

Makrofazi iz mikrookoliša tumora

Kučej, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:259947>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski svučilini studij

„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Lucija Kučej

Makrofazi iz mikrookoliša tumora

Završni rad

Rijeka, 2021.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski svučilini studij

„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Lucija Kučej

Makrofazi iz mikrookoliša tumora

Završni rad

Rijeka, 2021.

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Undergraduate programme
Biotechnology and drug research

Lucija Kučej
Macrophages from the tumor microenvironment
BSc thesis

Rijeka, 2021.

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Ivana Ratkaj

Završni rad obranjen je dana _____

pred povjerenstvom:

1. doc. dr. sc. Jelana Ban, predsjednica
2. izv. prof. dr. sc. Elitza Markova Car, članica
3. izv. prof. dr. sc. Ivana Ratkaj, mentorica

Rad ima 68 stranica, 15 slika, 3 tablice i 48 literaturnih navoda.

Sažetak

Tumorski mikrookoliš sastoji se od ne-tumorskih stanica koje okružuju tumor. Tumorski mikrookoliš se znatno razlikuje od zdravog tkiva te zbog toga okolne stanice mogu poprimiti drugačiju funkciju nego li bi to imale u normalnim uvjetima. Tumor također lučenjem citokina i direktnom interakcijom sa okolnim stanicama mijenja svoj mikrookoliš. Jedna od najučestalijih stanica u tumorskom mikrookolišu su makrofazi. Makrofazi iz mikrookoliša tumora (TAM) su stanice koje je tumor prilagodio u svrhu svog preživljavanja i razvijanja. TAM lučenjem raznih citokina i eksprimiranjem različitih receptora i liganada pomaže tumoru tako što omogućuje izjegavanje imunološkog sustava, potiče angiogenezu i limfogenezu tumora te i metastaziranje. TAMovi također negativno utječu na postojeće terapije zbog čega se sve intenzivnije traže lijekovi koji bi inhibirali TAMov utjecaj te čiji su osnovni principi opisani u ovom radu. Tumorski mikrookoliš svakog tumora, a time i funkcija TAMa je različita zbog čega se u ovom radu posebnu pažnju pridalo TAMovima u karcinomu dojke i karcinomu pluća.

Ključne riječi: mikrookoliš tumora (TME), makrofazi iz mikrookoliša tumora (TAM), terapija protiv TAM

Summary

Tumor microenvironment is contained of non-tumor cells which surround the tumor. Tumor microenvironment is significantly different from healthy tissue and because of that surrounding cells can have different function than they would have in healthy tissue. Also, with secretion of cytokines or with direct interaction with surrounding cells, tumor can change its microenvironment. One of the most common cells in tumor microenvironment are macrophages. Tumor associated macrophages (TAM) are cells which are modified by tumor in the purpose of its survival and development. With secreting numerous cytokines and with expressing different receptors and ligands TAM helps tumor by allowing the immune response to be avoided, while it promotes angiogenesis and lymphogenesis and metastasis of tumor. TAMs can also negatively affect on the existing therapies which is why drugs that would inhibit TAM effect and whose basic principles are described in this paper are increasingly being searched for. Tumor microenvironment of every tumor and by that the function of TAM is different and because of that special attention was paid in this paper on TAMs in breast and lung tumors.

Key words: tumor microenvironment (TME), tumor associated macrophage (TAM), therapy against TAM

Skraćenice

TME- mikrookoliš tumora

ECM- ekstracelularni matriks

VEGF- vaskularni endotelni faktor rasta

FGF- faktor rasta fibroblasta

PDGF- trombocitni faktor rasta

VEGFC- vaskularni endotelni faktor rasta C

VEGFD- vaskularni endotelni faktor rasta D

DC- dendritičke stanice

TH1- pomoćnički limfociti T 1

TH2- pomoćnički limfociti T 2

TH17- pomoćnički limfociti T 17

Treg- regulatorne T stanice

Breg- regulatorne B stanice

NK- ubilačke stanice

M2- alternativno aktivirani makrofazi

TAM- makrofazi iz tumorskog mikrookoliša

M1- klasično aktivirani makrofazi

AGM- aorta-gonad-mezonefrps

PRR- receptori za prepoznavanje uzorka

PAMP- molekularni uzorci povezani s patogenom

DAMP- molekularni uzorci povezani s oštećenjem stanice

MR- manozni receptori

TLR- toll-like receptori

ROS- reaktivne vrste kisika

NO- dušikov oksid

NADPH- nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

COX-2- ciklooksigenaza 2

PD-1- programmed cell death protein 1

PD-L1- programmed cell death-ligand 1

SIRP α - signal regulatory protein alpha

ITIM- tyrosine-based inhibitory motif

LILRs- leukocyte immunoglobulin-like receptors

DcR3- decoy receptori 3

KIR- Killer cell immunoglobulin-like receptor

Arg 1- arginaza 1

T_{cm}- centralne memorijske T stanice

nTreg- prirodne regulatorne T stanice

iTreg- inducirane regulatorne T stanice

HIF- hipoksijom inducirani čimbenik

CSF-1/CSF-M- faktor stimulacije kolonije makrofaga

MMP9- metalopeptidaza matriksa

bFGF- osnovni čimbenik rasta fibroblasta

TP- timidin fosforilaza

uPA- urokinaza

ADM-adrenomedulin

TIMP-1- tkivni inhibitor metalopeptidaze

SDF-1- stromalni faktor 1

LOX- lizil oksidaze

EMT- epitelmo-mezenhimska tranzicija

ELMO1- Engulfment and cell motility

SPARC- Secreted protein acidic and rich in cysteine

VCAM-1- vaskularnom adhezijskom staničnom molekulom

APO E- apolipoprotein E

R848- Resiquimod

CARTs- opuštajući transporter izmijene naboja

IRF5- interferonski regulatorni faktor 5

IKK β - inhibitor regulatornog faktora kappa- β kinaze

siRNA- male interferirajuće RNA

miRNA- microRNA

BTK- brutonova tirozin kinaza

HDACs- histon deacetilaza

PDT- fotodinamička terapija

G-klorin- klorin konjugiran s glukozom

M-klorin- klorin konjugiran manozom

TS- tumorska stroma

TN- tumorsko gnijezdo

OS- stopa preživljavanje (engl. overall survival)

SCLC- karcinom pluća malih stanica

NSCLC- karcinom pluća ne malih stanica

CRP- C-reaktivni protein

NAC- neoadjuvantna kemoterapija

pCR- patološki kompletni odgovor

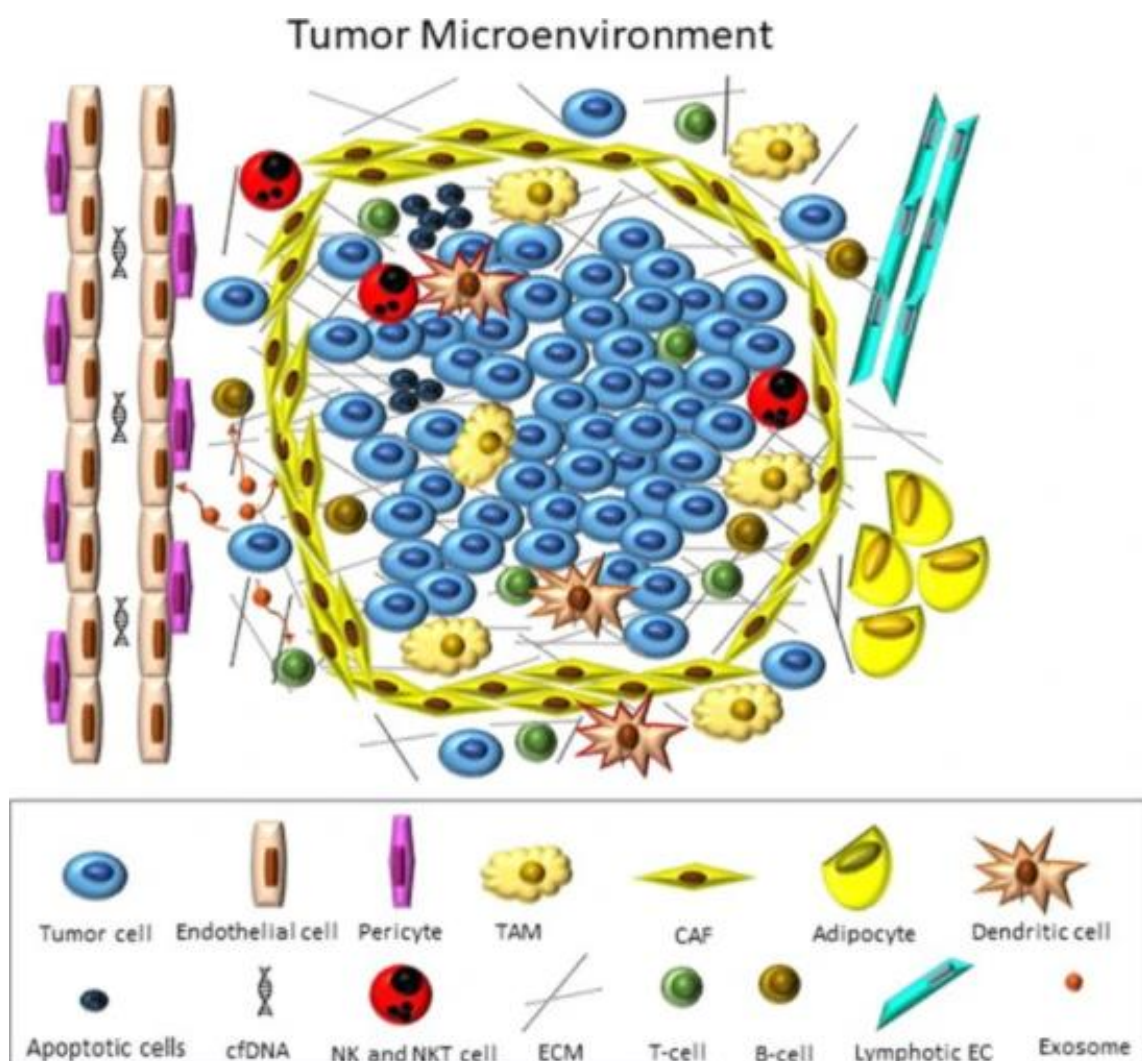
Sadržaj

1. Uvod	1
2. Svrha rada.....	6
3. Makrofazi.....	6
3.1 Podrijetlo makrofaga.....	6
3.2. Prepoznavanje antigena	9
3.3 Polarizacija makrofaga	12
4. Makrofazi iz mikrookoliša tumora.....	15
4.1. Migracija monocita u TME.....	16
4.2. Utjecaj TAMova na imunološki sustav.....	18
4.2.1 Imunosupresivni ligandi i receptori- inhibiranje fagocitoze i imunosnog odgovora.....	19
4.2.2. Imunosupresivni citokini	22
4.2.3. Lučenje arginaze 1 (Arg 1)	22
4.2.4. Komunikacija TAM i Treg stanica.....	23
4.3. Utjecaj TAM na angiogenezu.....	25
4.4. Utjecaj TAM na limfogenezu	26
4.5. Utjecaj TAM na metastaziranje tumora	27
4.5.1 Priprema pre-metastatske niše	28
4.5.2. Invazija tumorskih stanica	29
4.5.3. Intravazacija tumorskih stanica.....	30
4.5.4. Preživljavanje tumorskih stanica u cirkulaciji	30
4.5.5. Egzosomi iz TAM.....	31
5. Terapija protiv TAM.....	32
5.1. Utjecaj TAMa na tumorsko liječenje	32
5.2. Repolarizacija makrofaga	33
5.2.1. Repolarizacija makrofaga agonistom TLR-a.....	33
5.2.2. Repolarizacija makrofaga potaknuta nukleinskim kiselinama	34
5.2.3. Monoklonalna protutijela za repolarizaciju makrofaga	35
5.2.4. Drugi faktori koji uzrokuju repolarizaciju	35
5.3. Terapija sprječavanja nakupljanja M2 u TME.....	36
5.4. Fotodinamička terapija (engl. Photodynamic therapy, PDT)	38
6. TAM u karcinoma dojke i u karcinoma pluća	40
6.1. Karcinom dojke.....	40
6.1.2 TAM u karcinomu dojke	41
6.1.3. Utjecaj TAM na liječenje karcinoma dojke	43
6.2. Karcinom pluća.....	44

6.2.1. TAM u karcinomu pluća.....	45
6.1.3. Utjecaj TAM na liječenje karcinoma pluća	46
7. Zaključak	47
8. Literatura	48
9. Životopis	54

1. Uvod

Tumor nastaje nekontroliranom proliferacijom stanica koje može biti maligno ili benigno. Već je 1889. Stephan Paget pretpostavio da je okoliš tumora bitan za njegovo metastaziranje (engl. seed and soil theory).[1][2] S. Pegetova teorija je zaživjela tek 70-ih godina prošlog stoljeća kada se započelo s opsežnijim istraživanjem mikrookoliša tumora.[2] Danas je prihvaćeno da tumor ne čini samo masa malignih stanica nego i okolne stanice s kojima je tumor u interakciji. Skup stanica koje su u interakciji s tumorom te su važan faktor u tumorogenezi, promoviranju rasta, metastaziranju i patogenezi tumora nazivamo mikrookolišem tumora (engl. Tumor microenvironment, TME). Tumorske stanice komuniciraju s okolnim stanicama putem citokina, kemokina, faktora rasta, egzosoma, itd.[3][4] U tumorskom mikrookolišu prevladavaju uvjeti hipoksije i acidoze (pH od 6,2 do 6,9). Takvi uvjeti uz razne signale tumorskih stanica omogućuju da tumor utječe na svoju okolinu te je mijenja u korist svog preživljavanja. U nekim tumorima kao što je to karcinom dojke TME može činiti i do 90% mase tumora.[5] TME se sastoji od ekstracelularnog matriksa (engl. Extracellular matrix, ECM), fibroblasta, stromalnih stanica, vaskularnih i limfatičkih endotelnih stanica, pericita (Rougetove stanice), stanica imunskog sustava te ponekad i od adipocita.[3][4](slika 1) U sljedećem odlomku opisati ću navedene komponente TME.



Slika 1 Na slici su prikazane komponentne TMEa koje pomažu tumoru u razvitku. Slika je preuzeta iz članka „Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance“. [6]

ECM je građen od makromolekula kao što su glikoproteini, kolagen te i neki enzimi. Kao i u normalnom okruženju, ECM tumorskim stanicama pruža potporu, olakšava komunikaciju s okolnim stanicama, potiče proliferaciju i pomaže u adheziji na okolna tkiva. Fibroblasti su stanice vezivnog tkiva koje u TMEu pomažu tumoru u metastaziranju tako što omogućuju migraciju malignih stanica u krvožilni sustav te mogu biti imunosupresivni, proizvoditi kemokine i citokine koji promoviraju rast tumora i utjecati na sastav ECMA. Stromalne stanice poput fibroblasta

mogu lučiti kemokine i citokine koji doprinose razvitku tumora.[3][7] Za uspješan razvitak bilo kojeg tkiva, tako i tumorskog, potreban je i stalni dotok krvi. Stanice TME-a luče signale koji potiču angiogenezu pomoću vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. Vascular endothelial growth factor, VEGF), faktora rasta fibroblasta (engl. Fibroblast growth factor, FGF), trombocitnog faktora rasta (engl. Platelet-derived growth factor, PDGF), itd. te time dolazi do nastanka novog vaskularnog tkiva. Krvne žile u TME nisu nimalo nalik na krvne žile u zdravom tkivu. Krvne žile u TME su vrlo razgranate, neravnomjerne su debljine te često dolazi i do izljeva krvi u tumorsko tkivo. Izljev krvi doprinosi povećanju hipoksije. U slučaju ako stanice TME pojačano luče VEGFC ili VEGFD može doći i do limfogeneze. Limfatičke endotelne stanice kao i fibroblasti pomažu širenju malignih stanica. Periciti su u TME, kao i u ostatku tijela, potpora vaskularnom tkivu. Smanjen broj pericita u TME znači goru prognozu u liječenju tumora te se šanse za metastaziranjem povećavaju. Adipociti kao i većina navedenih stanica TME-a pomažu u metastaziranju i rastu tumora. Adipociti su stanice koje grade masno tkivo te služe za skladištenje energije. Mogu doprinjeti rastu tumora tako što tumorske stanice opskrbljuju masnim kiselinama. Zadnju skupinu stanica iz TME čine stanice imunosnog sustava. Stanice imunosnog sustava koje pronalazimo u mikrookolišu tumora čine stanice stečenog imunosnog sustava; T limfociti, B limfociti i dendritičke stanice (engl. Dendritic cells, DC) te stanice urođenog imunosnog sustava; prirodno ubilačke stanice (engl. Natural killer cells, NK), polimorfonuklearni leukociti i makrofazi. T stanice se mogu diferencirati u tri različite vrste; citotoksične CD8+, pomoćničke CD4+ i regulatorne T stanice (engl. Regulatory T cells, Treg). CD8+ T stanice su zbog svoje citotoksičnosti zadužene za eliminaciju stanica inficiranih virusom i za eliminaciju tumorskih stanica. CD4+T stanice indirektno sudjeluju u eliminaciji patogena lučenjem citokina.

Citokini stimuliraju stanice imunskog sustava među kojima su B stanice, CD8⁺ i makrofazi. Razlikuje se nekoliko tipova CD4⁺ stanica, a to su Th1, Th2 i Th17. Dominantni citokin koji luči Th1 je IFN- γ . IFN- γ aktivira makrofage i potiče eliminaciju unutarstaničnih patogena. Th2 luče IL-4, IL-5 i IL-13 koji stimuliraju eozinofile. Th17 luče IL-17 i IL-22 koji stimuliraju neutrofile i potiču uklanjanje izvanstaničnih bakterija. Treg su zadužene za supresiju autoreaktivnih stanica čime se sprječava nastanak autoimunskih bolesti. Glavna im je uloga da inhibiraju T stanični odgovor, ali mogu inhibirati i B i NK stanice. B stanice također mogu biti regulatorne stanice (engl. regulatory B cells, Breg) koje imaju funkciju kao i Treg. Glavni mehanizam Breg stanica je lučenje protu-upalnog citokina IL-10. Akumuliranje CD8⁺ T limfocita kao i CD4⁺ Th1 limfocita u TME označava bolju prognozu tumora. Nasuprot CD8⁺ i Th1 stanicama, Th2 i Th17 limfociti luče citokine koji mogu stimulirati rast tumora. Treg i Breg stanice u velikom broju tumora označavaju lošiju prognozu zbog svoje imunosupresivne uloge. DC su antigen prezentirajuće stanice i imaju bitnu ulogu u prezentiranju tumorskih antigena imunskim stanicama. Kod hipoksičnog TME DC gube svoju funkciju prezentiranja antigena T stanicama te time dolazi do smanjenog citotoksičnog odgovora T stanica što omogućava preživljavanje malignih stanica. Također u tumorskom mikrookolišu narušena je uloga NK stanica jer iako NK stanice u većini tumora uspješno potiču tumorske stanice na apoptozu u nekim TME mogu izgubiti svoju funkciju. TME može utjecati na NK stanice tako da im potisne odgovor na antigene[3]. Nadalje, bazofili i eozinofili, ovisno o tipu tumora, mogu imati pro-tumorsku ili anti-tumorsku funkciju.[8][9] Neutrofilu u većini tumora potiču angiogenezu, degradaciju ECMA i imaju imunosupresivnu funkciju.[3]

Najistaknutija stanica imunskog sustava koja doprinosi u razvitku tumora su makrofazi. Hipoksično okruženje prepuno raznih kemokina i citokina,

okoliš s povećanom koncentracijom mliječne kiseline, upalni okoliš tj. tumorski mikrookoliš privlači makrofage iz krvotoka. U TME makrofazi se često polariziraju u alternativno aktivirane makrofage (M2). M2 od svih stanica TME najviše potiču angiogenezu tumorskog tkiva, imaju imunosupresivnu funkciju te potiču tumorske stanice na rast i metastaziranje. Makrofazi iz tumorskog mikrookoliša (engl. Tumor associated macrophages, TAM) mogu činiti i do 50% mase tumora.[10] [11]

Tumorski mikrookoliš je vrlo važna komponenta tumora koja doprinosi njegovom opstanku i razvitku. Zbog te činjenice razvijaju se novi lijekovi koji bi djelovali ne samo na maligne stanice već i na stanice tumorskog mikrookoliša. TAM su izvrsna meta zbog visoke zastupljenosti u TME-mu te doprinosi razvitku tumora. Vrlo je važno što bolje opisati svojstva TAMova kako bi lijekovi bili što specifičniji. U sljedećim poglavljima detaljnije ću opisati svojstva makrofaga koja su bitna za preživljavanje tumora kao i komunikaciju između makrofaga i tumorskih stanica. Opisati ću i terapije koje se temelje na smanjivanju protumorskog utjecaja makrofaga. Zbog toga što se mikrookoliš svakog tumora razlikuje usporediti ću ulogu makrofaga u karcinomu dojke i karcinomu pluća. Izabrala sam karcinom dojke i pluća zato što su to dva vrlo agresivna i česta karcinoma te makrofazi čine veliki dio mikrookoliša ovih tumora.

Od 70-ih godina prošlog stoljeća do danas trend objavljivanja radova koji opisuju TAM neprestano raste. Zbog iznimno velikog broja novih radova potrebna je nova kritička analiza literature kako bi se sumirale glavne karakteristike TAMova. Sumiranjem svojstva TAMova olakšao bi se pristup u potrazi za novim lijekovima.

2. Svrha rada

U posljednjem desetljeću sve se više pažnje pridaje TME te je sve veći broj članaka izdanih na tu temu. Izabrala sam pregled literature o TAM, jednoj komponenti TME, zbog svoje važnosti i zastupljenosti u tumorima. Cilj ovog rada je prikazati mehanizme kako TAM utječe na supresiju imunosnog sustava oko tumora, na tumorsku angiogenezu i limfogenezu kao i na njegovo metastaziranje. Također je cilj ovog rada prikazati postojeće terapije koje su usmjerene na umanjenju pro-tumorskog učinka TAM na tumor.

3. Makrofazi

Makrofazi su stanice urođenog imunosnog sustava. Pronalazimo ih u većini tkiva. Zbog toga što su distribuirani po tkivima makrofazi su jedni od prvih stanica koje u dodiru s antigenom započinju imunosnu reakciju organizma. Imaju brojne funkcije u našem tijelu, od fagocitiranja mikroorganizama do pomaganja u obnovi tkiva.[11] Ovisno o primarnoj funkciji, makrofazi se mogu podijeliti u dva tipa; klasično aktivirani makrofazi (M1) i alternativno aktivirani makrofazi (M2).

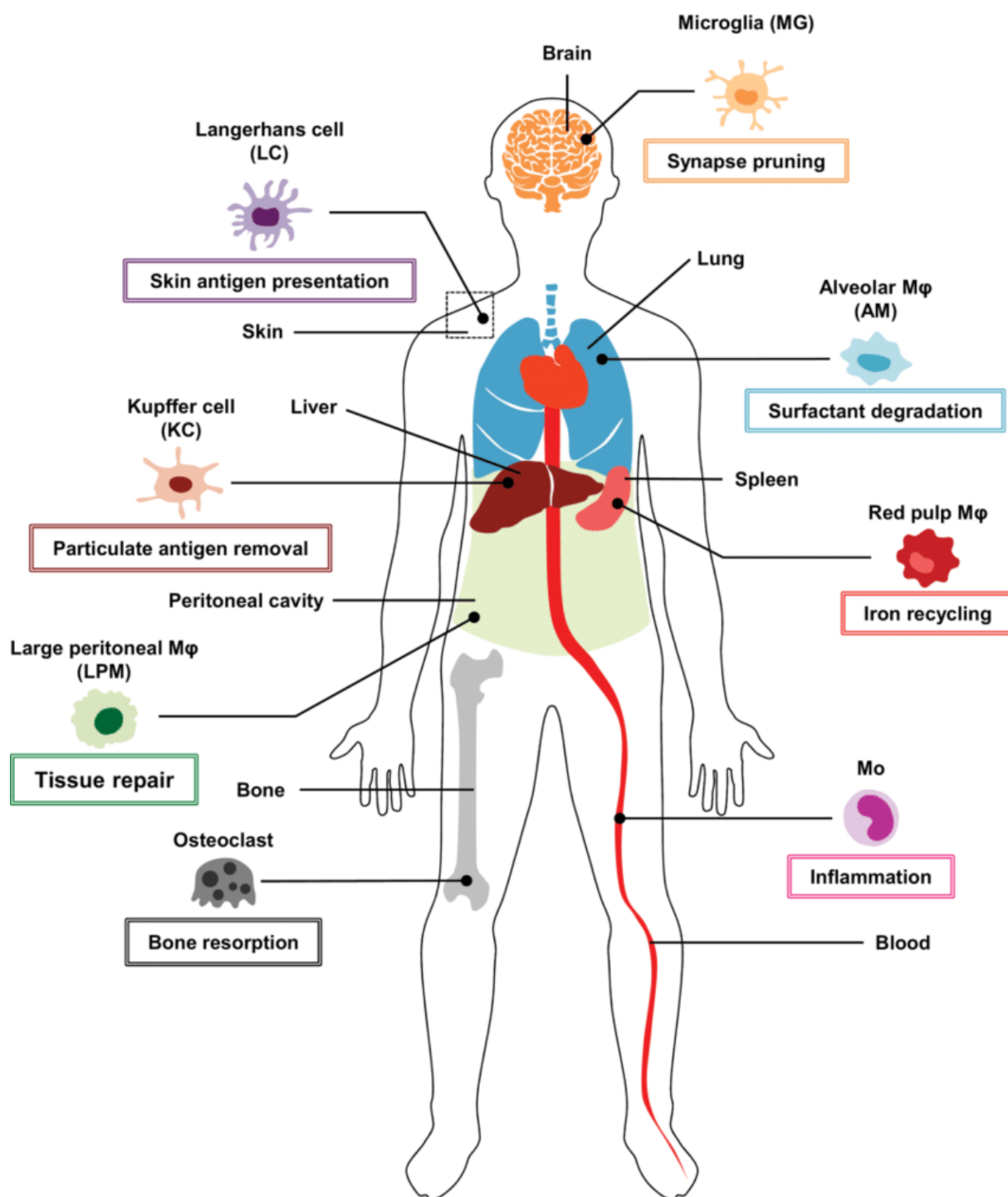
3.1 Podrijetlo makrofaga

Većina stanica imunosnog sustava nastaje tokom cijelog života u koštanoj srži. Međutim, dio makrofaga nastaje tokom embrionalnog razvoja. Oni se razvijaju iz žumanjačke vrećice, iz jetre fetusa i iz područja aorta-gonad-mezonefrisa (AGM). Nakon što se razviju smještaju se u tkiva fetusa.

Tokom života ti se makrofazi nalaze u tkivima te imaju sposobnost samoobnove. Drugi se dio makrofaga diferencira iz monocita koji cirkuliraju krvlju (adultni tip). Monociti na podražaj kemokina migriraju iz krvotoka u tkivo. U tkivu se monocit diferencira u makrofaga. [11][12]

Pošto postoje razna tkiva, makrofazi se mogu podijeliti u sub-populacije ovisno o tkivu u kojem se nalaze. Svaka sub-populacija makrofaga ima

razlike u funkcijskom fenotipu. Neke od sub-populacija makrofaga su Kupfferove stanice u jetri, mikroglia u središnjem živčanom sustavu (SŽSu), osteoklasti u kostima, histociti u slezeni itd.[12](slika 2)

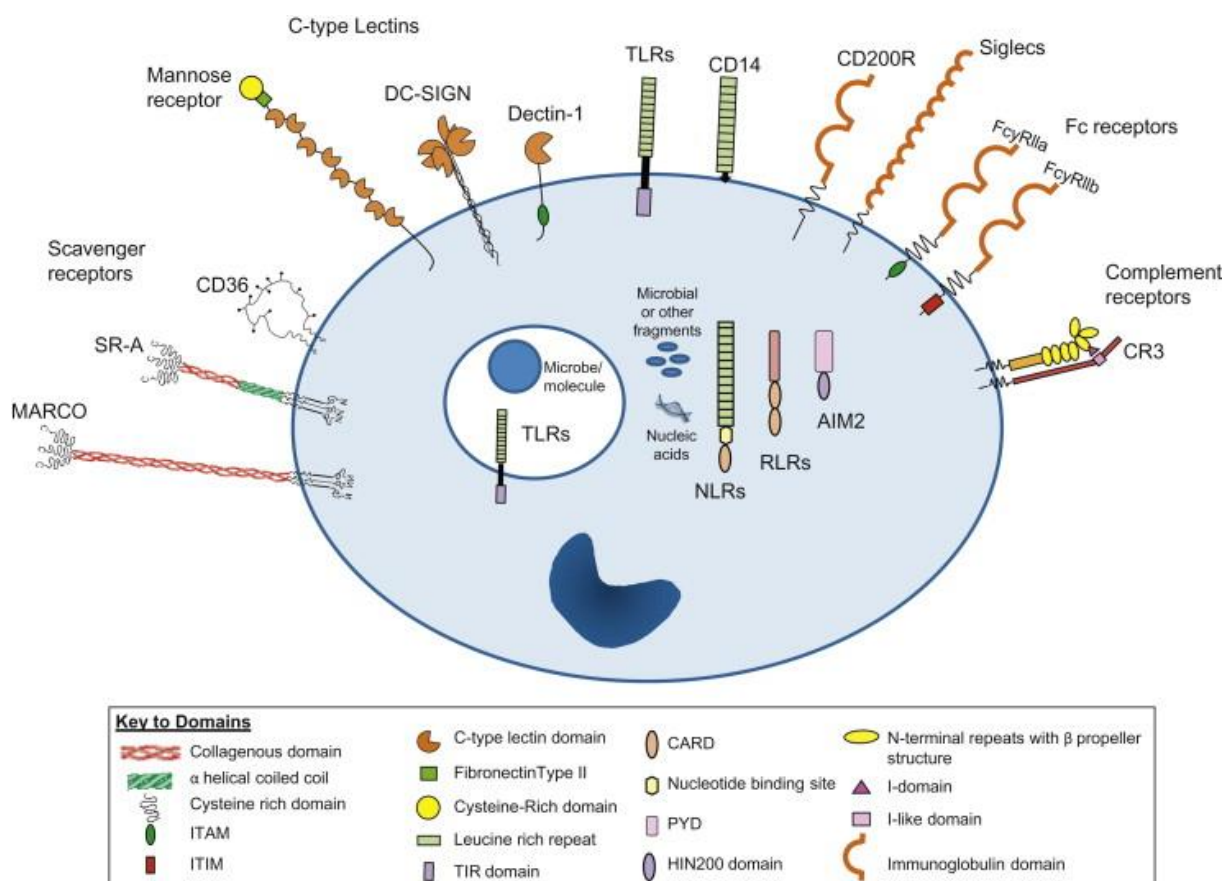


Slika 2 Na slici su prikazane različite subpopulacije makrofaga u tijelu (kupfferove stanice, osteoklasti, alveolarni makrofazi,...). Slika je preuzeta iz članka „Functions of the transcription factor Lyl-1 in the development of the macrophage lineage“. [13]

3.2. Prepoznavanje antigena

Patogeni ulaze u organizam na različitim mjestima. Da bi makrofag uspješno fagocitirao patogene ili oštećene stanice, makrofag prvo mora prepoznati antigen.

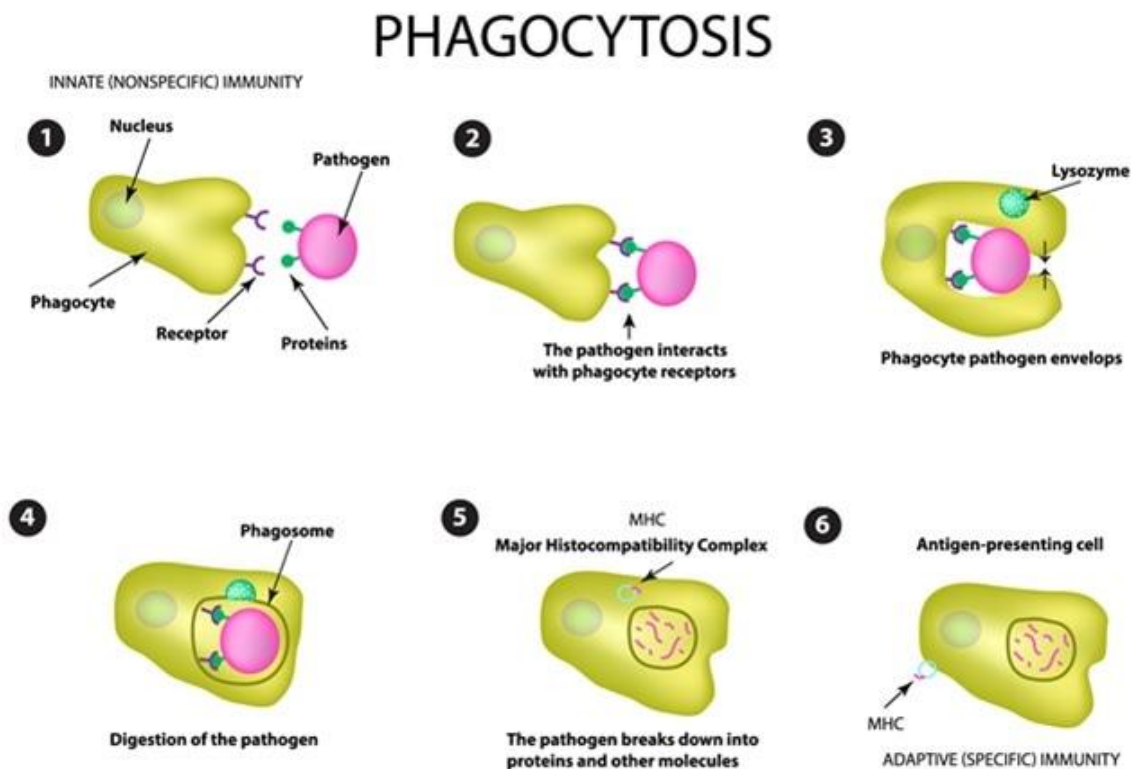
Makrofazi na sebi imaju receptore za prepoznavanje uzorka (engl. Pattern-recognition receptore, PRR). PRR prepoznaju molekulske uzorke povezane s patogenom (engl. Pathogen-associated molecular patterns, PAMP) koje sadrže patogeni ili molekulske uzorke povezane s oštećenjem stanice (engl. Damage-associated molecular patterns, DAMP) koje luče umiruće ili oštećene stanice. Najčešći PRR receptori na makrofazima su Dectin-1, manozni receptori (MR), lešinarski receptori (npr. MARCO, SR-A I, SR-A II), Fc receptori, komplementarni receptori (engl. complement receptor, CR) i toll-like receptori (TLR).(slika 3) Nakon što makrofag prepozna PAMP ili DAMP motive, zaokružuje stanicu te će ju internalizirati u fagosom. Fagosom se potom spaja s lizosomom te nastane fagolizosom. U fagolizosomu dolazi do zakiseljenja, otpuštanja sadržaja lizosoma te u kombinaciji s raznim enzimima koji su u fagolizosomu dolazi do proizvodnje radikala reaktivnih vrsta kisika (engl. Reactive oxygen species, ROS) i dušikovog oksida (NO). ROS proizvodi u sustavu nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze dok NO nastaje iz L-arginina djelovanjem enzima sinzetaze dušikova oksida. Radikali zatim unište fagocitirani mikroorganizam.[11](slika 4)



Slika 3 Na slici su prikazani neki od receptora zaduženih za prepoznavanje DAMP i PAMP motiva na makrofazima. Slika je preuzeta iz knjige „Autoimmune diseases (Fifth Edition), Chapter 11- Role of Macrophages in Autoimmunity“ [14]

Makrofazi osim što fagocitiraju antigen, mogu i prezentirati dijelove antigena na svojim membranama. (slika 4) Prezentiranjem antigena povezuje se urođeni i stečeni imunski sustav tako što dolazi do aktiviranja naivne (ili nativne) T stanice. Makrofag koji prezentira antigene će eksprimirati CD80, CD86, MHC I i MHC II molekule. Od MHC-I molekula u velikoj količini eksprimiraju se HLA-A i HLA-B, a u maloj HLA-C. Receptor HLA je receptor sličan leukocitnom imunoglobulinu (engl. Leukocyte immunoglobulin-like receptors, LILRs). LILR receptori se nalaze na raznim stanicama imunskog sustava; DC, neutrofili, eozinofili, makrofazi, NK, T i B stanicama te i na neuronima i endotelnim stanicama. LILRs obitelji spadaju inhibitorni (LILRB) i aktivirajući (LILRA) receptori.

LILRs su zaduženi za regulaciju imunskog sustava. Regulacijom se sprječava preslab ili pretjeran odgovor imunskih stanica na antigen. [11][12][15][16]



Slika 4 Na slici je prikazano prepoznavanje antigena, fagocitoza i prezentacija antigena. 1,2,3. Nakon što makrofag (žuta stanica) prepozna PRR receptorima PAMP motiv patogena, on ga zaokruži te ga internalizira u fagosom. 4 Potom se fagosom spaja s lizosomom te nastaje fagolizosom. U fagolizosomu patogen se razgrađuje pod utjecajem ROS i NO. 5 Fagolizosom se zatim spaja s mjehurićem iz golgijskog aparata koji u sebi nosi MHC II kompleks. 6 Za MHC II kompleks se veže peptid patogena te se taj kompleks MHC II molekule i peptida eksplicira na površini makrofaga. Slika je preuzeta iz članka „What is the difference Between a Phagocyte, Macrophage, Neutrophil and Eosinophil?“ [17]

Nakon što se makrofag susretne s antigenom on također luči citokine i kemokine. Lučenjem citokina i kemokina nastaje upalni odgovor organizma na antigen. Ovisno o tipu makrofaga razlikovati će se lučenje kemokina i citokina. Oba tipa makrofaga luče razne kemokine iz skupine CXC i CC. Najistaknutiji kemokin iz CXC skupine je CXCL8 (IL-8). IL-8 privlači naivne T stanice i neutrofile. Osim što privlači neutrofile, IL-8 također potiče aktivaciju i degranulaciju neutrofila. IL-8 potiče i angiogenezu. Najistaknutiji kemokini iz CC skupine su CCL4 (MIP-1 β) i

CCL2 (MCP-1). CCL4 privlači monocyte, T stanice, NK stanice i DC. CCL2 također privlači monocyte, T i NK stanice, DC te i bazofile. CCL2 aktivira makrofage, potiče bazofile na lučenje histamina te i promovira T_H2 imunski odgovor. Privlačenjem monocita na upaljeno mjesto povećava se broj makrofaga i DC. [11]

3.3 Polarizacija makrofaga

Polarizacija makrofaga je proces u kojem makrofazi poprimaju specifičan fenotip i funkciju ovisno o podražajima i signalima mikrookoliša.[12] Kao što je prije navedeno postoje dva tipa makrofaga ovisno o polarizaciji: M1 i M2.

M1 tip je klasičan primjer makrofaga koji sudjeluje u infekcijama. M1 ima anti-mikrobnu i anti-tumorsku funkciju. M1 makrofazi uklanjaju fagocitirane patogene i tumorske stanice stvaranjem ROS i NO. M1 makrofazi luče pro-upalne citokine. U visokim koncentracijama luče TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 i ciklooksigenazu-2 (COX-2), a u maloj količini luče i IL-10. TNF- α aktivira endotel i promovira upalu. IL-1 α i IL-1 β potiču stvaranje vrućice, aktiviraju T stanice i makrofage. IL-6 kao i IL-1 potiče vrućicu kao i rast i diferencijaciju T i B stanica. IL-1, IL-6 i TNF- α potiču jetru na stvaranje proteina akutne faze. Proteini akutne faze su proteini čija koncentracija u serumu poraste više od 25% za vrijeme infekcija. Neki od proteina akutne faze čija se koncentracija poveća je heptaglobin, C-reaktivni protein (engl. C-reactive protein, CRP), fibrinogen i proteini komplementnog sustava. IL-12 aktivira NK stanice i potiče diferencijaciju T stanica u T_H1 . IL-23 potiče proliferaciju T_H17 memorijskih T stanica i potiče stvaranje IFN- γ . IL-10 je moćan supresor funkcija M1 makrofaga jer potiče njegovu repolarizaciju u M2 makrofag.

Citokini	Utjecaj na organizam
----------	----------------------

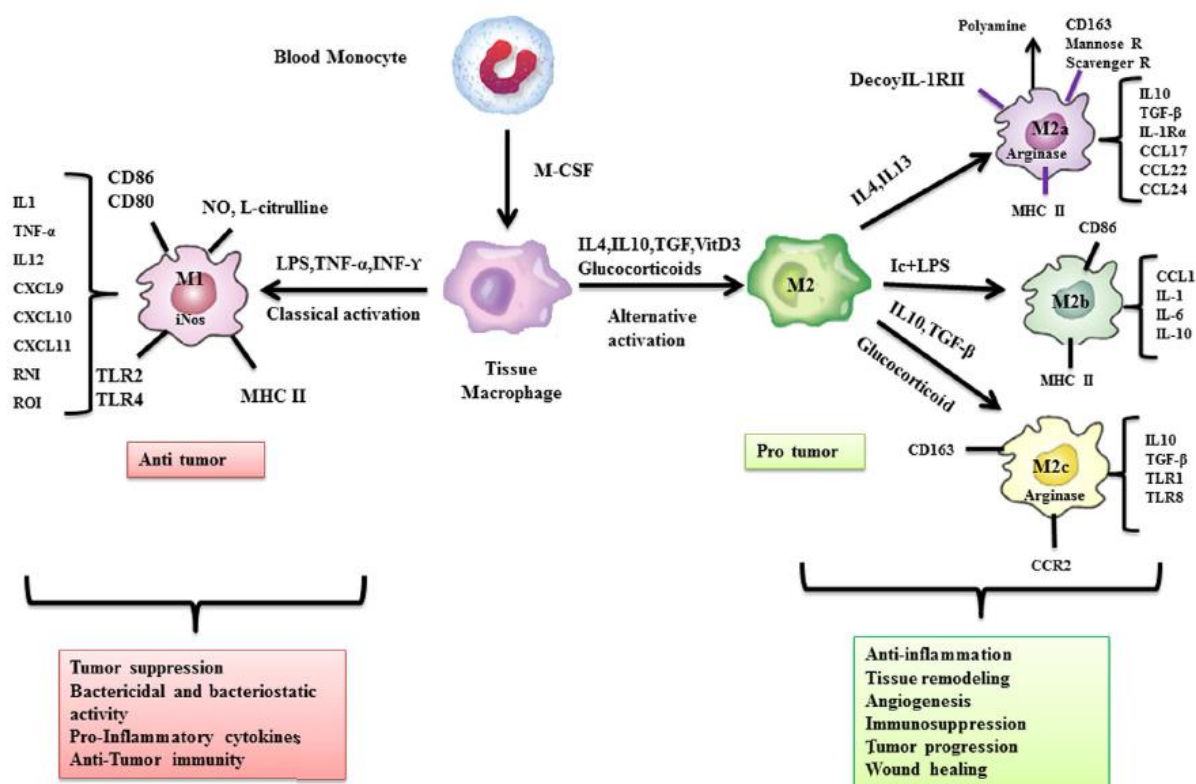
TNF- α	aktivacija endotela, pro-upalni citokin, stimulacija jetre za produkciju proteina akutne faze
IL-1 α i IL-1 β	stvaranje vrućice, aktivacija T stanica i makrofaga, stimulacija jetre za produkciju proteina akutne faze
IL-6	stvaranje vrućice, potiče diferencijaciju T i B stanica, stimulacija jetre za produkciju proteina akutne faze
IL-12	aktivacija NK stanica, potiče diferencijaciju T stanica
IL-23	proliferacija T stanica, potiče stvaranje IFN- γ
COX-2	pro-upalni citokin

Tablica 1 Prikaz najučestalijih citokina koje luče M1 makrofazi

Potrebno je nekoliko signala da se makrofazi polariziraju u M1. Četiri signala luče T_H1 stanice. T_H1 stanice luče citokin IFN- γ , TNF- α , CD40L i limfotoksin. Limfotoksin i CD40L čini makrofage osjetljivima na IFN- γ . Makrofazi se mogu polarizirati u M1 i prepoznavanjem lipopolisahraida (LPS) bakterija te svojim djelovanjem mogu oštetiti tkivo.[11][12]

M2 makrofazi, za razliku od M1 makrofaga, ne ubijaju bakterije i viruse ali pomažu u obnovi oštećenog tkiva izazvano djelovanjem M1 makrofaga. Makrofazi se polariziraju u M2 pod utjecajem T_H2 stanica. T_H2 luči citokine IL-4, IL-13 i IL-10. IL-4 i IL-13 aktiviraju transkripcijski faktor STAT6. IL-10 aktivira transkripcijski faktor STAT3. STAT3 i STAT6 nakon aktivacije moduliraju polarizaciju makrofaga u M2 makrofage. M2 makrofazi u svojoj citoplazmi imaju mnoštvo enzima arginaze-1. Arginaza-1 pretvara arginin u prolin i ornitin. Ornitin promovira popravak i remodeliranje tkiva kao i kontrakciju mukoznih glatkih mišića. M2 makrofazi pozitivno djeluju na formiranje i rast tumora tako što luče protu-upalne citokine čime se smanjuje imunski odgovor organizma i potiču angiogenezu. U visokim koncentracijama M2 makrofazi luče IL-10, TGF- β i VEGF.

Ovisno o citokinu koji ih polarizira, M2 makrofage možemo podijeliti u 4 podgrupe: M2a, M2b, M2c i M2d. M2a se inducira pod utjecajem IL-4 i IL-13. M2a imaju mnogo CD206 manoznih receptora, decoy receptora IL-1 II (IL1-RII) i antagonista IL-1 receptora (IL1-Ra). M2b nastaje utjecajem kompleksa protutijelo-antigen, stimulacijom TLR ili IL-1 receptora. Glukokortikoidi i IL-10 potiču stvaranje M2c. M2c inhibira upalni odgovor apoptotičkih stanica lučenjem IL-10 i TGF- β . Zadnja pogrupa M2 je M2d koj se inducira utjecajem TLR agonista na adenozijski receptor. Aktivacijom adenozijskog receptora inhibira se stvaranje pro-inflamatornih te se potiče stvaranje anti-inflamatornih citokina. Neki od citokina koje stvara M2d su IL-10 i VEGF. Oba citokina su karakteristična za makrofage iz mikrookoliša tumora. (slika 5)



Slika 5 Na slici je prikazana diferencijacija makrofaga u M1 ili M2 ovisno o okolišnim podražajima te i 3 podgrupe M2 makrofaga. Slika je preuzeta iz članka „Macrophage Polarization: Anti-Cancer Strategies to Target Tumor-Associated Macrophage in Breast Cancer“. [18]

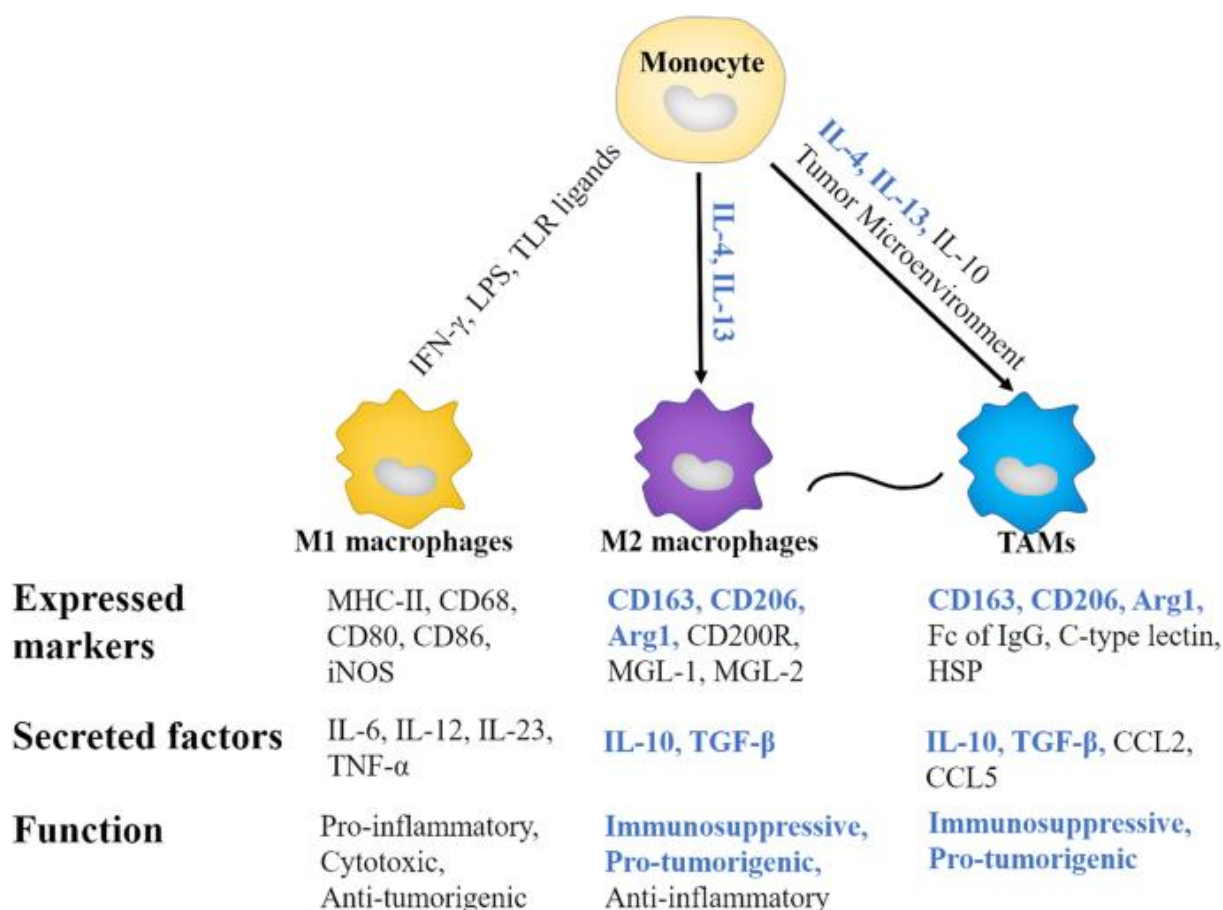
Citokini	Stanica koja luči	Utjecaj na diferencijaciju makrofaga
IFN- γ	T _H 1	M1
TNF- α	T _H 1, M1	M1
CD40L	T _H 1	M1
limfotoksin	T _H 1	M1
IL-4	T _H 2	M2a
IL-13	T _H 2	M2a
protutijelo-antigen	/	M2b
IL-10	T _H 2, M2c, M2d	M2c
glukokortikosteroidi	nadbubrežna žlijezda	M2c

Tablica 2 Prikaz utjecaja različitih citokina na diferencijaciju makrofaga

Makrofagi su vrlo plastične stanice zbog čega mogu mijenjati svoju polarizaciju te se taj proces naziva repolarizacija. Repolarizacija se događa ukoliko se promijene signali u mikrookolišu. Ovisno o promijeni signala M1 makrofazi mogu preći u M2 i obrnuto. [12]

4. Makrofazi iz mikrookoliša tumora

TAM su najzastupljenije stanice imunosnog sustava koje pronalazimo u stromi tumora. Mnoga istraživanja su potvrdila da veća gustoća makrofaga u tumorskom mikrookolišu znače goru prognozu u liječenju tumora. Makrofazi u velikoj mjeri doprinose odgovoru imunološkog sustava na tumorsko tkivo te i na razne načine utječu na preživljavanje tumorskih stanica. Iako makrofazi, ovisno o tipu (M1 i M2), imaju dvojaku funkciju u TME. Protumorski TAM se mogu promatrati kao posebna podgrupa makrofaga, ali zbog toga što pokazuju funkcije slične M2 tipu često ih se izjednačava s M2 tipom (slika 6). TAM mogu eksprimirati markere i M1 i M2 makrofaga. [10][19]



Slika 6 Na slici su prikazane razlike M1, M2 i TAM kao i sličnosti između TAM i M2. Slika je preuzeta iz članka „Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression“.[20]

4.1. Migracija monocita u TME

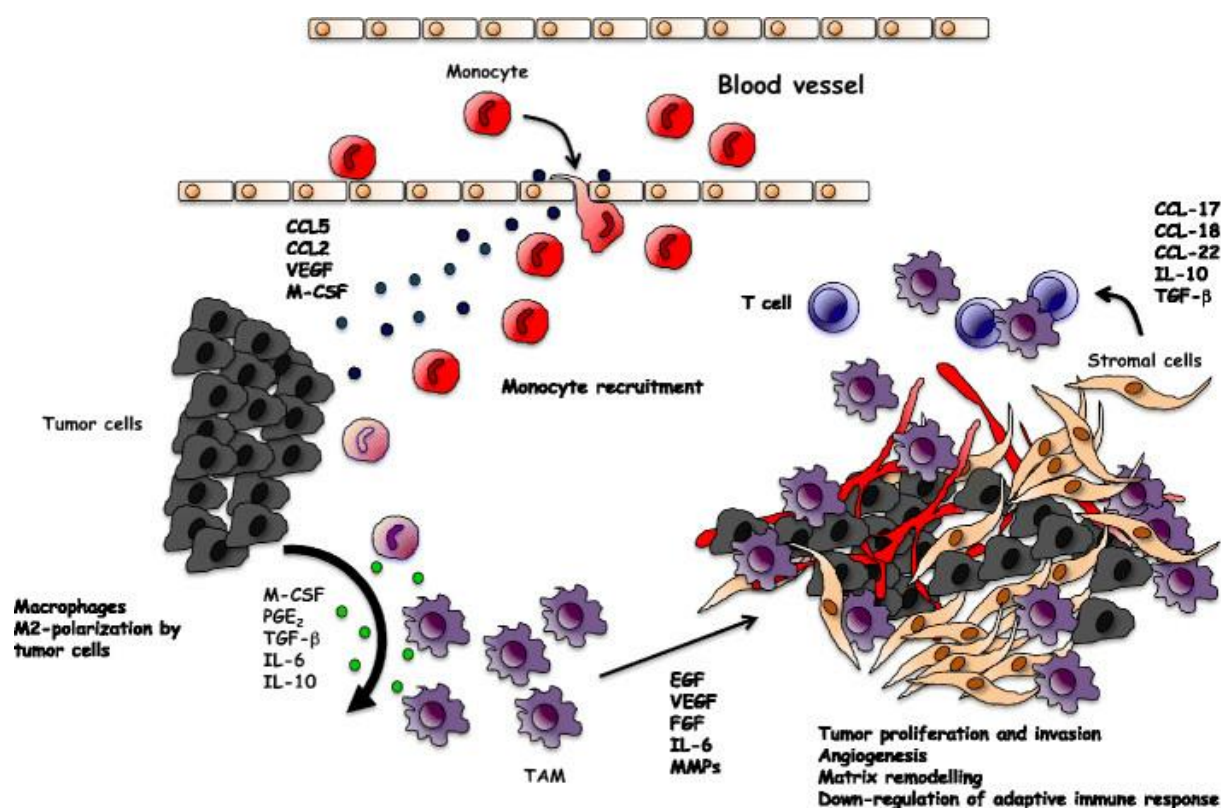
Maligne stanice u procesu svoga razvoja luče razne citokine i kemokine i mijenjaju uvjete u svom okolišu. Kao što je i u uvodu navedeno tumorski mikorookoliš je hipoksičan. Hipoksija nastaje zbog toga što tumorske stanice proliferiraju većom brzinom od normalnih stanica. Zbog brže proliferacije novonastalo tumorsko tkivo se ne može dovoljno brzo prokrviti što dovodi do manje koncentracije kisika. Tumorski okoliš je također i kiseliji zbog pojačane proizvodnje mliječne kiseline. Pojačana proizvodnja mliječne kiseline nastaje zbog toga što tumorske stanice u većoj koncentraciji unose glukozu u stanicu u svrhu proizvodnje energije. U procesu glikolize, glukoza se razgrađuje do mliječne kiseline. Mliječna kiselina tumorskim stanicama služi i za poticanje angiogeneze. Tumorske

stanice u prvom stadiju počinju lučiti razne citokine i kemokine među kojima su CCL2, CCL5, M-CSF (CSF-1), VEGF, TGF β i angiopoetin-2. Svi ti signali stimuliraju monocite iz krvotoka da migriraju u tumorski mikookoliš. Osim što tumorske stanice uzrokuju migraciju monocita one luče i IL-10 koji uzrokuje polarizaciju makrofaga u M2 tip koji na razne načine doprinosi razvitku tumora tj. nastaje TAM. TAM također luči CCL2, IL-10, IL-6, TGF- β i VEGF koji dodatno uzrokuju migraciju monocita u TME i njihovu polarizaciju. [5][10][19][21](slika 7)

Signali koje luče TAM	Utjecaj na tumor i TME
CCL2	migracija monocita
IL-6	migracija monocita
IL-10	migracija monocita, imunosupresija T stanica, proliferacija i migracija tumorskih stanica, razvitak iTreg,
TGF- β	migracija monocita, imunosupresija NK stanica, mastocita, granulocita i T stanica, regulacija DC, razvitak iTreg
VEGF	migracija monocita, angiogeneza, limfogeneza
Arg 1	metabolizam L-arginina
CCL22	kemokin za nTreg
CCL20	kemokin za nTreg
MMP9	modulacija EMCa
TNF- α	angiogeneza
bFGF	angiogeneza
TP	migracija endotelnih stanica
uPA	degradacija ECM-a
ADM	angiogeneza
semaforin 4D	sazrijevanje žila, mobilnost endotelnih stanica

prostaglandin E2	mobilnost endotelnih cjevčica
SDF-1	migracija tumorskih stanica

Tablica 3 Citokini koje luče TAM u svrhu razvitka tumora



Slika 7 Slika prikazuje citokine i kemokine koje tumor luči u svrhu privlačenja monocita iz cirkulacije, njihovu diferencijaciju u M2 makrofage te i pro-tumorski utjecaj TAM na tumor. Slika je preuzeta iz članka „Tumor-associated Macrophages (TAM) and Inflammation in Colorectal Cancer“.[22]

4.2. Utjecaj TAMova na imunološki sustav

U normalnim uvjetima stanice imunskog sustava su zaslužne za prepoznavanje i eliminaciju tumorskih stanica. Među stanicama imunskog sustava u eliminaciji tumorskih stanica su najviše zaslužene T i NK stanice. Jedan od mehanizama obrane tumorskih stanica od T i NK stanice je regrutiranje monocita iz krvotoka u TME te njihova diferencijacija u TAM. TAMovi su jedne od imunosupresivnih stanica koje tumor koristi u svrhu svoje zaštite. TAM imaju smanjenu sposobnost

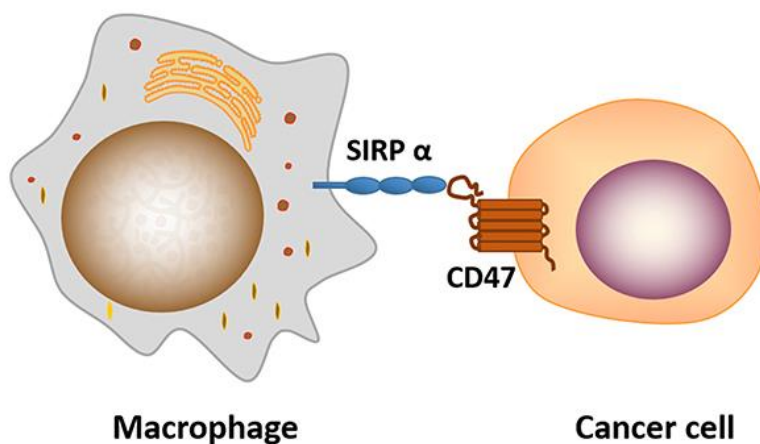
fagocitiranja tumorskih stanica, prezentiranja antigena te aktivacije T i NK stanica. [10][19]

4.2.1 Imunosupresivni ligandi i receptori- inhibiranje fagocitoze i imunosnog odgovora
PD-1 (engl. Programmed cell death protein 1, PD-1) pripada CD28 obitelji receptora. PD-1 je izražen na T stanicama u svrhu kontroliranja imunosnog odgovora T stanica. U kontaktu PD-1 i PD-L1 (engl. programmed cell death-ligand 1, PD-L1) supresira se imunosni odgovor aktiviranih T stanica. Tumorske stanice eksprimiraju PD-L1 te je to jedan od načina kojim tumor regulira imunosni odgovor. TAM za razliku od tkivnih makrofaga koji eksprimiraju PD-L1, imaju ekspresiju i PD-1 kao i T stanice. U dodiru s tumorskim PD-L1 dolazi do imunosupresivnog odgovora TAM čime se makrofazima inhibira sposobnost fagocitiranja tumorskih stanica. TAM također eksprimiraju i PD-L1. PD-L1 TAMova je stabilniji i neovisniji o IFN- γ za razliku od PD-L1 eksprimiranih na drugim stanicama. TAM koji imaju PD-L1 suprimiraju CD8⁺ T stanice što dodatno omogućava preživljavanje tumorskih stanica. [10][23][24](slika 10)

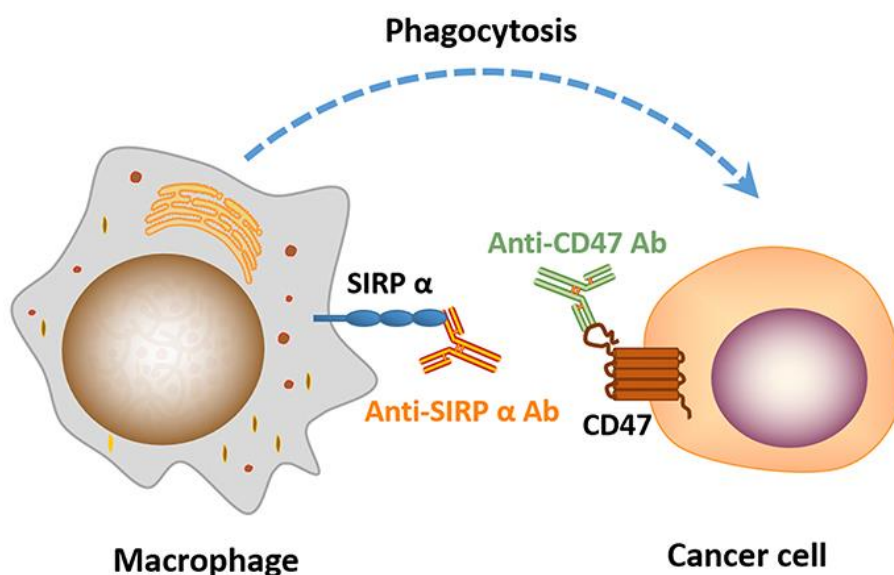
CD47 je transmembranski protein koji je prisutan na površini mnogih stanica pa tako i tumorskih. CD47 potječe iz obitelji imunoglobulina. On je antifagocitni signal te je zbog toga poznat i pod imenom „ne jedi me“ signal (engl. do not eat me signal). Signalni regulatorni protein α (engl. Signal regulatory protein alpha, SIRP α) je ligand CD47. SIRP α je najčešće eksprimiran na TAM, stanicama koštane srži i dendritičkim DC. SIRP α je inhibitorni ligand koji vezanjem na CD47 sprječava makrofagovu sposobnost fagocitiranja. U svojem citoplazmatskom djelu SIRP α sadrži inhibicijski motiv na osnovi imunoreceptora na tirozinu (engl. Tyrosine-based inhibitory motif, ITIM). Interakcijom CD47 i SIRP α dolazi do fosforilacije ITIM motiva. Fosforilacijom se aktiviraju SHP-1 i SHP-2. SHP-1 i SHP-2 mogu defosforilirati substrate puta za aktivaciju fagocitoze čime dolazi do njene inhibicije. U TME, tumorske stanice potiču proliferaciju

CD47 što dodatno utječe na makrofagovu sposobnost fagocitiranja tumorskih stanica. [10][25] (slika 8 i 10)

A



B



Slika 8 Na slici A je prikazana inhibicija makrofagove sposobnosti fagocitiranja interakcijom CD47 i SIRPα. Na slici B je prikazana inhibicija SIRP α i CD47 monoklonskim protutijelima što vraća makrofagovu sposobnost fagocitiranja. Slika je preuzeta iz članka „Potential New Cancer Immunotherapy: AntiCD47-SIRPα Antibodies“.[26]

Tumorske stanice eksprimiraju abnormalne HLA-I molekule. Tumorske stanice također luče imunosupresivni faktor DcR3 (engl. Decoy receptor 3). DcR3 deacilira CIITA promotor. Deacetilacijom se potiče diferencijacija u TAM čime se smanjuje eksprimiranje MHC-II molekula na njegovoj površini. Osim što TAM imaju smanjenu mogućnost prezentiranja

antigena imaju i drukčiju ekspresiju HLA-I molekula. TAM u većoj količini ekspimiraju HLA-C, HLA-G, HLA-E, HLA-F i inhibitorne LILRs; LILRB1 (ILT2) i LILRB2 (ILT4). Inhibitorni receptori ILT2 i ILT4 u doticaju s tumorskim HLA-I molekulma dovode do supresije fagocitoze u TAM. Ta Interakcija je još jedan od načina kako tumorske stanice utječu na makrofagovu fagocitozu. Vezanjem ILT2 TAMa na HLA-I molekule tumora, TAM luče TGF- β 1. TGF- β 1 privlači monocite iz krvotoka i supresira njihove citotoksične funkcije. Aktivirani ILT2 utječe na Th2 tako što dovodi do pojačanog lučenja IL-4 i IL-13. IL-4 i IL-13 reguliraju aktivnost arginaze 1 čime se dodatno utječe na polarizaciju makrofaga u M2 tj. TAM. HLA-C i HLA-G na TAM može dovesti do inhibicije NK stanica i efetorskih T stanica vezanjem na njihove receptore KIR (engl. Killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR). Vezanjem ILT2 receptora NK stanice na HLA-I molekule TAMova inhibira se sekrecija IFN- γ . IFN- γ je glavni citokin koji je zaslužan za inhibiciju TAMa te se bez IFN- γ ne može inducirati citotoksičnost T stanica. TAM može inducirati imunosupresiju T stanica i sekrecijom topivog HLA-G. HLA-G se veže za ILT-2 i ILT-4 na mijeloidnim antigen prezentirajućim stanicama. Osim što se mijeloidnim stanicama smanjuje mogućnost prezentiranja antigena, smanjuje se i sekrecija TGF- β . NK stanice ekspimiraju i heterodimere CD94/NKG2A. CD94/NKG2A se ponašaju kao inhibitorni receptori vezanjem za HLA-E TAMa. Njihovom interakcijom potiče se NK stanice na lučenje IL-10 i TGF- β . HLA-E služi i kao zaštita od citotoksične lize NK i T stanica. [16](slika 10)

Još jedan od važnih liganada kojeg prikazuju TAM, ali i tumorske stanice je B7. B7 je inhibitor receptora CTLA-4. B7 se natječe za aktivno mjesto CTLA-4 s kostimulatorom CD28. U normalnim uvjetima B7 je sigurnosni mehanizam koji sprječava pretjerani imunosni odgovor. CTLA-4 receptor se nalazi na površini aktiviranih T, B i NK stanica. Interakcijom CTLA-4 s

B7 dolazi do direktne inhibicije TCR signalnog puta čime se inhibira citotoksičnost i aktivacija T stanica.[15] (slika 10)

Na površini TAM se nalaze i ligandi FasL i TrailL. To su ligandi za stanične receptore smrti Fas i Trail. Interakcijom FasL s Fas ili TrailL s Trail stanica ulazi u apoptozu. [15](slika 10)

4.2.2. Imunosupresivni citokini

Najznačajniji imunosupresivni citokini koje luče TAM su IL-10 i TGF- β . IL-10 proizvode Th2, monociti i regulatorne T stanice. IL-10 je kodiran IL10 genom koji se pojačano prepisuje u TAM. IL-10 se veže za CD28 receptor T stanica. Vezanjem za CD28 inhibira se fosforilacija tirozina. Bez fosforiliranog tirozina ne može se vezati fosfatidilinozitol 3-kinaze i time prenjeti signal u T stanicama. T stanice koje zahtijevaju dodatni podražaj, vezanjem IL-10 za CD28 onemogućit će se njegova aktivacija jer T stanice neće moći primiti dovoljnu kostimulaciju. IL-10 će inhibirati Th1 i Th2 CD4⁺ T stanice. IL-10 također promovira proliferaciju i migraciju te regulira apoptozu tumorskih stanica tako što aktivira c-Met/STAT3 signalni put. [27][28](slika 10 i 13)

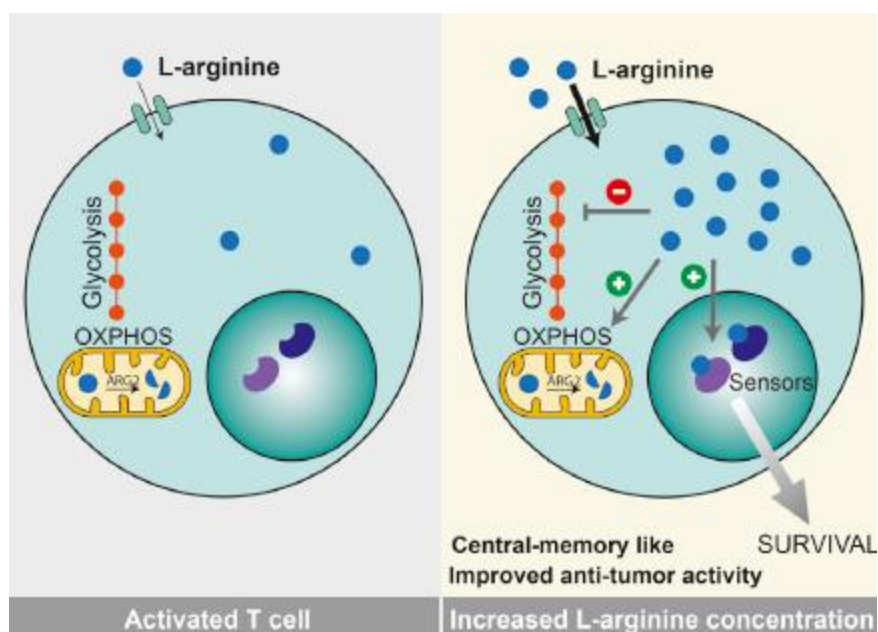
TGF- β na nekoliko načina regulira imunosnu supresiju. TGF- β može suprimirati stvaranje IL-2 ili njegov signalni put. Bez IL-2 aktivirane T stanice ne mogu proliferirati. TGF- β može utjecati na proliferaciju i utjecajem na ekspresiju unutarstaničnih regulatornih kinaza i promotora. TGF- β kao i IL-10 može inhibirati Th1 i Th2 stanice, ali on može utjecati i na CD8⁺ T stanice. On također regulira sazrijevanje i diferencijaciju DC. TGF- β može i suprimirati NK stanice, mastocyte i granulocyte. [29](slika 10)

4.2.3. Lučenje arginaze 1 (Arg 1)

Za razvitak T stanica bitan je L-arginin. L-arginin je nužan za normalan metabolizam T stanica. Povišena razina L-arginina uzrokuje prelazak

metabolizma sa glikolize na oksidativnu fosforilaciju što omogućuje stvaranje više ATP-a. Bitan je i za ekspresiju ζ lanca CD3 koreceptora. Bez funkcionalnog koreceptora ne može doći do signalizacije u T stanicama te samim time i do njene aktivacije. U aktiviranih T stanica pokazalo se da L-arginin potiče i stvaranje centralnih memorijskih T stanica (T_{cm}). (slika 9) [15][30]

TAM mogu lučiti enzim Arg 1. Stvaranje Arg 1 je potaknuto s IL-2 i mliječnom kiselinom. Oba faktora su zastupljenija u većoj koncentraciji u TME. Arg 1 metabolizira L-arginin u ureju i L-ornitin. Metaboliziranjem L-arginina smanjuje se njegova dostupna koncentracija. Za posljedicu toga, T stanice u TME ne mogu unijeti dovoljnu količinu L-arginina potrebnog za njihov normalan rad. [15][31] (slika 10)



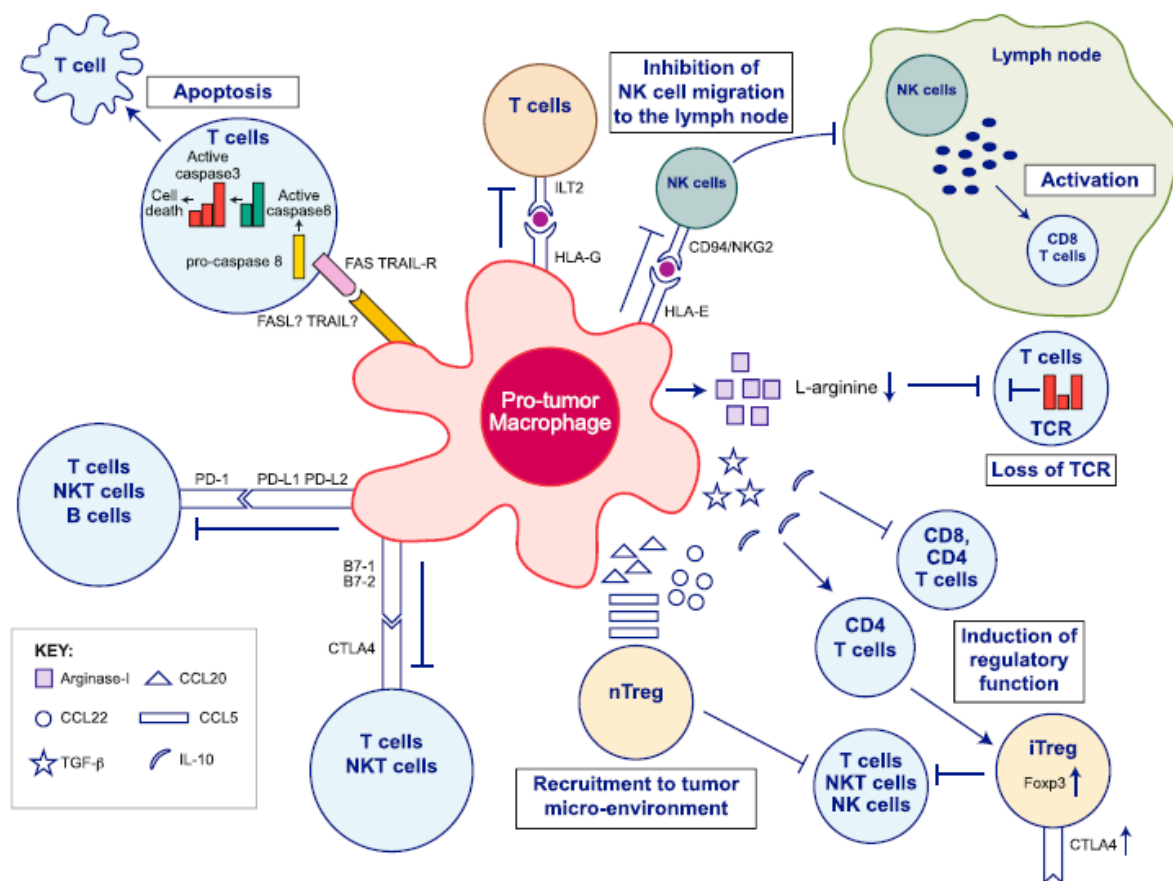
Slika 9 Slika prikazuje utjecaj L-arginina na funkciju centralnih memorijskih T stanica. Slika je preuzeta iz članka „L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity“ [30]

4.2.4. Komunikacija TAM i Treg stanica

Treg stanice, kao što je i prije navedeno, imaju važnu ulogu u regulaciji imunskog odgovor. Ovisno o mjestu nastanka dijelimo ih na prirodne Treg (engl. Natural regulatory T cells, nTreg) i inducirane Treg (engl.

Induced regulatory T cells, iTreg). NTreg nastaju u timusu, a iTreg u sekundarnim imunskim organima. ITreg, za razliku od nTreg stanica koje se razvijaju u timusu, razvijaju se iz naivnih CD4⁺ T stanica na podražaj citokina TGF- β i IL-10. U TME Treg supresiranjem imunskog odgovora pomaže tumoru u preživljavanju. [11][32]

TAM osim lučenjem citokina, enzima i eksprimiranjem različitih liganada može indirektno suprimirati imunski odgovor i regrutacijom Treg stanica. NTreg stanice imaju kemokinske receptore CCR4, CCR5, CCR6 i CCR10. TAM, ovisno o vrsti tumora, može lučiti CCL22, CCL20 i može eksprimirati CCR5 ligand. CCL22 privlači CCR4⁺ nTreg, a CCL20 privlači CCR6⁺ nTreg stanice. Kao što je i prije navedeno TAM luči IL-10 i TGF- β . Oba faktora su pokazala da pripomažu u diferencijaciji CD4⁺ T stanica u iTreg. TGF- β inducira prepisivanje Foxp3 gena. Foxp3 potiče diferencijaciju naivnih T stanica u Treg. Mehanizam djelovanja IL-10 još nije jasno razriješen, ali se smatra da djeluje po sličnom principu kao i TGF- β tj. da inducira prepisivanje Foxp3. [15][32](slika 10)



4.3. Utjecaj TAM na angiogenezu

Tumorsko tkivo uslijed brzog rasta gubi dotok krvi te se smanjuje opskrba hranjivim sastojcima i kisikom koji su mu potrebni za rast. Angiogeneza tumora je zbog toga esencijalan proces koji pomaže tumorskim stanicama u preživljavanju i rastu. Tumorske stanice mogu same lučiti angiogenske faktore koji potiču stvaranje angiogeneze, ali im u tome uveliko pomažu stanice TME. TAM se najviše ističu iz TME kao izvori i modulatori dostupnosti angiogeneskih faktora. [33]

Vaskularni endotelni faktor rasta-A (VEGF-A) je najistaknutiji faktor angiogene kojeg luči TAM. VEGF-A se veže za receptore VEGFR-1. VEGF-A stimulira kemotaksiju endotelnih stanica koje onda mogu formirati krvne

žile. Hipoksični uvjeti potiču ekspresiju hipoksijom induciranih čimbenika 1 α i 2 α (engl. Hypoxia-inducible factor, HIF). HIF-1 α i HIF-2 α su transkripcijski faktori koji reguliraju ekspresiju VEGF-A. Stvaranje HIF-a može biti potaknuto i citokinima IL1 β i TGF β 1 koje proizvode TAM. Tumori mogu lučiti faktor stimulacije kolonije makrofaga (engl. Macrophage colony stimulating factor, CSF-1/ CSF-M). CSF-M uz CCL2 inducira ekspresiju VEGF-A aktivacijom NF- κ B. TAM luče i metalopeptidazu matriksa 9 (engl. Matrix metalloproteinase 9, MMP9). MMP9 enzimatskim djelovanjem može osloboditi VEGF-A iz ekstracelularnog matriksa.[33]

Osim VEGF-A TAM mogu lučiti i druge angiogenske faktore. Neki od tih faktora su TNF α , osnovni čimbenik rasta fibroblasta (engl. Basic fibroblast growth factor, bFGF), timidin fosforilazu (engl. Thymidine phosphorylase, TP), urokinaza (engl. Urokinase-type plasminogen activator, uPA), adrenomedullin (ADM), semaforin 4D (engl. Semaphorin 4D), IL1 β i prostaglandin E2. TP stimulira migraciju endotelnih stanica. UPA potiče degradaciju ekstracelularnog matriksa čime se omogućava prodiranje vaskularnih stanica. ADM osim što potiče angiogenezu on i štiti endotelne stanice od apoptoze i utječe na njihovu permeabilnost i vaskularni tonus. Semaforin 4D potiče sazrijevanje žila i mobilnost endotelnih stanica. Mobilnost endotelnih stanica potiče preko plexin B1 receptora. Na mobilnost endotelnih stanica utječe i prostaglandin E2. IL1 α potiče stvaranje endotelnih cjevčica i neovaskularizaciju.[33]

4.4. Utjecaj TAM na limfogenzu

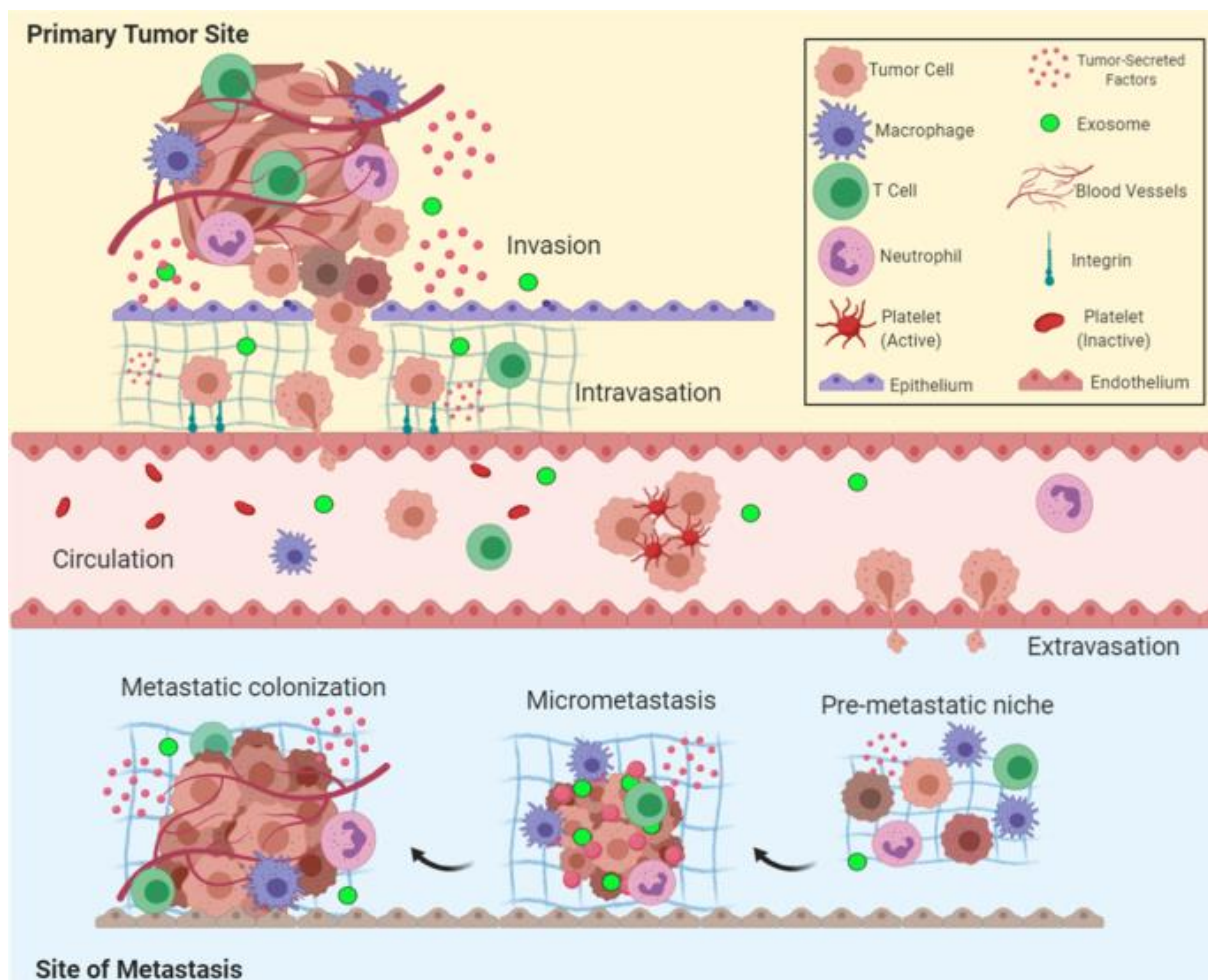
Nasuprot angiogenezi, limfogeneza nije potrebna tumoru za preživljavanje. Limfogeneza tumoru omogućava metastaziranje putem limfe. Limfne žile se sastoje od rahlo spojenih endotelnih stanica koje su obavijene pericitima ili vaskularnim glatkim mišićima. Takva „labava“ struktura omogućava lako prodiranje tumorskih stanica. Stanice limfnih žila imaju izražen VEGF receptor 3. TAM i tumorske stanice mogu lučiti

limfogene faktore rasta VEGF-C i VEGF-D koji direktno potiču limfogenezu. VEGF-C i VEGF-D se vežu na VEGFR3. VEGF-C i VEGF-D se mogu vezati i za VEGFR-2 te tako utjecati i na angiogenezu. Pošto VEGF-C i D mogu utjecati na angiogenezu tako može i VEGF-A utjecati na limfogenezu. VEGF-A vezanjem na VEGFR-2 endotelnih stanica limfe može potaknuti njihovu proliferaciju i migraciju. [33][34]

TAM može indirektno utjecati na limfogenezu tako da remodulira ekstracelularni matriks. Kao i kod angiogeneze MMP i uPA utječu na ECM. MMP-2 i MMP-9 olakšavaju migraciju endotelnih stanica limfe kroz vlakna kolagena. Svi ovi procesi su izuzetno bitni jer omogućuju metastaziranje tumora. [33]

4.5. Utjecaj TAM na metastaziranje tumora

Metastaziranje je širenje tumorskih stanica iz jednog staničnog okoliša u drugo. Metastaziranje se odvija u više faza. Tumorske stanice prvo moraju proći kroz ekstracelularni matriks koji ih okružuje. Zatim, tumorske stanice moraju proći kroz vaskularni endotel i preživjeti imunosni sustav u cirkulaciji. Tumorske stanice se također moraju i uhvatiti za stjenku žile kojom cirkuliraju u svrhu prolaska nazad u tkivo te se potom kolonizirati na novom tkivnom mjestu. Krvne i limfne žile nastale angiogenezom i limfogenezom su glavni put metastaziranja tumora. TAM pomažu tumorskim stanicama u njihovom metastaziranju u svim fazama.[35](slika 11)



Slika 11 Slika prikazuje metastaziranje tumora. Metastaziranje se sastoji od 5 koraka koji uključuju invaziju, intravazaciju, cirkulaciju, ekstravazaciju i kolonizaciju. Slika je preuzeta iz članka „Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited“. [36]

4.5.1 Priprema pre-metastatske niše

Primarni tumor je sposoban „označiti“ mjesto širenja prije nego li počne metastazirati. Na to „označeno“ mjesto će se tumor prvo proširiti i naziva se pre-metastaska niša. Makrofazi su jedan od glavnih faktora koji sudjeluju u stvaranju pre-metastatske niše. Tumorske stanice luče faktore koji potiču odlazak makrofaga u krvotok i zadržavanje u pre-metastatskoj niši. Faktori koje luči tumor, a utječu na makrofage su CCL-2, VEGF, PLGF, CSF-1, TNF- α , TGF- β , EGF, egzosome i tkivni inhibitor metalopeptidaze (engl. Tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP-1). Grupiranje makrofaga je tumorskim stanicama oznaka za nakupljanje. Takvi makrofazi luče

kemokin CXC stromani faktor 1 (engl. Stromal derived factor 1, SDF-1) i angiopoetin-1. SDF-1 potiče migraciju tumorskih stanica i njihov rast, a angiopoetin-1 potiče adheziju tumorskih stanica na endotel. Luče i MMP, integrine i lizil oksidaze (engl. Lysyl oxidase, LOX) u svrhu remodeliranja ECMA. Moduliranje ekstracelularnog matriksa je još jedan način kojim se tumorske stanice usmjeruju na pre-metastatsko mjesto. [35]

4.5.2. Invazija tumorskih stanica

Kao što je i prije navedeno, prelazak tumorskih stanica kroz ECM u stromu je prvi korak metastaziranja. Tumorske stanice koje imaju tu sposobnost su vrlo invazivne te su slabije povezane s ostalim stanicama primarne nakupine.

Tumorske stanice prvo moraju preći iz epitela u mezenhim (engl. Epithelial-mesenchymal transition, EMT). TAM potiče ekspresiju ključnih proteina N-kadherin i Snail potrebnih za metastaziranje. N-kadherin je posrednik adhezije, a Snail promovira represiju E-kadherina čime se regulira EMT. TAM također luči IL-1 β , IL-8, IL-6 TNF- α i TGF- β koji dodatno potiču tumorsku invaziju. IL-8 regulira ekspresiju ELMO1 (engl. Engulfment and cell motility 1) u tumorskim stanicama. ELMO-1 služi kao pro-angiogeni faktor i faktor za preživljavanje tumorskih stanica u krvotoku. IL-8 također pojačano potiče ekspresiju p-JAK, p-STAT3 i Snail čime se promovira EMT. TAM pomaže i u degradaciji ECM tako što luči protelitičke enzime kao što su katepsin, MMP7, MMP2, MMP9 i serinske proteaze. IL-6 potiče tumorsku angiogenezu i EMT tako što potiče fosforilaciju STAT3 koja se potom aktivira, kao i IL-8. [10][35](slika 13)

Nakon što se ECM degradira i remodelira, tumorske stanice koriste komponente ECMA fibronektin i vitronektin kako bi se kretao do žila. TAM pomaže u stvaranju interakcija između ECM i tumorskih stanica tako što sintetizira SPARC (engl. Secreted protein acidic and rich in cysteine).

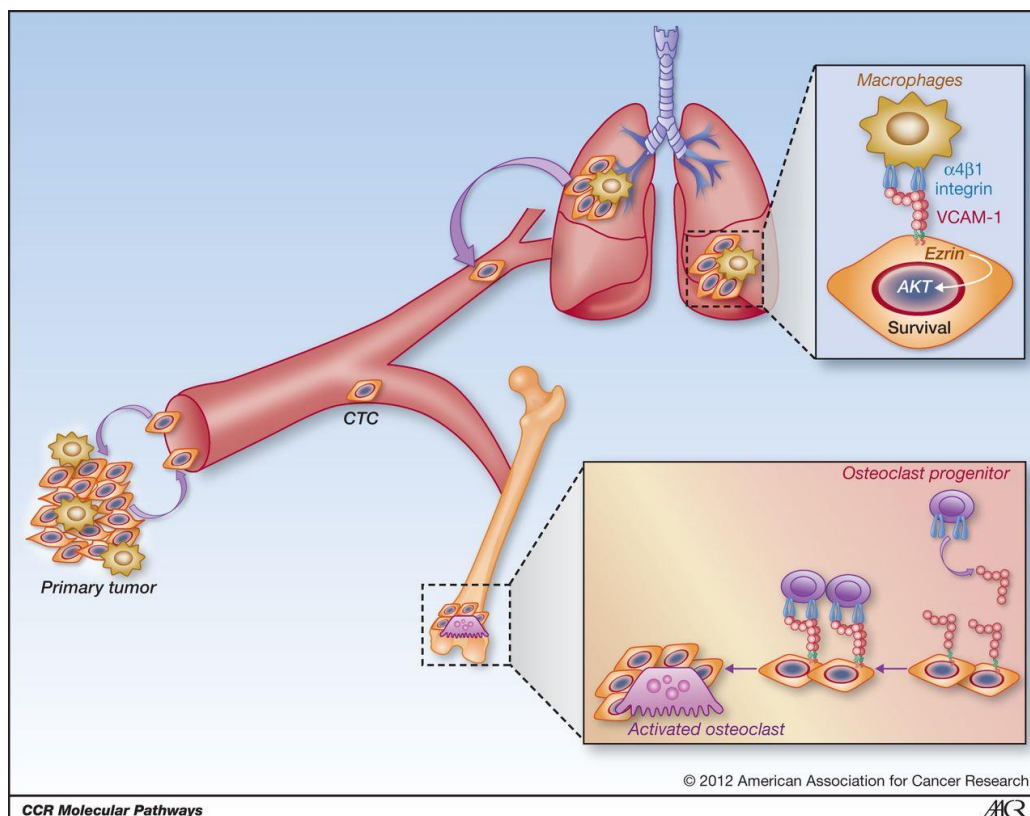
SPARC pomoću integrina stvara interakcije vlakna ECMA s tumorskim stanicama. [35]

4.5.3. Intravazacija tumorskih stanica

Nakon što tumorske stanice dođu do žila one moraju proći kroz malene pore kako bi ušle u krvotok. Kada tumorske stanice migriraju one se okruže s TAM i s epitelnim stanicama. Kako bi taj kompleks ušao u krvotok tumorske stanice luče CSF-1, a TAM tom podražaju odgovara s pojačanom migracijom i lučenjem EGF. EGF pripomaže u migraciji tumorskih stanica kroz žile u cirkulaciju. [35]

4.5.4. Preživljavanje tumorskih stanica u cirkulaciji

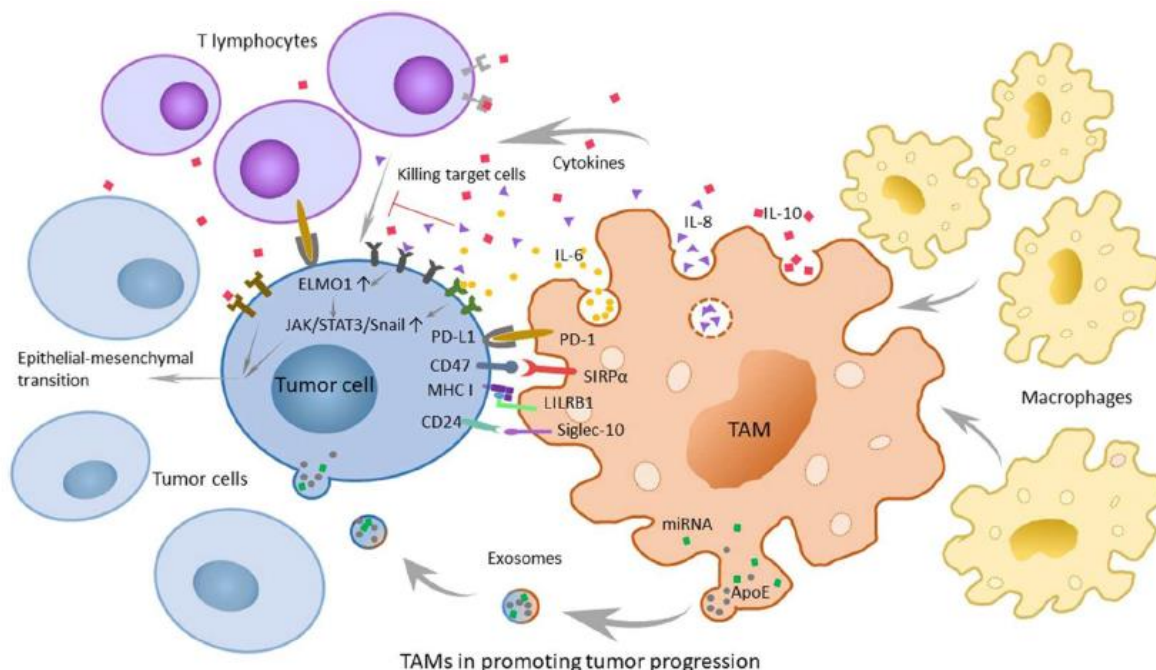
Tumorske stanice nakon što prodru u cirkulaciju moraju dovoljno dugo preživjeti da izađu iz cirkulacije. Makrofazi aktiviraju PI3K/Akt tumorski put za preživljavanje prije nego tumorska stanica uđe u krvotok. Put se aktivira interakcijom $\alpha 4$ integrina TAMa s vaskularnom adhezijskom staničnom molekulom 1 (engl. Vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1). Aktivacijom PI3K/Akt puta tumorska stanica se štiti od proapoptotičkih citokina. TAM štiti tumorske stanice i lučenjem imunosupresivnih citokina koji su objašnjeni u poglavlju 2.2.2. [35](slika 12)



Slika 12 Slika prikazuje utjecaj makrofaga na aktivaciju PI3K/Akt puta za preživljavanje u tumorskim stanicama. Put se aktivira interakcijom VCAM-1 molekule na tumorskim stanicama i $\alpha4$ integrina izraženog na makrofazima. Slika je preuzeta iz članka „Molecular Pathways: VCAM-1 as a Potential Therapeutic Target in Metastasis“. [37]

4.5.5. Egzosomi iz TAM

Egzosomi su malene stanične vezikule koje prenose proteine, DNA, RNA itd. iz jedne u drugu stanicu. To je jedan od načina kako TAM komunicira s tumorskim i ostalim stanicama. Prenošenje genetskog materijala TAMa ka tumoru, tumoru se pripomaže u preživljavanju, rastu i metastaziranju. Egzosomi TAMa su puni apoliproteina E (Apo E) koji može aktivirati PI3K/Akt put, potaknuti EMT i modulaciju ECMa što su sve faktori koji pripomažu u metastaziranju tumora. [10](slika 13)



Slika 13 Na slici je prikazana komunikacija TAM i tumorske stanice putem egzosoma kao i putem citokina i receptora. Slika je preuzeta iz članka „Tumor-Associated Macrophages:Recent Insights and Therapies“. [10]

5. Terapija protiv TAM

TAM je vrlo važna komponenta u razvitku i preživljavanju tumora. Osim što pomaže tumoru u preživljavanju, TAM mogu smanjiti učinak postojećih terapija. Zbog toga je vrlo važno razviti terapiju koje će osim uništavanja tumorskih stanica utjecati i na TAM. TAM na mnoge načine utječe na tumor te posljedično tome postoji mnogo putova koji mogu poslužiti kao meta lijekova kako bi se spriječio pro-tumorski utjecaj makrofaga. Terapija protiv TAM može se podijeliti u 2 glavne grupe. Prvi način se odnosi na repolaziraciju makrofaga iz M2 u M1 dok druga metoda pokušava inhibirati nakupljanja TAM-a tako što se inhibira njihova migracija ili se spriječi nakupljanje deplecijom TAM.[10][38]

5.1. Utjecaj TAMa na tumorsko liječenje

TAM može interferirati s protu-tumorskim terapijama te tako smanjiti njihov učinak. TAM interferiraju s radioterapijom i kemoterapijom.

M2 makrofazi su rezistentniji od M1 makrofaga na radijaciju. Visokom dozom zračenja se broj M2 makrofaga povećava. Također se dokazalo da tokom zračenja TAM održava svojstvo angiogeneze i invazivnosti tumorskih stanica. Promovirajući učinak terapije zračenja na TAM je posebno izražen ukoliko se kombinira sa CSF-1 terapijom.

U kemoterapiji nekih tumora može nastati nakupljanje M2 makrofaga u TME. Tijekom kemoterapije nastaju oštećenja zdravog i tumorskog tkiva čime okolne stanice počnu lučiti CSF-1 u svrhu oporavljanja tkiva. CSF-1 potiče migraciju imunosupresivnih mijeloidnih stanica i njihovu diferencijaciju u M2 makrofage. U raku dojke liječenje doxorubicinom će uzrokovati da stromalne stanice počnu lučiti CCL2. Na podražaj CCL2, monociti će preći iz krvotoka u okoliš tumora te će se monociti uz ostale tumorske faktore diferencirati u M2. Nekoliko istraživanja u miševima je pokazalo da TAM tokom kemoterapije mogu pojačano lučiti i IL-10.

5.2. Repolarizacija makrofaga

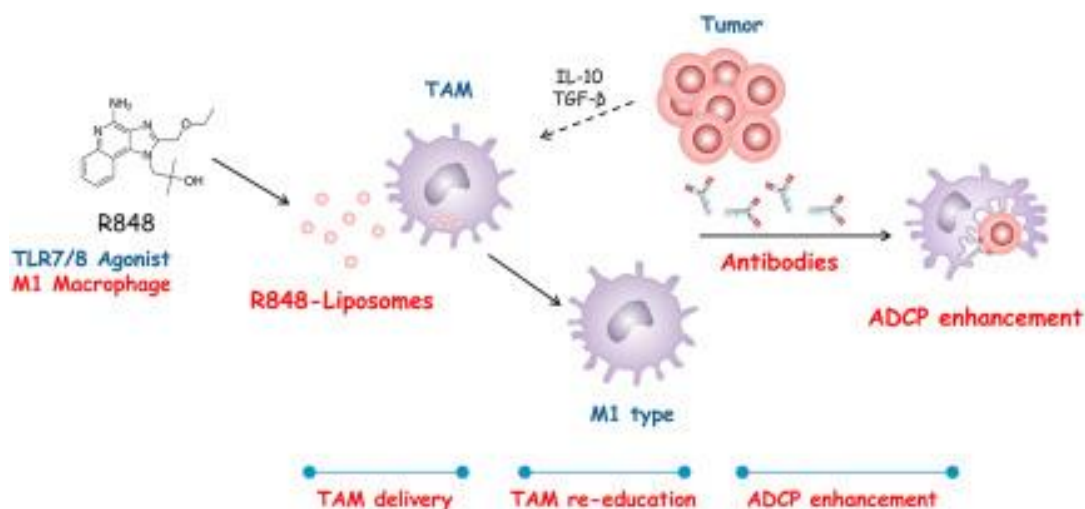
M1 makrofazi, za razliku od M2 makrofaga, imaju pro-inflamatorni učinak. M1 makrofazi mogu aktivirati Th1 i NK stanice, imaju sposobnost fagocitiranja, ekspimiraju ligande smrti čime se potiče stanicu u apoptozu, ekspimiraju MHC I i II receptore zbog čega ih se smatra antigen prezentirajućim stanicama. Stimulacijom imunskog sustava od strane M1 makrofaga potiče se organizam na uništavanje tumorskih stanica.

Makrofazi imaju svojstvo repolarizacije koje se može iskoristiti za terapiju. Repolarizacija se može postići agonistom TLR-a, nukleinskim kiselinama, monoklonalnim protutijelima te i drugim faktorima. [38]

5.2.1. Repolarizacija makrofaga agonistom TLR-a

Na makrofazima se nalaze razni TLR. Stimuliranjem TLR-a može se postići polarizacija TAM u M1. Istraživanjima je utvrđeno da su za svrhu repolarizacije TAM u M1 najbolji endosomalni receptori TLR3, TLR7, TLR8 i

TLR9. Trenutno je FDA odobrila jedino korištenje lijeka Imiquimod koji je agonist TLR7. Poly I:C je agonist TLR3 te se pokazao uspješnijim u repolarizaciji makrofaga u M1. Poly I:C se unese u ROS stimulirajuće micle te se oni zapečate sa galaktoznom grupom. Ovaj kompleks povećava koncentraciju ROSa, smanjuje aktivnost STAT3 te se povećava broj citotoksičnih NK i T stanica. Resiquimod (R848) agonist TLR7 i TLR 8 je također učinkovit u repolarizaciji makrofaga, ali je vrlo toksičan za organizam. Zbog toga se R848 kombinira s nanočesticama β -cyclodextrina međutim nanočestice β -cyclodextrin sprječavaju odlazak R848 s mjesta injektiranja. R848 s β -cyclodextrin potiče makrofage na lučenje pro-upalnog IL-12 u TME. [38][39] (slika 14)



Slika 14 Slika prikazuje utjecaj R848 na repolarizaciju TAM u M1. Slika je preuzeta iz članka „Enhancing antibody-dependent cellular phagocytosis by Re-education of tumor-associated macrophages with resiquimod-encapsulated liposomes“. [40]

5.2.2. Repolarizacija makrofaga potaknuta nukleinskim kiselinama

Repolarizaciju makrofaga potiču razni oblici RNA koja se u makrofage unosi pomoću oligonukleotida. „Nosač“ RNA koj se najviše koristi je opuštajući transpoter izmijene naboja (engl. Charge-altering releasable transporters, CARTs).

Sa mRNA se unese genska poruka za prepisivanje interferonskog regulatornog faktora 5 (IRF5) i inhibitor regulatornog faktora kappa- β

kinaza (IKK β). IRF5 i IKK β mogu regulirati ekspresiju gena za Serpinb2 i CCL11 u M2 te potaknuti ekspresiju gena CCL2. Time se postiže repolarizacija TAM u M1. mRNA može unijeti i gene za regulaciju CD80 i CD86. Repolarizacija se može potaknuti i unosom male interferirajuće RNA (siRNA). siRNA utišava ekspresiju gena u TAM koji su zaduženi za imunosupresiju. MicroRNA (miRNA) može repolarizirati TAM u M1 tako da utiša RNA i postranskripcijsku regulaciju ekspresije gena. MiRNA u makrofazima utiša ekspresiju IL-10, MMP9 i VEGF, a potiče ekspresiju IL-12.[38]

Za razliku od velike količine zračenja koje se koriste u liječenju, mala količina zračenja može uzrokovati repolarizaciju TAM u M1. Zračenje uništava tumorske stanice čime se ispuštaju dsRNA i antigeni tumora koje organizam prepoznaje kao DAMP. DAMP može stimulirati imunosni sustav, a time i makrofage.[38]

5.2.3. Monoklonalna protutijela za repolarizaciju makrofaga

TAM imaju mnogo liganada i receptora koji sprječavaju makrofagovu sposobnost fagocitiranja. Jedan od tih TAM signala koji sprječavaju fagocitozu je „ne jedi me“ signal tj. signal koji nastaje interakcijom CD47–SIRP α . Povratak makrofagove funkcije fagocitiranja se može izvršiti inhibicijom CD47 na tumorskim stanicama (slika 8). Sama repolarizacija TAM u M1 se može postići kombiniranjem protutijela za blokiranje SIRP α i inhibitora CSF-1R. Sličan efekt se može postići i inhibiranjem puta MHCI–LILRB1 monoklonalnim protutijelom. Repolarizacija se može postići i anti-CD40 protutijelima. Anti-CD40 protutijela imaju funkciju kao i CD40L. Anti-CD40 protutijela se isto mogu kombinirati s inhibitorom CSF-1R.[10] [38]

5.2.4. Drugi faktori koji uzrokuju repolarizaciju

PI3K γ je faktor koji može inhibirati NF- κ B i dovesti do aktivacije C/EBP β čime se postiže imunosupresivna funkcija M2. Inhibiranjem PI3K γ put NF-

κB će biti aktivan, a C/EBP β inhibiran te time makrofazi dobivaju proinflamotornu ulogu tj. postaju M1. Lijek koji inhibira PI3K γ , ali inhibira i brutonovu tirozin kinazu (BTK) se naziva Ibrutinib. BTK- PI3K γ signalni put se događa interakcijom B stanica s TAM. Ta interakcija može polarizirati makrofage u M2 zbog čega je važno inhibirati ovaj signalni put.

Histon deacetilaza (engl. Hystone deacetylases, HDACs) je enzim koji miče acetilnu grupu na histonima. To je epigenetička modifikacija koja regulira ekspresiju gena. Inhibicijom razreda IIa HDAC može se potaknuti proupalna svojstva makrofaga tj. može ih se repolarizirati. [38]

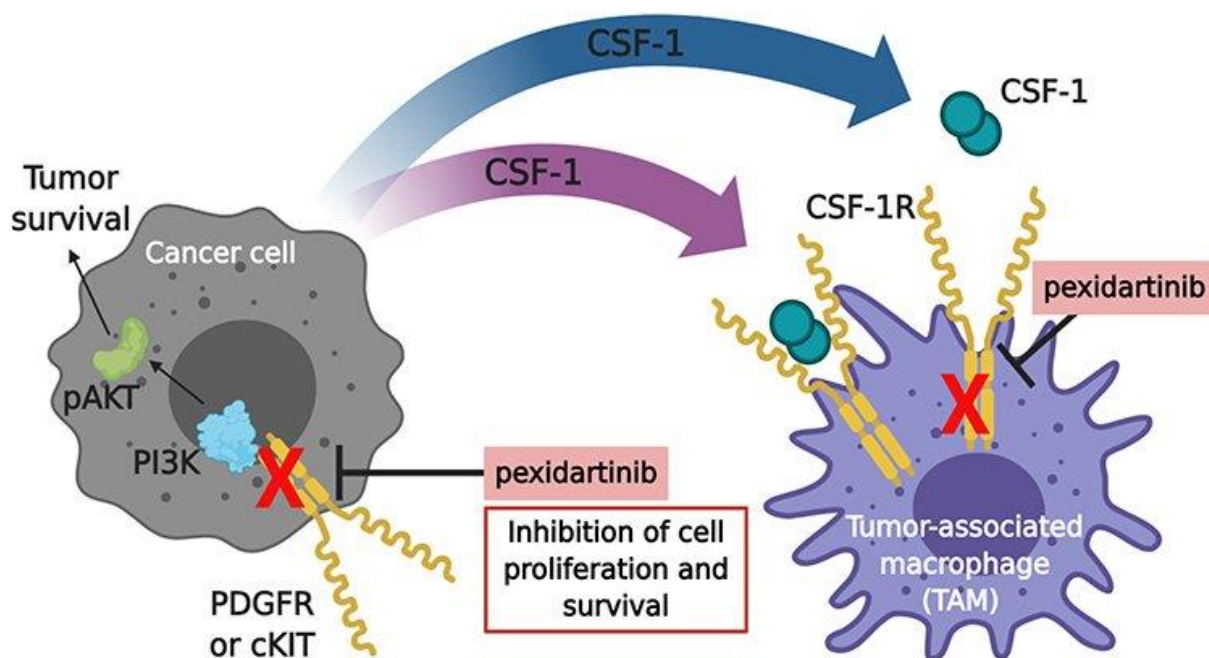
5.3. Terapija sprječavanja nakupljanja M2 u TME

Tumorske stanice luče razne faktore koji dovode do nakupljanje makrofaga u TME. Glavni faktori su CCL2, CCL5 i CSF-1. Inhibicijom tih signala može se spriječiti nakupljanje TAM, a time i poboljšati prognoza liječenja tumora.

CCL2 se veže za CCR2 receptor na monocitima. Inhibiranje nakupljanja monocita te njihova diferencijacija u makrofage u TME se može postići inhibiranjem CCR2 ili vezanjem anti-CCL2 protutijela za CCL2. U istraživanjima na miševima se pokazalo da inhibiranje CCL2-CCR2 puta uzrokuje smanjenje tumorskog rasta, metastaziranja te i poboljšanje učinkovitosti kemoterapije u nekih tumora. U tumoru dojke i pluća anti-CCL2 protutijela uzrokuju suprotan efekt. Ekspresiju CCL2 se može supresirati i zoledroničnom kiselinom. [10][38]

Pri visokim koncentracijama CCL5 se može, kao i CCL2, vezati za CCR2. Time se isto potiče regrutiranje makrofaga u TME. Inhibitor tirozin kinaze Gefitinib može smanjiti sekreciju CCL5. Pri manjoj koncentraciji, CCL5 se neće vezati za CCR2 te će se posljedično smanjiti dolazak monocita u TME. [10]

CSF1 osim što potiče regrutiranje makrofaga potiče njihovu diferencijaciju, repolarizaciju u M1 i proliferaciju. CSF1 se veže za CSF1R eksprimiranog na makrofazima. Mala molekula PLX3397 (pexidartinib) je inhibitor tirozin kinaze koji inhibira CSF1R te uzrokuje inhibiciju proliferacije TAMa. Inhibiranjem proliferacije TAMova se inhibira TAMov utjecaj na aktiviranje pI3K/Akt puta za preživaljavanje u tumorima (slika 15). PLX3397 se trenutno koristi u liječenju glijblastome i tumora dojke. PLX3397 se može kombinirati s anti-PDL1, anti-CTLA-4 i TORC1. PLX3397 može i poboljšati učinkovitost Veramufeniba, inhibitora BRAF-a. Lijek GW2580 inhibira CSF1 te isto dovodi do smanjenja TAM. [10][38]



Slika 15 Slika prikazuje utjecaj PLX3397 (pexidartinib) na TAM i tumorske stanice. Slika je preuzeta iz članka „Pexidartinib, a Novel Small Molecule CSF-1R Inhibitor in Use for Tenosynovial Giant Cell Tumor: A Systematic Review of Pre-Clinical and Clinical Development“ [41]

Trabectedin je lijek kojem su primarne mete tumorske stanice, ali se pokazalo da utječe na monocite i TAM. Trabectedin se veže za TRAIL receptore 1 i 2 koji su izraženi na monocitima i makrofazima. Vezanjem se pokreće apoptoza. Nažalost ovaj lijek ne djeluje samo na TAM nego

djeluje i na cirkulirajuće monocite čime ovaj lijek može biti citotoksičan.[38]

M2, a time i TAM eksprimiraju CD163 zbog čega je to dobra meta za ciljanu depleciju TAM. Monoklonalna antitijela za CD163 se vežu sa lipidima i Doxorubicinom. Doxorubicin je kemoterapeutski lijek. Vezanjem za CD163+ TAMa uzrokuje se njihova deplecija te se time omogućí dolazak T stanica u TME.[38]

Učinak imunosupresivne terapija koja blokira interakciju PD-1 sa PD-L1 i B7 sa CTLA-4 osim što je korisna jer inhibira komunikaciju tumorskih stanica s T stanicama korisna je i za depleciju protumorskih M2. Kao što je i prije navedeno TAM eksprimiraju PD-L1, PD-1 i B7. Posljedično tome antitijela za blokiranje PD-L1 ili B7 tumorskih stanica mogu se vezati i za TAM. Nakon što se inhibira PD1/PD-L1 ili CTLA-4/B7 put makrofazima će se vratiti funkcija fagocitiranja. Iako će ovakva terapija pomoći u smanjenju TAM, može negativno utjecati na prvobitnu svrhu, a to je deplecija tumorskih stanica. Ove terapije su prvobitno osmišljene kako bi se potaknula citotoksičnost T stanica. Ukoliko TAM veže većinu protutijela, neće moći doći do inhibicije utjecaja tumorskih stanica na T stanice te se time smanjuje učinkovitost. [10][38]

5.4. Fotodinamička terapija (engl. Photodynamic therapy, PDT)

Većina terapija navedenih u prethodnim poglavljima su ne-selektivne. Tim terapijama se često zahvate svi M2 makrofazi u organizmu što dovodi do imunokompromitiranog sustava. Zbog toga se traže što selektivnije terapije te jedna od njih je fotodinamička terapija (engl. Photodynamic therapy, PDT).

PDT je tretman koji se koristi u liječenju tumora i nekih ne malegnih bolesti. PDT je limitiran na područje primjene. Temelji se na stvaranju ROSa koji potom uništava tumorske stanice. ROS nastaju kombinacijom

ne toksičnih boja znanih kao i fotosenzibilizatori (engl. Photosensitizers) i vidljive svjetlosti. Protutumorski efekt PDTa, osim što je prouzrokovan nastalim ROSom koji uzrokuje citotoksičnost, nastaje i zbog unosa fotosenzibilatora u tumorske stanice.[42]

Postoji nekoliko generacija fotosenzibilatora. Prva generacija je koristila fotofrin ($C_{68}H_{74}N_8O_{11}$). U Japanu se koristio u kliničke svrhe, ali se uspostavilo da ima nekoliko mana. Osim što prije upotrebe treba biti zaštićen od svjetlosti 4 do 6 tjedana, fotofrin uzrokuje i toksičnosti kože. Toksičnost kože je prouzrokovana zbog velike fotosenzitivnosti fotofrina. Fotofrin je zbog toga zamijenjen s talaporfinom ($C_{38}H_{41}N_5O_9$). Talaporfin spada u drugu generaciju koju sačinjavaju ftalocijanini. Talaporfin zahtijeva zaštitu od svjetla 2 tjedna te uzrokuje manju toksičnost kože. Talaporfin se kombinira sa svjetlosti veće valne duljine (664 nm) od fotofrina (630 nm) te zbog toga može dublje penetrirati u tkivo. Iako su ftalocijanini poboljšani u odnosu na prvu generaciju i dalje nisu visoko selenktivni za tumorsko tkivo. Najnoviji fotosenzibilizator je klorin konjugiran s glukozom (G-klorin). G-klorin uzrokuje 30 puta veću citotoksičnost od talaporfina te je i selektivniji od 2. generacije. Veća selektivnost se događa zbog Warburovog efekta koji nastaje u tumorskim stanicama. [42][43]

Iz razloga što je TAM vrlo važna komponentna TME rade se novi fotosenzibilizatori koji bi ciljali jedino TAM, a ne ostale M2. Po uzoru na G-klorin sintetizirao se klorin konjugiran manozom (M-klorin). TAM eksprimiraju mnogo manoznih receptora na svojoj površini za koje se može vezati M-klorin. M-klorin se pokazao vrlo efikasan u eliminiranju TAM, ali i tumorskih stanica. M-klorin inducira smrt tumorskih stanica gotovo istom jakosti kao i G-klorin. PDT u kombinaciji s M-klorinom može inducirati apoptozu TAM 4 sata nakon aplikacije. Zbog toga što M-klorin

cilja i TAM i tumorske stancice, M-klorin može u većoj mjeri smanjiti tumor u usporedbi s G-klorinom.[42][44]

TAM u velikoj mjeri imaju i lešinarske receptore. Lešinarski receptori su se pokazali kao vrlo dobra meta za ftalocijanine čime im se poboljšala selektivnost. Ftalocijanini su se konjugirali s polianionskim ligandima koji se zatim vežu za lešinarske receptore TAM. Taj kompleks se pokazao mnogo selektivnijim od talaporfina te je uspješan u supresiji tumorskog rasta jer uništava TAM. [43]

6. TAM u karcinoma dojke i u karcinoma pluća

Svaki tumor je drugačiji zbog čega se i mikrookoliš svakog tumora razlikuje. Varijabilnost TAM ovisi o tipu tumora, intratumornoj heterogenosti i stadiju u kojem se tumor nalazi. Ova heterogenost pokazati će se na primjeru raka dojke i raka pluća. [45]

6.1. Karcinom dojke

Karcinom dojke je najučestaliji karcinom u žena. U 2013. je u Hrvatskoj od karcinoma dojke oboljelo 2767 žena.[46] Kada se gleda globalno u 2020. je dijagnosticirano 2.3 milijuna pacijentica s karcinomom dojke. 685 000 slučajeva je u 2020. završilo smrću.[47] Pri dijagnozi ovog tumora opisuje se stadij, stupnjevanje (engl. tumor grade), broj estrogenskih receptora (ER), progesteronskih receptora (PR), herceptinskih receptora (engl. Human epidermal growth factor receptor 2, HER2) i genska ekspresija. Iako se mnogo pažnje pridaje dijagnozi kako bi liječenje bilo što uspješnije postotak smrtnosti je i dalje velik. [45]

Karcinom dojke obuhvaća 5 molekularna podtipa. Svaki podtip ima drugačiju prognozu te se drugačije liječi. Podtipovi su luminal A, luminal B, trostruko negativan, bogat HER2 receptorom i normalan podtip. Luminalni A je HER2 negativan, ali je pozitivan na ER i PR. Luminalni A ima manje od 20% proteina Ki-67. Ki-67 kontrolira koliko će brzo tumorske stanice rasti

te što je niži znači da je rast tumora sporiji. Luminalni B je kao i A pozitivan na ER i PR, ali može biti HER2 ili pozitivan ili negativan. Glavna razlika od luminalnog A je to što sadrži više od 20% Ki-67. Trostruko negativni karcinom je najagresivniji od svih 5 podtipova. On je negativan na ER, PR i HER2 receptore. Ovaj tip je češći u žena s BRCA1 mutacijom. Kao što mu i samo ime kaže karcinom obogaćen s HER2 receptorom ima povećanu koncentraciju ovog receptora. Karcinom HER2 brže raste od luminalnog A i B, ali se uspješno liječi s monoklonskim protutijelima za HER2 npr. herceptinom. Karcinom dojke se također opisuje i na temelju heterogenosti. Postoje tri pristupa heterogenosti ovog karcinoma. Prvi pristup razlikuje tumorsku stromu (TS) i tumorsko gnijezdo (engl. Tumor nest, TN). Drugi pristup opisuje tumor ovisno o morfologiji tumorskih stanica. Razlikuju se tubularne, alveolarne, čvrste, trabekularne strukture i diskretne grupe. Svih 5 morfoloških struktura se može pronaći u TN luminalnog podtipa. Tumor s alveolarnom i trabekularnom strukturom ima veći rizik za metastaziranjem i daje lošiji odgovor na neoadjuvantnu kemoterapiju (engl. neoadjuvant chemotherapy, NAC). Treći pristup heterogenosti opisuje interakciju strome i parenhima. Ovisno o interakciji može se definirati 5 komponenta: područje sa mekanom fibroznom stromom, sa grubom fibroznom stromom, područje s maksimalnom interakcijom strome i parenhima, parenhimski elementi i praznine duktalne tumorske strukture. [45]

6.1.2 TAM u karcinomu dojke

TAM čini znatan dio mikrookoliša karcinoma dojke te se sve više pažnje pridaje njegovom utjecaju na karcinom u svrhu boljeg liječenja. Karcinom dojke je najistraživaniji karcinom te se protumorski utjecaj TAM prvi put opisao upravo na modelu karcinoma dojke. TAM se mogu nakupiti u različitim dijelovima tumora te će i ovisno o mjestu nakupljanja drugačije utjecati na prognozu i liječenje karcinoma dojke. U raznim istraživanjima

je dokazano da je nakupljanje TAM bitno za veličinu tumora, invazivnost tumora, bazalnom fenotipu, količinu ER i PR receptora, ali ne i HER2, itd. Pri promatranju TAM u karcinomu dojke promatra se količina eksprimiranog CD68 te jesu li prisutni M1 ili M2. [45]

U mnogim istraživanjima je potvrđeno da povećana količina receptora CD68 na TAM može biti povezana sa lošijim ishodom bolesti i manjim preživljavanjem. Naime, nakupljanjem CD68 makrofaga u TME tumor se povećava, dolazi do smanjenje ekspresije hormonskih receptora (ER i PR), pojačava se tumorska sposobnost vaskularne invazivnosti i metastaziranja na limfne čvorove. Na veličine tumora također utječu i makrofazi sa CD11c+. [45]

U prethodnim poglavljima je opisano da su M2 makrofazi ti koji imaju protumorski utjecaj. U karcinomu dojke M2 makrofazi eksprimiraju CD163, CD206, CD204 i stabilin 1. Uz te markere TAM u karcinomu dojku često eksprimiraju i CD47, COX-2, MMP9, PD-L1 i TIE2. CD163+ TAM imaju slične karakteristike kao i CD68+ TAM. CD163+ TAM su indikatori loše prognoze. Utječu na veličinu, metastaziranje i postotak Ki67. CD163+ TAM češće se pronalazi na metastatskim mjestima nego u primarnom tumoru. CD206 je prvi otkriveni marker M2 makrofaga koji se eksprimira u doticaju s IL-4 te je ova vrsta makrofaga direktno povezana sa niskom stopom preživljavanja (engl. overall survival, OS). CD68 i CD163 se već sad mogu koristiti za prognoziranje tijeka bolesti dok je korištenje CD204 i CD206 markera još uvijek nesigurno. Stabilin 1 se pronalazi na TAMovima kada je karcinom u prvom stadiju. [45]

Kao što je i navedeno makrofagov utjecaj na tumor ovisi o mjestu na kojem se makrofazi nalaze. Tako se nakupljanjem CD68+ TAM u periferiji tumora ne utječe na OS, ali ukoliko se CD68+ TAM nakupe u tumorskoj „jezgri“ negativno se utječe na OS tj. ono će biti kraće. Nasuprot tome

nakupljanjem CD11c+ u TS pozitivno se utječe na ishod bolesti dok nakupljanje CD11c+ u središtu tumora nema značajan utjecaj na OS. Nakupljanje TAM ovisi i o podtipu tumora. Nakupljanjem CD68+ TAM u trostruko negativnom karcinomu dojke povećavaju se šanse za daljim metastaziranjem i smanjuje se ukupno preživljavanje. Za usporedbu, nakupljanjem CD163 u ER negativnim pacijentima pozitivno se utječe na OS. [45]

6.1.3. Utjecaj TAM na liječenje karcinoma dojke

Liječenje karcinoma dojke sastoji se od operacije, zračenja, kemoterapije ili nekog drugog molekularnog pristupa. Liječenje ovisi o prisutnosti HER2, hormonskih receptora, stadiju metastaziranja i dobi pacijenta te sukladno tome o menopauzi. Za HER2 pozitivne pacijente djelotvorna je terapija anti-HER2 monoklonalnim protutijelima u kombinaciji s kemoterapijom. Za ER i PR pozitivne pacijente koriste se inhibitori aromataze u kombinaciji sa tamoxifenom koji je selektivni modulator estrogenskih receptora. Pacijenti s trostruko negativnim podtipom karcinoma dojke primaju NAC koja se temelji na cisplatinu ili karboplatinu. Pri primjeni bilo koje kemoterapije prati se patološki kompletni odgovor (engl. pathologic complete response, pCR). pCR opisuje prisutnost karcinoma nakon završetka terapije. U većini podtipova karcinoma dojke više od 40% će nakon primjene kemoterapije imati relaps tumora što nije slučaj s pacijentima s trostruko negativnim podtipom. U trostruko negativnog podtipa samo će 30-45% doživjeti pCR te razlog tome može biti zbog TAM. [45]

Kao što je i prije navedeno zabilježeno je dodatno nakupljanje TAM nakon primjene kemoterapije. U karcinomu dojke nakon primjene NAC sa mješavinom paclitaxela i fluorouracil–doxorubicin ciklofosfamida zabilježeno je nakupljanje CD45+, CD11b+ i CD14+ makrofaga. Primjena NAC temeljenog samo na paclitaxelu rezultirala je nakupljanjem CD68+ makrofaga. Pri primjeni samog palitaxela otkrilo se da su TAM izvori

katepsina. Katepsini su proteaze koji pripomažu tumoru u invaziji na okolna tkiva tj. u metastaziranju. U oba slučaja nakupljanje TAM se veže s nedostatnim pCRom i rezistentnosti na kemoterapiju. Kako bi se poboljšala kemoterapija, na životinjskim modelima se primjenjivala kombinacija paclitaxela sa PLX3397 koj je inhibitor tirozin kinaze receptora. Kombinacija kemoterapije i inhibitora makrofaga se pokazala vrlo uspješnom tj. rezultirala je smanjenom mogućnošću metastaziranja na pluća, pojačanim odgovorom CD8+ T stanica i smanjenom gustoćom krvnih žila oko tumora. Također se otkrilo da su TAM jedna od stanica koja uzrokuje rezistenciju karcinoma dojke na tamoxifen u mišjem modelu. Pri stvaranju rezistencije na tamoxifen dolazi do nakupljanja CD163+ TAM. Još nije posve razriješen mehanizam kojim TAM utječe na rezistenciju, ali se smatra da nastaje „petlja“ odgovora između TAM i tumorskih stanica. TAM ispuštaju CCL2 koji potom aktivira PI3K/Akt/mTOR signalni put u tumorskim stanicama. [45]

6.2. Karcinom pluća

Karcinom pluća je tumor s najvećom stopom smrtnosti. U 2020. je zabilježeno 2.21 milijuna slučajeva te 1.80 milijuna umrlih od ovog karcinoma. [47] Niti u Hrvatskoj broj oboljelih od ovog karcinoma nije neznan. U 2013. godini od karcinoma pluća oboljelo je 2753 ljudi. [48] Postoje dva glavna histološka tipa karcinoma pluća; karcinom pluća malih stanica (engl. Small cell lung cancer, SCLC) i karcinom pluća ne-malih stanica (engl. Non-small cell lung cancer, NSCLC). NSCLC je učestaliji od SCLC. NSCLC se sastoji od tri podtipa: adenokarcinom, pločaste stanice karcinoma i velike stanice karcinoma. NSCLC se u 70% pacijenata dijagnosticira kada je u 3. ili 4. stadiju zbog čega je smrtnost tako visoka. [45]

6.2.1. TAM u karcinomu pluća

U karcinomu pluća TAM su najzastupljenija imunosna stanica TME. U karcinomu pluća TAM promoviraju proliferaciju tumorskih stanica, EMT, invaziju i metastaziranje čime se još više doprinosi agresivnosti ovog tumora.

Kao i kod karcinoma dojke pri dijagnosticiranju se prati razina M1 i M2 makrofaga. U karcinomu pluća M2 TAMovi imaju svoje karakteristične markere. Oni eksprimiraju CD206, CD163, CD204 i MARCO. CD206+ TAM promoviraju EMT i invaziju tako da potaknu ekspresiju CRYAB. CRYAB aktivira ERK1/2/TRA-1/SLUG signalni put. CRYAB potiče metastaziranje na limfne čvorove. U karcinomu pluća TAM također eksprimiraju i integrin $\alpha\beta3$. Integrin $\alpha\beta3$ potiče epitelne stanice karcinoma na migraciju te omogućuje rezistenciju na lijekove. Kao i u karcinomu dojke, nakupljanje CD68+ makrofaga u tumorskoj stromi negativno utječe na OS. Međutim, nakupljanje CD68+ makrofaga u tumorskim otocima ili džepovima ili utorima može pozitivno utjecati na OS. CD163+ TAM koji se nakupe u stromi i alveolama, u nekim istraživanjima, značajno smanjuju RFS i OS. CD163+ TAM u karcinomu pluća se povezuje s višom razinom C-reaktivnog proteina (engl. C-reactive protein, CRP) u krvotoku, s proliferacijskim indeksom Ki-67, tumorskom diferencijacijom, metastaziranjem na limfne čvorove i s veličinom tumora. Marker CD204 u karcinomu pluća, za razliku od karcinoma dojke, ima veću dijagnostičku značaj nego CD163. CD204+ TAM u tumorskoj stromi povezuju se s naprednijom histološkom građom tumora i s naprednijim stadijem. Također ga se povezuje s invazijom u pleuralni prostor, lošim RFS, divljim tipom EGFR gena i diferencijacijom tumora. MARCO+ TAMovi su u direktnoj interakciji s PD-L1+ tumorskim stanicama. MARCO+ TAMovi imaju imunosupresivnu ulogu u karcinomu pluća. [45]

6.1.3. Utjecaj TAM na liječenje karcinoma pluća

Pri liječenju karcinoma pluća najvažniji čimbenici su stadij tumora i tip mutacije u protoonkogenima. U prvom stadiju u 60-80% slučajeva operacija je djelotvorna, a u drugom stadiju operacija je djelotvorna u 30-50% slučajeva. Za drugi stadij česta je primjena i kemoterapije temeljene na platini. Za treći i četvrti stadij koristi se kemoterapija temeljena na platini u kombinaciji s taksanima (paclitaxel, docetaxel i vinorelbin), antimetabolitima (gemicitabin i pemetrexed) ili s vinca alkaloidima (vinblastin). Česte mutacije protoonkogeni u karcinomu pluća su KRAS, EGFR, BRAF, PI3K, MEK i HER2 te se zbog toga primjenjuju i lijekovi koji ciljaju proteine nastale prepisivanjem ovih mutacija. Pacijentima s mutacijom EGFR se kao prvi lijek daje erlotinib ili gefitinib koji su inhibitori tirozin kinaza. Za pacijente s VEGF mutacijom kao prvi tretman se često daje kombinacija platinske kemoterapije i anti-VEGF inhibitora bevacizumaba. Na sve lijekove u karcinomu pluća često je stvaranje rezistencije zbog čega je potrebna daljnja potraga u pronalasku učinkovitijih terapija.

Kao i kod karcinoma dojke pri primjeni kemoterapije temeljene na platini zamijećeno je nakupljanje CD68+ TAM, ali se nakupljanje tih TAM u karcinomu pluća povezuje uz bolji OS. Nakon platinske kemoterapije u pacijenata s SCLCom zamijećen je porast IL-1 β citokina, koj je produkt M1 makrofaga, a smanjenje M2 produkta IL-1ra. Opaženo je da na gustoću TAM u karcinomu pluća utječu i inhibitori tirozin kinaza. Pri primjeni gefitiniba ili erlotiniba došlo je do nakupljanja CD163+ TAM u stromi tumora. To nakupljanje se povezuje uz lošiji OS i PFS, ali uz primjenu gefitiniba sa anti-PD-L1 ili inhibitorima deacetilaze histona zamijećena je repolarizacija TAM u M1 te i nastajanje njihova protu-tumorska efekta. Pri toj kombinaciji lijekova došlo je do inhibicije eksprimiranja CD206 i ARG-1 i aktivacije eksprimiranja CD86 i stvaranja ROS. U usporedbi sa utjecajem

TAM na kemoterapiju u karcinomom dojke vidljivo je da TAM može imati pozitivan učinak pri primjeni platinske kemoterapije u karcinomu pluća. Nažalost ne može se isto reći pri primjeni inhibitora tirozin kinaza ukoliko se ne koristi u kombinaciji sa drugim lijekovima koji će direktno utjecati na repolarizaciju TAM.

7. Zaključak

Tumor je bolest koja je sve zastupljenija u društvu. Iako postoje mnogi lijekovi koji direktno utječu na maligne stanice, i dalje je prisutna visoka stopa smrtnosti od ove bolesti. Neupitna je uloga TAMa na razvitak i preživljavanje tumorskih stanica. TAMovi direktno i indirektno pospješuju razvitak tumora. Smatram da bi se više istraživanja trebalo posvetiti istraživanju TAM te i samom TME kako bi se razvile terapije koje bi bile uspješnije u eliminaciji tumora. Također je vrlo bitno proučiti TAM u svakom tumoru posebno jer je i njihov utjecaj drugačiji što se vidi iz kratkog opisa utjecaja TAM na tumor dojke i pluća.

8. Literatura

- [1] Ribatti D, Mangialardi G and Vacca A 2006 Stephen Paget and the “seed and soil” theory of metastatic dissemination *Clin. Exp. Med.* **6** 145–9
- [2] Witz I P 2009 The tumor microenvironment: The making of a paradigm *Cancer Microenviron.* **2**
- [3] Balkwill F R, Capasso M and Hagemann T 2012 The tumor microenvironment at a glance *J. Cell Sci.* **125** 5591–6
- [4] Whiteside T L 2008 The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth *Oncogene* **27** 5904–12
- [5] Lebleu V S 2015 Imaging the tumor microenvironment *Cancer J. (United States)* **21** 174–8
- [6] Baghban R, Roshangar L, Jahanban-esfahlan R, Seidi K and Ebrahimi-kalan A 2020 Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance **4** 1–19
- [7] Siemann D W 2010 Tumor Microenvironment *Tumor Microenviron.*
- [8] Varricchi G, Galdiero M R, Loffredo S, Lucarini V, Marone G, Mattei F, Marone G, Schiavoni G, Varricchi G, Galdiero M R, Loffredo S, Marone G, Mattei F, Marone G and Schiavoni G 2018 Eosinophils : The unsung heroes in cancer ? *Oncoimmunology* **7** 1–14
- [9] Varricchi G 2020 Is There a Role for Basophils in Cancer ? **11** 1–16
- [10] Zhou J, Tang Z, Gao S, Li C, Feng Y and Zhou X 2020 Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies *Front. Oncol.* **10** 1–13
- [11] Otagiri M, Giam Chuang V T, Immunobiology, Murphy K and Weaver C 2017 Janeway ' S 9 Th Edition *America (NY)*. 1–277

- [12] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaili S A, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari J T and Sahebkar A 2018 *Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease* vol 233
- [13] Wang S 2017 Functions of the transcription factor Lyl-1 in the development of the macrophage lineage *ResearchGate*
- [14] Gordon S and Plüddemann A 2013 Role of Macrophages in Autoimmunity *The Autoimmune Diseases: Fifth Edition* (Elsevier Inc.) pp 161–74
- [15] Noy R and Pollard J W 2014 Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy *Immunity* **41** 49–61
- [16] Marchesi M, Andersson E, Villabona L, Seliger B, Lundqvist A, Kiessling R and Masucci G V 2013 *HLA-dependent tumour development: a role for tumour associate macrophages?* vol 11
- [17] Suirat 2018 What is the difference Between a Phagocyte, Macrophage, Neutrophil and Eosinophil? *News Med. life Sci.*
- [18] Tariq M, Zhang J, Liang G, Ding L, He Q and Yang B 2017 Macrophage Polarization: Anti-Cancer Strategies to Target Tumor-Associated Macrophage in Breast Cancer *J. Cell. Biochem.* **118** 2484–501
- [19] Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro M G, Rimoldi M, Biswas S K, Allavena P and Mantovani A 2008 Macrophage polarization in tumour progression *Semin. Cancer Biol.* **18** 349–55
- [20] Chen Y, Song Y, Du W, Gong L, Chang H and Zou Z 2019 Tumor-associated macrophages: An accomplice in solid tumor progression *J. Biomed. Sci.* **26** 1–13

- [21] Shen L, Zhou Y, He H, Chen W, Lenahan C, Li X, Deng Y, Shao A and Huang J 2021 Crosstalk between Macrophages, T Cells, and Iron Metabolism in Tumor Microenvironment *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**
- [22] Erreni M, Mantovani A and Allavena P 2011 Tumor-associated macrophages (TAM) and inflammation in colorectal cancer *Cancer Microenviron.* **4** 141–54
- [23] Gordon S R, Maute R L, Dulken B W, Hutter G, George B M, McCracken M N, Gupta R, Tsai J M, Sinha R, Corey D, Ring A M, Connolly A J and Weissman I L 2017 PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity *Nature* **545** 495–9
- [24] Petty A J, Dai R, Lapalombella R, Baiocchi R A, Benson D M, Li Z, Huang X and Yang Y 2021 Hedgehog-induced PD-L1 on tumor-associated macrophages is critical for suppression of tumor-infiltrating CD8+ T cell function *JCI Insight* **6**
- [25] Poh A R and Ernst M 2021 Tumor-associated macrophages in pancreatic ductal adenocarcinoma: Therapeutic opportunities and clinical challenges *Cancers (Basel)*. **13**
- [26] Lu Q, Chen X, Wang S, Lu Y, Yang C and Jiang G 2020 Potential new cancer immunotherapy: Anticd47-sirpa antibodies *Onco. Targets. Ther.* **13** 9323–31
- [27] Akdis C A and Blaser K *Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression*
- [28] Chen L, Shi Y, Zhu X, Guo W, Zhang M, Che Y, Tang L, Yang X, You Q and Liu Z 2019 IL-10 secreted by cancer-associated macrophages regulates proliferation and invasion in gastric cancer cells via c-

Met/STAT3 signaling *Oncol. Rep.* **42** 595–604

- [29] Abramo J M, Reynolds A, Crisp G T, Weurlander M, Söderberg M, Scheja M, Hult H, Wernerson A, Emacs A, Distribution U E, Makes W, Like A, Text O, Editors O T, Interface T A, Sets D C, Look T R, Veterans E, Bindings K, Aquamacs C, Support T E X, Previewer T E X, Beaumont C, O'Doherty M, Shannon L, Baume D, * M Y, Coffey M, Bhatara A, Laukka P, Levitin D J, Darrow A-A, Hornby W, Gingras B, Symposium I, Isbn P S, Author T, All a E C, Majid A, Boroditsky L, Gaby A, Petre M and Rugg G 2012 TGF- β Function in Immune Suppression *Assess. Eval. High. Educ.* **37** 435
- [30] Geiger R, Rieckmann J C, Wolf T, Basso C, Feng Y, Fuhrer T, Kogadeeva M, Picotti P, Meissner F, Mann M, Zamboni N, Sallusto F and Lanzavecchia A 2016 L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity *Cell* **167** 829-842.e13
- [31] Arlauckas S P, Garren S B, Garriss C S, Kohler R H, Oh J, Pittet M J and Weissleder R 2018 Arg1 expression defines immunosuppressive subsets of tumor-associated macrophages *Theranostics* **8** 5842–54
- [32] Zhu Q, Wu X, Wu Y and Wang X 2016 Interaction between Treg cells and tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment of epithelial ovarian cancer *Oncol. Rep.* **36** 3472–8
- [33] Riabov V, Gudima A, Wang N, Mickley A, Orekhov A, Red G and Blood C 2014 Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis **5** 1–13
- [34] Coffelt S B, Hughes R and Lewis C E 2009 Tumor-associated macrophages: Effectors of angiogenesis and tumor progression *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1796** 11–8
- [35] Lin Y, Xu J and Lan H 2019 Tumor-associated macrophages in tumor

- metastasis: Biological roles and clinical therapeutic applications *J. Hematol. Oncol.* **12** 1–16
- [36] Fares J, Fares M Y, Khachfe H H, Salhab H A and Fares Y 2020 Molecular principles of metastasis : a hallmark of cancer revisited *Signal Transduct. Target. Ther.*
- [37] Chen Q and Massagu J 2012 Molecular Pathways: VCAM-1 as a Potential Therapeutic Target in Metastasis *Clin Cancer Res* **18**
- [38] Anfray C, Ummaryno A, Torres Andón F and Allavena P 2019 cells Current Strategies to Target Tumor-Associated-Macrophages to Improve Anti-Tumor Immune Responses
- [39] Liu L, He H, Liang R, Yi H, Meng X, Chen Z, Pan H, Ma Y and Cai L 2018 ROS-Inducing Micelles Sensitize Tumor-Associated Macrophages to TLR3 Stimulation for Potent Immunotherapy *Biomacromolecules* **19** 2146–55
- [40] Li H, Somiya M and Kuroda S 2021 Enhancing antibody-dependent cellular phagocytosis by Re-education of tumor-associated macrophages with resiquimod-encapsulated liposomes *Biomaterials* **268** 120601
- [41] Benner B, Good L, Quiroga D, Schultz T E, Kassem M, Carson W E, Cherian M A, Sardesai S and Wesolowski R 2020 Pexidartinib, a novel small molecule csf-1r inhibitor in use for tenosynovial giant cell tumor: A systematic review of pre-clinical and clinical development *Drug Des. Devel. Ther.* **14** 1693–704
- [42] Hayashi N, Kataoka H, Yano S, Tanaka M, Moriwaki K, Akashi H, Suzuki S, Mori Y, Kubota E, Tanida S, Takahashi S and Joh T 2015 A novel photodynamic therapy targeting cancer cells and tumor-associated macrophages *Mol. Cancer Ther.* **14** 452–60

- [43] Tang F, Xie W, Li S, Hu Q, Zheng B, Ke M and Huang J 2020 Alginate-zinc (II) phthalocyanine conjugates: Synthesis, characterization and tumor-associated macrophages-targeted photodynamic therapy *Carbohydr. Polym.* **240** 116239
- [44] Soyama T, Sakuragi A, Oishi D, Kimura Y, Aoki H, Nomoto A, Yano S, Nishie H, Kataoka H and Aoyama M 2021 Photodynamic therapy exploiting the anti-tumor activity of mannose-conjugated chlorin e6 reduced M2-like tumor-associated macrophages *Transl. Oncol.* **14** 101005
- [45] Larionova I, Tuguzbaeva G, Ponomaryova A, Stakheyeva M, Cherdyntseva N, Pavlov V, Choinzonov E and Kzhyshkowska J 2020 Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers *Front. Oncol.* **10** 1–34
- [46] Hrvatski zavod za javno zdravstvo 2020 Odjel za programe probira raka dojke
- [47] World Health Organization (WHO) 2021 Cancer
- [48] Onkologija.hr Rak pluća- statistika

9.Životopis

**Lucija
Kučeј**

DATUM ROĐENJA:
04/12/1999

KONTAKT

Državljanstvo: hrvatsko

Spol: Žensko

Andrija Peruća 7,
51000 Rijeka, Hrvatska

 lucija.kucej@gmail.com

 (+385) 955484454



europass

RADNO ISKUSTVO

2021 – Rijeka, Hrvatska

Stručna praksa

Klinički bolnički centar Rijeka

2019 – Rijeka

Demonstrator na kolegiju "Stanična i molekularna biologija"

Odjel za biotehnologiju

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2018 – **TRENTAČNO**

Preddiplomski: "Biotehnologija i istraživanje lijekova"

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci

2018

Vatrogasac

DVD Sušak

2014 – 2018

Prirodoslovna gimnazija

Prirodoslovna i grafička škola Rijeka

JEZIČNE VJEŠTINE

MATERINSKI JEZIK/JEZICI: hrvatski

DRUGI JEZICI:

engleski

Slušanje
C1

Čitanje
C1

Govorna
produkcija
C1

Govorna
interakcija
C1

Pisanje
C1

talijanski

Slušanje
B1

Čitanje
B1

Govorna
produkcija
A2

Govorna
interakcija
A2

Pisanje
A2

DIGITALNE VJEŠTINE

MS Office (Word Excel PowerPoint) / Microsoft Word / Rad na raunalu / Windows / poznavanje programa PyMOL, Avogadro, ChemAxon Marvin, VMD, GAMESS, MacMOLPit

VOLONTIRANJE

2020 – TRENUTAČNO

● **Student mentor**

Odjel za biotehnologiju

2019 – TRENUTAČNO

● **Voditelj sportske lige Odjeli - Unisport**

Rijeka

2019 – 2020

● **Naturis**

Odjel za biotehnologiju

2018 – 2019

● **Kuglice dobrih želja**

Odjel za biotehnologiju

MREŽE I ČLANSTVA

2019 – TRENUTAČNO

● **Rotary klub Rijeka**

Rijeka

2008 – TRENUTAČNO

● **DVD Sušak**

Rijeka