

Imunodijagnostika i imunoterapija malignih oboljenja

Gordana Konjević

I m u n o d i j a g n o s t i k a

Pre i u toku primene terapije bolesnicima sa malignitetima se određuje broj, imunofenotipske karakteristike i funkcija limfocita i drugih ćelija u perifernoj krvi, limfnim čvorovima, mononuklearnim infiltratima tumora. Imunodijagnostika obuhvata i određivanje tumorskih antigena na tumorskim ćelijama.

I Ćelijske karakteristike

A Kvantifikovanje i imunofenotipizacija

Kvantifikacija različitih subpopulacija limfocita vrši se detekcijom skupine antigena diferencijacije (cluster of differentiation, CD) na membrani pomoću specifičnih monoklonkih antitela (mAt) koja mogu biti neobeležena, nativna, ili obeležena fluorescentnom bojom.

Imunofenotipizacijom se pored pripadnosti subpopulaciji i relativnog broja određuju i druge karakteristike jedne subpopulacije, kao što su zrelost i aktivacija. Na jednoj ćeliji se pomoću različitih mAt mogu detektovati istovremeno i do četiri različita površinska i/ili intraćelijska antigena u koliko su obeležena različitim fluorescentnim bojama. Ove analiza se vrše mikroskopom sa UV lampom ili aparatom za protočnu citometriju (FACS – fluorescence activated cell sorter).

Antigen prezentujuće ćelije

Makrofagi se odlikuju površinskim CD14 antigenom za monocitnu lozu, alfa-integrinima CD11b (Mac-1-CR3) i CD11c (CR4), CD16 (Receptor za Fc γ III), CD32 (Rc za Fc γ II), CD64 (Rc za Fc γ I) i CD40L, CD80 i CD86 kostimulativnim molekulima.

Dendritične ćelije (DĆ) se odlikuju CD33 antigenom, u koliko su DC1 podtip mijeloidnog porekla ili CD4 i CD8 antigenima, u koliko su DC2 podtip limfoidnog porekla, dok su im zajednički CD1c (neklasični MHC molekul klase I), CD11b/CD18, CD11c, CD54, CD58, CD80, CD83, CD86, CD40L, CD54 antigeni.

Ćelije nespecifične imunosti

NK ćelije su CD3 $^{-}$, TCR $^{-}$, CD16 $^{+}$, CD56 $^{+}$, imaju receptore koji aktiviraju citotoksičnost (KAR-killer activating receptors): CD161 $^{+}$ (NKR-P1), NKp46, NKp44, NKp30 i NKG2D (prepoznaje MIC-A,B), receptore koji inhibišu citotoksičnost (KIR-killer inhibitory receptors): Imunoglobulinski KIR koji se vezuju za HLA-C,B,A su CD158a $^{+}$, CD158b $^{+}$, p70, p140, a C-tip lektinski KIR, koji prepoznaje neklasični HLA-G i E je dimer, CD94/NKG2A,B. FasL dovodi do apoptoze.

NKT ćelije imaju karakteristike i T i NK ćelija. One su CD3+,CD4-, redje CD4+, CD8- češće TCR $\alpha\beta$ (V α 24 V β 11 kombinacija), nego TCR $\gamma\delta$, NK KAR: CD161+ i CD94+/NKG2D, KIR:CD94+/NKG2A,B i C, CD28-, FasL, IL-2 Rbeta/15Rbeta, aktivirane CD25+,CD69+ i imaju memorijski fenotip, CD45RO+.

CTL $\gamma\delta$, citotoksične T ćelije sa $\gamma\delta$ T ćelijskim receptorom, su CD2+, CD3+, CD4-,CD8-, redje CD8+, najredje CD4+, CD56+, CD11b+TCR $\gamma\delta$ (V δ 2 lanac) ograničenog repertoara, KAR: NKG2D, FasL (apoptotski ligand), aktivirane CD25+,CD69+, memorijski fenotip CD45RO+.

Ćelije specifične antitumorske imunosti

Zrele T ćelije ispoljavaju CD2,CD3, CD4 (T inductorske: CD40L kostimulativni molekul) ili CD8 (T citotoksične: CD28 kostimulativni molekul), TCR $\alpha\beta$, LFA1+ (athezioni molekul), FasL, nezrele CD7,CD5, naivne CD45RA, memorijske CD45RO, aktivirane CD25,CD69.

Zrele B ćelije ispoljavaju CD19, CD20, CD21, CD22, nezrele CD5,CD9,CD10, a aktivirane CD23, CD25.

Imunodiagnoistika limfoidnih neoplazija

Diferencijalna dijagnostika hematoloških neoplazija dobija se imunofenotipizacijom panelom mAt za površinske membranske antigene diferencijacije na limfocitima periferne krvi (LPK) ili ćelijama kosne srži. U T ćelijskim malignitetima dolazi do prekida u sazrevanju na nivou pretimocita i karakteriše ih prisustvo površinskih antigena terminalne deoksinukleotidil transferaze -TdT, i CD34,CD7, CD3, dok su na pre-T ćelijskom nivou prisutni markeri CD7, CD3, CD2, CD1, CD5, TdT, a na T-ćelijskom nivou CD7, CD3, CD2, CD5, CD4, CD8.

Povećanje B ćelijske subpopulacije monoklonalne prirode obično ukazuje na malignitet, kada sve ćelije imaju isti laki lanac, a poliklonlane prirode, kada neke ćelije ispoljavaju lambda (λ), a neke kapa (κ) lake lance (primer: CD19/kapa, CD19/lambda) ukazuje na infekciju. Prekid u B-ćelijskom sazrevanju na nivou pre-B ćelija naziva se pre-B ćelijska akutna limfoblastna leukemija (ALL), ili ako je na B ćelijskom nivou može biti hronična limfatična leukemija (CLL), leukemija vlasastih ćelija (hairy cell leukemia – HCL), B ćelijski limfom, B ćelijska leukemija.

U koliko se apsolutni broj limfocita (na pr. $0.9 \times 10^9/l$), izračunat na osnovu broja leukocita, u krvnj slici bolesnika, i procenta limfocita, u leukocitarnoj formuli, pomnoži relativnim brojem jedne subpopulacije dobijenim imunofenotipizacijom (na pr. CD3+ ima 70%), može se dobiti apsolutni broj ćelija u svakoj subpopulaciji.

B Funkcionalni testovi

1.Proliferativni odgovor na in vitro stimulaciju

Test limfocitne transformacije (TLT) koristi se za procenu proliferativnog odgovora na opšte mitogene ili, redje, na specifične tumorske antigene. Metode koje se koriste su mitotski indeks (morfološka metoda), ugradnja 3H-timidina (izotopska metoda), MTT (kolorimetrijska metoda).

Opšte proliferativne sposobnost T ćelija se procenjuje in vitro stimulacijom biljnim mitogenima, fitohemaglutininom (PHA) i konkavalinom A (ConA). T ćelijska proliferacija zahteva interakciju sa drugom ćelijom koja ispoljava antigen u sklopu "antigen:MHC kompleksa" klase I (za CD8+) ili klase II (za CD4+). CD8 T ćelije proliferišu na specifične kraće peptide poreklom od intraćelijskih tumorskih antigena, dužine 8-10 a.kis., vezane za MHC I na samim tumorskim ćelijama kao MAGE 1,3, Mart 1 i tirozinaza, poreklom iz melanoma, p 53, MUC 1 i Her-2/neu, poreklom iz karcinoma dojke, E6 i E7 poreklom iz karcinoma cerviksa uterusa, a a neophodna je aktivacija preko CD28 kostimulativnog molekula.

CD4+ T ćelije proliferišu u kontaktu sa dužim peptidnim tumorskim antigenima, od 12 do 35 amino kiselina, ekstraćelijskog porekla, ekspimiranih u sklopu MHC II na APC. To su, na pr. epitopi u sklopu tirozinaze kod malignog melanoma ili Her-2/neu antigena kod karcinoma dojke. Aktiviranje preko CD40L je kritično za proliferaciju.

Opšta proliferativna sposobnost B ćelija procenjuje se in vitro stimulacijom mitogenima (PWM za T-ćelijski zavisnu B ćelijsku stimulaciju, stafilkoknim proteinom (SpA) za T-ćelijski nezavisnu stimulaciju) ili specifičnim antigenima (tumorski antigeni).

Učestalost specifičnih T ili B ćelija određuje se testom limitirane dilucije (limiting dilution assay – LDA).

2. Citotoksičnost prema ciljnim tumorskim ćelijama

Test citotoksičnosti je najjednostavniji i najbrži bioesaj za procenu sposobnosti ubijanja ciljnih ćelija obeleženih radioaktivnim 51-hromom, od strane citotoksičnih ćelija, preko otpuštenog radioaktivnog hroma iz ubijenih ciljnih tumorskih ćelija. U NK ćelijskom citotoksičnom testu koriste se tumorske ćelije: K562 (osetljive), Daudi (slabo osetljive), Raji (rezistentne). Test može biti radioizotopski zasnovan na merenju otpuštanog 51-hroma iz prethodno obeleženih tumorskih ćelija, ili kolorimetrijski, u kome se određuje otpušteni intraćelijski enzim (LDH) iz liziranih tumorskih ćelija. Ovim testovima se primarno određuje nekroza izazvana sekrecijom *perforina*. Ovaj tip testa se koristi i za CD8 T ćelijsku citotoksičnost. Makrofagi preko lizozimskih enzima deluju citotoksično.

NK, T ćelije i makrofagi mogu ubijati tumorske ćelije i *apoptozom* koja nastaje vezivanjem Fas liganda na citotoksičnu za Fas molekul na ciljnoj ćeliji, vezivanjem TNF α i LT α za TNF Rc I na tumorskim ćelijama, delovanjem granzima B, kao i dejstvom slobodnih radikala. Apoptoza se detektuje na protočnom citometru obeležavanjem DNK u ćelijama aneksinom ili propidijum jodidom ili obeležavanjem nastalih DNK fragmenata imunofluorescentno markiranim nukleotidima u TUNEL testu. Morfološke promene karakteristične za apoptozu, kao što je kondenzacija hromatina ili apoptotična telašca, mogu se detektovati na svetlosnom ili

elektronskom mikroskopu. Apoptoza se može odrediti elektroforezom nastalih DNK fragmenata. Makrofagi mogu da usmrte tumorsku ćeliju i azot monoksida (NO). Prisustvo NO u makrofagima određuje se pomoću Greivess-vog reagensa.

Ćelije koje poseduju Rc za Fc fragment IgG (Fc γ), kao NK, CD8 ćelije i makrofagi, mogu ubiti ciljnu tumorsku ćeliju obloženu IgG antitelima mehanizmom nazvanim "antitelima posredovana ćelijska citotoksičnost" (ADCC). In vitro dodavanjem razblaženog seruma bolesnika, koji sadrži IgG, ciljnim tumorskim ćelijama, a zatim i limfocita, može se izazvati i proceniti ADCC preko otpuštenog radioaktivnog hroma ili kolorimetrijskom metodom.

3. Fagocitoza

Monociti imaju sposobnost fagocitoze. Za procenu fagocitne sposobnosti monocita koristi se test sa česticama kvasca obojenim neutral crvenom bojom koje monociti ingestiraju. Na taj način se određuje broj fagocitujućih monocita, a preko broja partikula kvasca po monocitu i kapacitet tj. indeks fagocitoze.

II Solubilni produkti

U imunodijagnostici određuje se klasa i količina imunoglobulina tj. antitela (At) koja je proporcionalna broju i funkcionalnosti B ćelija, kao i koncentracija citokina u serumu, posle in vitro indukovane produkcije i unutar samih limfocita, što ukazuje na citokinski profil.

A Imunoglobulini - Opšti nivo gama globulina se dobija elektroforezom seruma i procenom gamaglobulinske frakcije. Jedino B ćelije proizvode imunoglobuline i nivo specifičnih klasa serumskih imunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD i IgE, ukazuje na funkcionalni kapacitet B ćelija.

Tehnike za određivanje:

- a) Elektroforezom (EF) serumskih proteina na agaroznom gelu razdvaja se frakcija γ -globulina od albumina i α 1 i β globulina. Posle EF razdvojeni proteini se fiksiraju i mogu se vizuelizovati i kvantifikovati denzitometrijski.
- b) Koncentracija imunoglobulinskih klasa u serumu se najčešće obavlja tehnikom precipitacije u radialnoj imunodifuziji (RID) u pločama sa agaroznim gelom koji sadrži jednako raspoređena At za specifične izotipove imunoglobulina. Difuzija seruma i antitela, jedno prema drugom, stvara precipitinske krugove na mestu ekvivalentnosti čiji se prečnik određuje posle 18 h, na osnovu čega se određuje koncentracija određenog imunoglobulina.
- c) Metodom imunoelktroforeze (IEF) precizno se identifikuje priroda imunoglobulina (paraproteina) u monoklonskim gamapatijama, da li je α , γ ili μ klasa teškog lanca ili λ ili κ tip lakog lanca. U koliko se koristi kompletni anti-humani serum, koji je mešavina antitela protiv svih serumskih proteina (anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti- λ , anti- κ klasa lakih lanaca i anti- α , anti- γ and anti- μ klasa teških lanaca), stvaraju se mnogobrojni precipitinski lukovi.

d) ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay – enzimski imuno-vezujući test) je osetljiva, heterogena (više faza) analitička analiza za kvantifikaciju antigena ili antitela/imunoglobulina u kojoj je za čvrstu podlogu (na pr. epruvetu, mikroploču, plastičnu cev) vezano specifično At. Posle dodavanja uzorka bolesnika i reagensa stvara se bojeni produkt reakcije koji se očitava na ELISA čitaču, a koncentracija se izražava u odnosu na standardnu krivu za poznate koncentracije merene supstance.

B Citokini se mogu detektovati u serumu, u supernatantu stimuliranih kultura, intraćelijski kao i produkovani od pojedinačne ćelije.

Tehnike za ispitivanje:

a) Citokini se mogu produkovati in vitro tretiranjem izdvojenih mononuklearnih ćelija odgovarajućim mitogenima. T ćelije produkuju IL-2 po stimulaciji ConA, dok monociti produkuju TNF α stimulacijom LPS-om.

b) Koncentracija citokina se može određivati u biološkim esejima, u kojima imaju ulogu faktora rasta ili inhibitora rasta za određenu osetljivu ćelijsku liniju, na pr. D10(N4)M za IL-1, CTTL za IL-2, B9 za IL-6, ili L929 za TNF α . Proliferacija ćelija je ili direktno ili indirektno proporcionalna koncentraciji prisutnog citokina u uzorku dodatom u kulturu ćelija. Koncentracija citokina se određuje kolorimetrijskom metodom, MTT, na ELISA čitaču.

c) Modifikovanim ELISA testom (sendvič ELISA) određuje se citokin svojom sposobnošću da poveže dva, za njega specifična, mAt, preko svoja dva različita epitopa. Kolorimetrijski na ELISA čitaču moguće je veoma osetljivo i precizno odrediti koncentracije analiziranog citokina.

d) ELISPOT, tj. sendvič ELISA, se izvodi ukoliko se ćelije koje proizvode citokin stave na čvrstu podlogu presvučenu specifičnim mAt za dati citokin. Produkovani citokin iz svake ćelije vezuje se za mAt, a po odstranjivanju ćelija, dodavanjem drugog antitela obeleženog bojom, vizuelizuje se kao tačka na podlozi.

e) Intraćelijski citokini se mogu detektovati na protočnom citometru, posle permeabilizacije ćelija deterdžentom i intraćelijskog vezivanja dodatog specifičnog mAt za citokin.

C Određjivanje cirkulišućih imunih kompleksa (CIC) u serumu

U serumu bolesnika sa malignitetima usled viška produkovanih At i otkidanja antigena (Ag) sa površine tumorskih ćelija dolazi do stvaranja cirkulišućih antigen-antitelo kompleksa, odn. cirkulišućih imunih kompleksa (CIC), u kojima su zarobljena, inače, korisna specifična At. CIC se mogu odrediti različitim metodama.

- a) PEG precipitacija koristi se za detekciju, karakterizaciju i kvantifikaciju antigena i antitela u kompleksima.
- b) Esez za vezivanje C1q- CIC se mogu vezati teškim lancem Fc fragmenta u kompleksu At-Ag za C1q
- c) RIA (radioimunski esej) -je kompetitivni test inhibicije u kome se neobeleženi reumatoidni faktor (RF) kompetitivno vezuje za mesta na imobilizovanom IgG i CIC, a kvantifikuje se dodati obeleženi RF* koji je indirektno proporcionalan vezanom CIC.
- d) Raji ćelijski test – CIC se mogu vezati za ćelijske receptore Raji ćelijske linije. Dodato obeleženo At koje se vezuje za CIC imunoglobulin može se kvantifikovati i direktno je povezano sa koncentracijom CIC.

III Tumorski antigeni

Tumorski antigeni su proteini, glikoproteini, lipoproteini ili ugljenihidrati prisutna na površini i unutar maligno transformisanih ćelija. Opisano je više tipova tumorskih antigena, antigeni diferencijacije, antigeni izazvani tačkastim mutacijama normalnih gena, antigeni koji su previše ispoljeni u malignom tkivu, produkti virusnih gena. Oni mogu biti tumor specifični ili tumor asocirani u koliko su prisutni i na normalnim ćelijama bilo kada u toku diferencijacije. Tumorski antigeni mogu da izazovu imunske reakcije ćelijskog tipa, u koliko se radi o antigenima proteinske prirode ili humorskog tipa, ako su i ugljenohidratne prirode. Tumorski antigeni se mogu detektovati specifičnim mAt za bilo koji od njihovih epitopa. MAt se koriste za imunohistohemijsko ispitivanje tumorskog tkiva ili u detekciji cirkulišućih tumorskih antigena RIA metodom.

Metode za identifikaciju tumorskih antigena

A Opšte metode

- a) Genetska metoda – Izolacija gena koji kodira tumorski antigen dobija se izolacijom iRNK iz tumorske ćelije koja se zatim pretvara u cDNK, klonira u cDNK vektoru i zatim se može ispoljiti transfekcijom u fibroblaste.
- b) Biohemijska metoda – Tumorski antigeni vezani za molekule MHC klase I ili II izoluju se prečišćavanjem na imunoafinitetnim kolonama, pri niskim pH vrednostima. Zatim se reverznom tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (HPLC- high pressure liquid chromatography).
- c) Ćelijska metoda (CTL) – poznati peptidni tumorski antigeni eksprimiraju se in vitro na APC i stimulacijom T ćelija dovode do proliferacije specifično senzibilisanih limfocita.
- d) Imunohistohemijska metoda identifikuje tumorske antigene na isečcima tumorskog tkiva pomoću specifičnih mAt.

B Metode za određivanje tumorskih antigena u serumu

Tumorski antigeni u serumu određuju se preko RIA kompetitivnom analizom pomoću obeleženog At, u tečnoj sredini ili vezanog za čvrstu podlogu, na pr. epruvetu, staklene perle itd. Markirajući reagens, najčešće antitelo, je radioaktivno obeležen, obično ¹²⁵I. Kada se meri vezani obeleženi markirajući antigen, signal (broj otkucaja u minuti) iz obeleženog reagensainverzno je povezan sa koncentracijom neobeleženog antigena u uzorku. Količina antigena u uzorku se određuje poredjenjem vezane radioaktivnosti sa standardnom krivom. CEA i AFP su tumor asocirani antigeni koji se najčešće određuju u serumu bolesnika sa različitim malignitetima. CEA su mucini koji potiču od maligno transformisnih ćelija sa podtipovima koji su specifični za određene vrste tumora: CA-15-3 za karcinomom dojke, CA-19-9 za karcinomom pankreasa, CA 50 za karcinoma debelog creva, CA-125 za karcinomom jajnika. Povišen titar AFP povezan je sa malignitetima pankreasa i jetre.

IV In vivo kožni testovi

Kožni testovi kasne preosetljivosti (Tip IV preosetljivost) veoma su korisni u proceni ćelijske imunosti jer reaktivnost na neki antigen ili grupu antigena predstavlja opšti nivo imunokompetentnosti, a nemogućnost reagovanja na bateriju čestih kožnih antigena ukazuje na anergiju.

A) Kožni testovi sa već poznatim antigenima (tetanusni toksin, difterija, streptokok, PPD, kandida, trihofiton, *Proteus mirabilis*) omogućavaju merenje lenjirom najveće dimenzije i eritema i induracije posle 24, 48 h i 72 h.

B) Kožni testovi sa antigenima kancerskih vakcina (sintetski analozi tumorskih antigena MAGE, MART1, tirozinaze) koji indukuju T ćelijski imunski odgovor primenjuju se u toku terapije vakcinama da bi se procenio stepen indukovane specifične imunosti na primenjeni antigen.

Imunoterapija

Teoretska osnova na kojoj se zasniva današnja imunoterapijska strategija sastoji se u razbijanju nereaktivnosti i tolerancije prema prisutnom tumoru. Primenom imunoloških principa i postupaka bolesnici sa malignitetima bi trebalo da prepoznaju tumor kao "stran" i da razviju imunski odgovor koji bi bio isto tako efikasan kao u slučaju infekcije. Na ovaj način treba da se isprave ili poboljšaju nespecifične i specifične imunске reakcije na tumorske ćelije. Bolje razumevanje imunskih reakcija i mogućnost proizvodnje dobro definisanih imunološki produkata omogućili su razvoj više vidova imunoterapije i uz hirurgiju, zračnu terapiju i hemioterapiju, imunoterapija danas predstavlja četvrtu vrstu terapije bolesnika sa malignitetima. Po svojoj prirodi imunoterapija može biti pasivna, kada se daju već gotovi produkti (antitela ili in vitro stimulisani limfociti), tako da se organizam aktivno ne angažuje, ili aktivna, kad se primenjuju produkti koji dovode do aktivnog učešća imunskog sistema u razvoju protektivnih antitumorskih reakcija (vakcine i biološki agensi).

Pasivna imunoterapija

a) Imunoterapija monoklonskim antitelima

Ova terapija se zasniva na revolucionarnoj tehnologiji Kohlera i Milsteina iz 1975. kojom se pomoću hibridoma, a danas i pomoću rekombinantne DNK tehnike, proizvodi neograničena količina mAt specifičnih za jedan odredjen epitop tumorskih antigena. Za ovu vrstu terapije pogodni su tumorski antigeni koji su zajednički za više vrsta tumora, kao što su epitelni mucini, karcinoembrionalni antigen (CEA), antigeni diferencijacije karakteristični za hematološke malignitete, ili receptori za faktore rasta, na primer receptori za epidermalni faktor rasta (EGFR-epidermal growth factor receptor) ili receptori iz iste familije, HER2/neu, koji su prisutni u adenokarcinomima, kao što je karcinom dojke, kao i u brojnim drugim vrstama maligniteta.

U koliko se primenjuju nativna mAt ona mogu da dovedu do destrukcije tumorskih ćelija na više načina. *Direktnim mehanizmom* delovanja, kao antagonisti, nativna mAt inaktiviraju receptore bitne za rast tumora sprečavanjem vezivanja njihovih prirodnih liganda (receptori za IL-2 u leukemijama, TNF α , HER2/neu, EGFR u karcinomima), vezivanjem i ometanjem funkcije površinskih molekula (CD20, CD19 u limfomima) ili aktiviranjem molekula koji dovode do smrti ćelije (Fas na tumorskim ćelijama).

Pored ovog, nativna mAt mogu delovati *indirektnim mehanizmom* jer vezivanjem za membranu tumorskih ćelija preko svojih Fc fragmenata omogućavaju vezivanje citotoksičnih ćelija koje ispoljavaju Fc receptore za mAt, kao što su NK ćelije, CTL i makrofagi, i tako omogućavaju ćelijsku citotoksičnost zavisnu od antitela (ADCC – antibody dependent cell-mediated cytotoxicity) koja dovodi do smrti tumorske ćelije.

Na ovaj način vezana mAt aktiviraju C5b do C9 komponente komplekta sposobne da oštete membranu i da dovedu do lize tumorskih ćelija, kao i opsonizacijom koja olakšava fagocitozu. Ipak je indirektni mehanizam delovanja mAb najefekasniji u koliko se koriste mAt konjugova radiotivnim izotopima, citostaticima ili moćnim toksinima, što ih pretvara u specifične nosače antitumorskih preparata u tumorsko tkivo. Novije tehnološke mogućnosti u ovoj terapije zasnivaju se na proizvodnji tzv. bispecifičnih antitela, sa dva Fab fragmenta. Jedan Fab fragment se vezuje za specifični antigen tumora, a drugi Fab fragment, može da se veže za neki molekul na citotoksičnoj ćeliji, na pr. T-ćelijski receptorski kompleks, što dovodi do povezivanja tumorske i T citotoksične ćelije i aktiviranja citotoksičnog mehanizma prema tumorskoj ćeliji.

I ako se mAt najčešće proizvode u drugoj životinjskoj vrsti, najviše u mišu, danas se sintetišu humanizovana mAt čiji je Fab fragment, koji nosi specifičnost, mišjeg porekla, dok je Fc fragment humanog porekla. Primenuju se i sintetski humani jednolančani peptidi koji predstavljaju samo Fab fragmente, ili, sami, hipervarijabilni (Fv) domeni teškog ili lakog lanca mAt koji nose specifičnost ili fuzionisani sa citokinima, kao što je IL-2.

Postoje brojni problemi koji ograničavaju uspeh ove terapije. Pre svega, mogućnost neželjene, unakrsne, reaktivnosti sa normalnim tkivom predstavlja kritični činičnik za lokalizaciju antitela u tumor. Pored toga, fizičko-hemijske karakteristike mAt, kao što su afinitet za ciljani molekul,

veličina mAt koja zavisi od toga da li se primenjuje celo ili jednolančano antitelo ili samo specifični Fab fragment, utiču na njihovu prodornost u tumorsko tkivo. U samom tumorskom tkivu na difuziju mAt utiče njihova veličina i permeabilnost vaskularne mreže u tumorskom tkivu, karakteristike tumorske mikrosredine kao što su pH, pO₂ i povećan pritisak intersticijalne tečnosti. Primena ksenogenih, mišjih, antitela u visokim koncentracijama deluju antigenično i dovodi do stvaranje humanih At na mišja At (HAMA-human anti mouse antibodies) i štetnih imunskih reakcija kao i do stvaranja solubilnih, imunskih, antigen-antitelo kompleksa u cirkulaciji koja mogu da zarobe primenjena mAt. Iz ovih razloga kreiraju se himerična, delom mišja, delom humana, antitela. Nezaovoljavajući rezultati pasivne imunoterapije nastaju i usled nepovoljnih karakteristika tumora. Uspeh ove terapije zavisi od karakteristika tumorskog tkiva na kome tumorski antigen za koji mAt ima specifičnost treba da je stabilno, gusto i homogeno ispoljeni, da nema izražene nekroze i da tumor nema veliku masu. Pored toga, važan je poluživot primenjenog mAt, što zavisi od klase imunoglobulina, kao i brzina klierensa. Sve ove okolnosti i karakteristike ograničavaju uspeh terapije antitelima.

b) Adoptivna imunoterapija

Adoptivna ćelijska imunoterapija bolesnika sa tumorima predstavlja primenu *in vitro* kultivisanih i aktiviranih vlastitih limfocita koji su stekli pojačanu antitumorsku aktivnost. Adoptivna imunoterapija se zasniva na činjenici da su u prevenciji nastanka maligniteta uključene nespecifične NK ćelije i specifični CTL kao sastavni deo imunskog nadzora. Koristeći dokaze da je moguće limfocitima ostvariti imunizaciju na tumore u eksperimentalnim uslovima, Steven Rosenberg je razradio i klinički primenio LAK, a zatim i TIL terapiju.

LAK terapija

Ovaj oblik pasivne imunoterapije podrazumeva *in vitro* razmnožavanje i aktivaciju mononuklearnih ćelija periferne krvi osobe obolele od maligniteta u prisustvu IL-2 i stvaranje moćnih citotoksičnih ćelija koje se nazivaju LAK (lymphokine activated killer cells) ćelije, odn. ćelije ubice aktivirane citokinima. LAK ćelije se dobijaju leukoferezom, tako što se bolesnik tretira rhIL-2 u dozi od 2-3 x 10⁶U/m²/dan u toku 5 dana da bi se uspostavila limfocitoza. Zatim *in vitro* kultivisanje izdvojenih mononuklearnih ćelija sa rhIL-2 u toku 5 dana dovodi do stvaranja LAK ćelija koje se, zatim, vraćaju bolesniku infuzijom uz rhIL-2. LAK-ćelije u najvećoj meri čine aktivirane NK ćelije. Naj značajniji efekat ove terapije bio je uspostavljanje trajne remisije u nekih bolesnika sa velikim metastatskim tumorima, ali većina tretiranih bolesnika pokazala je mali pomak u kliničkom odgovoru u odnosu na prethodne vrste terapije, a teško je razdvajati efekat samih LAK-ćelija od efekta primenjenog rh IL-2.

TIL terapija

U pokušaju da pronadje efikasnije antitumorske citotoksične ćelije, Rosenberg je 1986. izolovao limfocite koji infiltrišu tumore i nazvao ih TIL (TIL-tumor infiltrating lymphocytes - limfociti koji infiltrišu tumor). Za razliku od LAK ćelija, TIL ćelije čine u najvećoj meri tumor specifični CTL sposobni da po *in vitro* aktivaciji rh IL-2 ubiju 100–1000 puta efikasnije od LAK ćelija autologe tumorske ćelije. TIL se dobijaju usitnjavanjem tumora do jednoćelijske

suspenzije mononuklearnih ćelija i tumorskih ćelija koja se zatim kultiviše in vitro u toku 30 do 45 dana dok se ne dostigne neophodan broj TIL ćelija koje se onda u infuziji sa rIL-2 vraćaju bolesniku. Danas se koriste savremeniji načini razmnožavanja specifičnih T limfocita iz tumorskog infiltrata, pa je aktiviranje limfocita in vitro anti-CD3 mAt i IL-2 pokazalo izvesne prednosti u citotoksičnom potencijalu generisnih ćelija u odnosu na prethodni postupak. TIL ćelije su bile od koristi u izučavanju specifičnih antitumorskih reakcija, u otkrivanju brojnih tumorskih antigena i značaja kostimulativnih signala. Sama adoptivna terapija dala je klinički odgovor kod neizlečivih bolesnika, ali u malom broju i uz značajnu toksičnost.

Aktivna imunoterapija

Nespecifična imunoterapija

(Smisao i primena imunoterapija se zasniva na iskustvima imunostimulišućeg dejstva bakterijskih produkata koji na nespecifičan način podstiču mnogobrojne, uključujući i antitumorske, imunske reakcije kod bolesnika sa malignitetima. BCG se koristi u površnim karcinomima mokraćne bešike. Pored adjuvanata, ova vrsta terapije uključuje i primenu interferona, citokina- IL-2, TNF α , GM-CSF koji mogu da pojačaju lokalne i sistemske opšte i antitumorske reakcije.)

Ovo je najstariji vid imunoterapije koji se zasnivao na aktiviranju opštih imunskih reakcija primenom bakterijskih produkata (adjuvanata). Najznačajniji među začetnicima nespecifične imunoterapije bio je W. Coley, hirurg iz Njujorka, koji je kod bolesnika sa sarkomima posle pojave erizipela uočio regresiju tumora. Pretpostavio je da korisan efekat potiče od bakterijskih produkata koji izazivaju infekciju i kombinovanjem različitih bakterijskih supernatanta napravio je tzv. "Coley-eve toksine" čija primena je dala odredjen uspeh.

I danas se u nespecifičnoj imunoterapiji primenjuju pojedine bakterije ili njihovi produkti, kao što su bacillus Calmette-Guerin (BCG), Corynebacterium parvum ili Bordatella pertussis. Jedino BCG u superficijalnom karcinomu mokraćne bešike, uspostavljanjem korisne inflamacije i imunskih reakcija, usporava progresiju tumora i odlaže potrebu za hirurškom intervencijom. Pored toga, hemijska jedinjenja, kao što je dvolančana RNK (Poly IC) ili levamizol, indukcijom sinteze interferona, aktiviraju različite vidove imunskog odgovora i ispoljavaju antitumorski efekat.

Citokini čine novu generaciju nespecifičnih imunostimulativnih agenasa i primenom interferona- α (IFN) imunoterapija je zvanično uvedena u kliničku praksu. IFN deluje antiproliferativno na tumorske ćelije, ali i imunomodulatorno na različite vidove imunskog odgovora. Primenjuje se bilo kao monoterapija u niskim, srednjim ili visokim dozama, u kombinaciji sa drugim citokinima (najčešće IL-2) ili u sklopu hemioterapije u više od 14 različitih tumora. Sledeći najčešće korišćen citokin, IL-2, odobren je 1992. za terapiju metsastatskog karcinoma bubrega, a 1998. i za terapiju metastatskog melanoma. Koristi se za produkciju LAK i TIL ćelija, ali i samostalno, najčešće u kombinaciji sa IFN, a u poslednje vreme u mnogobrojnim tumorima u kombinaciji sa IL-12, pasivnom imunoterapijom mAt i hemioterapijom. U visokim dozama IL-2 ima izrazitu toksičnost u vidu hemodinamskih

poremećaja i iz tih razloga se doze smanjuju do ultra niskih, a primena svodi na sc davanje. I pored toga što može da dovede do nekroze tumora, TNF α se primenjuje u izolovanoj perfuziji ekstremiteta zahvaćenih sarkomima ili melanomom, jer pri sistemske terapiji ispoljava visoku toksičnost. Primena IL-12, kao proinflamatorni citokina koji modulira i urodjene i adaptivne imunske reakcije, ograničena je zbog izražene toksičnosti i za sada se najčešće primenjuje sa IL-2 koji potencirajegovo dejstvo i omogućava smanjenje doze. Terapija GM-CSF-om dovodi do aktivacije APC (DČ), dok u kombinaciji sa IL-2 i IFN dovodi do značajne aktivacije antitumorskih efektorskih ćelija. Nova istraživanja treba da pokažu koji citokin u odredjenom tumoru daje najbolji efekat, kao i mogućnosti njihovog kombinovanja zasnovanog od biološkog mehanizma dejstva i vremenske kombinacije citokina i hemioterapeutskih agenasa u cilju postizanja sinergističkog ili aditivnog efekta.

Specifična aktivna imunoterapija

Tumorske vakcine

Pojam vakcinacije je povezan sa profilaksom infektivnih bolesti izazvanih bakterijama ili virusima. Medjutim, u onkologiji tumorske vakcine se najčešće primenjuju kod bolesnika sa metastatskim tumorima ili kod bolesnika po uspostavljanju remisije u cilju sprečavanja recidiva bolesti.

Profilaktične vakcine su tek u začetku i primenjuju se u rizičnim populacijama radi prevencije tumora čija je etiologija blisko povezana sa odredjenim virusima. Tako je u primeni vakcina protiv virusa za hepatitis B, kao zaštita od hepatocelularnog karcinoma, vakcina protiv humanog papiloma virusa (HPV) u prevenciji karcinoma cerviksa, a potencijalni značaj bi imala i vakcina protiv Epstein-Barr virusa u zaštiti od Burkittovog limfoma i nazofaringealnog karcinoma.

Same tumorske vakcine treba da aktiviraju imunski odgovor obolele osobe na primarni tumor koji se, ako je i postojao, izgubio ili je oslabljen. Pokušaji primene tumorskih ćelija kao vakcina stari su više od jednog veka. Tumorske vakcine mogu biti po prirodi ćelijske, poreklom od autologog ili alogenog tumora iste patohistologije koje se in vitro razmnožavaju i zatim atenuiraju zračenjem. Ovakve vakcine najčešće izazivaju humorni imunski odgovor koji je manje efikasan od ćelijskog imenskog odgovora na tumore (58). U koliko su vakcine sačinjene od ekstrakata tumorskih ćelija, one pored tumorskih antigena, često sadrže i heat shock proteine (HSP), koji deluju antigenično ili sadrže i prezentuju tumorske antigene. Noviji vid ćelijskih vakcina su dendritične ćelije koje se smatraju dobrim biološkim nosačima tumorskih lizata, sintetskih tumorskih antigena ili gena koji kodiraju tumorake antigene.

U poslednje vreme sintetišu se peptidi na osnovu poznate sekvence amno kiselina tumorskih antigena što je omogućilo razvijanje nove generacije, peptidnih, tumorskih vakcina koje sadrže jedan ili više tumorskih antigena. Efekat peptidnih tumorskih antigena može se ostvariti samo ukoliko bolesnik ispoljava neophodan MHC alel za prezentaciju primenjenog tumorskog antigena. U genetskim vakcinama kao nosači gena koji kodiraju tumorske antigene koriste se nepatogeni virusi, kao što je vaccinia virus, čijom se ugradnjom u mišićne ili vezivne ćelije, omogućava dugotrajna sinteza velikih količina tumorskih antigena i veća mogućnost razvoja neophodnog imenskog odgovora na tumor. Takodje su moguće genetske manipulacije samih

tumorskih ćelija transfekcijom gena bitnih za pojačavanje antitumorskih imunskih reakcija, kao što je transfekcija gena za MHC molekule klase I, kostimulativne molekule (B7-1 i 2) ili citokine (IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IFN γ , TNF α , GM-CSF) koje po primeni ispoljavanjem ovih antigena ili sintezom citokina pospešuju lokalni i sistemski imunski odgovor. Ovakvi pristupi se još uvek razradjuju u pretkliničkim i odgovarajućim kliničkim studijama i ukazuju na veliki potencijal.

Veoma važni sastojci tumorskih vakcina su adjuvanti, kao muramildipeptid (MDP), organski molekul poreklom iz bakterija, BCG, Detox ili superantigeni (SEB- streptokokni enterotoksin B) koji pojačavaju nespecifične imunske reakcije, privlače i stimulišu makrofage na mestu vakcinacije i usporavaju ulazak antigena u organizam.

Eekat tumorskih vakcina može se procenjivati kožnim testovima kasne preosetljivosti (DTH), traženjem specifičnih CTL u perifernoj krvi ili procenom kliničkog efekta.

Definisanje zajedničkih antigena za pojedine tipove tumora, poboljšanje njihove antigeničnosti, razumevanje bitnih činilaca u imunskim reakcijama, kao što su kostimulacija interakcijom CD40-CD40L molekula, karakteristike dendritičnih ćelija kao nosača tumorskih antigena i uloga KIR receptora koji inhibišu citotoksičnost (KIR – killer inhibitory receptors) predstavljaju neke od pojmova čije bolje razumevanje može pomoći u stvaranju uspešnije imunoterapije.

Literatura:

1. Janeway, C, Travers, P., Hunt, S., Waltróp, M. Immunobology : The Immune System in Health and Disease. Current Biology Ltd/Garland Publishing Inc, 4th edition, London, UK, 2000.
2. Abbas, AK, Litchman, AH, Pober, JS. Cellular and Molecular Immunology, W. B. Sanders Company, 4th edition, 2001.
3. Peter, J. Use and interpretation of tests in clinical immunology. Specialty Laboratories, Inc. Eighth Edition, Santa Monica, CA, 1991.
4. Stites P.D., Terr I.A, Parslow G.T. Basic and clinical immunology. Lange Medical Book, Eight edition, Norwalk, Connecticut, USA, 1994.
5. Hibbs, JB, Taintor, R, Vavrin, Z, Rachlin, E. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. Biochem. Biophys Res Commun. 1989, 157:87-94.
6. Lane, P.J. , Broucker, T. Development of dendritic cell function. Current Opinion in Immunol, 1999, 11:308-313.