

## 43. NÁDOROVÉ ANTIGENY, MECHANISMY IMUNITNÍHO SYSTÉMU NAMÍŘENÉ PROTI NÁDOROVÉMU BUJENÍ.

K maligní transformaci buňky může dojít mnoha různými způsoby v důsledku selhávání rozmanitých mechanismů regulace buněčného dělení a regulace sociálního chování buněk.

**Maligní transformace** je obvykle vyvolána mutacemi v tzv. **onkogenech nebo anti-onkogenech (tumor supresorových genech)**. Tyto geny v nemutované formě kódují důležité součásti signalizačních kaskád, transkripční faktory atd. – mutace vede ke snížené (tumor-supresory) nebo ke zvýšené (onkogeny) aktivitě. To může vést k nekontrolovatelnému dělení nebo k úniku do jiných tkání.

### Nádorové antigeny

- aby mohl imunitní systém reagovat s nádorovými buňkami, musí se na jejich povrchu vyskytovat specifické antigeny, které imunitní systém rozpozná
- rozlišujeme dvě skupiny:
  - **TSA – Antigeny specifické pro nádory** – proteiny, které se vyskytují jen na maligně transformovaných buňkách
    - **komplexy MHC gp I s abnormálními fragmenty buněčných proteinů**
      - nádorové buňky buď produkují proteiny mutovaných genů nebo abnormálně štěpí běžné proteiny a poté je vystavují prostřednictvím MHC gp I
      - typické pro chemicky indukované nádory a některé leukemie
      - tyto antigeny se často označují jako **neoantigeny** (nové, imunogenní verze normálních buněčných proteinů), množství neoantigenů je důležitým predikčním markerem v imunoterapii nádorů
    - **komplexy MHC gp s fragmenty onkogenních virů**
      - u nádorů vyvolaných viry (Polyomavirus, EBV aj.)
    - **abnormální formy glykoproteinů**
      - glykosylace (zejména sialylace) je u nádorových bb abnormální – tzn. povrchové proteiny jsou abnormálně glykosylované, což rozpoznává imunitní systém
    - **idiotypy myelomů a lymfomů**
      - nádorové bb odvozené od T- nebo B-lymfocytů mají na povrchu TCR nebo BCR, jejichž vazebná místa jsou unikátní antigenní strukturou právě pro ony nádory
  - **TAA – Antigeny asociované s nádory** – nejsou výlučně specifické pro nádorové buňky. Odlišnost spočívá v kvantitě exprese, v abnormální místní či časové expresi (např. antigeny typické pro fetální buňky se vyskytují na nádorových buňkách tlustého střeva)
    - **onkofetální antigeny**
      - přítomné v normálních embryonálních buňkách (např. alfa-fetoprotein nebo karcinoembryonální antigen)
      - AFP – sekretovaný hepatomy
      - CEA – exprimovaný nádorovými bb u karcinomu tlustého střeva
    - **melanomové antigeny**
      - Melan-A, MAGE-1, exprimovaný i na normálních melanocytech, ale na melanomových bb v extrémně vysokém množství
    - **antigen HER2/neu** (Human epithelial receptor)
      - přítomen na normálních epiteliálních bb, silně exprimován u Ca mammy
    - **PSA** (prostatický specifický antigen)
      - ve vysokých množstvích u Ca prostaty, pozor zvýšený i u benigní hyperplazie prostaty
    - **EPCAM** (adhezivní molekula epiteliálních bb, silná exprese především na metastázách)
    - **diferenční antigeny leukemických buněk**
      - přítomny při vývoji leukocytů během diferenciaci, ale i u leukémií, lymfomů

- nejznámější je CALLA – u akutní lymfoblastické leukémie (common lymphoblastoid leukaemia antigen)

## Protinádorové imunitní mechanismy

- **Hypotéza protinádorového imunitního dohledu**
  - myšlenka, že imunitní systém je schopen rozeznat a odpovídat na nádorové bujení
  - měla by znamenat, že imunodeficitní jedinci mají vyšší frekvenci nádorových onemocnění
  - při pokusech na myších byla tato hypotéza prokázána, rozsáhlé epidemiologické studie toto prokazují i na lidech (menší imunita vede k častějším virem indikovaným nádorům, ale i k častějšímu vzniku spontánních a chemicky indukovaných nádorů)
- **Hypotéza imunitní editace**
  - jedná se o nejnovější shrnutí dynamického vztahu mezi imunitním systémem a populací nádorových buněk, **imunitní editace** je dynamický proces, kdy imunitní systém a nádor vzájemně interagují
  - označována Teorie 3E – tři fáze – eliminace, rovnováha (equilibrium), únik (escape)
    - **ELIMINACE**
      - složky imunitního systému rozpoznávají a ničí nádorové buňky
      - některé nádory jsou v této fázi pravděpodobně eliminovány
      - v případě, že nádorová buňka umírá imunogenní buněčnou smrtí začne na povrchu exprimovat molekuly DAMPs, které vedou k aktivaci imunitního systému
      - pokud jsou nádorové buňky imunitním systémem rozpoznány, mohou se na jejich eliminaci podílet všechny hlavní imunitní mechanismy
        - antigenně nespecifické: neutrofil, aktivované makrofágy, NK bb.
        - antigenně specifické: protilátky aktivující komplement, ADCC, Th1, Th17, Tc
    - **ROVNOVÁHA**
      - nádor v průběhu svého vývoje může hromadit další mutace a měnit své vlastnosti -> imunitní systém už není schopen nádorové buňky plně eliminovat a dochází k vytvoření rovnováhy
      - klinicky se toto stádium shoduje s preneoplastickým onemocněním (nejčastěji zůstává nediodagnostikované)
      - imunitní systém dokáže kontrolovat a limitovat růst, ale nedokáže nádor zničit
      - výsledkem mohou být tři situace:
        - kompletní eliminace nádorových buněk
        - dlouhodobé udržování dynamické rovnováhy
        - pod vlivem dalších změn v genomu nebo při oslabení imunitního systému (infekce, stárnutí, imunosuprese) mohou nádorové bb zcela uniknout imunitní kontrole
    - **ÚNIK**
      - nádorové buňky unikají imunitní kontrole a nekontrolovatelně se množí, imunitní systém není schopen nádor kontrolovat a dochází k rozvoji onemocnění

## Tumor markery

Látky produkované maligními buňkami nebo organismem jako odpověď na nádorové bujení. Lokalizované na povrchu membrán, jsou ale uvolňovány i do okolí a lze je prokázat v tělních tekutinách nebo přímo v nádorové tkáni.

## Mechanismy odolnosti nádorů vůči imunitnímu systému

- různé typy nádorových bb se liší způsoby, kterými se mohou
- v časných fázích – nádorové bb ještě neexprimují specifické nádorové antigeny – imunita je nerozpozná
- v průběhu času mění své povrchové antigeny, ztrácí ty, které byly cílem imunitní reakce (**variabilita**)
- pokud na povrch exprimují málo Ag (**nízká hustota**) – imunita je může ignorovat
- nemají na povrchu CD80/86 a tak T-lymfocyty po vazbě deaktivují
- neexprimují dostatečné množství DAMPs

- některé protilátky mohou působit stimulačně pro nádorové bb (aktivují různé kaskády)
- produkují faktory inaktivující T lymfocyty, faktory blokující jiné důležité faktory
- exprese molekuly PD-L1 (vazba na PD-1 T lymfocytů vede k jejich deaktivaci)
- exprese Fas ligandu (aktivace apoptózy u lymfocytů)
- inhibují funkce dendritických buněk

## 44. IMUNOLOGICKÉ PŘÍSTUPY K LÉČBĚ NÁDOROVÉHO BUJENÍ. IMUNOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA V ONKOLOGII. PARAPROTEINY, JEJICH DIAGNOSTIKA A KLINICKÝ VÝZNAM.

Hlavním přístupem onkologické léčby je **chirurgický zákrok, chemoterapie a radioterapie**. Cílem protinádorové imunoterapie je využít imunitních mechanismů k indukci, znovunastolení nebo posílení imunitní reakce. Komponenty imunitního systému **mohou být využity k cílenému směřování léčiva do místa nádoru**. Imunoterapeutická léčba a přístupy zažívají v posledních letech doslova revoluci.

### Imunoterapie pomocí protilátek

V současné době se používá několik **monoklonálních protilátek** a ve fázi výzkumu je další řada z nich. **Monoklonální protilátky slouží jako nosiče léčiv či toxinů nebo se využívá jejich fyziologických funkcí** (opsonizace, indukce ADCC, aktivace komplementu, inhibice nežádoucích molekul).

- **monoklonální protilátky proti nádorovým antigenům**
  - aktivující apoptózu, působí opsonizačně (následuje fagocytóza nádorových buněk), ACDD
    - Herceptin – léčba karcinomu prsu, monoklonální protilátky proti antigenu HER2/neu
    - Mabthera – proti antigenu CD20 u B-lymfocytů, léčba lymfomů
  - často nedostatečný cytotoxický efekt, nedokonalý průnik do nádorové tkáně
- **konjugáty monoklonálních protilátek**
  - s **toxiny = IMUNOTOXINY**
  - s **radioizotopy = RADIOIMUNOTOXINY**
  - s **vysoce toxickými léky = ADC (antibody drug conjugates)**
  - vzhledem k tomu, že se toxická látka uvolňuje až v místě nádoru, je možné používat vysoce toxické látky, které by při normálním použití znamenali příliš velkou toxicitu pro organismus a nebylo by možné je systémově použít
- **protilátky proti inhibičním receptorům T-lymfocytů (checkpoint inhibitory)**
  - monoklonální protilátky namířeny proti inhibičním receptorům -> nedochází k tlumení T-lymfocytů
  - cíleno hlavně na CTLA-4 nebo PD-1 (nádorové bb mohou exprimovat ligandy těchto receptorů, my tyto receptory ale zablokujeme pomocí MAb)
  - proti CTLA-4 – ipilimumab, proti PD-1 – nivolumab, pembrolizumab -> podání vede k odblokování T-lymfocytů
  - testováno u většiny solidních nádorů a hematologických malignit, velmi dobře působí u karcinomu ledvin, maligního melanomu, nemalobuněčného karcinomu plic
  - nežádoucí účinek: výskyt autoimunitních onemocnění
- **bispecifické protilátky – jedno vazebné místo reaguje s nádorovým antigenem, druhé se váže na povrchové molekuly T-lymfocytů nebo NK bb**
  - blinatumomab
  - tyto protilátky tak zajišťují kontakt mezi efektorovými buňkami imunitního systému a nádorovými buňkami -> lýza nádorových bb
- **kinázové inhibitory**
  - inhibice signálních drah -> působí na nádorovou bb nebo angiogenezi, dochází k zastavení růstu, proliferace nebo metabolismu (nutno ale přesně cílit, dobré molekulární vyšetření drah)

## Imunoterapie založená na buněčně zprostředkovaných mechanismech

- **onkolytické viry**
  - řada nepatogenních nebo mírně patogenních virů vykazuje tropismus k nádorovým bb
  - po infekci lyzuje nádorové bb, vede k buněčné smrti
  - in vivo limitace preexistující imunita vůči těmto virům -> jsou eliminovány imunitou
- **adoptivní T-buněčná terapie**
  - spočívá v namnožení pacientových T lymfocytů ex vivo, případně jejich úpravě a vrácení zpět i.v.
  - lymfocyty se získávají buď přímo z krve nebo z nádoru
    - **LAK (lymphokine activated killers)** – T-lymfocyty z periferní krve
      - in vitro stimulace cytokiny IL-2, takto stimulované lymfocyty se vrací pacientovi a doufá se, že budou eliminovat nádor nebo potlačit jeho růst
    - **TIL (tumor infiltrating lymphocytes)**
      - izolujeme lymfocyty z nádoru, tyto lymfocyty by měli být nádorově specifické
- **CAR buňky**
  - podávání in vitro modifikovaných buněk, především T-lymfocytů a NK bb. – tzv. CAR (chimeric antigen receptor) buňky
  - pomocí technologií (třeba pomocí virů) je do buněk vnášen konstrukt, který rozpoznává nádorové antigeny a aktivuje T-lymfocyty (extracelulární část je většinou protilátka rozpoznávající antigen, intracelulární část aktivuje signální dráhy)
  - výsledkem je populace CAR buněk, která specificky rozpoznává nádorové buňky a zabíjí je
  - testovány pro léčbu leukémií
- **aktivní imunizace nádorovými antigeny**
  - snaha o aktivní indukci imunitní odpovědi proti nádorovým antigenům
  - „nádorové vakcíny“
    - měli by stimulovat Tc a Th1 lymfocyty, bohužel nádorové peptidy jsou poměrně málo imunogenní, musíme používat adjuvans
- **imunoterapie dendritickými buňkami**
  - in vitro připraveno velké množství dendritických bb, lze kultivovat s nádorovým antigenem, následně injikovány pacientovi a stimulují T buněčnou odpověď proti nádorovým antigenům
  - léčba metastatického nádoru prostaty
- **nespecifická stimulace zánětu**
  - v místě nádoru vyprovokujeme pomocí mykobakteriální vakcíny zánět – útok také na nádorové bb
  - částečně úspěšné u karcinomů močového měchýře
- **imunoterapie T lymfocyty dárce**
  - používá se u leukemických pacientů po transplantaci kostní dřeně
  - vyvolání reakce graft versus leukémie
- **imunoterapie produkty imunitního systému**
  - u maligního melanomu, u Grawitz Tu ledviny, leukémie
  - podávání rekombinantních cytokinů k posílení buněčných mechanismů imunity
  - IL-2, IL-15, INF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , GM-CSF

## Imunologická diagnostika v onkologii

- můžeme prokazovat tumor markery, k jejich diagnostice můžeme použít protilátky namířené proti těmto tumor markerům – tzn. využíváme reakcí ELISA, imunofluorescence atd.

## Paraproteiny, jejich diagnostika a význam

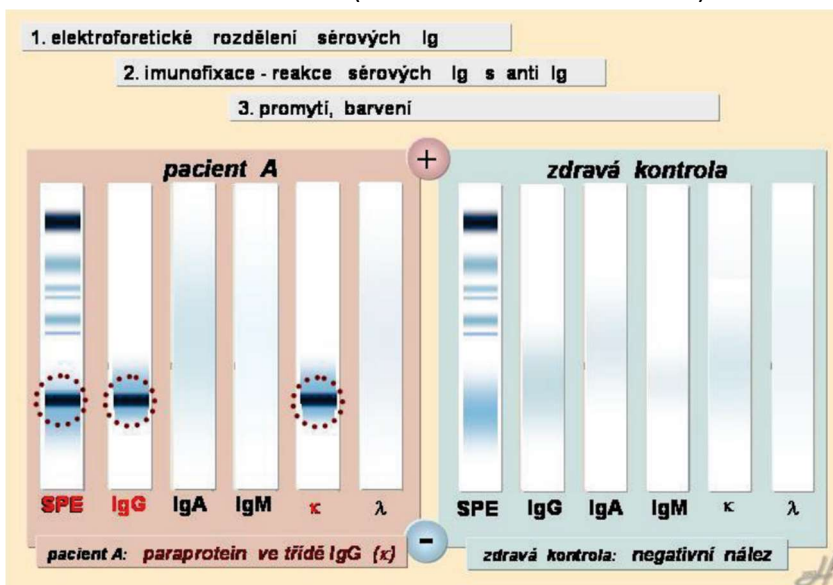
Paraprotein je produkt patologického klonu plazmatických buněk, které vznikají při monoklonálních gamapatiích. Jedná se o monoklonální bílkovinu, skládající se ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců. Paraprotein, zejména jeho lehké řetězce (lambda a kappa, také Bence-Johnsonova bílkovina) jsou vylučovány ledvinami a mohou vést k poškození ledvin.

## Monoklonální gamapatie

- dochází ke klonální proliferaci lymfoidní řady s plasmocytoidní diferenciací -> tvorba monoklonálního imunoglobulinu (paraproteinu)
- vyskytuje se u následujících chorob:
  - **monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS)**
    - bezpříznakové, nejsou splněna diagnostická kritéria zhoubných lymfoproliferativních onemocnění, pravděpodobně se jedná o prekancerózu
    - monoklonální IgG do 35g/l, monoklonální IgA do 20g/l, exkrece lehkých řetězců močí do 1g/24 hodin, na rtg bez ložisek, bez známek zhoubného onemocnění
  - **mnohočetný myelom**
    - maligní transformace B lymfocytů – nekontrolovatelná proliferace a diferenciace v plazmatické buňky, tvoří monoklonální imunoglobuliny a další cytokiny
    - známky: poškození skeletu (osteoporóza, osteolýza), poškození ledvin (proteinurie), postižení krvevotvorby (anémie, časté infekce)
  - **Waldenströмова makroglobulinemie**
    - maligní transformace B lymfocytů, proliferace a diferenciace v lymfoplazmocytní buňky produkující monoklonální IgM
    - insuficience kostní dřeně, nespecifické příznaky jako je únava, slabost či úbytek hmotnosti
  - **Amyloidóza**
    - hromadění neodbouratelné bílkoviny – amyloidu, velké množství proteinů
    - vrozená nebo získaná, mnoho typů
    - primární – AL amyloidóza souvisí s nádory krevních buněk -> velké množství defektních protilátek vedoucí k tvorbě AL amyloidů
    - ostatní – AA amyloidóza, Alzheimerova choroba aj.
    - příznaky variabilní podle místa hromadění amyloidu, poškození ledvin, jater, srdce, makroglosie atd.

## Diagnostika paraproteinu

- prokazovat lze v tělních tekutinách (krev, moč) nebo přímo v nádorové tkáni (lymfomy)
- **metody detekce:**
  - elektroforéza
    - rozdělení proteinů na základě jejich pohyblivosti v elektrickém poli
    - dělení na albuminovou, alfa1, alfa2, beta a gama frakci
  - imunofixace
    - imunofixace bílkovin séra – detekce a typizace paraproteinu
    - imunofixace bílkovin moče – identifikace paraproteinu, lehkých řetězců lambda a kappa (Bence-Johnsonova bílkovina)



### postup:

- v prvním kroku jsou elektroforeticky na agarózovém gelu rozděleny bílkoviny na jednotlivé frakce
- v druhém kroku se monoklonální bílkoviny fixují pomocí antisér. Používají se antiséra proti těžkým řetězcům anti-IgG, anti-IgA a anti-IgM a proti lehkým (volným i vázaným) řetězcům anti-kappa a anti-lambda. U některých případů přítomnosti monoklonálních lehkých řetězců a zároveň negativity imunofixace s antiséry proti imunoglobulinům A, G a M následuje ještě imunofixace s antiséry proti IgD a IgE.
- 93% pacientů pomocí imunofixace, 80% klasickou elektroforézou

