

PROGNOSTICKÁ HODNOTA SOLUBILNÍ INTERCELULÁRNÍ ADHEZNÍ MOLEKULY-1 (SICAM-1) V TĚLNÍCH TEKUTINÁCH ONKOLOGICKÝCH PACIENTŮ

J. Kotyza

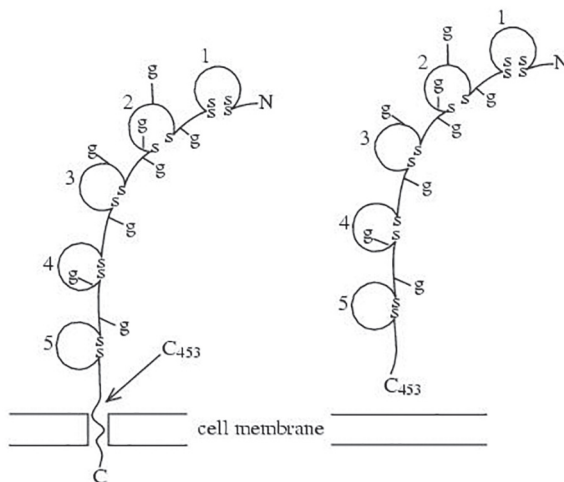
Ústav lékařské chemie a biochemie LF UK v Plzni

IMUNITNÍ REAKCE V KANCEROGENEZI

Infiltraci nádorových ložisek buňkami vrozeného i adaptivního imunitního systému je možno chápat jako imunitní odpověď organismu na přítomnost nádoru s cílem eliminovat nádorové buňky. Tento názor je rozveden v koncepci *imunitního dozoru* (*immune surveillance*). Ve prospěch této koncepce hovoří příznivější prognózy nádorů infiltrovaných cytotoxickými T lymfocyty (CTL) a přirozenými zabíječi (NK buňkami), v experimentální rovině pak výsledky pokusů na zvířatech s potlačenou imunitou, kde se experimentální tumory snáze vytvářejí a mají závažnější průběh. To, že i vysoce imunogenní nádorové buňky mohou uniknout destrukci, se vysvětluje inhibicí funkcí imunitního systému vyvíjejícím se nádorem. Potlačení imunitní destrukce bylo Hanahanem a Weinbergem definováno jako „nový onkogenní rys“ („*emerging hallmark*“) (9). Podílejí se na něm změny povrchových epitopů nádorových buněk, inhibice infiltrujících buněk imunosupresivními sekrečními produkty (TGF- β , IL-10), případně ochrana nádorových buněk mobilizací regulačních T lymfocytů (*Treg*) nebo supresorových buněk odvozených od kostní dřeně (MDSC).

Souběžně s důkazy *tumoricidních aktivit* však rovněž začalo vycházet najevo, že zejména buňky vrozené složky imunitního systému mohou paradoxně projevat i účinky tumorigenní. Dlouho je např. známo, že nádory často vznikají v oblastech chronických zánětů, kde infiltrace zánětovými buňkami – na rozdíl od akutních zánětů a hojení ran – přetrvává. Bylo zjištěno, že zánětové infiltráty produkují bohatou směs pronádorových růstových faktorů, chemokinů, cytokinů i matrix degradujících enzymů. Tyto složky stimulují proliferaci nádorových buněk, novotvorbu cév, tkáňovou invazivitu i metastatický rozsev. Zánětové projevy tak působí ve smyslu základních patologických faktorů kancerogeneze. Hanahan s Weinbergem zahrnují kooperující zánětovou složku pod pojem „*enabling characteristics*“ (9).

Mezi zánětové geny aktivované u nádorových tkání patří i geny *adhezních molekul*. Základní funkcí adhezních molekul, zakotvených v buněčné membráně, je zprostředkování komunikace mezi buňkami, případně mezi buňkami a strukturami mezibuněčné matrix. Tyto interakce, na rozdíl od působení cytokinů a hormonů, jsou založené na přímém kontaktu. Standardní mezibuněčné kontakty vyžadují vždy pár adhezních molekul, z nichž jedna molekula je na povrchu jedné, druhá na povrchu druhé buňky. Je věcí definice, kterou nazveme receptorem a kterou ligandem. Vzájemné propojení vyvolá signál, po



Obr. 1 Struktury ICAM-1 a sICAM-1 (podle Witkowska & Borawska 2004, [19]). 1–5, extracelulární domény; S, atomy síry disulfidických vazeb stabilizujících domény; g, potenciální místa pro glykosylace.

němž může následovat funkční odezva. Adhezní molekuly se kromě zánětlivých stavů fyziologicky exprimují během embryogeneze, při tkáňové diferenciaci, regeneraci tkání a při hematopoezi. Řada adhezních molekul se může vedle membránově vázaných forem vyskytovat také ve volné, *solubilní* podobě, která má schopnost ovlivňovat cílové buňky na větší vzdálenost. Mezi hlavní skupiny adhezních molekul patří *integriny*, *selektiny*, *muciny* a *adhezní molekuly imunoglobulinové povahy* (11).

MEMBRÁNOVÁ A SOLUBILNÍ INTERCELULÁRNÍ ADHEZIVNÍ MOLEKULA-1

Jednou z nejlépe prostudovaných adhezních molekul imunoglobulinové povahy je *intercelulární adhezivní molekula-1 (ICAM-1)*. Tato molekula je vytvářena řadou hematopoetických buněk jako jsou B a T buňky, dendritické buňky, makrofágy, ale i buňkami nehematopoetického původu, jakými jsou např. endoteliální buňky. ICAM-1 na endoteliích hraje důležitou roli při migraci aktivovaných leukocytů na místo infekce. Je kostimulační molekulou antigen prezentujících buněk při interakci s MHC gp II reagujícími T buňkami, u jiných buněčných typů s MHC gp I při aktivaci cytotoxických T lymfocytů (CTL). Představuje ligand pro hlavní lymfocytární integrin *lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1)*. Exprese ICAM-1 je stimulována $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL-1, bakteriálními lipopolysacharidy a inhibována glukokortikoidy, a to prostřednictvím promotorového elementu kappa B (1).

Jako člen imunoglobulinové superrodiny má ICAM-1 doménovou strukturu. Jeho N-koncová extracelulární část je tvořena 5 doménami a je spojená s krátkou intracelulární C-koncovou částí transmembránovým segmentem (obr. 1) (19). Kromě membránových

molekul se v tělních tekutinách vyskytují výše zmíněné *solubilní formy* (*sICAM-1*), odpovídající svou délkou extracelulární části. Jejich hmotnost kolísá podle rozsahu glykosylace (80–114 kD). Volné formy se mohou sdružovat v multimerní komplexy, především dimery. Tvorba solubilních molekul se vysvětluje dvěma mechanismy: odloučením (*shedding*) extracelulárního segmentu membránové molekuly proteolytickými enzymy nebo translací kratších variant mRNA, vzniklých alternativním sestřihem.

Na rozdíl od membránové molekuly, která zapojením do mezibuněčných interakcí imunitní procesy podporuje, dimerická solubilní forma *sICAM-1* může naopak tyto děje inhibovat, a to kompeticí o vazebná místa, má tedy účinky imunosupresivní. Beckerovy práce dokládají, že *sICAM-1* výrazně inhibuje interakce kultivovaných nádorových buněk s NK buňkami (3). Podobně ovlivňuje i T buňky (4). Zajímavé údaje byly získány při studiu infekce lidskými *rhinoviry*, které nejen využívají membránový *ICAM-1* epiteliálních buněk jako svůj buněčný receptor, ale jsou také schopny genezi této adhezni molekuly regulovat. Indukcí exprese membránových *ICAM-1* za současného útlumu tvorby *sICAM-1* mohou *rhinoviry* zvyšovat svou infektivitu. Tento efekt potvrzují inhibiční účinky rekombinovaného *sICAM-1 in vitro* i jeho profylaktické působení *in vivo* (18). Zdá se, že kromě zásahu do imunitních reakcí je možný i přímý efekt *sICAM-1* na novotvorbu cév a růst nádorů, jak naznačuje studie na zvířecím modelu (20).

SICAM-1 V KREVNÍM SÉRU A EXTRAVASKULÁRNÍCH TEKUTINÁCH

Hladiny *sICAM-1* v tělních tekutinách u chorobných stavů různé etiologie shrnuje nedávno publikovaný přehledný článek (19). Nejčtenější pozorování se týkají vzestupu *sICAM-1* u nádorových onemocnění. *Sérové hodnoty* u melanomu, kolorektálního karcinomu a karcinomu žaludku obecně korelují s progresí a hmotností nádoru. U karcinomu žaludku jsou zjišťovány mimořádně vysoké hladiny u metastazujících nádorů. Abnormální cirkulující hladiny provázejí i řadu zánětových i nezánětových onemocnění. Revmatoidní artritida má sérový *sICAM-1* navýšen, i když ne vždy úměrně k aktivitě nemoci. Nejvýraznější byl vzestup u případů komplikovaných vaskulitidou. U koronárních onemocnění jsou vyšší hladiny u nestabilní anginy pectoris (AP) v porovnání s kontrolami a stabilní AP. V centrálním nervovém systému je *sICAM-1* produkován mozgovými endoteliálními a gliovými buňkami, meningeální infekce vedou ke zvýšenému uvolňování do *cerebrospinálního moku*. Naproti tomu u migrén a schizofrenie byly pozorovány nižší sérové hladiny, snad ze snížené produkce $IFN\gamma$. Zvýšené sérové hladiny všeobecně provázejí rejekce orgánových štěpů, po transplantacích ledvin je patrné zvýšení *sICAM-1* také v *moči*. Z nálezů vyplývá, že *sICAM-1* má sice omezené uplatnění jako primární diagnostický marker, může však být užitečný při *monitorování progresu definovaných chorobných stavů* (19). Vedle krevního séra byl *sICAM-1* stanovován i v *ascitické tekutině* při ovariálním hyperstimulačním syndromu (1), v *edematózní tekutině* při akutních postižení plic (5) a ve *slinách* u primárního Sjogrenova syndromu (6). Je zajímavé že zvýšení *sICAM-1* ve slinách odpovídá lépe lokální zánětové aktivitě než hladiny plazmatické. Rovněž zvýšení adhezni molekul v tekutině *ovariálních cyst* je lepším diagnostickou pomůckou k odlišení benigního

ních a maligních afekcí než sérové hladiny (7). Nejlépe je však prostudována exprese sICAM-1 v *pleurální tekutině*, a proto jí bude věnována zvláštní kapitola.

SICAM-1 V PLEURÁLNÍCH TEKUTINÁCH

Pleurální tekutiny (*pohrudniční výpotky*) se řadí mezi *tekutiny extravaskulární* (8). Provázejí nejčastěji zánětlivé a neoplastické procesy plic a pleury, ale mohou se vytvářet také z příčin hemodynamických, nejčastěji při srdečním selhávání. Zatímco tekutiny sdružené se zánětem a nádory (*exsudáty*) obsahují značná množství bílkovin, buněk a jejich sekrečních produktů, jsou výpotky druhého typu (*transsudáty*) chudé na bílkoviny, buňky i další složky.

Při studiu patogeneze nádorových onemocnění představují výpotky alternativu k analýzám buněčných kultur nádorových buněk, podle některých názorů dokonce samy představují buněčnou kulturu *sui generis*. Předností oproti mediím tkáňových kultur je zapojení komplexního regulačního systému makroorganismu včetně jeho dynamiky v průběhu onemocnění. V případě nádorových výpotků obsahuje exsudát složky nedávno definovaného „*sekretomu nádorových buněk*“. V pleurálním nádorovém sekretomu bylo zatím identifikováno asi 1400 peptidových produktů. Při interpretaci látkového složení výpotků je přirozeně nutno brát v úvahu i kontaminaci plazmatickými proteiny (15). I u pleurálních tekutin bylo zjištěno, že v porovnání s krevním sérem lépe odrážejí rozdíly mezi benigními a maligními afekcemi pleurálního prostoru (13).

Vzhledem k tomu, že plazmatická koncentrace intercelulárních a vaskulárních adhezivních molekul je vyšší než koncentrace pleurální, má zcela zásadní význam, zda přítomný obsah sICAM-1 pochází z pleurálního prostoru, nebo prostupuje z plazmy. Porovnání s pleurálními koncentracemi albuminu, který je výlučně plazmatického původu, však svědčí ve prospěch lokální produkce (14). Koncentrace sICAM-1 je úměrná počtu buněk, exprimujících membránovou formu, a jeho uvolňování z povrchu buněk je stimulováno sekrečními produkty pleurálních makrofágů. Pleurální sICAM-1 má schopnost inhibovat interakce buněk nádorových linií s aktivovanými přirozenými zabíječi, stejně účinkuje i rekombinantní sICAM-1. Toto chování je v souladu s postulovanou imunosupresivní rolí sICAM-1 a naznačuje, jak by se nádorové buňky mohly bránit destrukci cytotoxickými lymfocyty.

Hladiny sICAM-1 v pleurálních výpotcích různého původu představuje (tab.1). V porovnání s transsudáty jsou hodnoty v nádorových a zánětových výpotcích výrazně vyšší.

Kvantifikace 13 ukazatelů zánětu ve výpotcích 116 pacientů s plicním karcinomem provedená v naší laboratoři prokázala zvýšenou expresi většiny markerů v porovnání s hladinami sérovými. Když byly pleurální hodnoty 102 zemřelých pacientů porovnány s dobou přežití, dle očekávání většina analytů korelovala s dobou přežití *negativně*. Spearmanova korelace byla nejvyšší u interleukinu-8 (IL-8), známého svou chemotaktickou aktivitou vůči neutrofilům, ale také podporou migrace nádorových buněk a angiogeneze (13). Výjimkou byl sICAM-1, kde jsme se paradoxně setkali s *pozitivní korelací* s dobou přežití, stejně jako u solubilní vaskulární adhezivní molekuly (sVCAM-1) (12). Podobně jako ne-

Tab. 1 Hladiny sICAM v pohrudničních výpotcích různého původu (ng/ml)

typ výpotku			literární odkaz
nádorový	zánětlivý/tuberkulosní	transsudát	
390 ¹ ± 61 ²	672 ± 31	–	<i>Hamzaoui et al. 1996 (2)</i>
402 ± 40	335 ± 35	90 ± 20	<i>Hoffmann et al. 1996 (10)</i>
591 ± 350	705 ± 317	123 ± 62	<i>Melis et al. 2003 (14)</i>
96,2 ³ (64–151) ⁴	105 (72–152)	49,6 (32–77)	<i>Kotyza et al. 2010 (12)</i>
418 ± 34	255 ± 18	–	<i>Qian et al. 2012 (16)</i>

¹ průměr, ² rozptyl hodnot, ³ medián, ⁴ kvartilové rozpětí

gativní korelace IL-8, i pozitivní korelace sVCAM-1 byla výraznější u metastatických tumorů (tab. 2).

Pokud je nám známo, jedná se o první pozorování pozitivní korelace solubilních adhezních molekul perinádorových tekutin s dobou přežití. Quian nedávno doložil negativní korelaci sérových hodnot sICAM-1 u pacientů s adenokarcinomem plic, u výpotků ale podobnou negativní korelaci nenašel (16). Pokud bychom vycházeli z imunosupresivní role sICAM-1 v kancerogenezi, vyznívaly by naše výsledky spíše ve smyslu oslabení pronádorového působení zánětlivých jevů *en bloc*, než ve smyslu specifického protinádorového působení T buněk.

SOUHRN

Infiltrace nádorového stromatu buňkami imunitního systému byla tradičně vysvětlována jako pokus makroorganismu o likvidaci nádorových buněk. V poslední době se však ukazuje, že zejména buňky vrozeného imunitního systému mohou vyvíjet aktivity podporující rozvoj nádoru. Mezi geny, které jsou aktivovány jak u zánětlivých stavů, tak u nádorů, jsou i geny zajišťující mezibuněčné interakce. Intercelulární adhezní molekula-1 zde patří k nejdůležitějším genovým produktům. Tato molekula existuje jak v membránově zakotvené podobě (ICAM-1), tak jako solubilní, volná forma (sICAM-1). Na rozdíl od membránové ICAM-1, která se přímo podílí na mezibuněčných interakcích, sICAM-1 může inhibovat interakce imunitních buněk kompeticí o vazebná místa na buňkách. Zvýšené koncentrace sICAM-1 byly zjištěny v sérech onkologických pacientů, ale také v tekutinách, které jsou v přímém styku s nádorem. Zdá se, že tyto tekutiny, např. pohrudniční výpotky, mají těsnější vztah k vyvolávajícím patologickým stavům než krevní plasma. sICAM-1 je produkován v pohrudničním prostoru regulovatelným způsobem a existují názory, že by mohl bránit tumorocidním aktivitám T buněk a tím potlačovat hostitelské protinádorové aktivity.

Tab. 2 Korelace pleurálních koncentrací IL-8 a sICAM s dobou přežití u nemocných s nádory plic (*Kotyza et al. 2010, cit. 12*)

	nádorové výpotky nediferencované n = 102	výpotky u metastazujících nádorů n = 18
IL-8	- 0,36 ¹ (0,001) ²	- 0,64 (0,01)
sICAM-1	+ 0,22 (0,03)	+ 0,55 (0,03)

¹ pořadová korelace dle Spearmana; ² statistická významnost

Tuto hypotézu zpochybňuje exprese sICAM-1 u maligních výpotků, kde projevuje, na rozdíl od běžných zánětových markerů, pozitivní korelaci s dobou přežití.

Prognostic value of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in body fluids of cancer patients

SUMMARY

The infiltration of tumor stroma by immune cells has traditionally been explained as an attempt of the host immune system to eradicate the tumor cells. More recently, a series of protumor activities, mediated mostly by the cells of innate immunity, have been reported. Among the genes upregulated both in inflammatory conditions and in cancer are the genes involved in cell-cell interactions. Intercellular adhesion molecule-1 represents one of the most studied gene products. This molecule exists both in a membrane-bound (ICAM-1), and in a soluble, free form (sICAM-1). In contrast to ICAM-1, which is directly involved in the cell-to-cell interactions, sICAM-1 presumably inhibits immune cell interactions by competing for the cellular binding sites. Increased concentrations of sICAM-1 have been detected in serum of cancer patients as well as in fluids proximal to tumor tissue. These fluids, eg. pleural fluids, are believed to be more closely related to the underlying pathology than the blood plasma. There are indications that sICAM-1 is generated in pleural space in a regulated manner. It has been hypothesized that sICAM-1 may interfere with the tumoricidal action of T cells and hence it may compromise the host antitumor activities. However, this hypothesis is challenged by sICAM-1 in cancer-related pleural effusions since, in contrast to common inflammatory markers, it shows a positive correlation with the survival time.

LITERATURA

1. Abramov Y., Schenker J. G., Lewin A. et al.: Soluble ICAM-1 and E-selectin levels correlate with clinical and biological aspects of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil. Steril.* 76, 2001: 51–57. – 2. Hamzaoui A., Hamzaoui K., Kahan A., Chabbou A.: Levels of soluble VCAM-1, Soluble ICAM-1, and soluble E-selectin in patients with tuberculous pleuritis. *Mediators Inflamm.* 5, 1996: 276–279. – 3. Becker J. C., Dummer R.,

Hartmann A. A. et al.: Shedding of ICAM-1 from melanoma cell lines induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Functional consequences on cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 147, 1991: 4398–4401. – 4. Becker J. C., Termeer C., Schmidt R. E., Brocker E. B.: Soluble intercellular adhesion molecule-1 inhibits MHC-restricted specific T cell/tumor interaction. *J. Immunol.* 151, 1993: 7224–7232. – 5. Calfee C. S., Eisner M. D., Parsons P. E. et al.: Soluble intercellular adhesion molecule-1 and clinical outcomes in patients with acute lung injury. *Intensive Care Med.* 35, 2009: 248–257. – 6. Cuida M., Haise A. K., Johannessen A. C. et al.: Indicators of salivary gland inflammation in primary Sjogren's syndrome. *Eur. J. Oral Sci.* 105, 1997: 228–233. – 7. Darai E., Bringuier A. F., Walker-Combrouze F.: Soluble adhesion molecules in serum and cyst fluid from patients with cystic tumours of the ovary. *Human Reprod.* 12, 1998: 2831–2835. – 8. Dennebaum R.: Extravascular body fluids. In: Thomas L. (Ed.). *Clinical laboratory diagnostics*. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt, Germany. 1998: 1327–75. – 9. Hanahan D., Weinberg R. A.: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 2011: 646–74. – 10. Hoffmann J. C., Kruger H., Luhrs J., Hamm H.: Detection of soluble adhesion molecules in pleural effusions. *Chest* 110, 1996: 107–113. – 11. Hořejší V., Bartůňková J.: *Základy imunologie* (3. vydání). Triton, Praha. 2005. – 12. Kotyza J., Havel D., Vrzalová J. et al.: Diagnostic and prognostic significance of inflammatory markers in lung cancer associated pleural effusions. *Int. J. Biol. Markers* 25, 2010: 12–20. – 13. Kotyza J.: Interleukin-8 (CXCL8) in tumor associated non-vascular extracellular fluids: its diagnostic and prognostic value. A Review. *Int. J. Biol. Markers* 27, 2012: 169–178. – 14. Melis M., Pace E., Siena L. et al.: Biologically active intercellular adhesion molecule-1 is shed as dimers by a regulated mechanism in the inflamed pleural space. *Am. J. Crit. Care Med.* 167, 2003: 1131–1138. – 15. Pavlou M. P., Diamandis E. P.: The cancer cell secretome: A good source for discovering biomarkers? *J. Proteomics* XX, 2010: 1–11. – 16. Qian Q., Zhan P., Sun W. K.: Vascular endothelial growth factor and soluble intercellular adhesion molecule-1 in lung adenocarcinoma with malignant pleural effusion: correlation with patient survival and pleural effusion control. *Neoplasma* 59, 2012: 433–439. – 17. Van de Stolpe A., van der Saag P. T.: Intercellular adhesion molecule-1. *J. Mol. Med.(Berl)* 74, 1996: 13–33. – 18. Whiteman S. C., Bianco A., Knight R. A., Spiteri M. A.: Human rhinovirus selectively modulates membranous and soluble forms of its intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) receptor to promote epithelial cell infectivity. *J. Biol. Chem.* 278, 2003: 11954–11961. – 19. Witkowska A. M., Borawska M. H.: Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur. Cytokine Netw.* 15, 2004: 91–98. – 20. Yong S. G., Kim P. N., Li H. C. et al.: Stimulation of tumor growth by human soluble intercellular adhesion molecule-1. *Cancer Res.* 61, 2001: 4253–4257.

Adresa autora: J. K., Lidická 1, 301 66 Plzeň