

Received: 13.06.2018
Accepted: 12.12.2018
Published: 31.12.2018

Komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego jako potencjalny cel terapii przeciwnowotworowych*

Myeloid-derived suppressor cells as a target for anticancer therapy

Natalia Anger, Joanna Rossowska

Samodzielne Laboratorium Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Komórki MDSC to heterogenna populacja niedojrzałych komórek pochodzenia mieloidalnego, które charakteryzują się znaczną aktywnością supresorową i odgrywają istotną rolę w progresji i przerzutowaniu nowotworów. Główną rolę w akumulacji komórek MDSC pełnią czynniki wydzielane przez mikrośrodowisko nowotworu, które zaburzają proces mielopojezy zachodzący w szpiku kostnym oraz warunkują migrację niedojrzałych komórek w kierunku nowotworu. Komórki MDSC promują rozwój nowotworu przez hamowanie aktywności komórek immunokompetentnych, a także biorą udział w aktywacji mechanizmów niezależnych od odpowiedzi odpornościowej, takich jak angiogeneza w nowotworze, degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej oraz tworzenie niszy premetastatycznej. Ze względu na ich istotny wpływ na rozwój nowotworów, komórki MDSC stały się ważnym elementem w obrazie klinicznym choroby. W ostatnich latach, podejmowano próby opracowania schematów terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem związków wpływających zarówno na zahamowanie proliferacji, akumulacji lub aktywności supresorowej komórek MDSC, jak i na różnicowanie bądź całkowitą eliminację tych komórek. Proponowane strategie terapeutyczne często zakładają połączenie czynników redukujących supresję związaną z MDSC z konwencjonalną chemioterapią, czy immunoterapią ukierunkowaną na immunologiczne punkty kontroli.

W artykule omówiono czynniki warunkujące powstawanie i akumulację komórek MDSC, metody identyfikacji fenotypowej tych komórek, a także wykorzystywane przez nie mechanizmy supresji. Przedstawiono także najnowsze badania dotyczące terapii przeciwnowotworowych, których celem jest przywrócenie reaktywności układu odpornościowego przez redukcję supresorowego efektu komórek MDSC.

Słowa kluczowe:

MDSC • komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego • mikrośrodowisko nowotworu • terapia przeciwnowotworowa

*Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr 2014/15/N/NZ4/04817 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Summary

Myeloid-derived suppressor cells are heterogenic immature myeloid cells, which possess suppressor activity and play an important role in both, tumor progression and metastasis. The accumulation of MDSCs is induced primarily by factors that are secreted by the tumor microenvironment, which disturb myelopoiesis that occurs in the bone marrow and enables the migration of immature myeloid cells into the tumor. MDSCs promote tumor growth by inhibiting the activity of immunocompetent cells, as well as by activating non-immunological processes, such as tumor angiogenesis, the degradation of extracellular matrix and the formation of premetastatic niche. Due to their significant impact on the development of cancer, MDSCs became clinically relevant in tumor diagnostics. In recent years, various therapeutic strategies were developed in order to inhibit the proliferation, accumulation or suppressor activity of MDSCs, as well as to render the differentiation or total depletion of these cells. The proposed therapies often combine factors that reduce MDSCs suppression with conventional chemotherapy or with immune checkpoints inhibitors.

In this review, we describe the current state of knowledge about factors that enable the accumulation of MDSCs, methods of phenotypic identification of these cells, as well as the mechanisms of suppression used by them. Moreover, we provide insight into the therapeutic approaches, which aim to restore the reactivity of the immune system by reducing the suppressor effects of MDSCs.

Keywords: MDSC • myeloid-derived suppressor cells • tumor microenvironment • anticancer therapy

GICID 01.3001.0012.8267
DOI: 10.5604/01.3001.0012.8267
Word count: 7772
Tables: 2
Figures: 2
References: 120

Adres autorki: dr inż. Joanna Rossowska, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: joanna@iitd.pan.wroc.pl

Wykaz skrótów: **5-FU** – 5-fluorouracyl (5-fluorouracil); **ADAM17** – adamalizyna 17 (a disintegrin and metalloproteinase domain 17); **ALDH** – dehydrogenaza aldehydowa (aldehyde dehydrogenase); **AMPKa** – podjednostka α kinazy aktywowanej 5'AMP (5'-AMP-activated protein kinase domain α); **Arg1** – arginaza 1 (arginase 1); **ASC** – transporter aminokwasów ASC (Alanine-Serine-Cysteine transporter); **ATRA** – kwas całkowicie *trans*-retinowy (all-trans retinoic acid); **bFGF** – podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (basic fibroblast growth factor); **B-RAF** – protoonkogenna kinaza serynowo-treoninowa (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B); **Bv8** – prokinetycyna 2 (prokineticin 2/Bombina Variegata 8); **C/EBP β** – białko wiążące się z sekwencją CCAAT β (CCAAT/enhancer-binding protein β); **CAF** – fibroblasty związane z nowotworem (cancer-associated fibroblasts); **CCL** – chemokina CC (CC chemokine); **CCR** – receptor chemokin CC (CC chemokine receptor); **Cdk4** – kinaza cyklinozależna 4 (cyclin-dependent kinase 4); **c-FLIP** – białko hamujące aktywność kaspazy-8 (FLICE-like inhibitory protein); **CK2** – kinaza kazeinowa 2 (casein kinase 2); **c-Kit** – receptor czynnika wzrostu komórek macierzystych (stem cell growth factor receptor); **CSC** – macierzyste komórki nowotworowe (cancer stem cells); **CtBP2** – korepresor transkrypcji (C-terminal binding protein 2); **CTLA-4** – antygen-4 związany z CTL (CTL associated antigen-4); **CXCL** – chemokina CXC (CXC chemokine); **CXCR** – receptor chemokin CXC (CXC chemokine receptor); **DC** – komórka dendrytyczna (dendritic cell); **EGF** – czynnik wzrostu śródbłonna (epidermal growth factor); **EMT** – przejście nabłonkowo-mezenchymalne (epithelial-mesenchymal transition); **ERK** – kinaza aktywowana przez czynniki pozakomórkowe (extracellular signal-regulated kinase); **Fit3** – kinaza fms podobna (fms-like tyrosine kinase); **GCN2** – pseudokinaza (general control nonrepressible 2); **G-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (granulocyte colony-stimulating factor); **GM-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor); **HDAC** – deacetylaza histonu (histone deacetylase); **HGF** – czynnik wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor); **HIF-1 α** – czynnik indukowany

hipoksja 1 (hypoxia-inducible factor 1 α); **IC** – immunologiczne punkty kontroli (immune checkpoints); **IDO** – 2,3-dioxygenaza indolaminy (indolamine 2,3-dioxygenase); **IFN- γ** – interferon- γ (interferon- γ); **IL** – interleukina (interleukin); **iNOS** – indukowana syntaza tlenu azotu (inducible nitric oxide synthase); **IRF8** – czynnik regulujący interferon 8 (interferon regulatory factor 8); **IRS** – zintegrowana odpowiedź na stres (integrated stress response); **JAK2** – kinaza Janusowa 2 (Janus kinase 2); **LOX-1** – receptor wiążący utlenioną formę lipoproteiny LDL (lectin-like oxidized low-density lipoprotein (LDL) receptor-1); **M-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (macrophage colony-stimulating factor); **MDSC** – komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego (myeloid-derived suppressor cells); **MET** – przejście mezenchymalno-nabłonkowe (mesenchymal-epithelial transition); **M-MDSC** – monocytarne MDSC (monocytic MDSC); **MMP9** – metaloproteinaza 9 (matrix metalloproteinase-9); **NADPH** – ester fosforanowy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate); **NF- κ B** – czynnik jądrowy κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells); **NKG2D** – receptor lętknowy typu C komórek NK (natural killer group 2D); **NOX2** – oksydaza 2 NADPH (NADPH oxidase 2); **p38MAPK** – kinaza aktywowana mitogenami p38 (p38 mitogen-activated protein kinase); **PD-1** – receptor programowanej śmierci 1 (programmed death receptor 1); **PDE-5** – fosfodiesterazy typu 5 (phosphodiesterase 5); **PD-L1** – ligand receptora programowanej śmierci 1 (programmed death-ligand 1); **PGE₂** – prostaglandyna E2 (prostaglandin E2); **PMN-MDSC** – granulocytarne MDSC (polymorphonuclear MDSC); **PTEN** – kinaza PI3K (phosphatase and tensin homologue); **RNS** – reaktywne formy azotu (reactive nitrogen species); **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species); **S100A8, S100A9** – białka wiążące wapń z rodziny S100 (S100 calcium-binding protein); **shRNA** – krótkie RNA o strukturze spinki do włosów (short hairpin RNA); **siRNA** – krótkie interferujące RNA (small interfering RNA); **SMAD2** – wewnątrzkomórkowe białko efektorowe szlaku sygnalizacyjnego TGF- β (similar to mothers against decapentaplegic homolog 2); **STAT3** – transduktor sygnału i aktywator transkrypcji-3 (signal transducer and activator of transcription-3); **TAM** – makrofagi związane z nowotworem (tumor-associated macrophages); **TAN** – neutrofile związane z nowotworem (tumor-associated neutrophils); **TCR** – receptor limfocytów T (T cell receptor); **TGF- β** – transformujący czynnik wzrostu- β (transforming growth factor- β); **TIMP-1** – tkankowy inhibitor metaloproteinaz 1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1); **TNFR-2** – receptor czynnika martwicy nowotworu 2 (tumor necrosis factor receptor 2); **TNF- α** – czynnik martwicy nowotworu- α (tumor necrosis factor- α); **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (vascular endothelial growth factor).

WSTĘP

Komórki MDSC (myeloid-derived suppressor cells) to heterogenna populacja niedojrzałych komórek pochodzenia mieloidalnego, które charakteryzują się znaczną aktywnością supresorową i odgrywają istotną rolę w progresji i przerzutowaniu nowotworów. Komórki te rozpoznawano u pacjentów cierpiących na różnego rodzaju nowotwory już od wielu lat. Pierwsze doniesienia na temat komórek mieloidalnych o właściwościach supresorowych, nazywanych wówczas naturalnymi komórkami supresorowymi, pojawiły się w latach 80. ubiegłego wieku. Później komórki identyfikowane u chorych określano jako niedojrzałe komórki mieloidalne lub mieloidalne komórki supresorowe. W odpowiedzi na niejednorodną nomenklaturę stosowaną w opracowaniach naukowych, w 2007 r. wprowadzono termin MDSC, który trafnie określa zarówno pochodzenie, jak i funkcję tych komórek [29]. Obecnie, wśród nich wyodrębnia się dwie subpopulacje: monocytarne MDSC (monocytic MDSC, M-MDSC) oraz granulocytarne MDSC (polymorphonuclear MDSC, PMN-MDSC). Ze względu na znaczenie tych komórek w obrazie klinicznym choroby nowotworowej, redukcja efektu supresorowego spowodowanego przez komórki MDSC wydaje się niezwykle obiecującą stra-

tegią terapeutyczną. W artykule omówiono czynniki warunkujące powstawanie i akumulację komórek MDSC, metody identyfikacji fenotypowej tych komórek, a także wykorzystywane przez nie mechanizmy supresji. Przedstawiono także najnowsze badania dotyczące terapii przeciwnowotworowych, których celem jest przywrócenie reaktywności układu odpornościowego przez redukcję supresorowego efektu komórek MDSC.

POWSTAWANIE I AKUMULACJA MDSC

Komórki MDSC powstają w szpiku kostnym z mieloidalnych komórek progenitorowych podczas procesu mielopozy zaburzonego przez czynniki pochodzenia nowotworowego. Czynniki te wpływają na proliferację i różnicowanie komórek hematopoetycznych oraz aktywują mechanizmy supresji wykorzystywane przez komórki MDSC. Główną rolę w regulowaniu procesu mielopozy pełnią czynniki wzrostu, takie jak czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF), czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF) oraz czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF), których podwyższone stężenie stwierdza się w trakcie rozwoju wielu rodzajów nowotworów [1]. W badaniach wykorzystujących

mysie modele nowotworów wykazano, że GM-CSF oraz G-CSF wydzielany przez mikrośrodowisko nowotworowe powoduje różnicowanie komórek MDSC z komórek progenitorowych szpiku kostnego, a neutralizacja tych czynników obniża ich liczebność w śledzionach, krwi oraz guzach [22, 57]. Mimo że powodują zwiększoną proliferację i akumulację niedojrzałych komórek mieloidalnych, nie wystarczają do aktywacji mechanizmów supresji wykorzystywanych przez MDSC [62]. Za uruchomienie szlaków sygnałowych determinujących aktywność komórek MDSC są odpowiedzialne inne czynniki, do których należą m.in. interleukina-6 (IL-6), czynnik martwicy nowotworu (TNF- α), IL-1 β , prostaglandyna E2 (PGE₂) oraz białka wiążące wapń S100A8 i S100A9.

Udział IL-6 w indukowaniu komórek MDSC wykazano zarówno u pacjentów, jak i w licznych modelach mysich nowotworów. Badania przeprowadzone na myszach wykazały, że podwyższone stężenie IL-6 indukowało fosforylację czynnika STAT3 zwiększając jednocześnie właściwości supresorowe komórek MDSC. Natomiast po neutralizacji tej cytokiny odnotowano zahamowanie akumulacji komórek MDSC i spowolnienie rozwoju nowotworu w mysim modelu raka przetyku oraz zwiększenie wrażliwości na chemioterapeutyki w modelu lekoopornego raka wątroby [12, 114]. Zaobserwowano, że IL-6 razem z GM-CSF indukują ekspresję czynnika transkrypcyjnego C/EBP β , który bierze udział w kontroli ekspresji arginazy-1 i syntazy tlenu azotu - enzymów odpowiedzialnych za aktywność supresorową komórek MDSC [62]. Z tego powodu cytokiny te są wykorzystywane w protokołach różnicowania komórek szpikowych w kierunku komórek MDSC w warunkach *in vitro* [62]. Poza IL-6, czynnikiem który może być stosowany razem z GM-CSF w hodowli komórek MDSC jest PGE₂ [72]. Mao i wsp. wykazali, że PGE₂ aktywuje szlak p38MAPK/ERK w monocytach, prowadząc do różnicowania tych komórek w kierunku komórek M-MDSC o charakterystyce zbliżonej do komórek pozyskanych od pacjentów z rozwijającym się czerniakiem [61]. PGE₂ indukuje także ekspresję receptora CXCR4, umożliwiając komórkom MDSC migrację w kierunku nowotworu [73]. W rozwijającym się nowotworze obserwuje się również podwyższoną ekspresję TNF- α . Oddziaływanie transbłonowej postaci TNF- α z receptorem TNFR-2 obecnym na komórkach MDSC indukuje fosforylację białka p38 i aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, co prowadzi do uruchomienia w tych komórkach mechanizmów supresji wobec limfocytów T [43]. W wyniku wiązania TNF- α do receptora TNFR-2, zachodzi aktywacja białka c-FLIP i zmniejsza się aktywność kaspazy-8, powodując zahamowanie apoptozy komórek MDSC i ich zwiększoną akumulację w guzie nowotworowym [119]. Oddziaływanie transbłonowej postaci TNF- α z receptorem TNFR-2 indukują także ekspresję receptora CXCR4 wpływającego na ukierunkowanie migracji komórek MDSC. Potwierdzeniem tej obserwacji jest wynik doświadczenia przeprowadzonego z wykorzystaniem myszy z nokautem genów receptorów TNF (*Tnfr^{-/-}*): u których stwierdzono mniej komórek MDSC we krwi, śledzionach oraz tkance nowo-

tworowej niż u myszy dzikich, natomiast w szpiku kostnym liczebność komórek MDSC u myszy z nokautem i dzikich była porównywalna [3]. Ważną rolę w indukcji akumulacji komórek MDSC podczas procesu nowotworzenia pełni także IL-1 β . Wykazano, że wysokie stężenie IL-1 β u myszy z rozwijającym się nowotworem zaburza hematopoezę i akumulację niedojrzałych komórek MDSC w śledzionie, co może zostać zahamowane przez zastosowanie w terapii antagonisty receptora IL-1R [94]. Ponadto, nadekspresja IL-1 β u myszy transgenicznych może zwiększać akumulację komórek MDSC we wczesnym stadium rozwoju raka żołądka [102]. Tu i wsp. udowodnili, że powstawanie komórek MDSC z udziałem IL-1 β jest zależne od oddziaływania cytokiny z receptorem IL-1R i aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [102]. Innymi czynnikami regulującymi zarówno proces akumulacji MDSC w guzach nowotworowych, jak i aktywność supresorową komórek MDSC są białka wiążące wapń S100A8 i S100A9. W mikrośrodowisku nowotworowym są one wydzielane przez różne komórki, w tym komórki MDSC. Oddziałują z receptorami końcowych produktów zaawansowanej glikacji (RAGE) na komórkach MDSC i aktywują czynnik transkrypcyjny NF- κ B [92].

Rekrutacja komórek MDSC do mikrośrodowiska nowotworu jest zależna od chemokin, które są chemoatraktantem komórek wykazujących ekspresję odpowiednich receptorów chemokinowych. Wśród chemokin warunkujących chemotaksję komórek MDSC wymienia się ligandy receptorów CCR2, CCR5 oraz CXCR4. CCR2 jest receptorem charakterystycznym komórek monocytarnych, a jego oddziaływanie z ligandami, w tym z chemokiną CCL2, powoduje migrację komórek do krwiobiegu, a następnie do tkanek limfatycznych czy mikrośrodowiska nowotworu. Wykazano, że monocytarne komórki MDSC obecne w guzie mysiego czerniaka B16 wykazują ekspresję receptora CCR2. Natomiast pozbawienie myszy genu tego receptora sprawiło, że akumulacja komórek MDSC w guzie nowotworowym była w znacznym stopniu ograniczona [54]. W badaniach z wykorzystaniem mysiego modelu raka jelita grubego, wykazano, że CCL2 wytwarzana przez komórki nowotworowe wpływa na akumulację komórek MDSC, zarówno monocytarnych jak i granulocytarnych oraz powoduje wzrost aktywności supresorowej komórek PMN-MDSC [13]. U pacjentek cierpiących na raka jajnika zidentyfikowano natomiast komórki M-MDSC wykazujące wysoką ekspresję receptora CXCR4, którego ligandem jest chemokina CXCL12. Duże stężenie tej chemokiny odnotowano w płynie wodobrzusza pacjentek [73]. W mysim modelu raka gruczołu piersiowego, fibroblasty związane z nowotworem (CAF) w odpowiedzi na progesteron wytwarzały więcej CXCL12, a blokowanie oddziaływania CXCL12 z receptorem CXCR4 powodowało obniżenie odsetka komórek MDSC w mikrośrodowisku nowotworu [75]. Inni badacze podkreślają rolę ligandów receptora CCR5 w migracji komórek MDSC. W badaniach z wykorzystaniem transgenicznych myszy *ret*, u których dochodzi do spontanicznego rozwoju czerniaka zaobserwowano zwiększony

naciek komórek MDSC wykazujących ekspresję receptora CCR5 do mikrośrodowiska nowotworu [104]. Podwyższony odsetek CCR5-pozytywnych komórek MDSC stwierdzony w tkankach nowotworowych pobranych od pacjentów z czerniakiem korelował ze stężeniem ligandów tego receptora - CCL3, CCL4 oraz CCL5 [6].

FENOTYP I IDENTYFIKACJA KOMÓREK MDSC

Identyfikacja komórek MDSC u myszy

U myszy, komórki MDSC początkowo były identyfikowane na podstawie ekspresji markerów CD11b i Gr-1. Badania prowadzone w latach 90. ub.w. wykazały, że komórki MDSC są heterogenną populacją, w obrębie której wyróżniano komórki o wysokiej oraz niskiej ekspresji markera Gr-1. Później okazało się, że przeciwciała monoklonalne anti-Gr-1 wiążą z różną wydajnością dwa epitopy - Ly6C i Ly6G, które występują na powierzchni komórek o odmiennej charakterystyce. Dzięki tym markerom wśród komórek MDSC możliwa jest identyfikacja dwóch subpopulacji: monocytarnych MDSC, charakteryzujących się wysoką ekspresją Ly6C oraz małą ziarnistością (CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G^{SSC^{low}}) i granulocytarnych MDSC, które wykazują niski poziom ekspresji Ly6C, wysoki Ly6G oraz dużą ziarnistość (CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G^{SSC^{high}}). Wymienione markery pozwalają jedynie na wstępną identyfikację komórek MDSC. Oprócz nich, wśród cząsteczek obecnych na powierzchni komórek M-MDSC, wyróżnia się F4/80, CD115, CD49d, CCR2. Natomiast komórki PMN-MDSC można charakteryzować również na podstawie ekspresji cząsteczek CD115 i CD244. Markery te nie są jednak uniwersalne dla wszystkich mysich modeli nowotworów, dlatego też nadal większość metod identyfikacji komórek MDSC opiera się o analizę ekspresji cząsteczek CD11b, Ly6C i Ly6G.

W modelu mysiego raka jelita grubego, monocytarne komórki MDSC wykazujące ekspresję receptora IL-4 (IL-4Rα/CD124) charakteryzowały się aktywnością supresorową wobec limfocytów T cytotoksycznych, w przeciwieństwie do komórek CD124-negatywnych [31]. Obecność markera CD124 na komórkach MDSC wykazano także w mysim modelu raka sutka. Zaobserwowano, że blokowanie szlaku sygnałowego zależnego od receptora IL-4Rα prowadzi do apoptozy komórek MDSC, a to potwierdza udział tej cząsteczki w regulowaniu aktywności komórek MDSC [84]. Ekspresja markera CD124 na komórkach MDSC nie jest jednak niezbędna do utrzymania supresorowego statusu tych komórek, co wykazali Sinha i wsp. [93]. Brak ekspresji IL-4Rα na komórkach MDSC nie wpływał negatywnie na ich aktywność supresorową. Innym markerem obecnym na powierzchni komórek M-MDSC jest integryna CD49d, a znakowanie tej cząsteczki można stosować razem z CD11b alternatywnie do Gr-1 w celu rozróżnienia dwóch subpopulacji komórek [35]. Komórki M-MDSC wykazują także ekspresję receptora chemokiny CCL2 – CCR2 [54]. Jak wcześniej opisano, CCR2 warunkuje zdol-

ność do migracji komórek M-MDSC w kierunku guza nowotworowego. Komórki M-MDSC można także zidentyfikować na podstawie ekspresji markera F4/80, charakterystycznego dla makrofagów. Należy jednak zaznaczyć, że ekspresja tej cząsteczki na powierzchni komórek M-MDSC jest znacznie niższa niż na powierzchni makrofagów związanych z nowotworem (TAM) [30]. Markrem wspólnym dla komórek M-MDSC i PMN-MDSC jest CD115 – receptor M-CSF. Huang i wsp. zaobserwowali, że komórki MDSC wykazujące ekspresję CD115 hamowały proliferację limfocytów T oraz indukowały ich polaryzację w kierunku limfocytów T regulatorowych (Treg) [44]. Jednak badania przeprowadzone przez Youn i wsp. potwierdziły tę obserwację jedynie w dwóch z kilku badanych mysich modeli nowotworów [117]. Ten sam zespół wykazał, że komórki PMN-MDSC wyizolowane od myszy obarczonych nowotworem, w przeciwieństwie do neutrofilii wyizolowanych ze zdrowych myszy, miały na swojej powierzchni zarówno cząsteczkę CD115, jak i CD244 [116]. Komórki CD244⁺, w przeciwieństwie do komórek niewykazujących ekspresji tego markera, miały aktywność supresorową wobec limfocytów T.

Identyfikacja komórek MDSC u ludzi

Pierwsze doniesienia na temat mieloidalnych komórek supresorowych u ludzi pojawiły się w 1995 r., gdy u pacjentów cierpiących na nowotwory głowy i szyi, u których stwierdzono podwyższone stężenie GM-CSF, zidentyfikowano komórki CD34⁺ zdolne do hamowania aktywności limfocytów T [76]. Ze względu na brak ludzkiego homologa białka Gr-1 występującego u myszy, charakterystyka fenotypowa mieloidalnych komórek supresorowych u pacjentów jest utrudniona. Początkowo komórki te opisywano jako pozbawione markerów liniowych (CD3, CD14, CD19, CD57), wykazujące ekspresję markerów charakterystycznych dla mieloidalnych komórek progenitorowych – CD33 i CD13, jednocześnie niewykazujące ekspresji markerów komórek dojrzałych – HLA-DR i CD15 [20]. Obecnie, podobnie jak u myszy, u ludzi wyróżnia się populacje komórek M-MDSC, które według Bronte i wsp. są opisywane jako CD11b⁺CD14⁺HLA-DR^{-/low}CD15⁻ oraz PMN-MDSC, które wykazują fenotyp CD11b⁺CD14⁻CD15⁺ lub CD11b⁺CD14⁻CD66⁺ [7]. U pacjentów występują także komórki Lin⁻ (CD3⁻CD14⁻CD15⁻CD19⁻CD56⁻) HLA-DR⁺CD33⁺, które tworzą heterogenną populację niedojrzałych komórek progenitorowych, zwanych niedojrzałymi lub wczesnymi MDSC (immature MDSC, early-stage MDSC) [7]. Dumitru i wsp. zaproponowali inną metodę identyfikacji komórek MDSC, która zakłada podział na sześć subpopulacji: MDSC1 (CD14⁺IL-4Rα⁺), MDSC2 (CD15⁺IL-4Rα⁺), MDSC3 (Lin⁻HLA-DR⁻CD33⁺), MDSC4 (CD14⁺HLA-DR^{low/-}), MDSC5 (CD11b⁺CD14⁻CD15⁺) oraz MDSC6 (CD15⁺FSC^{low}SSC^{high}) [23]. Oprócz wymienionych markerów, klinicyści często rozszerzają analizę o oznaczenie cząsteczek, takich jak CD66b, pSTA3, CD13, CD16, CD34, a także o określenie poziomu ekspresji enzymów odpowiedzialnych za aktywność supresorową – Arg1 i iNOS oraz poziomu wytwarzania

ROS [20]. Częstość występowania poszczególnych subpopulacji komórek MDSC jest różna w zależności od rodzaju nowotworu, jak i stadium zaawansowania choroby. Liczebność oraz metody identyfikacji komórek MDSC u pacjentów cierpiących na różnego rodzaju nowotwory wyczerpująco opisali Elliot i wsp. [24].

Komórki MDSC a monocyty i neutrofile

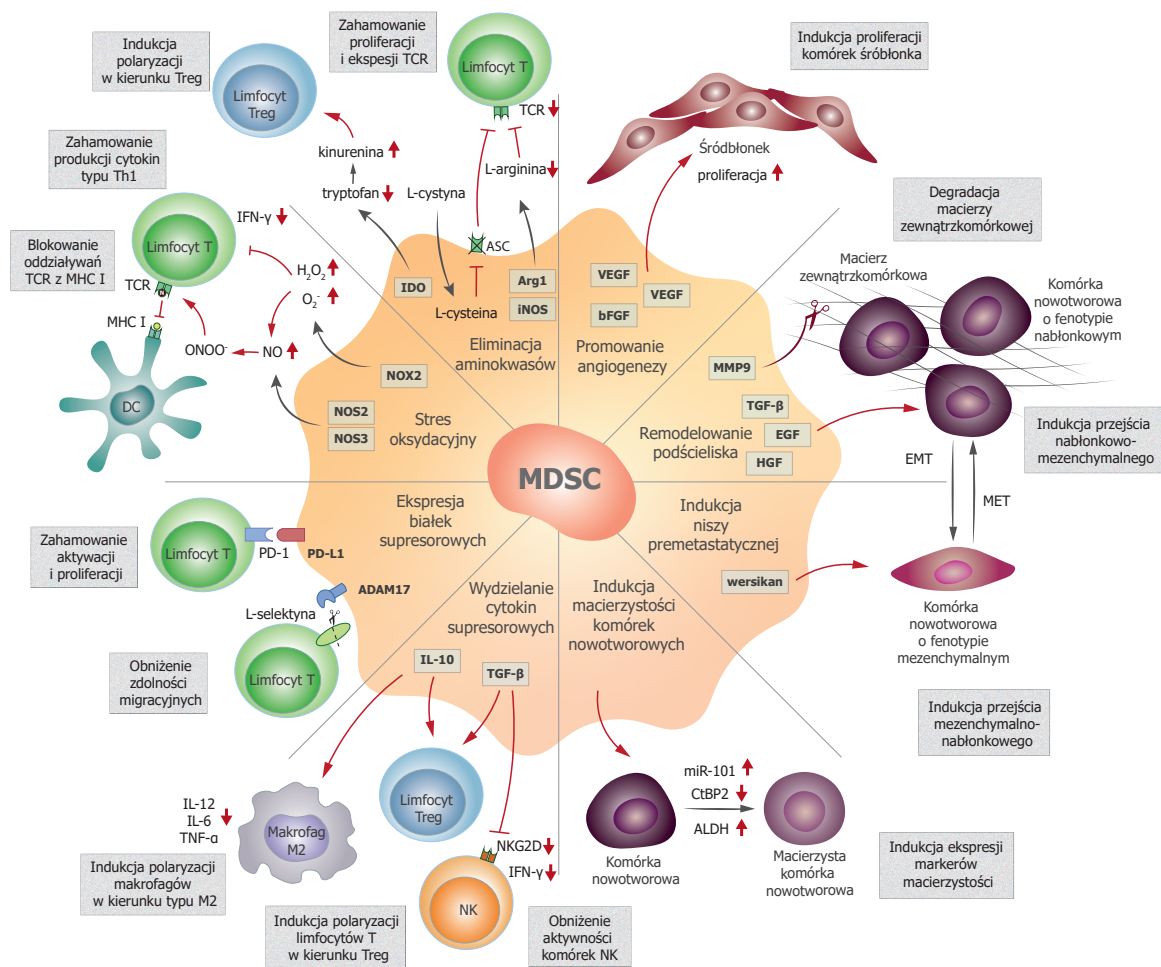
Należy podkreślić, że komórki MDSC powstające w wyniku rozwijającego się nowotworu, są fenotypowo podobne do neutrofilii oraz monocytów obecnych zarówno u zdrowych myszy jak i ludzi. Dlatego też, najczęściej w celu prawidłowej identyfikacji komórek MDSC, niezbędne jest rozszerzenie ich charakterystyki, zarówno o oznaczenie ekspresji markerów świadczących o niedojrzałym statusie komórek, jak również o określenie ich aktywności supresorowej. Wśród komórek mieloidalnych wykazujących właściwości pronowotworowe, oprócz M-MDSC i PMN-MDSC wyróżnia się także makrofagi związane z nowotworem (TAM) oraz neutrofile związane z nowotworem (TAN). U myszy, makrofagi TAM, podobnie jak komórki M-MDSC wykazują ekspresję markerów CD11b oraz Ly6C, dlatego też często rozróżnienie tych dwóch populacji na podstawie oznaczenia tych markerów jest utrudnione. Jednak, wraz ze wzrostem stopnia zróżnicowania komórek M-MDSC w kierunku komórek TAM, maleje poziom ekspresji cząsteczki Ly6C, przy jednoczesnym wzroście ekspresji cząsteczek MHC II, CD115 oraz F4/80 [7]. Poza tym makrofagi TAM wykazują wyższy poziom ekspresji arginazy-1, czynnika transkrypcyjnego IRF8 oraz białka odpowiedzialnego za hamowanie procesu apoptozy – c-FLIP. U ludzi, fenotyp CD14⁺CD11b⁺ wykazują zarówno komórki M-MDSC jak i makrofagi TAM, jednak rozszerzenie analizy o określenie ekspresji markerów HLA-DR oraz CD64, które występują na powierzchni komórek TAM, pozwala na rozróżnienie tych dwóch populacji [24]. Zarówno w myszy komórki PMN-MDSC, jak i neutrofile wykazują ekspresję markerów CD11b i Ly6G. Komórki PMN-MDSC i neutrofile występujące u ludzi charakteryzuje fenotyp CD11b⁺CD15⁺. Niemniej jednak, można odróżnić je na podstawie ich morfologii. Dojrzałe neutrofile mają segmentowane jądro, a komórki PMN-MDSC, które są opisywane jako niedojrzała populacja komórek granulocytarnych, mają jądro w kształcie podkowy („ring shaped”). Ze względu na różnicę w morfologii tych komórek, możliwa jest ich separacja przez wirowanie w gradiencie gęstości. Dojrzałe neutrofile znajdują się we frakcji o wysokiej gęstości (granulocytów), a komórki PMN-MDSC są odnajdywane we frakcji o niskiej gęstości (monocytów) [66]. Jednak metoda ta jest odpowiednia jedynie do analizy komórek krwi obwodowej, a jej wykorzystanie do analizy komórek infiltrujących tkankę nowotworową jest ograniczone. Poza różnicami w morfologii, komórki PMN-MDSC wykazują mniejszą zdolność do fagocytozy niż neutrofile, jednocześnie charakteryzują się większym wytwarzaniem ROS, arginazy-1 oraz mieloperoksydaz [116]. U ludzi, oprócz markerów CD11b i CD15, neu-

trofile wykazują ekspresję cząsteczek CD16 i CD66b [24]. Niedawno zidentyfikowano dodatkowy marker pozwalający na rozróżnienie komórek PMN-MDSC i granulocytów u pacjentów. Komórki PMN-MDSC izolowane z krwi obwodowej pacjentów cierpiących na nowotwory wykazywały podwyższoną ekspresję receptora wiążącego utlenioną postać lipoproteiny LDL – LOX-1, w przeciwieństwie do granulocytów, które charakteryzowano jako LOX-1-negatywne [14]. Dużo większym problemem jest rozróżnianie komórek PMN-MDSC i komórek TAN o właściwościach pronowotworowych (N2). Oprócz tego, że obie populacje wykazują ten sam fenotyp, nie różnią się morfologią oraz wykorzystują podobne mechanizmy supresji [7]. Z tego powodu, niektórzy badacze uważają, że populacje tych komórek są tożsame. Jednak analiza transkryptomu komórek PMN-MDSC, niedojrzałych neutrofilii oraz komórek TAN przeprowadzona przez Fridlendera i wsp. wykazała różnice między tymi populacjami [28].

Opisane obserwacje przedstawiają niejedolitą charakterystykę fenotypową komórek MDSC, często zależną od rodzaju badanego nowotworu oraz miejsca ich występowania. Ze względu na niedostateczne poznanie unikalnych markerów komórek MDSC, ich oznaczenie w tkankach metodami immunohistochemicznymi nie jest możliwe [7, 24]. Jedynie wieloparametrowa analiza metodą cytometrii przepływowej, jednocześnie uzupełniona o analizę funkcjonalną komórek, pozwala na identyfikację komórek MDSC, zarówno u myszy jak i u ludzi. Ich niezwykła plastyczność i heterogenność oraz kluczowa rola jaką pełnią w progresji nowotworu, wskazuje na potrzebę poznania nowych markerów ułatwiających identyfikację fenotypową tych komórek podczas badań diagnostycznych, co umożliwiłoby wykorzystanie monitorowania zmian w liczebności komórek MDSC jako markera prognostycznego.

UDZIAŁ KOMÓREK MDSC W PROGRESJI NOWOTWORU

Komórki MDSC promują rozwój nowotworu przez oddziaływanie na komórki układu odpornościowego i komórki nieimmunologiczne tworzące razem z komórkami nowotworowymi mikrośrodowisko nowotworowe (ryc. 1). Działając na komórki immunokompetentne, MDSC mogą hamować swoiste i nieswoiste reakcje odpornościowe wspomagając ucieczkę nowotworu spod nadzoru immunologicznego. Wykorzystują do tego różne mechanizmy immunosupresji, takie jak eliminacja aminokwasów niezbędnych do aktywacji limfocytów T, wytwarzanie reaktywnych form tlenu i azotu, cytokin i białek o charakterze supresorowym, a także indukcja innych komórek supresorowych, takich jak limfocyty T regulatorowe, czy makrofagi TAM. Komórki MDSC biorą także udział w aktywacji procesów niezależnych od odpowiedzi odpornościowej, takich jak angiogeneza, degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej oraz tworzenie niszy premetastatycznej.



Ryc. 1. Udział komórek MDSC w progresji nowotworu – mechanizmy wykorzystywane przez komórki MDSC warunkujące immunosupresję, neoangiogenezę oraz przerzutowanie. Rozwinięcie skrótów zastosowanych na rycinie przedstawiono w wykazie skrótów

Mechanizmy immunosupresji wykorzystywane przez komórki MDSC

Jednym z pierwszych opisywanych mechanizmów immunosupresji wykorzystywanych przez komórki MDSC jest eliminacja aminokwasów, takich jak arginina, tryptofan oraz cysteina, które są niezbędne do prawidłowej proliferacji oraz aktywacji limfocytów T. Obniżone stężenie L-argininy obserwuje się często u pacjentów cierpiących na różnego rodzaju nowotwory. Komórki MDSC wykazują ekspresję enzymów arginazy-1 (Arg1) oraz indukowanej syntazy tlenku azotu 1 i 2 (iNOS1, iNOS2), których substratem jest L-arginina. W rezultacie, stężenie aminokwasu jest obniżone w miejscu występowania komórek MDSC, co wpływa na zaburzone funkcjonowanie limfocytów T. Brak dostępu do argininy powoduje obniżenie poziomu ekspresji łańcucha zeta cząsteczek CD3 (CD3ζ) na powierzchni limfocytów T uniemożliwiają

prawidłowe funkcjonowanie receptorów TCR i aktywację tych komórek. Poza tym, pod nieobecność argininy dochodzi do zatrzymania limfocytów T w fazie G0-G1, co jest spowodowane zahamowaniem translacji cykliny-3 oraz kinazy zależnej od cykliny-4 (cdk4) [78]. Komórki MDSC ograniczają także limfocytom T dostępność cysteiny. Aminokwas ten warunkuje prawidłowe funkcjonowanie limfocytów T, zwłaszcza podczas ich aktywacji, proliferacji i różnicowania. W prawidłowych warunkach, cysteina jest dostarczana limfocytom T przez dojrzałe komórki mieloidalne, takie jak komórki dendrytyczne lub makrofagi, za pomocą transportera aminokwasów ASC (alanina, seryna, cysteina). Jest to konieczne z tego względu, że limfocyty T nie mają cystationazy – enzymu uczestniczącego w szlaku przekształcenia metioniny do cysteiny, nie wykazują także ekspresji transportera cystyny, przez co nie są zdolne do pobrania utlenionego aminokwasu i jego redukcji wewnątrz komórki. Komórki

MDSC, podobnie jak inne komórki mieloidalne, są zdolne do pobierania cystyny, a ze względu na zwiększoną ich akumulację w mikrośrodkowisku nowotworowym zużywają cystynę znacznie zmniejszając jej stężenie w środowisku. Należy zaznaczyć, że komórki MDSC nie wykazują ekspresji transportera ASC, w związku z czym nie są zdolne do przekazywania cysteiny limfocytom T, co wpływa na zahamowanie procesu aktywacji limfocytów [95]. Oprócz argininy i cysteiny, komórki MDSC zmniejszają także dostępność tryptofanu w mikrośrodkowisku przez wytwarzanie 2,3-dioksygenazy indolaminy (IDO), która jest odpowiedzialna za metabolizm tego aminokwasu do kinureniny. Wykazano, że pod nieobecność tryptofanu w limfocytach T dochodzi do aktywacji kinazy GCN2, która wiąże wolne, niezwiązane z aminokwasem cząsteczki transferowego RNA, co prowadzi do indukcji zintegrowanej odpowiedzi na stres (integrated stress response, IRS) powodującej zahamowanie ekspresji białek [67]. Poza tym, kinurenina obecna w mikrośrodkowisku przez oddziaływanie z receptorem węglowodoru arylu w limfocytach T prowadzi do zahamowania szlaku zależnego od IL-2 i do zmniejszenia aktywności komórek efektorowych oraz indukcji limfocytów T regulatorowych przez uruchomienie ekspresji białek PTEN i CTLA-4 [85].

Komórki MDSC mogą powodować immunosupresję także przez wydzielanie reaktywnych form tlenu (ROS) i azotu (RNS). Do reaktywnych form tlenu, wydzielanych przez MDSC, należą anion ponadtlenkowy (O_2^-) oraz nadtlenek wodoru (H_2O_2), które są produktem reakcji katalizowanej przez oksydazę NADPH – NOX2, której ekspresja jest zależna od aktywacji czynnika transkrypcyjnego STAT3 [16]. Natomiast reaktywne formy azotu, takie jak nadtlendioazotyn ($ONOO^-$) powstają w wyniku reakcji cząsteczek ROS i tlenu azotu, który jest produktem reakcji zachodzących w obecności arginazy oraz syntazy tlenu azotu typu 2 i typu 3 (NOS2, NOS3). Ze względu na dużą niestabilność reaktywnych form tlenu i azotu, cząsteczki te wpływają na komórki docelowe znajdujące się w bezpośrednim sąsiedztwie komórek MDSC wydzielających ROS. Stres oksydacyjny wywołany przez reaktywne formy tlenu może zahamować proliferację i aktywację limfocytów T oraz powodować indukcję apoptozy w tych komórkach. Cząsteczki ROS hamują aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w efektorowych limfocytach T, powodując obniżenie wytwarzania cytokin typu Th1 [60]. Poza tym, ROS hamuje proces remodelowania cytoszkieletu limfocytów T przez utlenianie kofiliny, białka warunkującego depolimeryzację aktyny fibrylarnej, prowadząc do zahamowania aktywności oraz obniżenia zdolności chemotaktycznych tych komórek [50]. Cząsteczki RNS wytwarzane przez komórki MDSC powodują nitrację reszt tyrozynowych receptorów TCR limfocytów T cytotoksycznych, a to obniża zdolność oddziaływania TCR z kompleksami MHC klasy I-antypgen [68]. Zdolność limfocytów T do rozpoznawania antypgenów związanych z cząsteczkami MHC klasy I może być zahamowana także pośrednio przez nitrację białek MHC, co uniemożliwia utworzenie pra-

widłowego kompleksu MHC I i peptydu [37]. Poza tym, cząsteczki RNS powodują nitrację aminokwasów chemokin, takich jak CXCL12, CCL21, CCL2 i CCL5. Powoduje to zahamowanie zdolności migracyjnych limfocytów T przez obniżenie powinowactwa receptorów chemokinowych znajdujących się na ich powierzchni do nitrowanych chemokin [20].

Komórki MDSC hamują migrację dziewiczych limfocytów T do węzłów chłonnych przez obniżenie poziomu ekspresji L-selektyny (cząsteczki CD62L) odpowiedzialnej za zdolność limfocytów do toczenia się po śród-błonku. Obecne na powierzchni komórek MDSC białko błonowe ADAM17 przeprowadza reakcję proteolizy L-selektyny podczas bezpośredniego kontaktu komórek MDSC z dziewiczymi limfocytami T. Niemożliwa jest więc, zachodząca w węzłach chłonnych, aktywacja dziewiczych limfocytów T prowadząca do powstania swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej [36].

Bezpośrednie oddziaływanie komórek MDSC z limfocytami T cytotoksycznymi poprzez szlak PD-L1 – PD-1 powoduje natomiast zahamowanie ścieżki sygnałowej uruchamianej przez sygnał z receptora TCR i prowadzi do zahamowania proliferacji, wytwarzania cytokin oraz zdolności cytotoksycznych limfocytów T [34]. Wykazano, że ekspresja cząsteczki PD-L1 na komórkach MDSC pochodzenia nowotworowego jest zależna od aktywności czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α indukowanego w warunkach hipoksji [71]. Zaobserwowano również, że zablokowanie PD-L1 w tych warunkach obniża aktywność supresorową komórek MDSC i przywraca limfocytom T zdolność do wytwarzania IFN- γ . Obserwacje te mają szczególne znaczenie w kontekście badanych terapii z zastosowaniem czynników blokujących cząsteczki PD-1 lub PD-L1.

Komórki MDSC wpływają na komórki docelowe także przez zdolność do wytwarzania cytokin supresorowych, takich jak TGF- β i IL-10, która wzrasta w warunkach hipoksji [7, 71]. Wykazano, że komórki MDSC przez wytwarzanie TGF- β i IL-10 indukują polaryzację limfocytów T w kierunku komórek Treg o właściwościach supresorowych [44]. Ponadto, z naszych badań wynika, że komórki MDSC izolowane z guzów nowotworowych z wyciszoną ekspresją TGF- β 1 miały obniżoną zdolność do hamowania proliferacji limfocytów T CD4 $^+$ i CD8 $^+$ [82]. Komórki MDSC wykazujące ekspresję TGF- β w formie związanej z błoną komórkową powodują zahamowanie aktywności cytotoksycznej komórek NK oraz zmniejszenie poziomu ekspresji receptora NKG2G i wytwarzanie IFN- γ przez te komórki prowadząc do ich anergii [55]. Komórki MDSC wytwarzając IL-10 wpływają na aktywność i polaryzację makrofagów. Beury i wsp. wykazali, że IL-10 wytwarzana przez komórki MDSC obniża zdolność makrofagów do wytwarzania IL-12, IL-6 oraz TNF- α i indukuje ich polaryzację w kierunku komórek typu M2 o właściwościach pronowotworowych [5]. Jednak makrofagi w obecności komórek MDSC wytwarzających IL-10 wydzielają więcej tlenu azotu, co jest cechą prozapal-

ných komórek typu M1 [5]. Interleukina-10 wytwarzana przez komórki MDSC obniża także zdolność komórek dendrytycznych do wydzielania IL-12 oraz aktywacji limfocytów T, co wykazano w mysim modelu raka wątroby [42]. W naszych badaniach zaobserwowaliśmy, że neutralizacja IL-10 za pomocą przeciwciał lub wyciszenie ekspresji tej cytokiny w guzach mysiego raka jelita grubego, obniża odsetek komórek MDSC oraz ich aktywność supresorową, zwiększając skuteczność chemioimmunoterapii z udziałem cyklofosfamidu i szpilek na bazie komórek dendrytycznych [81, 83].

Nieimmunologiczne aspekty aktywności pronowotworowej komórek MDSC

Rozwój nowotworu jest uzależniony od dostępności tlenu oraz składników odżywczych, dlatego też jednym z głównych etapów kancerogenezy jest angiogeneza. Wykazano, że komórki MDSC mają znaczący wpływ na neowaskularyzację nowotworu, wytwarzając wiele czynników biorących udział w tym procesie. Przede wszystkim komórki MDSC wydzielają czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) oraz prokinetycinę 2/Bv8 (białko pierwotnie wyizolowane z wydzieliny skóry płaza *Bombina variegata*), których ekspresję warunkuje czynnik transkrypcyjny STAT3 [15]. Komórki MDSC wytwarzają także metaloproteinazę-9 (MMP9), która reguluje biodostępność VEGF przez uwalnianie cząsteczek tego białka z macierzy zewnątrzkomórkowej [15]. Wykazano, że obniżenie skuteczności terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem przeciwciał anti-VEGF jest spowodowane przez akumulację komórek MDSC, które są zdolne do podtrzymywania procesu neoangiogenezy nawet po neutralizacji VEGF [91].

Komórki MDSC odgrywają ważną rolę w tworzeniu niszy premetastatycznej, przygotowując mikrośrodowisko do przyjęcia przerzutów komórek nowotworowych. W badaniach na mysich modelach raka płuc i czerniaka, zaobserwowano akumulację komórek MDSC w płucach jeszcze przed utworzeniem przerzutów [49]. Natomiast w mysim modelu raka jelita grubego, komórki PMN-MDSC tworzyły niszę premetastatyczną w wątrobie. Ustalono również, że ich migracja do wątroby zależała od oddziaływania chemokiny CXCL1 z receptorem CXCR2 na komórkach MDSC [109]. Scenay i wsp. wykazali, że komórki mysiego raka gruczołu piersiowego wytwarzają w warunkach hipoksji czynniki, takie jak CCL2, G-CSF, TNF- α , VEGF, TIMP-1 i MMP9. W płucach myszy traktowanych supernatantem z hodowli tych komórek odnotowano zwiększoną liczbę ognisk przerzutowych po dożylnym podaniu komórek nowotworowych. Utworzenie przerzutów było poprzedzone zwiększoną rekrutacją do płuc komórek PMN-MDSC i komórek NK o obniżonej aktywności cytotoksycznej, które brały udział w tworzeniu niszy premetastatycznej [88].

Oprócz udziału w tworzeniu niszy premetastatycznej, komórki MDSC biorą czynny udział w procesie przerzutowania. MMP9, wytwarzana przez MDSC znajdujące się

w mikrośrodowisku guza pierwotnego, powoduje degradację macierzy zewnątrzkomórkowej, która prowadzi do uwolnienia komórek nowotworowych do krwiobiegu [4]. Ponadto, MDSC indukują proces przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT) komórek nowotworowych, w wyniku którego komórki te zmieniają swoją charakterystykę fenotypową i molekularną, przez co nabywają zdolności do migracji. W badaniach prowadzonych na mysim modelu czerniaka, Toh i wsp. zaobserwowali, że komórki PMN-MDSC indukowały proces EMT zachodzący w komórkach nowotworowych przez aktywację szlaków sygnałowych zależnych od TGF- β , czynnika wzrostu śródbłonna (EGF) oraz czynnika wzrostu hepatocytów (HGF) [99]. MDSC mogą także promować odwrotny proces, czyli przejście mezenchymalno-nabłonkowe (MET), dzięki któremu przerzutujące komórki nowotworowe mogą zasiedlić niszę przerzutową. Jak wykazali Gao i wsp., komórki M-MDSC wyizolowane z płuc myszy z rozwijającym się rakiem gruczołu piersiowego, indukowały proces MET przez wydzielanie wersikanu, który wpływał na zmniejszenie poziomu fosforylacji białka SMAD2 w komórkach nowotworowych [32]. Co więcej, podwyższony poziom ekspresji wersikanu odnotowano także w komórkach mieloidalnych wyizolowanych z płuc lub wątroby pacjentek chorych na raka gruczołu piersiowego, u których rozwinęły się przerzuty.

MDSC promują rozwój nowotworu oraz proces przerzutowania także przez indukcję macierzystości komórek nowotworowych (cancer stem cells, CSCs). Wykazano, że komórki MDSC powodują wzrost ekspresji dehydrogenazy aldehydowej (ALDH), która jest markerem macierzystości, w komórkach ludzkiego raka jajnika [17]. W tych samych badaniach zaobserwowano, że MDSC indukują ekspresję miR-101 w komórkach nowotworowych, co powoduje zahamowanie ekspresji białka CtBP2, które pełni funkcję korepresora genów warunkujących macierzystość komórek. Komórki raka jajnika wykazujące ekspresję miR-101 miały zdolność do tworzenia sferoidów, co jest cechą charakterystyczną CSCs, a także wykazywały zwiększony potencjał do przerzutowania [17]. Odnotowano również korelację między liczebnością komórek MDSC, a CSCs u pacjentek cierpiących na raka gruczołu piersiowego [77]. Dalsze badania wykazały, że MDSC przez wydzielanie IL-6 i tlenu azotu aktywują odpowiednio szlak STAT3 i Notch w komórkach raka gruczołu piersiowego, co powoduje przekształcenie ich w CSCs [77].

MDSC JAKO CEL TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWYCH

W ostatnich latach komórki MDSC stały się ważnym elementem w obrazie klinicznym choroby nowotworowej, a ich występowanie często koreluje ze złymi prognozami. Z obserwacji klinicznych wynika, że do akumulacji MDSC dochodzi w wielu rodzajach nowotworów, m.in. w pierwotnym raku wątroby, czerniaku, niedrobnokomórkowym raku płuc, raku trzustki, przełyku, żołądka i pęcherza. Ponadto wykazano, że MDSC występują znacznie częściej u pacjentów w trzecim i czwartym sta-

dium choroby, niż u pacjentów w pierwszym i drugim stadium [27]. Dlatego też podejmuje się próby opracowania terapii mających na celu obniżenie immunosupresji wywołanej przez komórki MDSC przez zahamowanie ich proliferacji, akumulacji i aktywności supresorowej, indukowanie ich dojrzewania lub eliminację (ryc. 2). Ponadto, proponowane strategie terapeutyczne często zakładają połączenie czynników redukujących supresję związaną z MDSC z konwencjonalną chemioterapią, czy immunoterapią ukierunkowaną na immunologiczne punkty kontroli [111]. W tabeli 1 zamieszczono opis badań klinicznych nad zastosowaniem szeroko pojętych inhibitorów komórek MDSC w schematach terapii przeciwnowotworowej.

Zahamowanie akumulacji MDSC

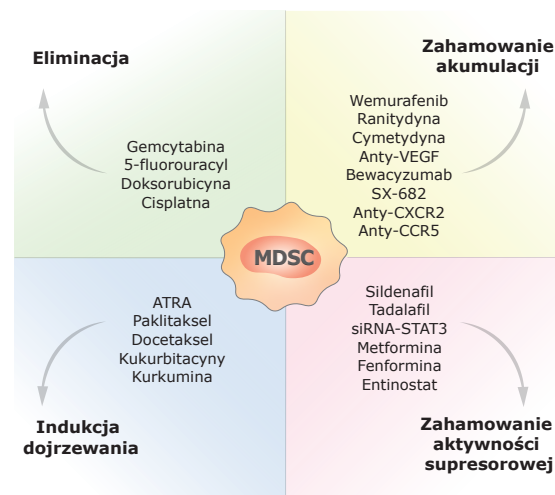
Strategie terapeutyczne mające na celu zahamowanie akumulacji komórek MDSC polegają na zablokowaniu czynników biorących udział w procesie przekształcenia komórek hematopoetycznych w komórki o charakterze supresorowym, a także eliminacji białek warunkujących migrację komórek MDSC w kierunku pierwotnego guza nowotworowego, czy też przerzutów. Jednym z czynników hamujących ekspansję komórek MDSC jest wemurafenib, inhibitor kinazy serynowo-treoninowej swoisty wobec zmutowanego białka B-RAF występującego w komórkach ludzkiego czerniaka. Wykazano, że u pacjentów z rozwijającym się czerniakiem, którzy otrzymali terapię na bazie wemurafenibu, dochodzi do obniżenia liczby komórek M-MDSC oraz PMN-MDSC. Badania rozszerzono o testy *in vitro*, w których dowiedziono, że wemurafenib hamuje powstawanie komórek MDSC przez zmianę profilu wydzielniczego komórek nowotworowych [63]. Hashimoto i wsp. zbadali natomiast wpływ inhibitora innej serynowo-treoninowej

- kinazy kazeinowej CK2 na populację komórek mieloidealnych w mikrośrodowisku nowotworowym. Wykazali, że zastosowany inhibitor CK2 obniżył liczebność komórek PMN-MDSC, co było spowodowane zahamowaniem procesu różnicowania komórek hematopoetycznych w kierunku komórek o charakterze supresorowym przez obniżenie poziomu ekspresji czynnika transkrypcyjnego C/EBP α [38].

Inną grupą leków oddziałującą na proces akumulacji MDSC są związki, takie jak ranitydyna i cymetydyna, antagoniści histydyny blokujący receptor H₂, powszechnie stosowane w terapii choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy. Ranitydyna, stosowana w mysich modelach raka gruczołu piersiowego, wykazywała aktywność przeciwnowotworową i przeciwprzerzutową, a dodatkowo powodowała zmniejszenie liczebności komórek MDSC [106]. Dalsze badania wykazały, że u myszy pozbawionych ekspresji receptora CCR2 nie obserwuje się wpływu ranitydyny na wzrost nowotworu, co wskazuje, że lek ten może wpływać na zdolność komórek MDSC do migracji zależną od ekspresji CCR2 [107]. Zaobserwowano również zmniejszoną liczbę komórek progenitorowych w szpiku kostnym myszy po długotrwałym przyjmowaniu ranitydyny [107]. Obecnie prowadzona jest próba kliniczna z udziałem zdrowych ochotników, której celem jest określenie wpływu ranitydyny na komórki układu odpornościowego, w tym limfocyty B i T, komórki NK, monocyty oraz komórki MDSC u ludzi (nr próby NCT03145012). Natomiast cymetydyna wykazuje inny mechanizm działania wobec komórek MDSC. Lek ten nie wpływa na proces ich różnicowania jak ranitydyna, ale promuje apoptozę MDSC przez zwiększenie ekspresji cząsteczek Fas i FasL na ich powierzchni i indukcję apoptozy zależnej od kaspazy-3 [120].

Inną strategią terapeutyczną wykorzystywaną w chorobach nowotworowych, która wpływa na akumulację komórek MDSC jest blokowanie VEGF za pomocą przeciwciał. Komórki MDSC oprócz tego, że wytwarzają ten czynnik wzrostu, mogą wykazywać także ekspresję receptora VEGFR1, co zaobserwowano u pacjentów cierpiących na przerzutującego raka nerki [52]. Zastosowanie bewacyzumabu - przeciwciała monoklonalnego swoistego wobec ludzkiego VEGF-A, wpłynęło hamująco na rekrutację VEGFR1-pozytywnych komórek mieloidalnych u myszy atymicznych obciążonych ludzkim rakiem nerki [52]. Chemioterapia wzbogacona o bewacyzumab powodowała również obniżenie liczebności komórek PMN-MDSC u pacjentów cierpiących na raka jelita grubego [58]. Obecnie prowadzone są badania kliniczne z udziałem pacjentów cierpiących na zaawansowanego raka nerki otrzymujących terapię składającą się z pazopanibu i bewacyzumabu, której celem jest m.in. redukcja liczebności komórek MDSC (nr próby NCT01684397).

Sunitynib, inhibitor receptorów kinaz tyrozynowych, który powoduje blokowanie szlaków sygnałowych zależnych od receptorów VEGFR, Flt3, c-Kit oraz CSF-1R [80], również hamuje akumulację komórek MDSC. W bada-



Ryc. 2. MDSC jako cel terapii przeciwnowotworowych – wykaz terapeutyków stosowanych w celu przywrócenia reaktywności układu odpornościowego poprzez redukcję efektu pronowotworowego komórek MDSC

niach klinicznych z udziałem pacjentów z rozwiniętymi przerzutami różnych rodzajów nowotworów wykazano, że sunitynib w połączeniu z radioterapią obniżał liczebność komórek M-MDSC oraz limfocytów Treg u pacjentów, którzy korzystnie odpowiadali na terapię [11]. Podobne wyniki odnotowano po zastosowaniu sunitynibu u pacjentów z rakiem nerki, a obniżenie liczebności MDSC korelowało z polaryzacją odpowiedzi w kierunku Th1 [51].

Migracja MDSC do mikrośrodowiska nowotworowego jest zależna od ekspresji chemokin oraz ich receptorów, dlatego też jedną ze strategii obniżenia aktywności komórek MDSC jest zablokowanie oddziaływań między chemokinami a tymi komórkami. Zablokowanie receptora CXCR2 za pomocą przeciwciał monoklonalnych zmniejszało akumulację komórek PMN-MDSC w mysim modelu mięśniakomięsaka prążkowanokomórkowego - nowotworu najczęściej występującego u dzieci - i przyczyniło się do zwiększenia skuteczności terapii z zastosowaniem przeciwciała anty-PD-1 [40]. W badaniach nad zastosowaniem cząsteczki SX-682 - antagonisty receptorów CXCR1 i CXCR2 jako potencjalnego leku przeciwnowotworowego, zaobserwowano obniżenie zdolności migracyjnych komórek MDSC *in vitro* [118]. Zastosowanie tego leku w terapii chorych z przerzutingącym czerniakiem jest przedmiotem I fazy badań klinicznych, a jednym z parametrów mierzonych podczas terapii będzie liczebność komórek MDSC u pacjentów (nr próby NCT03161431). Innym receptorem chemokin, który pełni istotną rolę w procesie migracji komórek MDSC jest CCR5. Wykazano, że zablokowanie oddziaływania CCR5-CCL5 może doprowadzić do zahamowania rozwoju raka trzustki, jelita grubego, stercza czy gruczołu piersiowego [27]. W badaniach prowadzonych na mysim modelu czerniaka zaobserwowano, że zastosowanie przeciwciał anty-CCR5 powodowało obniżenie liczebności komórek MDSC w guzie nowotworowym, co korelowało ze zwiększonym napływem limfocytów T oraz komórek NK do guza, a także zahamowaniem wzrostu nowotworu [97]. Podobny skutek zaobserwowano po zastosowaniu przeciwciał anty-CCR5 u myszy z rakiem żołądka. W tym przypadku, neutralizacja CCR5 dodatkowo przyczyniła się do zwiększenia skuteczności terapii z wykorzystaniem przeciwciała anty-PD-1 [115].

Zahamowanie aktywności supresorowej MDSC

Jednym z celów terapii skierowanych przeciwko MDSC jest obniżenie aktywności arginazy-1 i syntazy tlenu azotu, enzymów odpowiedzialnych za aktywność supresorową tych komórek. Wykazano, że inhibitory fosfodiesterazy typu 5 (PDE-5), stosowane zazwyczaj w leczeniu nadciśnienia płucnego oraz zaburzeń erekcji, przywracają aktywność cytotoksyczną limfocytów T przez zahamowanie aktywności supresorowej komórek MDSC. Jeden z inhibitorów PDE-5, sildenafil obniża ekspresję Arg1 i iNOS, a także IL-4R α w komórkach MDSC wyizolowanych z guzów mysiego raka jelita grubego, co powoduje zwiększenie aktywności limfocytów T, zaha-

mowanie wzrostu guzów, a także poprawę efektu terapeutycznego transferu adopcyjnego limfocytów T [89]. Podczas II fazy badań klinicznych z udziałem pacjentów cierpiących na raki płaskonabłonkowe głowy i szyi, określono wpływ innego inhibitora PDE-5, tadalafilu, na aktywność komórek MDSC (nr próby NCT00894413). Stwierdzono, że tadalafil obniża poziom ekspresji Arg1 i iNOS oraz redukuje liczebność komórek MDSC i limfocytów Treg we krwi pacjentów [9]. Tadalafil wykorzystano także w badaniach pilotażowych z udziałem pacjentów w zaawansowanym stadium czerniaka poddanych wcześniej immunoterapii z udziałem ipilimumabu lub chemioterapii (nr próby EudraCT-No: 2011-003273-28). Zaobserwowano obniżenie liczebności komórek M-MDSC we krwi, a także zahamowanie wytwarzania tlenu azotu przez te komórki, jednak tylko u pacjentów, u których na początku badań odnotowano stabilizację choroby [39].

Celem terapii ukierunkowanej na zablokowanie aktywności supresorowej MDSC mogą być białka biorące udział w głównych dla tych komórek szlakach sygnałowych. W badaniach poświęconych próbom zahamowania aktywności czynnika STAT3 wykorzystano koniugaty siRNA wyciszającego ekspresję STAT3 i oligonukleotydów zawierających niemetylowane sekwencje CpG, które są ligandem receptora TLR9 występującego na komórkach mieloidalnych, w tym na MDSC [41]. Zaobserwowano, że komórki PMN-MDSC izolowane z krwi chorych na raka stercza skutecznie pochłaniały koniugat CpG-STAT3siRNA, a efektem było zahamowanie ekspresji STAT3, czemu towarzyszyły zmniejszone wytwarzanie arginazy 1 i obniżona aktywność supresorowa tych komórek. W innych badaniach zastosowano wektory lentiwirusowe kodujące sekwencje shRNA skierowane przeciwko mRNA dla STAT3 w terapii mysiego czerniaka [25]. Zaobserwowano, że terapia powoduje zahamowanie wzrostu guzów u myszy, a komórki PMN-MDSC, izolowane ze śledzion myszy traktowanych wektorami lentiwirusowymi wykazywały obniżoną aktywność supresorową wobec limfocytów T CD8 $^+$. Ponownie, jak w przypadku wcześniej opisywanych doświadczeń z wykorzystaniem CpG-STAT3siRNA, obniżenie aktywności supresorowej zaobserwowano jedynie w przypadku komórek PMN-MDSC, a nie M-MDSC [25, 41].

Wpływ na aktywność supresorową komórek MDSC zaobserwowano w badaniach nad zastosowaniem w postaci terapii przeciwnowotworowej metforminy oraz fenforminy, wykorzystywanych powszechnie w leczeniu chorych z cukrzycą typu 2. Wykazano, że metformina przez aktywację kinazy AMPK α obniżała ekspresję czynnika HIF-1 α , co prowadziło do zahamowania ekspresji cząsteczek CD39/CD73 na komórkach MDSC izolowanych z krwi pacjentek z rakiem jajnika [56]. Cząsteczki CD39 i CD73 obecne na powierzchni komórek MDSC, a także komórek nowotworowych czy limfocytów T regulatorowych przeprowadzają reakcję hydrolizy zewnątrzkomórkowego ATP lub ADP do AMP, a następnie AMP do adenozyiny, która hamuje proliferację limfocytów T,

obniża zdolność komórek dendrytycznych do aktywacji limfocytów T, a także zmniejsza aktywność cytotoksyczną komórek NK [105]. Po zastosowaniu fenforminy zaobserwowano natomiast zmniejszoną ekspresję białek odpowiedzialnych za mechanizmy supresji w komórkach PMN-MDSC, takich jak S100A8, S100A9 oraz Arg1 [48]. Redukcja aktywności supresorowej komórek PMN-MDSC spowodowana przez fenforminę przyczyniła się także do zwiększenia skuteczności terapii opartej na przeciwciałach anty-PD-1 [48].

Innym potencjalnym lekiem przeciwnowotworowym wpływającym na aktywność komórek MDSC jest entinostat, inhibitor deacetylaz histonowych 1 i 3 (HDAC1, HDAC3). W badaniach przedklinicznych prowadzonych z wykorzystaniem mysich modeli raka płuc i nerki, wykazano, że entinostat wywołuje u myszy zwiększoną akumulację komórek o fenotypie charakterystycznym dla MDSC, jednak komórki te mają znacznie obniżoną aktywność supresorową w stosunku do limfocytów T cytotoksycznych, w porównaniu do tych izolowanych z myszy kontrolnych [74]. W badaniach przeprowadzonych w ramach II fazy badań klinicznych nad zastosowaniem entinostatu w połączeniu z eksemestanem w terapii hormonozależnego raka gruczołu piersiowego (nr próby NCT00676663) zaobserwowano, że entinostat obniża liczebność komórek MDSC (zarówno monocytarnych, jak i granulocytarnych), a zidentyfikowane komórki wykazywały obniżoną ekspresję cząsteczki CD40 [100]. Monocyty wyizolowane z krwi kobiet poddanych terapii z udziałem entinostanu miały podwyższoną ekspresję cząsteczek HLA-DR, co sugeruje, że entinostat wpływa nie tylko na liczebność komórek MDSC, ale także moduluje ich aktywność [100]. Badania nad wykorzystaniem entinostatu i eksemestanu w terapii raka gruczołu piersiowego znajdują się obecnie w III fazie prób klinicznych (nr próby NCT02115282).

Indukcja dojrzewania MDSC

Do redukcji liczebności komórek MDSC można doprowadzić za pomocą czynników indukujących różnicowanie ich w kierunku dojrzałych populacji mieloidalnych, takich jak komórki dendrytyczne, makrofagi czy neutrofile. Kwas całkowicie *trans*-retinowy (ATRA) jest jednym z leków o potencjale przeciwnowotworowym, przyczyniającym się do indukcji dojrzewania komórek mieloidalnych. Wprawdzie mechanizm działania tego czynnika nie jest dokładnie poznany, wydaje się, że ATRA indukuje dojrzewanie komórek MDSC przez aktywację szlaku sygnałowego ERK1/2, co prowadzi do nadekspresji syntetazy glutationowej, zwiększonej syntezy glutationu i w rezultacie obniżenia wydzielania ROS [69]. Wpływ ATRA na status zróżnicowania komórek MDSC określono podczas próby klinicznej z udziałem pacjentów z przerzutującym rakiem nerki (nr próby NCT00100906) [65]. Zaobserwowano, że ATRA, stosowana samodzielnie oraz w połączeniu z IL-2 powoduje obniżenie liczebności niedojrzałych komórek mieloidalnych we krwi pacjentów, przy jednoczesnym zwiększeniu odsetków dojrzałych

komórek dendrytycznych. Podczas próby klinicznej z udziałem pacjentów z zaawansowanym drobnokomórkowym rakiem płuc wykazano, że ATRA w połączeniu ze szczepionkami na bazie komórek dendrytycznych powodowała obniżenie liczebności komórek MDSC oraz zwiększenie aktywności przeciwnowotworowej limfocytów T cytotoksycznych, w porównaniu do zastosowania samych szczepionek (nr próby NCT00617409) [45].

Dojrzewanie komórek MDSC powodują także związki z grupy taksanów – paklitaksel oraz docetaksel, rutynowo stosowane jako leki o działaniu przeciwnowotworowym z innymi chemioterapeutykami. Wpływ paklitakselu na poziom zróżnicowania komórek MDSC wykazano w badaniach z wykorzystaniem transgenicznych myszy *ret*, u których dochodzi do spontanicznego rozwoju czerniaka. U myszy traktowanych bardzo niskimi, nietoksycznymi dawkami paklitakselu zaobserwowano zmniejszoną liczebność komórek MDSC, a także przywrócenie aktywności przeciwnowotworowej limfocytów T CD8⁺, przy czym nie odnotowano wpływu terapii na proces hematopoezy [90]. W kolejnych badaniach przeprowadzonych przez ten sam zespół udowodniono, że paklitaksel powoduje różnicowanie komórek MDSC w dojrzałe komórki dendrytyczne [63]. Niedawno zaproponowano strategię terapeutyczną, w której zastosowano ten lek w nanonośnikach degradowanych przez enzymy odpowiedzialne za wzmożone wytwarzanie reaktywnych form tlenu i azotu, co zapewnia selektywność leku wobec komórek MDSC [8]. Terapia nanonośnikami z paklitaksellem zastosowana w mysim modelu czerniaka spowodowała zahamowanie wzrostu nowotworu oraz obniżenie liczebności komórek MDSC. Docetaksel powoduje różnicowanie monocytów w kierunku makrofagów typu M1, bardziej niż paklitaksel, co zaobserwowano w badaniach z wykorzystaniem frakcji komórek izolowanych z ludzkiej krwi [64]. Terapia z udziałem docetakselu, uzupełniona o suplementację L-argininą zastosowana w mysim modelu raka gruczołu piersiowego spowodowała obniżenie liczebności komórek MDSC oraz obniżenie poziomu ekspresji IL-10 w guzach nowotworowych, za to komórki dendrytyczne o wysokiej ekspresji markerów zróżnicowania występowały częściej niż u myszy nieleczonych [10].

Innymi czynnikami powodującymi dojrzewanie komórek MDSC są kurkubitacyny, związki organiczne naturalnie występujące w niektórych warzywach, a także kurkumina, związek organiczny izolowany z kurkumy. Związek JSI-124 (kurkubitacyna I), okazał się selektywnym inhibitorem szlaku sygnałowego JAK2/STAT3, a jego zastosowanie w hodowli *in vitro* mieloidalnych komórek supresorowych indukowało ich różnicowanie w kierunku komórek dendrytycznych oraz makrofagów [70]. Kurkubitacyna B podawana pacjentom z rakiem płuc obniżała liczebność niedojrzałych komórek mieloidalnych we krwi [59]. Zastosowanie kurkuminy jako jednego z elementów skojarzonej terapii przeciwnowotworowej jest obecnie przedmiotem wielu

prób klinicznych. Wpływ tego związku na komórki MDSC wykazano w badaniach *in vivo* prowadzonych na mysim modelu raka jelita grubego oraz raka żołądka. Kurkumina podawana myszom doustnie lub dootrzewnowo indukowała dojrzewanie komórek M-MDSC w kierunku makrofagów typu M1 [111].

Eliminacja MDSC

Wykazano, że niektóre chemioterapeutyki standardowo stosowane w leczeniu przeciwnowotworowym mogą wpływać na selektywną eliminację komórek MDSC. Jednym z nich jest gemcytabina, która powoduje eliminację komórek MDSC w śledzionach myszy obciążonych nowotworem, przy zachowaniu liczebności populacji limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ oraz komórek NK [96]. U pacjentów z rakiem trzustki zaobserwowano eliminację komórek MDSC oraz Treg po zastosowaniu gemcytabiny, przy czym lek ten nie obniżał zdolności do proliferacji i aktywacji limfocytów T pomocniczych i cytotoksycznych. Niestety, po zakończeniu cyklu chemioterapii populacje komórek supresorowych uległy odnowie [26]. W badaniach przedklinicznych z wykorzystaniem mysiego modelu raka trzustki odnotowano obniżenie liczebności komórek MDSC po zastosowaniu gemcytabiny, jednak monoterapia nie wpłynęła na długość przeżycia myszy. Po skojarzeniu chemioterapii ze szczepionkami zawierającymi komórki dendrytyczne, zaobserwowano zarówno zahamowanie wzrostu nowotworu jak i przedłużenie czasu przeżycia myszy [33]. Obecnie prowadzone są badania kliniczne z udziałem gemcytabiny i komórek dendrytycznych stosowanych w leczeniu dzieci i dorosłych z rozwijającymi się mięsakami, a jednym z głównych parametrów ocenianych w trakcie leczenia będzie liczebność komórek MDSC, traktowana jako biomarker odpowiedzi odpornościowej (nr próby: NCT01803152). W badaniach prowadzonych z wykorzystaniem mysiego modelu raka trzustki zastosowano terapię skojarzoną z udziałem komórek dendrytycznych stymulowanych egzozomami pochodzenia nowotworowego oraz trzech chemioterapeutyków: sunitynibu, gemcytabiny i ATRA [113]. Zastosowanie leków, które wykazują inne mechanizmy działania wobec komórek MDSC, pozwoliło na skuteczną redukcję ich liczebności, a uzupełnienie terapii o szczepionki z komórkami dendrytycznymi spowodowało odnowę odpowiedzi przeciwnowotworowej i zanik guzów nowotworowych. Niestety, długotrwałe podawanie myszom sunitynibu, gemcytabiny i ATRA miało działanie niepożądane w postaci drastycznego spadku liczebności leukocytów, co doprowadziło do ponownego rozwoju nowotworu [113]. Dużą wydajność i selektywność w indukowaniu apoptozy komórek MDSC wykazuje 5-fluorouracyl (5-FU) [108]. Zastosowanie tego chemioterapeutyku u myszy obciążonych nowotworem znacznie obniżyło liczebność komórek MDSC, nie wpłynęło natomiast na limfocyty T, komórki NK, komórki dendrytyczne oraz limfocyty B [108]. 5-FU jest stosowany w terapii raka jelita grubego, jako jeden z leków w terapiach skojarzonych FOLFOX oraz FOLFIRI. Tylko po zastosowaniu tej pierwszej obserwuje się eliminację

komórek MDSC, a zarazem obniżenie immunosupresji, a druga terapia działa odwrotnie [46]. Jest to spowodowane obecnością irynotekanu (CPT11) w schemacie leczenia FOLFIRI, który wywołuje silną immunosupresję, przewyższając działanie 5-FU [46]. Innym chemioterapeutykiem, którego wpływ na komórki MDSC został zbadany, jest doksorubicyna. W mysim modelu raka gruczołu piersiowego doksorubicyna indukowała selektywną eliminację komórek MDSC ze śledzion, krwi oraz mikrośrodowiska nowotworowego [2]. Komórki MDSC wyizolowane z krwi pacjentów z nowotworami okazały się wrażliwe na ten chemioterapeutyk w testach *ex vivo* [2]. Pojawiają się jednak raporty świadczące o tym, że doksorubicyna raczej indukuje akumulację komórek MDSC. W badaniach z wykorzystaniem mysich komórek raka gruczołu piersiowego wykazano, że komórki nowotworowe, które wykształciły oporność na doksorubicynę indukują powstawanie komórek MDSC przez wzmożone wydzielanie PGE₂ [79]. W innych badaniach z wykorzystaniem tego samego modelu nowotworu zaobserwowano, że doksorubicyna zwiększała stężenia chemokin CXCL1/2 i CCL2 u myszy, a to przyczyniło się do zwiększenia akumulacji komórek MDSC w płucach [21]. Cisplatyna jest chemioterapeutykiem, którego wpływ na liczebność komórek MDSC wykazano w badaniach z wykorzystaniem mysiego modelu raka pęcherza. Zaobserwowano, że zastosowanie cisplatyny indukowało oprócz apoptozy komórek nowotworowych także obniżenie odsetka komórek PMN-MDSC, co korelowało ze zwiększoną liczebnością limfocytów T cytotoksycznych [112]. Terapia z udziałem cisplatyny, paklitakselu, gemcytabiny oraz parykalcytolu (analogu witaminy D) będzie testowana w II fazie badań klinicznych z udziałem pacjentów cierpiących na raka trzustki (nr próby: NCT03415854).

Eliminacja MDSC w celu zwiększenia skuteczności terapii z wykorzystaniem przeciwciał blokujących szlaki sygnałowe immunologicznych punktów kontroli

Immunoterapia nowotworów, polegająca na blokowaniu tzw. immunologicznych punktów kontroli (immune checkpoints, IC), czyli receptorów lub ligandów hamujących odpowiedź odpornościową, w ostatnich latach stała się niezwykle obiecującą strategią w walce z nowotworami. Pierwszym lekiem hamującym IC zatwierdzonym do stosowania u pacjentów był ipilimumab – przeciwciało monoklonalne blokujące receptor CTLA-4 stosowany w czerniaku [111]. Kilka lat później, do kliniki wprowadzono przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko receptorowi PD-1 – nivolumab oraz pembrolizumab, które są stosowane u pacjentów z rozwijającym się czerniakiem, niedrobnokomórkowym rakiem płuca, nerki, pęcherza moczowego, szyi lub głowy oraz chłoniakiem Hodgkina [111]. W terapiach stosuje się także blokowanie ligandu PD-1 za pomocą przeciwciał monoklonalnych anty-PD-L1. Trzy z nich: atezolizumab, durvalumab i avelumab zatwierdzono do leczenia pacjentów z rakiem urotelialnym pęcherza moczowego,

Tabela 1. Wykaz badań klinicznych określających skuteczność terapii przeciwnowotworowych uzupełnionych o inhibitory komórek MDSC

Jednostka chorobowa	Zastosowane leczenie	Faza kliniczna	Numer badania, status
Zahamowanie akumulacji MDSC			
Rak jasnokomórkowy nerki Rak nerki w IV stadium zaawansowania	Bewacyzumab Pazopanib	I/II	NCT01684397 (rekrutujące)
Czerniak w III lub IV stadium zaawansowania	SX-682 Pembrolizumab	I	NCT03161431 (jeszcze nie rekrutujące)
Zahamowanie aktywności supresorowej MDSC			
Płaskonabłonkowy rak głowy i szyi	Tadalafil	II	NCT00894413 (zakończone)
Rak gruczołu piersiowego estrogenozależny	Entinostat Eksemestan	II	NCT00676663 (zakończone)
Rak gruczołu piersiowego hormonozależny lub HER2-ujemny	Entinostat Eksemestan Goseralina	III	NCT02115282 (rekrutujące)
Rak gruczołu piersiowego w III i IV stadium zaawansowania	Entinostat Ipilimumab Nivolumab	I	NCT02453620 (rekrutujące)
Indukcja dojrzewania MDSC			
Drobnokomórkowy rak płuca	Paklitaksel ATRA Szczepionki na bazie komórek dendrytycznych z nadekspresją p53	II	NCT00617409 (z zakończoną rekrutacją)
Czerniak	ATRA Ipilimumab	II	NCT02403778 (z zakończoną rekrutacją)
Czerniak w III i IV stadium zaawansowania	ATRA Pembrolizumab	I/II	NCT03200847 (rekrutujące)
Eliminacja MDSC			
Mięsaki tkanek miękkich Mięsaki kości	Szczepionki na bazie komórek dendrytycznych Gemcytabina Imikwimod	I	NCT01803152 (rekrutujące)
Rak trzustki Przerzutujący rak trzustki	Paklitaksel Cisplatyna Gemcytabina Parikalcytol	II	NCT03415854 (rekrutujące)
Niedrobnokomórkowy rak płuca w III stadium zaawansowania	Nivolumab Gemcytabina	II	NCT03302247 (rekrutujące)

niedrobnokomórkowym rakiem płuca oraz rakiem neuroendokrynnym skóry [53]. Niestety, terapie bazujące na tych lekach są skuteczne jedynie u niewielkiej części pacjentów, co może być spowodowane obecnością komórek supresorowych, których aktywność niweluje immunostymulujący wpływ podawanych przeciwciał [101]. Liczne raporty wskazują, że zwiększona akumulacja

komórek MDSC przyczynia się do obniżenia skuteczności przeciwciał blokujących IC, a diagnostyka ukierunkowana na charakterystykę tych komórek może być markerem prognostycznym efektu terapeutycznego takich leków. Przykładowo, u pacjentów z czerniakiem, którzy nie odpowiadali pozytywnie na terapię ipilimumabem, obserwowano w trakcie terapii podwyższoną

Tabela 2. Wykaz badań klinicznych nad zastosowaniem komórek MDSC w postaci biomarkera diagnostycznego

Jednostka chorobowa	Wdrożone badania	Numer badania, status
Niedrobnokomórkowy rak płuca	Analiza poziomu ekspresji PD-L1 i PD-L2 na komórkach MDSC we krwi pacjentów	NCT02827344 (rekrutujące)
Rak pęcherza w II, III, IV stadium zaawansowania	Identyfikacja komórek MDSC we krwi i moczu pacjentów	NCT02735512 (rekrutujące)
Rak nerki w I, II, III stadium zaawansowania Przerzutujący rak nerki	Identyfikacja komórek MDSC we krwi i moczu pacjentów	NCT02664883 (rekrutujące)
Niedrobnokomórkowy rak płuca	Analiza poziomu ekspresji markerów komórek MDSC przed i po terapii nivolumabem	NCT03486119 (rekrutujące)
Przerzutujący rak płuca Chłoniaki nieziarnicze	Analiza liczebności komórek MDSC i Treg we krwi pacjentów w trakcie leczenia inhibitorami IC	NCT03595813 (rekrutujące)

liczbę komórek MDSC wykazujących ekspresję markerów CD14 i IL-4R α [19]. W innych badaniach, pacjenci z zaawansowanym czerniakiem, u których przed rozpoczęciem leczenia ipilimumabem odnotowano wysoki odsetek komórek MDSC, wykazywali krótki czas przeżycia [86]. Korelację między dużą liczbą komórek M-MDSC i krótkim czasem przeżycia odnotowano także u pacjentów z czerniakiem otrzymujących nivolumab [110]. W raku stercza na terapię skojarzoną z udziałem szczepionek GVAX oraz przeciwciał ipilimumab odpowiadali korzystniej pacjenci, u których przed terapią zidentyfikowano mniej komórek M-MDSC [87]. Obecnie trwają próby kliniczne, których celem jest zidentyfikowanie markerów umożliwiających prognozowanie skuteczności terapii z zastosowaniem inhibitorów immunologicznych punktów kontroli. Próba NCT03595813 z udziałem 90 pacjentów otrzymujących blokery IC, polega na zidentyfikowaniu korelacji między przebiegiem terapii a zmianami zachodzącymi w liczbie komórek MDSC, Treg oraz stężeniach cytokin supresorowych. Celem innego badania klinicznego jest natomiast analiza częstości występowania komórek MDSC we krwi pacjentów i odpowiedź na pytanie, czy taka analiza może być markerem prognostycznym w terapii z udziałem nivolumabu stosowanej w leczeniu chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (nr próby: NCT03486119). W tabeli 2 przedstawiono opis badań klinicznych nad zastosowaniem komórek MDSC w postaci biomarkera diagnostycznego.

Uwzględniając przedstawione wyżej obserwacje, słuszne wydaje się łączenie strategii terapeutycznych polegających na eliminacji komórek MDSC oraz blokowaniu immunologicznych punktów kontroli. Obecnie prowadzone są próby kliniczne oceniające skuteczność takich terapii. W I fazie badań klinicznych z udziałem pacjentek cierpiących na raka gruczołu piersiowego, zostanie przetestowana terapia skojarzona na bazie entinostatu, nivolumabu oraz ipilimumabu (nr próby: NCT02453620). Podobną terapię stosowano w testach przedklinicznych na dwóch modelach mysiego raka gruczołu piersiowego, w których zaobserwowano, że eliminacja komórek

MDSC za pomocą entinostatu, w połączeniu z blokowaniem IC za pomocą przeciwciał anti-CTLA-4 i anti-PD-1 spowodowało zahamowanie wzrostu guzów na poziomie 80%, przy czym zastosowanie samych przeciwciał nie przyniosło podobnych rezultatów [47]. Inną strategią, ukierunkowaną na indukcję dojrzewania komórek MDSC i blokowanie receptorów IC jest terapia skojarzona z wykorzystaniem kwasu całkowicie *trans*-retinowego i ipilimumabu, stosowana w leczeniu zaawansowanego czerniaka podczas II fazy badań klinicznych (nr próby: NCT02403778). Rezultatem było obniżenie liczby komórek MDSC, a także wzrost ekspresji markera HLA-DR na powierzchni komórek mieloidalnych we krwi pacjentów, terapia okazała się także bezpieczna i nie powodowała progresji choroby [98]. Jednak próbę przerwano ze względu na niewielką liczbę pacjentów zakwalifikowanych do udziału, co było spowodowane rozwojem terapii z wykorzystaniem przeciwciał blokujących receptor PD-1, która okazała się skuteczniejsza i bezpieczniejsza [98]. Dlatego też, obecnie trwa rekrutacja do I i II fazy badań klinicznych z udziałem pacjentów z zaawansowanym czerniakiem, którzy otrzymają terapię na bazie ATRA z pembrolizumabem (nr próby: NCT03200847). W II fazie badań klinicznych znajduje się terapia skojarzona z udziałem gemcytabiny i nivolumabu stosowana w leczeniu chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca, której przewidywanym efektem jest poprawa skuteczności terapeutycznej nivolumabu przez eliminację komórek MDSC przez gemcytabinę (nr próby: NCT03302247).

PODSUMOWANIE

Badania prowadzone w ostatnich kilkunastu latach ujawniły, że komórki MDSC pełnią znaczącą rolę w supresji układu odpornościowego, prowadząc do progresji choroby nowotworowej. Poznanie biologii komórek MDSC, a w tym identyfikacja czynników warunkujących ich akumulację w guzach nowotworowych oraz określenie wykorzystywanych przez te komórki mechanizmów supresji, pozwoliło na opracowanie nowych schematów terapii przeciwnowotworowej, których celem jest

eliminacja komórek MDSC. Jak wykazują wyniki badań przedklinicznych i klinicznych, redukcja supresji uwarunkowanej obecnością komórek MDSC może być uzupełnieniem zarówno standardowych schematów chemioterapii, jak i schematów immunoterapii opartych na blokowaniu receptorów hamujących odpowiedź immunologiczną. Dalsze badania nad opracowaniem protokołów terapii skojarzonych przyczynią się do zwiększenia skuteczności leczenia pacjentów reagujących na monoterapię, a także umożliwią uzyskanie efektu terapeutycznego u pacjentów, którzy do tej pory nie odpowiadali na zastosowaną terapię jednoskładnikową. Komórki MDSC

mogą się stać również biomarkerem prognozującym skuteczność danej terapii, co umożliwi zakwalifikowanie pacjentów do odpowiedniego schematu leczenia. Monitorowanie zmian fenotypowych i funkcjonalnych zachodzących w komórkach MDSC w czasie terapii umożliwi bieżącą ocenę odpowiedzi pacjenta na zastosowane leczenie. Dlatego też niezbędne są dalsze prace nad identyfikacją markerów komórek MDSC, które nie tylko będą weryfikować przynależność komórek MDSC do danej subpopulacji, ale także pozwolą na określenie ich statusu czynnościowego w testach diagnostycznych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Aliper A.M., Frieden-Korovkina V.P., Buzdin A., Roumiantsev S.A., Zhavoronkov A.: A role for G-CSF and GM-CSF in nonmyeloid cancers. *Cancer Med*, 2014; 3: 737-746
- [2] Alizadeh D., Trad M., Hanke N.T., Larmonier C.B., Janikashvili N., Bonnotte B., Katsanis E., Larmonier N.: Doxorubicin eliminates myeloid-derived suppressor cells and enhances the efficacy of adoptive T-cell transfer in breast cancer. *Cancer Res.*, 2014; 74: 104-118
- [3] Ba H., Li B., Li X., Li C., Feng A., Zhu Y., Wang J., Li Z., Yin B.: Transmembrane tumor necrosis factor- α promotes the recruitment of MDSCs to tumor tissue by upregulating CXCR4 expression via TNFR2. *Int. Immunopharmacol.*, 2017; 44: 143-152
- [4] Baniyash M.: Myeloid-derived suppressor cells as intruders and targets: clinical implications in cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2016; 65: 857-867
- [5] Beury D.W., Parker K.H., Nyandjo M., Sinha P., Carter K.A., Ostrand-Rosenberg S.: Cross-talk among myeloid-derived suppressor cells, macrophages, and tumor cells impacts the inflammatory milieu of solid tumors. *J. Leukoc. Biol.*, 2014; 96: 1109-1118
- [6] Blattner C., Fleming V., Weber R., Himmelhan B., Altevogt P., Gebhardt C., Schulze T.J., Razon H., Hawila E., Wildbaum G., Utikal J., Karin N., Umansky V.: CCR5+ myeloid-derived suppressor cells are enriched and activated in melanoma lesions. *Cancer Res.*, 2018; 78: 157-167
- [7] Bronte V., Brandau S., Chen S.H., Colombo M.P., Frey A.B., Grenten T.F., Mandruzzato S., Murray P.J., Ochoa A., Ostrand-Rosenberg S., Rodriguez P.C., Sica A., Umansky V., Vonderheide R.H., Gabrilovich D.I.: Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat. Commun.*, 2016; 7: 12150
- [8] Burkert S.C., Shurin G.V., White D.L., He X., Kapralov A.A., Kagan V.E., Shurin M.R., Star A.: Targeting myeloid regulators by paclitaxel-loaded enzymatically degradable nanocups. *Nanoscale*, 2018; 10: 17990-18000
- [9] Califano J.A., Khan Z., Noonan K.A., Rudraraju L., Zhang Z., Wang H., Goodman S., Gourin C.G., Ha P.K., Fakhry C., Saunders J., Levine M., Tang M., Neuner G., Richmon J.D. i wsp.: Tadalafil augments tumor specific immunity in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2015; 21: 30-38
- [10] Cao Y., Wang Q., Du Y., Liu F., Zhang Y., Feng Y., Jin F.: L-arginine and docetaxel synergistically enhance anti-tumor immunity by modifying the immune status of tumor-bearing mice. *Int. Immunopharmacol.*, 2016; 35: 7-14
- [11] Chen H.M., Ma G., Gildener-Leapman N., Eisenstein S., Coakley B.A., Ozao J., Mandeli J., Divino C., Schwartz M., Sung M., Ferris R., Kao J., Wang L.H., Pan P.Y., Ko E.C. i wsp.: Myeloid-derived suppressor cells as an immune parameter in patients with concurrent sunitinib and stereotactic body radiotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 2015; 21: 4073-4085
- [12] Chen M.F., Kuan F.C., Yen T.C., Lu M.S., Lin P.Y., Chung Y.H., Chen W.C., Lee K.D.: IL-6-stimulated CD11b+ CD14+ HLA-DR- myeloid-derived suppressor cells, are associated with progression and poor prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncotarget*, 2014; 5: 8716-8728
- [13] Chun E., Lavoie S., Michaud M., Gallini C.A., Kim J., Soucy G., Odze R., Glickman J.N., Garrett W.S.: CCL2 promotes colorectal carcinogenesis by enhancing polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cell population and function. *Cell Rep.*, 2015; 12: 244-257
- [14] Condamine T., Dominguez G.A., Youn J.I., Kossenkov A.V., Mony S., Alicea-Torres K., Tcyganov E., Hashimoto A., Nefedova Y., Lin C., Partlova S., Garfall A., Vogl D.T., Xu X., Knight S.C. i wsp.: Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci. Immunol.*, 2016; 1: aaf8943
- [15] Condamine T., Ramachandran I., Youn J.I., Gabrilovich D.I.: Regulation of tumor metastasis by myeloid-derived suppressor cells. *Annu. Rev. Med.*, 2015; 66: 97-110
- [16] Corzo C.A., Cotter M.J., Cheng P., Cheng F., Kusmartsev S., Sotomayor E., Padhya T., McCaffrey T.V., McCaffrey J.C., Gabrilovich D.I.: Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J. Immunol.*, 2009; 182: 5693-5701
- [17] Cui T.X., Kryczek I., Zhao L., Zhao E., Kuick R., Roh M.H., Vatan L., Szeliga W., Mao Y., Thomas D.G., Kotarski J., Tarkowski R., Wicha M., Cho K., Giordano T. i wsp.: Myeloid-derived suppressor cells enhance stemness of cancer cells by inducing microRNA101 and suppressing the corepressor CtBP2. *Immunity*, 2013; 39: 611-621
- [18] Damuzzo V., Pinton L., Desantis G., Solito S., Marigo I., Bronte V., Mandruzzato S.: Complexity and challenges in defining myeloid-derived suppressor cells. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2015; 88: 77-91
- [19] Damuzzo V., Solito S., Pinton L., Carrozzo E., Valpione S., Pigozzo J., Arboretti Giancristofaro R., Chiarion-Sileni V., Mandruzzato S.: Clinical implication of tumor-associated and immunological parameters in melanoma patients treated with ipilimumab. *Oncoimmunology*, 2016; 5: e1249559
- [20] De Sanctis F., Sandri S., Ferrarini G., Pagliarello I., Sartoris S., Ugel S., Marigo I., Molon B., Bronte V.: The emerging immunological role of post-translational modifications by reactive nitrogen species in cancer microenvironment. *Front Immunol.*, 2014; 5: 69
- [21] Deng Z., Rong Y., Teng Y., Zhuang X., Samykutty A., Mu J., Zhang L., Cao P., Yan J., Miller D., Zhang H.G.: Exosomes miR-126a released from MDSC induced by DOX treatment promotes lung metastasis. *Oncogene*, 2017; 36: 639-651
- [22] Dolcetti L., Peranzoni E., Ugel S., Marigo I., Fernandez Gomez A., Mesa C., Geilich M., Winkels G., Traggiai E., Casati A., Grassi F., Bronte V.: Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur. J. Immunol.*, 2010; 40: 22-35

- [23] Dumitru C.A., Moses K., Trellakis S., Lang S., Brandau S.: Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012; 61: 1155-1167
- [24] Elliott L.A., Doherty G.A., Sheahan K., Ryan E.J.: Human tumor-infiltrating myeloid cells: phenotypic and functional diversity. *Front Immunol.*, 2017; 8: 86
- [25] Emeagi P.U., Maenhout S., Dang N., Heirman C., Thielemans K., Breckpot K.: Downregulation of Stat3 in melanoma: reprogramming the immune microenvironment as an anticancer therapeutic strategy. *Gene Ther.*, 2013; 20: 1085-1092
- [26] Eriksson E., Wenthe J., Irenaues S., Loskog A., Ullenhag G.: Gemcitabine reduces MDSCs, tregs and TGFβ-1 while restoring the teff/treg ratio in patients with pancreatic cancer. *J. Transl. Med.*, 2016; 14: 282
- [27] Fleming V., Hu X., Weber R., Nagibin V., Groth C., Altevogt P., Utikal J., Umansky V.: Targeting myeloid-derived suppressor cells to bypass tumor-induced immunosuppression. *Front Immunol.*, 2018; 9: 398
- [28] Fridlender Z.G., Sun J., Mishalian I., Singhal S., Cheng G., Kapoor V., Horng W., Fridlender G., Bayuh R., Worthen G.S., Albelda S.M.: Transcriptomic analysis comparing tumor-associated neutrophils with granulocytic myeloid-derived suppressor cells and normal neutrophils. *PLoS One*, 2012; 7: e31524
- [29] Gabrilovich D.I., Bronte V., Chen S.H., Colombo M.P., Ochoa A., Ostrand-Rosenberg S., Schreiber H.: The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.*, 2007; 67: 425-426
- [30] Gabrilovich D.I., Nagaraj S.: Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009; 9: 162-174
- [31] Gallina G., Dolcetti L., Serafini P., De Santo C., Marigo I., Colombo M.P., Basso G., Brombacher F., Borrello I., Zanovello P., Bricciato S., Bronte V.: Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J. Clin. Invest.*, 2006; 116: 2777-2790
- [32] Gao D., Joshi N., Choi H., Ryu S., Hahn M., Catena R., Sadik H., Argani P., Wagner P., Vahdat L.T., Port J.L., Stiles B., Sukumar S., Altorki N.K., Rafii S. i wsp.: Myeloid progenitor cells in the premetastatic lung promote metastases by inducing mesenchymal to epithelial transition. *Cancer Res.*, 2012; 72: 1384-1394
- [33] Ghansah T., Vohra N., Kinney K., Weber A., Kodumudi K., Springett G., Sarnaik A.A., Pilon-Thomas S.: Dendritic cell immunotherapy combined with gemcitabine chemotherapy enhances survival in a murine model of pancreatic carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2013; 62: 1083-1091
- [34] Gibbons Johnson R.M., Dong H.: Functional expression of programmed death-ligand 1 (B7-H1) by immune cells and tumor cells. *Front Immunol.*, 2017; 8: 961
- [35] Haile L.A., Gamrekelashvili J., Manns M.P., Korangy F., Greten T.F.: CD49d is a new marker for distinct myeloid-derived suppressor cell subpopulations in mice. *J. Immunol.*, 2010; 185: 203-210
- [36] Hanson E.M., Clements V.K., Sinha P., Ilkovich D., Ostrand-Rosenberg S.: Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol.*, 2009; 183: 937-944
- [37] Hardy L.L., Wick D.A., Webb J.R.: Conversion of tyrosine to the inflammation-associated analog 3'-nitrotyrosine at either TCR- or MHC-contact positions can profoundly affect recognition of the MHC class I-restricted epitope of lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein 33 by CD8 T cells. *J. Immunol.*, 2008; 180: 5956-5962
- [38] Hashimoto A., Gao C., Mastio J., Kossenkova A., Abrams S.I., Purandare A.V., Desilva H., Wee S., Hunt J.T., Jure-Kunkel M., Gabrilovich D.I.: Inhibition of casein kinase 2 disrupts differentiation of myeloid cells in cancer and enhances the efficacy of immunotherapy in mice. *Cancer Res.*, 2018; 78: 5644-5655
- [39] Hassel J.C., Jiang H., Bender C., Winkler J., Sevko A., Shevchenko I., Halama N., Dimitrakopoulou-Strauss A., Haefeli W.E., Jäger D., Enk A., Utikal J., Umansky V.: Tadalafil has biologic activity in human melanoma. Results of a pilot trial with tadalafil in patients with metastatic melanoma (TaMe). *Oncoimmunology*, 2017; 6: e1326440
- [40] Highfill S.L., Cui Y., Giles A.J., Smith J.P., Zhang H., Morse E., Kaplan R.N., Mackall C.L.: Disruption of CXCR2-mediated MDSC tumor trafficking enhances anti-PD1 efficacy. *Sci. Transl. Med.*, 2014; 6: 237ra67
- [41] Hossain D.M., Pal S.K., Moreira D., Dutttagupta P., Zhang Q., Won H., Jones J., D'Apuzzo M., Forman S., Kortylewski M.: TLR9-targeted STAT3 silencing abrogates immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells from prostate cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 2015; 21: 3771-3782
- [42] Hu C.E., Gan J., Zhang R.D., Cheng Y.R., Huang G.J.: Up-regulated myeloid-derived suppressor cell contributes to hepatocellular carcinoma development by impairing dendritic cell function. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2011; 46: 156-164
- [43] Hu X., Li B., Li X., Zhao X., Wan L., Lin G., Yu M., Wang J., Jiang X., Feng W., Qin Z., Yin B., Li Z.: Transmembrane TNF-α promotes suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells via TNFR2. *J. Immunol.*, 2014; 192: 1320-1331
- [44] Huang B., Pan P.Y., Li Q., Sato A.I., Levy D.E., Bromberg J., Divino C.M., Chen S.H.: Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.*, 2006; 66: 1123-1131
- [45] Iclozan C., Antonia S., Chiappori A., Chen D.T., Gabrilovich D.: Therapeutic regulation of myeloid-derived suppressor cells and immune response to cancer vaccine in patients with extensive stage small cell lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2013; 62: 909-918
- [46] Kanterman J., Sade-Feldman M., Biton M., Ish-Shalom E., Lasry A., Goldshtein A., Hubert A., Baniyash M.: Adverse immunoregulatory effects of 5FU and CPT11 chemotherapy on myeloid-derived suppressor cells and colorectal cancer outcomes. *Cancer Res.*, 2014; 74: 6022-6035
- [47] Kim K., Skora A.D., Li Z., Liu Q., Tam A.J., Blosser R.L., Diaz L.A.Jr., Papadopoulos N., Kinzler K.W., Vogelstein B., Zhou S.: Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014; 111: 11774-11779
- [48] Kim S.H., Li M., Trousil S., Zhang Y., Pasca di Magliano M., Swanson K.D., Zheng B.: Phenformin inhibits myeloid-derived suppressor cells and enhances the anti-tumor activity of PD-1 blockade in melanoma. *J. Invest. Dermatol.*, 2017; 137: 1740-1748
- [49] Kitamura T., Qian B.Z., Pollard J.W.: Immune cell promotion of metastasis. *Nat. Rev. Immunol.*, 2015; 15: 73-86
- [50] Klemke M., Wabnitz G.H., Funke F., Funk B., Kirchgessner H., Samstag Y.: Oxidation of cofilin mediates T cell hyporesponsiveness under oxidative stress conditions. *Immunity*, 2008; 29: 404-413
- [51] Ko J.S., Zea A.H., Rini B.I., Ireland J.L., Elson P., Cohen P., Golshayan A., Rayman P.A., Wood L., Garcia J., Dreicer R., Bukowski R., Finke J.H.: Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.*, 2009; 15: 2148-2157
- [52] Kusmartsev S., Eruslanov E., Kübler H., Tseng T., Sakai Y., Su Z., Kaliberov S., Heiser A., Rosser C., Dahm P., Siemann D., Vieweg J.: Oxidative stress regulates expression of VEGFR1 in myeloid cells: link to tumor-induced immune suppression in renal cell carcinoma. *J. Immunol.*, 2008; 181: 346-353
- [53] Lee H.T., Lee J.Y., Lim H., Lee S.H., Moon Y.J., Pyo H.J., Ryu S.E., Shin W., Heo Y.S.: Molecular mechanism of PD-1/PD-L1 blockade via anti-PD-L1 antibodies atezolizumab and durvalumab. *Sci. Rep.*, 2017; 7: 5532

- [54] Lesokhin A.M., Hohl T.M., Kitano S., Cortez C., Hirschhorn-Cymerman D., Avogadri F., Rizzuto G.A., Lazarus J.J., Pamer E.G., Houghton A.N., Merghoub T., Wolchok J.D.: Monocytic CCR2+ myeloid derived suppressor cells promote immune escape by limiting activated CD8 T-cell infiltration into the tumor microenvironment. *Cancer Res.*, 2012; 72: 876-886
- [55] Li H., Han Y., Guo Q., Zhang M., Cao X.: Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF- β 1. *J. Immunol.*, 2009; 182: 240-249
- [56] Li L., Wang L., Li J., Fan Z., Yang L., Zhang Z., Zhang C., Yue D., Qin G., Zhang T., Li F., Chen X., Ping Y., Wang D., Gao Q. i wsp.: Metformin-induced reduction of CD39 and CD73 blocks myeloid-derived suppressor cell activity in patients with ovarian cancer. *Cancer Res.*, 2018; 78: 1779-1791
- [57] Li W., Zhang X., Chen Y., Xie Y., Liu J., Feng Q., Wang Y., Yuan W., Ma J.: G-CSF is a key modulator of MDSC and could be a potential therapeutic target in colitis-associated colorectal cancers. *Protein Cell*, 2016; 7: 130-140
- [58] Limagne E., Euvrard R., Thibaudin M., Rébé C., Derangère V., Chevriaux A., Boidot R., Végran F., Bonnefoy N., Vincent J., Bengrine-Lefevre L., Ladoire S., Delmas D., Apetoh L., Ghiringhelli F.: Accumulation of MDSC and Th17 cells in patients with metastatic colorectal cancer predicts the efficacy of a FOLFFOX-bevacizumab drug treatment regimen. *Cancer Res.*, 2016; 76: 5241-5252
- [59] Lu P., Yu B., Xu J.: Cucurbitacin B regulates immature myeloid cell differentiation and enhances antitumor immunity in patients with lung cancer. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 2012; 27: 495-503
- [60] Malmberg K.J., Arulampalam V., Ichihara F., Petersson M., Seki K., Andersson T., Lenkei R., Masucci G., Pettersson S., Kiessling R.: Inhibition of activated/memory (CD45RO+) T cells by oxidative stress associated with block of NF- κ B activation. *J. Immunol.*, 2001; 167: 2595-2601
- [61] Mao Y., Sarhan D., Steven A., Seliger B., Kiessling R., Lundqvist A.: Inhibition of tumor-derived prostaglandin-E2 blocks the induction of myeloid-derived suppressor cells and recovers natural killer cell activity. *Clin. Cancer Res.*, 2014; 20: 4096-4106
- [62] Marigo I., Bosio E., Solito S., Mesa C., Fernandez A., Dolcetti L., Ugel S., Sonda N., Biccianti S., Falisi E., Calabrese F., Basso G., Zanovello P., Cozzi E., Mandruzzato S. i wsp.: Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBP β transcription factor. *Immunity*, 2010; 32: 790-802
- [63] Michels T., Shurin G.V., Naiditch H., Sevko A., Umansky V., Shurin M.R.: Paclitaxel promotes differentiation of myeloid-derived suppressor cells into dendritic cells in vitro in a TLR4-independent manner. *J. Immunotoxicol.*, 2012; 9: 292-300
- [64] Millrud C.R., Mehmeti M., Leandersson K.: Docetaxel promotes the generation of anti-tumorigenic human macrophages. *Exp. Cell Res.*, 2018; 362: 525-531
- [65] Mirza N., Fishman M., Fricke I., Dunn M., Neuger A.M., Frost T.J., Lush R.M., Antonia S., Gabrilovich D.I.: All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res.*, 2006; 66: 9299-9307
- [66] Mishalian I., Granot Z., Fridlender Z.G.: The diversity of circulating neutrophils in cancer. *Immunobiol.*, 2017; 222: 82-88
- [67] Munn D.H., Sharma M.D., Baban B., Harding H.P., Zhang Y., Ron D., Mellor A.L.: GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity*, 2005; 22: 633-642
- [68] Nagaraj S., Gupta K., Pisarev V., Kinarsky L., Sherman S., Kang L., Herber D., Schneck J., Gabrilovich D.I.: Altered recognition of antigen is a novel mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat. Med.*, 2007; 13: 828-835
- [69] Nefedova Y., Fishman M., Sherman S., Wang X., Beg A.A., Gabrilovich D.I.: Mechanism of all-trans retinoic acid effect on tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.*, 2007; 67: 11021-11028
- [70] Nefedova Y., Nagaraj S., Rosenbauer A., Muro-Cacho C., Sebt S.M., Gabrilovich D.I.: Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the Janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer Res.*, 2005; 65: 9525-9535
- [71] Noman M.Z., Desantis G., Janji B., Hasmim M., Karray S., Dessen P., Bronte V., Chouaib S.: PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J. Exp. Med.*, 2014; 211: 781-790
- [72] Obermajer N., Kalinski P.: Generation of myeloid-derived suppressor cells using prostaglandin E2. *Transplant. Res.*, 2012; 1: 15
- [73] 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.*, 2011; 71: 7463-7470
- [74] Orillion A., Hashimoto A., Damayanti N., Shen L., Adelaiye-Ogala R., Arisa S., Chintala S., Ordentlich P., Kao C., Elzey B., Gabrilovich D., Pili R.: Entinostat neutralizes myeloid-derived suppressor cells and enhances the antitumor effect of PD-1 inhibition in murine models of lung and renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2017; 23: 5187-5201
- [75] Ouyang L., Chang W., Fang B., Qin J., Qu X., Cheng F.: Estrogen-induced SDF-1 α production promotes the progression of ER-negative breast cancer via the accumulation of MDSCs in the tumor microenvironment. *Sci. Rep.*, 2016; 6: 39541
- [76] Pak A.S., Wright M.A., Matthews J.P., Collins S.L., Petruzzelli G.J., Young M.R.: Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34+ cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin. Cancer Res.*, 1995; 1: 95-103
- [77] Peng D., Tanikawa T., Li W., Zhao L., Vatan L., Szeliga W., Wan S., Wei S., Wang Y., Liu Y., Staroslawska E., Szubstarski F., Rolinski J., Grywalska E., Stanisławek A. i wsp.: Myeloid-derived suppressor cells endow stem-like qualities to breast cancer cells through IL6/STAT3 and NO/NOTCH cross-talk signaling. *Cancer Res.*, 2016; 76: 3156-3165
- [78] Rodriguez P.C., Quiceno D.G., Ochoa A.C.: L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood*, 2007; 109: 1568-1573
- [79] Rong Y., Yuan C.H., Qu Z., Zhou H., Guan Q., Yang N., Leng X.H., Bu L., Wu K., Wang F.B.: Doxorubicin resistant cancer cells activate myeloid-derived suppressor cells by releasing PGE2. *Sci. Rep.*, 2016; 6: 23824
- [80] Roskoski R.Jr.: Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007; 356: 323-328
- [81] Rossowska J., Anger N., Kicielińska J., Pajtasz-Piasecka E., Bielawska-Pohl A., Wojas-Turek J., Duś D.: Temporary elimination of IL-10 enhanced the effectiveness of cyclophosphamide and BMDC-based therapy by decrease of the suppressor activity of MDSCs and activation of antitumor immune response. *Immunobiology*, 2015; 220: 389-398
- [82] Rossowska J., Anger N., Szczygieł A., Mierzejewska J., Pajtasz-Piasecka E.: Intratumoral lentivector-mediated TGF- β 1 gene downregulation as a potent strategy for enhancing the antitumor effect of therapy composed of cyclophosphamide and dendritic cells. *Front Immunol.*, 2017; 8: 713
- [83] Rossowska J., Anger N., Szczygieł A., Mierzejewska J., Pajtasz-Piasecka E.: Reprogramming the murine colon cancer microenvironment using lentivectors encoding shRNA against IL-10 as a component of a potent DC-based chemotherapeutic. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2018; 37: 126
- [84] Roth F., De La Fuente A.C., Vella J.L., Zoso A., Inverardi L., Serafini P.: Aptamer-mediated blockade of IL4R α triggers apoptosis of MDSCs and limits tumor progression. *Cancer Res.*, 2012; 72: 1373-1383

- [85] Routy J.P., Routy B., Graziani G.M., Mehraj V.: The kynurenine pathway is a double-edged sword in immune-privileged sites and in cancer: Implications for immunotherapy. *Int. J. Tryptophan Res.*, 2016; 9: 67-77
- [86] Sade-Feldman M., Kanterman J., Klieger Y., Ish-Shalom E., Olga M., Saragovi A., Shtainberg H., Lotem M., Baniyash M.: Clinical significance of circulating CD33+CD11b+HLA-DR- myeloid cells in patients with stage IV melanoma treated with ipilimumab. *Clin. Cancer Res.*, 2016; 22: 5661-5672
- [87] Santeoets S.J., Stam A.G., Lougheed S.M., Gall H., Jooss K., Sacks N., Hege K., Lowy I., Scheper R.J., Gerritsen W.R., van den Eertwegh A.J., de Grujil T.D.: Myeloid derived suppressor and dendritic cell subsets are related to clinical outcome in prostate cancer patients treated with prostate GVAX and ipilimumab. *J. Immunother. Cancer*, 2014; 2: 31
- [88] Sceneay J., Chow M.T., Chen A., Halse H.M., Wong C.S., Andrews D.M., Sloan E.K., Parker B.S., Bowtell D.D., Smyth M.J., Möller A.: Primary tumor hypoxia recruits CD11b+Ly6Cmed/Ly6G+ immune suppressor cells and compromises NK cell cytotoxicity in the pre-metastatic niche. *Cancer Res.*, 2012; 72: 3906-3911
- [89] Serafini P., Meckel K., Kelso M., Noonan K., Califano J., Koch W., Dolcetti L., Bronte V., Borrello I.: Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J. Exp. Med.*, 2006; 203: 2691-2702
- [90] Sevko A., Michels T., Vrohings M., Umansky L., Beckhove P., Kato M., Shurin G.V., Shurin M.R., Umansky V.: Antitumor effect of paclitaxel is mediated by inhibition of myeloid-derived suppressor cells and chronic inflammation in the spontaneous melanoma model. *J. Immunol.*, 2013; 190: 2464-2471
- [91] Shojaei F., Wu X., Malik A.K., Zhong C., Baldwin M.E., Schanz S., Fuh G., Gerber H.P., Ferrara N.: Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nat. Biotechnol.*, 2007; 25: 911-920
- [92] Sinha P., Okoro C., Foell D., Freeze H.H., Ostrand-Rosenberg S., Srikrishna G.: Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *J. Immunol.*, 2008; 181: 4666-4675
- [93] Sinha P., Parker K.H., Horn L., Ostrand-Rosenberg S.: Tumor-induced myeloid-derived suppressor cell function is independent of IFN- γ and IL-4R α . *Eur. J. Immunol.*, 2012; 42: 2052-2059
- [94] Song X., Krelm Y., Dvorkin T., Bjorkdahl O., Segal S., Dinarello C.A., Voronov E., Apte R.N.: CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1 β -secreting cells. *J. Immunol.*, 2005; 175: 8200-8208
- [95] Srivastava M.K., Sinha P., Clements V.K., Rodriguez P., Ostrand-Rosenberg S.: Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res.*, 2010; 70: 68-77
- [96] Suzuki E., Kapoor V., Jassar A.S., Kaiser L.R., Albelda S.M.: Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 6713-6721
- [97] Tang Q., Jiang J., Liu J.: CCR5 blockade suppresses melanoma development through inhibition of IL-6-Stat3 pathway via upregulation of SOCS3. *Inflammation*, 2015; 38: 2049-2056
- [98] Tobin R.P., Jordan K.R., Robinson W.A., Davis D., Borges V.F., Gonzalez R., Lewis K.D., McCarter M.D.: Targeting myeloid-derived suppressor cells using all-trans retinoic acid in melanoma patients treated with Ipilimumab. *Int. Immunopharmacol.*, 2018; 63: 282-291
- [99] Toh B., Wang X., Keeble J., Sim W.J., Khoo K., Wong W.C., Kato M., Prevost-Blondel A., Thiery J.P., Abastado J.P.: Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. *PLoS Biol.*, 2011; 9: e1001162
- [100] Tomita Y., Lee M.J., Lee S., Tomita S., Chumsri S., Cruickshank S., Ordentlich P., Trepel J.B.: The interplay of epigenetic therapy and immunity in locally recurrent or metastatic estrogen receptor-positive breast cancer: Correlative analysis of ENCORE 301, a randomized, placebo-controlled phase II trial of exemestane with or without entinostat. *Oncoimmunology*, 2016; 5: e1219008
- [101] Toor S.M., Elkord E.: Therapeutic prospects of targeting myeloid-derived suppressor cells and immune checkpoints in cancer. *Immunol. Cell Biol.*, 2018; 96: 888-897
- [102] Tu S., Bhagat G., Cui G., Takaishi S., Kurt-Jones E.A., Rickman B., Betz K.S., Penz-Oesterreicher M., Bjorkdahl O., Fox J.G., Wang T.C.: Overexpression of interleukin-1 β induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell*, 2008; 14: 408-419
- [103] Tu S.P., Jin H., Shi J.D., Zhu L.M., Suo Y., Lu G., Liu A., Wang T.C., Yang C.S.: Curcumin induces the differentiation of myeloid-derived suppressor cells and inhibits their interaction with cancer cells and related tumor growth. *Cancer Prev. Res.*, 2012; 5: 205-215
- [104] Umansky V., Blattner C., Gebhardt C., Utikal J.: CCR5 in recruitment and activation of myeloid-derived suppressor cells in melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2017; 66: 1015-1023
- [105] Umansky V., Shevchenko I., Bazhin A.V., Utikal J.: Extracellular adenosine metabolism in immune cells in melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2014; 63: 1073-1080
- [106] Vila-Leahey A., Oldford S.A., Marignani P.A., Wang J., Haidl I.D., Marshall J.S.: Ranitidine modifies myeloid cell populations and inhibits breast tumor development and spread in mice. *Oncoimmunology*, 2016; 5: e1151591
- [107] Vila-Leahey A., Rogers D., Marshall J.S.: The impact of ranitidine on monocyte responses in the context of solid tumors. *Oncotarget*, 2016; 7: 10891-10904
- [108] Vincent J., Mignot G., Chalmin F., Ladoire S., Bruchard M., Chevriaux A., Martin F., Apetoh L., Rébé C., Ghiringhelli F.: 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res.*, 2010; 70: 3052-3061
- [109] Wang D., Sun H., Wei J., Cen B., DuBois R.N.: CXCL1 is critical for premetastatic niche formation and metastasis in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 2017; 77: 3655-3665
- [110] Weber J., Gibney G., Kudchadkar R., Yu B., Cheng P., Martinez A.J., Kroeger J., Richards A., McCormick L., Moberg V., Cronin H., Zhao X., Schell M., Chen Y.A.: Phase I/II study of metastatic melanoma patients treated with nivolumab who had progressed after ipilimumab. *Cancer Immunol. Res.*, 2016; 4: 345-353
- [111] Weber R., Fleming V., Hu X., Nagibin V., Groth C., Altevogt P., Utikal J., Umansky V.: Myeloid-derived suppressor cells hinder the anti-cancer activity of immune checkpoint inhibitors. *Front Immunol.*, 2018; 9: 1310
- [112] Wu K., Tan M.Y., Jiang J.T., Mu X.Y., Wang J.R., Zhou W.J., Wang X., Li M.Q., He Y.Y., Liu Z.H.: Cisplatin inhibits the progression of bladder cancer by selectively depleting G-MDSCs: A novel chemomodulating strategy. *Clin. Immunol.*, 2018; 193: 60-69
- [113] Xiao L., Erb U., Zhao K., Hackert T., Zöller M.: Efficacy of vaccination with tumor-exosome loaded dendritic cells combined with cytotoxic drug treatment in pancreatic cancer. *Oncoimmunology*, 2017; 6: e1319044
- [114] Xu M., Zhao Z., Song J., Lan X., Lu S., Chen M., Wang Z., Chen W., Fan X., Wu F., Chen L., Tu J., Ji J.: Interactions between interleukin-6 and myeloid-derived suppressor cells drive the chemoresistant phenotype of hepatocellular cancer. *Exp. Cell Res.*, 2017; 351: 142-149
- [115] Yang L., Wang B., Qin J., Zhou H., Majumdar A.P., Peng F.: Blockade of CCR5-mediated myeloid derived suppressor cell accumulation enhances anti-PD1 efficacy in gastric cancer. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 2018; 40: 91-97

[116] Youn J.I., Collazo M., Shalova I.N., Biswas S.K., Gabrilovich D.I.: Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J. Leukoc. Biol.*, 2012; 91: 167-181

[117] Youn J.I., Nagaraj S., Collazo M., Gabrilovich D.I.: Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearing mice. *J. Immunol.*, 2008; 181: 5791-5802

[118] Zebala J.A., Maeda D.Y., Schuler A.D.: Method for treating cancer using chemokine antagonists. United States Patent and Trademark Office, 2018; US10046002B2

[119] Zhao X., Rong L., Zhao X., Li X., Liu X., Deng J., Wu H., Xu X., Erben U., Wu P., Syrbe U., Sieper J., Qin Z.: TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J. Clin. Invest.*, 2012; 122: 4094-4104

[120] Zheng Y., Xu M., Li X., Jia J., Fan K., Lai G.: Cimetidine suppresses lung tumor growth in mice through proapoptosis of myeloid-derived suppressor cells. *Mol. Immunol.*, 2013; 54: 74-83

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

