

Komplexita interakcií nádorového procesu

Z. Valášková¹, S. Kiňová², Ľ. Danihel³, I. Ďuriš², D. Markovičová¹, B. Mravec^{1,4}, I. Hulín¹

¹ Oddelenie klinickej patofyziológie Ústavu patologickej fyziológie Lekárskej fakulty UK Bratislava, Slovenská republika, prednosta doc. MUDr. Marián Bernadič, CSc., mim. prof.

² I. interná klinika Lekárskej fakulty UK a FN Bratislava, Slovenská republika, prednosta doc. MUDr. Soňa Kiňová, PhD.

³ Ústav patologickej anatómie Lekárskej fakulty UK Bratislava, Slovenská republika, prednosta prof. MUDr. Ľudovít Danihel, CSc.

⁴ Ústav experimentálnej endokrinológie SAV Bratislava, Slovenská republika, riaditeľ prof. MUDr. Iwar Klimeš, DrSc.

Súhrn: Pomerne dlho pretrvávali predstavy, že nádor je tvorený iba transformovanými bunkami, pre ktoré je typická hyperproliferácia, invázivnosť a imortalizácia buniek. Terapeutické stratégie boli preto zamerané na autonómnou proliferáciu a prežívanie nádorových buniek. Ide o vlastnosti podmienené aktiváciou onkogénov a inaktiváciou tumor-supresorových génov. Vedecké sledovania priniesli poznanie, že samotný rast nádoru je komplexným dejom. Okrem toho potvrdili účasť heterotypických multicelulárnych interakcií v nádorovom tkanive. Komplexita ako charakteristika sa priradzuje k tým dejom, ktoré nevykazujú vlastnosti lineárnych systémov. V priebehu nádorového rastu sú určité zákonitosti, ktoré nie je možné presne usporiadať z hľadiska trvania a následnosti. Preto ho môžeme považovať za dej so znakmi komplexity. Pri takomto pohľade nádorové prostredie tvoria viaceré druhy buniek, ako sú endotelové bunky a ich progenitorové bunky, pericyty, fibroblasty, asociované s nádorom, myofibroblasty, hladkosvalové bunky, žirné bunky, T- a B-lymfocyty, neutrofily, eozinofily, bazofily, NK-bunky a niekoľko foriem makrofágov. V súčasnosti sa opodstatnene predpokladá, že hlboké štúdium vnútorného prostredia nádorov môže viesť k formovaniu nových základov nádorovej biológie ako aj terapeutických postupov. Štúdium detailov mikroprostredia nádorov je potrebné z hľadiska vedeckého poznania a následne aj pre definovanie biomarkerov charakterizujúcich nádory. Ich sledovanie prehĺbi molekulovú diagnostiku. Biomarkery sa budú využívať v širokom meradle pre monitorovanie priebehu rastu nádorov a aj priebehu liečby. Sledovanie kombinácie biomarkerov umožní bližšie charakterizovať mikroprostredie nádorov. Okrem receptorov, signálnych molekúl, rastových faktorov, molekúl akcelerujúcich apoptózu to môžu byť nielen molekuly samotné, ale aj ich kombinácie, alebo charakteristiky neoangiogenézy, alebo invázie nádorov. Komplexita nádorov zahŕňa nielen intracelulárne prostredie, ale aj intercelulárne vzťahy a vzťahy buniek s extracelulárnymi súčasťami nádorov. K doteraz známym skutočnostiam pribudne sledovanie cirkulujúcich nádorových buniek. Pre ich detekciu sa s veľkou pravdepodobnosťou budú využívať nízkomolekulové fluoreskujúce farbivá. Možno očakávať, že cirkulujúce nádorové bunky budú markerom prognózy i ukazovateľom progresie malignity a liečby. Vedecké bádanie prehĺbi individuálnu terapiu pacientov s nádorovými chorobami. V prehľadovej štúdii sme sa pokúsili analyzovať vedecké poznatky z pozície akceptácie zložitosti a heterogenosti každého nádoru. Spracovanie obrovského množstva literatúry sme považovali za zmysluplné z hľadiska akceptácie nových poznatkov a teoretickej prípravy na očakávané zmeny diagnostiky a liečby nádorov. Predpokladáme, že prezentované poznatky sú užitočným krokom pre ucelený pohľad do mikroprostredia nádorov.

Kľúčové slová: angiogenéza – invázie nádorov – mikroprostredie nádoru – n. vagus – protizápalové pôsobenie nervového systému

The complexity of interactions of the tumour growth process

Summary: It was believed for rather a long time that the only components of tumour tissue are transformed cells characterised by hyper-proliferation, invasivity and immortalisation. Therapeutic strategies thus focused on autonomous proliferation and tumour cell survival. These result from oncogene activation and inactivation of tumour-suppressor genes. Research studies showed that tumour growth itself is a complex process. In addition, studies confirmed involvement of heterotypical multicellular interactions in tumour tissue. Complexity as a characteristic is one of the processes that do not demonstrate attributes of linear systems. The process of tumour growth involves certain patterns that cannot be classified according to duration and sequence. Consequently, tumour growth can be viewed as a process with features typical for complexity. From this perspective, tumour environment consists of a range of cells, such as endothelial cells and their progenitor cells, pericytes, fibroblasts, tumour-associated fibroblasts, myofibroblasts, smooth muscle cells, mast cells, T- and B-lymphocytes, neutrophils, eosinophils, basophils, NK-cells and several different forms of macrophages. At present, well-founded assumptions exist that in-depth study of intra-tumour environment might lead to formulation of new principles in tumour biology as well as introduction of new therapeutic strategies. Research into details of tumour microenvironment is needed to expand scientific knowledge as well as to, subsequently, define tumour biomarkers. Monitoring of these biomarkers will facilitate molecular diagnostics. Biomarkers will be widely used to monitor tumour growth as well as to monitor the process of treatment. Monitoring of combinations of biomarkers will enable more detailed characterisation of tumour microenvironment. These might include, apart from receptors, signal molecules, growth factors and molecules accelerating apoptosis, specific molecules as well as their combinations or neoangiogenesis or tumour innervation parameters. Tumour complexity involves not just intracellular environment but also intracellular relationships and associations between cells and extracellular tumour components. Detection of circulating tumour cells represents another parameter to be monitored. Low-molecular weight fluorescent dyes will very likely be used for their detection. It can be assumed that circulating tumour cells will be used as markers of prognosis as well as indicators of malignity progression and treatment. Scientific advances in this area will facilitate individualised therapy of patients suffering from cancers. The aim of the present review study was to analyze scientific knowledge from the perspective of acceptance of complexity and heterogeneity of each tumour. We perceived processing of the vast amounts of literature as meaningful with respect to recognition of new knowledge and theoretical preparation for expected changes in diagnostics and treatment of tumours. We believe that the presented findings are a useful step towards achievement of comprehensive insight into tumour microenvironment.

Key words: angiogenesis – tumour innervation – tumour microenvironment – vagus nerve – anti-inflammatory effects of nervous system

Nádor a vnútronádorové prostredie

Onkologické ochorenia zasahujú rôznymi spôsobmi do života každého človeka a aj preto onkologický výskum prináša neustále množstvo poznatkov o príčine, priebehu a prevencii tohto ochorenia. Súčasné poznanie princípov a procesov malígneho bujnenia nie je však úplné a sotva niekedy bude, keďže nádor nepredstavuje jeden typ ochorenia, ale viac ako 200 samostatných ochorení. Molekulárnym prístupom sa snažíme vysvetliť podstatu ochorenia a vyliečiť choroby. Je možné, aby riešenie problému predchádzalo jeho pochopeniu? Vedecké bádanie v nádorovej biológii prináša neustále nové zistenia, avšak každé nové zistenie podmieňuje množstvo ďalších nových otázok. Organizmus je pozoruhodný práve pre svoju komplexnosť. Proces vznik nádoru v živom organizme je mnohostupňový a môže byť považovaný za akúsi Darwinovu evolúciu na mikroskopickej úrovni.

Vnútné prostredie nádoru nie je ohraničené anatomicky. Skôr ho tvoria súčasti, ktoré sú v okolí nádorových buniek, alebo sa rastu nádoru dotýkajú sprostredkovane. Bunky vo vnútnom prostredí nádoru sú aktívované alebo atrahované nádorovými bunkami priamo, pomocou uvoľňovania faktorov alebo nepriamo indukciou hypoxického prostredia či nekrozou. Je veľmi pravdepodobné, že okrem lokálnych zmien nádorové prostredie iniciuje systémové zmeny, ktoré ovplyvňujú nádorový rast a metastatické šírenie. Vnútné prostredie nádoru zásadne ovplyvňuje efektívnosť protinádorovej liečby, nádorové bunky využívajú bunky organizmu na mnohých úrovniach. Vzhľadom na túto skutočnosť aj lokalizovaný nádor by mal byť považovaný a liečený ako systémová choroba [1,2].

Po prvotnom vzájomnom kontakte nádorových buniek s bunkami okolitého tkaniva je ďalší priebeh a rast nádoru podmienený biologickými vlastnosťami nádorových buniek, ale aj

zložením adherentného tkaniva. Veľmi pravdepodobne ide o kombináciu dvoch skutočností. Iničiálnou reakciou tkaniva sú obranné mechanizmy typické pri poškodení tkaniva. V náväznosti na tento proces nádorové bunky využívajú mechanizmy pre „vlastný prospech“. Zaangažovanie a aktivácia mezenchymálnych kmeňových buniek, endotelových prekursorov, fibroblastov, dendritických buniek a leukocytov sa považuje za typickú reakciu tkaniva na prítomnosť nádorových buniek [3]. Následne rôzne typy buniek sekréciou rastových faktorov, chemokínov a enzýmov prispievajú k remodelácii tkaniva. Vzájomné abnormálne interakcie prostredníctvom bunkových povrchov a signálnych molekúl vedú k fenotypovým prejavom nádorového tkaniva.

Vnútné prostredie nádoru je tvorené extracelulárnym matrix (ECM), signálnymi molekulami, nádorovými a nenádorovými bunkami organizmu. Zmeny nádorového tkaniva (rôzne zastúpenie buniek alebo zloženie ECM) môžu mať inhibičný alebo stimulačný vplyv na rast nádoru. Bunky organizmu nie sú pri organizácii nádorov pasívne, ale participujú procesmi, ako je desmoplázia (fibroblasty a ECM), zápal a imunitná odpoveď (makrofágy, lymfocyty a dendritické bunky) [4], ako aj novotvorba krvných a lymfatických ciev [5]. Remodelovaná ECM obsahuje matrix-metaloproteinázy (MMP), ktoré aktivujú povrch buniek a rastové faktory. Produkcia rastových faktorov a chemokínov imunitnými bunkami a fibroblastmi je pozmenená a prispieva k priamej stimulácii rastu nádorových buniek. Výsledkom je potlačenie apoptózy nádorových buniek a narušenie gradientu chemokínov produkovaných v rámci imunitnej odpovede. Na stimulačný vplyv reagujú abnormálnym rastom a proliferáciou aj prekursorové bunky [6,7].

V rámci populácie nádorových buniek bol pozorovaný výskyt „zvláštnych“ buniek, ktoré sa správajú ako kmeňové bunky a boli pomenované „nádorové kmeňové bunky“. Majú

schopnosť samoobnovy, pri transplantácii vhodnému recipientovi dokážu rekonštituovať nádor a zdá sa, že práve tieto bunky sú zodpovedné za nádorový rast a metastázovanie [8,9]. Predpokladá sa, že nádorové kmeňové bunky majú pôvod v kmeňových alebo progenitorových bunkách. Zatiaľ sa preukázalo, že ich zastúpenie v jednotlivých nádoroch varíruje, bolo zistené 0,03% zastúpenie, inde predstavovali dokonca takmer 100% z populácie nádorových buniek [10]. Zdá sa, že ich výskyt poukazuje na stupeň progresie a genetickú nestabilitu nádoru. Zistená zvýšená rezistencia na chemoterapiu sa vysvetľuje zvýšenou expresiou antiapoptických proteínov, enzýmov metabolizujúcich alebo proteínov vypudzujúcich chemoterapeutické liečivá z buniek [11].

Úloha fibroblastov v nádorovom prostredí

Fibroblasty v niektorých typoch nádorov predstavujú veľkú časť buniek, ba dokonca prevyšujú počet nádorových buniek [12]. Sú prítomné ako myofibroblasty, peritumorálne fibroblasty, reaktívne stromálne bunky a fibroblasty asociované s nádorom. Funkčne aj fenotypovo sa však líšia od fibroblastov toho istého tkaniva mimo okolia nádoru. Na základe cytologických štúdií sa nádorové fibroblasty opisujú ako neustále aktívované bunky s vysokým proliferačným indexom. Neobnovujú normálny fenotyp, nepodliehajú apoptóze či eliminácii a histologicky sú obklopené denznou akumulovaným fibrilárnym kolagénom. Tento fenotyp je spojený so zachytávaním zápalových buniek a proces sa označuje dezdesmoplázia. Je typický pre niektoré typy ľudských nádorov, ako je nádor prsníka, prostaty, pankreasu, hrubého čreva a pľúc [5].

Imunitné bunky nádorového prostredia

Podľa mnohých autorov je prítomnosť buniek imunitného systému v nádorovom tkanive spojená s lepšou

prognózou onkologického ochorenia pacienta, pričom ich typ, denzita a lokalizácia v nádore má prognostickú hodnotu [13,14]. Približne rovnaké množstvo autorov však nepovažuje infiltráciu nádorov za pozitívny signál. Predpokladajú, že imunitné bunky môžu napomáhať progresii nádorového procesu [15–17]. Ako sa neskôr preukázalo, zlou prognózou sú nádor infiltrujúce lymfocyty. Predstavujú väčšinu z infiltrovaných imunitných buniek a ich vyšší výskyt sa potvrdil u pacientov s pokročilým nádorom. Predpokladá sa, že sú funkčne pozmenené, napr. sa u nich zistila znížená cytotoxická schopnosť voči nádorovým bunkám [18,19]. Zvýšené množstvo buniek vrodenej imunity často koreluje so stupňom angiogenézy a zlou prognózou [16,17]. Výsledky experimentálnych a klinických štúdií naznačujú, že imunitné bunky môžu pôsobiť na nádorový rast stimulačne, ako aj inhibične v závislosti od zastúpenia jednotlivých typov buniek v infiltrujúcej populácii a od stupňa progresie nádorového procesu.

NK-bunky sa zúčastňujú primárnych obranných reakcií voči patogénom. Už staršie práce dokumentovali ich schopnosť redukovať metastázovanie nádorových buniek in vivo. Ich prítomnosť v mnohých nádoroch však nebola potvrdená [20]. Na základe týchto zistení možno predpokladať, že nezohrávajú úlohu pri progresii nádoru, skôr sú indikátorom imunitnej protinádorovej reakcie.

V ľudských nádoroch sa **polymorfonukleárne leukocyty** nevyskytujú často. Výnimkou sú epitelové nádory, kde sa predpokladá ich účasť pri raste a metastázovaní nádorových buniek. Pri experimentálnych nádoroch kože boli identifikované ako zdroj exprese MMP-9, ktorá prispieva progresii nádoru [21]. Elimináciou granulocytov sa podarilo inhibovať rast nádoru kože [22]. Pri neutrofiloch sa predpokladá, že zvyšujú metastatické schopnosti nádorových buniek a sprostredkujú nepriame adhézie nádorových

a endotelových buniek. Prispievajú k transendoteliálnym migráciám nádorových buniek [23] a pôsobia ako stimulatory angiogenézy prostredníctvom syntézy faktorov VEGF, HGF, MMP-2, IL-8 [24].

Makrofágy ako nevyhnutné bunkové zložky vrodenej imunity sa často vyskytujú v nádorovej stróme ako tzv. s nádorom asociované makrofágy (tumor-associated macrophages – TAMs) fenotypovo príbuzné forme M2. Za hlavného chemoatraktanta monocytov sa považuje chemokín CCL2 uvoľňovaný nádorovými bunkami, ale ich cielený pohyb stimulujú aj faktory VEGF, PDGF, TGF- β , M-CSF [25]. Zdá sa, že monocyty sú prednostne atrahované do oblastí nekrózy a hypoxie, kde sa alterujú ich funkcie a podieľajú sa na zvýšenej tvorbe hypoxiou indukovaných rastových faktorov. V súčasnosti je už akceptovaná skutočnosť, že makrofágy asociované s nádorom majú výraznú schopnosť stimulovať proliferáciu, invazívnosť a metastatické šírenie nádorových buniek produkciou celého spektra rastových faktorov, angiogénnych mediátorov, zápalových cytokínov a enzýmov degradujúcich ECM [26].

Lymfocyty, konkrétne tzv. nádor infiltrujúce lymfocyty, sú z imunitných buniek vo vnútornom prostredí nádoru najviac zastúpené. Považujú sa za indikátora dobrej prognózy pri karcinóme ovárií [27,28], kolorektálnom karcinóme [14] a ich prítomnosť naznačuje, že môžu kontrolovať nádorový rast [29]. V súčasnosti sa predpokladá, že hlavným mechanizmom protinádorovej imunity je T bunková odpoveď [30]. Protinádorová odpoveď môže byť následkom priameho cytotoxického účinku CD8+ T-lymfocytov, ktoré rozpoznávajú antigény hlavného histokompatibilného komplexu (MHC) triedy I na povrchu nádorových buniek. U onkologických pacientov sú lymfocyty reagujúce na nádorové bunky detekovateľné v krvi a boli prítomné aj v nádorovom tkanive. Pri dlhodobej špecifickej protiná-

dorovej imunity majú dôležitú úlohu pamäťové T bunky. Ich prítomnosť korelovala s dlhším prežívaním pacientov s pokročilým štádiom onkologického ochorenia [30]. Niektoré podskupiny T-lymfocytov pôsobia naopak pozitívne pri progresii nádoru. U pacientov s rôznym typom nádorovej choroby možno detekovať zvýšenú hladinu regulačných CD4+ T-lymfocytov v periférnej krvi, aj v samotných nádoroch. Prispievajú k pozorovanej imunosupresii pri nádorovom ochorení [31,32].

Dendritické bunky (DC) sa považujú za spojnicu medzi špecifickou a nešpecifickou imunitnou reakciou. V in vitro podmienkach sa DC kultivované s nádorovými antigénmi využívajú ako bunkové vakcíny s cieľom aktivovať cytotoxický účinok T-lymfocytov voči nádorovým bunkám. Novšie štúdie však naznačujú duálne funkcie týchto buniek v nádorovom procese. V ľudských tkanivách boli pozorované dve hlavné populácie DC: myeloidné a plazmacytoidné DC [33]. Myeloidné DC po dozrievaní indukujú Th1 imunitnú odpoveď a považujú sa za iniciátory špecifických imunitných reakcií voči nádorovým antigénom. Ich výskyt v ľudských nádoroch je veľmi zriedkavý [34,35]. Predpokladá sa, že nádorová stróma je zdrojom faktorov, ktoré potláčajú dozrievanie DC [36]. Nezrelé formy myeloidných DC síce stimulujú proliferáciu T-lymfocytov, ale nemajú schopnosť ich aktivovať a prispievajú k imunitnej tolerancii nádorových buniek [37]. Zrelé myeloidné DC produkujú anti-angiogénny IL-12 [38], ich neprítomnosť teda prospieva nádorovému rastu aj z hľadiska angiogenézy.

B-lymfocyty sa len príležitostne vyskytujú v nádorovom tkanive. Predpokladá sa, že B-lymfocyty infiltrujúce nádorové tkanivo môžu slúžiť ako zdroj špecifických protilátok voči nádorovým bunkám [39]. Sérologické vyšetrenia však detekujú nádorové protilátky iba vo veľmi málo prípadoch. Celkovo je význam B-lymfocytov v nádorovej biológii málo dokumentovaný.

Imunitný systém v „útoku“ proti nádorovým bunkám

Pôvodne bolo štúdium nádorovej imunobiológie založené na teóriách, že imunitný systém dohliada na priebeh nádorového rastu. Imunita voči nádorom bola demonštrovaná experimentmi, v ktorých sa transplantovali nádory z jedného zvieratá do iného. Neskôr sa zistilo, že odmietnutie nádoru bolo podmienené imunitnou reakciou voči špeciálnym povrchovým molekulám MHC triedy I a II. V prospech teórie o protinádorových schopnostiach imunitných buniek vystupovali aj experimenty, kde sa preukázalo, že myši deficientné na jednu zložku získanej imunity majú zvýšenú náchylnosť na vznik spontánnych nádorov [40].

Bolo už viackrát demonštrované, že experimentálne zvieratá môžu byť imunizované voči nádorovým bunkám. V prípade nádorov indukovaných vírusmi sa zvyčajne pozoruje, že po imunizácii voči jednému nádoru je imunita účinná aj voči ostatným nádorom, ktoré daný vírus vyvoláva [41]. Pri štúdiu zákonitostí tohto procesu sa potvrdilo, že uvedené imunitné reakcie možno „preniesť“ do iných zvierat imunitnými bunkami (nie sérom) a protinádorová odpoveď môže byť následkom priamej eliminácie nádorových buniek cytotoxickými CD8⁺ T-lymfocyty, ktoré rozpoznávajú MHC triedy I exprimované na povrchu nádorových buniek. V súčasnosti je už známe, že mnohé nádory unikajú imunitnému systému potlačením expresie MHC triedy I a II.

Ako naznačili štúdie vplyvu imunitných buniek na nádorovú proliferáciu, v niektorých prípadoch je prítomnosť T-lymfocytov v primárnych nádoroch spojená s lepšou prognózou, čo naznačuje, že T-lymfocyty môžu kontrolovať nádorový rast [29]. Experimenty u myši preukázali, že protinádorové CD4 a CD8 odpovede nie sú generované priamym kontaktom nádorových buniek s lymfocyty, ale úlohu zohráva absorpcia nádorového materiálu antigén prezentujúcimi bunkami [31,42].

Názory, že u pacientov s nádorom prebieha špecifická protilátková odpoveď voči nádorovým bunkám, vychádzajú zo sledovaní, že séra niektorých pacientov rozpoznávajú špecifické antigény selektívne exprimované na vlastných nádorových bunkách, ale nie na normálnych bunkách. Protilátky môžu pôsobiť deštruktívne buď priamo, väzbou na „strategické“ molekuly, čím zablokovujú prenos signálov, alebo tak, že spustia v nádorových bunkách apoptózu [43]. Z hľadiska štúdia protinádorových imunitných reakcií pretrvávali snahy definovať antigény špecifické pre nádory. Ich vznik je podmienený genetickou zmenou a rovnaký antigén nemusí byť prítomný v iných nádoroch hoci aj rovnakého typu. Prvé pokusy využívali séra onkologických pacientov alebo zvierat úmyselne imunizovaných nádormi ľudí. Ako sa neskôr zistilo v sére boli prítomné aj protilátky reagujúce na mnohé antigény normálnych buniek. Mnoho iných skupín však už identifikovalo antigény špecifické pre nádorové bunky [44,45]. Protinádorové protilátky boli zistené voči viacerým intracelulárnym antigénom, ako aj proti membránovo-viazaným antigénom [46]. Zdá sa, že bunková lokalizácia rozpoznaného antigénu má prognostický význam. Protilátky detekované proti intracelulárnym proteínom korelujú so zlou prognózou, kým protilátky proti komponentom bunkového povrchu korelujú s lepšou prognózou [47]. Skutočnosť, že mnoho nádorov rastie a usmrcuje organizmus, naznačuje, že imunitná odpoveď je pravdepodobne neskorým dejom a vo väčšine prípadov nie je účinná v prevencii nádorového rastu.

Pronádorová aktivita imunitného systému

V súčasnosti je zrejmé, že vzájomný vzťah medzi imunitným systémom a nádorom je vysoko komplexný a prebieha od reakcií inhibície nádorového rastu imunitnými bunkami až po stimuláciu nádorovej progresie. Vo vnútornom prostredí nádoru reak-

cie vrodenej aj získanej imunity môžu podporovať nádorovú progresiu alebo sprostredkovať odmietanie nádoru [5,48]. Bunkové komponenty a imunomodulačné mediátory (cytokíny a chemokíny) smerujú imunitnú odpoveď organizmu k špecifickému fenotypu, v prospech alebo na potlačenie nádorovej progresie [49].

Všeobecne sa predpokladá, že rastúci nádor vytvára stratégie, ktorými by unikol alebo obmedzil pôsobenie imunitného systému [50]. Tieto názory vychádzajú zo skutočnosti, že u onkologických pacientov je možné iba zriedka pozorovať efektívnu nádorovo špecifickú imunitnú reakciu. Navyše je nádorová progresia často spojená so sekreciou imunosupresívnych faktorov a zníženou expresiou antigénov MHC triedy I. Tieto reakcie sa považujú za mechanizmy, ktorými sa snaží nádor uniknúť pred imunitným systémom [51]. Bolo preukázané, že nádorové bunky produkujú cytokíny TGF- β , VEGF inhibujúce vývin a funkciu T buniek. V mnohých typoch nádorov bola opísaná sekrecia imunosupresívnych mediátorov IL-6 a IL-10 [30]. IL-6 je exprimovaný vo vnútornom prostredí nádoru u 83 % pacientov s kolorektálnym karcinómom a koreluje s nepriaznivou progresiou ochorenia [52]. Významne moduluje reaktivitu T buniek v nádorovom prostredí. IL-10 má pleiotropný účinok na funkcie T buniek, inhibuje ich proliferáciu, znižuje expresiu adhézných molekúl a antigénov MHC triedy I, II [53]. U pacientov s ovarálnym karcinómom sa často v sére, peritoneálnom exsudáte a nádorovom tkanive zisťujú vysoké hladiny cytokínov, ktoré inhibujú expresiu imunitu aktivujúcich cytokínov (IL-2, IL-4) [31,54]. Predpokladá sa, že aj to prispieva k signálnym defektom v aktivite T-lymfocytov u pacientov s pokročilým štádiom nádorového ochorenia.

Úloha žírnych buniek v progresii nádoru

V patogenéze nádorového rastu je jedným z kľúčových dejov formovanie no-

vých ciev v okolí a priamo v nádorovom tkanive. Pri štúdiu nádorového prostredia sa v súvislosti s vaskularizovanými, solídnymi i hematopoetickými nádormi pozorovalo zvýšené množstvo žírnych buniek. Ako prvý si všimol množenie sa žírnych buniek v prevažne malígnych nádoroch Ehrlich. Jeho študent Westphal presne definoval, že žirne bunky majú tendenciu zhromažďovať sa na periférii nádorov [55].

O žírnych bunkách je známe, že produkujú cytokíny IL-1, IL-4, IL-6, TNF, a preto sa predpokladá, že participujú na rejekcii nádoru. V minulosti sa periférna distribúcia žírnych buniek v okolí experimentálneho nádoru považovala za znak prebiehajúcej protinádorovej činnosti. Pri inhibícii nádorového rastu sa poukazovalo na produkty degranulácie (histamín, serotonin a heparín) a predpokladalo sa, že stav nádoru a tvorba metastáz nepriamoúmerne koreluje s počtom žírnych buniek a obsahom histamínu v nádorovom tkanive [56].

V protiklade s týmito názormi sú novšie štúdie, ktoré predpokladajú, že sa žirne bunky zúčastňujú na prebiehajúcych zápalových reakciách a podporujú progresiu nádorov [21,55]. Pozitívny efekt žírnych buniek pri nádorovom raste naznačujú aj pozorovania, že faktory atrahujúce a aktivujúce žirne bunky sú uvoľňované nádorovými bunkami. Jedným z významných faktorov je faktor kmeňových buniek (SCF), ktorému sa pripisuje úloha aj pri facilitácii angiogenézy následne po aktivácii žírnych buniek [57]. Ďalšie stimulačné faktory žírnych buniek sú FGF-2, VEGF, rastový faktor endotelu pochádzajúci z krvných doštičiek, RANTES a chemotaktický proteín pre monocyty-1 [58].

Štúdie, ktoré sa snažia definovať lokalizáciu žírnych buniek, naznačujú, že infiltrujú hyperplázie, dysplázie a invazívne oblasti zhubných nádorov, ale nie centrálnu oblasť solídnych nádorov. Bolo pozorované, že sa degranulujú v blízkosti kapilár a bazálnych membrán endotelu. Produkciou látok ako VEGF, FGF-2, IL-8, TGF- β , TNF, MMP-2, MMP-9, tryptáza, chymáza

a nervový rastový faktor podporujú degradáciu nádorovej ECM, invázivnosť nádorových buniek do intersticiálneho stromálneho tkaniva, expanziu cievneho zásobenia a prispievajú k imunosupresii [59,60]. Navyše možno agregáciu na povrchu nádorov považovať za prognostický faktor [61,62]. V prípade nádorov prostaty infiltrácia koreluje so zlou prognózou, čo potvrdzuje, že žirne bunky môžu podporovať progresiu nádoru [62]. Priamoúmerná korelácia bola preukázaná aj medzi infiltráciou žírnych buniek, nádorovou angiogenezou a metastázovaním pri nádore žalúdka [63], kolorektálnom nádore [64], pľúcnom adenokarcinóme [65] a renálnom karcinóme [61].

Je všeobecne akceptované, že v genéze väčšiny nádorov hrubého čreva majú významnú úlohu adenomatózne polypy [66,67]. Experimenty u myší demonštrovali, že polypy sú infiltrované prozápalovými žírnyimi bunkami, ich prekursori a farmakologická alebo genetická deplécia žírnych buniek je spojená s remisiou existujúcich polypov. Pri experimentoch s endostatínom, ktorý je účinným inhibítorom angiogenézy a nádorového rastu, sa zistilo, že inhibovaná nádorová angiogenéza bola spojená so zníženou infiltráciou žírnych buniek, signifikantnou redukciou lymfatických ciev a metastáz lymfatických uzlín. Navyše bola v nádoroch pozorovaná znížená infiltrácia žírnych buniek pozitívnych na lymfangiogénny faktor VEGF-C [58]. Výsledky teda naznačujú, že žirne bunky zohrávajú úlohu nielen v procese formovania krvných ciev, ale aj ciev lymfatického systému.

Proces nádorovej angiogenézy

Novotvorba ciev má zásadný význam pre progresiu nádoru. S nádorom asociované cievy podporujú rast poskytovaním kyslíka, výživy, syntézou rastových faktorov endotelovými bunkami a v procese metastázovania umožňujú nádorovým bunkám vstup do cirkulácie. Nádorová angiogenéza je pravdepodobne podmienená reakciou ná-

dorového tkaniva, pretože pri absencii potrebného cievneho zásobenia väčšina nádorov nepresiahne niekoľko mm³ a zostáva klinicky „tichými“ [68].

Angiogenéza je prísne regulovaný proces, ktorým vzniká hierarchicky usporiadaná funkčná cievna sieť. Za patologických stavov ako sú chronický zápal a nádor vzniká neorganizovaná cievna sieť s obmedzenou funkčnosťou [69]. Predpokladá sa, že táto disorganizácia a neusporiadaná priestorová distribúcia je výsledkom nerovnováhy medzi proangiogénymi a antiangiogénymi faktormi [70]. Vlastnosti nádorových ciev sa líšia aj podľa toho, či ide o rastúci alebo regresívny nádor. Bolo pozorované, že s typom nádoru, lokalizáciou a štádiom nádorového procesu sa mení aj veľkosť pórov cievnej steny [71].

Vzhľadom na význam ciev pri progresii nádoru sa protinádorová terapia zameriava aj na formovanie antiangiogénnych postupov. Je zrejmé, že nádorová angiogenéza predstavuje komplexný problém a jej inhibítory nie sú vždy účinným terapeutickým postupom, keďže zhoršujúci hypoxický stav vedie k selekcii a expanzii agresívnejších klonov nádorových buniek.

Za účelom formovania nových ciev dochádza k aktivácii a proliferácii endotelových buniek. Bunky endotelu migrujú do remodelovanej strómy, kde sa diferencujú a organizujú do nových tubulárnych štruktúr [72]. Tieto procesy sú indukované a regulované širokým spektrom faktorov VEGF, IL-1, IL-8, TNF, bazický fibroblastový rastový faktor, angiotensin 1 a 2, tymidín-fosforyláza, semaforíny, neuropilíny a plexíny, MMP-9, MMP-2, NO, proteínkinázy MAPK, proteínkináza A, proteínkináza B, GTP-ázy, adhézne molekuly zo skupiny kadherínov a integrínov, proteíny ECM, množstvom transkripčných faktorov a regulačných molekúl [73,74]. Predpokladá sa, že k angiogénemu deju často dochádza v čase konverzie premalígnych lézií na malígne [75].

Za kritické mediátory angiogenézy sa považujú VEGF [73,76], najmä faktor

VEGF-A, ktorý sa viaže a aktivuje receptory VEGFR-1 a VEGFR-2 s tyrozín-kinázovou aktivitou. Konkrétne cez receptor VEGFR-2 stimuluje mitogézu, angiogézu a zvyšuje permeabilitu. Význam VEGFR-1 v procese angiogenézy je zdá sa viac komplexný [77]. VEGFR-1 zohráva významnú úlohu aj v hematopoéze, infiltrácii monocytov a iných buniek kostnej drene, ktoré sa môžu usídliť v nádorovom cievnom systéme a podporovať angiogézu.

Expresia VEGF je značne indukovaná environmentálnym stresom, najmä hypoxiou vzniknutou vo vnútornom prostredí nádoru. V hypoxickej regulácii VEGF zohrávajú centrálnu úlohu hypoxiou indukované faktory (HIF) [78,79]. Faktor HIF-1 α sa za normálnych podmienok tvorí pomerne vo veľkom množstve, ale je degradovaný. Za hypoxických podmienok a pri absencii tumor supresorového proteínu VHL je HIF-1 α translokovaný do jadra, kde sa dimerizuje s HIF-1 β za vzniku aktívneho transkripčného faktoru HIF. HIF sa zúčastňuje regulácie mnohých biologických procesov s cieľom adaptovať nádor na podmienky so zníženou dostupnosťou kyslíka. Aktivuje expresiu génov regulujúcich angiogézu, metabolizmus, proliferáciu a apoptózu buniek [80]. Snaží sa mobilizovaním uvedených dejov zabezpečiť optimálnejšie podmienky pre ďalší vývin nádoru. Zdá sa, že rastúci nádor „vysiela“ signály pre bunky z kostnej drene (aj imunitné), ktoré potom putujú do nádorového tkaniva a prispievajú k invázivnosti nádoru a angiogéze. Keďže HIF aktivuje aj špecifické dráhy regulujúce multipotenciu kmeňových buniek, predpokladá sa existencia prepojenia kmeňových buniek a hypoxie [80].

Angiogenézy sa zúčastňujú rôzne typy buniek, najmä endotelové, perivaskulárne (pericyty, bunky hladkého svalstva), zápalové bunky. S nádorovou angiogenezou napr. koreluje infiltrácia žirných buniek [61,63,65]. Bunky vrodenej imunity (makrofágy a neutrofile) uvoľňujú faktory aktivujúce endotelové bunky (VEGF, IL-6,

HGF, MMP-2, MMP-9 a IL-8). Predpokladá sa, že zápalové bunky v nádorom tkanive zohrávajú významnú úlohu nielen v procese nádorovej angiogenézy, ale aj v jej iniciácii [81,82].

Formovanie lymfatických ciev v nádorovom tkanive

V experimentoch u myši vyšla najavo skutočnosť, že VEGF stimuluje rast lymfatických ciev a vývin metastáz lymfatických uzlín, čo viedlo autorov k predpokladu, že lymfangiogenéza pripravuje cestu pre budúce metastázy. Techniky umožňujúce detekovať pohyb nádorových buniek in vivo preukázali, že sa šíria cez lymfatický systém do lokálnych lymfatických uzlín. Keďže lymfatické uzliny sú prvé orgány prichádzajúce do kontaktu s nádorovými metastázami, ich stav sa využíva ako ukazovateľ stupňa progresie daného nádorového ochorenia. Výsledky sa využívajú aj pri stanovení liečebných postupov onkologických pacientov [83].

Definovanie markerov (transkripčný faktor Prox-1, špecifický receptor pre hyaluronan a homológ CD44 – LYVE-1) [84] umožnilo štúdium procesov lymfangiogenézy. Pôvodné predstavy boli, že malígne bunky prerastajú existujúci lymfatický systém. V súčasnosti je potvrdená existencia procesov „neolymfangiogenézy“ v nádorovom tkanive a zdá sa, že nový lymfatický systém vzniká výhradne z existujúcich lymfatických kapilár [85]. Zistilo sa, že významnú úlohu zohrávajú rastové faktory VEGF-C a VEGF-D, ktoré sú uvoľňované nádorovými bunkami a makrofágmi vnútorného prostredia nádoru [84]. V súčasnosti sa predpokladá, že kvantifikácia VEGF-C a VEGF-D v krvi môže byť prediktívnym biomarkerom metastázovania [83].

Pozorovania, že antagonizmy integrínov alebo znížená expresia integrínov má za následok inhibíciu lymfangiogenézy a metastázovania [86] poukazuje na veľkú úlohu integrínov v novotvorbe lymfatických ciev. Preukázalo sa, že myši deficientné na integrín $\alpha 9\beta 1$ uhynuli 6–12 dní po narodení v dôsledku akumulácie lymfy v pleurálnej dutine

[87]. Navyše prostredníctvom väzby VEGF-C a D stimuluje migráciu endotelových buniek [88].

Prebiehajúce štúdie o úlohe lymfatického systému v nádorovom raste poukazujú na jeho aktívnu úlohu. Aktivované bunky lymfatického endotelu produkujú niekoľko rastových faktorov a cytokínov s priamym stimulačným účinkom na nádorové bunky, umožňujú metastaticky šíriacim sa bunkám vytvárať sekundárne nádory [89]. Navyše mnoho mediátorov z endotelu má proangiogénnu aktivitu a lymfatický systém tak prispieva k progresii nádoru aj z hľadiska aktívnej podpory angiogenézy [90].

Nervový systém v kontexte so zápalom a nádorovým procesom

Zápal predstavuje precízne regulovanú reakciu organizmu voči zraneniu alebo infekcii. Typickými mediátormi reakcie sú TNF a mnoho ďalších prozápalových a protizápalových cytokínov, ktoré uvoľňujú bunky vrodenej imunity. Imunitné mechanizmy musia prebiehať na potrebnej „kontrolovanej“ úrovni, pretože napr. zvýšená expresia TNF a prozápalových cytokínov sa môže na systémovej úrovni prejavovať ako systémový zápal a spôsobiť sekundárne poškodenie tkanív [91]. V kontrole zápalu a v modulácii procesov vrodenej imunity zohráva významnú úlohu nervový systém. Pôvodne pretrvával názor, že imunitný a neuroendokrinný systém fungujú autonómne a k ich kontaktu dochádza len počas patologických situácií. Na druhej strane je už dávno známe, že psychický stav ovplyvňuje obranyschopnosť organizmu proti infekčným agensom (prehľad štúdií viď [92]).

Mozog a imunitný systém komunikujú prostredníctvom neurotransmiterov, cytokínov a endokrinných hormónov. Prozápalové cytokíny využívajú ku komunikácii nervové (depolarizujú senzorické nervové zakončenia a aktivujú autonómny nervový systém) aj humorálne dráhy (prostredníctvom cirkumventrikulárnych orgán-

nov i priamym transportom) [93]. Informácie o prebiehajúcich imunitných procesoch sú spracované v mozgu, ktorý následne moduluje činnosť imunitných zložiek opäť prostredníctvom neurálnych (parasymptikus a sympatikus) a humorálnych dráh. Kým humorálne dráhy sú pomerne pomalé a neinformujú presne o lokalite signálu, nervové dráhy sú naopak rýchle a lokalizačne špecifické [94]. Štúdie neuroimunitných interakcií preukázali, že akékoľvek narušenie ich vzájomnej komunikácie podmieňuje náchylnosť k infekciám, zápalovým a autoimunitným chorobám [92].

Protizápalové pôsobenie humorálnej hypotalamo-hypofýzo-adrenokortikálnej osi

Imunitný systém signalizuje mozgu prítomnosť „nebezpečenstva“, environmentálneho stresora na periférii. Cytokíny uvoľňované pri procesoch vrodenej a získanej imunity aktivujú hypotalamo-hypofýzo-adrenokortikálnu (HPA) os, ktorá predstavuje významný neuroendokrinný imunomodulačný mechanizmus. Receptory pre cytokíny boli detekované na všetkých úrovniach HPA osi, a preto možno predpokladať, že integrácia imunitných a neuroendokrinných signálov prebieha na všetkých úrovniach HPA osi. Cytokíny môžu stimulovať regulačné centrá viacerými mechanizmami, na úrovni viscerálnych nervových zakončení, prechodom cez cirkumventrikulárne orgány, priamym pôsobením na neuronálne zakončenia na úrovni eminentia mediana [95,96].

V minulosti sa glukokortikoidy považovali za typické imunosupresívne hormóny. Pozorovania, ktoré potvrdili, že glukokortikoidy dokážu nielen inhibovať, ale aj stimulovať imunitné reakcie v závislosti od typu imunitnej odpovede, imunitného kompartmentu a zastúpenia imunitných buniek potvrdili ich postavenie imunomodulačných hormónov. V závislosti od transkripčných faktorov viazaných v promótorovej oblasti aktivujú alebo inhibujú expresiu génov [97].

Aktivita samotnej HPA osi je tiež kontrolovaná. Glukokortikoidy uplatňujú negatívnu spätnú väzbu na hypotalamus a hypofýzu, čím inhibujú syntézu a uvoľňovanie CRH a POMC/ACTH, znižujú expresiu CRH-R1 mRNA. Hipocampus, u ktorého sa preukázala vysoká denzita glukokortikoidových receptorov, pôsobí inhibične na neuróny CRH PVN, a tým aj na aktivitu osi HPA [96].

Súhrnne možno konštatovať, že v rámci protizápalových aktivít glukokortikoidy pôsobia na imunitné bunky, inhibujú ďalšiu syntézu a uvoľňovanie cytokínov, a tak chránia organizmus pred negatívnymi vplyvmi abnormálne intenzívnej imunitnej reakcie (poškodenie tkaniva, autoimunita, septický šok) [91,92].

Neurálne dráhy neuroimunitných interakcií

V zápale sa okrem imunitnej kontroly prebiehajúcich reakcií uplatňuje aj imunomodulačný vplyv nervového systému. Mozog a imunitný systém majú navzájom obojsmerne prepojené prostredníctvom autonómneho nervového systému. Sympatikus a parasympatikus (n. vagus) inervujú srdce, gastrointestinálny trakt, pečeň, pankreas, obličky, pľúca, týmus a regulujú zložky vrodenej imunity. V porovnaní s regulačným vplyvom osi HPA je neurálna dráha rýchlejšia a poskytuje informácie o mieste poškodenia [92].

Cholinergická protizápalová dráha – n. vagus

V rýchlej zápalovej signalizácii majú významnú úlohu aferentné vlákna n. vagus [98]. Aktivita senzorických zakončení vedie k aktivácii cholinergických nervových vlákien eferentného nervus vagus a k synaptickému uvoľňovaniu acetylcholínu, ktorý inhibuje ďalšiu sekréciu prozápalových cytokínov. Táto protizápalová činnosť bola označená ako „cholinergická protizápalová dráha“ [91,99].

Zdá sa, že nevyhnutné zastúpenie v cholinergicky sprostredkovanom pro-

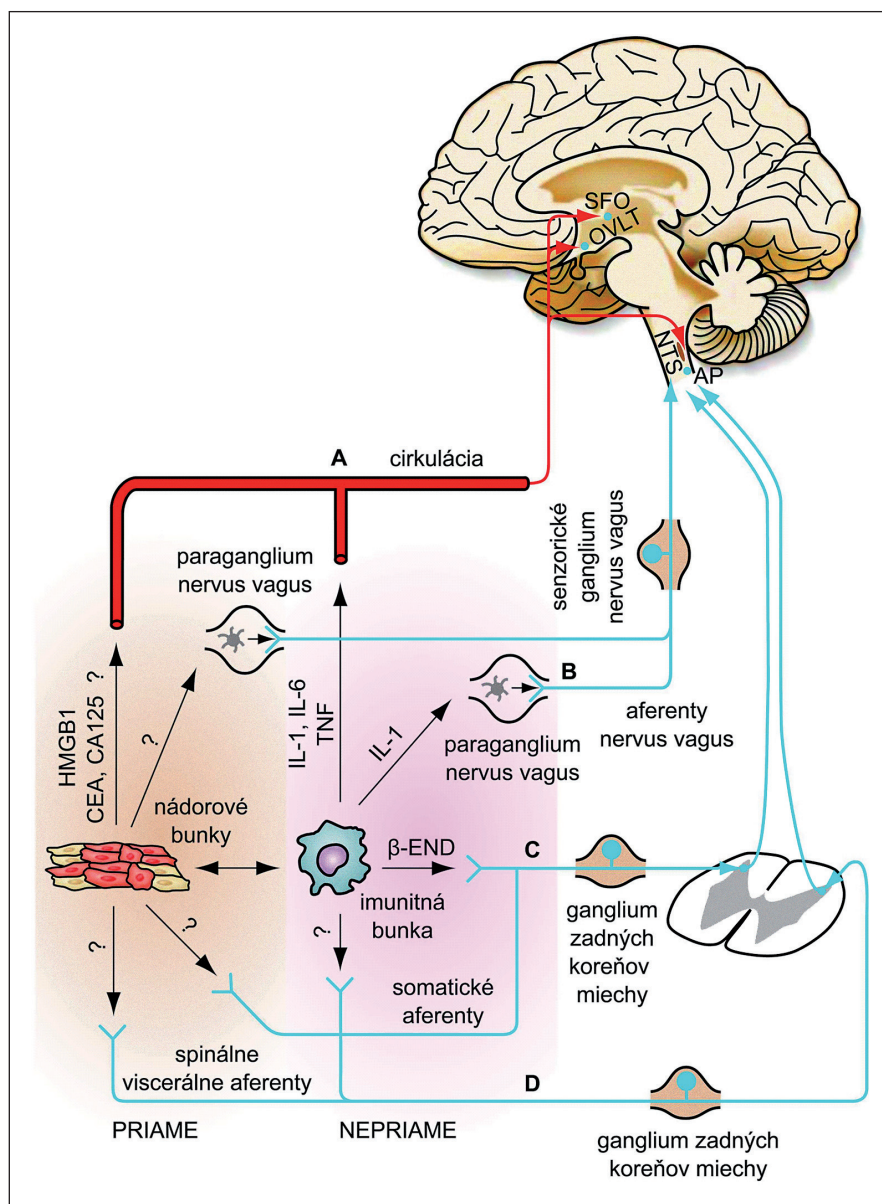
tizápalovom pôsobení n. vagus majú nikotínové receptory s $\alpha 7$ -podjednotkou [91,100–102]. Aktiváciou receptora, či už fyziologicky stimuláciou n. vagus alebo farmakologicky agonistami nikotínových receptorov, sa redukovala tvorba zápalových mediátorov prostredníctvom inhibície translokácie transkripčného faktoru NF κ B a stimulácie dráhy Jak/STAT. Pri štúdiu vplyvu cholinergickej transmisie sa pri T bunkách zistilo, že aktivácia receptora tiež znižuje prozápalovú sekréciu a zároveň inhibuje mitogénom indukovanú proliferáciu [103–105].

Pozitívny vplyv cholinergickej protizápalovej dráhy potvrdzujú mnohé experimentálne štúdie. Elektrickou stimuláciou n. vagus sa podarilo znížiť koncentráciu TNF počas endotoxémie [106], ischemicko-reperfúznom poškodení [107]. Zlepšila priebeh ochorení ako sú experimentálna artritída, hemoragický šok, sepsa, pankreatitída [100,105,108]. Vzhľadom na zistenú spoluúčasť zápalu pri vzniku nádorov sa predpokladá zapojenie neurónov n. vagus do modulácie nádorového procesu [92,109–111].

Pôsobenie sympatikových noradrenergických dráh v zápalových procesoch

Skutočnosť, že imunitný systém je regulovaný sympatikovým nervovým systémom, potvrdzuje nielen sympatiková inervácia väčšiny tkanív lymfatických orgánov, ale aj preukázaná expresia adrenergických receptorov na povrchu imunitných buniek [112], pričom prenos imunoregulačných signálov sympatika je podmienený prítomnosťou konkrétne adrenergických a purinergických receptorov [91]. Jadrá mozgového kmeňa, ktoré vysielajú imunomodulačné signály pregangliovým nervovým vláknam sympatika, sa nachádzajú v pars rostralis ventrolaterálnej časti predĺženej miechy [100,113].

Noradrenalin pôsobí prostredníctvom väzby na adrenergické receptory, ktoré patria medzi klasické G-proteínové receptory so 7 transmembráno-



Obr. 1. Predpokladané mechanizmy interakcií medzi nádorovým prostredím a centrálnym nervovým systémom [92].

vými doménami. Lokálne uvoľňovaný noradrenalin, neuropeptid Y, alebo cirkulujúce katecholamíny ovplyvňujú pohyb, cirkuláciu, proliferáciu lymfocytov, modulujú produkciu cytokínov a funkčnú aktivitu lymfoidných buniek [113]. Vplyv sympatika na imunitné reakcie potvrdzuje fenomén označovaný ako „adrenergická leukocytoza“, ktorý sa následne po aktivácii sympatika manifestuje okamžitou mobilizáciou leukocytov.

O imunomodulačných vplyvoch sympatika existujú protichodné zistenia. Chemická sympatikotómia u myši zvýšila infiltráciu plazmatických buniek

a sérové hladiny protilátok [112,114]. Bolo preukázané, že chemická sympatikotómia stimuluje proliferáciu, migráciu a diferenciáciu T- a B-lymfocytov [115,116]. U NK-buniek aktivácia β -adrenergických receptorov inhibovala cytotoxickú aktivitu [117,118], ale na druhej strane stimulovala ich migráciu, ako aj migráciu cytotoxických T-lymfocytov [118].

Zaujať jednotné stanovisko v otázke celkového pôsobenia sympatika v zápalových procesoch nie je jednoduché. Niektoré štúdie naznačujú, že aktivácia sympatika pôsobí prozápalovo, ale väčšina prác poukazuje na jeho proti-

zápalové pôsobenie [119]. Prerušenie sympatických noradrenergických vlákien v lymfatických uzlinách sa spája so zhoršením zápalového procesu, na proti tomu existujú pozorovania, že sympatikotómia alebo denervácia nervových dráh obmedzila závažnosť zápalu [120]. Predpokladá sa, že účinok sympatikotómie závisí od viacerých faktorov na bunkovej a molekulárnej úrovni [121].

Inervácia nádorov ako štrukturálny dôkaz vplyvu nervového systému na nádorový proces

Otázka inervácie nádorov sa považuje za pomerne nový vedecký „problém“. V roku 2001 bola publikovaná práca nemeckých autorov o inervácii adenómu epitelu ciliárneho tela [122], ktorá akoby otvorila novú kapitolu vo výskume nádorovej biológie. Jedna z „najstarších“ prác popisuje inerváciu vo vzťahu k regulácii prietoku nádorových ciev [123]. Prítomnosť nervových vlákien v blízkosti ciev a ich úlohu v regulácii krvného zásobenia dávajú do vzťahu aj novšie publikované práce [122,124–126]. Aktuálne poznatky o úlohe neurotransmiterov, neurohumorálnych dráh v procese nádorového rastu však tiež viedli k súčasným názorom, že inervácia nádorov, resp. novotvorba nervových vlákien v nádoroch je proces analogický k nádorovej angiogénze či lymfangiogénze [127,128]. Jednoznačne však prítomnosť nervových vlákien v nádoroch predstavuje štrukturálny dôkaz o vzájomných komunikáciách medzi nervovým systémom a nádorovým tkanivom [122].

Význam inervácie nádorov a vplyv neurotransmiterov na nádorový proces

Výskyt neuronálnych štruktúr v nádorovom tkanive by mohol byť na jednej strane dôkazom informovanosti organizmu a centrálného nervového systému o existencii nádoru a snáď v kontexte s protizápalovým pôsobením nervových dráh odrazom snahy nervového systému kontrolovať ná-

dorový rast. Na druhej strane poznatky o vplyve neurotransmiterov na imunitné a nádorové bunky skôr naznačujú, že neurogenéza môže byť účelovým procesom zo strany nádoru. Detekcia vazoaktívneho intestinálneho peptidu (VIP) a neuropeptidu Y (NPY) v blízkosti nádorového cievneho systému poukazuje na úlohu týchto neuropeptidov v regulácii lokálneho krvného prietoku [124]. O neuropeptide VIP je známe, že stimuluje sekréciu imunosupresívne pôsobiaceho kortizolu [129], čo môže v tomto prípade tiež poukazovať na nepriamu moduláciu imunitných procesov v rámci nádoru. Sympatikový mediátor NPY má tiež imunomodulačné účinky. Reguluje diferenciáciu T pomocných buniek, stimuluje uvoľňovanie zápalových mediátorov z monocytov, aktivuje NK-bunky [130] a je tiež angiogénnym faktorom [131]. Na druhej strane boli NPY a VIP pozitívne nervové štruktúry (vlákna a ich zväzky) prítomné v blízkosti nádorových buniek, čo naznačuje, že produkciu rôznych rastových faktorov môžu priamo ovplyvňovať nádorový rast [124].

Úlohu nervového systému v nádorovom procese sa v súčasnosti venuje veľká pozornosť. Je známe, že imunitný systém detekuje prítomnosť nádorových buniek, a preto existujú predpoklady, že nervový systém je prostredníctvom neuroimunitných interakcií informovaný o prítomnosti nádoru a môže ho modullovať (obr. 1) [92,109,110,132,133].

Úlohu neurotransmiterov v nádorovom procese potvrdzujú dôkazy o expresii receptorov pre neurotransmitery v mnohých typoch nádorových buniek. Výsledky viacerých štúdií naznačujú vplyv neuronálnych signálov sympatikových a parasympatikových dráh v procesoch apoptózy, migrácie a metastázovania buniek, angiogenézy [134]. Keďže neurotransmitery pôsobia chemotakticky, môžu prispievať k lokalizácii metastáz do orgánov uvoľňujúcich tieto chemické látky [128,135].

Úloha katecholamínov v nádorových procesoch je spomedzi všetkých neurotransmiterov najviac popísaná [136]. Je známe, že katecholamíny ovplyvňujú cez adrenergické receptory metabolizmus a rast cieľových buniek [137]. Pri noradrenalíne (NA) sa preukázalo, že stimuluje migráciu a metastázovanie nádorových buniek zrejme cez β_2 -adrenergické receptory [138,139] a tieto procesy možno úspešne eliminovať použitím beta-blokátorov [140]. Expresia β_2 -adrenergických receptorov a väzba adrenalínu bola preukázaná pri nádorových bunkách ovárií a interakcie týchto receptorov s mediátorom NA v nádoroch prsníka, ovárií, prostaty, hrubého čreva [141]. Aktivácia sympatikoadrenálneho systému pri stresových reakciách a celkovo stres sa považujú za faktory, ktoré podporujú nádorovú progresiu a zhoršujú zdravotný stav onkologického pacienta [92,133,142,143]. Preukázalo sa, že NA prispieva k progresii nádoru prostredníctvom zvýšenia expresie angiogénnych faktorov ako VEGF, MMP [144], ako aj IL-8 a IL-6 [145]. Pozorovanie, že NA indukuje rast fibroblastov a hladkosvalových buniek naznačuje pozitívne pôsobenie v signálnych proliferčných dráhach [131]. V prípade sympatikového mediátora NPY sa pozorovala proliferčná aj antiproliferačná aktivita, pričom sa zdá, že pôsobenie NPY závisí od typu nádorových buniek, exprimovaného receptoru, experimentálnych podmienok a koncentrácie NPY [146].

Úlohu n. vagus a cholinergického systému v nádorovej biológii naznačujú pozorovania o vplyve acetylcholínu a jeho receptorov v nádorovom procese. Aktivácia muskarínového receptoru nádorových buniek sa spája s generovaním antiproliferačných signálov a stimuláciou E-selektínom sprostredkovanej adhézie [147]. Na druhej strane sa preukázalo, že acetylcholín cez muskarínové receptory stimuluje rast nádoru ovárií, pľúc a v prípade nádorov hrubého čreva a prostaty sa potvrdil proliferčný sti-

mul cez muskarínové M3 receptory [148]. Už dávnejšie bola venovaná pozornosť nikotínovému receptoru v súvislosti s fajčením a nádorom pľúc. Štúdie preukázali, že nikotínové receptory zohrávajú významnú úlohu v mitogénnej signalizácii a proliferčnú aktivitu bolo možno blokovat antagonistami nikotínových, ale nie muskarínových receptorov [149]. V tejto súvislosti sa preukázali významné najmä receptory obsahujúce $\alpha 7$ -podjednotku. Je zaujímavé, že zvýšená expresia mRNA pre $\alpha 7$ -podjednotku bola preukázaná pri mnohých typoch nádorových buniek pľúc, ale prítomnosť tohto proteínu v nikotínovom receptore iba v prípade veľmi agresívnych buniek malobunkového karcinómu pľúc (SCLC). Stimuláciou receptora sa zvýšila syntéza DNA, ako aj počet buniek SCLC. Tento typ receptorov preukázal významnú úlohu pri inhibícii apoptózy, stimulácii migrácie a invázivnosti buniek. Aktivácia pôsobila ako stimul pre sekréciu niektorých rastových faktorov a ich autokrinné pôsobenie na nádorové bunky [149]. Aktivita signálnych dráh proliferácie a invázivnosti SCLC buniek je naopak inhibovaná cez aktiváciu β_2 -adrenergických receptorov [150].

Uvedené experimentálne výsledky, ako aj pozorovania týkajúce sa pôsobenia iných neurotransmiterov v nádorovom tkanive [134,151] sú dôkazom toho, že nervové zakončenia v nádorovom tkanive poskytujú signálne látky, ktoré môžu podporovať proliferáciu nádorových buniek a iniciovať formovanie metastáz.

Proces nádorovej neoneurogenézy

Celkovo možno vývin neuronálnych štruktúr rozdeliť do 6 krokov. Zahŕňajú migráciu prekursorových buniek do cieľovej oblasti, ich diferenciáciu, organizáciu budúcej štruktúry, vytvárajú sa prepojenia s existujúcimi nervovými štruktúrami a prebiehajú procesy podmieňujúce celkové prispôbenie sa k budúcim funkciám.

Bunky v nádorovom tkanive spolu navzájom komunikujú a interagujú.

Nervové bunky uvoľňujú neurotransmitery, ktoré sa viažu na špecifické receptory nádorových buniek a modulujú patogenézu nádorového rastu. Na druhej strane aj nádorové bunky sú schopné uvoľňovať nielen angiogénne, lymfangiogénne, ale aj faktory, ktoré môžu stimulovať príslušné nervové bunky a viesť k vrastaniu axónov do nádoru. I keď sa predpokladalo, ako aj v prípade nádorových krvných a lymfatických ciev, že nádor prerastá cez už existujúci nervový systém, v súčasnosti existujú dôkazy o nádorovej „neoneurogenéze“ [128,152]. Pri rôznych typoch nádorových buniek sa preukázala syntéza nervového rastového faktoru (NGF), mozgového rastového faktoru (BDNF), neurotrofinu 3 [128,153]. Tieto faktory ovplyvňujú procesy rastu a diferenciácie nervových buniek a navyše sa funkcie neurogénnych a angiogénnych faktorov prekrývajú. V súvislosti so známymi skutočnosťami o procesoch vývinu nádorových lymfatických a krvných ciev by nebolo správne pripisovať jednému faktoru úlohu pri noneurogenéze, skôr ide o komplex faktorov a interakcií [128].

Pri porovnávaní inervácie malígnych a benígnych nádorov prsníka bol v malígnom tkanive preukázaný vyšší výskyt nervových vlákien v porovnaní s benígnym, či normálnym tkanivom [154]. V súčasnosti je otáznosť, či by sme ovplyvnením inervácie nádorov mohli zvrátiť zlý stav onkologického pacienta.

Neurobiologický pohľad na etiopatogenézu nádorových chorôb, ktorý vychádza z preukázanej inervácie nádorových tkanív, vplyvu neurotransmiterov na procesy spojené s nádorovým rastom, ako aj obojsmerných interakcií medzi imunitným a nervovým systémom, vytvára podklad pre úplnejšie chápanie komplexity procesov sprevádzajúcich nádorový rast. Experimentálne štúdie neurobiológie nádorových chorôb, ktoré v súčasnosti prebiehajú aj v našom laboratóriu [155,156], môžu v budúcnosti umožniť využitie získaných poznatkov pri zavedení no-

vých diagnostických a terapeutických postupov v onkológii.

Záver

Predložená práca je pokusom o zhrňujúci pohľad „do vnútra nádorového procesu“. K zložitosti nádorového rastu sme priradili termín „komplexita“. Prvou podmienkou komplexity je prostredie, v ktorom prebiehajú procesy, ktoré môžeme sledovať aspoň parciálne. Druhou podmienkou je nelinearita sledovaných dejov. Predpokladáme, že obidve podmienky sú splnené v prípade nádorového rastu.

Nádorového rastu sa zúčastňuje veľa faktorov. Ich počet určite presahuje minimálne niekoľko desiatok. Ak zoberieme do úvahy pravdepodobné kombinácie, tak pri desiatkach faktorov dosahuje počet možných kombinácií niekoľko miliárd možností. Táto skutočnosť nás nabáda k tomu, aby sme rešpektovali zložitost, a aby sme boli opatrní pri oceňovaní alebo preceňovaní niektorých faktorov, látok alebo molekúl a ich vzájomných interakcií v tomto zložitom procese. Okrem toho musíme rešpektovať aj to, že vývin nádorov nie je lineárny. Rast nádorov ako zložitý a komplexný dej je na začiatku harmonizovaný. Harmónia rastu je však na hranici chaosu. Pritom bunky nefungujú ako automaty a ich činnosť nie je kontinuálna. V bunkách prebiehajú procesy v závislosti od ich „výbavy“, ale aj v závislosti na okolí prostredí. Tieto skutočnosti spolu predstavujú zložitost, ktorá môže mať navonok spoločné charakteristiky rastu niektorých typov nádorov.

Myslíme si, že je potrebné robiť analýzy smerujúce k zjednocovaniu poznatkov o vnútornom prostredí nádorov. Preto sme sa pokúsili zhrnúť novšie poznatky a usporiadať ich tak, aby tvorili prehľad a základ pre hlbšie štúdium. Diagnostika a terapeutické ovplyvňovanie rastu alebo eliminácie nádorov „sa teraz posúvajú“ do vnútra buniek, k molekulám a k nadmieru zložitým procesom. Myslíme si, že podobné štúdie predstavujúce zhr-

ňujúci pohľad budú nevyhnutné s určitou pravidelnosťou aj preto, aby sa známe obohacovalo o nové bez štúdia všetkých detailov, najmä bez opisu procesov, pri ktorých sa poznatky získali.

Od minulého roka sa v najprestížnejších časopisoch objavujú štúdie, v ktorých sa predpokladá využitie reverzie molekulového programu malígnych buniek, ktoré by malo za následok odstránenie nádorového rastu. K týmto nádejam sa pridávajú aj predpoklady časového horizontu v dohľade budúcich 20 rokov. Aj preto považujeme štúdium vnútorného prostredia nádoru za odôvodnené. Naša práca je pokusom o jednoduché priblíženie nadrozmernej zložitosti vnútronádorového procesu.

Celkom vedome sme nerobili hierarchiu procesov podľa ich zložitosti alebo rozsahu. Budúcnosť ukáže uzlové body, ktoré sú významnejšie ako paralelne prebiehajúce deje. Predpokladáme, že rozhodujúcimi ukazovateľmi a charakteristikami budú biomarkery a najmä ich kontinuálne sledovanie. Takými môže byť aj sledovanie neoangiogenézy, alebo noneurogenézy. Predpokladáme, že pre dosahovanie týchto cieľov sú práce podobné ako predložená, opodstatnené.

Táto práca vznikla v súvislosti s riešením grantových projektov APVV-0045-06; VEGA (1/4312/07, 1/4251/07 a 2/0010/09) a grant UK 450/2009.

Literatúra

1. Adam Z, Chlupová G, Tomášek J et al. Systémové a paraneoplastické prejavy malígnych onemocnění. Vnitř Lék 2007; 53: 253–285.
2. Polyak K, Haviv I, Campbell IG. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. Trends Genet 2009; 25: 30–38.
3. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW et al. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. Cancer Res 1999; 59: 5002–5011.
4. Hlávková D, Kopecký O, Lukešová Š. Zánetlivá reakce a její význam v průběhu nádorového procesu. Vnitř Lék 2008; 54: 821–826.
5. Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. Annu Rev Pathol 2006; 1: 119–150.

6. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161–174.
7. Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM et al. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 411–424.
8. Houghton J, Morozov A, Smirnova I et al. Stem cells and cancer. *Semin Cancer Biol* 2007; 17: 191–203.
9. Ailles LE, Weissman IL. Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol* 2007; 18: 460–466.
10. Marotta LL, Polyak K. Cancer stem cells: a model in the making. *Curr Opin Genet Dev* 2009; 19: 44–50.
11. Wicha MS. Cancer stem cell heterogeneity in hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res* 2008; 10: 105.
12. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005; 121: 335–348.
13. Pagès F, Berger A, Camus M et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 2654–2666.
14. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313: 1960–1964.
15. Stewart TH, Heppner GH. Immunological enhancement of breast cancer. *Parasitology* 1997; 115: S141–S153.
16. Nonomura N, Takayama H, Nishimura K et al. Decreased number of mast cells infiltrating into needle biopsy specimens leads to a better prognosis of prostate cancer. *Br J Cancer* 2007; 97: 952–956.
17. Taskinen M, Karjalainen-Lindsberg ML, Leppä S. Prognostic influence of tumor-infiltrating mast cells in patients with follicular lymphoma treated with rituximab and CHOP. *Blood* 2008; 111: 4664–4667.
18. Ben-Baruch A. Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. *Breast Cancer Res* 2003; 5: 31–36.
19. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 2008; 27: 5904–5912.
20. Gassmann P, Haier J. The tumor cell-host organ interface in the early onset of metastatic organ colonisation. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25: 171–181.
21. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D et al. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 2000; 103: 481–490.
22. Pekarek LA, Starr BA, Toledano AY et al. Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J Exp Med* 1995; 181: 435–440.
23. Wu QD, Wang JH, Condrón C et al. Human neutrophils facilitate tumor cell transendothelial migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C814–C822.
24. Schrufer R, Lutze N, Schymeinsky J et al. Human neutrophils promote angiogenesis by a paracrine feedforward mechanism involving endothelial interleukin-8. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H1186–H1192.
25. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860–867.
26. Crowther M, Brown NJ, Bishop ET et al. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 478–490.
27. Sato E, Olson SH, Ahn J et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 18538–18543.
28. Leffers N, Lambeck AJ, de Graeff P et al. Survival of ovarian cancer patients overexpressing the tumour antigen p53 is diminished in case of MHC class I down-regulation. *Gynecol Oncol* 2008; 110: 365–373.
29. Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab Invest* 2006; 86: 231–245.
30. Mantovani A, Romero P, Palucka AK et al. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet* 2008; 371: 771–783.
31. Lukešová Š, Vroblová V, Hlávková D et al. Sledování protinádorové buněčné imunitní odpovědi u nemocných s renálním karcinomem, porucha proliferace T-lymfocytů. *Vnitř Lék* 2008; 54: 139–145.
32. Wolf D, Wolf AM, Rumpold H et al. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8326–8331.
33. O'Neill DW, Adams S, Bhardwaj N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood* 2004; 104: 2235–2246.
34. Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hérmin A et al. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 2001; 7: 1339–1346.
35. Iwamoto M, Shinohara H, Miyamoto A et al. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 2003; 104: 92–97.
36. Freedman RS, Deavers M, Liu J et al. Peritoneal inflammation – a microenvironment for Epithelial Ovarian Cancer (EOC). *J Transl Med* 2004; 2: 23.
37. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J et al. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001; 193: 233–238.
38. Curiel TJ, Cheng P, Mottram P et al. Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 5535–5538.
39. Pavoni E, Monteriù G, Santapaola D et al. Tumor-infiltrating B lymphocytes as an efficient source of highly specific immunoglobulins recognizing tumor cells. *BMC Biotechnol* 2007; 7: 70.
40. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21: 137–148.
41. Beverley PC. The immunology of cancer. In: Knowles MA, Selby PJ (eds). *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. New York: Oxford University Press 2005: 337–353.
42. Girolomoni G, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells hold promise for immunotherapy. *Immunol Today* 1997; 18: 102–104.
43. Cholužová D. Protinádorová imunita a imunoterapia – molekulárne ministerstvo obrany. 2007. Available from http://www.nvr.sk/buxus/generate_page.php?page_id=547.
44. Gerhardt A, Usener D, Keese M et al. Tissue expression and sero-reactivity of tumor-specific antigens in colorectal cancer. *Cancer Lett* 2004; 208: 197–206.
45. Eichmüller S, Usener D, Thiel D et al. Tumor-specific antigens in cutaneous T-cell lymphoma: expression and sero-reactivity. *Int J Cancer* 2003; 104: 482–487.
46. Mittelman A, Lucchese A, Sinha AA et al. Monoclonal and polyclonal humoral immune response to EC HER-2/NEU peptides with low similarity to the host's proteome. *Int J Cancer* 2002; 98: 741–747.
47. Taylor DD, Gercel-Taylor C. Tumor-reactive immunoglobulins in ovarian cancer: diagnostic and therapeutic significance? *Oncol Rep* 1998; 5: 1519–1524.
48. Ostrand-Rosenberg S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev* 2008; 18: 11–18.
49. DeNardo DG, Coussens LM. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 2007; 9: 212.

50. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol* 2006; 90: 51–81.
51. Gilboa E. How tumors escape immune destruction and what we can do about it. *Cancer Immunol Immunother* 1999; 48: 382–385.
52. Piancatelli D, Romano P, Sebastiani P et al. Local expression of cytokines in human colorectal carcinoma: evidence of specific interleukin-6 gene expression. *J Immunother* 1999; 22: 25–32.
53. Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 1043–1051.
54. Benelli R, Lorusso G, Albini A et al. Cytokines and chemokines as regulators of angiogenesis in health and disease. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 3101–3115.
55. Crivellato E, Ribatti D. Involvement of mast cells in angiogenesis and chronic inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4: 9–11.
56. Burtin C, Ponvert C, Fray A et al. Inverse correlation between tumor incidence and tissue histamine levels in W/WV, WV/+, and +/+ mice. *J Natl Cancer Inst* 1985; 74: 671–674.
57. Zhang W, Stoica G, Tasca SI et al. Modulation of tumor angiogenesis by stem cell factor. *Cancer Res* 2000; 60: 6757–6762.
58. Crivellato E, Nico B, Ribatti D. Mast cells and tumour angiogenesis: new insight from experimental carcinogenesis. *Cancer Lett* 2008; 269: 1–6.
59. Ribatti D, Marimpietri D, Pastorino F et al. Angiogenesis in neuroblastoma. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1028: 133–142.
60. Di Girolamo N, Indoh I, Jackson N et al. Human mast cell-derived gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) is regulated by inflammatory cytokines: role in cell migration. *J Immunol* 2006; 177: 2638–2650.
61. Tuna B, Yorukoglu K, Unlu M et al. Association of mast cells with microvessel density in renal cell carcinomas. *Eur Urol* 2006; 50: 530–534.
62. Nonomura N. Three successful cases of bilateral testicular tumors where the unilateral testis was preserved by three courses of BEP chemotherapy. *Int J Urol* 2007; 14: 882.
63. Yano H, Kinuta M, Tateishi H et al. Mast cell infiltration around gastric cancer cells correlates with tumor angiogenesis and metastasis. *Gastric Cancer* 1999; 2: 26–32.
64. Lachter J, Stein M, Lichtig C et al. Mast cells in colorectal neoplasias and premalignant disorders. *Dis Colon Rectum* 1995; 38: 290–293.
65. Takanami I, Takeuchi K, Naruke M. Expression and prognostic value of the standard CD44 protein in pulmonary adenocarcinoma. *Oncol Rep* 2000; 7: 1065–1067.
66. Gounaris E, Erdman SE, Restaino C et al. Mast cells are an essential hematopoietic component for polyp development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 19977–19982.
67. Procházka V, Chlup R. Kolorektální karcinom a diabetes mellitus. *Vnitř Lék* 2008; 54: 979–984.
68. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27–31.
69. McDonald DM, Choyke PL. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med* 2003; 9: 713–725.
70. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005; 307: 58–62.
71. Fukumura D, Jain RK. Imaging angiogenesis and the microenvironment. *APMIS* 2008; 116: 695–715.
72. Hanahan D, Christofori G, Naik P et al. Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2386–2393.
73. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008; 358: 2039–2049.
74. Neufeld G, Kessler O. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 632–645.
75. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353–364.
76. Ferrara N. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology* 2005; 69 (Suppl 3): 11–16.
77. Shibuya M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 409–420.
78. Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 993–998.
79. Pouyssegur J, Mechta-Grigoriou F. Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol Chem* 2006; 387: 1337–1346.
80. Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell* 2007; 129: 465–472.
81. Rüegg C. Leukocytes, inflammation, and angiogenesis in cancer: fatal attractions. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 682–684.
82. Noonan DM, De Lerma Barbaro A, Vannini N et al. Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27: 31–40.
83. Tsiolis TD, Papastratis G, Masselou K et al. Circulating lymphangiogenic growth factors in gastrointestinal solid tumors, could they be of any clinical significance? *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2691–2701.
84. Ji RC. Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: New insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25: 677–694.
85. Kerjaschki D, Huttary N, Raab I et al. Lymphatic endothelial progenitor cells contribute to de novo lymphangiogenesis in human renal transplants. *Nat Med* 2006; 12: 230–234.
86. Garmy-Susini B, Makale M, Fuster M et al. Methods to study lymphatic vessel integrins. *Methods Enzymol* 2007; 426: 415–438.
87. Huang XZ, Wu JF, Ferrando R et al. Fatal bilateral chylothorax in mice lacking the integrin alpha9beta1. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 5208–5215.
88. Ji RC. Lymphatic endothelial cells, inflammatory lymphangiogenesis, and prospective players. *Curr Med Chem* 2007; 14: 2359–2368.
89. Das S, Skobe M. Lymphatic vessel activation in cancer. *Ann NY Acad Sci* 2008; 1131: 235–241.
90. Cao Y. Why and how do tumors stimulate lymphangiogenesis? *Lymphat Res Biol* 2008; 6: 145–148.
91. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002; 420: 853–859.
92. Mravec B. Neurobiológia chorôb periférnych tkanív. Bratislava: SAP 2008.
93. Godbout JP, Johnson RW. Age and neuroinflammation: a lifetime of psychoneuroimmune consequences. *Neurol Clin* 2006; 24: 521–538.
94. Pavlov VA, Wang H, Czura CJ et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol Med* 2003; 9: 125–134.
95. Blatteis CM. The afferent signalling of fever. *J Physiol* 2000; 526: 470.
96. Silverman MN, Pearce BD, Biron CA et al. Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. *Viral Immunol* 2005; 18: 41–78.
97. Sternberg EM. Neural-immune interactions in health and disease. *J Clin Invest* 1997; 100: 2641–2647.
98. Goehler LE, Gaykema RP, Nguyen KT et al. Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? *J Neurosci* 1999; 19: 2799–2806.
99. Czura CJ, Tracey KJ. Autonomic neural regulation of immunity. *J Intern Med* 2005; 257: 156–166.
100. Pavlov VA, Tracey KJ. Neural regulators of innate immune responses and in-

flammation. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2322–2331.

101. Quan N, Banks WA. Brain-immune communication pathways. *Brain Behav Immun* 2007; 21: 727–735.

102. Wang H, Yu M, Ochani M et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003; 421: 384–388.

103. De Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2–STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2005; 6: 844–851.

104. Gallowitsch-Puerta M, Pavlov VA. Neuro-immune interactions via the cholinergic antiinflammatory pathway. *Life Sci* 2007; 80: 2325–2329.

105. Oke SL, Tracey KJ. From CNI-1493 to the immunological homunculus: physiology of the inflammatory reflex. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 512–517.

106. Bernik TR, Friedman SG, Ochani M et al. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Exp Med* 2002; 195: 781–788.

107. Bernik TR, Friedman SG, Ochani M et al. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. *J Vasc Surg* 2002; 36: 1231–1236.

108. Andersson J. The inflammatory reflex – introduction. *J Intern Med* 2005; 257: 122–125.

109. Mravec B, Hulin I. Does vagus nerve constitute a self-organization complexity or a “hidden network”? *Bratisl Lek Listy* 2006; 107: 3–8.

110. Mravec B, Gidron Y, Kukanova B et al. Neural-endocrine-immune complex in the central modulation of tumorigenesis: facts, assumptions, and hypotheses. *J Neuroimmunol* 2006; 180: 104–116.

111. Palaria L, Grozio A, Cesario A et al. The cholinergic system and cancer. *Semin Cancer Biol* 2008; 18: 211–217.

112. Nance DM, Sanders VM. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987–2007). *Brain Behav Immun* 2007; 21: 736–745.

113. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP et al. The sympathetic nerve: an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 595–638.

114. Pongratz G, McAlees JW, Conrad DH et al. The level of IgE produced by a B cell is regulated by norepinephrine in a p38 MAPK- and CD23-dependent manner. *J Immunol* 2006; 177: 2926–2938.

115. Madden KS, Olschowka JA, Livnat S. Noradrenergic sympathetic innervation of lymphoid organs. *Prog Allergy* 1988; 43: 14–36.

116. Madden KS, Sanders VM, Felten DL. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 417–448.

117. Shakhar G, Ben-Eliyahu S. In vivo beta-adrenergic stimulation suppresses natural killer activity and compromises resistance to tumor metastasis in rats. *J Immunol* 1998; 160: 3251–3258.

118. Lang K, Drell TL, Niggemann B et al. Neurotransmitters regulate the migration and cytotoxicity in natural killer cells. *Immunol Lett* 2003; 90: 165–172.

119. Sternberg EM. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 318–328.

120. Bellinger DL, Millar BA, Perez S et al. Sympathetic modulation of immunity: relevance to disease. *Cell Immunol* 2008; 252: 27–56.

121. Haug SR, Heyeraas KJ. Modulation of dental inflammation by the sympathetic nervous system. *J Dent Res* 2006; 85: 488–495.

122. Seifert P, Spitznas M. Tumours may be innervated. *Virchows Arch* 2001; 438: 228–231.

123. Shapiro DM, Warren S. Cancer innervation. *Cancer Res* 1949; 9: 707–711.

124. Li Q, Johansson H, Kjellman M et al. Neuroendocrine differentiation and nerves in human adrenal cortex and cortical lesions. *APMIS* 1998; 106: 807–817.

125. Schwei MJ, Honore P, Rogers SD et al. Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *J Neurosci* 1999; 19: 10886–10897.

126. Seifert P, Spitznas M. Axons in human choroidal melanoma suggest the participation of nerves in the control of these tumors. *Am J Ophthalmol* 2002; 133: 711–713.

127. Entschladen F, Palm D, Lang K et al. Neoneurogenesis: tumors may initiate their own innervation by the release of neurotrophic factors in analogy to lymphangiogenesis and neoangiogenesis. *Med Hypotheses* 2006; 67: 33–35.

128. Entschladen F, Palm D, Niggemann B et al. The cancer's nervous tooth: Considering the neuronal crosstalk within tumors. *Semin Cancer Biol* 2008; 18: 171–175.

129. Nicol MR, Cobb VJ, Williams BC et al. Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates cortisol secretion from the H295 human adrenocortical tumour cell line via VPAC1 receptors. *J Mol Endocrinol* 2004; 32: 869–877.

130. Groneberg DA, Folkerts G, Peiser C et al. Neuropeptide Y (NPY). *Pulm Pharmacol Ther* 2004; 17: 173–180.

131. Raju B, Haug SR, Ibrahim SO et al. Sympathectomy decreases size and invasiveness of tongue cancer in rats. *Neuroscience* 2007; 149: 715–725.

132. Gidron Y, Perry H, Glennie M. Does the vagus nerve inform the brain about preclinical tumours and modulate them? *Lancet Oncol* 2005; 6: 245–248.

133. Mravec B, Ondicova K, Valaskova Z et al. Neurobiological principles in the etiopathogenesis of disease: when diseases have a head. *Med Sci Monit* 2009; 15: RA6–RA16.

134. Lang K, Bastian P. Neurotransmitter effects on tumor cells and leukocytes. *Prog Exp Tumor Res* 2007; 39: 99–121.

135. Drell TL 4th, Joseph J, Lang K et al. Effects of neurotransmitters on the chemokinesis and chemotaxis of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 80: 63–70.

136. Entschladen F, Drell TL 4th, Lang K et al. Neurotransmitters and chemokines regulate tumor cell migration: potential for a new pharmacological approach to inhibit invasion and metastasis development. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 403–411.

137. Sanae F, Miyamoto K, Koshiura R. Altered adrenergic response and specificity of the receptors in rat ascites hepatoma AH130. *Cancer Res* 1989; 49: 6242–6246.

138. Lang K, Drell TL 4th, Lindecke A et al. Induction of a metastatogenic tumor cell type by neurotransmitters and its pharmacological inhibition by established drugs. *Int J Cancer* 2004; 112: 231–238.

139. Masur K, Niggemann B, Zanker KS et al. Norepinephrine-induced migration of SW 480 colon carcinoma cells is inhibited by beta-blockers. *Cancer Res* 2001; 61: 2866–2869.

140. Palm D, Lang K, Niggemann B et al. The norepinephrine-driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by beta-blockers. *Int J Cancer* 2006; 118: 2744–2749.

141. Thaker PH, Sood AK. Neuroendocrine influences on cancer biology. *Semin Cancer Biol* 2008; 18: 164–170.

142. Goldfarb Y, Ben-Eliyahu S. Surgery as a risk factor for breast cancer recurrence and metastasis: mediating mechanisms and clinical prophylactic approaches. *Breast Dis* 2006–2007; 26: 99–114.

143. Kiecolt-Glaser JK, Robles TF, Heffner KL et al. Psychooncology and cancer: psychoneuroimmunology and cancer. *Ann Oncol* 2002; 13: 165–169.

144. Yang EV, Sood AK, Chen M et al. Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2,

and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. *Cancer Res* 2006; 66: 10357–10364.

145. Yang EV, Kim SJ, Donovan EL et al. Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression in human melanoma tumor cell lines: implications for stress-related enhancement of tumor progression. *Brain Behav Immun* 2009; 23: 267–275.

146. Körner M, Reubi JC. NPY receptors in human cancer: a review of current knowledge. *Peptides* 2007; 28: 419–425.

147. Williams CL. Muscarinic signaling in carcinoma cells. *Life Sci* 2003; 72: 2173–2182.

148. Song P, Sekhon HS, Lu A et al. M3 muscarinic receptor antagonists inhibit small cell lung carcinoma growth and mitogen-activated protein kinase phosphorylation induced by acetylcholine secretion. *Cancer Res* 2007; 67: 3936–3944.

149. Schuller HM. Neurotransmitter receptor-mediated signaling pathways as modulators of carcinogenesis. *Prog Exp Tumor Res* 2007; 39: 45–63.

150. Plummer HK 3rd, Dhar MS, Cekanova M et al. Expression of G-protein inwardly rectifying potassium channels (GIRKs) in lung cancer cell lines. *BMC Cancer* 2005; 5: 104.

151. Kinova S, Duris I, Kovacova E et al. Malignant carcinoid in two brothers. *Bratisl Lek Listy* 2001; 102: 231–234.

152. Lang K, Entschladen F, Weidt C et al. Tumor immune escape mechanisms: impact of the neuroendocrine system. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 749–760.

153. Entschladen F, Palm D, Drell TL 4th et al. Connecting a tumor to the environment. *Curr Pharm Des* 2007; 13: 3440–3444.

154. Soltanghoraiee H, Zavarehii MJ, Broomand MA. Comparison between number of nerve fibers in normal breast

tissue, benign lesions and malignant breast tumors. *Acta Medica Iranica* 2004; 42: 355–358.

155. Mravec B, Lackovicova L, Pirnik Z et al. Brain response to induced peripheral cancer development in rats: dual fos-tyrosine hydroxylase and fos-oxytocin immunohistochemistry. *Endocr Regul* 2009; 43: 3–11.

156. Pirnik Z, Bundzikova J, Bizik J et al. Activity of brainstem groups of catecholaminergic cells in tumor bearing rats: response to immobilization stress. *Ann NY Acad Sci* 2008; 1148: 141–147.

Mgr. Zuzana Valášková

www.fmed.uniba.sk

e-mail: zuzana.valaskova@fmed.uniba.sk

Doručeno do redakce: 25. 3. 2009

Přijato po recenzi: 8. 7. 2009

www.eOnkologie.cz