

CHEMOTAKTICKÉ CYTOKINY PERITUMOROSNÍCH TEKUTIN

J. Kotyza

Ústav lékařské chemie a biochemie LF UK v Plzni

Chemotaktické cytokiny (chemokiny) jsou malé proteiny jednotné struktury, o kterých je více než 20 let známo, že aktivují leukocyty a vyvolávají jejich směrovaný pohyb. Příkladem je migrace neutrofilů k místu tkáňového poškození pod vlivem interleukinu-8. V názvosloví chemokinů je využita lokalizace klíčových cysteinů („C“) ve struktuře peptidu. Hlavní podrodiny CC a CXC jsou za normálních okolností produkovány zejména leukocyty, endoteliálními a epiteliálními buňkami a fibroblasty. Jejich receptory jsou označovány zkratkami CCR a CXCR. Účinky chemokinů jsou zprostředkovány aktivací G-proteinů propojených s receptory. Vyvolané modulace cytoskeletálních proteinů a změny afinity integrinů jsou zodpovědné za buněčný pohyb.

V poslední době se ukázalo, že receptory pro chemokiny se mohou vyskytovat i u nádorových buněk, a že nádorové buňky samy chemokiny produkují. Produkci chemokinů nádorovou tkání však nelze omezit jen na proliferující nádorové buňky. Nádor obsahuje další typy buněk mezenchymálního původu, mezi kterými jsou i buňky imunitního systému. Historicky byly nádorem vyvolané imunitní děje považovány za pokus imunitního systému o odstranění tumoru. Později se však ukázalo, že imunitní odpověď vyvolaná nádorovým bujením paradoxně progresi nádoru podporuje, a to zejména dodáváním bioaktivních regulačních molekul. Mezi nimi jsou různé růstové faktory, matrix degradující proteolytické enzymy, ale také cytokiny a chemokiny (8). Z toho vyplývá, že karcinomatózní buňky mohou být vystaveny jak parakrinní, tak autokrinní chemokinové regulaci. Zdá se, že vedle nádorové angiogeneze a proliferace je chemokinový systém zapojen i do migrace buněk, a to od lokální invazivity až po tvorbu distantních metastáz (4, 19). Analogicky k funkci chemokinů v hematopoetickém kontextu byla navržena obdobná funkce v metastatickém kontextu. Na příklad SDF-1 je produkován konstitutivně v lokalitách kam typicky metastazuje karcinom prsu, tj. v kostní dřeni, plicích, játrech a uzlinách. Podobně jako tento chemokin vyvolává homing hematopoetických buněk exprimujících CXCR4 do kostní dřeni, mohl by ovlivňovat tvorbu kostních metastáz nádorových buněk exprimujících stejný receptor (3). Chemokinová signalizace se tak stává jedním z možných terapeutických cílů zaměřených na potlačení metastatického procesu.

Základní poznatky o funkci chemokinů přinášejí studia buněčných kultur a nádorových tkání. Součástí výzkumu v této oblasti je však i sledování hladin chemotaktických cytokinů tělních tekutin ve vztahu ke klinickým ukazatelům. Na rozdíl od živných medií tkáňových

kultur se pouze na této úrovni mohou uplatnit komplexní regulační mechanismy. Stanovení cytokinů a chemokinů v krevním séru se často používá jako diagnostický a prognostický ukazatel u zánětlivých onemocnění, zvýšené hladiny jsou nacházeny i u maligních procesů. Sérové koncentrace však zpravidla neumožňují rozlišit mezi maligními a benigními stavy (1, 9, 13). Lépe odpovídá nádorové cytokinové produkci jejich obsah v tekutinách, které jsou v přímém styku s nádorem, jejichž tvorbu nádor v některých případech vyvolává. Jedná se zejména o pleurální a peritoneální tekutiny a obsah nádorových cyst. Informativní je však i moč, sliny, mozkomíšni mok, intersticiální tekutiny a sekrety žláz. Souborně byly tyto tekutiny nazývány „extravascular fluids“ (5) nebo také „proximal fluids“ (17). Secernované proteiny jsou kodovány asi 10 % lidského genomu a soubor proteinů produkováných nádorovými buňkami byl nazván „nádorovým sekretomem“ (17). Mezi těmito produkty se nacházejí i regulační molekuly včetně chemokinů. Následující text obsahuje stručné údaje o funkci, vlastnostech a výskytu 3 nejsledovanějších chemokinů peritumorálních tekutin, mezi které patří „monocyte chemoattractant protein 1“ (MCP-1, CCL2), „interleukin-8“ (IL-8, CXCL8) a „stromal cell-derived factor-1“ (SDF-1, CXCL12).

Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1, CCL2)

Tento protein byl poprvé zjištěn r. 1989 v kondicionovaném mediu linie lidských myelomonocytových buněk jako monocytární chemotaktický faktor. Obsahuje 76 aminokyselin včetně 4 cysteinů. Ukázalo se, že je produkován i jinými buňkami v odpověď na stimulaci interleukinem-1 (IL-1) a tumor necrosis faktorem (TNF) a že jeho receptorem je CCR-2. Pro svou masivní produkci a výskyt se stal nejstudovanějším chemokinem CC podrodiny. První analýzy pohrudničních výpotků různé etiologie našly vyšší koncentrace MCP-1 u výpotků nádorového původu v porovnání s výpotky zánětlivé etiologie (2). Tato převaha sice nebyla potvrzena v pozdějších studiích, nicméně koncentrace v nádorových tekutinách převyšovaly jak hladiny transudátů, tak zejména sérové hladiny (medián 165 pg/ml, 11). Hodnoty v nádorových exudátech nesignifikantně korelovaly se závažností nádorové choroby (vyjádřeno jako negativní korelace s dobou přežití) u pacientů s primárním karcinomem plic (11).

Tab. 1 Hladiny cytotaktických cytokinů v extravaskulárních tekutinách maligního a benigního původu

chemokin	tekutina		literární odkaz
	maligní původ	benigní původ	
MCP-1 (CCL2) pg/ml	n = 116 exsudát při karcinomu plic 442¹ (277 640) ²	n = 18 transsudát 365² (223 492) ²	<i>Kotzya J. (2010)</i> (11)
IL-8 (CXCL8) pg/ml	n = 116 exsudát při karcinomu plic 106¹ (38,2 394) ²	n = 18 transsudát 21,6¹ (11,4 40,5) ²	<i>Kotzya J.(2010)</i> (11)

chemokin	tekutina		literární odkaz
	maligní původ	benigní původ	
SDF-1 (CXCL12) pg/ml	n = 19 ascites při karcinomu žaludku 4667³ (2530 7320) ⁴	n = 6 benigní peritoneální výpotek ≤2000	Yasumoto K. (2006) (21)

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

Interleukin-8 (IL-8, CXCL8)

Interleukin-8 je významný člen chemokinové podrodiny CXC. Jedná se o prozáněťový cytokin, který se účastní mobilizace, aktivace a migrace neutrofilů na místo tkáňového poškození. Účinkuje i na jiné typy leukocytů, na endotelové buňky, a na nádorové buňky vybavené receptory typu CXCR1 a CXCR2. Má tumorigenní vlastnosti, stimuluje proliferaci buněk, angiogenezi a únik z apoptosy. Stimulace migrace byla demonstrována na melanomových buňkách (19). IL-8 zvyšuje také endoteliální propustnost, zřejmě transaktivací receptoru pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR-2). Za normálních okolností je IL-8 secernován v zanedbatelných množstvích. Jeho exprese je však výrazně stimulována, podobně jako u MCP-1, prostřednictvím IL-1 a TNF, ale také aditivně epidermálním růstovým faktorem (EGF) a u karcinomu prsu estrogeny.

Hladiny IL-8 byly sledovány v nejrůznějších nevaskulárních tekutinách (shrnuje v 12). Typicky byly nacházeny signifikantně vyšší hladiny u tekutin provázejících agresivní tumory v porovnání s neexpandujícími nádory, nejnižší hodnoty se vyskytovaly u pre-maligních lézí a benigních afekcí. Nejčastěji analyzovanou tekutinou byl pohrudniční výpotek, který provází, kromě různých záněťových stavů a hemodynamických poruch, 25–53 % plicních karcinomů (16). Ve všech studiích byly zjišťovány mnohonásobně vyšší hladiny u maligních výpotků v porovnání se séry stejných pacientů. Ve studii analyzující 102 maligních výpotků byla zjištěna signifikantní negativní korelace s dobou přežití u primárních nádorů plic s koeficientem $-0,31$, u metastatických tumorů s koeficientem $-0,64$. Tak výrazný korelační koeficient nebyl nalezen u žádného ze 13 souběžně analyzovaných záněťových markerů (11).

Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1, CXCL12)

SDF-1 je členem chemokinové podrodiny CXC jako IL-8. Je produkován širokou škálou buněčných typů a jeho účinky jsou zprostředkovány receptory CXCR4 a CXCR7. Kromě vlivu na pohyb imunitních buněk ovlivňuje buněčné migrace při embryogenezi a má vliv na progresi nádorů buď přímo, prostřednictvím CXCR4 s účinkem na nádorový růst, migraci a invazivitu, nebo nepřímo, mobilizací progenitorů epiteliálních buněk ve smyslu nádorové angiogeneze. Mimo to směřuje imunopresorové buňky (T_{reg} a pDC) do mikroprostředí nádoru, což brzdí přirozenou imunitní odpověď (15). Hypoxie zvyšuje expresi SDF-1 a CXCR4, adhezi nádorových buněk k endoteliím a transendoteliální migraci (10).

Vysoké koncentrace SDF-1 jsou nacházeny zejména v pleurálních a peritoneálních tekutinách maligního původu. Exrese SDF-1 i CXCR4 byly signifikantně vyšší u maligních výpotků než u transsudátů (6). Podobně byly nalezeny vyšší hladiny u ascitických tekutin provázejících epiteliální karcinomy ovaria než u tekutin serosních cyst (20). Masivní přítomnost SDF-1 je zjišťována v pleurálních tekutinách u hepatocelulárního karcinomu (14). Rovněž koncentrace provázející peritoneální karcinomatózu u žaludečních nádorů výrazně převyšují hodnoty nemaligních ascitů (20).

Tumorigenní role chemokinů a jejich receptorů stimuluje výzkum v oblasti protinádorové terapie zaměřené na osu chemokin-receptor. V předchozích několika letech se objevila řada studií inhibice chemokinové signalizace na úrovni receptoru, příslušných cytosolových signálních drah, nebo blokad samotného chemokinu monoklonální protilátkou (22). Antagonista receptoru pro SDF-1 CXCR4 AMD3100 vyvolává inhibici migrace leukemických buněk a předpokládá se, že v kombinaci s dalšími léky by mohl být využit při léčbě lymfocytární leukemie (18). Byla navržena nová strategie zasahující receptor CXCR1, vázající IL-8 u kmenových buněk karcinomu prsu. Kromě specifické protilátky byl vyvinut i malý nekompetitivní inhibitor Reparixin (Dompè Pharmaceuticals), který výrazně ochromuje jak nádorové linie, tak cizorodé nádorové štěpy s protirůstovým a anti-metastatickým efektem (7). Tento inhibitor je v současné době ve stadiu klinických testů.

SOUHRN

Chemotaktické cytokiny (chemokiny) jsou historicky definované jako chemoatraktanty pro leukocyty, četné údaje však ukazují i na kontrolní roli v kancerogenezi na mnoha různých úrovních, kde účinkují jak na nádorové buňky, tak na nádor infiltrující leukocyty ve smyslu rozvoje maligního procesu. Koncentrace chemokinů jsou typicky vyšší v nevasculárních tekutinách, které jsou v přímém styku s nádorem, v porovnání s podobnými tekutinami benigního původu, jak dokládají nejčastěji sledované chemokiny monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1, CCL2), interleukin-8 (IL-8, CXCL8) a stromal cell-derived factor-1 (SDF-1, CXCL12). Recentní nálezy naznačují, že specifické chemokin-receptorové páry by mohly být zodpovědné za prognosticky klíčový proces metastatické disseminace, což je klasifikuje jako možné cíle inhibičních zásahů proti nádorové migraci, adhezi a extravazaci v cílových orgánech.

Chemotactic cytokines of peritumoral fluids

SUMMARY

Chemotactic cytokines (chemokines) are historically defined as chemoattractants for leukocytes, however accumulating evidence indicates that they also control malignant processes at many different levels, affecting both proliferative cancer cells and tumor-infiltrating leukocytes to express tumor-promoting functions. The chemokine concentrations

are typically higher in peritumoral non-vascular fluids when compared to similar fluids of benign provenance, exemplified by prominent chemokines monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1, CCL2), interleukin-8 (IL-8, CXCL8) and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1, CXCL12). The recent findings suggest that specific pairs of chemokines and their receptors may be important for a prognostically critical process of metastatic dissemination, and thus may be considered as targets for the limitation of cancer cell migration, adhesion and extravasation at the destined metastatic sites.

LITERATURA

1. Alexandrakis M. G., Coulocheri S. A., Bouros D., Eliopoulos G. D.: Evaluation of ferritin, interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha in the differentiation of exudates and transudates in pleural effusions. *Anticancer Res.* 19, 1999: 3607–12. – 2. Antony V. B., Goodbey S. W., Kunkel S. L., Hott J. W., Hartman D. L., Burdick M. D., Strieter R. M.: Recruitment of inflammatory cells to the pleural space. Chemotactic cytokines, IL-8, and monocyte chemoattractant peptide-1 in human pleural fluids. *J. Immunol.* 151, 1993: 7216–7223. – 3. Ben-Beruch A.: Organ selectivity in metastasis: regulation by chemokines and their receptors. *Clin. Exp. Metastasis* 25, 2008: 345–56. – 4. Brat D. J., Bellail A. C., Van Meir E. G.: The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro. Oncol.* 7, 2005: 122–33. – 5. Dennebaum R.: Extravascular body fluids. Thomas L(Ed.). *Clinical laboratory diagnostics*. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt, Germany, 1998: 1327–75. – 6. Economidou F., Antoniou K. M., Soufla G. et al.: Role of VEGF-stromal cell-derived factor-1alpha/CXCL12 in pleural effusion of lung cancer. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 30, 2010: 154–60. – 7. Ginestier C., Liu S., Diebel M. E., Korkaya H., Luo M., Brown M., Wicinski J., Cabaud O., Charafe-Jauffret E., Birnbaum D., Guan J. L., Dontu G., Wicha M. S.: CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *J. Clin. Invest.* 120, 2010: 485–97. – 8. Hanahan D., Weinberg R. A.: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 2011: 646–74. – 9. Ivarsson K., Runesson E., Sundtfeldt K., Haeger M., Hedin L., Janson P. O., Mats Brannstrom M.: The chemotactic cytokine interleukin-8 – a cyst fluid marker for malignant epithelial ovarian cancer? *Gynecol Oncol.* 71, 1998: 420–3. – 10. Jin F., Brockmeier U., Otterbach F., Metzgen E.: New insight into the SDF-1/CXCR4 axis in a breast carcinoma model: hypoxia-induced endothelial SDF-1 and tumor cell CXCR4 are required for tumor cell intravasation. *Mol. Cancer Res.* 10, 2012: 1021–31. – 11. Kotyza J., Havel D., Vrzalová J., Kulda V., Pešek M.: Diagnostic and prognostic significance of inflammatory markers in lung cancer associated pleural effusions. *Int. J. Biol. Markers* 25, 2010: 12–20. – 12. 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. – 13. Lee H. L., Eom H. S., Yun T., Kim H. J., Park W. S., Nam B. H., Moon-Woo S., Lee D. H., Kong S. Y.: Serum and urine levels of interleukin-8 in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Cytokine* 43, 2008: 71–5. – 14. Liu H., Pan Z., Li A., Fu S., Lei Y., Sun H., Wu M., Zhou W.: Roles of chemokine receptor 4 (CXCR4) and chemokine ligand 12 (CXCL12) in metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *Cell Mol. Immunol.* 5, 2008: 373–8. – 15. Obermajer N., Muthuswamy R., Odunsi K., Edwards R. P., Kalinski P.: PGE₂-induced CXCL12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment. *Cancer Res.* 71, 2011: 7463–70. – 16. Olopade O. I., Ultmann J. E.: Malignant effusions. *Cancer J. Clin.* 41, 1991: 166–79. – 17. Pavlou M. P., Diamandis E. P.: The cancer cell secretome: A good source for discovering biomarkers? *J. Proteomics* XX, 2010: 1–11. – 18. Stamatopoulos B., Meuleman N., De Bruyn C. et al.: AMD3100 disrupts the cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and a mesenchymal stroma or nurse-like cell-based microenvironment: preclinical evidence for its association with chronic lymphocytic leukemia treatments. *Haematologica* 97, 2012: 608–15. – 19. Wang J. M., Taraboletti G., Matsushima K., Van Damme J., Mantovani A.: Induction of haptotactic migration of melanoma cells by neutrophil activating protein/interleukin-8. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 1990: 165–70. – 20. Wertel I., Polak G.,

Tarkowski R., Kotarska M.: SDF-1alpha/CXCL12 and dendritic cells in ovarian cancer microenvironment. *Ginekol.Pol.* 82, 2011: 421–5. – 21. Yasumoto K., Koizumi K., Kawashima A. et al.: Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. *Cancer Res.* 66, 2006: 2181–7. – 22. Zhu Y. M., Webster S. J., Flower D., Woll P. J.: Interleukin-8/CXCL8 is a growth factor for human lung cancer. *British J. Cancer* 91, 2004: 1970–6.

Adresa autora: J. K., Karlovarská 48, 301 66 Plzeň