

Joanna Domagała-Kulawik¹, Iwona Osińska²

¹Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. n. med. R. Chazan

²Katedra i Zakład Patomorfologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. n. med. B. Górnicka

Zaburzenia odpowiedzi immunologicznej w raku płuca — nowy cel terapii

Immune alterations in lung cancer — the new therapeutic approach

Praca nie była finansowana

Abstract

Lung cancer is the main cause of cancer death worldwide. An advanced stage of the disease at the time of diagnosis, observed in the majority of cases, does not allow for introduction of radical treatment or makes the treatment ineffective. Lung cancer as a solid tumour with a very low antigenicity escapes immune surveillance, and cytotoxic cells attack. Cytotoxic lymphocytes play a key role in anticancer defence, but the population of these cells individually differs. Many suppressor and regulatory mechanisms inhibit the recognition of tumour antigens by dendritic and cytotoxic cell activation. The population of regulatory T cells (T regs) plays a crucial role in this inhibition of immune response. Their function depends on the expression of transcription factor Foxp3 and the presence of CTLA-4 molecules. The increased proportion of T regs and high expression of Foxp3 and CTLA-4 on lung cancer cells and tumour infiltrating lymphocytes were observed. Other components of immune response inhibition and tumour promotion are: Th17 cell population, M2 macrophage polarisation, the presence of myeloid derived suppressor cells (MDSCs) and a significantly elevated concentration of cytokines: TGF- β and IL-10 in the tumour microenvironment. The recognition of these mechanisms may have important therapeutic implications. Several types of agents which are capable of modulating the immune response have recently been used in many clinical trials conducted in lung cancer patients, some of them showing efficacy. Lung cancer immunotherapy has two main directions: the first goal is to improve the cytotoxic effect (for example by inhibition of CTLA-4, stimulation of dendritic cell function, inhibition of lymphocyte apoptosis), and the second way is the production of anti-cancer vaccines using known cancer antigens: MAGE A3, MUC1, EGF and TGF- β . Immunotherapy in lung cancer treatment has a character of personalised therapy — there is a need to specify the patient's immune status prior to treatment. The analysis of immune cells and mediators in the peripheral blood allows this, but the more valuable method seems to be bronchoalveolar lavage (BAL) examination with careful assessment of the tumour microenvironment.

Key words: lung cancer, immunotherapy, cytotoxic lymphocytes, regulatory cells

Pneumonol. Alergol. Pol. 2014; 82: 286–299

Streszczenie

Rak płuca zajmuje pierwsze miejsce wśród przyczyn zgonów na nowotwory złośliwe. W znaczącej większości przypadków wysoki stopień zaawansowania choroby w chwili rozpoznania uniemożliwia zastosowanie leczenia przyczynowego bądź czyni to leczenie nieskutecznym. Jako nowotwór lity o małej specyficy antygenowej rak płuca wymyka się spod nadzoru immunologicznego i ataku komórek cytotoksycznych. Główną rolę w przeciw nowotworowej obronie układu odporności odgrywają limfocyty cytotoksyczne, których populacja różni się indywidualnie. Rozpoznanie antygenów nowotworowych przez komórki dendrytyczne i aktywację komórek cytotoksycznych hamuje wiele mechanizmów o działaniu supresorowym i regulatorowym. Głównymi komórkami osłabiającymi obronę immunologiczną są limfocyty T regulatorowe (Tregs). Ich funkcja zależy od ekspresji czynnika Foxp3 oraz obecności cząsteczki CTLA-4. Wykazano znaczne zwiększenie populacji Tregs,

Adres do korespondencji: prof. dr hab. n. med. Joanna Domagała-Kulawik, Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Pneumonologii i Alergologii WUM, ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa, e-mail: domagalakulawik@gmail.com

DOI: 10.5603/PiAP.2014.0034

Praca wpłynęła do Redakcji: 2.09.2013 r.

Copyright © 2014 PTChP

ISSN 0867-7077

Foxp3 i CTLA-4 w komórkach raka płuca oraz w puli limfocytów naciekających guz. Inne elementy hamujące odpowiedź immunologiczną i promujące rozwój guza to populacja limfocytów Th17, polaryzacja makrofagów w kierunku M2, obecność mieloidalnych komórek supresorowych (MDSCs), znacznie zwiększone stężenia cytokin TGF β i IL-10 w mikrośrodku guza. Rozpoznanie tych mechanizmów może mieć ważne implikacje terapeutyczne. W fazie badań klinicznych jest kilka rodzajów leków modulujących odpowiedź immunologiczną, których część wykazuje pewną skuteczność. Immunoterapia w raku płuca opiera się na wzmożeniu efektu cytotoksycznego (np. poprzez hamowanie CTLA-4, pobudzenie funkcji komórek dendrytycznych, hamowanie apoptozy limfocytów) lub produkcję szczepionek antynowotworowych z wykorzystaniem znanych antygenów, jak MAGE A3, MUC1, EGF, TGF β . Immunoterapia w raku płuca ma charakter terapii personalizowanej — przed podjęciem leczenia wskazane jest dokładne rozpoznanie stanu układu odporności pacjenta. Umożliwia to badanie krwi obwodowej, ale bardziej wartościowe wydaje się wykorzystanie w tym celu metody BAL z dokładną oceną mikrośrodowiska guza.

Słowa kluczowe: rak płuca, immunoterapia, limfocyty cytotoksyczne, komórki regulatorowe

Pneumonol. Alergol. Pol. 2014; 82: 286–299

Wstęp

Rak płuca stanowi pierwszą przyczynę zgonów na nowotwory złośliwe w Polsce i na świecie. Zachorowalność na raka płuca sięga globalnie 1 600 000 nowych przypadków rocznie [1, 2]. Jest najczęstszym typem nowotworu u mężczyzn i przyczyną aż 1/3 zgonów z powodu nowotworów [3]. W Polsce rocznie umiera z powodu tego nowotworu ponad 20 000 chorych. W populacji kobiet w Polsce w 2007 roku po raz pierwszy częstość zgonów z powodu nowotworu płuca wyprzedziła częstość zgonów związanych z rakiem piersi [4]. Podobnie w większości krajów europejskich notuje się bardzo szybki wzrost zachorowalności u kobiet [2, 5]. Zachorowalność i umieralność z powodu raka płuca są silnie skorelowane z wiekiem, znany jest związek przyczynowy występowania raka płuca z paleniem papierosów [6, 7]. Nadal podkreśla się fakt, że prawie wszystkie zgony na raka płuca są spowodowane paleniem papierosów, jakkolwiek ostatnio obserwuje się wzrost częstości zachorowań u osób nigdy niepalących. Zwrócono uwagę na różnice w charakterystyce klinicznej raka u osób niepalących: częściej występuje u kobiet w starszym wieku i charakteryzuje go głównie utkanie gruczołowe [7]. Wśród przyczyn występowania tego typu raka można upatrywać wpływ nasilonych zmian związanych ze starzeniem organizmu, w tym starzenia układu immunologicznego, które generalnie charakteryzuje osłabienie odporności [8]. W raku płuca nadal dużym problemem pozostaje zbyt późne rozpoznanie. Większość przypadków nowotworów płuca zostaje rozpoznana w zaawansowanym stadium. Całkowite wyleczenie osiąga się ogółem u około 15% chorych. Pięcioletnie przeżycie w chorobie ograniczonej sięga 50%, niestety, w raku rozsiały nie przekracza kilku procent chorych. Ponad 60% chorych nie

kwalifikuje się do leczenia przyczynowego-operacyjnego. To sprawia, że w dużym odsetku chorych guz jest niedostępny do przeprowadzenia pełnej diagnostyki histopatologicznej, ale także utrudnia to znacznie badania poznawcze.

Ze względu na różnice w biologii, charakterze utkania histologicznego, przebiegu klinicznym i sposobie leczenia wyróżnia się dwa główne typy raka płuca: niedrobnokomórkowy (NDRP) i drobnokomórkowy (DRP). Obecnie w kontekście coraz szerzej stosowanej terapii celowanej obowiązuje wyodrębnienie podtypu w obrębie NDRP: raka płaskonabłonkowego i gruczołowego [9, 10]. W ostatnich dwóch latach pojawiła się nowa, siódma, edycja klasyfikacji TNM (*tumor, nodes, metastasis*) oceny zaawansowania raka płuca [11, 12]. Leczenie radykalne w przypadku choroby zlokalizowanej w NDRP obejmuje zabieg operacyjny i/lub radioterapię, zaś w raku DRP — chemioterapię. Inne sposoby leczenia mają wartość uzupełniającą, jakkolwiek zarówno terapia celowana, jak i chemioterapia w NDRP poprawiają rokowanie. W ostatnich latach obserwuje się relatywne wydłużenie czasu przeżycia wolnego od progresji u chorych na NDRP, do czego przyczynia się między innymi precyzyjne rozpoznanie histopatologiczne i molekularne oraz indywidualny dobór sposobów terapii. Nowe metody leczenia wspomagającego w raku płuca obejmują również leczenie immunologiczne. Celem obecnego opracowania jest przedstawienie metod immunoterapii w raku płuca na podstawie poznanych dotychczas mechanizmów zaburzenia odporności w tym groźnym nowotworze.

Metody badania odpowiedzi immunologicznej w raku płuca

W analizie zaburzeń immunologicznych związanych z procesem nowotworzenia istotny wydaje się przegląd metod ich badania. Naj-

ważniejszą rolę w nadzorze immunologicznym w raku płuca (ang. *immunosurveillance*) odgrywa obronność komórkowa. W nacieku zapalnym wokół guza występują komórki zapalne, do których należą limfocyty naciekające guz, czyli limfocyty TIL (*tumor infiltrating lymphocytes*) oraz makrofagi TAM (*tumor associated macrophages*) [13, 14].

Limfocyty TIL to komórki wykazujące bezpośrednio działanie cytotoksyczne lub prowadzące do lizy guza poprzez uwalnianie cytokin [15]. Ocenę fenotypu i funkcji TIL umożliwia zastosowanie odpowiednich przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom powierzchniowym tych komórek z wykorzystaniem techniki immunocytochemii lub cytometrii przepływowej. Badania TIL oraz TAM są możliwe w guzach resekowanych. Istotna większość przypadków raka płuca w przypadku NDRP oraz generalnie wszystkie przypadki DRP nie kwalifikują się do zabiegów operacyjnych usunięcia guza, co ogranicza dostępność materiału do badania. Przegląd literatury wskazuje na możliwość wykorzystania w pewnym zakresie małych wycinków z guza pobieranych w trakcie diagnostyki, hodowli linii komórkowych raka oraz badań doświadczalnych na zwierzętach. Szeroko prowadzone badania zmian we krwi obwodowej mają istotne ograniczenie polegające na tym, że nie odzwierciedlają zmian miejscowych w mikrośrodkowisku rozwoju guza. Środowisko rozwoju nowotworu litego stanowi odrębną i specyficzną przestrzeń zmian modulujących odpowiedź komórkową i humoralną. Funkcjonalną część tego mikrośrodkowiska budują komórki nowotworowe, fibroblasty, komórki śródbłonna naczyń, makrofagi, komórki dendrytyczne, limfocyty i macierz międzykomórkowa. Liczne mediatory, jak cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostu i enzymy wydzielane są przez komórki i oddziałują wzajemnie [16]. Ponadto mikrośrodkowisko guza cechują zmienione warunki, między innymi hipoksja, które promują angiogenezę i wpływają na procesy zwane przemianą nabłonkowo-mezenchymalną (EMT, *epithelial-mesenchymal transition*) ze zwiększonym wydzielaniem metalloproteinaz. W przypadku badania środowiska rozwoju raka płuca wartą uwagi jest metoda płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL, *bronchoalveolar lavage*). Płyn z BAL (BALF, *BAL fluid*) stanowi cenny materiał, możliwy do wykorzystania do oceny odpowiedzi immunologicznej u chorych na raka niedrobnokomórkowego także w nieoperacyjnych stadiach zaawansowanych oraz w raku drobnokomórkowym. Ponadto badanie płynu z BAL pozwala na szczegółową, kompleksową ocenę szlaków komórkowych i cytokinowych biorących

udział w procesie patologicznym oraz czynników o znaczeniu regulatorowym. Jest to badanie umożliwiające pozyskanie materiału komórkowego i niekomórkowego z przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej (z powierzchni nabłonka obwodowego dróg oddechowych) [17]. Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe jest metodą stosunkowo mało inwazyjną, powtarzalną. W praktyce polega na wprowadzeniu w trakcie badania bronchofiberoskopowego około 100–250 ml płynu (sol fizjologicznej), ogrzanego do temperatury 37°C i odzyskania około 50–70% objętości podanego płynu. W wyniku „przepłukania” powierzchni pęcherzyków płucnych solą fizjologiczną otrzymuje się kilka milionów komórek o żywotności ponad 90%. Skład komórkowy od osób zdrowych niepalących jest stały: > 80% stanowią makrofagi pęcherzykowe, < 20% limfocyty, < 3% neutrofile i < 0,5% eozynofile [18]. Uzyskana zawiesina komórkowa kwalifikuje się do badania fenotypu komórek i składu cytokinowego między innymi metodą cytometrii przepływowej, która jest obecnie jedną z podstawowych technik w ocenie zaburzeń immunologicznych. Komórki pozyskane z BAL kwalifikują się do izolowania i hodowli. W licznych pracach zostało udowodnione znaczenie badania BAL w diagnostyce guzów obwodowych [19–22]. Prace własne autorów wykazały skuteczność tej metody w badaniu zaburzeń w układzie odporności w raku płuca w szerokim zakresie, zarówno badania komórek, jak i cytokin [23–27].

Odpowiedź immunologiczna w raku płuca

Reakcja cytotoksyczna

Reakcje zachodzące pomiędzy komórkami gospodarza a komórkami nowotworowymi są złożone i dynamiczne. Poznanie tych oddziaływań stanowi obecnie podstawę rozwoju nowoczesnych terapii przeciwko komórkom nowotworowym. Rak płuca należy do guzów litych o skąpej i heterogenicznej charakterystyce antygenowej. Dodatkowo odpowiedź przeciwnowotworowa jest modyfikowana przez środowisko płuc, w którym niejednokrotnie toczą się złożone procesy patologiczne wywołane czynnikami zewnętrznymi, do których w szczególności należy dym papierosowy [28].

Mechanizm nadzoru immunologicznego w raku płuca jest procesem złożonym i ulega osłabieniu w trakcie przebiegu choroby. Komórki raka są niszczone przez limfocyty, granulocyty, makrofagi, enzymy proteolityczne wydzielane przez granulocyty obojętne i kwasochłonne oraz przeciwciała produkowane

przez limfocyty B. Najważniejsze komórki układu immunologicznego odgrywające znaczącą rolę w procesie aktywnego zabijania komórek nowotworowych to cytotoksyczne limfocyty T (CTL). Komórki te, podobnie jak inne komórki efektorowe wykazują działanie przeciwnowotworowe dzięki obecności komórek prezentujących antygen (APC, *antigen presenting cells*): komórek dendrytycznych (DCs, *dendritic cells*) i makrofagów. Komórki dendrytyczne, główna populacja komórek prezentujących antygen, zajmują kluczowe miejsce w uruchamianiu reakcji cytotoksycznej przeciwnowotworowej. Po sfagocytowaniu materiału antygenowego z komórek guza DCs migrują do okolicznych węzłów chłonnych, gdzie prezentują antygen w kontekście HLA I limfocytom CD8+ i HLA II- limfocytom CD4+. Powstaje pula aktywnych komórek cytotoksycznych: limfocyty CD8+, CD4+, komórki *natural killer* (NK), limfocyty B produkujące przeciwciała przeciwnowotworowe. Komórki raka niszczone są na drodze wzbudzenia apoptozy, czyli programowanej śmierci. Mechanizm cytotoksyczności wiąże się z ziarnami cytolitycznymi (perforyny, granzyny) lub mechanizmem błonowym, receptorowym (Fas/FasL [*factor and fas ligand*], TRAIL [*TNF-related apoptosis-inducing ligand*], TNF [*tumor necrosis factor*]) [29]. Jest to odpowiedź złożona, która ulega modyfikacji w mikrośrodkowisku guza, a komórki nowotworowe wykorzystują wiele mechanizmów wymykają się z nadzoru immunologicznego, reakcja cytotoksyczna jest znacznie osłabiona. Skuteczność leczenia immunomodulującego w raku płuca jest zależna od puli komórek CTL — ich istotny niedobór może być przyczyną niepowodzenia [13]. Z jednej strony wskazana jest ocena stanu odporności pacjenta z analizą puli CTL, z drugiej bada się metody zwiększenia populacji CTL i wspomaganie ich funkcji.

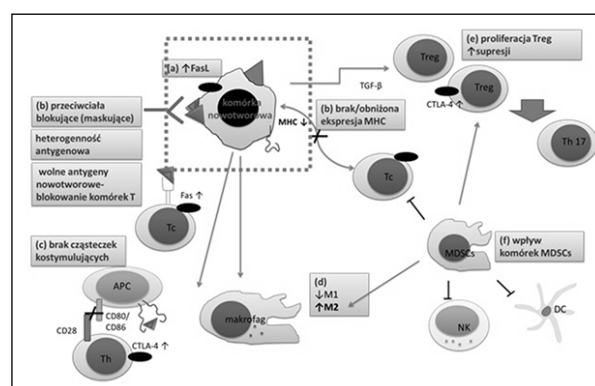
W badaniach własnych autorzy wykorzystywali materiał z BAL, wykazując dużą wartość tej metody w ocenie stanu układu odporności u chorych na raka płuca *in vivo* [23–26]. Potwierdzono udział limfocytów cytotoksycznych w obronie przeciwnowotworowej i różnice w odniesieniu do osób zdrowych. Autorzy dokonali analizy profilu komórek u pacjentów chorych na pierwotnego raka płuca i zaobserwowali zwiększony odsetek limfocytów T oraz niższy limfocytów B i komórek NK w płynie z BAL. Dodatkowo stosunek odsetka limfocytów T: Th/Tc (CD4+/CD8+) był znacząco niższy w BALF u chorych na raka płuca, co świadczy o występowaniu zmian w środowisku toczącego się guza. Wszystkie badane osoby były

palaczami. Całkowita liczba komórek w BALF u palaczy tytoniu była istotnie większa. Zaobserwowano niski odsetek komórek T pomocniczych (Th), oraz zwiększony odsetek komórek T cytotoksycznych (Tc) w BALF u palaczy chorych na raka płuca. Stosunek odsetka limfocytów Th do Tc i Th limfocytów do T były znacząco niższe w BALF u zdrowych palaczy w porównaniu do osób niepalących. Udział limfocytów T aktywowanych był mniejszy w grupie chorych na raka płuca niż u zdrowych osób palących. Wyniki tych prac wskazują na konieczność analizy historii palenia w toku oceny zmian w BALF [24].

Elementy osłabienia odpowiedzi immunologicznej

Rozwój nowotworu i rozprzestrzenianie się komórek guza w organizmie ułatwia tak zwana tolerancja immunologiczna, czyli brak reakcji na antygeny. Poniżej przedstawiono elementy wymykania się komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego (ryc. 1).

Komórki TIL to limfocyty T o dużym znaczeniu klinicznym, dzięki właściwościom infiltrującym i niszczącym komórki nowotworowe. W ich puli dominują komórki CTL migrujące bezpośrednio do guza poprzez złożone interakcje z cząstkami adhezyjnymi i pod wpływem czynników chemotaktycznych [13]. Istotnym elementem obrony nowotworu przed atakiem CTL jest wzbudzenie apoptozy tych komórek. Na komórkach raka dochodzi do wzrostu ekspresji ligandu dla białka Fas (czynnik śmierci) — FasL, przez co nabywają one zdolności do indukowania apoptozy. Z kolei obserwuje się znaczne zwiększenie podatności limfocytów na apoptozę w wyniku obecności na komórkach receptora Fas [30]. Jest to jeden z bardzo istotnych elementów wymykania się komórki



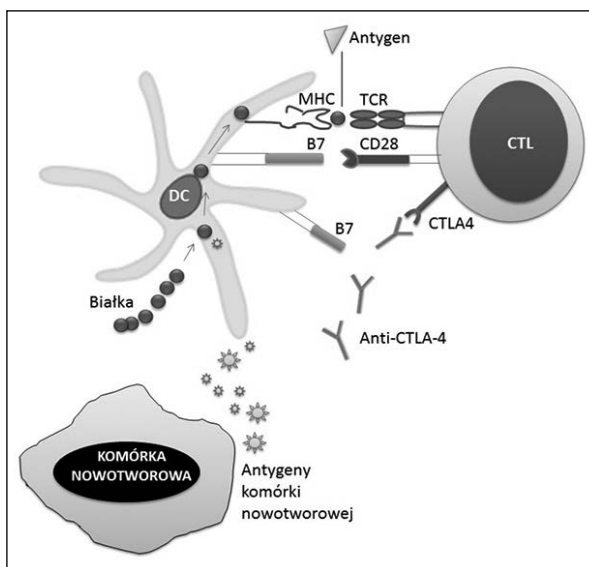
Rycina 1. Mechanizmy wymykania się komórki nowotworowej spod nadzoru układu immunologicznego

Figure 1. Mechanisms of lung cancer escape from immunosurveillance

nowotworowej spod nadzoru immunologicznego. Autorzy w badaniach własnych oceniali techniką cytometrii przepływowej ekspresję receptora Fas na limfocytach uzyskanych od pacjentów chorych na raka płuca. Odsetek limfocytów Fas dodatnich, zarówno Th jak i Tc był istotnie większy u chorych w porównaniu do osób zdrowych oraz u palaczy w porównaniu z niepalącymi [31]. W innych badaniach własnych oceniających ekspresję antygenu Fas na komórkach immunokompetentnych pochodzących z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego autorzy wykazali zwiększoną ekspresję białka Fas na komórkach od osób chorych na raka płuca w porównaniu do innych chorych i osób zdrowych [32].

Komórki raka płuca wykazują znaczną heterogenność morfologiczną i fenotypową. Różnorodność ekspresji antygenów na komórkach raka płuca i brak ich jednorodności utrudnia atak ze strony układu odpornościowego [33, 34]. Ponadto komórki guza często wykazują zmniejszoną ekspresję lub brak cząsteczek MHC, co nie pozwala na prawidłową prezentację antygenów nowotworowych limfocytom T. Innym mechanizmem powodującym „wymknięcie” się komórki nowotworowej spod nadzoru układu immunologicznego jest maskowanie antygenów na powierzchni komórki nowotworowej przez przeciwciała blokujące dostęp właściwych komórek efektorowych. Dodatkowo komórki nowotworowe są zdolne do uwalniania wolnych antygenów, które również mogą blokować właściwe komórki efektorowe [29].

Inną przyczyną upośledzenia rozpoznawania komórek nowotworowych są zaburzenia lub brak cząsteczek kostymulujących na komórkach guza oraz na komórkach prezentujących antygen w środowisku nowotworu [34]. Limfocyty T „rozpoznają” obcą tkankę guza m.in. za pomocą komórek prezentujących antygen (APC, *antigen presenting cell*) [35]. Do pełnej aktywacji limfocytów cytotoksycznych niezbędne jest przekazanie sygnału ko-stymulującego przez cząsteczki B7 (CD80, CD86) na powierzchni komórki APC z ich receptorem CD28 na powierzchni limfocytu (ryc. 2). Cząsteczki B7 mogą również przekazywać sygnał supresyjny przez oddziaływanie z cząsteczkami CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), które hamują przekaz sygnału przez receptor TCR limfocytów T [36–38]; jest on homologiczny do CD28, a przy tym ma około 40-krotnie silniejsze powinowactwo, jako cząstka kostymulująca, wypiera więc CD28. CTLA-4 obecny na komórkach regulatorowych bierze udział w ich aktywacji. Ekspresja cząsteczek CTLA-4 na komórkach limfoidalnych w środowisku nowotworów jest



Rycina 2. Oddziaływanie komórki dendrytycznej z limfocytom CTL

Figure 2. Dendritic cell interaction with lymphocyte CTL

szeroko badana i stała się podstawą opracowania nowego sposobu leczenia immunomodulującego z wykorzystaniem przeciwciał blokujących. W przypadku raka płuca wykazano, że wraz ze wzrostem liczby komórek regulatorowych wzrasta ekspresja CTLA-4, co ma związek z zaawansowaniem choroby i gorszym rokowaniem [39].

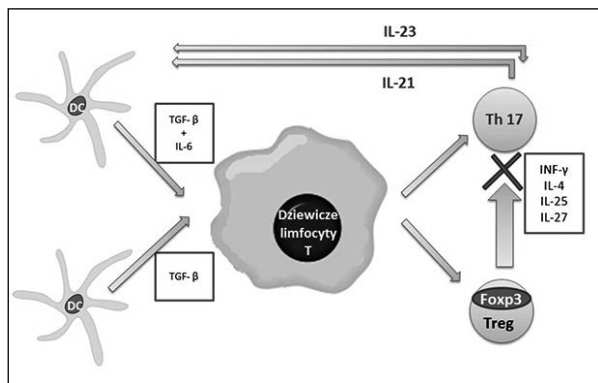
Komórki nowotworowe są silnym źródłem różnego rodzaju cytokin, chemokin oraz metabolitów, które interferują z naturalną obroną przeciwnowotworową i czynnością komórek prezentujących antygen. W środowisku guza panują warunki niedotlenienia, które stymulują komórki immunosupresyjne. Czynniki pochodzące z nowotworu, takie jak czynnik wzrostu śródbłonnki naczyń (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) czy interleukina 10 (IL-10, *interleukin 10*) wywołują wady funkcjonalne w komórkach DCs oraz upośledzają ich liczbę. Komórki DCs poprzez takie działanie tracą zdolność do aktywacji naiwnych komórek T, ale również mają zmniejszoną ruchliwość oraz mniejszą ekspresję cząsteczek MHC, cząsteczek adhezyjnych i kostymulatorów [13].

Najważniejszą rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej w nowotworach odgrywają komórki regulatorowe. Stwierdzono, że limfocyty T regulatorowe (Tregs, *regulatory T cells*) są zdolne do hamowania aktywności limfocytów T (CD4+, CD8+), komórek dendrytycznych oraz komórek NK. Odgrywają one istotną rolę w mechanizmach nadzoru i tolerancji immunologicznej. Komórki Tregs stanowią nieliczną grupę limfocytów CD4+ (2–5% limfocytów we krwi obwodowej), a iden-

tyfikowane są między innymi poprzez ekspresję na ich powierzchni odpowiednich antygenów. Subpopulacja komórek Tregs nie jest jednorodna fenotypowo [40]. Są to komórki definiowane jako CD4+/CD25+ z „wysoką” ekspresją CD25. Dodatkowo komórki Tregs wykazują obecność cząsteczek: Foxp3 (*forkhead box P3*), CD25, GITR (*glucocorticoid-induced TNF-receptor*), CD357, LAG3 (*lymphocyte-activation gene 3*), CTLA4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*) oraz niską ekspresję CD127. Wyróżnia się naturalne limfocyty regulatorowe — nTregs wywodzące się z grasicy, oraz indukowane — iTregs, różnicujące się w krążeniu, „na obwodzie” pod wpływem cytokin IL-10 i przekształcającego czynnika wzrostu — TGF- β (*transforming growth factor beta*) i po kontakcie z antygenem [40]. Do pełnej funkcji limfocytów Tregs niezbędne jest aktywne białko, czynnik transkrypcyjny — Foxp3). Aktywacja funkcjonalnych Tregs wiąże się z obecnością Foxp3 po kontakcie z antygenem. Identyfikacja komórek Tregs jest możliwa dzięki zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych przeciw Foxp3 czy to w technice immunocytochemii, czy cytometrii przepływowej. Wykazano, że zastosowanie przeciwciała przeciw Foxp3 w technice immunohistochemii pozwala ocenić ekspresję tego białka na komórkach nowotworu i jednocześnie, na limfocytach, co może mieć aspekt praktyczny w diagnostyce [41]. W chorobach autoimmunologicznych stwierdzono zmniejszenie liczby komórek regulatorowych, podczas, gdy w nowotworach ich liczba jest wydatnie zwiększona. Mikrośrodowisko nowotworowe jest bogate w cytokiny IL-10 i TGF- β , które indukują dojrzewanie Tregs i ekspresję Foxp3. Potwierdzono negatywne znaczenie rokownicze obecności komórek Tregs Foxp3 dodatnich w licznych badaniach dotyczących raka płuca [39, 41–46]. Ostatnio potwierdzono, że wykrycie ekspresji Foxp3 w okolicznych, nawet klinicznie wolnych od przerzutu, węzłach chłonnych jest negatywnym czynnikiem prognostycznym [46]. Liu i wsp. zaproponowali stosowanie wskaźnika Foxp3/CD8 jako predyktora odpowiedzi na chemioterapię [44]. Ostatnio Ju i wsp. opisali „nowy” fenotyp komórek regulatorowych o silnych właściwościach supresyjnych: CD13+/CD4+/CD25^{high} [47]. Dodatkowo wielu badaczy podkreśla istotną rolę funkcjonalną cząsteczki kostymulującej CTLA-4 na komórkach Tregs, której działaniem jest negatywna regulacja odpowiedzi immunologicznej [48, 49]. Wykazano, że u chorych na raka płuca istotnie zwiększona jest liczba krążących limfocytów CTLA-4+ z przewagą wewnątrzkomórkowej ekspresji tej cząsteczki [39, 50].

Komórki nowotworowe zdolne są do wydzielania substancji działających hamująco na układ odpornościowy. Jednym z najlepiej poznanych czynników o takim działaniu jest TGF- β , identyfikowany w zwiększonych stężeniach w guzach, w hodowlach komórek nowotworowych i w płynie z BAL od chorych na raka płuca [27, 51, 52]. Do funkcji tej cytokiny związanej z promocją progresji raka należą: hamownie czynności komórek NK i limfocytów T cytotoksycznych, różnicowanie polaryzacji limfocytów pomocniczych w kierunku Th2 oraz utrzymanie różnicowania Tregs [53]. Z kolei komórki nowotworowe są niewrażliwe na hamujące działanie TGF- β ze względu na utratę receptorów dla tej cytokiny. Inne cytokiny supresorowe o podobnej funkcji, to IL-10 oraz indukująca CTLA-4- IL-2. Interleukina 10 jest obecna w wysokich stężeniach w środowisku guza wydzielana zarówno przez jego komórki, jak i limfocyty [54]. Obie wymienione cytokiny mają silne działanie zmieniające polaryzację limfocytów z aktywujących na hamujące oraz działają supresyjnie na komórki prezentujące antygen. W najnowszych badaniach zwraca się uwagę również na inne cytokiny, które mogą mieć związek z rozwojem guza i mają zastosowanie kliniczne, między innymi badano niedawno odkryte IL-27, IL-29, IL-31 oraz IL-33. Ich rola w raku płuca nie została jednak jeszcze jednoznacznie określona [55].

Z funkcją wymienionych cytokin wiąże się kolejny element regulacji w procesie nowotworzenia, jakim jest obecność komórek Th17. W ostatnich latach odkryto możliwość konwersji komórek T regulatorowych w subpopulację limfocytów Th17 [56]. Przedstawiony przez Mosmanna i wsp. dotychczasowy podział na limfocyty Th1 i Th2 został rozszerzony o dodatkową subpopulację limfocytów, o potencjalnym znaczeniu supresorowym. Charakterystyczną cechą tych komórek jest produkcja IL-17A. Jest to populacja konkurująca w różnicowaniu z komórkami Tregs Foxp3+. Obie populacje różnicują się w odpowiedzi na TGF- β , ale są zdolne do przekształcenia się w komórki Th17 tylko w obecności IL-6 (ryc. 3). Wyniki badań u ludzi wykazały, że głównymi cytokinami odpowiedzialnymi za rozwój Th17 są interleukiny: IL-1 β i IL-23. Do pełnego różnicowania Th17 prowadzi aktywacja szlaku Stat3 z udziałem receptora IL23R [57]. Różnicowanie w kierunku komórek Th17 jest przykładem plastyczności miejscowej układu odporności: wykazano, że małe stężenia TGF- β współdziałają w różnicowaniu Th17, podczas gdy duże — w dojrzewaniu Tregs Foxp3+ [57, 58]. Ponadto, przypuszcza się, że IL-6 hamuje

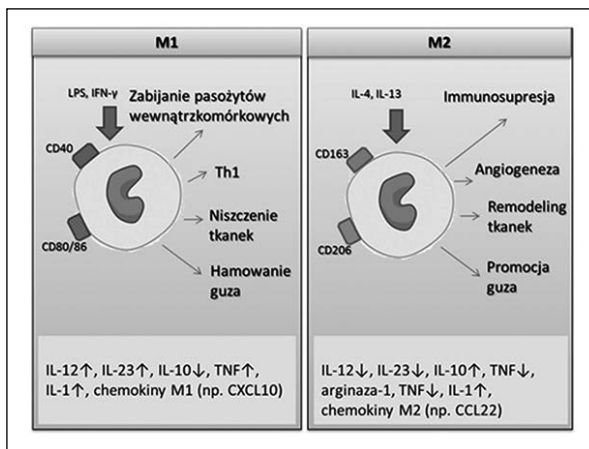


Rycina 3. Różnicowanie się komórki T regulatorowej i komórki Th17
Figure 3. The differentiation of regulatory T cells and Th17 cells

rozwój Tregs, zwiększając jednocześnie pulę Th17 zależną od TGF-β [58].

Limfocyty Th17 odgrywają ważną rolę w obronie przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej, ale cechują się słabymi właściwościami proliferacyjnymi i cytotoksycznymi. Udowodniono ich rolę w procesach autoimmunizacyjnych [59, 60]. Nie ma jednoznacznych danych na temat działania przeciwnowotworowego limfocytów Th17. Z jednej strony badania wykazują obecność tych komórek w mikrośrodku guza, z drugiej jednak nie ma jednoznacznych dowodów na ich wpływ na jego rozwój [61]. Wydaje się, że funkcja komórek Th17 i produkowanej głównie przez nich IL-17 ze względu na jej plejotropizm może wpływać hamująco lub stymulująco. Działanie pobudzające może być związane między innymi z działaniem proangiogennym cytokiny 17 [62]. Działanie przeciwnowotworowe tych komórek przedstawiono w licznych pracach, w których wykazano, że IL-17 indukuje swoistą odpowiedź przeciwnowotworową i prowadzi do zahamowania wzrostu guza [63]. Z drugiej strony aktualne badania wskazują na rolę polimorfizmu genetycznego receptora dla IL-23 w ryzyku rozwoju między innymi raka płuca [64]. Ponadto, badacze zwracają uwagę na plastyczność komórek Th17, które są zdolne do nabycia cech limfocytów Th1, co może przyczynić się na przykład do ochrony przeciwbakteryjnej, roli w rozwoju chorób autoimmunologicznych i być niezbędnym elementem dla aktywności przeciwnowotworowej komórek [57].

Makrofagi do niedawna uważane były za dość jednolitą fenotypowo grupę komórek, obecnie wyodrębnia się ich dwa podtypy M1 i M2, które różnią się funkcjonalnie, a niektórzy badacze sugerują dodatkowo istnienie populacji o charakterze regulatorowym [65, 66]. Makrofagi M1 pełnią głównie funkcje immunostymulujące, są to komór-



Rycina 4. Polaryzacja makrofagów M1 i M2

Figure 4. Polarization of M1 and M2 macrophages

ki efektorowe, produkujące znaczne ilości cytokin prozapalnych (wytwarzają IL-12), biorą udział w fagocytozie. Makrofagi określane jako M2, pełnią głównie funkcje immunosupresyjne (wytwarzają IL-10), promują angiogenezę i naprawę tkanek [67]. O kierunku polaryzacji makrofagów decyduje rodzaj czynników aktywujących ich powstawanie i dojrzewanie. Dla makrofagów M1 są to: lipopolisacharyd pochodzenia bakteryjnego (LPS, *bacterial lipopolysaccharide*) i interferon gamma (IFN-γ, *interferon gamma*). Natomiast cytokinami związanymi z polaryzacją makrofagów typu drugiego są: IL-4, IL-10, IL-13 i TGFβ [68]. Na rycinie 4 przedstawiono różnicowanie się makrofagów.

W środowisku toczącego się nowotworu dochodzi do osłabienia liczby i funkcji makrofagów M1, które są zdolne do aktywacji komórek układu odpornościowego, zaś w znacznej przewadze występują makrofagi M2. Te ostatnie tworzą liczną pulę tak zwanych: makrofagów towarzyszących guzowi (TAM, *tumor-associated macrophages*). Obecność makrofagów M2 wiąże się z występowaniem swoistej „edukacji” nowotworowej i rekrutacji typowych makrofagów TAM, które mogą stanowić 50% masy guza [69, 70]. W interakcji z komórkami nowotworowymi TAM prowadzą do rozwoju naczyń, sprzyjają wzrostowi guza, wykazują zdolność do ekspresji cytokin, chemokin i proteaz, które promują rozwój guza, proliferację i rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych. W ocenie zaburzeń immunologicznych w środowisku guza istotne wydaje się uwzględnienie plastyczności makrofagów [53]. W przypadku raka płuca wykazano, że przewaga makrofagów M1 w środowisku guza ma pozytywne znaczenie rokownicze [71]. Przewaga populacji M2 zwią-

zana jest ze zwiększoną produkcją cytokin supresyjnych, jak IL-10 i TGF β oraz arginazy [72]. Wykazano związek populacji M2 z komórkami regulatorowymi oraz interleukiną IL-17 o właściwościach regulujących odpowiedź immunologiczną [73]. Badanie populacji TAM jest możliwe w guzach resekowanych, w przypadkach guzów zaawansowanych makrofagi mogą być pozyskiwane metodą BAL: w płynie z BAL stanowią one dominującą populację komórkową. Stosując tę metodę wykazano w badaniach własnych istotne upośledzenie funkcji makrofagów w raku płuca w odpowiedzi na INF- γ) [74].

Ostatnio dowiedziono, że istotną rolę w procesie nowotworzenia odgrywają komórki MDSCs (*myeloid derived suppressor cells*) będące heterogenną grupą niedojrzałych komórek szpikowych, prekursorem makrofagów, granulocytów oraz komórek dendrytycznych. Ich rekrutacja ze szpiku dokonuje się w procesach patologicznych [75]. Dojrzewanie komórek MDSCs jest aktywowane przez sieć cytokin wydzielaną w mikrośrodku guza. Komórki te są zdolne do regulacji odpowiedzi immunologicznej. Mogą bezpośrednio lub pośrednio wpływać na funkcję limfocytów T poprzez wytwarzanie tlenku azotu (NO, *nitric oxide*), wolnych rodników tlenowych (ROS, *reactive oxygen species*) — modulacja bezpośrednia oraz TGF- β i PGE2, aktywność cyklooksygenazy 2 (COX-2) oraz obniżenie dostępności cysteiny-modulacja pośrednia [76]. Tlenek azotu, arginina i cysteina są niezbędne do prawidłowej aktywacji i funkcji cytotoksycznych komórek T oraz komórek pamięci. Poprzez konkurencyjne zużywanie substratów MDSCs hamują aktywację limfocytów T, różnicowanie DCs i promują rozwój komórek Tregs. Komórki MDSCs charakteryzuje ekspresja CD11b, GR1, F4/80, CD80, IL-4R, Arg-1, iNOS, ROS, IL-10, TGF β i aktywność STAT3 [77].

W raku płuca fenotyp MDSCs określony został jako: CD11+ /CD14-/CD15+/CD33+ [76]. Modulacja funkcji komórek NK oraz zdolność do indukcji limfocytów Tregs przez komórki MDSCs stała się punktem zainteresowania badaczy. Guzy lite zawierają w swoim mikrośrodku znaczącą liczbę komórek MDSCs, które promują wzrost nowotworu przez hamowanie układu odpornościowego, wpływając na komórki Tregs za pośrednictwem IL-10 i TGF- β i indukując ich działanie, na komórki NK, tłumiąc ich działanie poprzez produkcję INF- γ oraz na dojrzewanie makrofagów związanych z nowotworem typu M2. Funkcja MDSCs wiąże się z EMT, co podkreśla znaczenie środowiska nowotworowego w modyfikacji odpowiedzi gospodarza [75].

Implikacje terapeutyczne — metody immunoterapii w raku płuca

Poznane mechanizmy obrony przeciwnowotworowej stały się podstawą nowego sposobu leczenia nowotworów złośliwych, jaką jest immunoterapia. Jak wynika z przedstawionych powyżej złożonych mechanizmów zaburzeń immunologicznych w przebiegu rozwoju nowotworu, celem immunoterapii jest uaktywnienie jednych lub wyhamowanie innych szlaków odpowiedzi układu odpornościowego. Historycznie, pierwsze próby immunoterapii nowotworów polegały na wykorzystaniu mechanizmu działania szczepionek [78]. Rak płuca należy do nowotworów litych o szybko zwiększającej się masie guza i małej antygenowości, co powoduje, że nie jest dobrym modelem badania tego typu immunoterapii. Wobec małej skuteczności i ograniczeń leczenia przyczynowego konieczność poszukiwania nowych sposobów terapii zaowocowała jednak w ostatnich latach wprowadzeniem do badań klinicznych nowych leków o działaniu immunomodulującym (tab. 1). Niniejszy przegląd ilustruje, jak szeroki jest zakres upośledzenia odpowiedzi immunologicznej w raku płuca. Na tej podstawie łatwiej zrozumieć, w których punktach można wzmocnić mechanizmy obronne, a w których osłabić immunosupresję.

Historycznie immunoterapię nowotworów dzieli się na bierną i czynną oraz swoistą i nieswoistą [79]. Pojęcia te, jako dość powszechnie stosowane, wymagają objaśnienia. Immunoterapia bierna polega na podawaniu czynników, które pobudzają własny układ odporności, na przykład cytokin, której sztandarowym przykładem jest IL-2 o działaniu ogólnoustrojowym. Jest to jednocześnie przykład immunoterapii nieswoistej. Swoiste pobudzenie układu odporności w sposób bierny polega na podaniu TIL po ich namnożeniu lub przeciwciał przeciwko receptorom na komórkach guza, na przykład w przypadku raka płuca: przeciw CD22 [80, 81]. Czynna immunoterapia polega na stymulacji układu antygenami, które nie występują w organizmie, na przykład szczepionką BCG, co jest przykładem działania na drodze nieswoistej. Swoiste czynne pobudzenie polega na podaniu antygenów danego nowotworu i stymulacji komórek APC. Przykładem są szczepionki, na przykład preinkubowane z antygenami raka komórki DC [82].

Przegląd aktualnego piśmiennictwa wskazuje, że w przypadku raka płuca znaczenie mają dwa kierunki immunoterapii: stosowanie immunomodulatorów i aktywacja układu odporności oraz produkcja szczepionek [83, 84]. W zakre-

Tabela 1. Przykłady leków o działaniu immunomodulującym będących w fazie badań klinicznych w raku płuca

Table 1. Examples of immunomodulating therapies in ongoing clinical trials

	Punkt odniesienia	Mechanizm działania	Przykład
Immunomodulatory	CD25	Przeciwciało	Daclizumab Basiliximab
	CTLA-4	Przeciwciało	Ipilimumab
	GITR	Przeciwciało	DTA-1
	COX-2	Inhibitor	Celecoxib
	PD-L1	Przeciwciało	MDX-1106
	DCs	Rekombinowana laktoferyna	Talactoferrin
Szczepionki	MAGE-A3	Szczepionka liposomalna	MAGE-A3, badanie "MAGRIT"
	MUC1	Rekombinowany wektor wirusowy Szczepionka liposomalna	Stimuvax, TG4010(MUC1+IL2) BLP25
	TGFβ	Wprowadzenie „falszywej” informacji genetycznej do linii komórek raka	Belagenpumatucel-L (Lucanix)
	GM-CSF		GVAX
	GVAX i Lucanix		TAG
	EGFR	Rekombinowany EGF	CIMAvax

Zastosowane skróty objaśniono w tekście

się pierwszych możliwości należy wymienić przeciwciała blokujące CTLA-4. Przeciwciało anti-CTLA-4 blokuje tę cząsteczkę przez co włącza aktywację limfocytów Th i Tc przez kontakt z CD80/86 na komórkach dendrytycznych. Pierwsze skuteczne próby stosowania tej formy terapii opisano w przypadku czerniaka [85]. Dwa preparaty o zbliżonych właściwościach są obecnie w fazie badań klinicznych: ipilimumab i tremelimumab. Wykazano pewną skuteczność ipilimumabu w IV stopniu zaawansowania raka płuca odnośnie do czasu wolnego od progresji [13]. Podobnie w okresie badań są przeciwciała blokujące receptor i ligand programowanej śmierci (PD-1, PD-L1), których celem jest usprawnienie funkcji limfocytów cytotoksycznych. PD-1 występuje na limfocytach cytotoksycznych, ligand dla PD-1- PD-L1 występuje w nadmiarze na komórkach guza. Interakcja PD-1 z PD-L1 ma silną funkcję immunosupresyjną poprzez hamowanie wydzielania cytokin oraz supresję aktywności cytolitycznej limfocytów [86, 87]. W badaniach klinicznych wykazano skuteczność humanizowanych przeciwciał monoklonalnych, który funkcja polega na hamowaniu połączenia receptora PD-1 z ligandem. Na sprawność komórek dendrytycznych wpływa laktoferyna i jedną z nowoczesnych metod immunoterapii jest aktywacja tego białka. Pewne nadzieje daje możliwość zmniejszenia populacji Tregs poprzez:

— stosowanie chemioterapii,

- supresję ich funkcji przez przeciwciała blokujące receptory komórek: anti-CTLA-4, anti-GITR czy modulacja *Toll-like* receptorów (TLR),
- hamowanie napływu do guza przez blokowanie chemokin,
- wyczerpanie funkcji Tregs poprzez modulację IL-6, TGF-β czy PGE2 [13].

Nowe znaczenie w kontekście wspomaganie efektu immunoterapii przypisuje się chemioterapii. Pomimo oczywistych przesłanek, że cytostatyki zabijają cenne aktywne komórki układu odpornościowego, wyniki wielu badań wykazały, że zastosowanie chemioterapii równoległe z immunoterapią jest korzystne [79]. Może to wynikać z faktu, że komórki regulatorowe stanowią większą, bardziej aktywną i szybko mnożącą się pulę w sprzyjającym środowisku guza. Są one bardziej plastyczne niż komórki cytotoksyczne. Chemioterapia stosowana przed podaniem TIL niszczy skutecznie komórki supresorowe, Tregs [79]. Stwierdzono, że małe dawki cyklofosfamid modyfikują Tregs przez zmniejszenie ekspresji funkcjonalnego Foxp3. Gemcytabina z kolei wzmacnia apoptozę komórek nowotworu przez co przyczynia się do odsłonięcia i prezentacji krzyżowej antygenów nowotworowych komórkom cytotoksycznym. Inny mechanizm polega na uczulaniu komórek raka na swoiste limfocyty cytotoksyczne, na przykład dla antygeny rakowo-płodowego [79]. Celowana radioterapia

może również indukować antygenowość komórek raka. Ponadto zwiększa wydzielanie cytokin prozapalnych, pobudza migrację DCs do węzłów chłonnych i nasila ekspresję receptorów apoptozy na komórkach nowotworowych [88]. Powyższe obserwacje dały podstawę opracowania schematów łączących klasyczne terapie przeciwnowotworowe z lekiem immunomodulującym.

Szczepionki przeciwnowotworowe w raku płuca

Jak wspomniano, rak płuca jest guzem litym, szybko zwiększającym masę, a jego komórki charakteryzuje mała i heterogenna antygenowość. Niemniej jednak w ostatnich latach opracowano kilka szczepionek wykorzystując poznane antygeny prezentowane przez komórki raka płuca.

Antygen MAGE-A3 (*melanoma associated antigen*) jest obecny na komórkach raka płuca i rozpoznawany przez komórki cytotoksyczne co dało szansę na produkcję szczepionki. Rola tego antygeny nie jest znana w raku płuca, ale stwierdzono, że we wczesnych fazach karcinogenezy dochodzi do aktywacji genu *MAGE*, który wykrywany jest w 35–50% NDRP, a dodatkowo guzy MAGE+ charakteryzują się złym rokowaniem [89]. Antygen MAGE-A3 występuje najczęściej w raku ściśle związanym z paleniem papierosów, czyli w typie płaskonabłonkowym [83]; nie jest prezentowany na zdrowych komórkach. Przed zastosowaniem tego typu szczepionki trzeba więc precyzyjnie rozpoznać histopatologicznie oraz potwierdzić ekspresję tego antygeny na komórkach guza. Wykazano również, że powodzenie leczenia jest związane z obecnością allelu HLA-A1 (stwierdzany u ok. 20% chorych). Wobec tak zdefiniowanego antygeny opracowano szczepionki liposomalne, które obecnie są w okresie badań klinicznych.

Proteina antygenowa MUC1 to glikoproteina obecna powszechnie na komórkach nowotworowych guzów nabłonkowych, szczególnie gruczołowych. Podobnie do MAGE, obecność MUC1 na komórkach raka implikuje gorsze rokowanie. Domena zewnętrzna MUC1 jest silnie immunogenna, ponadto wykazano jej działanie proangiogenne, zwiększa migrację komórek guza, nasila jego oporność na apoptozę [90]. Glikoproteina ta hamuje proliferację komórek T, co jest odwracalne przez IL-2. Wyprodukowane szczepionki mają na celu odwrócenie niekorzystnej funkcji MUC1. Znana jest lizosomalna szczepionka Stimuvax, która pobudza prezentację antygeny i proliferację limfocytów cytotoksycznych oraz limfocytów B produkujących przeciwciała anty MUC1 oraz TG4010 skonfigurowana z IL-2, produkowana

z wykorzystaniem wektora wirusowego [84]. Stwierdzono, że znaczenie dla skuteczności leczenia i zmniejszenia nasilenia objawów niepożądanych ma ocena wyjściowej liczby komórek NK (CD16+/CD56+/CD69+) [84].

Naskórkowy czynnik wzrostu (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) jest powszechnie obecny na komórkach raka płuca [91], co stało się podstawą opracowania szczepionki CIMAvax obecnie w fazie badań klinicznych, a w kilku krajach Ameryki Południowej zaaprobowanej do leczenia w drugiej linii [84, 89].

Szczepionki typu *whole tumor cells* wykorzystują wszystkie komórki guza, nie tylko te, które wykazują ekspresję danego antygeny [92]. Istota polega na modyfikacji genetycznej komórek i zwiększeniu ich immunogenności z wykorzystaniem mediatorów powszechnie obecnych w środowisku guza. Takim mediatorem o wielokierunkowym działaniu promującym rozwój raka płuca jest TGF- β . Do produkcji szczepionki Belagenpumatucel-L (Lucanix) wykorzystano TGF- β 2. Lek jest syntetyzowany po inkorporacji plazmidu nonsensownego do czterech linii komórkowych allogenicznych komórek raka [83, 92]. Po zastosowaniu szczepionki stwierdza się zwiększenie immunogenności komórek raka i pobudzenie efektu cytotoksycznego oraz osłabienie źródła TGF β . GVAX, to rodzaj szczepionki, w której wykorzystywany jest adenowirus do produkcji GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), czego celem jest aktywacja immunologiczna. TAG to połączenie szczepionek Lucabix i GVAX o wzmocnionej aktywności przeciwrakowej bez zwiększenia toksyczności pomimo połączenia dwóch składników [84, 92]. Do około 30% guzów wykazuje bardzo niekorzystną cechę molekularną, jaką jest mutacja *Kras*. Zmutowany gen *Kras* koduje białko, które wykorzystano jako antygen do produkcji szczepionki, obecnie zwanej GI-4000 indukującej odpowiedź komórek cytotoksycznych CD8+.

W „produkcji” szczepionek i w licznie prowadzonych badaniach wykorzystywane są powszechnie komórki dendrytyczne (DCs). U chorych na raka płuca DCs są niedojrzałe, mają upośledzoną funkcję prezentacji antygeny, co jest dodatkowo nasilone przez cytokiny hamujące upośledzające dojrzewanie tych komórek [92]. Niedojrzałe DCs ułatwiają migrację komórek raka, inwazję oraz EMT. Dojrzewanie komórek dendrytycznych można pobudzić po stymulacji antygenami nowotworowymi, między innymi w węzłach chłonnych. Przykładem jest opisany przypadek skutecznego leczenia wyprodukowa-

na własną szczepionką DCs przez zespół Wojas i wsp. W badaniu niedojrzałe DCs z krwi poddano stymulacji antygenami nowotworowymi, między innymi MAGE A3 i MUC-1, a następnie podawano choremu, jednocześnie monitorując w szerokim zakresie stan układu immunologicznego [82]. Dojrzewanie DCs można pobudzić w sposób niespecyficzny, trwają badania rekombinowanej laktoferyny jako leku stymulującego [83].

Nowe badania obejmują również próby hamowania funkcji MDSCs. Leki chemiczne zmniejszają ich populację, podobnie, jak liczbę komórek Tregs (5-fluorouracyl, gemcytabina). Ponadto trwają badania próby konwersji funkcji MDSCs w kierunku funkcjonalnych APC przez środki częściowo dopuszczone do leczenia, jak IL-10, kurkumin, witamina D3, inhibitory ROS [13].

Podstawą do opracowania nowych szczepionek może być rozpoznanie zmian immunogenności raka poprzez śledzenie spontanicznych mutacji zachodzących w trakcie wzrostu guza. Podobne znaczenie w indywidualnym projektowaniu szczepionek może mieć ocena profilu molekularnego stosowanego obecnie w planowaniu terapii celowanej. Wykazano, że mutacje KRAS, HER2, ALK wzmagają immunogenność i pobudzają odpowiedź komórkową i humoralną. Te właściwości są wykorzystywane w opracowaniu nowej generacji przeciwciał, na przykład w nowym leku anty-EGFR [88].

Omówione próby leczenia immunomodulującego dotyczą NDRP. W DRP podstawowym skutecznym sposobem leczenia pozostaje chemioterapia. Próby leczenia przeciwiangiogennego (bevacizumab) wykazały skuteczność u pacjentów z chorobą rozsianą odnośnie czasu wolnego od progresji i całkowitego przeżycia (bevacizumab dodany do chemioterapii). Dostępne są pojedyncze doniesienia o próbach stosowania przeciwciała anty-CTLA-4 lub szczepionek przeciw p53 oraz o nieskuteczności szczepionki BCG [78, 84]. Wyniki immunoterapii są mało obiecujące. Wydaje się, że lepszej odpowiedzi można się spodziewać u chorych z zespołem miastenicznym Lamberta-Eatona. W badaniach skuteczności stosowania interferonów wykazano, że INF- α może być korzystny w przypadku choroby ograniczonej (LD, *limited disease*), zaś dla INF- γ nie wykazano korzyści z monoterapii [93, 94].

Próby kliniczne z zastosowaniem leków immunomodulujących

Większość badań klinicznych leków wspomagających obronę immunologiczną dotyczy

NDRP w nieoperacyjnych stadiach zaawansowania III/IV, w części są to programy złożone z towarzyszącą chemioterapią. Dostępne są wyniki wskazujące na skuteczność tego typu terapii odnośnie do czasu wolnego od progresji raka (PFS, *progression-free survival*), częstości odpowiedzi (RR, *response rate*), median przeżycia (MS, *median survival*). Wiele prac dotyczy programów badania przeciwciała przeciw CTLA-4, w przypadku raka płuca jest to ipilimumab. Lek wykazał pewną skuteczność podawany w połączeniu z chemioterapią w dawce 10 mg/kg jedynie w NDRP. W badaniu 204 chorych wykazano skuteczność leku z paclitaxelem i karboplatiną w porównaniu z samą chemioterapią odnośnie do PFS (5,7 wobec 4,6 miesiąca). Uzyskane wyniki pozwoliły na podjęcie 3 fazy badania. Objawy uboczne zgłaszane w toku terapii ipilimumabem to świąd, zaczerwienienie skóry, biegunki. Znacznie mniejszą toksyczność wykazują przeciwciała blokujące interakcję PD-1 – PD-L1 badane w kilku próbach klinicznych: jako nivolumab, anty-PD-1 i anty PD-L1 (BMS-936559). Badania prowadzone u chorych w IV stopniu zaawansowania po pierwszej linii chemioterapii wykazały dotychczas RR na poziomie kilku do 30% w zależności od dawki i typu histologicznego z korzyścią dla typu płaskonabłonkowego. W badaniach szczepionek daje się zauważyć zindywidualizowanie terapii. I tak, szczepionka wykorzystująca antygen MAGE-A3 wykazuje istotną skuteczność u chorych z ekspresją genu *MAGE* (43% redukcja nawrotów), co otwiera możliwość badania 3 fazy już u chorych po resekcji guza, a więc we wcześniejszych stadiach niż inne leki immunomodulujące. Planuje się badanie 2270 chorych po potwierdzeniu, że rak jest MAGE+ badany metodą biologii molekularnej w badaniu MERGIT. Szczepionka liposomolana BLP25 (badanie START, INSPIRE) dotychczas okazała się skuteczna jedynie u chorych z wyjściowo odpowiednio liczną populacją komórek NK aktywowanych (CD16/CD56/CD69 dodatnich). U tych chorych MS wyniosła 18 wobec 11,3 miesiąca dla chorych pozbawionych tej populacji limfocytów. Belagenpumatucel-L (Lucanix) to szczepionka z wykorzystaniem antysensownego genu TGF- β 2 transfekowanego do komórek raka. W badaniu II fazy u 75 chorych uzyskano MS 32,5 miesiąca u chorych, u których osiągnięto odpowiedź immunologiczną w stosunku do 11,6 miesiąca wśród chorych bez odpowiedzi. Badanie o akronimie STOP zakłada ocenę skuteczności tej szczepionki u 506 chorych. Immunogenność EGF znalazła zastosowanie w wytworzeniu szczepionki CIMAvax EGF. W przypadku badania tej

szczepionki wyniki co do mediany przeżycia były korzystne jedynie u chorych, u których była dobra odpowiedź na leczenie: 11,7 w stosunku do 3,6 miesiąca bez odpowiedzi. Powyższy orientacyjny przegląd prowadzonych prób klinicznych wskazuje na wyraźnie indywidualną skuteczność leków immunomodulujących [13, 83, 84, 88].

Podsumowanie

Prowadzone w ostatnich latach liczne badania zaowocowały poznaniem roli mechanizmów odporności komórkowej i humoralnej w obronie przeciwnowotworowej w raku płuca z kluczową rolą komórek cytotoksycznych. Jednocześnie jednak wykazano, że wraz z rozwojem guza dochodzi do przewagi mechanizmów hamowania odpowiedzi immunologicznej. Istotnemu osłabieniu ulega funkcja prezentacji antygenów, z dominującą rolą cząsteczki CTLA-4. Podobną funkcję immunosupresyjną odgrywa interakcja PD-1-PD-L1 pomiędzy limfocytami a komórką raka. W obu przypadkach opracowano metodę blokowania efektu supresyjnego poprzez wykorzystanie przeciwciał monoklonalnych, które w badaniach klinicznych wykazują pewną skuteczność u chorych na NDRP. Inny kierunek immunoterapii wiąże się z ograniczeniem funkcji Tregs, komórek wzmagających tolerancję immunologiczną. Celem nowych sposobów terapii, między innymi szczepionek, jest TGF- β , cytokina o udowodnionym silnym, wielokierunkowym działaniu promującym rozwój raka. W produkcji szczepionek w przypadku raka płuca wykorzystywane są dwa antygeny najpowszechniej występujące na komórkach nowotworowych: MAGE-A3 i MUC-1 oraz komórki dendrytyczne. Możliwość stymulacji funkcji tych ostatnich komórek jest przedmiotem badań z zastosowaniem rekombinowanej laktoferyny. Nowe schematy leczenia raka płuca obejmują połączenie leczenia immunomodulującego z wybranymi chemioterapeutykami, które okazały się skuteczne w niszczeniu puli komórek regulatorowych lub w uwrażliwianiu komórek raka na atak CTL w wyniku „odsłonięcia” antygenów. Skuteczne jest łączenie immunoterapii z radioterapią, między innymi dzięki mechanizmowi odsłaniania antygenów nowotworowych i uwrażliwianiu na apoptozę. Kolejnym przykładem skojarzenia sposobów leczenia raka płuca jest wykorzystanie oceny molekularnej (*gene signature*), będącej podstawą terapii celowanej i rozpoznanie immunogenności onkoantygenów z rodziny HER, ALK czy KRAS. Wydaje się, że przez analogię ze wskazaniami do terapii celowanej, przed rozpoczęciem leczenia

immunomodulującego powinien być znany stan układu odporności chorego stanowiący wskazanie do doboru terapii. Jak wykazują wyniki badań, jest on indywidualnie zaburzony. Wykorzystując zdefiniowane zaburzenia immunologiczne w raku płuca, można pokusić się o opracowanie zastawu do badania podstawowych parametrów z wykorzystaniem nowoczesnych technik, na przykład cytometrii przepływowej. Biorąc pod uwagę przesłanki teoretyczne wydaje się, że „zestaw” przeciwciał mógłby obejmować co najmniej przeciwciała przeciw: CD4, CD8, CD25, Foxp3, CTLA-4, TGF β . Optymalne byłoby, aby materiał do badania pochodził ze środowiska guza, co jest możliwe w przypadku komórek TIL, płynu z BAL lub biopsji węzłów śródpiersia pobieranych drogą biopsji aspiracyjnej transbronchialnej pod kontrolą ultrasonografii wewnątrzbronchialnej (EBUS/TBNA). Niezbędnym uzupełnieniem charakterystyki guza będzie w przyszłości jego mapa molekularna z oceną dynamiki zmian. W świetle aktualnych danych trzeba bowiem podkreślić, że podobnie, jak terapia celowana, immunoterapia jest rodzajem terapii zindywidualizowanej, dotychczasowe wyniki wskazują na odpowiedź średnio u 20–30% chorych przy znacznej niekiedy toksyczności. Na przykład populacja komórek cytotoksycznych może być u części chorych na tyle zredukowana, że w pewnym sensie brakuje celu do modyfikacji. Niezbędna jest więc ocena potencjalnych korzyści przed podjęciem leczenia, co może stanowić kierunek przyszłych badań. Wyzwaniem dla badaczy będzie prawdopodobnie rak gruczołowy, który występuje z rosnącą częstością i, jak wykazały badania, jest jednostką bardzo heterogenną pod względem histopatologicznym oraz molekularnym. Wobec pewnej skuteczności ograniczenia rozprzestrzenienia nałogu palenia papierosów prawdopodobnie ulegnie zmianie profil biologiczny raka płuca, a także środowisko rozwoju tego nowotworu, co może mieć wpływ na wyłonienie się nowych mechanizmów własnej obrony przeciwnowotworowej, wymagających kolejnych badań.

Konflikt interesów

Autorka deklaruje brak konfliktu interesów.

Piśmiennictwo:

1. Alberg A.J., Brock M.V., Ford J.G., Samet J.M., Spivack S.D. Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013; 143: 1–29.
2. Dela Cruz C.S., Tanoue L.T., Matthay R.A. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin. Chest Med.* 2011; 32(4): 605–644.

3. Didkowska J. Epidemiologia nowotworów złośliwych w Polsce. W: Meder J. (red.). Podstawy onkologii klinicznej. CMKP, Warszawa 2011; 5–17.
4. Didkowska J., Wojciechowska U., Zatoński W. Trendy umieralności na nowotwory złośliwe. Polska na tle Europy. W: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2007. Centrum Onkologii – Instytut M. Skłodowskiej-Curie, KRN, Warszawa 2009; 35–42.
5. Tyczynski J.E., Bray F., Aareleid T. i wsp. Lung cancer mortality patterns in selected Central, Eastern and Southern European countries. *Int. J. Cancer.* 2004; 109: 598–610.
6. Doll R., Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* 1981; 66: 1191–1308.
7. Ning L., Bin Q., Kang S. i wsp. Smoking Cause Specific Lung Cancer-Evidence from Non-Smoking Lung Adenocarcinoma. *J. Cancer Therapy.* 2012; 3: 435–441.
8. Franceschi C., Bonafe M., Valensin S. i wsp. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2000; 908: 244–254.
9. Langfort R., Szolkowska M., Szczepulska-Wojcik E., Maksymiuk B. Small biopsies and cytologic specimens management in microscopic diagnosis and subtyping of non-small cell lung cancer, as recommended by IASLC/ATS/ERS. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2012; 80: 172–177.
10. Travis W.D., Brambilla E., Riely G.J. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31: 992–1001.
11. Wrona A., Jassem J. The new TNM classification in lung cancer. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2010; 78: 407–417.
12. Detterbeck F.C., Postmus P.E., Tanoue L.T. The Stage Classification of Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2013; 143: 191–210.
13. Aerts J.G., Hegmans J.P. Tumor-specific cytotoxic T cells are crucial for efficacy of immunomodulatory antibodies in patients with lung cancer. *Cancer Res* 2013; 73: 2381–2388.
14. Katakai A., Scheid P., Piet M. i wsp. Tumor infiltrating lymphocytes and macrophages have a potential dual role in lung cancer by supporting both host-defense and tumor progression. *J. Lab. Clin. Med.* 2002; 140: 320–328.
15. Topalian S.L., Rosenberg S.A. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) Evidence for spycytic immune reactions against growing cancers in mice and humans. *Lippincott, Philadelphia* 1990; 19.
16. Witz I.P. Tumor-microenvironment interactions: the selectin-selectin ligand axis in tumor-endothelium cross talk. *Cancer. Treat. Res.* 2006; 130: 125–140.
17. Reynolds H.Y. Use of bronchoalveolar lavage in humans — past necessity and future imperative. *Lung* 2000; 5: 271–293.
18. Chcialowski A., Chorostowska-Wynimko J., Fal A., Pawłowicz R., Domagała-Kulawik J. Recommendation of the Polish Respiratory Society for bronchoalveolar lavage (BAL) sampling, processing and analysis methods. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2011; 79: 75–89.
19. de Gracia J., Bravo C., Miravittles M. i wsp. Diagnostic value of bronchoalveolar lavage in peripheral lung cancer. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993; 147: 649–652.
20. Linder J., Radio S.J., Robbins R.A., Ghafouri M., Rennard S.I. Bronchoalveolar lavage in the cytologic diagnosis of carcinoma of the lung. *Acta Cytol.* 1987; 31: 796–801.
21. Pirozynski M. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of peripheral, primary lung cancer. *Chest.* 1992; 102: 372–374.
22. Rennard S.J. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of cancer. *Lung.* 1990; 168: 1035–1040.
23. Domagała-Kulawik J., Hoser G., Droszcz P., Kawiak J., Droszcz W., Chazan R. T-cell subtypes in bronchoalveolar lavage fluid and in peripheral blood from patients with primary lung cancer. *Diagn. Cytopathol.* 2001; 25: 208–213.
24. Hoser G., Domagała-Kulawik J., Droszcz P., Droszcz W., Kawiak J. Lymphocyte subsets differences in smokers and nonsmokers with primary lung cancer: a flow cytometry analysis of bronchoalveolar lavage fluid cells. *Med. Sci. Monitor.* 2003; 9: 310–315.
25. Domagała-Kulawik J., Guzman J., Costabel U. Immune cells in bronchoalveolar lavage in peripheral lung cancer — analysis of 140 cases. *Respiration* 2003; 70: 43–48.
26. Hoser G., Kawiak J., Domagała-Kulawik J., Kopiński P., Droszcz W. Flow cytometric evaluation of lymphocyte subpopulations in BALF of healthy smokers and nonsmokers. *Folia Histochem. Cytobiol.* 1999; 37: 25–30.
27. Domagała-Kulawik J., Hoser G., Safianowska A., Grubek-Jaworska H., Chazan R. Elevated TGF-beta1 concentration in bronchoalveolar lavage fluid from patients with primary lung cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2006; 54: 143–147.
28. Domagała-Kulawik J. The Nature of Immunological Reaction in the Peripheral Airways of Cigarette Smokers. *Curr. Respir. Med. Rev.* 2007; 3: 117–127.
29. Lasek W., Malejczyk J. Mechanizmy cytotoksyczności limfocytów. W: Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W., Stokłosa T. (red.). *Immunologia.* PWN, Warszawa 2007; 241–249.
30. Jakóbsiak M. Immunologia nowotworów. W: Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W., Stokłosa T. (red.). *Immunologia.* PWN, Warszawa 2007; 253–254.
31. Hoser G., Wasilewska D., Domagała-Kulawik J. Expression of Fas receptor on peripheral blood lymphocytes from patients with non-small cell lung cancer. *Folia. Histochem. Cytobiol.* 2004; 42: 249–252.
32. Domagała-Kulawik J., Droszcz P., Kraszewska I., Chazan R. Expression of Fas antigen in the cells from bronchoalveolar lavage fluid (BALF). *Folia. Histochem. Cytobiol.* 2000; 38: 185–188.
33. Fargion S., Carney D., Mulshine J. i wsp. Heterogeneity of cell surface antigen expression of human small cell lung cancer detected by monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 1986; 46: 2633–2638.
34. Bright R.K. Immunology of lung cancer. W: Pass H.I. Mitchell I.B., Johnson D.H., Turisi A.T., Minna J.D. *Lung Cancer.* W&W; 2000; 304–318.
35. Vermaelen K., Pauwels R. Pulmonary dendritic cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005; 172: 530–551.
36. Egen J.G., Kuhns M.S., Allison J.P. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat. Immunol.* 2002; 3: 611–618.
37. Jakóbsiak M. Regulacja odpowiedzi immunologicznej, pamięć immunologiczna. W: Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W., Stokłosa T. (red.). *Immunologia.* PWN, Warszawa 2007; 253–254.
38. Kazar-Kamińska K., Kamiński R. Aktywacja limfocytów. W: Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W., Stokłosa T. (red.). *Immunologia.* PWN, Warszawa 2007; 234–235.
39. Erfani N., Mehrabadi S.M., Ghayumi M.A. i wsp. Increase of regulatory T cells in metastatic stage and CTLA-4 over expression in lymphocytes of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 2012; 77: 306–311.
40. Sakaguchi S., Wing K., Yamaguchi T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Tregs. *Eur. J. Immunol.* 2009; 39: 2331–2336.
41. Tao H., Mimura Y., Aoe K. i wsp. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer* 2012; 75: 95–101.
42. Karanikas V., Speletas M., Zamanakou M. i wsp. Foxp3 expression in human cancer cells. *J. Transl. Med.* 2008; 22: 19.
43. Petersen R.P., Campa M.J., Sperlazza J. i wsp. Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer* 2006; 107: 2866–2872.
44. Liu H., Zhang T., Ye J. i wsp. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to chemotherapy in patients with advance non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2012; 61: 1849–1856.
45. Shigematsu Y., Hanagiri T., Shiota H. i wsp. Immunosuppressive effect of regulatory T lymphocytes in lung cancer, with special reference to their effects on the induction of autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Oncol. Lett.* 2012; 4: 625–630.
46. Hanagiri T., Shigematsu Y., Shinohara S. i wsp. Clinical significance of the frequency of regulatory T cells in regional lymph node lymphocytes as a prognostic factor for non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2013; 81: 475–479.
47. Ju S., Qiu H., Zhou X. i wsp. CD13+CD4+CD25hi regulatory T cells exhibit higher suppressive function and increase with

- tumor stage in non-small cell lung cancer patients. *Cell Cycle*. 2009; 8: 2578–2585.
48. Nielsen J., Holm T.L., Claesson M.H. CD4+CD25+ regulatory T cells: II. Origin, disease models and clinical aspects. *APMIS* 2004; 112: 642–650.
 49. Baecher-Allan C., Viglietta V., Hafler D.A. Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Semin Immunol.* 2004; 16: 89–98.
 50. Erfani N., Khademi B., Haghshenas M.R., Mojtahedi Z., Khademi B., Ghaderi A. Intracellular CTLA-4 and regulatory T cells in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Immunol. Invest.* 2013; 42: 81–90.
 51. Bennett W.P., el-Deiry W.S., Rush W.L. i wsp. p21waf1/cip1 and transforming growth factor beta 1 protein expression correlate with survival in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 1998; 4: 1499–1506.
 52. Fischer J.R., Darjes H., Lahm H., Schindel M., Drings P., Kramer P.H. Constitutive secretion of bioactive transforming growth factor beta 1 by small cell lung cancer cell lines. *Eur. J. Cancer* 1994; 30A: 2125–2129.
 53. Traves P.G., Luque A., Hortelano S. i wsp. Macrophages, inflammation, and tumor suppressors: ARF, a new player in the game. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012: 568783.
 54. Andreev K., Graser A., Maier A., Mousset S., Finotto S. Therapeutic measures to control airway tolerance in asthma and lung cancer. *Fron.t Immunol.* 2012; 3: 1–13.
 55. Naumnik W., Naumnik B., Niewiarowska K., Ossolinska M., Chyczewska E. Novel cytokines: IL-27, IL-29, IL-31 and IL-33. Can they be useful in clinical practice at the time diagnosis of lung cancer? *Exp. Oncol.* 2012; 34: 348–353.
 56. Park H., Li Z., Yang X.O. i wsp. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 2005; 6: 1133–1141.
 57. Muranski P., Restifo N.P. i wsp. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood.* 2013; 121: 2402–2414.
 58. Romagnani S. Human Th17 cells. *Arthritis Res. Ther.* 2008; 10: 206.
 59. Khader S.A., Gaffen S.L., Kolls J.K. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal. Immunol.* 2009; 2: 403–411.
 60. Martinez G.J., Nurieva R.I., Yang X.O., Dong C. Regulation and function of proinflammatory TH17 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008; 1143: 188–211.
 61. Kryczek I., Wei S., Zou L., i wsp. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J. Immunol.* 2007; 178: 6730–6733.
 62. Numasaki M., Watanabe M., Suzuki T. i wsp. IL-17 enhances the net angiogenic activity and *in vivo* growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR2-dependent angiogenesis. *J. Immunol.* 2005; 175: 6177–6189.
 63. Kryczek I., Banerjee M., Cheng P. i wsp. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 2009; 114: 1141–1149.
 64. Zheng J., Jiang L., Zhang L. i wsp. Functional genetic variations in the IL-23 receptor gene are associated with risk of breast, lung and nasopharyngeal cancer in Chinese populations. *Carcinogenesis.* 2012; 33: 2409–2416.
 65. Hutchinson J.A., Riquelme P., Geissler E.K., Fändrich F. Human regulatory macrophages. *Methods. Mol. Biol.* 2011; 677: 181–92.
 66. Cassetta L., Cassol E., Poli G. Macrophage polarization in health and disease. *Scientific World Journal* 2011; 11: 2391–2402.
 67. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., Sica A. Macrophage polarization : tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002; 23: 549–555.
 68. Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8: 958–969.
 69. Murdoch C., Giannoudis A., Lewis C.E. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 2004; 104: 2224–2234.
 70. Leek R.D., Harris A.L. Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia.* 2002; 7: 177–189.
 71. Ma J., Liu L., Che G., Yu N., Dai F., You Z. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer* 2010; 10: 112.
 72. Liu G., Ma H., Qiu L. i wsp. Phenotypic and functional switch of macrophages induced by regulatory CD4+CD25+ T cells in mice. *Immunol. Cell Biol.* 2011; 89: 130–142.
 73. Liu L., Ge D., Ma L. i wsp. Interleukin-17 and prostaglandin E2 are involved in formation of an M2 macrophage-dominant microenvironment in lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 2012; 7: 1091–1100.
 74. Dabrowska M., Grubek-Jaworska H., Hoser G., Domagała-Kulawik J. Effect of IFN-gamma stimulation on expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on alveolar macrophages in patients with non-small cell lung cancer. *J. Interferon Cytokine Res.* 2006; 26: 190–195.
 75. Srivastava M.K., Andersson A., Zhu L. i wsp. Myeloid suppressor cells and immune modulation in lung cancer. *Immunotherapy* 2012; 4: 291–304.
 76. Condamine T., Gabrilovich D.I. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol.* 2011; 32: 19–25.
 77. Zamarron B.F., Chen W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int. J. Biol. Sci.* 2011; 7: 651–658.
 78. Kirkwood J.M., Butterfield L.H., Tarhini A.A., Zarour H., Kalinski P., Ferrone S. Immunotherapy of cancer in 2012. *CA Cancer J. Clin.* 2012; 62: 309–335.
 79. Mackiewicz J., Mackiewicz A. Immunoterapia nowotworów i perspektywy jej rozwoju. *Współczesna Onkologia* 2010; 14: 59–71.
 80. Tuscano J.M., Kato J., Pearson D. i wsp. CD22 antigen is broadly expressed on lung cancer cells and is a target for antibody-based therapy. *Cancer Res.* 2012; 72: 5556–5565.
 81. Pillay V., Gan H.K., Scott A.M. Antibodies in oncology. *N. Biotechnol.* 2011; 28: 518–529.
 82. Wojas J., Pajtasz-Piasecka E. Dendritic cell-regulatory T-cell interaction. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2010; 64: 167–174.
 83. Thomas A., Hassan R. Immunotherapies for non-small-cell lung cancer and mesothelioma. *Lancet Oncol.* 2012; 13: 301–310.
 84. Hall R.D., Gray J.E., Chiappori A.A. Beyond the standard of care: a review of novel immunotherapy trials for the treatment of lung cancer. *Cancer Control.* 2013; 20: 22–31.
 85. Ascierto P.A., Marincola F.M., Ribas A. Anti-CTLA-4 monoclonal antibodies: the past and the future in clinical application. *J. Transl. Med.* 2011; 13: 196.
 86. Brahmer J.R., Tykodi S.S., Chow L.Q. i wsp. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366: 2455–2465.
 87. Wu Y.L., Liang J., Zhang W., Tanaka Y., Sugiyama H. Immunotherapies: the blockade of inhibitory signals. *Int. J. Biol. Sci.* 2012; 8: 1420–1430.
 88. Tartour E., Zitvogel L. Lung cancer: potential targets for immunotherapy. *Lancet Respir. Med.* 2013; 1: 551–563.
 89. Mellstedt H., Vansteenkiste J., Thatcher N. Vaccines for the treatment of non-small cell lung cancer: investigational approaches and clinical experience. *Lung Cancer.* 2011; 73: 11–17.
 90. Yonezawa S., Higashi M., Yamada N. i wsp. Mucins in human neoplasms: clinical pathology, gene expression and diagnostic application. *Pathol. Int.* 2011; 61: 697–716.
 91. da Cunha Santos G., Shepherd F.A., Tsao M.S. EGFR mutations and lung cancer. *Annu. Rev. Pathol.* 2011; 6: 49–69.
 92. Dasanu C.A., Sethi N., Ahmed N. Immune alterations and emerging immunotherapeutic approaches in lung cancer. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2012; 12: 923–937.
 93. Spigel D.R., Socinski M.A. Rationale for chemotherapy, immunotherapy, and checkpoint blockade in SCLC: beyond traditional treatment approaches. *J. Thorac. Oncol.* 2013; 8: 587–598.
 94. Zarogoulidis K., Ziogas E., Boutsikou E. Immunomodifiers in combination with conventional chemotherapy in small cell lung cancer: a phase II, randomized study. *Drug Des. Devel. Ther.* 2013; 7: 611–617.