



YU ISSN 0350-8218

SCRIPTA MEDICA

STRUČNI
ČASOPIS
LJEKARA
BOSANSKE
KRAJINE

GODINA XXIII — BROJ 3/4 — 1988.

Maj/August
1988.

Broj 3/4
Godina XXIII
YU ISSN 0350-8218

SCRIPTA MEDICA

STRUČNI ČASOPIS LJEKARA BOSANSKE KRAJINE



Banjaluka, 1988.

SCRIPTA MEDICA
Stručni časopis ljekara Bosanske krajine

Vlasnik i izdavač:

Podružnica Društva ljekara Banjaluka

Glavni i odgovorni urednik

Branko Pikula

Redakcioni odbor

Kastelic Zvonimir Pišteljić Dušan

Batančev Branka Hadžikarić Nedim

Novkinić Medžid

Lektor za engleski jezik

Doc. dr. sci. Hamza Mujagić

Adresa uredništva: Scripta medica KBC — Zavod za patologiju Banjaluka

Štampa: MP »Nova štampa«, Bosanska Gradiška

Časopis izlazi četiri puta godišnje. Pretplata 480 dinara za ustanove, a 240 dinara za pojedince. Žiro-račun 10500-678-773, Podružnica društva ljekara Banjaluka.

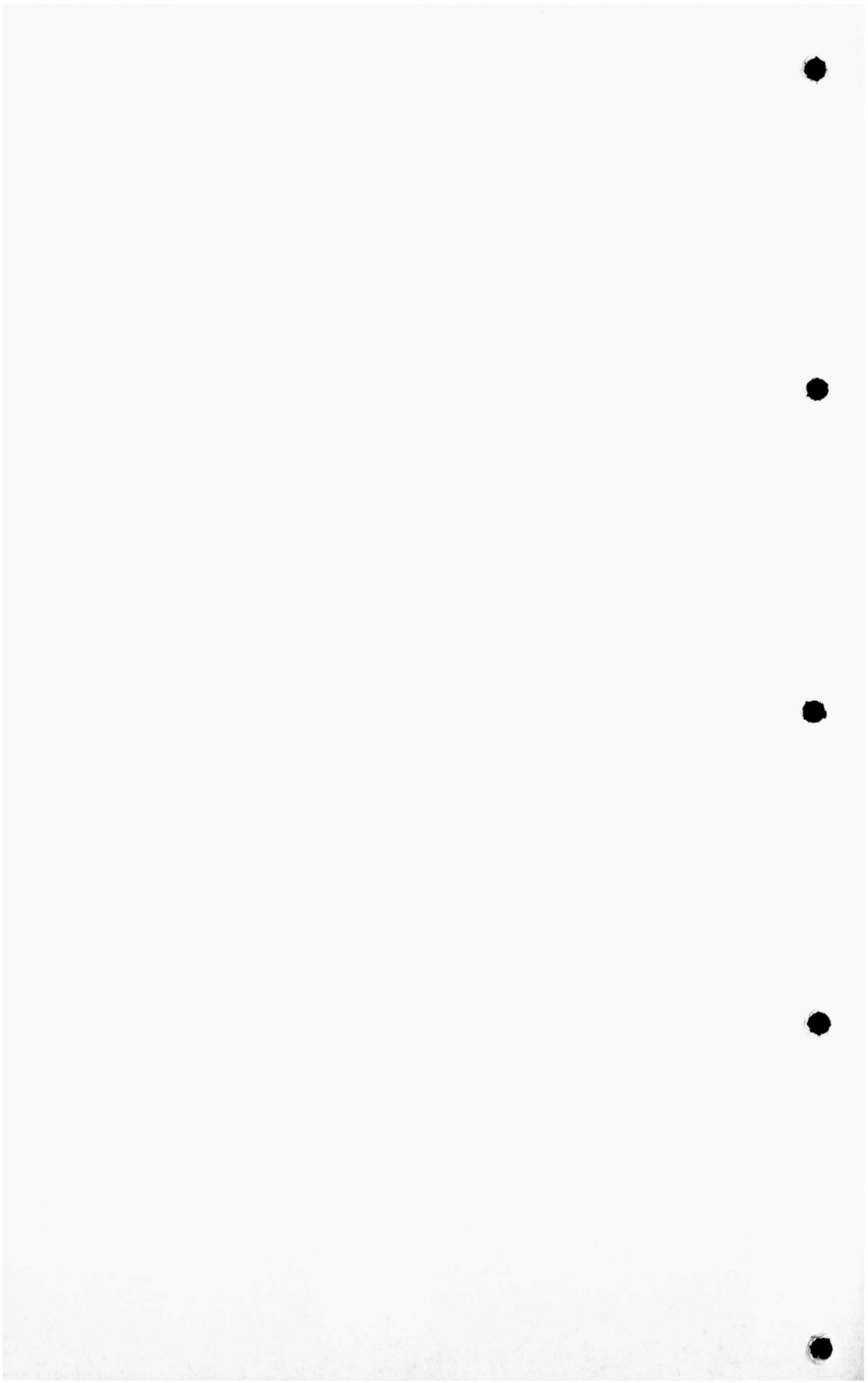
PREDGOVOR

Ovaj broj Scripta medica-e posvećen je tumorskoj imunologiji, i to bazičnim istraživanjima u okviru te oblasti. Tumorska imunologija doživljava intenzivan razvoj u posljednjih deset godina i stvara osnovu za kliničku primjenu eksperimentalnih nalaza, tako da se zasluženno izdvojila kao posebna grana imunologije i po prvi put prošle godine bila obilježena Svjetskim kongresom iz oblasti imunoterapije karcinoma.

Na Zavodu za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Banjoj Luci, već 3. godinu intenzivno radi Imunološka grupa, koju čine 13 mladih istraživača, čije su glavne preokupacije upravo iz oblasti bazične tumorske imunologije. Za ovaj broj Scripta medica-e pripremljeni su radovi koji sa različitih aspekata ispituju imuni odgovor na eksperimentalno izazvani maligni tumor kod štakora, zatim probleme individualnih razlika u prijemčivosti eksperimentalnih tumora, probleme inhibicije i blokade imunog odgovora na tumor, kao i različite metode ispitivanja molekula važnih u tumorskoj imunologiji. Prisutna su i dva revijalna prikaza, jedan iz oblasti imunoterapije humanih karcinoma, a drugi iz oblasti neuroimunologije, koja ima sve više dodirnih tačaka sa tumorskom imunologijom.

Svi radovi su eksperimentalno izvedeni na Zavodu za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Banjoj Luci. Svesrdnu pomoć, u vidu aparature, hemikalija, korisnih savjeta i stručne pomoći, dugujemo: prof. dr Mislavu Jurinu i saradnicima sa Instituta »Ruđer Bošković« (Laboratorija za eksperimentalnu biomedicinu), ass. dr sci. Branki Horvat i saradnicima sa Medicinskog fakulteta u Zagrebu (Zavod za fiziologiju), prof. dr Brani Jankoviću i doc. dr. Draganu Mariću i saradnicima sa Instituta »Torlak« iz Beograda (Laboratorija za neuroimunologiju) i brojnim saradnicima iz Kliničko-medijskog centra Banja Luka.

U Banjoj Luci, 8. 1. 1991. godine



SADRŽAJ — CONTENTS

Predgovor

RADOVI — REPORTS

- Mišković I., Tur D., Pjanić A.:** Gel filtracija ascitesne tečnosti štakora nosioca Yoshida-inog ascitičnog sarkoma 7
Gel filtration of ascitic fluid from a YAS bearing rat
- Habibović S., Bašić S., Pjanić A.:** Celularni i humoralni imuni odgovor kod štakora nosilaca tumora 15
Cellular and humoral imunity in rats with malignant tumors
- Nikolić B., Kondić A., Pjanić A.:** Imunološka reaktivnost štakora koji su odbacili tumor 23
The immunologic reactivity in rats witch have rejected a tumor transplantates
- Tucek A., Pjanić A., Vojčić D., Savić D.:** Imunoelektroforetsko ispitivanje unakrsne reaktivnosti štakorskog anti-humanog seruma i proteinskih frakcija humanog seruma 31
Immuno electrophoretic research of cross-reactivity of rats anti-human serum and protein fractions from human serum
- Hajder S., Kardum D., Pjanić A.:** Elektroforetsko određivanje vrijednosti gama-globulinske frakcije seruma štakora koji su odbacili tumor 39
Gama-globulin fraction in the serum of rats which have rejected a tumors
- Unčanin D., Pjanić A.:** Modifikacija reakcije vezanja komplementa 45
Modification of the complement fixation reaction
- Bašić S., Habibović S., Pjanić A.:** Intenzitet imunog odgovora praćen testovima celularne (CC) i humoralne (CDC) citotoksičnosti povezan je sa brzinom rasta tumora 53
The tumor growth is conected with intensity of the imune responce to the tumor
- PREGLEDNI ČLANAK-REVIEW ARTICLE**
- Jović V., Pjanić A.:** Imunologija ponašanja 59
Behavioral immunology
- Tur D., Mišković I., Pjanić A.:** Imunoterapija uz pomoć virusa 65
Immunotherapy of malignant cancer utilizing virus help



GEL FILTRACIJA ASCITESNE TEČNOSTI ŠTAKORA NOSIOCA YOSHIDA-inog ASCITIČNOG SARKOMA

IVICA MIŠKOVIĆ, DRAGAN TUR, AIDA PJANIĆ

Štakoru, nosiocu intraperitonealnog YAS-a, uzeta je cjelokupna ascitesna tečnost. Nakon odvajanja od celularnih elemenata, centrifugiranjem 15 min. na 2000 g, iz supernatanta je izdvojena γ -globulinska frakcija dvostrukim frakcioniranim taloženjem sa bezvodnim Na-sulfatom (18% i 14%). Izdvojena γ -globulinska frakcija nanescna je na kolonu sa Sephadex-om G-200 (h=90 cm, d=2,6 cm, V ukupni=500 ml). Eluiranje je vršeno fosfatnim puferom (PBS), pH 7,4. Sakupljeno je 50 frakcija po 10 ml, čija absorbanca je očitana na UV spektrofotometru (280 nm). Dobijeno je ukupno 6 pikova, od kojih su 4 posebno izražena. Standardni proteini za određivanje molekulske mase izoliranih proteinskih frakcija bili su: humani albumin (MM=67000) i humani IgG (MM=150000). Upoređivanjem sa standardnim proteinima, zaključili smo da gel filtracijom γ -globulinske frakcije malignog ascitesa dobijamo sljedeće proteinske frakcije: (1) MM=150000 (γ -globulini), (2) MM=120000, (3) MM=100000, (4) MM=90000, (5) MM=80000 (potencijalna supresorska frakcija) i (6) MM=67000 (albumini).

Gel filtracija predstavlja preparacionu fizičko-hemijsku metodu razdvajanja i izolacije makromolekula iz datih uzoraka, odnosno komponenti iz smjese, na temelju veličine molekula. Zasniva se na principu filtracije kroz specifične gelove, te direktno ovisi od karakteristika upotrebljenog gela.

Treba naglasiti da je ovo preparaciona metoda i da sa njom dobijamo uzorke koji su razdvojeni, ali ne i visoko prečišćeni, ali koja može poslužiti kao predmetoda za visoko specifične izolirajuće tehnike (5).

Prednosti ove metode u odnosu na druge su:

- 1) pogodni uvjeti za izolaciju i nestabilnih supstanci,
- 2) neznatan gubitak na supstanci koja se filtrira,
- 3) mogućnost velikog broja izvođenja, tj. ponavljanja postupka pod istovjetnim uslovima,
- 4) mogućnost odvajanja najrazličitijih količina uzorka,
- 5) razmjerno kratko vrijeme izvođenja,
- 6) oprema koja nije suviše skupa (2).

Gel filtracija može korisno poslužiti u raznim granama medicine, a za imunologiju je značajna jer se pomoću nje mogu izolirati željene supstance, osobito antigene (u našem slučaju potencijalna supresorska frakcija) a koja se na jednostavniji i jeftiniji način ne mogu dobiti (7).

Uprkos detaljnih istraživanja, mehanizam gel filtracije nije još potpuno razjašnjen (2). Sam gel se sastoji iz malih partikula — kuglica sa spužvastom strukturom i porama jednakog promjera. Ako se smjesa različitih velikih molekula nanese na jednu kolonu ovog materijala, tada će se veće molekule veoma teško zadržati u pore i biće sa vrlo malim otporom eluirane. Male molekule će, međutim, difundirati u pore i tamo se zadržati izdvojene iz tekućeg rastvora. Stepem kojim će se one zadržavati u koloni ovisi od toga koliko dugo se one zadržavaju u porama gela, a što je opet direktno ovisno od veličine molekula i promjera pora (3).

Eluirani uzorci se potom mogu ispitivati na UV spektrofotometru različitih talasnih dužina (ovisno od uzorka kojeg tražimo, npr. proteini — 280 nm). Pomoću dobijenih vrijednosti pravi se dijagram (3). Zbog toga, gel filtracija je pogodna metoda i za određivanje molekulskih masa.

Ako nekoliko tvari poznatih MW podvrgnemo gel filtraciji možemo dobiti standardni grafikon. Naime, postoji linearan odnos između volume elucije i logaritma relativne molekulske mase, pa se iz podataka za poznate tvari konstruira baždarni dijagram iz kojeg se interpolacijom može izračunati MW nepoznate, tražene molekule (8).

Materijal i metode

1. UZORAK

Ascitesna tečnost dobijena je od štakora soja Wistar, kome su intraperitonealno ubrizgane stanice visoko transplatabilnog, štakorskog tumora YAS-a (Yoshida ascitičnog sarkoma), u količini od 10 miliona stanica. Sedmog dana od inokulacije, štakor je žrtvovan i odstranjena mu je ascitesna tečnost. Sama ascitesna tečnost je veoma slična krvnoj plazmi i njihov proteinski sastav prikazan je u tabeli 1.

Proteini	Molekularna masa
orozomukoid	44000
alfa-1 antitripsin	45000
alfa-2 HS glikoprotein	49000
prealbumin	61000
albumin	67000
haptoglobin	85000
transferin	85000
ceruloplazmin	150000
IgG	150000
IgA	150000
IgD	170000
IgE	190000
fibrinogen	341000
alfa-2 makroglobulin	820000
IgM	900000

Tabela 1. Važnije proteinske frakcije krvne plazme poredane po molekulskoj masi

Radi eliminacije tumorskih i ostalih stanica, ascites je centrifugiran 15 min. na 2000 g. Bistra, žućkasta tečnost (supernatant) pažljivo je otpipetirana Pasterovom pipetom i dalje je korištena u eksperimentu.

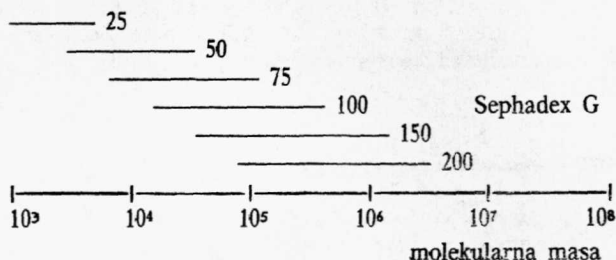
2. γ — GLOBULINSKA FRAKCIJA ASCITESNE TEČNOSTI

Isoljavanjem γ -globulinske frakcije iz ascitesne tečnosti obavljeno je dvostrukim frakcioniranim taloženjem sa bezvodnim Na-sulfatom (18% i 14%), pri temperaturi 25°C i 3000 g. Talog globulinske frakcije je rastvoren u 15 ml destilovane vode i dijaliziran naspram PBS-a (fosfatnog pufera). Dobijena otopina podvrgnuta je gel filtraciji.

3. GEL FILTRACIJA ASCITESNE TEČNOSTI

3a. PRIPREMANJE GELA

Gel kroz koji je vršena filtracija, Sephadex G—200, nabavljen je u obliku bijelog praha. Širina njegove filtracione moći kreće se od 10000 do 500000 (Slika 1).



Slika 1. Prikaz selektivnosti pojedinih gelova iz serije Sephadex G

Hidratizacija gela obavljena je u elucionom sredstvu: PBS-u, pH vrijednost 7,4. Gel je sipan u posudu sa elucionim rastvorom uz lagano miješanje staklenim štapićem. Prethodno je eluciono sredstvo zagrijano na sobnu temperaturu, kako bi hidratizacija bila potpuna.

Usljedilo je prečišćavanje gela višestrukim ispiranjem gel matrixa u PBS-u. Ovo je imalo za cilj da se odstrane sitne čestice gela («fines»), koje mogu zaglavljivanjem u pore gela ili pak u međuprostore između gel partikula znatno smanjiti brzinu filtracije, a i selektivnost gela.

Na kraju obavljeno je otplinjavanje gela, tako što je posuda sa pripremljenim gelom priključena na vodenu (vakum) mlaznu pumpu, kako bi se sprečilo nastajanje mjehurića zraka u koloni.

3b. PRIPREMANJE KOLONE

Kolona je isprana destilovanom vodom i PBS-om radi odstranjenja eventualnih nečistoća i provjere sigurnosnog ventila na dnu kolone. U ležište kolone stavljena je pamučna vata kao sredstvo koje će sprečiti isticanje gela za vrijeme filtracije. Neposredno prije pakovanja, u kolonu je nasuto 10 ml. PBS-a kako bi se odstranio zrak iz mrtvog prostora oko ispušnog ventila i iz vate.

3c. PAKOVANJE KOLONE

500 ml prethodno pripremljenog gela suspendovano je u 500 ml elucione otopine, jer volumen suspenzije treba biti dvostruko veći od krajnjeg volumena kolone gela. Gel je pažljivo lijevan niz stranicu zakrivljene kolone i pri tom je osobita pažnja obraćana da ne nastanu zračni mjehurići u njemu. Kolona je ostavljena 30 min. da se gel istaloži, sa tim da je prethodno učvršćena za stalak, tako da stoji točno u uspravnom položaju. Potom je otvoren ispustni ventil stuba, čime je omogućeno proticanje kroz stub i oticanje iz stuba PBS-a, tj. završno, fino pakovanje gel kolone.

Time su dobijene konačne dimenzije gel kolone: ukupna zapremina od 500 ml, visina gel stuba od 90 cm i prečnik kolone od 2,6 cm.

3d. NANOŠENJE UZORKA

Elucioni rastvor koji se nakon taloženja nalazio iznad gela, ispušten je tik do gel površine. Pripremljeni uzorak za filtraciju, u količini od 15 ml, nanesen je pažljivo na samu površinu gela. Ispustni ventil kolone je zatvoren u trajanju od 15 min, kako bi uzorak sam udifundirao u gel matrix. Potom je ventil otvoren i počelo se sa pažljivim opterećavanjem PBS-om. Pri tom je uspostavljen i konstantan hidrostatski pritisak, pod kojim je vršena filtracija.

3e. ELUIRANJE FRAKCIJA

Gel filtracija je vršena pod navedenim uvjetima u trajanju protoka 500 ml elucione otopine kroz kolonu. Sakupljeno je ukupno 50 epruveta po 10 ml eluata. One su čuvane na +4°C do kolorimetrijskog očitavanja.

3f. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA DOBIJENIH FRAKCIJA

Svim sakupljenim frakcijama određena je apsorbanca na UV spektrofotometru pri talasnoj dužini od 280 nm. Dobijeni rezultati poslužili su za konstruisanje dijagrama.

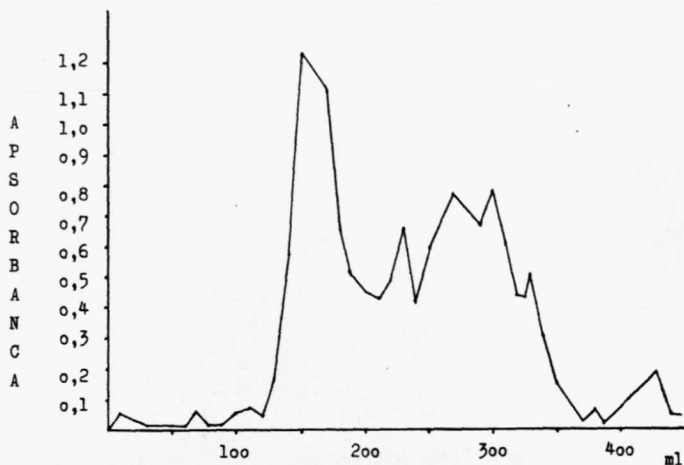
4. STANDARDNI PROTEINI

Za standardizaciju Sephadex G—200 kolone korišteni su humani albumin i humani IgG. Albumini su dobijeni izoliranjem sa Na-sulfatom i elektroforetski su ispitani, a IgG je dobijen sa jonoizmjenjivačke kolone pakovane DEAE celulozom. Njegova čistoća potvrđena je radijarnom imunodifuzijom sa anti-IgG-om.

Rezultati

(1) Gel filtracija ascitesne tečnosti štakora nosioca YAS-a

Na osnovu UV spektrofotometrijske analize na 280 nm frakcija sakupljenih sa kolone Sephadex G—200, sačinjen je grafikon (slika 2).

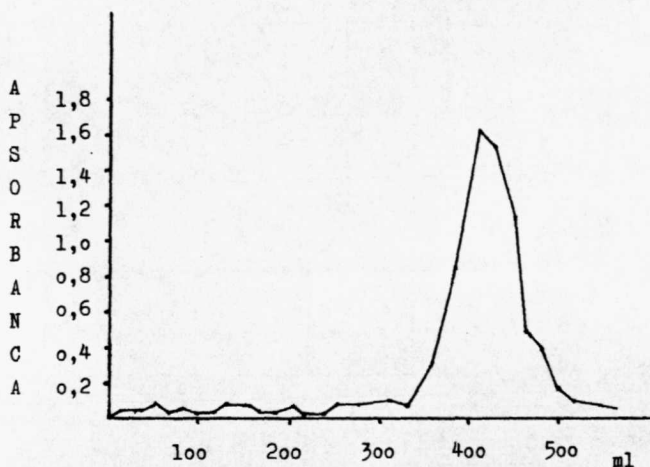


Slika 2. Rezultati očitavanja apsorpcije eluiranih proteinskih frakcija ascitesa na UV spektrofotometru

Jasno se uočava 6 izraženih pikova. Prvi i najveći od njih nalazi se od 13. do 18. epruvete i predstavlja IgG frakciju, što je elektroforetski potvrđeno. Posljednji od njih se postiže između 41. i 44. epruvete i odgovara piku zaostalih albuminskih primjesa, što je također elektroforetski potvrđeno.

(2) Gel filtracija izolovane albuminske frakcije

Radi standardizacije, filtrirana je čista albuminska frakcija humanog seruma i nakon kolonimetrijskog očitavanja na 280 nm sačinjen je dijagram (slika 3).

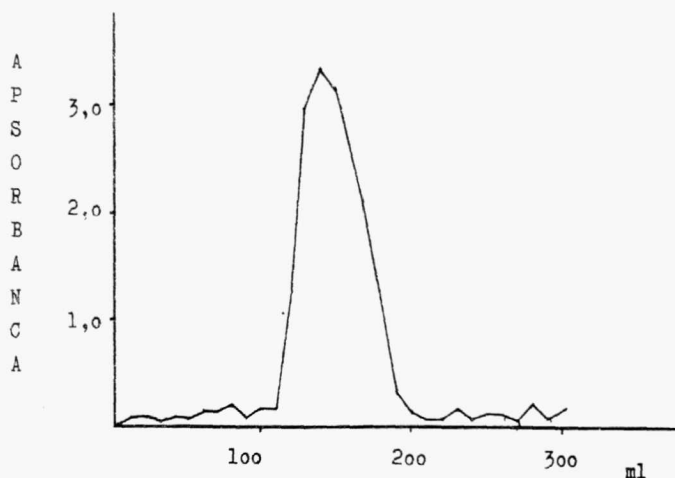


Slika 3. Apсорpcija eluata dobijenih gel filtracijom čistih humanih albumina

Na datom dijagramu jasno se vidi jedan izražen pik u rasponu 360. — 450. ml eluata, koji bi odgovarao albuminu.

(3) Gel filtracija izolovanog IgG

Iz humanog seruma izoliran je IgG i filtriran kroz kolonu sa Sephadex-om G—200 radi određivanja njegove elucione pozicije (slika 4).

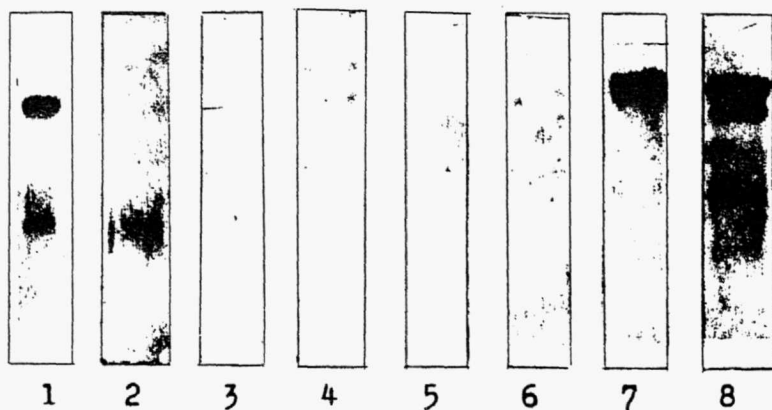


Slika 4. Apsorpcija eluata pri filtraciji humanog IgG

Jedini izraženi pik IgG-a prostire se u rasponu između 120. i 180. ml eluata.

(4) Elektroforetsko ispitivanje uzoraka i eluata

Elektroforetski su ispitani: uzorak ascitesne tečnosti koji je podvrgnut filtraciji, pojedini uzorci eluiranih frakcija i štakorski serum (slika 5).



Slika 5. Uzorci ispitani elektroforezom: 1. ascitesna tečnost štakora; 2—7. uzorci pojedinih pikova (1—6) dobijenih gel filtracijom; 8. štakorski serum

Upoređujući izolirane frakcije sa kompletnim serumom i ascitesom, vidi se da frakcija br. 1 pripada γ -globulinima, a frakcija br. 6 albuminima. Ostale ne daju vidljive precipitacione linije, vjerovatno jer su previše razblažene da bi se mogle elektroforetski ispitati.

Diskusija

Ascitesnu tečnost štakora nosioca YAS-a, gel filtracijom uspjeli smo razdvojiti na sastavne komponente, što smo na UV spektrofotometru i dokazali.

Naknadnom elektroforetskom analizom razdvojenih komponenti ascitesa dobili smo interesantne podatke. Prema mjestu koje su zauzele pojedine eluirane frakcije u odnosu na kompletni štakorski serum, zaključili smo da prvi pik odgovara IgG frakciji štakora, a posljednji primjesama albumina koji su zaostali iz procesa taloženja proteina, ostali pikovi nisu dali karakterističan elektroforetski položaj, najvjerovatnije zbog male koncentracije.

Uzimajući u obzir činjenice o veličini molekula u pikovima poznatog sastava (1. pik IgG, MW=150000; 6. pik albumin, MW=67000) i poznavanje odnosa između relativne molekulske mase i elutivnog volumena (koji bi za molekule ovih masa bio gotovo linearan), pretpostavili smo i veličine molekula izlučenih u ostala 4 pika, i to: pik broj 2 — oko 1200000; pik broj 3 — oko 100000; pik broj 4 — oko 900000; i pik broj 5 — oko 80000.

Iz dostupne naučne literature (7) o prisutnosti supresorske frakcije u ascitesu štakora nosioca YAS-a i njegovoj MW oko 82000, naš budući zadatak bi bio da sve dobijene frakcije, a osobito u sastavu pika broj 5, detaljnije ispitamo testovima celularne imunosti i po mogućnosti ukažemo na prisustvo i efikasnost dejstva eventualnog supresorskog faktora.

Zahvaljujemo se: prof. dr Ibri Tabakoviću, mr Rifetu Tabakoviću i mr Esmiru Gu-
niću sa Tehnološkog fakulteta u Banjoj Luci na pomoći koju su nam pružili prilikom izrade ovog rada.

LITERATURA

1. **Allegretti N., Andreis I., Culo F., Marušić M., Taradi M.:** *Imunologija*. Školska knjiga, Zagreb, 1987.
2. **Cooper G. T.:** *Biochemische Arbeitsmethoden*, Walter de Gruyter, Berlin, 1981.
3. **Johnstone A. and Thorpe R.:** *Immunochemistry in practice*. Blackwell Scientific publications, Oxford, 1987.
4. **Nikolić B.:** *Biohemija*, Naučna knjiga, Beograd, 1980.
5. **Osterman L. A.:** *Methods of protein and nucleic acid reserch*. Spring Verlag, New York, 1984.
6. **Scorpes R. K.:** *Protein purification: Principles and practice*. Spring Verlag, New York, 1987.
7. **Steele J. K., Stammers T. A. and Levy G. J.:** Isolation ond characterization of a tumor-specific T suppressor factor from a T cell hybridoma. *The Journal of Immunology*, No. 4, 2767-2778, 1985.
8. **Štraus B.:** *Medicinska biokemija*. Jumena, Zagreb, 1988.

SUMARY

GEL FILTRATION OF ASCITIC FLUID FROM A YAS BEARING RAT

Ivica Misković, Dragan Tur, Aida Pjanic

Immunology Group, Faculty of Medicine Banja Luka

Ascites from the rat, with intraperitoneal Yoshidas ascitic sarcoma, was centrifuged at 2000 g for 15 min. Gamma globulin fraction was separated with anhydrous Na-sulphate into two steps. Separated gamma globulin fraction was applied on the column packed with Sephadex G-200 ($h=90$ cm, $d=2.6$ cm, $V_t=500$ ml). Gel filtration was performed in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4. We collected 50 fractions per 10 ml. The absorbance were detected by UV spectrophotometer (280 nm) and we got 6 peaks as a result. Four of them were on the extreme high level. Proteins for the standardization were: human albumin (MW=67000) and human IgG (MW=150000). We compared their peaks with the eluted by the gel filtration of malignant ascites, and determined the molekular weight of the separated fractions: (1) MW=150000 (gamma globulin), (2) MW=120000, (3) MW=100000, (4) MW=90000, (5) MW=80000 (probable supersion fraction) and (6) MW=67000 (human albumin).

CELULARNI I HUMORALNI IMUNI ODGOVOR KOD ŠTAKORA NOSILACA TUMORA

HABIBOVIĆ SENAD, BAŠIĆ SUBHA, PJANIĆ AIDA

Upoređivane su dvije grupe štakora nosilaca tumora: (A) skupina kod koje se razvio tumor male veličine i (B) skupina kod koje je tumor razvio znatno veću veličinu. Obje grupe životinja su primile istu količinu tumorskih stanica, ali se kod njih razvio različito velik tumor.

Imunološka reaktivnost u skupine A štakora je bila signifikantno jača od skupine B štakora, mjereno sa pet testova: CDC (complement dependent cytotoxicity), CC (cellular cytotoxicity) ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity), TC (total cytotoxicity) i CCs (cellular cytotoxicity + sera). Naša pretpostavka je da je upravo imunološka reaktivnost suprimirala rast tumora.

U reakciji na tumor praktično, svaka komponenta imunog odgovora ima svoj udio u manjoj ili većoj mjeri. Kod imunogeničnijih tumora, najvjerovatnije, veći značaj imaju specifične imunološke reaktivnosti, dok kod manje imunogeničnih, vjerovatno nespecifične reakcije imaju prioritet (1, 9, 17). U specifične imunološke reaktivnosti na tumor spadaju aktivnost NK stanica, makrofaga, K limfocita, aktivnost posredovana limfocitima T i B, te aktivnost posredovana antitijelima uz pomoć komplementa (8, 16, 18). Nespecifične reaktivnosti na tumor obuhvataju: uslove mikrookoline, utjecaj okolnih parenhimskih stanica i strome samog organa u kojem se tumor razvija, faktore iz plazme, manjak kiseonika i drugih hranjivih materija (glukoza, faktori rasta hormoni, itd.) (7, 11, 15). Najveći značaj u reakciji na tumor imaju aktivnosti NK stanica, makrofaga, T limfocita, a znatno manji značaj ima antitijelima posredovana liza tumorskih stanica.

Pored sposobnosti da liziraju tumorske stanice uz dejstvo komplemента ili K limfocita, antitijela mogu imati i »blokadnu« aktivnost, tako što se kao necitotoksična vežu za tumorsku stanicu, s tim što istovremeno

ne vežu i komplement ili K limfocit, ili što kao kompleks antigen-antitijela zauzima Fc receptor na imunološki aktivnoj stanici i omogućuje joj litičku aktivnost. (5)

Materijal i metode

1. ŽIVOTINJE

Korišteno je 13 visokosrodnih štakora soja Wistar Zgr, uzgojenih u štali Medicinskog fakulteta, starosti 2—3 mjeseca. Selekcija po polu nije vršena.

2. TUMOR

Korišten je YAS (YOSHIDA-in ascitični sarkom). Tumorske stanice YAS-a su s. c. injicirane štakorima soja Wistar Zgr. Veličina tumora je mjerena 14 dana, a izražavana je kao površina poprečnog presjeka.

3. SUSPENZIJA TUMORSKIH STANICA

Suspenzija se dobije centrifugiranjem ascitesa (12 min. na 1200 g) štakora nosilaca intraperitonealnog tumora. Tumorske stanice se 2x ispiraju i to prvi put sa ACT-om, a drugi put sa PBS-om i taj se postupak može ponoviti više puta, tj. dok ima eritrocita. Suspenzija stanica se pravi tako da se pomiješaju 3 kapi stanica i 2 ml PBS-a, za CDC, ADCC, TC, CCs reakciju, a 2 kapi stanica i 2 ml PBS-a za CC reakciju. Cijeli postupak se izvodi na hladnom (4°C), a finalne koncentracije iznose: 2×10^7 (za CDC, ADCC, TC, CCs) i 2×10^6 (za CC).

4. LEUKOCITI

Dobijeni su ispiranjem peritonealne šupljine štakora, sa 20 ml PBS-a (fosfatni pufer). Ispirak se centrifugira 12 min. na 2000 g. Postupak ispiranja i centrifugiranja se ponavlja 3x. Nakon posljednjeg centrifugiranja i odlijevanja PBS-a, napravljena je suspenzija od 2×10^6 stanica po mililitru. U toku rada, epruvete se drže na ledu.

5. SERUM

Iz repne vene štakora uzeta je krv. Krv je zatim centrifugirana 12 min. na 2000 g i uzet je supernatant (serum). Endogeni komplement je inaktivisan inkubacijom seruma u vodenom kupatilu 30 min. na 56°C.

6. KOMPLEMENT

Uzeta je suspenzija standardnog pripravka (Imunološki zavod Zagreb) u koncentraciji 2 i. j./50 mikrolitara.

7. CDC—TEST (COMPLEMENT DEPENDENT CYTOTOXICITY)

Test se izvodi tako da se na 0.1 ml suspenzije tumorskih stanica doda 0.1 ml seruma ispitivane životinje i to inkubira 20 min. na 4°C. Zatim se dodaje 0.1 ml komplementa i sve inkubira 60 min. na 37°C. Očitava se postotak mrtvih stanica.

8. CC—TEST (CELLULAR CYTOTOXICITY)

Test se izvodi tako da se tumorske stanice inkubiraju sa leukocitima ispitivane životinje (po 0.1) na 37°C u trajanju 30 min. Očitava se postotak mrtvih stanica.

9. CCs—TEST (CELLULAR CYTOTOXICITY + SERA)

Test se izvodi tako da se tumorske stanice inkubiraju sa leukocitima i serumom ispitivane životinje (sve po 0.1 ml) na 37°C u trajanju 30 min. Očitava se postotak mrtvih stanica.

10. ADCC—TEST (ANTIBODY DEPENDENT CELLULAR CYTOTOXICITY)

Test se izvodi tako da se na tumorske stanice doda serum ispitivane životinje (po 0.1 ml) i inkubira se na 4°C u trajanju 20 min. Zatim se dodaju leukociti normalnih štakora (0.1 ml.) i inkubira se 300 min. na 37 °C. Očitava se postotak mrtvih stanica.

11. TC—TEST (TOTAL CYTOTOXICITY)

Test se izvodi tako da se na tumorske stanice doda serum ispitivane životinje (po 0.1 ml) i inkubira se na 4°C u trajanju 20 min. Zatim se dodaju leukociti normalnih štakora i komplement (po 0.1 ml) te se sve inkubira 300 min. na 37 °C. Očitava se postotak mrtvih stanica.

12. POSTOTAK MRTVIH STANICA

Određuje se tako da se pomiješa 0.05 ml suspenzije stanica sa 0.1 ml 10% razlaženja Tripan plavog, te se pod srednjim uvećanjem mikroskopa u 100 stanica izbrojenih, odmah izračunava broj živih i mrtvih stanica.

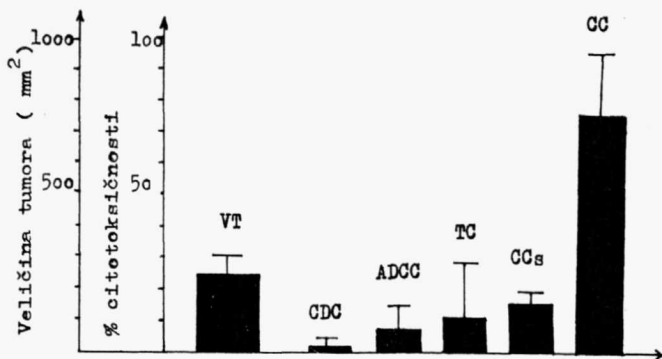
13. STATISTIČKA OBRADA PODATKA

Podaci su obrađivani Studentovim t-testom.

Rezultati

1. TESTOVI IMUNOLOŠKE REAKTIVNOSTI ŠTAKORA ČIJI SU TUMORI RAZVILI MALU VELIČINU

Primijećeno je da se tumori kod štakora razvijaju različitom brzinom. Uočeno je da se štakori, s obzirom na veličinu tumora mjerenu 14-og dana mogu grupisati u dvije skupine. Kod ove skupine štakora (skupina A), je veličina poprečnog presjeka 14-og dana dosegla relativno, malu vrijednost. Uz mjerenje veličine tumora, isti dan su rađeni testovi ćelularne i humoralne imunosti, odnosno citotoksičnosti.

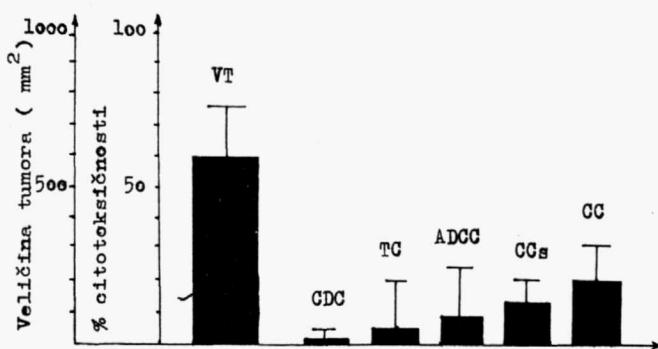


Slika 1 — Veličina tumora (VT) i postotak citotoksičnosti mjeren CDC, ADCC, TC, CCs i CC testovima, kod štakora koji su razvili male tumore.

Sa slike je uočljivo da su štakori razvili tumore male veličine. Također, se vidi da postoji reaktivnost na tumor iz vrijednosti testova citotoksičnosti. Ta reaktivnost je viša od reaktivnosti kontrolne grupe normalnih štakora, čija je vrijednost uzeta kao nulta vrijednost, a predstavljeni rezultati su samo razlika u odnosu na normalne štakore. Najviši postotak citotoksičnosti ima CC test, a zatim slijede CCs, TC, ADCC pa CDC test, poredani po visini. Uočljiv je interesantan fenomen da se dodatkom seruma CC testu njegova vrijednost značajno smanjuje.

2. TESTOVI IMUNOLOŠKE REAKTIVNOSTI ŠTAKORA KOD KOJIH SU SE RAZVILI VELIKI TUMORI

S obzirom da je uočena razlika u veličini tumora kod pojedinačnih štakora, ova je skupina sastavljena od štakora čiji su tumori 14-og dana dosegli veliku vrijednost (skupina B). I kod ove skupine štakora su rađeni testovi celularne i humoralne imunosti, istog dana i na isti način kao u prethodne skupine.



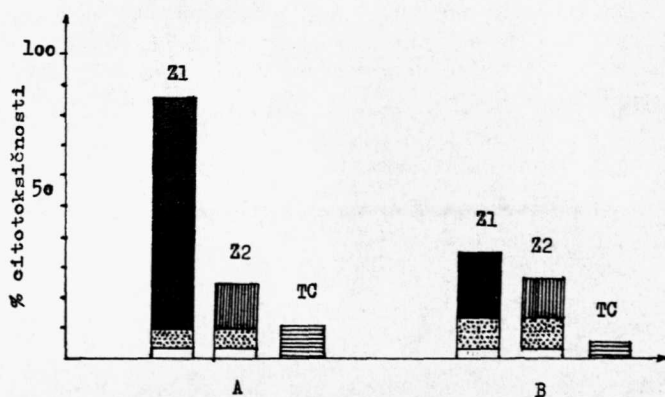
Slika 2 — Veličina tumora (VT) i postotak citotoksičnosti mjeren CDC, TC, ADCC, CCs i CC testovima, kod štakora koji su razvili velike tumore.

Treba primijetiti sa slike 2. da i na ovako veliki tumor postoji imunološka reaktivnost. Ona je najviša u CC testu, a zatim slijede CCs, ADCC, TC pa CDC poredani po visini postotka citotoksičnosti. I kod ove skupine se uočava smanjenje vrijednosti CC testa dodatkom vlastitog seruma.

U poređivanjem vrijednosti CC testa sa Slike 1 i 2 se može primijetiti signifikantno ($p < 0,1$) viša vrijednost CC testa na slici 1. Komparacijom ostalih testova (CDC, CCs, ADCC, TC) ne može se uočiti značajnija razlika.

3. UPOREĐIVANJE ZBIRNIH VRIJEDNOSTI TESTOVA CITOTOKSIČNOSTI

Ukoliko se želi dobiti bolji uvid u ukupnu citotoksičnost tumorskih stanica mogu se testovi citotoksičnosti grupisati na slijedeći način: Zbir₁ (Z₁) sadrži vrijednost CDC, ADCC, CC testova, dok zbir² (Z₂) sadrži vrijednost CDC, ADCC, CCs testova. Zbirove 1 i 2 ima smisla komparirati kako međusobno i među skupovima A i B, tako i sa TC testom (koji bi trebao da najbliže imitira »in vivo« uslove).



Slika 3 - Zbirovi testova citotoksičnosti u skupinama A i B, štakora nosilaca tumora. ■ - CC, ▨ - CCs, ▩ - ADCC, ▧ - TC, □ - CDC.

Sa slike je uočljivo da je u obe skupine štakora zbir₁ (Z₁) viši od zbir₂ (Z₂), a još viši od TC testa iste skupine ($p < 0,1$). Komparirajući zbir skupina A i B uočava se viša vrijednost zbira₁ u skupini A. Između zbirova₂ (Z₂) skupina A i B kao i TC testova navedenih skupina nema značajnijih razlika.

Diskusija

Ovisnost pojave i brzine rasta tumora od prisutnosti i intenziteta imunog odgovora na njega, predstavlja centralno pitanje imunologije tumora (2, 16, 17), pa smo i mi pokušali naći korelaciju brzine rasta Yoshida-inog ascitičnog sarkoma (YAS) i imunog odgovora štakora nosilaca. Citotoksične efekte prema živim tumorskim stanicama ispoljavaju i serum (CDC) i imu-

nokompetentne stanice (ADCC, CC), s tim što kod YAS-a celularni imuni odgovor dominira nad humoralnim. To je inače slučaj kod većine malignih tumora (3, 9).

Upoređujući skupine štakora koji su razvili male (A) i velike (B) tumore, u istom vremenskom intervalu praćenja, jasno se uočava da je imuni odgovor jači u skupini A, nego u skupini B. To se najviše odnosi na citotoksičnost posredovanu stanicama (CC), dok u drugim testovima nema bitne razlike. Pošto su sve životinje dobile istovremeno, istu količinu tumorskih stanica, s. c., i u istim vremenskim intervalima jedne razvile male, a druge velike tumore, a citotoksičnost je višestruko izraženija u prvoj nego u drugoj skupini, možemo izvesti zaključak da je upravo jači imuni odgovor u prvoj skupini bio uzrok usporenog rasta.

Kasnije posmatranje životinja pokazalo je da su na kraju sve razvile smrtonosne tumore, s tim što su one iz skupine B znatno ranije uginule (neprikazani rezultati). To se uklapa u naše nalaze o supresorskoj aktivnosti seruma životinja iz obje skupine (Slika 3.). Naime, ukoliko se imunokompetentnim stanicama koje dokazano ispoljavaju citotoksičnost prema živim tumorskim stanicama (CC), doda serum nosioca tumora (CCs i TC), dolazi do snažne inhibicije celularne citotoksičnosti, što je prisutno i u skupini A i u skupini B. Ovakve inhibitorne aktivnosti seruma nosilaca tumora su poznate od ranije (5, 19) i predstavljaju, možda, ključnu prepreku imunološkom odbacivanju tumora.

Stoga smatramo da bi rad na poništavanju inhibitorne aktivnosti seruma nosilaca malignih tumora, bio možda najbolji pristup imunoterapiji maligniteta, naravno, ne isključujući i ostale terapijske tretmane (hemoterapiju, hirurške zahvate itd.), o čemu se, u posljednje vrijeme, pojavljuju nalazi u literaturi (6, 10, 13), a što će biti i naše opredjeljenje u daljem radu.

LITERATURA

1. Allegretti, N., Andreis, I., Culo, F., Marušić, M., Taradi, M.: *Imunologija*, Školska knjiga Zagreb, 1987.
2. Bier, O. G., Dias da Silva, W., Götze, D., Mota, I.: *Fundamentals of Immunology*, Springer-Verlag New York, 1981.
3. Bröcker, E. B., Zwaldo, G., Hoizman, B., Machner, E., Sorg, C.: Inflammatory cell infiltrates in human melanoma at different stages of tumor progression, *Int J Cancer*, 41:567-567, 1988.
4. Fröhlich, E. D.: *Patofiziologija poremećaji regulatornih mehanizama u organizmu* GRO Prosveta Beograd, 1982.
5. Ferguson, T. A., Ptak, W., Iverson, G. M., Flood, P.: The role of suppression in immunoregulation: in vivo analysis using a monoclonal antibody to a T suppressor factors, *Eur J Immunol*, 18:1179-1185, 1988.
6. Ferguson, T. A., Iverson, G. M.: Development of monoclonal anti-body with specificity to murine T suppressor factor, *J Immunol*, 136:286-2908, 1986.
7. Gamulin, S., Marušić, M., Krvavica, S.: *Patofiziologija*, Yumena Zagreb, 1988.
8. Hamby, C. V., Liao, S-K., Kanamara, T., Ferrone, S.: Immunogenicity of human melanoma-associated antigens defined by murine monoclonal antibodies in allogeneic and xenogeneic hosts, *Cancer Res*, 47:5284-5289, 1987.
9. Young, J. D. E., Liu, C-C.: Multiple mechanisms of lymphocyte-mediated killing, *Immunol Today*, 9:140-144, 1988.
10. Kuchroo, V. K., Hellström, K. E., Hellström, J., Halliday, W. J.: Tumor-specific idiotopes on suppressor factors and suppressor cells revealed by monoclonal anti-idiotopes antibodies, *Cell Immunol*, 104:105-114, 1987.
11. Kuda, T., Yasumoto, K., Yano, T., Nakahshi, H., Sugimachi, K., Nomoto, K.: Role of antitumor activity of alveolar macrophages in lung cancer patients, *Cancer Res*, 47:2199-2202, 1987.
12. Onasaki, T., Tamatani, T., Matshushima, K.: Growth inhibition and augmentation of mouse myeloid leukemic cell line differentiation by interleukin-1, *Cancer Res*, 47:2397-2402, 1987.
13. Pjanić, A.: Pojačanje antiblokade aktivnosti seruma kao novi trend imunoterapije malignih tumora, 1990.
14. Raychaudhuri, S., Saeki, Y., Chen, J-J., Kohler, H.: Analysis of the idiotypic network in tumor, *J Immunol*, 11:3902-2910, 1987.
15. Robbins, S. L.: *Patologijske osnove bolesti*, Školska knjiga Beograd-Zagreb, 1987.
16. Roitt, I. M.: *Temeljna imunologija*, Jugoslovenska medicinska naklada Zagreb, 1989.
17. Stites, P. D., Stobo, J. D., Wels, J. V.: *Osnovna i klinička imunologija*, Savremena administracija Beograd, 1989.
18. Tadžer, I.: *Opšta i specijalna patološka fiziologija*, Medicinska knjiga Beograd-Zagreb, 1986.
19. Takahashi, K., Ono, K., Hirabayashi, Y., Taniguchi, M.: Escape mechanisms of melanoma from immune system by soluble melanoma antigen, *J Immunol*, 9:3244-3248, 1988.
20. Thomassen, M. J., Wiedemann, H. P., Barna, B. P., Farmer, M., Ahmad, M.: Induction of invitro tumoricidal activity in alveolar macrophages and monocytes from patients with lung cancer *Cancer Res*, 48:3949-3953, 1988.

SUMMARY

CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY IN RATS WITH MALIGNANT TUMORS

Habibović Senad, Bašić Subha, Pjanić Aida
Immunology Group, Faculty of Medicine, Banja Luka

We compared two groups of rats with growing tumors: (A) the animals with small tumors, and (B) the animals with large tumors. Both of groups have received the same amount of tumor cells, but they differed in tumor size.

The immunologic reactivity in group A is significantly higher than in group B, measured by five tests: CDC (complement dependent cytotoxicity), CC (cellular cytotoxicity), ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity), TC (total cytotoxicity), and CCs (cellular cytotoxicity + sera). We propose that strong immunologic reactivity is the cause of suppressed tumor growth.

IMUNOLOŠKA REAKTIVNOST ŠTAKORA KOJI SU ODBACILI TUMOR

KONDIĆ ALEKSANDAR, NIKOLIĆ BOŽIDAR, PJANIĆ AIDA

Grupi štakora soja Wistar Zgr smo injicirali 2×10^8 živih tumorskih stanica (Yoshida-inog ascitičnog sarkoma). Pojavila se grupa od 5 životinja koje su odbacile tumorski transplantat. Njihov imunološki odgovor na tumorske antigene praćen je LAI — testom u periodu od 19 dana.

Našli smo zadovoljavajući imunološki odgovor kod životinja nosilaca tumora, u normalnom i vlastitom serumu. Ovi rezultati slijede našu pretpostavku da su tumori odbačeni specifičnom imunološkom reakcijom.

U toku radova pasaže Yoshida-inog ascitičnog sarkoma u Vistar Zgr štakore, povremeno se javljaju životinje kod kojih se tumor ne razvije (vlastita opažanja). Razlozi za to mogu biti višestruki: od nepravilnog injiciranja tumorskog transplantata, neprihvatanja tumorskih stanica u organizmu domaćina zbog nespecifičnih inflamatornih procesa do specifičnog imunološkog odbacivanja tumora (2, 8). U posljednjem slučaju moraju biti prisutni pokazatelji specifičnog imunog odgovora na tumor u organizmu nosioca (15).

Poznato je da serum nosioca tumora djeluje inhibitorno na celularni imuni odgovor, što se definiše kao supresorska ili blokadna aktivnost seruma (1,15). Nasuprot tome, serumi životinja ili ljudi čiji su tumori u cjelosti odstranjeni, ili je došlo do spontanog odbacivanja tumora, ispoljavaju deblokadna svojstva (1,15). To znači da takvi serumi poništavaju inhibitorno dejstvo blokadnih seruma i da pojačavaju celularni imuni odgovor (3,10). Deblokadna svojstva ispoljavaju i serumi životinja koje ne nose tumor, ali su imunizovane blokadnim serumom, što je odraz komplikovane idiotipske mreže u humoralnom imunom odgovoru na tumor (5,13,14).

Materijal i metode

ŽIVOTINJE: U eksperimentu su korišteni štakori soja Wistar Zgr, stari 2—4 mjeseca, bez polne selekcije.

TUMOR: Yoshida—in ascitični sarkom (YAS) je visoko transplantabilan tumor, koji vodi ponijekle od karcinoma jetre i raste i s.c. i i.p.. Mi smo s. e. injicirali 2×10^8 živih stanica YAS-a, u desni bok, što rezultuje razvojem solidnih, dobro ograničenih tumora, koji se lako pipaju ispod kože.

LAI—TEST: LAI—test je »in vitro« metod za ispitivanje celularne imunosti, primjenjiv kod životinja i ljudi. Njime se može ispitivati reaktivnost leukocita na gotovo sve vrste antigena. Metoda je zasnovana na osobini makrofaga da adheriraju za staklenu površinu, a da tu sposobnost gube u kontaktu sa senzibiliziranim limfocitima i odgovarajućim antigenima. Uzrok ove pojave je lučenje limfokina od strane T limfocita (MAF), koji pokreću makrofage, pa se oni više ne lijepe za staklo. Suspenzija leukocita, koja sadrži i limfocite i makrofage, može se dobiti iz periferne krvi, slezene ili peritonealne šupljine. Mi smo koristili najčešće primjenjivani način kod laboratorijskih životinja, tj. iz peritonealne šupljine.

Ukratko, test se izvodi tako da se peritonealne stanice izbroje, inkubiraju sa antigenom i serumom, stave pod staklo hemocitometra i ponovo inkubiraju, izbroje se, pa se isperu neadherirane stanice, da bi se na kraju prebrojale preostale peritonealne stanice, čiji će se broj uporediti sa brojem dobijenim prije pranja. Rezultati se izražavaju kao procenat adheriranih stanica.

Dobijanje peritonealnih stanica

Živim, etrom anestetiziranim životinjama se intraperitonealno ubrizga rastvor fosfatnog pufera (PBS), (10—15 ml), koji sadrži heparin (10 i.j./ml) Kroz istu injekcionu iglu sakupi se peritonealni ispirak u epruvete za centrifugiranje koje se drže na ledu. Nakon centrifugiranja (oko 1000 g 5 min.) izvrši se još jedno ispiranje mediumom (MEM — »Imunološki zavod«, Zagreb). Eventualni zaostaci eritrocita se mogu odstraniti amonijum hloridom (1 ml 0,15 molarnog rastvora), ali kod dobro uzetih peritonealnih ispiraka to nije potrebno. Takođe, radi boljeg prinosa peritonealnih stanica, životinjama se može 2—4 dana prije ispitivanja i.p. injicirati mineralno ulje (1,5 ml rastopljenog parafina), ali mi smo i bez toga imali sasvim dovoljno stanica. Na kraju, leukociti se resuspendiraju u MEM-u tako da bude oko 2×10^7 stanica/ml i čuvaju se na ledu ili u frižideru ($+4^\circ\text{C}$).

Dobijanje antigena

Korišteni su gotovi antigeni YAS-a dobijeni sa Zavoda za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu, a sam postupak pripravljanja antigena je sljedeći: tumorske stanice se homogeniziraju u PBS-u i centrifugiraju 30 min na 1000 g 4°C . Supernatant se odstrani i centrifugira na 10000—20000 g, na 4°C . Supernatant koji sadrži djeliće membrana tumorskih stanica sa antigenima se čuva razdijeljen u male volumene od 0,2 ml na -20°C ili niže. Ukupni proteini ovog tumorskog ekstrakta iznose oko 10 mg/kg (po Follin-ovoj metodi) i potrebno ih je razblažiti prije upotrebe. Step en razblaženja treba odrediti individualno, u vlastitoj laboratoriji, tako da se nađe najmanja koncentracija dovoljna da stimuliše imune leukocite. Mi smo radili sa 50 puta razbalženim antigenom u MEM-u. Veće koncentracije od ove su aktivne u nespecifičnom smislu, tj. toksične.

Izvođenje LAI-testa

U obilježene staklene epruvete stavljamo sljedeće sastojke:

leukociti (0,05 ml) + antigen (0,05 ml) + serum (0,1 ml).
Leukociti su podešeni na koncentraciju od 2×10^7 stanica/ml. Epruvete se zatvaraju i inkubiraju 30 min. na 37°C u vodenom kupatilu, a svakih 5 min. se dobro protresu da bi interakcija između stanica bila što bolja.

Iz svake epruvete se stavi dio sadržaja pod pokrovno stakalce hemocitometra. Hemocitometri se pakuju u petrijevke sa ovlaženim filter papirom i inkubiraju 1 sat na 37°C .

Brojanje stanica

Nakon inkubacije prebroje se sve stanice na 5 leukocitnih polja. Zatim se vrši ispiranje neadheriranih leukocita u kadama sa PBS-om tako što se lagano uroni hemocitometar u tečnost i pusti da se pokrovno stakalce samo skliže. Još dva puta se komorica ispere prostim provlačenjem kroz PBS u čašama i stavlja se novo pokrovno stakalce.

Sada se vrši dugo brojanje preostalih stanica na istim onim poljima na kojima su brojane stanice prije ispiranja.

Istraživanje rezultata

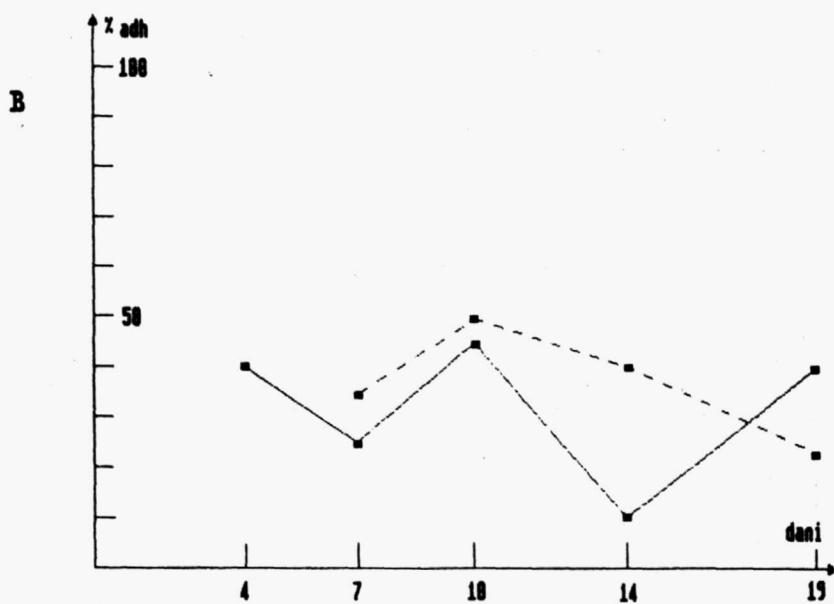
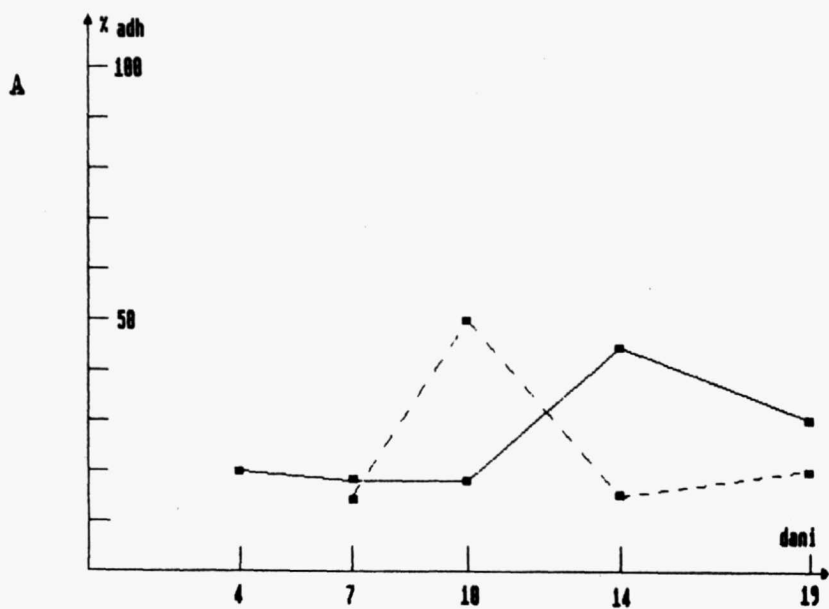
Upoređivanjem zbira brojeva prvog i drugog brojanja dobijamo procenat stanica koje su ostale vezane za staklo komorice nakon ispiranja, odnosno procenat neaktiviranih leukocita koji je obrnuto proporcionalan sa imunološkom reaktivnošću prema određenom antigenu. Znači, što je procenat adheriranih leukocita manji, to je imuni odgovor bolji. Prema Halliday-u, pozitivnim rezultatima smatramo one gdje je adherencija (%) sig-nifikantno različita od odgovarajuće kontrole.

Rezultati

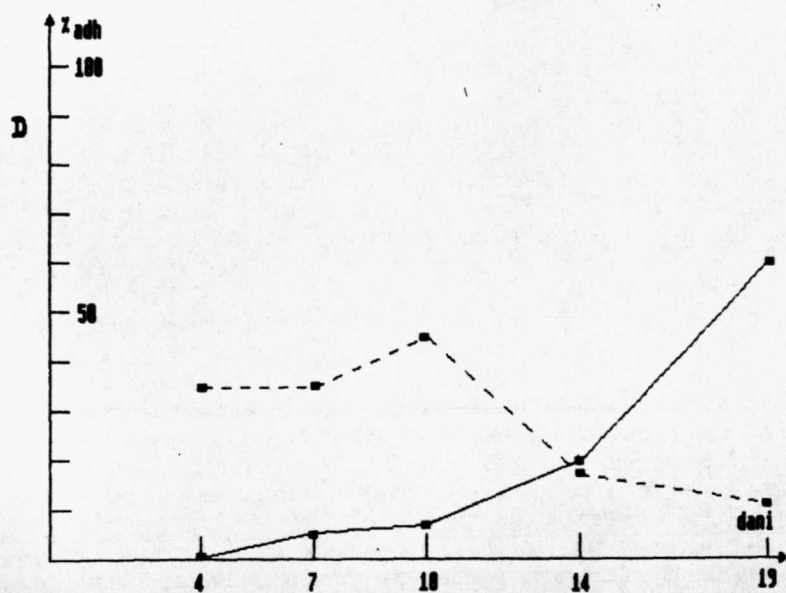
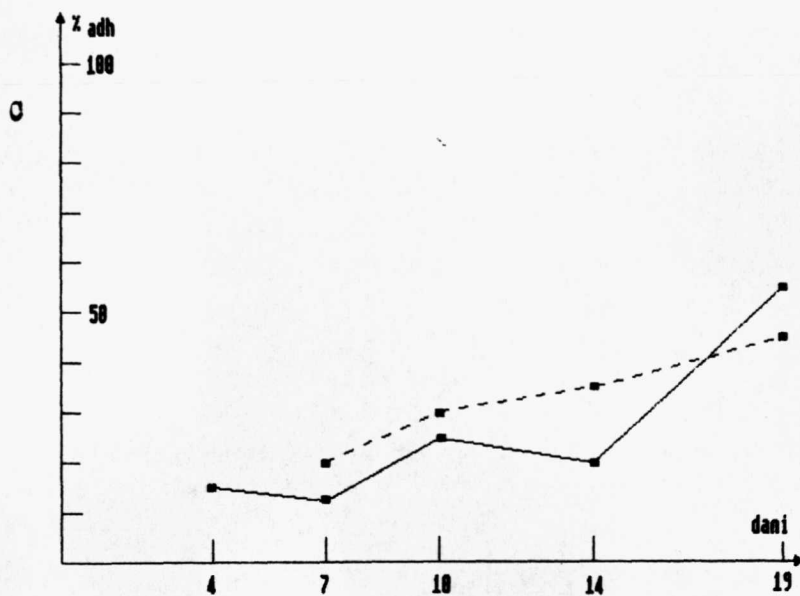
Nakon injiciranja velikog broja životinja sa 2×10^8 živih stanica YAS-a, s.c., pojavilo se 5 životinja čija je imunološka reaktivnost na tumorske antigene bila izuzetno dobra od samog početka (slika 1.). Na te životinje smo posebno obratili pažnju i 19 dana kontinuirano pratili pojavu tumora i imunološku reaktivnost peritonealnih leukocita prema antigenima YAS-a, u normalnom i u vlastitom serumu ispitane životinje.

U svim slučajevima nije došlo do razvoja tumora u cijelom intervalu praćenja, dok su kod ostalih štakora, izuzev onih 5 prikazanih, tumori bili u prosjeku veliki 25×25 mm. Paralelno, imuni odgovor je svih 19 dana izuzetno jak, kako u normalnom, tako i u vlastitom serumu ispitivane životinje.

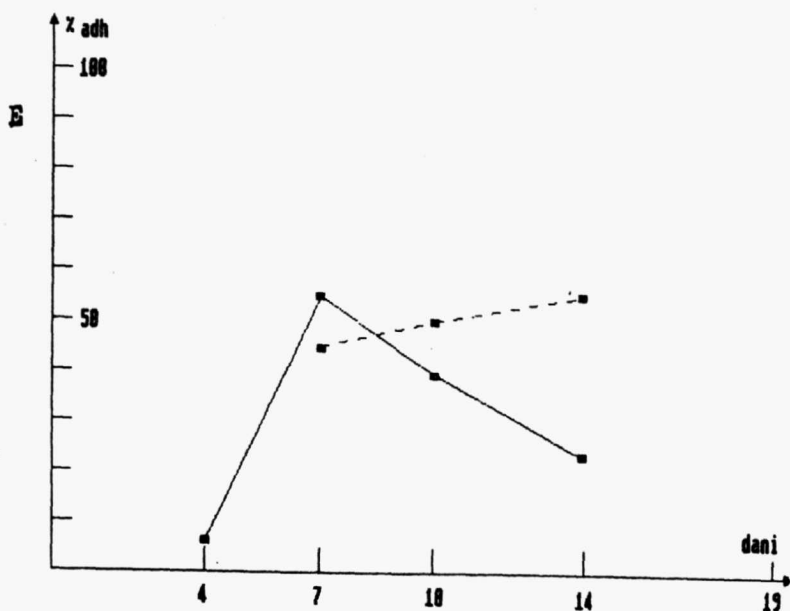
Na pojedinačnim grafikonima je vidljiva osobina vlastitog seruma da pojačava celularni imuni odgovor u poređenju sa serumom normalnih životinja, koji ne utiče na celularni odgovor. Kod životinje broj 4, na samom



Slika 1 — Imunološka reaktivnost, praćena LAI-testom, kod 5 Ńtakora koji su odbacili transplantat Yoshida-inog ascitićnog sarkoma. A, B, C, D i E — Ńivotinje br. 1, 2, 3, 4 i 5).



Slika 1 — Imunološka reaktivnost, praćena LAI-testom, kod 5 űtakora koji su odbacili transplantat Yoshida-inog ascitićnog sarkoma. A, B, C, D i E — űivotinje br. 1, 2, 3, 4 i 5).



Slika 1 — Imunološka reaktivnost, praćena LAI-testom, kod 5 Ńtakora koji su odbacili transplantat Yoshida-inog ascitićnog sarkoma. A, B, C, D i E — Ńivotinje br. 1, 2, 3, 4 i 5].

kraju intervala praćenja, dolazi do inverzije, tj. vlastiti serum inhibira celularni imuni odgovor prisutan u normalnom serumu, Ńto će naknadno biti prokomentarisano.

Diskusija

Jak imuni odgovor kod 5 Ńtakora kod kojih se tumori nisu razvili nakon s.c. injiciranja Ńivih stanica YAS-a, ukazuje na to da su tumori bili odbaceni posredstvom specifićnog imunog odgovora na tumor. Kod Ńivotinja koje razviju tumore, imuni odgovor je slabiji od samog poćetka, a pogotovo sa razvojem tumora sve viŃe slabi (4, 6, 11). Kod Ńivotinja koje smo mi pratili, celularni imuni odgovor je jak u toku cijelog intervala praćenja.

Serum normalnih Ńivotinja utiće na intenzitet celularnog imunog odgovora i on se koristi samo kao izvor svih supstanci neophodnih za odrŃavanje stanica u Ńivotu, u toku izvođenja testa. Poznato je da serumi nosilaca tumora inhibiraju celularni imuni odgovor (11, 12). Serumi Ńtakora koji su odbacili tumorski transplantat ispoljili su, u naŃem istraŃivanju, deblokadna svojstva, jer pojaćavaju imuni odgovor u odnosu na normalni serum. PoŃto se deblokadni serumi inaće mogu dobiti od Ńivotinja koje spontano odbace tumor, to je joŃ jedan dokaz da su Ńivotinje koje smo mi pratili, odbacile tumore posredstvom specifićnog imunog odgovora na njih.

Kod jedne od Ńivotinja (broj 4) primijećena je blokadna aktivnost seruma 19 dana od injiciranja tumorskih stanica. Naknadnim posmatranjem svih Ńivotinja, naŃli smo da je kod te Ńivotinje, nakon 2 mjeseca,

ipak došlo do pojave i razvoja tumora, koji ju je i usmrtio, dok se kod ostale 4 niti nakon 3 mjeseca tumori nisu pojavili. To se slaže sa našim ranijim nalazima da pojava blokadne aktivnosti u serumu »predskazuje« pospješene tumorskog rasta (11, 12, 16).

Imunomodulacijom koja dovodi do razvoja deblokadnih osobina tumora moglo bi se uticati na imunološki sistem individue, u smislu zaštite od razvoja maligniteta. Takođe, možemo pretpostaviti da neki individualni organizmi već imaju prirodno takvu sposobnost, što i jeste osnova njihove osobine da odbacuju tumor, za razliku od onih čiji imunološki sistem nije u stanju da se suprostavi tumorskom rastu (9).

LITERATURA

1. Bier, O. G., Dias da Silva, W., Götze, D., Mota, I.: Fundamentals of Immunology Springer-Verlag New York, 1981.
2. Bröcker, E.B., Zwaldo, G., Holzman, B., Machner, E., Sorg, C.: Inflammatory cell infiltrates in human melanoma at different stages of tumor progression, *Int J Cancer*, 41: 562-567, 1988.
3. Bubenik, J., Indrova, M., Holan, V.: Anti-tumor efficacy of IL-1 and IL-2, *Folia Biol*, 39: 42-47, 1988.
4. Cozzolino, F., Torcia, M., Carossino, A. M., Giordani, R., Selli C., Talini, G., Reali, E., Novelli, A., Pistoia, V., Ferrarini, M.: Characterization of cells from invaded lymph nodes in patients with solid tumors. Lymphokine requirement for tumor-specific lymphoproliferative response, *J Exp Med*, 166: 303-318, 1987.
5. Econom, J. W., McBride, W. H., Essner, R., Rhoades, S., Hoknes, E. C., Morton, D. L.: Tumor Necrosis factor production by IL-2-activated macrophages, *immunol*, 4 : 415-520, 1989.
6. Ferguson, T. A., Iverson, G. M.: Development of monoclonal antibody with specificity to murine T suppressor factor, *J Immunol*, 136: 2896-2908, 1986.
7. Halliday, W. J.: In vitro methods in cell-mediated and tumor immunity, Academic Press, New York, 547-554, 1976.
8. Hamby, C. V., Liao, S-K., Kanamara, T., Ferrone, S.: Immunogenicity of human melanoma-associated antigens defined by murine monoclonal antibodies in allogeneic and xenogeneic hosts, *Cancer Res*, 47: 5284-5289, 1987.
9. Hansen, M. F., Cavenee, W. K.: Genetics of cancer predisposition, *Cancer Res*, 47: 5518-5527, 1987.
10. Henney, C. S.: Interleukin-7: effects on early events in lymphopoiesis, *Immunol Today*, 10: 170-174, 1989.
11. Hoh, K., Pellis, N. R., Balch, C. M.: Monocyte-dependent, serum-borne suppressor precursor of induction of lymphokine-activated killer cells in lymphocytes from melanoma patients, *Cancer Immunol Immunother*, 29: 57-62, 1989.
12. Kuchroo, V. K., Lee, V. K., Hellström, K. E., Hellström, J., Halliday, W. J.: Tumor-specific idiotopes on suppressor factors and suppressor cells revealed by monoclonal anti-idiotope antibodies, *Cell Immunol*, 104: 105-114, 1987.
13. Onazaki, T., Tamatani, T., Hashimoto, T., Matchushima, K.: Growth inhibition and augmentation of mouse myeloid leucemic cell line differentiation by interleukin-1, *Cancer Res*, 47: 2397-2402, 1987.
14. Philip, R.: Cytolysis of tumor necrosis factor (TNF)-resistant tumor targets: differential cytotoxicity of monocytes activated by the interferons, IL-2 and TNF, *J Immunol*, 140: 1345, 1988.
15. Roitt, I. M.: Temeljna imunologija, Jugoslovenska medicinska naklada Zagreb, 1987.
16. Steele, J. K., Stammers, A. T., Levy, J. G.: Preliminary Characterization of human T cell suppressor factor (HTsF) isolated from tinsil cells by monoclonal antibody immunoadsorbence, *J Immunol*, 2: 1201-1206, 1985.

SUMMARY

THE IMMUNOLOGIC REACTIVITY IN RATS WHICH HAVE REJECTED A TUMOR TRANSPLANTATES

Kondić Aleksandar, Nikolić Božidar, Pjanić Aida
Immunology Group, Faculty of Medicine, Banja Luka

The large group of the Wistar Zgr rats has been injected with a 2×10^8 viable tumor cells s. c. of Yoshida's ascytic sarcoma. Among them emerged a group of five animals which rejected a tumor transplantat. Their immune response to the tumor antigens has been monitored by the LAI — test (leucocyte adherentio inhibition — test), within a period of 19 days.

We founded a prominent immunologic response in animals with tumor, as well in normal, as in own serum. These results confirm our presumption that the tumors have been rejected by the influence of the specific immunologic reactivity to the tumor.

IMUNOELEKTROFORETSKO ISPITIVANJE UNAKRSNE REAKTIVNOSTI ŠTAKORSKOG ANTI-HUMANOG SERUMA I PROTEINSKIH FRAKCIJA HUMANOG SERUMA

TUCEK ALMA, PJANIĆ AIDA, VOJČIĆ DRAGICA, SAVIĆ DUBRAVKA

Kompletni štakorski anti-humani serum (KŠAHS) koji je dobijen iz krvi štakora imunizovanih kompletnim humanim serumom (KHS), poslužio nam je kao osnova za ispitivanje proteinskih frakcija (PF) humanog seruma. Iz KHS-a su izolovane sljedeće PF: (1) albumini, (2) γ -globulini i (3) IgG. Identifikacija pojedinih frakcija izvršena je na dva načina: (1) standardnom elektroforezom (upoređivanjem mjesta migracije PF sa KHS-om) i (2) imunoprecipitacionim tehnikama u agaru (1% agar u PBS-u ili Tris-Veronal puferu PH 9): (a) dupla imunodifuzija, (b) radijalna imunodifuzija, (c) imuno elektroforeza (6V/cm, 60 min). U svim slučajevima dobijene su jasne precipitacione linije. Iz KŠAHS-a izolovana je γ -globulinska frakcija, koja je imuno elektroforetski pokazala precipitacione linije protiv svih proteinskih komponenti KHS-a.

Elektroforeza je metoda separacije proteina na osnovu njihove molekulske mase i električnog naboja, uz korištenje jednosmjerne električne struje. Na bazno puferiranoj gel traci, proteini putuju različitom brzinom i zauzimaju različite položaje na njoj. Na osnovu položaja proteinskih linija, može se tačno utvrditi kojoj vrsti proteina pripada uzorak a na osnovu optičke gustine, njihova tačna koncentracija (2, 3, 4, 10).

Imunoprecipitacione tehnike se zasnivaju na reakciji vezivanja antigena i antitijela pri čemu nastaje imuni kompleks, koji usljed svoje veličine ostaje fiksiran na mjestu na kojem je i nastao (4). Kontakt između antigena i antitijela može biti ostvaren običnom difuzijom u agaru, što je osnova imunodifuzionih tehnika, ili može biti ubrzan elektroforetskom silom, što je osnova za imuno elektroforetske tehnike (3, 4). Kada se postigne optimalna koncentracija antigena i antitijela imuni kompleksi se vide

u obliku precipitacionih linija. Ovim metodama se može ispitivati unakrsna reaktivnost između seruma (i/ili njegovih komponenti) i antiseruma proizvedenog na njih (1, 5, 8).

Materijal i metode

1. **Kompletni humani serum (KHS)** dobijen je od zdravih dobrovoljnih davalaca krvi od Zavoda za transfuziju krvi, Banja Luka.

2. **Anti serum (AS) na kompletni humani serum** dobijen je imunizacijom štakora (soj Wistar Zgr) sa KHS-om. Imunizacija je izvršena s. c., na 6 mjesta na tijelu, mješavinom CFA i KHS-a (omjer 1:1, 2 ml po životinji) i 7 dana kasnije mješavinom PBS-a i KHS-a na isti način.

3. **Albumini i γ -globulini humanog seruma (HS)** dobijeni su metodom isoljavanja proteina po Howe-u sa bezvodnim Na-sulfatom, što je detaljno opisano drugdje (5).

4. **γ -globulinska frakcija AS-a** dobijena je metodom isoljavanja proteina po Howe-u.

5. **Humani IgG** dobijen jonoizmjenjivačkom hromatografijom na DEAE-celulozi, što je detaljno opisano drugdje (5).

6. **Komercijalna RID ploča:** Korištena je Nor-Partigen (radijalna imunodifuzijska) ploča, sa umiješanim anti-IgG antitijelima (BEHRING, Marburg).

7. **Standardna elektroforeza:** Izvodi se na aparatu za elektroforezu (CHEMETRON, Italy), semimikro postupkom sa semimikro aplikatorom na Cellogel trakama 5,7 x 14 cm. Korištena je Na-Veronal-Veronal-Tris pufer Ph 9, uz voltažu od 200 V i vrijeme 30 min. Trake su obojene u rastvoru PONCEAU S boje, zatim obojene u 5% sirćetnoj kiselini i očitane na densitometru (560 nm).

8. **Dupla imunodifuzija** je rađena na predmetnim stakalcima preko kojih je u debljini od 2-3 mm nanesen 1% agar u PBS-u. U dva bazena prečnik 5 mm, na međusobnoj udaljenosti od 0,5 do 1 cm, naneseni su antigen i antitijela u količinama od 50 μ l. Nakon inkubacije od 12 h na sobnoj temperaturi posmatra se da li je došlo do stvaranja precipitacione linije između reagujućih komponenti.

9. **Radijalna imunodifuzija** se izvodi po istim propozicijama kao i prethodna metoda s tim što je u 1% agar u PBS-u umiješano 50 μ l antigena. U niz bazena nanesena su rastuća razblaženja antiseruma u PBS-u. Inkubacija kao pod 7).

10. **Imunoelektroforeza:** Na staklenim pločama u debljini od 2 do 3 mm nanosi se 1% agar rastvoren u Na-Veronal-Veronal-Tris puferu Ph 9. Proteini antigena se prvo elektroforetski separiraju (količina uzorka 50 μ l, voltaža 6 V/cm, vrijeme 60 min.). Nakon završene elektroforeze antiserum je u količini od 50 μ l pušten da difunduje kroz prorez (1x50 mm) napravljen paralelno sa smjerom kretanja antigena. Inkubacija kao i kod imunodifuzionih tehnika.

Rezultati

ISPITIVANJE KOMPLETNIH SERUMA I NJIHOVIH FRAKCIJA ELEKTROFORETSKIM I IMUNOPRECIPITACIONIM TEHNIKAMA

1. ELEKTROFOREZA (EF)

1a) EF kompletnih seruma

Kompletni humani serum (KHS) i štakorski anti-humani serum (AS) ispitani su standardnom elektroforezom. Procentualna zastupljenost pojedinih proteinskih frakcija je upoređena sa normalnim vrijednostima (Tabela 1).

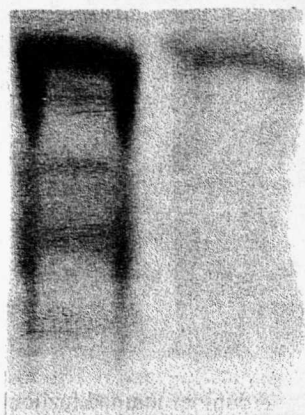
PROTEINI	KHS % ispitivani	KHS % normalne vrijednosti	AS % ispitivani	NSŠ % normalne vrijednosti
albumini	53,9	60,0	33,8	48,0
α 1	8,0	5,0	21,0	17,0
α 2	10,0	8,0	10,0	10,0
β	9,5	10,0	19,0	19,0
γ-globulini	14,5	17,0	16,2	6,0

Tabela 1. Procentualna zastupljenost pojedinih komponenti seruma

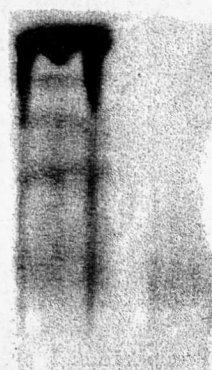
Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 1. vidimo da se procentualna zastupljenost pojedinih proteina kreće u granicama normale, izuzev γ-globulinske frakcije AS-a, jer se radi o hiper imunom serumu.

1b) EF proteinskih frakcija

U cilju određivanja elektroforetske migracije pojedinih izoliranih frakcija, urađena je paralelna elektroforeza pojedine frakcije i seruma iz kojeg je izolirana (Slika 1, 2. i 3).



Slika 1. Mjesto migracije albumina HS-a (a) u poređenju sa KHS-om (b).



Slika 2. Položaj migracije γ-globulinske frakcije (a) u poređenju sa KHS-om (b).

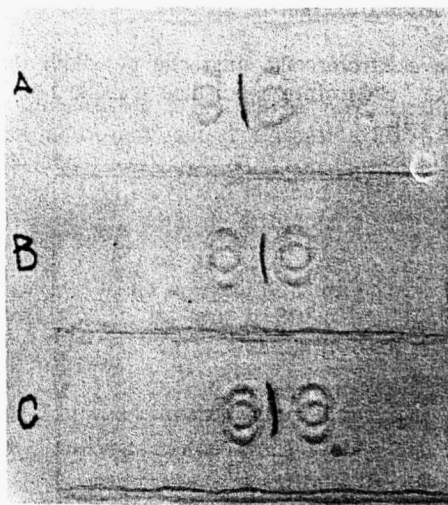


Slika 3. Mjesto migracije Ig-a (a) u odnosu na KHS pod (b)

Izolovani proteini humanog seruma: albumini (Sl. 1a), γ -globulini (Sl. 2a) i IgG (Sl. 3a), pokazali su identična mjesta migracije kao i istoimene komponente prisutne u KHS-u (Slike 1b, 2b i 3b).

2. DUPLA IMUNODIFUZIJA

U prvoj fazi je ispitano postojanje unakrsne reaktivnosti između KHS-a i AS-a (Slika 4a), a zatim antiseruma i proteinskih komponenti humanog seruma: albumina i γ -globulina (slika 4b i 4c).

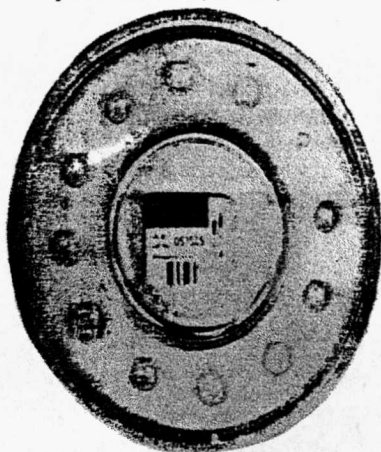


Slika 4. Precipitacione linije u obliku luka nastale duplom imunodifuzijom

U svim slučajevima je došlo do stvaranja precipitacione linije što potvrđuje postojanje unakrsne reaktivnosti (Slika 4a, 4b i 4c). Vidljiva precipitaciona linija između IgG-a i AS-a nije nastala.

3. RADIJALNA IMUNODIFUZIJA

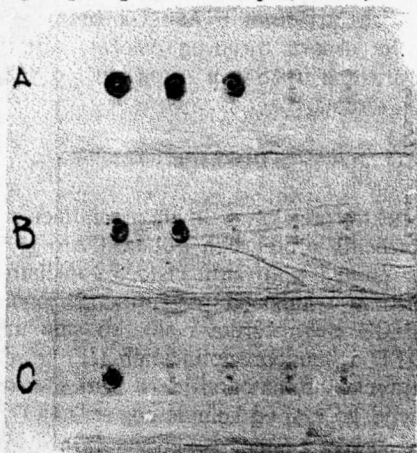
3a) RID na komercijalnoj RID ploči
RID-om sa umiješanim anti-IgG antitijelima ispitivana je unakrsna reaktivnost na IgG koji je izdvojen iz KHS-a (Slika 5).



Slika 5. Kružne precipitacione linije dobijene reakcijom vezivanja IgG-a i anti-IgG-a RID-om

Precipitacione linije su dobijene, što dokazuje da je izolirani protein upravo IgG. Mjerenjem prečnika precipitacione linije koji iznosi 4,6 mm određena je i tačna koncentracija IgG-a, na osnovu standardnog dijagrama. Ona iznosi 5,1 g/l.

3b) RID na pločama vlastite proizvodnje
RID-om je utvrđen titar antitijela na pojedine proteinske frakcije humanog seruma, tako što je posmatrano pri kojem razblaženju AS-a dolazi do stvaranja posljednje vidljive precipitacione linije (Slika 6).

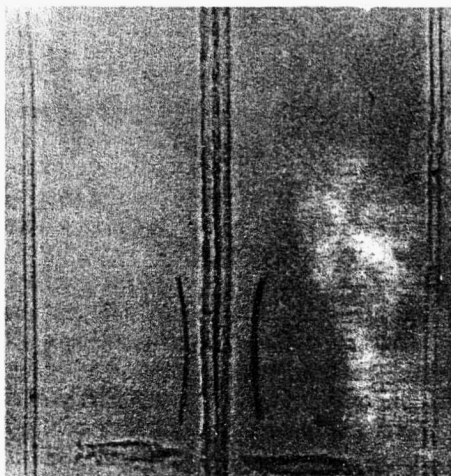


Slika 6. Precipitacione linije dobijene RID-om

Pri razblaženju AS-a od 1:8 stvara se posljednja vidljiva precipitaciona linija, što odgovara titru anti-KHS antitijela (Slika 6a). Titar anti- γ -globulinskih antitijela iznosi 1:4, a anti-albuminskih antitijela 1:2 (Slike 6b i 6c).

4. IMUNOELEKTROFOREZA (IEF)

Imunoelektroforetski je ispitana unakrsna reaktivnost između KHS-a i γ -globulinske frakcije izolovane iz antiseruma.



Slika 7. Precipitaciona linija dobijena imunoelektroforezom

Nakon inkubacije uočena je jedna precipitaciona linija koja je nastala vezivanjem antitijela prisutnih u AS-u sa prethodno separiranim antigenima iz KHS-a. Na osnovu njegovog položaja, utvrđeno je da su se specifična antitijela prisutna u AS-u, u ovom slučaju vezala za γ -globulinsku frakciju humanog seruma.

Diskusija

Kombinacija elektroforetskih i imunoprecipitacionih tehnika se koristi za ispitivanje različitih proteinskih izolata. Često je to jedna od neizostavnih faza u dokazivanju i ispitivanju čistoće pojedinih izolata, dobijenih različitim preparativnim tehnikama (gel-filtracija, jonoizmjenjivačka hromatografija, SDS—PAGE elektroforeza i sl.). Mi smo unakrsno, putem više elektroforetskih (EF) i imunoprecipitacionih (IP) tehnika, ispitali finalni produkt jonoizmjenjivačke hromatografije — čisti humani IgG, i sve faze u toku njegove izolacije, počevši od kompletnog seruma (7,9).

Upotrijebljene tehnike su dale očekivane rezultate. Pri tome, one se razlikuju po svojoj specifičnosti i osjetljivosti. Standardna elektroforeza je osjetljiva za količine uzorka od 1 do 5 μ l i služi kao dobra orijentacija da

li izolirani uzorak zauzima potrebni položaj. Međutim, pošto se proteini separiraju samo prema naelektrisanju i molekulskoj masi, pojedine klase i potklase imuno-globulina je na ovaj način, nemoguće separirati (3,6,7).

Imunoprecipitacione tehnike su visoko specifične, zbog same osobine antitijela da mogu reagovati samo sa odgovarajućim antigenom. Zato, dupla i radijalna imunodifuzija, daju precipitacione linije samo ukoliko je prisutna tražena frakcija (Slike: 4 a, b i c, 5 i 6 a, b i c). Takođe ove tehnike su i kvantitativne, jer se može odrediti titar bilo antigena, bilo antitijela, tj. njihova tačna koncentracija. Nedostaci ovih tehnika su sljedeći: (1) mala osjetljivost, jer je potrebna veća količina reagujućih komponenti, pa je nemoguće otkriti vrlo male koncentracije i (2) nemoguće je utvrditi stepen čistoće ispitivanog izolata, jer sve nečistoće ostaju nevidljive. Ovi nedostaci se mogu nadoknaditi upotrebom dopunskih ispitivanja: a) Osjetljivost IP tehnika je ograničena količinom ispitivanih uzoraka koja daje vidljivu precipitacionu liniju (oko 1 mg). Veću osjetljivost pružaju samo imunoeseji (imunofluorescenca, RIA, ELISA i sl.), i b) IP tehnike koje otkrivaju upravo očekivane nečistoće, takođe mogu povećati kvalitet ispitivanja. U našem postupku dokazivanja čistog IgG-a, izolat nije pokazivao precipitacione linije sa anti-IgA i anti-IgM Nor-Partigen pločama (neprikazani rezultati), pa možemo sa velikom sigurnošću tvrditi da se radi o vrlo čistom pripravku IgG-a (9).

Imunoelektroforeza u agaru (Slika 7.) nije dala očekivane rezultate. Naime, dobijena je samo jedna precipitaciona linija, na -globulinsku frakciju, što je takođe posljedica ograničene osjetljivosti tehnika u agaru (7). Komponente separirane elektroforetski difundirale su u agar, čime je opala koncentracija, pa se optimalan omjer antigena i antitijela neophodan za nastajanje vidljivog precipitata, nije postigao. Ovaj problem se može prevazići upotrebom agaroze umjesto agara, što planiramo u daljem radu.



ELEKTROFORETSKO ODREĐIVANJE VRIJEDNOSTI GAMA- -GLOBULINSKE FRAKCIJE SERUMA ŠTAKORA KOJI SU ODBACILI TUMOR

Hajder Slobodan, Kardum Duško, Pjanić Aida

Većoj skupini štakora soja Wistar Zgr. smo inokulisali po 2×10^{10} ćelija YAS-a (Yoshida-in ascitični sarkom (s. c.) Nakon petnaest dana jedna grupa životinja je odbacila tumore (grupa A), dok ih je druga razvila (grupa B). Kao kontrolu koristili smo skupinu normalnih štakora (grupa C).

Elektroforetskom metodom odredili smo nivoe gama-globulinske frakcije u serumu sve tri skupine štakora.

Nivoi gama-globulinske frakcije u serumu štakora skupine A bili su normalni, dok su u skupini B značajno niži. Dakle, možemo pretpostaviti da je nizak nivo gama-globulinske frakcije kod životinja koje su razvile tumor znak slabog ili iscrpljenog humoralnog imuniteta.

Reakcija organizma na tumorske antigene odvija se u dva pravca: prvi i važniji vid imunog odgovora predstavlja razvoj celularnog imuniteta koji počiva na T limfocitima dok bi drugi vid reaktivnosti bilo stvaranje specifičnog humoralnog imunog odgovora koji se zasniva na B limfocitima, odnosno njihovom razvoju u plazma stanice. (1,2)

Mada navodi literature ne pridaju veliki značaj ovoj vrsti imunološke reakcije u eventualnom savlađivanju neoplazme od strane organizma poznata su dva načina na koji humoralni imuni odgovor može uništiti tumorsku stanicu. Prvi način bio bi vezivanje specifičnog antitijela na antigensko mjesto tumorske stanice a zatim vezivanje i aktivacija komplementa od strane tog istog antitijela što bi na kraju dovelo do lize tumorske stanice (CDC) (3,9). Drugi način bio bi putem ćelijske citotoksičnosti ovisne o antitijelima, gdje bi specifična antitijela predstavljala »most« između tumorske stanice i citotoksičnih T limfocita (ADCC). (6,7,8)

Materijal i metode

1. ŽIVOTINJE: Štakori soja Wistar Zgr. oba spola, starosti 2—3 mjeseca, uzgojeni na Medicinskom fakultetu u Banjoj Luci.
2. TUMOR: Tumorske stanice YAS-a (Yoshida-in ascitični sarkom), visoko transplantabilni tumor koji vodi porijeklo od Ca jetre, raste i i.p. i s.c.
3. SERUM: Izdvojen je iz krvi štakora dobijene zasijecanjem repne vene.
4. ELEKTROFOREZA: Metoda je rađena na aparatu CHEMETRON TANK mod. 2 PAC/5 uz upotrebu semimikro 4P aplikatora, na celogel trakama 14 x 5,5 cm, u Na-veronal puferu pH 9, pri struji od 200 V, a u trajanju od 45 minuta. Bojenje je vršeno u Ponceau-S boji u trajanju od 5 minuta, a odbojavanje u 5% sirćetnoj kiselini. Trake su očitavane na densitometru.
5. STATISTIČKA OBRADA: Student-ovim T testom.

Rezultati

Metodom elektroforeze određivane su vrijednosti gama-globulinske frakcije u serumima štakora soja Wistar Zgr. nosioca s.c. YAS-a, te odgovarajućih zdravih životinja istog soja. Štakori nosioci tumora podijeljeni su na dvije grupe od po 10 životinja, a na osnovu toga da li su razvili ili odbacili s.c. injicirane tumore.

Petnaest dana od datuma injiciranja tumorskih stanica, životinjama je uzet serum i elektroforetski su određene vrijednosti gama-globulinske frakcije serumskih proteina (Tabela 1).

	SKUPINA A	SKUPINA B	SKUPINA C
1.	20	15	16
2.	20	17	19
3.	20	15	20
4.	18	16	19
5.	19	16	18
6.	19	17	21
7.	19	12	22
8.	19	16	22
9.	22	17	19
10.	21	12	18

Tabela 1. Elektroforetske vrijednosti gama-globulinske frakcije pojedinih životinja raspoređenim po skupinama

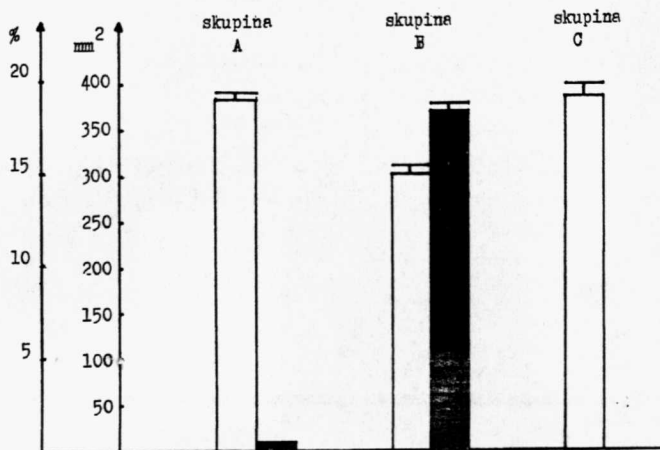
Skupina A — Životinje koje su petnaest dana nakon injiciranja odbacile tumor

Skupina B — Životinje koje su nakon 15 dana razvile tumor

Skupina C — Kontrolna grupa zdravih životinja.

Nakon toga izračunate su prosječne vrijednosti gama-globulina za sve tri skupine, te je određena statistička greška Student-ovim T testom.

Mjerenjem površine poprečnog presjeka, u isto vrijeme kada im je uziman i serum za ispitivanje, određene su veličine tumora kod životinja iz skupina A i B. Izračunate su njihove prosječne vrijednosti i određena je statistička greška. Na kraju je izvršena korelacija vrijednosti gama-globulinske frakcije i veličine tumora u skupinama A i B, što je i grafički prikazano. (Slika 1) Kao uporedna vrijednost dat je nivo gama-globulinske frakcije u skupini zdravih životinja.



Slika 1 — Vrijednosti gama-globulinske frakcije (□) i veličine tumora (■) po skupinama.

Razmatrajući dobivene rezultate vidimo da u skupini A, gdje se nalaze životinje koje su odbacile injicirani tumor, postoje visoke vrijednosti gama-globulinske frakcije ($19,7 \pm 0,35\%$), te da ni jedna od pojedinačnih životinja iz te skupine nije pokazala uočljiv pad gama-globulina u odnosu na skupinu zdravih životinja ($19,4 \pm 0,6\%$). U istoj toj skupini rast tumora pokazao je zanemarljivo malu veličinu ($5,9 \pm 0,3 \text{ mm}^2$) u odnosu na štakore skupine B ($370 \pm 9 \text{ mm}^2$), a kod kojih je, u isto vrijeme kada im je izmjerena ta veličina tumora, nađen signifikantno niži nivo gama-globulinske frakcije ($15,3 \pm 0,5\%$) u odnosu na skupine A i C. Pored toga skupina B je pokazivala i značajnije varijacije u vrijednosti gama-globulinske frakcije mjereno kod pojedinih životinja. (Tabela 1)

Diskusija

Posmatrajući rezultate dobijene u sve tri skupine životinja ono što možemo prvo zapaziti jesu slične vrijednosti gama-globulinske frakcije dobijene u skupinama A i C, odnosno signifikantno niže vrijednosti izmjerene

u grupi B. Znamo da je skupina C u ovom slučaju kontrolna grupa zdravih životinja za razliku od štakora skupine A i B koji su istovremeno bili s.c. injicirani stanicama YAS-a. Nakon injiciranja štakori skupine B progresivno su razvili tumore, a štakori skupine A odbacili.

Mada savremena literatura ne pridaje veliku važnost humoralnom odgovoru na tumor, pa ga čak i optužuje za tzv. fenomen »blokade«, iz sadašnjeg naučnog iskustva je ipak poznato da dobar imunološki odgovor može postojati samo kao kompletan, odnosno uz potpunu saradnju ćelij-skog, humoralnog i nespecifičnog imunog odgovora. (4, 7) Uz to dokazana je i nepobitna činjenica o uticaju humoralnog imuniteta na savlađivanje tumora putem ADCC i RVK. (9, 10)

Uzevši u obzir naprijed navedeno, logično je zaključiti da će organizmi sa boljim humoralnim odgovorom, a uz odgovarajuću celularnu reakciju imati i bolju odbranu od tumora, odnosno da životinje sa slabijim ili iscrpljenim imunim odgovorom neće biti u stanju da adekvatno imunološki reaguju i eliminišu stanice tumora.

Kao potvrdu ovakvih pretpostavki o značaju humoralnog imuniteta u imunološkoj reakciji na tumor bilo bi dobro spomenuti i upotrebu monoklonskih antitijela na poznate tumorske antigene u svrhu imunoterapije. (5, 6)

LITERATURA

1. Allegretti N, Čulo F, Taradi M, Andreis I: *Imunologija*, 1987, Školska knjiga — Zagreb
2. Bier OG, Dias da Silva H, Götze D, Mota I: *Fundamentals of Immunology*, 1981 by Springer-Verlag New York Inc.
3. Gamulin S, Marušić M, Krvavica S: *Patofiziologija*, 1988, Yumena
4. Kuchroo VK, Lee VK, Hellström KE, Hellström J, Halliday WJ: Tumor-specific idiotopes on suppressor factors and suppressor cells revealed by monoclonal anti-idiotope antibodies. *Cell Immunol* 1987, 104: 105-114
5. Masashi M, Toshihiro N, Teruhisa N, Soldano F: Synergistic in vitro and in vivo anti-tumor effect of daunomycin-96-kDa melanoma-associated antigen monoclonal antibody CL 207 conjugate and recombinant IFN-gama γ , 1988, *J. Immunol*
6. Munn DH, Cheung NKV: Interleukin-2 enhancement of monoclonal antibody-mediated cellular cytotoxicity against human melanoma. *Cancer Res* 1987, 47: 6600-6605
7. Raychaudhuri S, Saeki Y, Chen J-J, Kohler H: Analysis of the idiotypic network in tumor immunity. *J Immunol* 1987, 11: 3902-3910
8. Robbins SL: *Patologijske osnove bolesti*, 1974, Medicinska knjiga Beograd — Zagreb
9. Roitt IM.: *Temeljna imunologija*, 1989, Jugoslovenska medicinska naklada, Zagreb
10. Saeki Y, Chen JJ: Characterization of regulatory idiotope-specific T cell clones to a monoclonal anti-idiotypic antibody mimicing a tumor-associated antigen (TAA), *J Immunol* 1989, 3: 1046-1052

SUMMARY

GAMA-GLOBULIN FRACTION IN THE SERUM OF RATS WHICH HAVE REJECTED A TUMORS

Hajder Slobodan, Kardum Duško, Pjanić Aida
Immunology Group, Faculty of Medicine, Banja Luka

Wistar Zgr. rats were inoculated with 2×10^{10} cells of YAS (Yoshida ascitic sarcoma) s. c. After 15 days one group of the animals rejected tumors (group A), while the other one developed the tumors (group B). As a control we used a group of normal rats (group C). Using electrophoretic measurement we investigated the level of the gama-globulin fraction of serum.

The values of gama-globulin fraction in group A are normal, while in the group B are significantly lower.

We can propose that low values of gama-fraction in animals developing tumors might be a sign of weak humoral immunity.



MODIFIKACIJA REAKCIJE VEZANJA KOMPLEMENTA

UNČANIN DRAGAN, PJANIĆ AIDA

Klasična reakcija vezanja komplementa (RVK) služi za određivanje titra antitijela na određeni antigen, uz pomoć danog komplementa i hemolitičkog sistema. Titracijom komplementa kod štakora nosilaca tumora ustanovili smo da se on jako mijenja, što pored titra antitijela bitno utiče na efikasnost humoralnog imunološkog odgovora. Zato smo uveli sljedeću modifikaciju RVK: nismo dodavali komplement, nego smo nakon inkubacije tumorskih antigena i neinaktivisanog seruma nosioca tumora dodali samo hemolitički sistem.

Na taj način smo se daleko više približili »in vivo« situaciji, jer je citoksičnost posredovana ne samo količinom antitijela nego i količinom raspoloživog komplementa u serumu nosioca tumora. Rezultati dobijeni ovom modifikacijom slažu se sa rezultatima dobijenim drugim metodama (CDC, elektroforeza), te je smatramo podesnijom od klasične RVK.

Početak ovog vijeka Bordet i Gengou su otkrili da antitijela IgG i IgM klase, kada se spoje sa odgovarajućim antigenom, formiraju komplekse sposobne da vežu komplement što predstavlja efektorski dio humoralnog odgovora (2). Ovaj pronalazak je poslužio kao osnova za izvođenje reakcije vezanja komplementa (RVK) koja se ukratko izvodi tako što u prvoj fazi pomiješamo adekvatnu količinu antigena, komplementa i ispitivnog seruma. Nakon inkubacije dodaje se hemolitički sistem koji se sastoji od eritrocita ovce i hemolizina. Ukoliko postoje specifična antitijela na dati antigen, komplement će istrošiti u prvoj fazi. Za drugu fazu komplementa neće preostati te eritrociti neće biti hemolizirani. Suprotno tome pojava hemolize označava odsustvo specifičnih antitijela (1).

U početku se RVK koristila samo za dokazivanje sifilisa ali je do danas našla dijagnostičku primjenu u brojnim infektivnim oboljenjima (bakterijskim, virusnim itd.). Korak dalje je predstavljala primjena RVK u određivanju tipova i subtipova mnogih virusa (6).

RVK je našla odgovarajuće mjesto i u tumorskoj imunologiji sa ciljem da otkrije prisustvo specifičnih antitijela na tumorske antigene (3).

Treba naglasiti da količina komplementa ne raste u toku imunološkog odgovora (7). Budući da se on troši, logično je da se pored specifičnih antitijela, kao ograničavajući faktor efikasnosti imunološkog odgovora, javlja i količina prisutnog komplementa, što klasična RVK ne razmatra.

Materijal i metode

1. SERUMI

Izolovani su iz krvi zarezivanjem repne vene, centrifugiranjem 10 min. na 2000 g. Izvor seruma su bili visokorodni štakori soja Wistar Zgr: a) normalni, b) nosioci tumora (2×10^6 tumorskih stanica Yoshida-inog ascitičnog sarkoma injiciranih i.p.), c) imunizovani IgG-om humanim, prema klasičnoj proceduri imunizacije uz dodatak CFA i IFA, što je opisano drugdje (4).

2. ANTIGENI

Korištena su 2 antigena: a) djelići membrane tumorskih stanica YAS-a, koncentracije od 1,8 mg/ml, b) humani IgG dobijen na način opisan drugdje (5), u koncentraciji od 5,1 mg/ml.

3. HEMOLITIČKI SISTEM

Sastoji se od jednakih volumnih jedinica: a) 1% otopine ovčijih eritrocita, b) hemolizina titra 1:2 400.

4. TITRACIJA KOMPLEMENTA

Izvedena je u mikroelisa pločicama. Ispitivani serum je u rastućem razblaženju (do 256), u neaktiviranom obliku (nije inkubiran na 56°C čime je očuvan endogeni komplement) upotrijebljen u količini od 50 μ l. Dodano je 100 μ l hemolitičkog sistema. Inkubacija traje 60 min na 37°C. Pločice se ostave preko noći u frižideru (4°C). Narednog dana se očitavaju rezultati.

5. TITRACIJA ANTIGENA

Izvršena je po principu »šahovske table« u mikroelisa pločicama. Horizontalno su nanošena rastuća razblaženja antigena (do 2 048), a u okomitom smjeru rastuća razblaženja seruma (do 8 128). Nakon inkubacije u vodenom kupatilu (60 min. na 37°C) dodan je hemolitički sistem i izvršena druga inkubacija (60 min. na 37°C). Pločice se ostave preko noći u frižideru i sutradan se očitavaju rezultati. Našli smo da je najpodesnija koncentracija tumorskog antigena 1,8 mg/ml, a IgG-a 5,1 mg/ml.

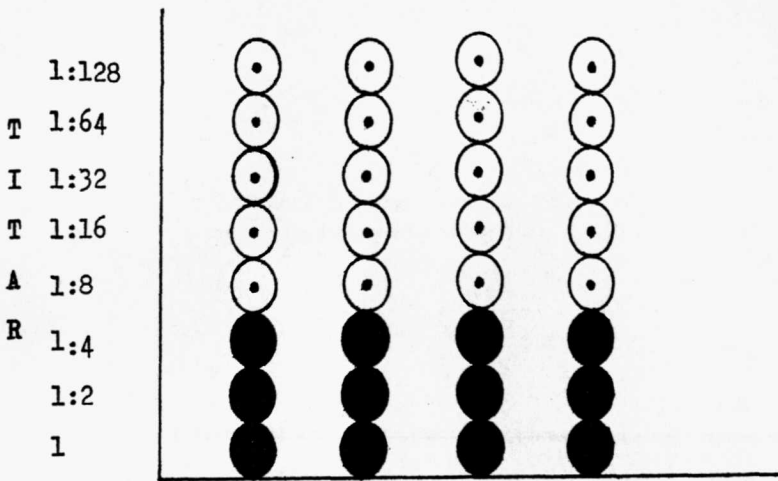
6. MODIFICIRANA RVK

Rastućem razblaženju (od 256) neaktiviranog seruma (50 μ l) se dodaju antigen (50 μ l). Umjesto egzogenog komplementa dodato je 50 μ l fiziološke otopine. Nakon inkubacije (60 min. na 37°C) dodano je 100 μ l hemolitičkog sistema. Sljedeća inkubacija je provedena pod istim uslovima kao i prethodna. Rezultati su očitavani nakon što su pločice prenočile u frižideru na 4°C.

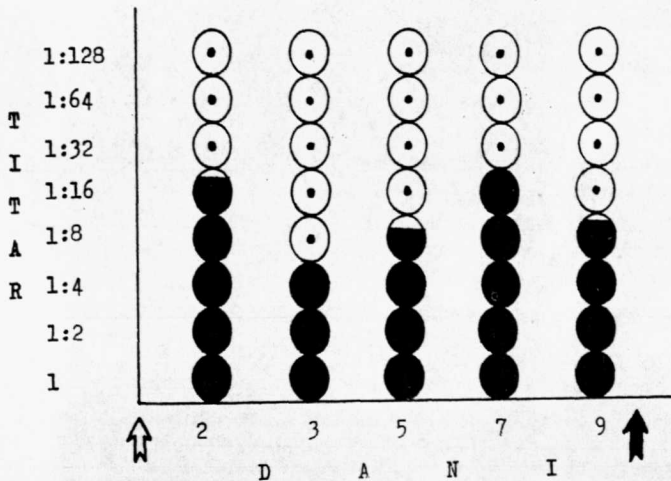
Rezultati

1. AKTIVNOST ENDOGENOG KOMPLEMENTA IZ SERUMA

U klasičnoj RVK serum se inaktivira 30 min. na 37°C, da bi se uništio endogeni komplement, a u reakciju se naknadno dodaje komplement zamorca. Da bismo ispitali aktivnost endogenog komplementa neaktivirani serum je dodan u hemolitički sistem. Preko rastućih razblaženja seruma određen je titar komplementa u normalnom serumu (Slika 1) i serumu štakora nosilaca tumora (Slika 2).



Slika 1. Titracija endogenog komplementa u serumu normalnih štakora



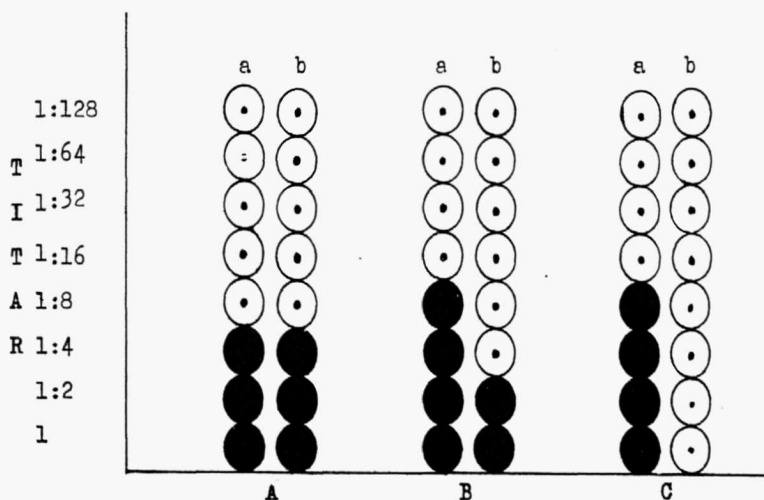
Slika 2. Titracija endogenog komplementa u serumu štakora nosilaca tumora ↑ — dan injeiciranja tumorskih stanica
 ↓ — dan exitusa

Na slici 1 se vidi da je hemoliza prisutna do 3. bunarčića mikroelisa pločice što odgovara titru komplementa od 1:4. Titar komplementa životinja nosilaca tumora se mijenja tokom rasta tumora. U toku cijelog intervala praćenja on je iznad normalnih vrijednosti, izuzev 3. dana. Najveći titar zapažen je 7. dana od injiciranja tumorskih stanica i odgovara titru od 1:16. Bitno je primijetiti da u toku rasta tumora endogeni komplement značajno varira.

2. ISPITIVANJE PRISUSTVA ANTI-TUMORSKIH ANTITIJELA

U predhodnom ispitivanju su u reakciju bili uvedeni samo serum (kao izvor endogenog komplementa) i hemolitički sistem. Sada smo u paralelnom nizu bunarčića uveli u reakciju i antigen. Ispitani su sljedeći serumi:

- (A) normalni serum (a) i normalni serum uz dodatak tumorskih antigena (b),
- (B) serum štakora nosilaca tumora (a) i serum iste životinje uz dodatak tumorskih antigena (b),
- (C) serum štakora imunizovanih humanim IgG-om (a) i serum iste životinje uz dodatak IgG-a kao antigena (b).

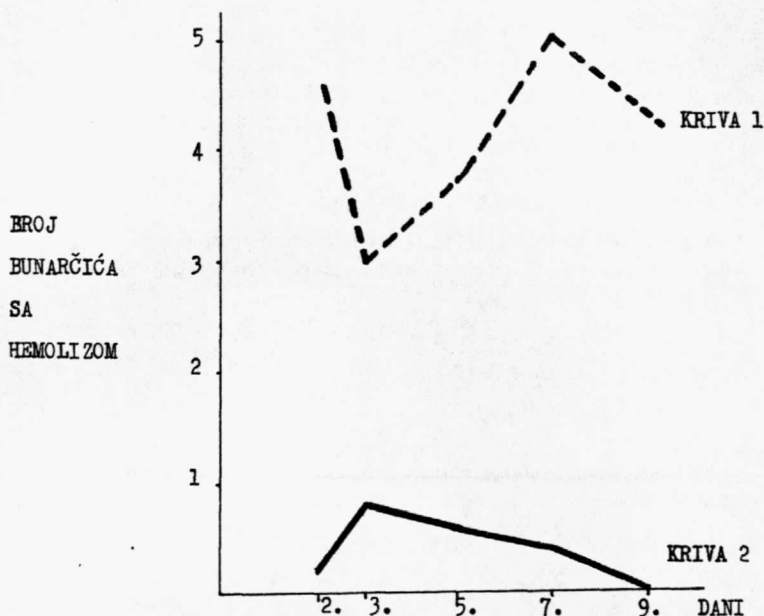


Slika 3—Hemoliza u bunarčićima sa: a) serumom i hemolitičkim sistemom, i b) serumom, hemolitičkim sistemom i antigenom.

Uočava se da serumi koji posjeduju antitijela protiv dodatnih antigena ispoljavaju razlike u mjestu prestanka hemolize pod uticajem endogenog komplementa. Hemoliza ranije prestaje, tj. potencijalno prisutna antitijela se vezuju za antigen, »kupe« komplement, te ga ne preostaje za hemolitički sistem. U serumu štakora imunizovanih humanih IgG-om je razlika između niza bunarčića bez antigena i sa antigenom izraženija nego u serumu nosilaca tumora, što se može povezati sa većim titrom antitijela. Kod normalnih seruma nije ispoljena razlika u mjestu prestanka hemolize između niza bunarčića sa antigenom i bez njega.

3. MODIFICIRANA REAKCIJA VEZANJA KOMPLEMENTA KOD NOSILACA TUMORA U TOKU NJEGOVOG RAZVOJA

Kod životinja nosilaca tumora, paralelno sa praćenjem oboljenja od injiciranja do smrti, svaki drugi dan je u serumu ispitivan: a) titar komplementa i b) titar antitumorskih antitijela modificiranom reakcijom vezanja komplementa. Titar antitumorskih antitijela je određen oduzimanjem broja hemoliza sa antigenom od broja hemoliza bez antigena.



Slika 4—Grafički prikaz kretanja titra komplementa (1) i titra antitumorskih antitijela (2) u toku razvoja tumora.

Uočljivo je da titar antitijela (kriva 2) raste do 3. dana kada doseže najveću vrijednost (0,8) i da nakon toga opada da bi u terminalnoj fazi pao na 0. Takođe se vidi da najvećim dijelom postoji obrnuto proporcionalan odnos između 2 krive. Bitno je naglasiti da titar antitijela određen modificiranom RVK korelira sa tokom oboljenja.

Diskusija

Određivanje titra komplementa čini sastavni dio modificirane RVK. Komplement, koji smo koristili u klasičnoj RVK, je nabavljen od Imunološkog zavoda Zagreb, nije posjedovao očekivanu aktivnost iako je čuvan i doveden u radno stanje po propisanim uputama. Samim tim su rezultati dobijeni posredstvom ovakvog komplementa nepouzdana. Kod modificirane RVK je to izbjegnuto jer je sastavni dio reakcije određivanje titra komplementa.

Čak i da je bio potpuno ispravan egzogeni komplement, klasična RVK ne daje cjelovit uvid u stanje humoralnog imunološkog odgovora jer se njom može odrediti samo titar specifičnih antitijela. Drugi bitan faktor (ako ne i edinčun) za efikasnost humoralnog imunološkog odgovora, komplement, ne tretira.

Modificiranom RVK se može odrediti orijentacioni titar antitijela. Dobijeni rezultati su podudarni sa rezultatima dobijenim drugim metodama (elektroforeza ADCC, itd.), koje pokazuju da je maksimalna produkcija anti-tumorskih antitijela upravo 3. dana od injiciranja tumorskih stanica. Nakon toga imuni odgovor (kako humoralni, tako i celularni) slabi, a tumor progresivno raste. Životinje sa i.p. tumorima koje smo mi pratili do egzitusa (9. dan od injiciranja tumorskih stanica), pokazale su takođe 3. dana maksimalan humoralni odgovor, mjeran modificiranom reakcijom vezanja komplementa (slika 3). Nakon toga titar antitijela i komplementa jako opada. Paralelno rađena elektroforeza i CDC reakcija, daju naknadno još jedan pik 5. dana, ali to ne korelira sa tokom oboljenja (neprikazani rezultati).

Modificirana reakcija vezanja komplementa, dakle, prati oba faktora humoralnog imunološkog odgovora, njihovo prisustvo, odsustvo kao i varijacije. Na taj način je mnogo bliža »in vivo« situaciji. Organizam u borbi protiv stranog agensa ne koristi nikakav egzogeni komplement, kao ni egzogeno antitijelo, nego samo ona koja sam posjeduje. Ishod te borbe ovisi kako o količini antitijela tako i o količini raspoloživog komplementa, i da bi se mogao predvidjeti, neophodno je praćenje oba faktora.

Na osnovu svega izloženog modificiranu reakciju vezanja komplementa smatramo podesnijom od klasične jer mnogo bolje odslkava zbivanja u organizmu.

RVK
tjom
ne i
ent,

Do-
ama
anti-
Na-
mor
zitu-
lana
anja
opa-
edan
iti).
tora
vari-
orbi
gzo-
tako
i se

LITERATURA

1. Allegrotti, N., Andreis, I., Čulo, F., Marušić, M., Taradi M: Imunologija, Školska knjiga, Zagreb, 1987.
2. Bier G. O., Dias da Salva W., Götze D., Mota I.: Fundamentals of Immunology, Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 1980.
3. Harlow E., Lane D.: Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1988.
4. Johnsotne A., Thorpe R.: Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1987.
5. Pletikosa Z., Pjanić A., Gunić E.: Izolacija IgG-a iz humanog seruma na DEAE celulozi, Scripta Medica 1990.
6. Roitt I.: Essential Immunology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988.
7. Stites D. P., Stobo J. D., Wells J. V.: Basic & Clinical Immunology, Appleton & Lange, Norwalk, 1987.

SUMMARY

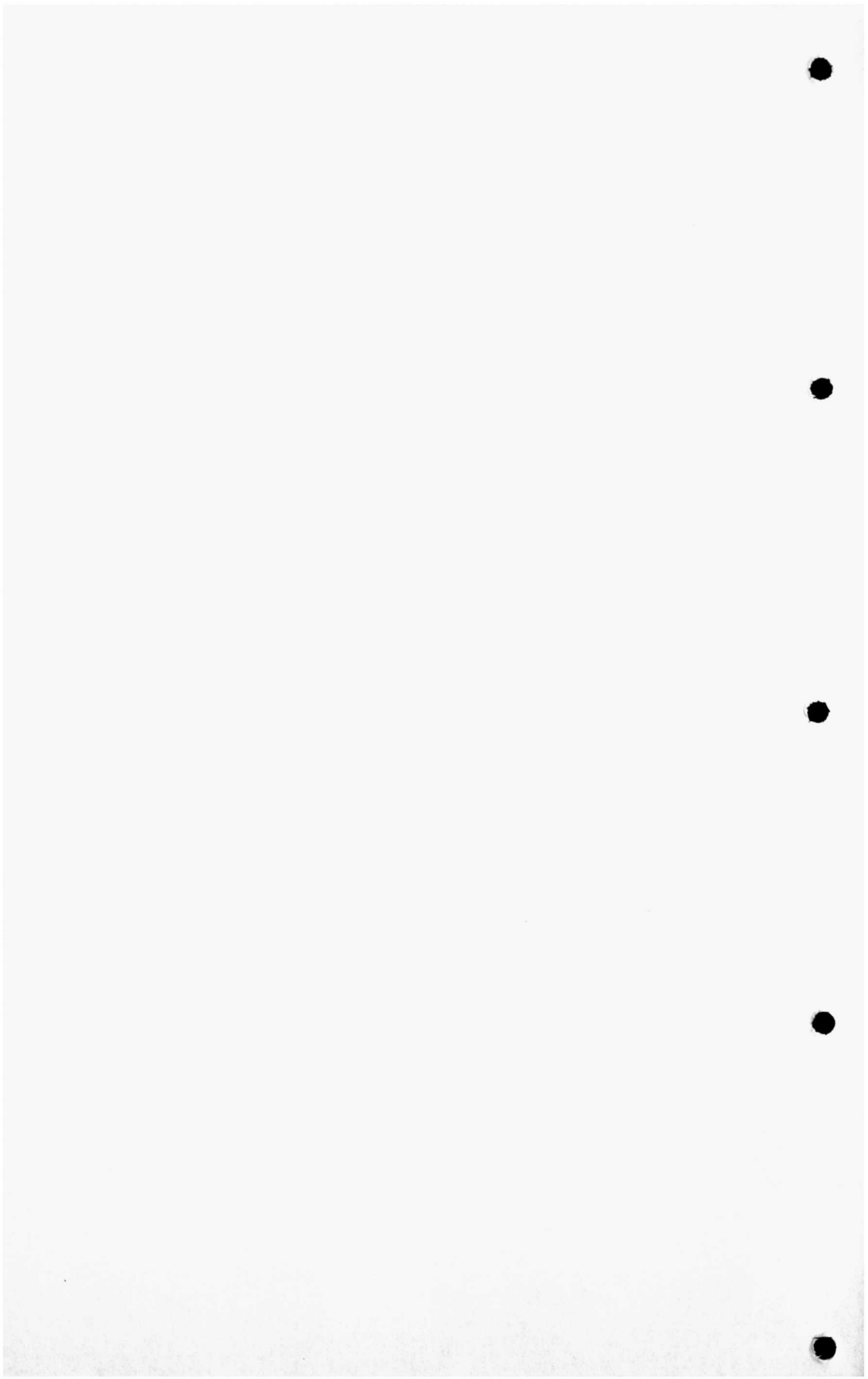
MODIFICATION OF THE COMPLEMENT FIXATION REACTION

Unčanin Dragan, Pjanić Aida
Immunology group, Faculty of Medicine, Banja Luka

Classic COMPLEMENT FIXATION REACTION (CFR) serves for the ordering of a titar antibodies on a given antigen, with a help of the added complement and hemolytical system. We have evaluate that the titar of the complement in rats with growing tumors changes through the disease. Because of that, we introduced the following modification: we did not add compelement in the reaction, than only non-inactivated serum (with endogenous complement). In that case, the antigen-antibody reaction could use only the complement from the tested serum.

With this modification we are closer to the »in vivo« conditions, because the cytotoxicity depends not only of the amount of antibodies than also of the amount of the disposable complement.

Our results agree with the results of the others methods and present status of tumor bearers, better than those obtained with classic CFR. We consider that present modification of CFR is more suitable than obvious assay.



**INTENZITET IMUNOG ODGOVORA PRAĆEN TESTOVIMA
CELULARNE (CC) I HUMORALNE (CDC) CITOTOKSIČNOSTI
POVEZAN JE SA BRZINOM RASTA TUMORA**

BAŠIĆ SUBHA, HABIBOVIĆ SENAD, PJANIĆ AIDA,

U visokosrodne štakore soja Wistar Zgr injicirano je s.c. 2×10^{10} stanica YAS-a (Yoshida-in ascitični sarkom). Površina poprečnog presjeka je praćena 14 dana. Paralelno je praćen i imuni odgovor testovima celularne (CC-cellular cytotoxicity) i humoralne (CDC-complement dependent cytotoxicity) imunosti. Primijećeno je da su vrijednosti CC i CDC testova kod nosilaca tumora više od vrijednosti dobijenih u kontrolnoj skupini normalnih štakora, te da su vrijednosti CC testa znatno više od vrijednosti CDC testa.

Jedna skupina štakora je nakon 14 dana imala tumore veličine $230 \pm 63,8$ mm² (skupina A), a druga tumore veličine 600 ± 161 (skupina B). Upoređivanjem intenziteta imunog odgovora skupina A i B primjećuje se da je imuni odgovor jači u skupini A nego u skupini B i da je celularni imuni odgovor u skupini A signifikantno jači nego u skupini B, iako je svima injiciran isti broj tumorskih stanica. Može se pretpostaviti da individualna imunološka reaktivnost pojedinog štakora određuje veličinu i brzinu razvoja tumora.

Imunološki odgovor na tumor obuhvata čitav spektar reakcija - čavanja do pospješjenja rasta tumora. Taj odgovor se zasniva na postojanju tzv. neoantigena na tumorskim stanicama, a koji se ne nalazi na normalnim stanicama istog tkiva. (10,11)

U imunološki odgovor na tumorske stanice uključeni su nespecifični oblici imunosti i oba oblika specifične imunosti: humoralni i stanični. (2, 5, 9) Stanična imunost uključuje citotoksično djelovanje limfocita T, stanica NK i K, makrofaga, monocita, i dr. polimorfonuklearnih leukocita. (4, 6, 13) Humoralnu imunost čini čitav spektar antitijela raznih razreda koja u dodiru sa površinskim tumorskim antigenima mogu izazvati niz efe-

kata: od potpunog uništenja tumora, pa do pospješivanja rasta tumora promjenom površine koja štiti tumor. (8)

Antitijela koja stvaraju nosilac tumora na rastući tumor ne mogu pružiti djelotvornu reakciju bez istovremene aktivacije T stanica ali mogu pomoći u ograničavanju širenja tumora, ometajući pojavu metastaza (antitijela se u cirkulaciji vezuju na tumorske stanice i uništavaju ih. (2, 12)

Dakle, na postojanje tumorskih stanica u organizmu nosioca se javlja imunološki odgovor, a od intenziteta tog odgovora zavisice dalja sudbina rasta tumora.

Materijal i metode

1. ŽIVOTINJE

Korišteno je 13 visokosrodnih štakora soja Wistar Zgr, uzgojenih u štali Medicinskog fakulteta, starosti 2—3 mjeseca. Selekcija po polu nije vršena.

2. TUMOR

Korišten je YAS (YOSHIDA-in ascitični sarkom). Tumorske stanice YAS-a su s.c. injicirane štakorima soja Wistar Zgr. Veličina tumora je mjerena 14 dana, a izražavana je kao površina poprečnog presjeka.

3. SUSPENZIJA TUMORSKIH STANICA

Suspenzija se dobije centrifugiranjem ascitesa (12 min. na 2000 g.) štakora nosilaca intraperitonealnog tumora. Tumorske stanice se 2x ispiraju i to prvi put sa ACT-om, da se odvoje od eritrocita, a drugi put sa PBS-om, i taj se postupak može ponavljati sve dok ima eritrocita. Suspenzija stanica se pravi tako da se uzimaju 3 kapi stanica i 2 ml PES-a, za CDC reakciju, a 2 kapi stanica i 2 ml PBS-a, za CC reakciju. Cijeli postupak se izvodi na hladnom (4°C), a finalne koncentracije iznose: 2×10^7 (za CDC) i 2×10^6 (za CC).

4. LEUKOCITI

Dobijeni su ispiranjem peritonealne šupljine štakora, sa 20 ml PBS-a (fosfatni pufer). Ispirak se centrifugira 12 min. na 2000 g. Postupak ispiranja i centrifugiranja se ponavlja 3x. Nakon posljednjeg centrifugiranja i odljevanja PBS-a, napravljena je suspenzija od 2×10^6 stanica po mililitru. U toku rada, epruvete se drže na ledu.

5. SERUM

Iz repne vene štakora uzeta je krv. Krv je zatim centrifugirana 12 min. na 2000 g, i uzet je supernatant (serum). Endogeni komplement je inaktivisan inkubacijom seruma u vodenom kupatilu na 56°C u trajanju 30 min.

6. KOMPLEMENT

Uzeta je suspenzija standardnog pripravka (Imunološki zavod Zagreb) u koncentraciji od 2 i. j. /50 mikrolitara.

7. CDC—TEST (COMPLEMENT DEPENDENT CYTOTOXICITY)

Test se izvodi tako da se na 0.1 ml suspenzije tumorskih stanica doda 0.1 ml. seruma ispitivane životinje i to inkubira 20 min. na 4°C. Zatim se dodaje 0.1 ml. komplementa i sve inkubira 60 min. na 37°C. Očitava se postotak mrtvih tumorskih stanica.

8. CC—TEST (CELLULAR CYTOTOXICITY)

Test se izvodi tako da se tumorske stanice inkubiraju sa leukocitima ispitivane životinje (po 0,1 ml) na 37°C u trajanju 30 min. Očitava se postotak mrtvih tumorskih stanica.

9. POSTOTAK MRTVIH TUMORSKIH STANICA

Određuje se tako da se pomiješa 0.05 ml suspenzije stanica sa 0.45 ml 10% razblaženja Tripan plavog, te se pod srednjim uvećanjem mikroskopa u 100 izbrojanih stanica odmah izračunava broj živih i mrtvih stanica.

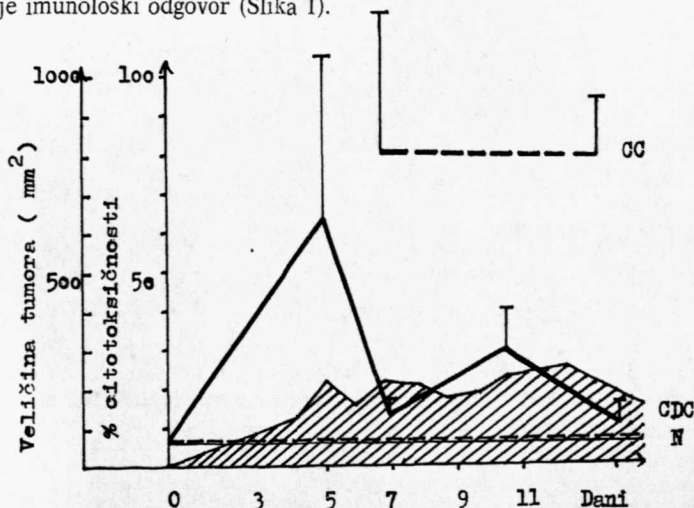
10. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Podaci su obrađeni Student-ovim t-testom.

Rezultati:

1. INTENZITET IMUNOLOŠKE REAKTIVNOSTI I BRZINA RASTA TUMORA KOD ŠTAKORA KOJI SPORO RAZVIJAJU TUMORE

Skupina A predstavlja štakore koji su nakon 14 dana mjerenja razvili tumore površine $230 \pm 63.8 \text{ mm}^2$. Paralelno sa razvojem tumora praćen je imunološki odgovor (Slika 1).

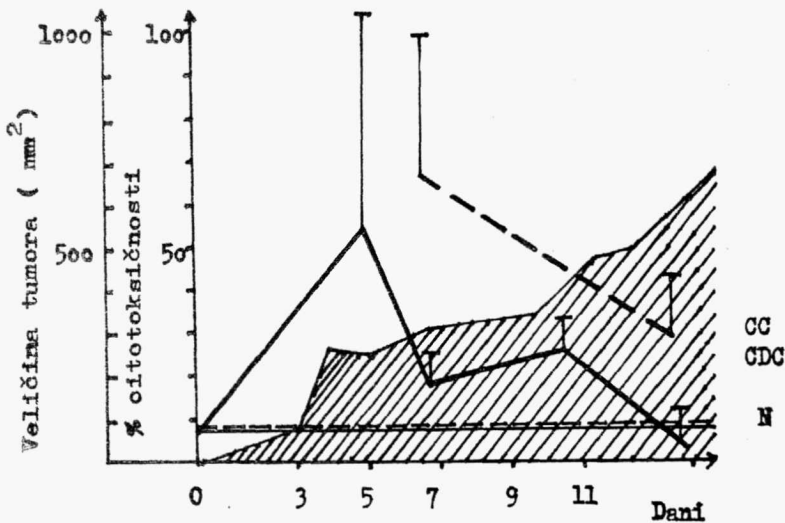


Slika 1 — Veličina tumora i imunološka reaktivnost praćena testovima citotoksičnosti (CC i CDC) u skupini A štakora koji su razvili male tumore. N — normalne životinje.

Analizom vrijednosti testova imunološke citotoksičnosti se vidi da su one znatno više u ovoj skupini u odnosu na reaktivnost normalnih štakora iz kontrolne grupe. Humoralni imuni odgovor praćen preko CDC testa ima najvišu vrijednost 5-og dana, a poslije njegova vrijednost progresivno opada približavajući se vrijednostima reaktivnosti štakora u kontrolnoj skupini normalnih životinja. Vrijednosti celularnog imunog odgovora su cijelo vrijeme izrazito visoke.

2. INTENZITET IMUNOLOŠKE REAKTIVNOSTI I BRZINA RASTA TUMORA KOD ŠTAKORA KOJI BRZO RAZVIJA TUMORE

Skupina B predstavlja štakore koji su nakon 14 dana mjerenja razvili tumore površine $600 \pm 161 \text{ mm}^2$. Paralelno sa razvojem tumora praćen je i imunološki odgovor (Slika 2).



Slika 2 — Veličina tumora i imunološka reaktivnost praćena testovima citotoksičnosti (CC i CDC) u skupini B štakora koji su razvili velike tumore. N — normalne životinje.

Analizom vrijednosti testova imunološke citotoksičnosti i u ovoj skupini se primjećuju više vrijednosti u odnosu na normalnu reaktivnost štakora iz kontrolne skupine. Vrijednosti humoralnog odgovora visoke su 5-og dana, a onda opadaju i bitnije se ne razlikuju u odnosu na skupinu A. Vrijednosti celularnog odgovora su 7-og dana bile izrazito visoke da bi 14 dana bile signifikantno niže ($p \leq 0.05$).

Diskusija

Iz rezultata dobijenih u ovom radu primjećuje se da se na prisutnost tumorskih stanica u organizmu nosioca tumora javlja imuni odgovor, što se vidi komparacijom vrijednosti testova humoralne i celularne imunosti štakora nosilaca tumora sa životinjama iz kontrolne skupine (1, 2). Intenzi-

da
šta-
esta
ivno
sku-
jelo

tet imunog odgovora kod štakora nosilaca tumora u obrnutoj je srazmjeri sa veličinom i brzinom rasta tumora. Skupina štakora koja je razvila male tumore (A) imala je jači imuni odgovor od skupine štakora sa razvijenim velikim tumorima (B), iako su štakorima iz obje skupine injicirane iste doze tumorskih stanica.

STA

zvili
n je

Intenzitet humoralnog imunog odgovora se bitnije ne razlikuje u skupinama A i B (3). Može se primijetiti da je humoralni imuni odgovor djelotvoran samo u početku rasta primarnog tumora, te da sa daljim rastom tumora slabi, i približava se vrijednostima onog u kontrolnoj skupini normalnih štakora. To upućuje na činjenicu da humoralni imuni odgovor samostalno nije u stanju da spriječi razvoj tumora te da je za njegovu aktivnost bitno učešće i dr. faktora imunosti (4, 7, 10).

OC

tovi-
e tu-

ovoj
nost
su
u A.
i 14

nost
što
osti
enzi-

Celularni imuni odgovor (CC) ima dominantniju ulogu u imunološkoj reaktivnosti od humoralnog što je vidljivo kod obje skupine štakora, što se uklapa u rezultate radova drugih autora (11, 13). Nadalje, celularni imuni odgovor bolje korelira sa rastom tumora od humoralnog, tj. pad vrijednosti celularnog odgovora (CC) praćen je porastom veličine tumora i razvojem velikih tumora (Slika 2), a konstantno visoke vrijednosti celularnog odgovora dovode do stagnacije rasta, a zatim opadanja veličine tumora (Slika 1). Naše mišljenje je da bi navedeni rezultati korelacija veličine tumora i imunološke reaktivnosti mogli imati značaj i u humanoj patologiji za praćenje efekata antitumorske terapije te u prognostičke svrhe.

LITERATURA

1. Allegretti, N., Andreis, I., Culo, F., Marušić, M., Taradi, M.: Imunologija, Školska knjiga Zagreb, 1987.
2. Baldwin RW: Specific antitumor immunity and its role in host resistance to tumors. Basic and clinical tumor immunology. Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 1983.
3. Bier, O.G., Dias da Silva, W., Götze, D., Mota, I.: Fundamentals of Immunology, Springer-Verlag New York, 1981.
4. Bröcker, E. B., Zwaldo, G., Holzman, B., Machner, E., Sorg, C.: Inflammatory cell infiltrates in human melanoma at different stages of tumor progression, *Int J Cancer*, 41:562-567, 1988.
5. Gamulin, S., Marušić, M., Krvarica, S.: Patofiziologija, Yumena Zagreb, 1988.
6. Young, J. D. E., Liu, C.—C.: Multiple mechanisms of lymphocytemediated killing, *Immunol Today*, 9:140-144, 1988.
7. Pjanić, A.: Pojačanje antiblokadne aktivnosti seruma kao novi trend imunoterapije malignih tumora. Doktorska disertacija, 1990.
8. Raychaudhuri, S., Saeki, Y., Chen, J—J., Kohler, H.: Analysis of the idiotypic network in tumor immunity, *J Immunol*, 11:3902-2910, 1987.
9. Robbins, S. L.: Patologijske osnove bolesti, Školska knjiga Beograd — Zagreb, 1987.
10. Roitt, I. M.: Temeljna imunologija, Jugoslovenska medicinska naklada Zagreb, 1989.
11. Steits, P. D., Wels, J. V.: Osnovna i klinička imunologia, Savremena administracija Beograd, 1989.
12. Tadžer, I.: Opšta i specijalna patološka fiziologija, Medicinska knjiga Beograd—Zagreb 1986.
13. Thomassen, M. J., Wiadmann, H. P., Barna, B. P. Farmer, M., Ahmad, M.: Induction of in vitro tumoricidal activity in alveolar macrophages and monocytes from patients with lung cancer *Cancer Res*, 48:3949-3953, 1988.

SUMMARY

THE TUMOR GROWTH IS CONNECTED WITH INTENSITY OF THE IMMUNE RESPONSE TO THE TUMOR

Bašić Subha, Habibović Senad, Pjanić Aida
Immunology Group, Faculty of Medicine, Banja Luka

Wistar Zgr rats have been injected with 2×10^{10} cells of Yoshida's ascitic sarcoma s. c.. The size of cross-section area of tumor has been monitored through the 14 days, in parallel with the percentage of cellular (CC) and humoral (CDC) cytotoxicity. The values of CC and CDC in tumor bearers were significantly higher than in control group of normal rats and CC values were higher than CDC values in each animal.

Although, all of the animals received, a same amount of tumor cells, the group A developed, a smaller tumors than group B. We can propose that individual immunologic reactivity in separate animals define the size of, a tumor.

IMUNOLOGIJA PONAŠANJA

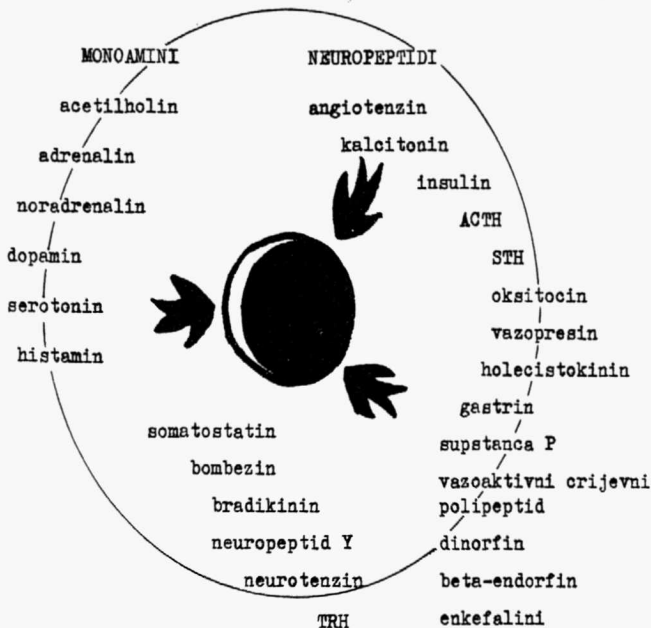
JOVIĆ VLADIMIR, PJANIĆ AIDA

Imuni sistem je samo jedna od komponenti u kompleksnom sistemu živog organizma. Mnoge reakcije unutar njega još nisu razjašnjene. Moderni naučnici pokušavaju da unesu malo više svjetla u neuro-imune komunikacije.

Sve je počelo sa ponašanjem uslovljenim imunim odgovorom: neki uslovni stimulus može izazvati neuslovan odgovor — u ovom slučaju, imuni odgovor. U stvari, postoji mogućnost učenja stimulacije ili inhibicije imunog odgovora, kroz ponavljane oblike ponašanja.

U ovom mini-revizijalnom članku pokušali smo prezentovati najnovija saznanja iz područja imunologije ponašanja.

Do sada je objavljen veliki broj radova u kojima su opisane promjene u imunom sistemu pod dejstvom nervnih i endokrinih funkcija (8). Mehanički komunikacije između tih sistema su dobrim dijelom poznati i zasnivaju se na sposobnosti limfocita da specifično reaguju na veliki broj biološki aktivnih supstanci (sl. 1). Međutim, najznačajniji napor u pokušajima da se pokažu od psihičkih faktora inducirane homeostatske promjene, učinjen je u radovima koji su pokazali mogućnost kondicioniranja, ili uslovljavanja, imunog odgovora.



Slika 1. Limfocitov osjetni svijet

Osnova klasičnog kondicioniranja je sparivanje dva stimulusa, neuslovnog (NS) i uslovnog stimulusa (US). Uslovne draži, kao što su svjetlo ili zvuk, izabrane su jer ne proizvode jasne odgovore, ili proizvode slabe odgovore nevezane za odgovor koji će se kasnije eventualno naučiti. Sa druge strane, neuslovne draži, kao što su hrana ili bolni agens na nozi, izabrani su zato što uvijek izazivaju jasnu reakciju, ili neuslovni odgovor, kao što su salivacija ili povlačenje noge. Razlog što je odgovor nazvan neuslovnim je zato što je urođen; dobijen je pomoću neuslovne draži bez učenja. Kada je US ponavljano praćen sa NS u preciznim vremenskim intervalima, US počinje da izaziva odgovor, nazvan uslovnim odgovorom, koji liči na neuslovni odgovor. US tada postaje signal koji predviđa pojavu NS-a, i životinja odgovara na njega već pripremljena na neuslovni stimulus.

Prvi radovi koji su pokazali mogućnost uslovljavanja imunog odgovora, odnosno primjene klasične Pavlovljeve teorije uslovnih refleksa na, do tada od drugih fizioloških funkcija izolirano promatrane funkcije nervnog sistema, imali su za cilj dokazivanje funkcionalne povezanosti CNS-a i imunog sistema (10). U ovim radovima kao neuslovna draž korišteni su određeni antigeni i modulatori nespecifičnog imuniteta, kao što su, između ostalih, virusi, eritrociti, albumin, konjski serum, paraziti i bakterijske vakcine. Porast titra antitijela izazvan prezentacijom same uslovne draži smatrao se glavnim argumentom u korist teze o direktnom uticaju centralnog nervnog sistema na imunološku reaktivnost. U tabeli 1 sistematizirani su eksperimenti u kojima je korišten ovaj metod, na osnovu tri različite kategorije neuslovnih draži.

Tabela 1. Klasično kondicionirani imuni odgovori.

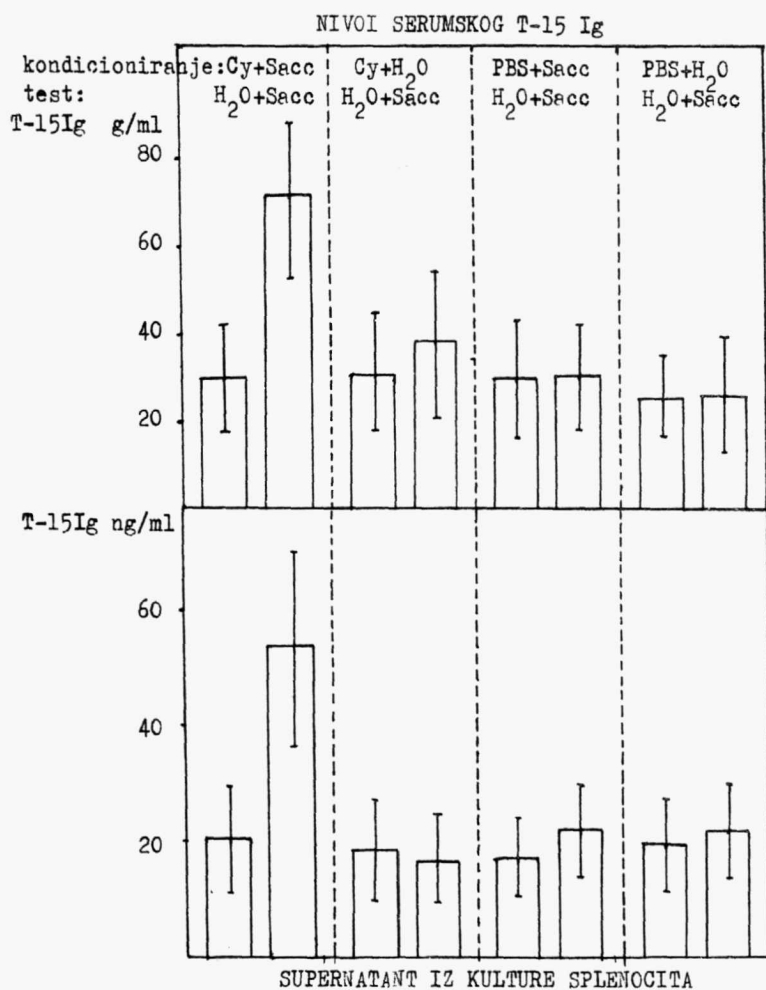
NEUSLOVNA DRAŽ	USLOVLJENI ODGOVOR
A. Aktivatori nespecifičnog imuniteta kao neuslovne draži	
Tapioka	Leukocitoza
Gama globulin	Pojačanje fagocitoze
Poly I:C	Pojačanje NK aktivnosti
B. Antigeni kao neuslovne draži	
V. cholerae	Povećanje titra antitijela
Tifusna vakcina	Povećanje titra antitijela
Virus influence	Povećanje titra antitijela
Ovalbumin	Anafilaktički šok
Alloantigen	Povećanje broja citotoks. limfocita
Kravlji serumski alb.	Otpuštanje histamina
C. Imunomodulirajuće supstance kao neuslovne draži	
Ciklofosfamid	Imunosupresija
Anti-limfocitni serum	Imunosupresija
Ciklofosfamid	Leukopenija
Levamisol	Imunopotencijacija

Najčešće korištena imunomodulatorna supstanca u eksperimentima sa klasično kondicioniranim imunim odgovorom je ciklofosfamid. Usporednim davanjem ciklofosfamida i neke neuslovne draži kao što je aromatiziran rastvor za piće, životinje su sticale uslovne reflekse. Kao rezultat toga, kada bi kondicioniranim životinjama bio prezentiran sam uslovni stimulus (aromatizirana voda), pokazivale bi usporen rast titra antitijela pri imunizaciji ovčijim eritrocitima, što upravo oponaša reakciju na ciklofosfamid. Sa druge strane, kondicionirane životinje kojima nije prezentiran uslovni stimulus i nekondicionirane životinje su kao kontrolne grupe pokazale značajno brži porast titra antitijela (1).

Sličan primjer testa gdje je kao neuslovna draž korišten ciklofosfamid je i oslabljena reakcija odbacivanja kod životinja kojima je prezentiran samo US, a koje su ranije bile kondicionirane paralelnim davanjem ciklofosfamida i aromatiziranog rastvora za piće (3). Intenzitet reakcije je određen mjerenjem težine regionalnih limfnih čvorova i najslabiji je bio kod kondicioniranih životinja kojima je prezentiran uslovni stimulus. Kao što se moglo i očekivati, uzastopno brojno izlaganje životinje uslovnoj draži dovelo je do slabljenja imunosupresivnog odgovora (4).

Odgovor na tumor kod ranije kondicioniranih miševa ispitan je na BALB/c soju sa plazmocitomom koji proizvodi antifosforilholin antitijela sa karakterističnom determinantom identificiranom kao TEPC-15 idiotip (5). Životinje kondicionirane uzastopnim davanjem ciklofosfamida i saharina u vodi za piće, žrtvovane su 10 dana nakon inokulacije tumora, a uzorci seruma testirani na prisustvo imunoglobulina sa TEPC-15 idiotipom. U isto vrijeme napravljena je kultura splenocita i nakon pet dana u supernatantu određena količina TEPC-15 imunoglobulina. Tako su dobijeni tačniji parametri o brzini rasta tumora u odnosu na vrijeme umiranja. Značajne razlike

u sadržaju TEPC-15 imunoglobulina kod kondicioniranih životinja testiranih saharinom, u odnosu na nekondicionirane, prikazane su na slici 2, da bi se, barem na ovom primjeru, stekao utisak o intenzitetu kondicioniranog imunog odgovora.



Slika 2. Nivoi TEPC-15 idiotip pozitivnog imunoglobulina u serumu i kulturi splenocita.

stiranih
a bi se,
og imu-

Sljedeći primjer uslovljavanja imunog odgovora je farmakoterapija sistemskog lupusa u New Zealand miševa koji spontano razvijaju ovu bolest (2). Kod kondicioniranih životinja zamjena aktivnog lijeka uslovnom draži dovela je do odgađanja pojave autoimune bolesti, za razliku od nekondicioniranih životinja kojima je data doza immunosupresivne supstance nedovoljna da izmijeni tok razvoja bolesti. Karakteristično, miševi sa manifestnim simptomima bolesti nisu pokazivali averziju na izmijenjen okus vode za piće, ranije kombinovane sa aplikacijom immunosupresivne supstance, kao što je bio slučaj sa drugim, normalnim životinjama (6). Ovi podaci pokazuju da su životinje sposobne osjetiti imunološke poremećaje, i da se to odražava na njihovo ponašanje, čime se pokušava popraviti homeostatski disbalans. Međutim, najveći nedostatak ovog modela je nemogućnost da se vremenski i imunološki definiše neuslovni odgovor, usljed opšte citotoksičnosti i sporednih dejstava ciklofosfamida, te je veoma teško govoriti o specifičnim posljedicama njegove administracije i uslovljavanja immunosupresivnog odgovora.

Umjesto ciklofosfamida su se, kao neuslovne draži, koristile i druge immunomodulatorne supstance, kao što su antilimfocitni serum (9) i levamizol (7), pošto imaju specifičnije dejstvo na imuni sistem. Međutim, njihovo dejstvo je dugotrajno i može imati trajne efekte na imuni sistem.

Kao zaključak može se reći da se pravi značaj ovih eksperimenata još uvijek ne može predvidjeti, ali je sigurno da oni ukazuju na najmanje tri važne činjenice na koje treba obratiti pažnju prilikom daljih istraživanja. Kao prvo, ovi eksperimenti ukazuju na jasnu funkcionalnu vezu između centralnog nervnog sistema i imunog sistema, bez obzira na fiziološku osnovu te komunikacije. Dalje, upućuju na činjenicu da imunološki eksperimenti in vitro ispituju imune funkcije organizma izolovane od uticaja nervnog sistema i uopšte živog tkiva u kojem su komponente imunog sistema konstantno pod uticajem različitih i još nedovoljno poznatih faktora. I konačno, radovi koji ukazuju na povezanost visoko složenih kortikalnih funkcija kao što je učenje kod životinja, i za opstanak esencijalno važnih fizioloških sistema kao što je imuni sistem, možda u daljem radu mogu dati odgovor na pitanje kako kompleksni faktori socijalne sredine i psihičkog života čovjeka mogu uticati na integritet i opstanak individue.

umu i

LITERATURA

1. Ader, R. and Cohen, N. (1975) *Psychosom. Med.* 37, 333-340.
2. Ader, R. and Cohen, N. (1982) *Science* 215, 1534-1536.
3. Bovbjerg, D., Ader, R. and Cohen, N. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 583-585.
4. Bovbjerg, D., Ader, R. and Cohen, N. (1984) *J. Immunol.* 132, 111-113.
5. Gorczyński, R. M., Kennedy, M. and Ciampi, A. (1985) *J. Immunol.* 134, 4261-4266.
6. Grota, L. J., Ader, R., and Cohen, N. (1987) *Brain Behav. Immun.* 1, 238-250.
7. Husband, A. J., King, M. G. and Brown, R. (1986) *Immunol. Lett.* 14, 91-94.
8. Janković, B. D. (1989) *Imunol. Lett.* 21, 101-118.
9. Kusnecov, A. R., Sivyer, M., King, M. G., Husband, A. J., Cripps, A. W. and Clancy, R. L. (1983) *J. Immunol.* 130, 2117-2120.
10. Metalnikov, S. and Chorine, V. (1926) *Ann. Inst. Pasteur* 40, 893-900.

SUMMARY

BEHAVIORAL IMMUNOLOGY

Jović Vladimir, Pjanić Aida
Immunology group, Faculty of Medicine Banja Luka

The immune system is only one of the components in the organised system of the living being. Many relationships which make the system possible, are unknown. The modern scientist are trying to look inside the neuro-immune communications.

Everything started with the behaviorally conditioned immune response: one conditioned stimulus can provoke one unconditioned response; in this case, one immune response. In fact, we can learn to stimulate or inhibit our immune responsiveness through repeated behavioral reactions.

In this mini-review we will present recent studies from this field of research.

**PREGLEDNI ČLANAK
REVIEW ARTICLE**

IMUNOTERAPIJA MALIGNIH TUMORA UZ POMOĆ VIRUSA

TUR DRAGAN, MIŠKOVIĆ IVICA, PJANIĆ AIDA

Imunoterapija malignih oboljenja je naučna i klinička disciplina koja se naglo razvija u posljednje vrijeme. Koriste se razne metode da se poveća imuni odgovor na tumor. Mnoge od njih su klinički testirane i neke daju veoma dobre rezultate.

U posljednjih par godina pojavio se novi oblik imunoterapije malignih tumora, uz pomoć virusa. Neke vrste virusa injiciranjem direktno u tumorsku masu ili u okolinu tumora, modificiraju tumorske antigene. Koristeći ovaj postupak tumorske ćelije postaju bolje prepoznatljive za imunološki sistem.

Imunoterapijski postupci

Svrha svih imunoterapijskih postupaka je potenciranje imunog odgovora na tumor. Postoji više imunoterapijskih postupaka i još uvijek se istražuju nove mogućnosti. Imunoterapija se može primijeniti u preventivne svrhe, zatim kod razvijenih i metastatskih tumora i kao dodatna terapija u kombinaciji sa drugim terapijskim postupcima. Većina ispitivanja vrši se na eksperimentalnim životinjama ali raste i broj pozitivnih efekata dobijenih kod bolesnika sa malignim tumorima.

U osnovi imunoterapijski postupci su sljedeći: terapija »in vitro« kultivisanim imunim stanicama, tumorskim antigenima, antitijelima, zatim citokinima, imunostimulansima, postupcima koji umanjuju supresiju u imunom odgovoru te kombinacijama ovih pojedinih postupaka.

U posljednjih par godina pojavio se novi oblik imunoterapije virusima.

Svi postupci imaju za cilj pojačanje specifičnog imunog odgovora na tumor.

Potencijalni mehanizmi djelovanja

Princip imunoterapije pacijenata oboljelih od malignih tumora baziran je na činjenici da su tumor asocirani antigeni (TAA) imunogenični odnosno da induciraju imuni odgovor protiv tumorskih ćelija. TAA specifični imuni

odgovor može biti uvećan različitim tipovima antigena koji modificiraju tumorske ćelije. Jedan od mogućih modifikatora je virus.

Shimizu i saradnici (1) smatraju da virus djeluje kao pomoćni antigen proizvedeći T helper (Th) limfocitnu aktivnost koja će dovesti do povećanja TAA induciranog (anti TAA) B limfocitnog odgovora kao i aktivnosti citotoksičnih limfocita (CTL). Koristeći ovaj mehanizam stvorili su tumor specifični imunoprotektivni model. Ukratko, inokulacijom živih virusa inducira se stvaranje Th limfocita specifičnih za virus. Ponovnom imunizacijom sa virusom inficiranim (modificiranom) singeničnim tumorskim ćelijama indukuje se povećana tumor specifična otpornost saradnjom između Th limfocita specifičnih za virus i tumor specifičnih efektorskih ćelija.

Hoegen i saradnici (2) su pokazali da jednokratna vakcinacija sa virus modificiranim tumorskim ćelijama zaštićuje miševе sa metastazama singeničnog tumora dok je vakcinacija samo sa tumorskim ćelijama neefikasna. Ovaj podatak ukazuje na mehanizam neovisan o preimunizaciji virusom. Dokazali su (pod svojim eksperimentalnim uslovima) da virus specifični CTL nisu bili inducirani. Umjesto njih djelovali su TAA specifični CTL-i. Pretpostavljaju da se nelitički virus adsorbuje na površinu ćelije, inficira ćeliju i replicira se u njoj. Na taj način ispoljeni virusni antigeni na površini ćelije mogu olakšati vezivanje susjednih TAA na efektorske T limfocite sa nisko afinitetnim receptorima. Moguće je i da enzimska aktivnost virusne neuraminidaze može otkriti antigenske komponente na tumorskoj ćeliji ili da virusima inducirani neoantigeni na površini ćelije mogu stimulisati Th limfocite da pomognu efektorskim T limfocitima u prepoznavanju određenih antigenih determinanti kao što su TAA.

Neki virusi imaju onkolitičku aktivnost zahvaljujući razmnožavanju u tumorskim ćelijama. Kliničke eksperimente sa ovakvim virusima (neki od njih su štetni za ljude) na pacijentima sa uznapredovalim tumorima vršio je Asada sa saradnicima (3). Njegovi ogledi su imali težište na direktnoj onkolitičkoj aktivnosti virusa pa imuni odgovor pacijenata nije bio jasan.

Očigledno je da svi aspekti ovog problema još nisu sagledani i da su potencijalni mehanizmi još uvijek — potencijalni.

Klinička primjena imunoterapije virusima

Wallock i saradnici (4) su kliničkim ispitivanjem utvrdili mogućnost imunoterapijske primjene virusom modificiranih tumorskih ćelija kod pacijenata sa melanomom. Postupak je povećao tumor specifični imuni odgovor. Modifikaciju tumorskih ćelija su radili »in vitro«.

Shimizu je došao na ideju da pokuša »in situ« modificirati tumorske stance jednostavnim injiciranjem virusa u neposrednu okolinu ili direktno u tumorsku masu.

Za rad je izabrao virus parotitisa (mumps virus — MV) zbog dokazane sigurnosti njegove kliničke primjene (3).

Prethodno je pokazano (1) da imunizacija miša sa živim vakcinija virusom (VV) i kasnija imunizacija sa VV-modificiranim singeničnim tumorskim ćelijama povećava stvaranje tumor specifične imunosti saradnjom između VV-specifičnih Th limfocita i tumor specifičnih efektorskih ćelija.

Osim toga, Nakayama (5) je pokazao da imunizacija ljudi sa MV može izazvati produkciju interferona α i γ od strane B i T limfocita.

nizaci
predo
rvikal
ušlo
keijoi
lokal
bliže
klinič
znaci
podno
lidne
pacije
dnih
Sa di
njem
čnost

minar
da je
sman
radov
kod 1
dalja
provj

perife
MV t

Pacij

H.

K.

M.

H.

K.

T.

H.

F.

A.

T.

M.

K.

Tabel

* U t

Ove dvije činjenice su navele autora na zaključak o neophodnosti imunizacije pacijenata MV-om prije terapije. Dvadeset dvije pacijentice sa uznapredovalim ginekološkim karcinomima (12 ovarijalnih karcinoma i 10 cervikalnih karcinoma) rezistentnim na konvencionalnu citotoksičnu terapiju ušlo je u ovo istraživanje. Sve su prvo bile senzibilizirane subkutanom injekcijom male doze MV. Terapija se sastojala od ponavljanih injiciranja MV-a lokalno i sistemski. Kod ograničenih tumora MV su davani što je moguće bliže malignoj leziji. Reagovanje na MV terapiju je ocjenjivano promjenom kliničkih parametara, kao što su tumorski markeri, citološki nalazi, klinički znaci i subjektivne tegobe*. Neželjeni efekti MV terapije su bili blagi i podnošljivi, najčešće temperatura koja se lako snižavala antipireticima. Solidne tumorske lezije nisu dobro reagovale na MV terapiju, ali je kod pet pacijentica postignuto stabilno stanje. Izostanak dramatičnog odgovora solidnih tumora možda zavisi od terminalnog stanja bolesti (prevelike lezije). Sa druge strane, maligni izlivi su bili dobro kontrolirani lokalnim injiciranjem MV nakon senzibilizacije. Kod pet od sedam pacijentica pleuralna tečnost ili ascites su se potpuno povukli i nisu se više javljali.

Imunološki mehanizam MV terapije kod ljudi ostaje nejasan. Preliminarna analiza limfocita iz periferne krvi jedne od pacijentica pokazala je da je OKT4 T limfocitna populacija povećana, a OKT8 T limfocitna populacija smanjena. Ovo se slučajno poklapa sa rezultatima dobijenim u prijašnjim radovima Shimizua i saradnika gdje su korišteni virus ovisni Th limfociti kod miševa (1). Bila Th aktivnost specifično povećana ili ne, potrebna je dalja analiza pacijenata koji primaju MV imunoterapiju. Takođe se treba provjeriti potreba prethodnog senzibiliziranja pacijenata.

Ovi ohrabrujući klinički rezultati i preliminarna analiza limfocita iz periferne krvi jedne od pacijentica trebalo bi da podstaknu dalje razvijanje MV terapije na pacijentima oboljelim od tumora.

Pacijent	Starost	Stadij	Reagovanje na MV ter.	Preživljavanje u mjesecima
H. M.	57	IV	Da	15
K. Y.	62	R	Ne	3
M. I.	61	R	Da	19
H. K.	45	III	Neodr.	> 40
K. K.	58	III → R	Da	> 39
T. M.	49	IV	Da	8
H. S.	56	IV	Neodr.	> 4
F. S.	52	IV	Da	> 17
A. S.	57	IV	Ne	> 3
T. M.	53	III	Da	> 39
M. K.	27	III	Da	> 19
K. S.	38	II → R	Ne	> 3

Tabela I: Pacijenti sa ovarijalnim tumorima koji su primali MV terapiju

* U tabelama I i II su prikazani svi slučajevi pojedinačno

Pacijent	Starost	(FIGO) Stadij	Reagovanje na MV ter.	Preživljavanje u mjesecima
A. W.	47	Ib → R	Neodr.	6
T. M.	64	Ib → R	Neodr.	> 2
M. Y.	58	Ib → R	Neodr.	> 3
H. S.	66	Ib → R	Ne	3
Y. S.	49	IVb	Ne	5
E. N.	35	Ib → R	Da	> 10
K. M.	40	Ib → R	Da	> 30
C. N.	55	Ib → R	Da	> 18
F. K.	50	Ib	Da	> 10
N. N.	46	Ib → R	Neodr.	> 8

Tabela II: Pacijenti sa cervikalnim tumorima koji su primali MV terapiju

LITERATURA:

1. Asada T.: Treatment of human cancer with mumps virus, *Cancer* 1974, 34: 1907-1928.
2. Hoegen P., Weber E., Schirmacher V.: Modification of tumor cells by a low dose of Newcastle Disease Virus, *Eur. J. Immunol.* 18: 1159-1166, 1988.
3. Nakayama T.: Immune-specific production of gamma interferon in human lymphocyte cultures in response to mumps virus, *Cancer Immunology Immunotherapy*, 27: 223-227, 1988.
4. Shimizu Y., Hasumi K., Masubuchi K., Okudaira Y.: Immunotherapy of tumor-bearing mice utilizing virus help, *Infect. Immunol.* 40: 486-492, 1983.
5. Shimizu Y., Hasumi K., Okudaira Y., Yamanishi K., Takahashi M.: Immunotherapy of Advanced Gynecologic Cancer Patients Utilizing Mumps Virus, *Cancer Detection and Prevention*, 12: 487-495, 1988.
6. Shimizu Y., Hasumi K., Masubuchi K., Okudaira Y.: Establishment of tumor-specific immunotherapy model utilizing vaccinia virusreactive helper T cell activity, *Eur. J. Immunol.*, 18: 1773-1778, 1988.
7. Wallak M. K., Michaelides M.: Serologic response to human melanoma lines from patients with melanoma undergoing treatment with vaccinia melanoma oncolysates, *Surgery*, 96: 791-800, 1984.

SUMMARY

IMMUNOTHERAPY OF MALIGNANT CANCER UTILIZING VIRUS HELP

Tur Dragan, Mišković Ivica, Pjanić Aida
Immunology group, Medical faculty Banja Luka

The immunotherapy of malignant diseases is a scientific and clinical discipline promptly developed in a last decade. A different approaches are performing to increase the immune response to a tumor. Many of them are clinically tested and some of them give very good results.

In last few years appeared a new form of the immunotherapy of malignant tumors, utilizing a virus help. Some applicable types of the viruses can be injected directly in the tumor mass or in a tumor environment, modified a tumor antigens. Using this approach tumor cells become better recognizable for the imunologic system.