

Nöro-Onkolojide Lokal Moleküler Tedavi Yöntemleri

Regional Molecular Therapeutic Approaches in Neuro-Oncology

İmmünoterapi ve Sonuçları

Immunotherapy and Results

Dendritik Hücreler ve İmmünoterapi

Dr. Emin ÖZYURT

Istanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Nöroşirürji Anabilim Dalı, İstanbul

Dendritik hücreler (DH) kemik iliğinden farklılaşmış bir hücre ailesidir. Neredeyse tüm dokularda bulunur ve antijen sunan bir hücre ağı oluşturur. Yüzeyden projekte eden dendrit olarak adlandırılan birçok uzun örümceksi sitoplazmik uzantıları vardır. Dendritler ve diğer özellikleri bu hücre ailesinin antijen prezentasyonunda ve T hücre aktivasyonunda etkili olmasını sağlar. Uyarılmamış T hücrelerini en etkili şekilde aktive eden hücre grubudur.

Deri immün cevap için önemli bölgelerden biridir. Epidermiste yerleşmiş antijen sunan hücrelere **Langerhans hücreleri (LH)** denmektedir. LH tüm epidermal hücrelerin %5'ini oluşturur. Bakteryel ya da viral patojenlere bağlı lokal inflamasyonda salgılanan faktörler (IL-2 ve IL-6) LH leri aktive eder ve LH'ler kan yoluyla sekonder lenf nodlarına giderler. Burada parmaklı çıkıntılar gösteren tam diferansiye olmuş formlarına – **inter-digitating dendritic cells** – dönüşerek T hücre bölgelerine (parakortekse) yerleşirler ve T hücrelerini antijene özgül olarak aktive ederler. Özet olarak DH'lerin görevi enfeksiyon bölgesinden antijenleri sekonder lenf nodlarına taşımak ve burada planlı bir şekilde bu antijen ve toksinlere karşı özgül immün yanıt oluşmasını sağlamaktır. Bu şekilde T hücrelerinin antijenle teması kolaylaşır. Çünkü aktive olmamış T hücreleri 24 saatlik periyotlarda periferik lenf sisteminde birkaç kez dolaşır. DH'ler tarafından aktive edildikten sonra dolaşım paternlerini değiştirerek enfeksiyon lokalizasyonunda efektör hücreler haline gelirler. Sitotoksik T hücreleri enfekte olmuş hücreleri ve tümör hücrelerini parçalarken yardımcı T hücrelerinden (T helper, Th) Th1 makrofajların fagositik ve bakterisidal aktivitelerini uyarak enflamatuvar mediatörlerin salgılanmasını ve intraselüler patojenlerin eradikasyonunu sağlar; Th2

de humoral immün cevabı destekleyerek antikor üreten B hücrelerini aktive eder.

Antijen sunan hücreler (antigen presenting cells-APC-) antijene özgül T hücrelerini aktive etmekte çok önemlidir. Çünkü T hücreleri kendi başlarına antijen tanıyamazlar. Antijenin APC ler tarafından işlenip sunulması gerekir. Spesifik antijen APC ler tarafından küçük peptitlere ayrılırlar ve bu peptidler major histocompatibility complex class-I (MHC-I) e bağlanırlar. Daha sonra MHC-I APCnin dış hücre membranına çıkar. Ancak o zaman T hücreleri MHC-I molekülü ve antijen peptidi kompleksini tanır. Bu, latent T hücrelerini aktive eder.

Vücudun periferinde bulunan Langerhans hücreleri (LH) antijen tanıma ve onu işlemekte ustadırlar ama latent T hücrelerini aktive etmede yetersizdirler. Sekonder lenf nodlarına gelip interdigitating dendritic cell (IDC) formuna mature olduktan sonra antijen tanıma ve işleme özelliklerini kaybedip LH evresindeyken içine almış olduğu antijeni en iyi şekilde T hücrelerine tanıtip onu aktive edecek potansiyeli kazanır.

DH'lerin latent T hücrelerini aktive etme potansiyelleri kanser gibi durumlarda immünoterapide kullanılabilir. Bu durumda DH'ler tümöre özgül antijenler tarafından sensitize edilerek sensitize edilmiş DH'ler kanser hastasına infüze edilir (selüler aşı olarak) ve T hücreleri özgül olarak aktive edilir. Bu şekilde tümör hücreleri ve kronik viral enfeksiyonlar (örn. HCV, persistan serviks displazilerinde görülen HPV enfeksiyonu, HIV) elimine edilebilir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, HIV-1 enfeksiyonlu terminal evre hastalarda HIV-1 ile sensitize edilmiş DH'ler güçlü CD8+ T lenfosit cevabı sağlamışlardır. Bu cevap gamma interferon ve IL-2 uygulamasıyla arttığı bildirilmiştir.(1)

İNSAN DH'LERİNİN IN VITRO ÜRETİLMESİ VE DİFERANSİYASYONU

Dh'lerin izole edilmesi zordur ve LH ve IDC evrelerinde mitoz özelliklerini kaybetmişlerdir. Bu yüzden izole edilseler bile replike olmaları imkansızdır. Araştırmalar sonunda omnipotent periferik kan kök hücrelerinden(CD34+ hücreler) veya periferik kan progenitor (öncü) hücrelerinden kültür ortamına GM- CSF, IL-4, TNF-a diğer sitokinler (4,5,9,12,13,14) ekleyerek çok miktarda DH elde edilebilmiştir.

DH'LERİN TÜMÖR SPESİFİK PEPTİDLERLE SENSİTİZASYONU

Antijen DH içine DNA olarak sokulabilir. Böylece DH içinde antijenin transkripsiyonu ve translasyonu gerçekleşir ve bu yabancı protein hücre metabolizması tarafından parçalanarak MHC molekülüne bağlanır ve hücre membranında eksprese edilir. Bu yolla CD8+ T hücreleri aktive olur. CD8+ T hücreleri özellikle tümör hücrelerine karşı oluşturulan immün cevapta önemlidirler.

Patojenlerin ve tümöre özgül antijenlerin lizatları da DH'leri sensitize etmek için kullanılabilir. Fakat bu şekilde sunulan antijenler genelde sitoplazmada değil; endozomlarda metabolize olurlar. Dolayısıyla metabolize olan peptidler MHC-II ye bağlanırlar ve CD4+ T hücrelerini aktive ederler. Bu olay enfeksiyöz ajanlara karşı geliştirilen immünitede ve immünizasyona cevap vermeyenlerde etkilidir.

Tümör immünoterapisinde asıl hedef sitotoksik T hücre aktivasyonu olduğundan DH'leri protein ve lizatlarla inkübe ederek sensitize etmek optimal değildir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ekstra selüler proteinler ve heat shock proteinlerinin de sitotoksik T hücre yanıtını arttırmada rol oynadığını göstermiştir.

Çeşitli çalışmalarda hayvan modellerinde tümör antijenleriyle sensitize edilmiş dendritik hücrelerin(DH) tümör regresyonuna yol açtığı gösterilmiştir.

Dr. W. Gorter başkanlığında yürütülen Köln Modelinde hasta 1. Gün 50 ml kan verir. Kandan monositler izole edilir ve kültür ortamına ekilir. 6 gün sonunda monositlerden dendritik hücreler elde edilir. Hastanın tümör hücrelerinden elde edilen özgül antijenler DH lere sunulur. 7. Gün sensitize edilen bu DH ler hastaya infüze edilir (aşılama).

Hastaların dendritik hücrelerle en az 6 kez aşılınması ve iki aşılama arasında 4 hafta olması önerilmektedir.

Tümörisidal aşı fikri 1909 da Coley'in inop sarkomları bakteriyel toksinlerle tedavi etmeye çalışmasına kadar uzanır. Fakat asıl Zinkernagel, Van Pel, ve Boon tarafından CD8+ T hücrelerinin MHC-I aracılığıyla tümör hücrelerini öldürdüğünü göstermesi bu alanda öncü çalışmadır.(32) DH'ler 1973'te Steinman ve Chon tarafından ilk kez fare dalağında gösterilmiştir(12,11). 1980'lerin ortalarında DH'lerin LH'ler aynı hücre ailesine ait oldukları farkedildi.

DH'ler çok miktarda MHC-I ve II içerir. 1990'da Freudenthal ve Steinman DH'lerin aynı zamanda çok miktarda immün sistemi modüle eden protein (CD80, CD86, CD40) ve iki adhezin (ICAM-I(CD54) ve LFA3(CD58)) içerdiğini gösterdi. DH aynı zamanda interferon üreten hücreleri aktive eden IL-12 de üretmektedir.(3)

İlk DH immünoterapi deneyleri periferik kandaki DH'ler izole edilerek yapıliyordu. Fakat DH'ler periferik kanda <5 olduğundan büyük zorluklar çıkıyordu. 1990da Markowics ve ark. GM-CSF nin dendritik hücrelerin ömrünü 6 haftaya kadar uzatmakla kalmayıp DH diferansiasyonunu da sağladığını ortaya koydu. (8)

1994'te Mehta-Damani ve ark.(10) in vitro antijene özgül CD8+ sitotoksik T lenfosit (STL) üretmeyi başardı. 1995'te de aynı grup in vitro antijene özgül CD4+ T lenfosit üretmeyi başardı.

1996'da, Hsu ve ark.(6) antijenle sensitize edilmiş dendritik hücrelerle ilk klinik çalışmayı gerçekleştirdi. Çalışmada, tümör specific idioype proteine sensitize edilmiş DH lerin B hücreli lenfomada etkinliği araştırıldı.

Hsu ve ark.(6)in çalışmasının başarılı olması üzerine Timmerman ve ark. (15) aynı teknikle daha büyük bir hasta popülasyonu üzerinde non Hodgkin B hücreli lenfomayı çalıştı. 3 adet aylık iv DH infüzyonundan sonra hastalara 2-6 ay içinde 4. aşılama yapıldı. Sonuç idioype proteinine sensitize edilmiş DH aşılmasının T hücreli ve humoral immüniteyi arttırdığı ve tam tümör regresyonunu sağladığı yönündeydi.

DH aşılmasının geliştirilmesi ve optimizasyonunda halen bazı güçlükler bulunmaktadır. Şu anda kullanılan izolasyon ve sensitizasyon yöntemleri çok pahalı ve zor. Ayrıca DH aktivasyonu şuanda yapılan gibi in vitro değil in vivo olmalıdır.

Ayrıca hala etkili immün yanıt oluşturmak için kaç tane aktive olmuş ve diferansiye olmuş DH gerektiği bilinmemektedir. Hayvan modellerinde ve klinik çalışmalarda aşı başına 100,00-100,000,000 DH kullanılmıştır. Gereken DH sayısı 100ml periferik kandan izole edilen ve ekilen monositlerin kalitesine göre değişebilir. Köln Modelinde dendritik hücreler hastanın kendi monositlerinden üretiliyor ve tümörün yeri, cinsi ve diğer özelliklerine göre aşılama intrakutan, intranodüler (lenf nodu içine), intratümöral, intratekal veya intravenöz olabiliyor.

Lökoferez ile çok daha fazla monosit izole edilerek çok daha fazla DH elde edilebilir.

Tanaka ve ark. (15) hayvan modelinde düşük doz cisplatin+ 5-FU (florourasil) kemoterapisi sonrası intratümöral DH aşılmasının in vivo antitümör etkisini araştırdı. Bu tedavi kombinasyonu MC38 (murine adenokarsinomunun) tamamen regrese oldu.

Stift ve ark., pankreatik kanserli tek hastayla yaptığı çalışmasında, allogeneik lizatlarla otolog dendritik hücreleri sensitize etti. Pankreatik kanserde tümör peptitlerinin olmaması antijen olarak allogeneik tümör kullanma fikrini güçlendirmektedir. Evre 4 pankreas ca hastalarına 3 hafta arayla 1-2*10 otolog monositlerden elde edilmiş DH aşısı inguinal lenf nodlarına uygulandı. İlk 10 aşısındaki DH ler cerrahi eksplorasyon sırasında elde edilen tümör hücrelerinin lizatlarıydı. Otolog lizatlar bittiği zaman dendritik hücreler tümör hücre kökeninden lizatlarla sensitize edildi. Hem otolog, hem de allogeneik tümör lizatına gelişen gecikmiş tip immün reaksiyon değerlendirildi. Her ikisine de yeterli ölçüde immün yanıt vardı. Ve toksisite veya otoimmünite gelişmedi. Dolayısıyla allogeneik lizatlar da toksik olmaması ve anti tümör cevap uyandırması nedeniyle immünoterapide yer alabilir. (16)

KAYNAKLAR

1. Fan Z, Huan XL, Borowski L, Mellors JW, Rinaldo CR: Restoration of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) responses in CD8+ T cells from late-stage patients on prolonged antiretroviral therapy by stimulation in vitro with HIV-1 protein-loaded dendritic cells. *J Virol*, 75(9): 4413-4419, 2001
2. Fecci PE, Mitchell DA, Archer GE, Morse MA, Lysterly HK, ve diğerleri: The history, evolution, and clinical use of dendritic cell-based immunization strategies in the therapy of brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology* 64: 161-176, 2003
3. Freudenthal PS Engleman EG: The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7698-7702, 1990
4. Herbst B ve diğerleri: In vitro differentiation of CD34+ hematopoietic progenitor cells toward distinct dendritic cell subsets of the birbeck granule and MHC-positive Langerhans cell and the interdigitating dendritic cell type. *Blood* 88: 2541-2548, 1996
5. Hsu FJ ve diğerleri: Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 2: 52-58, 1996
6. Mayordomo J ve diğerleri: Bone Marrow-derived dendritic cells serve as potent adjuvants for peptide-based antitumor vaccines. *Stem cells* 15: 94-103, 1997
7. Liu B, Ye S, He P, Zheng N, Zhao, Sun R, Tang Z: Study of the cytotoxicity against human hepatocellular carcinoma cells induced by the MAGE-1 gene modified dendritic cells. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 9: 151-153, 2001
8. Markowicz S, Engleman EG: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes differentiation and survival of human peripheral blood dendritic cells in vitro. *J Clin Invest* 85: 955-961, 1990
9. Hsu FJ, Benike C, Fagnone F, ve diğerleri: Vaccination of patients with B cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature Med* 2:52-58, 1996
10. Mehta-Damani A, Markowicz S, Engleman EG: Generation of antigen-specific CD8+ CTLs from naïve precursors. *J Immunol* 153:996-1003, 1994
11. Pedersen IM, Kitada S, Leoni LM, Zapata JM, Karras JG, Tsukada N, Kipps TJ, Choi YS, Bennett F, Reed JC: Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood* Sep 1;100(5):1795-1801, 2002
12. Peters J ve diğerleri: Dendritic cells: From ontogenetic orphans to myelo-monocytic descendants. *Immunol Today* 17:273-278, 1996
13. Sallusto F, Lanzavecchia A: Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 179: 1109-1118, 1994
14. Santiago-Schwarz F ve diğerleri: TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages. *J Leukoc Biol* 52: 274-281, 1992
15. Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, ve diğerleri: Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: Clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 99:1517-1526, 2002
16. Qiu S, Ye S, Tang Z, Qian S, Li L: Feasibility of using hepatitis B virus surface antigen as target antigen in immunogenic therapy against cancer. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 82: 253-256, 2002
- Caux C ve diğerleri: GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360: 258-261, 1992