemotaxi endoteliálních buněk a proliferaci in vitro i in vivo. Jeden z nejvýraznějších vlastností IL-8 jsou změny jeho hladin exprese. Nadměrná exprese IL-8 byla pozorována u několika typů solidních nádorů (např. rakovina plic, karcinomy hlavy a krku, kolorektální nádory, melanomy) [30].

4.4.2 Vztah IL-8, VEGF a p53 u solidních nádorů

Progrese solidních nádorů (např. karcinomy plic - NSCLC) jsou spojeny se zvýšením počtu mikrocév (microvessel count - MVC), které nastane při narušení rovnováhy mezi angiogenickými faktory a inhibitory. Angiogeneze je mnohastupňový proces řízený různými faktory. Doposud nebyl plně vyjasněn. IL-8 má zřejmě angiogenické účinky in vitro a in vivo a jeho exprese je mnohonásobně zvýšena v solidních nádorech. Úpravy supresorového genu p53 jsou tou nejčastější změnou sledovanou u zhoubných nádorů. Některé studie

zjistily vztah mezi abnormální p53 a angiogenezi u rakovin plic, jiné studie zjistily vztah mezi mutací p53 a expresí IL-8 [30].

Nádory jsou závislé na angiogenezi. S nádorovým růstem se zvyšuje i vaskulární zásobování. Tvorba nových cév umožňuje nádorovým buňkám šířit se do vzdálených tkání a orgánů. Progrese několika typů solidních nádorů je asociována se zvýšenou mírou nádorové angiogeneze, což může být zapříčiněno zvýšením angiogenických faktorů a redukcí angiostatických faktorů [30], [32].

Jeden z angiogenických faktorů - vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) byl zaznamenán ve zvýšeném množství u rakovin mozku, tlustého střeva, prs a plic, a koreloval s vysokou hladinou MVC a špatnou prognózou u těchto nádorů [30].

P53 je velmi známým nádorovým supresorovým genem u širokého spektra rakovin a jeho mutace je jednou z nejčastějších genetických změn vedoucí k tvorbě zhoubných nádorů [30]. Je dobře známo, že p53 má důležitou roli při řízení angiogeneze pomocí různých mechanismů zahrnující regulaci exprese VEGF [33]. Při studiích (rakovin plic) se prokázala jednoznačná spojitost mezi mutantním p53 a zvýšenou hladinou exprese VEGF. V jiné studii exprese mRNA IL-8 byla vyšší ve vzorcích s abnormální p53, z čehož vyplývá, že existuje co-exprese VEGF a IL-8 na povrchu zhoubných buněk. Vysoká hladina IL-8 koreluje s vysokou hladinou mRNA VEGF, vysokým nádorovým MVC a mutovaným genem p53, což značí účast IL-8 při angiogenickém jevu [30].

4.4.3 Úloha IL-8 při pankreatickém karcinomu

Zánět a zánětlivé mediátory ovlivňují nádorovou progresi ať už přímo či nepřímo, v prvním případě prostřednictvím přímých vlivů na nádorové buňky, v druhém případě nepřímo přes indukci angiogeneze nebo zvýšením počtu zánětlivých buněk [32]. Existuje vztah mezi chronickým zánětem slinivky břišní a rakovinou pankreatu. Zvýšená exprese IL-8 může vést ke zvýšenému odvodu lymfoidních a myeloidních buněk do nádoru (na základě chemotaktických vlastností IL-8), což může v konečném důsledku vést k pozitivní zpětné vazbě, čili zvýšené produkci IL-8, který pak postupně přispívá k růstu a metastázi lidského pankreatického karcinomu. Angiogeneze, charakterizována utvářením nových útvarů krevního řečiště, je podstatná pro četné fyziologické i patologické pochody – chronický zánět, utváření nádoru a jeho růst. IL-8 přímo zvyšuje dělení a přežívání endoteliálních buněk, jež exprimují IL-8RA a IL-8RB. Protilátky k IL-8 inhibují růst a angiogenezi v lidských melanomech [31].

4.5 Interleukin 12

IL-12 je heterodimerická molekula skládající se z α - řetězce (podjednotka p35) a β - řetězce (podjednotka p40), které jsou spojeny disulfidickou vazbou v biologicky aktivní heterodimer. Tento interleukin má nezastupitelnou roli v interakci mezi přirozenou a adaptivní imunitou. Řídí zánětlivé reakce, přirozenou rezistenci k infekcím a také reguluje adaptivní imunitu organismu. Endogenní IL-12 je zodpovědný za rezistenci vůči mnoha patogenům a nádorům vyvolané chemickými vlivy. U experimentálních nádorových modelů, u nádorů indukované chemickými faktory a nádorů vznikající spontánně v geneticky modifikovaných myších má léčba rekombinantním IL-12 silný protinádorový účinek. IL-12 využívá efektorových mechanismů přirozené i adaptivní imunity k tomu, aby zprostředkoval protinádorovou rezistenci. IL-12 také indukuje IFN- γ a kaskádu jiných sekundárních a terciárních pro-zánětlivých cytokinů, které mají přímý toxický účinek na nádorové buňky nebo mohou aktivovat anti-angiogenní mechanismy. Stimulační aktivity IL-12 jsou využívány antigen-specifickou imunitou. IL-12 má totiž především schopnost rozeznávat Th1 lymfocyty a zesilovat cytotoxické odpovědi T lymfocytů indukované Th1 lymfocyty. Díky této své schopnosti má IL-12 silnou ochrannou aktivitu proti rakovině [34], [35].

4.5.1 Biologické funkce a receptor IL-12

IL-12 je produkován imunitními buňkami, především B lymfocyty a DC. IL-12 produkováný T lymfocyty a NK buňkami zvyšuje tvorbu a aktivitu cytotoxických lymfocytů a vyvolává proliferaci a produkci cytokinů, hlavně IFN- γ . Kromě toho je IL-12 také hlavním cytokinem řídící diferenciaci Th1 lymfocytů, které jsou výraznými producenty IFN- γ . IFN- γ zase silně ovlivňuje schopnost fagocytů (makrofágů) a DC produkovat IL-12, což vede k silné pozitivní zpětné vazbě. Výsledkem této pozitivní zpětné vazby je dostatečně silná odpověď proti intracelulárním patogenům, která však představuje potenciální nebezpečné mechanismy pro nekontrolovatelné cytokinové produkty nebo pro rozvoj autoimunity [34], [35].

Receptory IL-12 (IL-12R) jsou hlavně exprimovány na aktivovaných T lymfocytech a NK buňkách, cDNA pro dvě podjednotky IL-12R byly klonovány z myších a lidských T lymfocytů a byly pojmenovány jako IL-12R β 1 a IL-12R β 2. Obě dvě tyto podjednotky náleží k podskupině gp130 patřící k cytokinové receptorové rodině. IL-12R β 2 je součástí vysoko afinitního receptorového komplexu a zúčastňuje se signální transdukce. Signální transdukce

prostřednictvím IL-12 indukují tyrosinovou fosforylaci rodiny JAK 2 a TYK2, která pak fosforyluje a aktivuje STAT4 [34], [35].

4.5.2 IL-12 a NK buňky

IL-12 má silné protinádorové účinky založené na indukcii IFN- γ a aktivaci efektorových buněk, převážně CD8⁺ T lymfocyty a NK buňky [34]. Cytokiny řídí NK buněčné odpovědi pomocí aktivace signálních drah, zahrnující MAP kinázu a PI3K dráhy. Tyto signální dráhy přináší stimuly z vnějšího okolí do jádra a aktivují četné transkripční faktory, a to vede k mnoha změnám v genové expresi, které jsou odpovědné za buněčnou proliferaci, cytokinovou sekreci a cytotoxicitu. Interakce IL-12 s jeho receptorem ústí v řadu signalizačních dějů, zahrnující tyrosinovou fosforylaci rodiny JAK2 a TYK2, které vedou až k fosforylaci STAT4. Fosforylované STAT4 dimerizují, translokují se do jádra a zahajují transkripci specifických cílů [36], [35].

Bylo zjištěno, že IL-12 zvyšuje expresi receptoru NKG2D (natural-killer group 2, member D) na NK buňkách. Cytolýza zprostředkovaná IL-12 je částečně závislá na interakci mezi NKG2D (na NK buňkách) a MICA (MHC class-I related genes) (na cílených buňkách). Blokováním NKG2D nebo MICA se dramaticky zesílil účinek IL-12 na cytolýze řízené NK buňkami. Také bylo zjištěno, že IL-12 může zvýšit expresi aktivujícího receptoru (DNAM-1) a naopak snížit expresi inhibičního receptoru (NKG2A). Porucha rovnováhy mezi receptory NK buněk může přispět ke zvýšené lýze NK buněk při léčbě IL-12. Nejen IL-12 zvyšuje cytolytickou aktivitu v závislosti na interakci mezi NKG2D a jeho ligandem MICA, tuto vlastnost mají i jiné cytokiny. Bylo pozorováno, že i jiné cytokiny, např. IL-15 nebo INF- α , mají vliv na expresi NKG2D na NK buňkách [36].

NK buňky zprostředkovávají zabíjení buněk pomocí různých mechanismů, k nimž patří cytotoxicita zprostředkovaná cytotoxickými granulemi obsahující perforin a granzym nebo pomocí signalizace zprostředkované receptory TNF [13]. IL-12 nezvyšuje pouze cytotoxicitu NK buněk prostřednictvím NKG2D, ale také zvyšuje transkripci TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) a perforinu. Perforin a TRAIL jsou důležitými efektoři v cytotoxických reakcích NK buněk proti nádorům i tkáním infikované patogeny. Perforin také hraje důležitou roli v supresi (zprostředkované NK buňkami) nádorové iniciace a metastáze [36].

4.5.3 Přímý vliv na angiogenezi a nepřímá imunitní odpověď

Existují další dva protinádorové mechanismy IL-12: přímý zásah do angiogeneze a nepřímá imunitní odpověď. V přímém zásahu do angiogeneze došlo po aplikaci IL-12 do nádorových buněk ke snížení exprese vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) a ke snížení hustoty cév v nádoru, který získal přímou genovou terapii IL-12. V protinádorové odpovědi *in vivo* došlo ke snížení hustoty cévního zásobení a naopak ke zvýšení infiltrace CD8⁺ T lymfocytů a CD56⁺ NK buněk a zvýšení hladiny IFN- γ . Dvojitý účinek terapie IL-12, zahrnující inhibici angiogeneze a zároveň zesílení imunitní odpovědi, tedy znamená snížení exprese VEGF a zvýšení produkce IFN- γ buňkami imunitního systému. Tyto protinádorové mechanismy byly sledovány u karcinomu hlavy a krku při přímé genové terapii IL-12 [37].

4.6 Interleukin 17

IL-17 je pro-zánětlivý cytokin sekretovaný aktivovanými T lymfocyty. Příbuzné molekuly tvoří rodinu cytokinů, v tomto případě rodinu IL-17. Modelovým interleukinem této rodiny je IL-17A. Kromě něj byly identifikovány i další členy: IL-17B – IL-17F, a také bylo rozeznáno 5 příbuzných receptorů. Zatímco IL-17A je produkován výhradně T lymfocyty, ostatní členové rodiny IL-17 jsou produkovány širokou škálou tkání. Receptor pro IL-17A (IL-17R) je jednoduchý transmembránový protein, který je exprimován mnoha tkáněmi. Aktivace receptoru IL-17R (po navázání se na IL-17) obecně vede k indukci jiných pro-zánětlivých cytokinů pomocí aktivace NF- κ B [38], [39].

Signalizační systém IL-17 probíhá v odlišných tkáních, např. kloubní chrupavky, kosti, mozek, hematopoetická tkáň, ledviny, plíce, kůže, střevo, a proto vývoj ligandů a receptorů rodiny IL-17 může hrát důležitou roli v homeostázi tkání a vývoji onemocnění [38].

4.6.1 Úloha IL-17 při rozvoji nádoru

Bylo prokázáno, že IL-17 je aktivní v průběhu iniciace nádoru. IL-17A podporuje angiogenezi v nádorových modelech a koleruje s množstvím cév v nádorech vaječníku u lidí. IL-17A dále podporuje tvorbu nádorů při nádorovém onemocnění děložního čípku zvýšením exprese IL-6 na nádorové straně. Zvýšená hladina IL-6 souvisí s invazivitou nádorů děložního čípku. Na druhou stranu však IL-17 může také přispět k ochraně

organismu proti nádorům zesílením imunitního systému prostřednictvím nádorové rejekce [38].

4.6.2 Pro-nádorové aktivity IL-17

4.6.2.1 IL-17 podporuje angiogenezi

Mnoho funkcí IL-17 v nádorovém mikroprospeřdí přispívá k rozvoji nádorové progresi. IL-17 hraje hlavní roli při rozvoji nádorů asociované se zánětem, které jsou závislé na proangiogenických vlastnostech okolních endoteliálních buněk a fibroblastů. Patologicky zvýšená exprese IL-17 v buňkách fibrosarkomu zvyšuje jejich nádorový růst. IL-17 indukuje širokou škálu angiogenických mediátorů zahrnující vasculární endoteliální růstový faktor (VEGF), který značně podporuje zánět a nádorovou angiogenezi. IL-17 také dokáže zvýšit produkci VEGF pomocí fibroblastů a poté podpořit tvorbu nových cév v zánětu nebo nádorech [40]. Spojení IL-17 a VEGF ovlivňuje i další angiogenické faktory – TGF- β (IL-17 indukuje VEGF, VEGF pak dále indukuje TGF- β). TGF- β je exprimován ve zvýšené míře mnoha nádorovými buňkami, kde stimulací angiogeneze umocňuje nádorový růst a metastáze. IL-17 také indukuje IL-6 a prostaglandin E2 (PGE2) a zvyšuje expresi mezibuněčné adhezivní molekuly ICAM-1 (intercellular adhesive molecule) ve fibroblastech. Všechny tyto molekuly jsou známé svými hlavními rolami v angiogenezi a nádorové invazi. IL-17 dále stimuluje produkci IL-18. Signalizace IL-18 podporuje angiogenické pochody v endoteliálních buňkách, zvyšuje proliferaci a přežití endoteliálních a nádorových buněk a podporuje migraci nádorových buněk [41].

4.6.2.2 IL-17 a IFN- γ , IL-6

Významný Th1 cytokin IFN- γ je dobře známým nádorovým antagonistou, který zesiluje napadení nádorů zabíječskými T lymfocyty, a činí tak z nádorů buňky náchylné k zániku. IFN- γ také potlačuje vývoj IL-17 (produkovaný Th17 lymfocyty), který se spolupodílel na iniciaci nádoru. Zjistilo se, že IL-17 pomáhá zvýšit nádorový růst tím, že inhibuje diferenciaci Th1 a aktivuje signální dráhu STAT3 u onkogenických molekul. U myši postrádající IL-17 došlo ke zpomalení růstu dvou typů nádorů (močového měchýře a melanoma). Bez IL-17 T lymfocyty produkují IFN- γ , který zaplaví nádorovou oblast, a tím zpomalí nádorový růst. A naopak v případě absence IFN- γ mají převahu Th17 lymfocyty, a to vede k rychlému vzestupu nádorové populace [42].

IL-17 aktivuje nepřímo STAT3 pomocí cytokinu IL-6. Jelikož IL-6 také podporuje diferenciaci Th17 buněk, dojde k větší podpoře nádorového růstu, protože se sčítají příznivé podmínky pro rozvoj nádoru. STAT3 řídí expresi cílových genů, které pak zajišťují buněčné přežití, proliferaci a angiogenezi. Nádorový růst je zmírněn blokováním signální dráhy IL-6 [42].

4.6.3 Protinádorové funkce IL-17

V mnoha případech bylo také zaznamenáno, že IL-17 má i protinádorové účinky. IL-17 dokáže zvýšit hladinu nádorově specifických cytotoxických T lymfocytů (CTL) indukci IL-6 a produkci IL-12 z makrofágů. Tyto dva interleukiny jsou známé svou schopností indukovat nádorově specifické CTL. IL-17 dále podporuje zrání progenitorů DC. Buňky fibrosarkomy transdukované IL-17 vyvolávají protinádorovou imunitu rozšířením exprese antigenů MHC třídy I a II. Angiogeneze indukovaná IL-17 může také přispět k protinádorové imunitě tím, že vytvoří prostředí, ve kterém je imunitním buňkám umožněno napadat vnitřní masu solidního nádoru [41].

Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala interleukiny a jejich úlohou při nádorovém bujení. Interleukiny zprostředkovávají komunikaci mezi buňkami imunitního systému. Tato komunikace je nezbytná pro vytvoření dostatečně silné imunitní odpovědi proti extracelulárním i intracelulárním patogenům a nádorovým buňkám.

Interleukiny mají protinádorový účinek. Podpora protinádorových mechanismů spočívá převážně v zesílení složek imunitního systému a inhibici angiogenických pochodů. Mezi interleukiny mající protinádorový účinek patří IL-2, který se zúčastňuje aktivace přirozené i adaptivní imunity a v klinice je hojně užíván v protinádorové terapii. Také IL-4 se podílí na regulaci imunitní odpovědi, komunikuje s buňkami imunitního systému i s nádorovými buňkami. Kromě přímých protinádorových mechanismů zasahuje IL-4 i nepřímo proti nádorovému růstu – a to inhibicí angiogeneze. Velmi důležitým interleukinem v protinádorové obraně je IL-12. IL-12 má silné protinádorové účinky, využívá mechanismů přirozené i adaptivní imunity. Je spojován s indukcí INF- γ , zvyšuje cytotoxické účinky NK buněk a inhibuje angiogenezi.

V mnoha případech však byly prokázány i pro-nádorové účinky interleukinů. Pro-zánětlivý IL-1 patří mezi interleukiny podporující nádorový růst. Také IL-4 může podporovat zhoubné procesy indukci supresorových pochodů v T lymfocytech. IL-8 je asociován s pro-angiogenickým faktorem VEGF a mutantním nádorovým supresorovým genem p53. IL-8 tedy taky podporuje růst nádoru. Mnoho funkcí IL-17 přispívá k nádorové progresi především podporou angiogeneze. IL-17 indukuje nemalý počet angiogenických faktorů, které podporují zánětlivé reakce a tvorbu nových cév v místě zánětu nebo nádorového růstu.

Interleukiny jsou v posledních letech velmi studovanými molekulami imunitního systému. Některé interleukiny mají výhradně protinádorový účinek, resp. pro-nádorový, jiné interleukiny mají schopnost podporovat a zároveň inhibovat iniciaci nádorového růstu. Výsledky mnoha experimentů odhalily nezastupitelné funkce interleukinů v protinádorové imunitě, avšak mnoho otázek zůstává stále zatím nezodpovězených. Objasnění dalších funkcí interleukinů může v budoucnu přispět k lepšímu pochopení nádorových onemocnění a jejich léčbě.

Literatura

- [1] HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. *Základy imunologie*. Praha: TRITON, 2005, s. 95-105, s. 174-181. ISBN 80-7254-686-4.
- [2] LEE, Sylvia a Kim MARGOLIN. Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers*. 2011, č. 3, s. 3856-3893.
- [3] ZÍDEK, Z., P. ANZENBACHER a E. KMONÍČKOVÁ. Current status and challenges of cytokine pharmacology. *British Journal of Pharmacology*. 2009, č. 157, s. 342-361.
- [4] RANE, SG a REDDY. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene*. 2000, č. 19, s. 5662-5679.
- [5] RAWLINGS, Jason S., ROSLER a Douglas A. HARRISON. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science*. 2004, č. 117, s. 1281-1283.
- [6] WILLIAMS, Jeffrey G. STAT signalling in cell proliferation and in development. *Cancers*. 2000, č. 10, s. 503-507.
- [7] SATAGOPAM, Douglas A., Margarita C. THEODOROPOULOU a Christos K. STAMPOLAKIS. GPCRs, G-proteins, effectors and their interactions: human-gpDB, a database employing visualization tools and data integration techniques. *Database*. 2010.
- [8] MARRARI, Yannick, Marykate CROUTHAMEL, Roshanak IRANNEJAD a Philip B. WEDEGAERTNER. Assembly and Trafficking of Heterotrimeric G Proteins. *Biochemistry*. 2008, č. 46, s.7665-7677.
- [9] DORSAM, Robert T., J. Silvio GUTKIND a Philip B. WEDEGAERTNER. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2007, č. 7, s. 79-94.
- [10] SMYTH, Mark J. Tumour immunology. *Current Opinion in Immunology*. 2007, č. 19, s. 200-202.
- [11] KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004, s. 540-570. ISBN 80-86225-50-X.
- [12] BREMERS, Andreas J.A. a Giorgio PARMIANI. Immunology and immunotherapy of human cancer: present concepts and clinical developments. *Critical Reviews in Oncology:Hematology*. 2000, č. 34, s. 1-25.

- [13] ARNON, Tal I., Gal MARKEL a Ofer MANDELBOIM. Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors. *Seminars in Cancer Biology*. 2006, č. 16, s. 348-358.
- [14] GATTI, Evelina a Philippe PIERRE. Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution. *Current Opinion in Cell Biology*. 2003, č. 15, s. 468-473.
- [15] ACOSTA-RODRÍGUEZ, Eva V., Maria C. MERINO, Carolina L. MONTES, C. Cristina MOTRAÍN a Adriana GRUPPI. Cytokines and chemokines shaping the B-cell compartment. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2007, č. 18, s. 73-83.
- [16] OLLILA, Juha a Mauno VIHINEN. B cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2005, č. 37, s. 518-523.
- [17] BONILLA, Francisco A. a Hans C. OETTGEN. Adaptive immunity. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology*. 2010, č. 125, s. 33-40.
- [18] SHARMA, Ricky A. a Michael J. BROWNING. Mechanisms of the self/non-self-survey in the defense against cancer: Potential for chemoprevention?. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2005, č. 56, s. 5-22.
- [19] APTE, Ron N. a Elena VORONOV. Interleukin-1—a major pleiotropic cytokine in tumor–host interactions. *CANCER BIOLOGY*. 2002, č. 12, s. 277-290.
- [20] VORONOV, Elena, Dror S. SHOUVAL a Yakov KRELIN et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *The National Academy of Sciences*. 2001, č. 5, s. 2645-2650.
- [21] ELARAJ, Dina M, David M WEINREICH a Sheelu VARGHESE et al. The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts. *Clinical Cancer Research*. 2006, č. 12, s. 1088-1096.
- [22] APTE, Ron N., Yakov KRELIN, Xiaoping SONG a Shahar DOTAN et al. Effects of micro-environment and malignant cell-derived interleukin-1 in carcinogenesis, tumour invasiveness and tumour–host interactions. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER*. 2006, č. 42, s. 751-759.
- [23] CASANA, Patricia H., Hector HERNANDEZ a Manuel J. ARANA. Interleukin-2 inhibits proliferation of HPV-associated tumor cells and halts tumor growth in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002, č. 299, s. 818-824.
- [24] ROSSOWSKA, Joanna, Elzbieta PAJTASZ-PIASECKA a Oliwia RYŚNIK. Generation of antitumor response by IL-2-transduced JAWS II dendritic cells. *Immunobiology*. 2011, č. 216, s. 1074-1084.

- [25] GAFFEN, Sarah L. a Kathleen D. LIU. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*. 2004, č. 28, s. 109-123.
- [26] MAERTEN, Philippe, Chong SHEN a Dominique M.A. BULLENS. Effects of interleukin 4 on CD25 CD4 regulatory T cell function. *Journal of Autoimmunity* 25. 2005, č. 25, s. 112-120.
- [27] THOMSON, Angus W. a Michael T. LOTZE. *The Cytokine Handbook*. London: Academic Press, 2003, s. 227-250. ISBN 0-12-689663-1.
- [28] LANDI, Stefano, Fabio BOTTARI a Federica GEMIGNANI et al. Interleukin-4 and interleukin-4 receptor polymorphisms and colorectal cancer risk. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER*. 2007, č. 43, s. 762-768.
- [29] GOCHEVA, Vasilena, Hao-Wei WANG a Bedrick B. GADEA et al. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes & Development*. 2010, č. 24, s. 241-255.
- [30] BOLDRINI, Laura, Silvia GISFREDI a Silvia URSINO et al. Interleukin-8 in non-small cell lung carcinoma: Relation with angiogenic pattern and p53 alterations. *Lung Cancer*. 2005, č. 50, s. 309-317.
- [31] HUSSAIN, Farah, Jayson WANG a Raida AHMED et al. The expression of IL-8 and IL-8 receptors in pancreatic adenocarcinomas and pancreatic neuroendocrine tumours. *Cytokine*. 2010, č. 49, s. 134-140.
- [32] RIBATTI, Domenico a CRIVELLATO. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012, č. 1822, s. 2-8.
- [33] PERRONE, G. a B. VINCENZI et al. Correlation of p53 and bcl-2 expression with vascular endothelial growth factor (VEGF), microvessel density (MVD) and clinico-pathological features in colon cancer. *Cancer Letters*. 2004, č. 208, s. 227-234.
- [34] COLOMBO, Mario P. a Giorgio TRINCHIERI. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2002, č. 13, s. 155-168.
- [35] WATFORD, Wendy T. a Masato MORIGUCHI. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2003, č. 14, s. 361-368.
- [36] ZHANG, Cai, Jianhua ZHANG a Jiafeng NIU et al. Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Human Immunology*. 2008, č. 69, s. 490-500.

- [37] IMAGAWA, Yukari, Kenichi SATAKE a Yasumasa KATO et al. Antitumor and antiangiogenic effects of interleukin 12 gene therapy in murine head and neck carcinoma model. *Auris Nasus Larynx*. 2004, č. 31, s. 239-245.
- [38] MOSELEY, T.A., D.R. HAUDENSCHILD, L. ROSE a A.H. REDDI. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2003, č. 14, s. 155-174.
- [39] REYNOLDS, Joseph M., Pornpimon ANGKASEKWINAI a Chen DONG. IL-17 family member cytokines: Regulation and function in innate immunity. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2010, č. 21, s. 413-423.
- [40] NUMASAKI, Muneo a Jun-ichi FUKUSHI et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood*. 2003, č. 101, s. 2620-2627.
- [41] MURUGAIYAN, Gopal a Bhaskar SAHA. Protumor vs Antitumor Functions of IL-17. *The Journal of Immunology*. 2009, č. 183, s. 4169-4175.
- [42] MAXMEN, Amy. IL-17's tumor team. *The Journal of Experimental Medicine*. 2009, č. 206, s. 1452-1453.