

Milan Terzić¹Saša Kovačević¹Snežana Živković²Sanja Maričić³¹ Institut za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije, Beograd² Institut za zaštitu zdravlja Srbije, Beograd³ Dom zdravlja "Savski venac", Beograd

Nekroza tumora - faktori i principi

Ključne reči

citokini

faktori nekroze tumora α i β

E-selektin

Sažetak

Nekroza tumora koja nastaje kao odgovor na različite terapijske modalitete, najčešće je posledica drastičnog smanjenja vaskularizacije tumora. Ovi tumori skoro uvek recidiviraju zahvaljujući spoljnom sloju preživelih ćelija, osim ako je nekroza povezana sa specifičnim imunim odgovorom T ćelija obolele osobe.

Faktori nekroze tumora α i β (TNF- α i TNF- β), citokini stvoreni u aktiviranim monocitima i limfocitima, imaju različite biološke efekte, u koje spadaju: citotoksično-citostatska aktivnost protiv tumorskih ćelija, imunomodulatorne funkcije, interakcije s drugim modifikatorima biološkog odgovora i modulacije genske ekspresije. Zbog sistemskih toksičnih efekata koji nastaju posle intravenske aplikacije, faktori nekroze tumora imaju ograničenu kliničku primenu. Toksičnost se smanjuje aplikovanjem TNF direktno u tumor.

TNF je pokazao sinergistički efekat sa interferonom- γ (IFN- γ). Navedeni sinergistički efekat odgovara povećanoj ekspresiji adhezivnih molekula E-selektina i adhezivnog molekula vaskularnih ćelija (*vascular cell adhesion molecule 1 - VCAM-1*), koji predstavljaju prospektivne markere senzitivizacije endotela. VCAM-1 ima važnu ulogu u interakciji T-ćelija sa aktiviranim endotelom, i u izvesnim tkivima regrutuje različite subpopulacije T-ćelija. Indukcija tolerancije na toksične efekte TNF može omogućiti više terapijske doze ovih citokina.

Mnogi konvencionalni hemioterapeutske agensi indukuju produkciju citokina u imunim ćelijama obolele osobe, što je nekada povezano sa apoptozom ćelija tumora. Zbog toga, početni efekti oštećenja do kojih dovode hemioterapeutske agensi mogu indirektno dovesti do nekroze tumora, kroz aktivaciju efektnih mehanizama domaćina.

Nekroza tumora se može konstatovati u brojnim eksperimentalnim studijama i u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Ona je najvećim delom posledica neispunjavanja nutritivnih potreba rastućeg tumora postojećom vaskularizacijom. Kako nekroza nastaje zbog fenomena difuzionog limita kiseonika, nove terapijske strategije lečenja tumora nazvane su *vaskularno limitirajućim*. Ovakvo lečenje podrazumeva pristup kojim se uništava postojeća vaskularizacija tumora ili sprečava nastanak novih krvnih sudova, čime se inhibira dalji rast tumora. Dakle, smanjenim dotokom nutritivnih materija i kiseonika u parenhim tumora nastaje brza ishemijska nekroza, ali se time, naravno, ne postiže potpuna regresija tumora.

Indukcija nekroze tumora

Nedavno je dokazano da lekovi ordinirani eksperimentalnim životinjama sa karcinomom prostate mogu biti fotoaktivirani laserskim zracima. Taj tretman dovodi do brze hemoragijske nekroze uglavnom uticajem na endotel krvnih sudova⁸. Zbog nedostatka imunološkog odgovora navedeni efekti su češće reverzibilni nego nekroza nastala pod uticajem faktora nekroze tumora (*tumor necrosis factor-TNF*)¹³.

Mnoge vazoaktivne hemijske supstance privremeno smanjuju protok krvi u eksperimentalnim tumorima, bez uticaja na rast tumora. Izuzeci su flavon-8-sirćetna kiselina i 5,6 dimetilksantenon sirćetna kiselina, koje dovode do značajnog

smanjenja protoka krvi i do brze regresije eksperimentalnih tumora⁴. Smatra se da je ovakva aktivnost povezana sa sposobnošću navedenih agenasa da indukuju transkripciju faktora nekroze tumora i interferona γ (IFN- γ) u imunim ćelijama domaćina. Mnogi konvencionalni hemioterapeutske agensi takođe indukuju produkciju citokina u ćelijama domaćina; u nekim slučajevima ovo može biti povezano sa apoptozom ćelija tumora⁶. Zbog toga, početni efekti oštećenja do kojih dovode hemioterapeutske agensi mogu indirektno dovesti do nekroze tumora kroz aktivaciju efektnih mehanizama domaćina.

Faktor nekroze tumora

TNF vezan za membranu (*membrane bound TNF - mTNF*) dovodi do programirane smrti ozračenih ćelija endotela i ćelijske linije Colo205. Međutim, ovaj efekat nije dokazan za solubilni TNF¹². Smatra se da mTNF dovodi do specifične aktivacije TNF receptora poznatijih kao TNFR80¹⁹. Indukcija prokoagulantne aktivnosti endotelne ćelije kao odgovor na njihovu interakciju sa T ćelijama, podrazumeva slični mehanizam: međusobno vezivanje proteina adhezije leukocita, nazvanog E-selektin, za molekul 1 intercelularne adhezije na luminalnom endotelu (intercellular adhesion molecule 1 - ICAM-1). Vezivanje E-selectina za ICAM-1 dovodi do stvaranja mTNF i aktivacije TNFR80².

Postojanje polipeptida koji aktivira monocite (*endothelial-monocyte activating polypeptide II - EMAP II*) utvrđeno je još 1992. Taj polipeptid, koga proizvode endotelne ćelije tumora, potencira protrombotične efekte TNF. Utvrđeno je takođe da ovaj protein indukuje apoptozu⁷. Hipoksija i stanje rasta i motiliteta ciljnih ćelija povećava apoptotični efekat. Kako se smatra da nekroza tumora nastaje zbog hipoksije, a da endotel tumora ispoljava izraženiji proliferativni fenomen nego normalni endotel, EMAP II dovodi do vaskularne apoptoze *in vivo*. Endotoksin i TNF indukuju nastanak mRNA za EMAP II, što ukazuje da ovaj faktor može biti regulisan nekim posttranslacionim mehanizmima¹². Faktori nekroze tumora alfa i beta (TNF- α i TNF- β) su citokini koje stvaraju aktivirani monociti i limfociti¹³. Oni u eksperimentu *in vivo* uzrokuju hemoragijsku nekrozu i regresiju tumora kod miša. Takođe, TNF- α i TNF- β ispoljavaju citotoksično-citostatsku aktivnost protiv L ćelija miša *in vitro*. Faktori nekroze tumora TNF- α (monokin) i TNF- β (limfotoksin) imaju u skoro 30% strukture homologu sekvencu aminokiselina, vezuju se za iste ćelijske receptore i danas se, zahvaljujući savremenim rekombinantnim DNK tehnologijama, mogu relativno jednostavno sintetisati¹⁷. Međutim, klinički su ispitani efekti samo monokina (TNF- α)²⁰. TNF- α na ćelijskom nivou prouzrokuje dva potpuno različita odgovora: smrt ćelije ili aktivaciju transkripcije gena za preživljavanje ćelije. Apoptoza do koje dovodi TNF- α podrazumeva aktivaciju kaskade kaspaza, kojaku minira cepanjem specifičnih ćelijskih supstrata, što

ima za rezultat smrt ćelije. Ali, TNF- α takođe uzrokuje smrt ćelije nezavisno od kaskade kaspaza. Nuklearni faktor kappa B (NFkB) i aktivirajući protein 1 (AP-1) su dva transkriptivna faktora stvorena pod uticajem TNF- α . Putevi koji doprinose aktivaciji ovih transkriptivnih faktora podrazumevaju signalne molekule kao što su kinaze, fosfolipaze i sfingomijelinaze. Pored pomenutih antiapoptotičnih efekata, NFkB i AP-1 stimulišu stvaranje faktora inflamacije, ćelijskog rasta i signalnih proteina¹⁰. Ipak, veoma je važno detaljno analizirati oba faktora nekroze tumora, budući da ispoljavaju različiti antitumorski spektar iako se vezuju za iste receptore i imaju homologu aminokiselinsku sekvencu u skoro 30% svoje strukture^{1,15}.

Faktori nekroze tumora su produkti normalnih ćelija i imaju različite biološke aktivnosti, u koje spadaju: citotoksično-citostatska aktivnost protiv tumorskih ćelija, imunomodulatorne funkcije, interakcije s drugim modifikatorima biološkog odgovora, i modulacije genske ekspresije¹². Faktori nekroze tumora mogu uništiti tumorske ćelije *in vitro* u odsustvu ćelija imunog sistema¹³. Brojni eksperimenti potvrđuju da faktori nekroze tumora mogu ispoljavati modulatorne efekte ćelijskog imunološkog odgovora protiv tumora. Faktori nekroze tumora mogu aktivirati i intenzivirati funkcije neutrofila i eozinofila, i pojačati ekspresiju prve i druge klase histokompatibilnih antigena. Inicijalni događaj predstavlja vezivanje faktora nekroze tumora za specifične receptore veoma velikog afiniteta. Ćelije koje ne poseduju ove receptore rezistentne su na delovanje faktora nekroze tumora. Citotoksično-citostatska aktivnost potvrđena je u brojnim eksperimentima *in vitro* sa humanim i animalnim tumorskim ćelijama. Hemoragijska nekroza i regresija dokazana je u ćelijskim linijama karcinoma grlića, jajnika, dojke i kolona, melanoma, karcinoma pluća i astrocitoma. Međutim, postoji heterogenost odgovora u različitim tipovima tumora. Odgovor na faktore nekroze tumora ne zavisi od tipa tumora niti od nekog potencijalno prognostičkog faktora. Klinička toksičnost rekombinantnog TNF slična je toksičnosti rekombinantnih interferona - povišena temperatura, groznica i glavobolja. Lokalni inflamatorni odgovor nije redak, zavisi od doze i reverzibilan je. Hipotenzija retko nastaje i lako se tretira intravenskom rehidracijom. Neurološki simptomi (kao što je konfuzija) mogu nastati, ali veoma retko. Mijelodepresija se javlja sporadično, reverzibilna je i zavisi od primenjene doze. Navedeni podaci ukazuju da se faktori nekroze tumora mogu istovremeno primenjivati sa mijelosupresivnom hemoterapijom. Samo mali broj pacijenata zahteva transfuziju zbog anemije, ali to ne predstavlja veliki klinički problem. Zbog sistemskih toksičnih efekata koji nastaju posle intravenske primene, faktori nekroze tumora imaju veoma ograničenu kliničku primenu. Pokušava se sa aplikovanjem TNF direktno u tumor, čime se svakako smanjuje toksičnost⁹.

Vaskularno limitiranje i antiangiogeneza

Za vaskularizaciju tumora je od presudnog značaja uticaj faktora rasta vaskularnog endotela (*vascular endothelial growth factor-VEGF*). Krvni sudovi tumora imaju receptore za VEGF i dominantno-negativne mutante koji nemaju VEGF-receptore. Navedeni mutanti koji nemaju VEGF receptore efikasno inhibiraju angiogenezu i rast tumora u glioblastomima implantiranim pod kožu timektomiranih miševa¹⁸.

Smatra se da je tkivni faktor važan medijator hemoragijske nekroze indukovane TNF-om u fibrosarkomima stvorenim pod uticajem metilholantrena. U eksperimentalnim uslovima tkivni faktor vezan je za antitelo protiv antigena tumorskog endotela. Davanje ovog kompleksa mišu koji ima tumor imalo je za posledicu stvaranje koaguluma unutar vaskularne peteljke tumora, cirkulatornu stazu, masivnu nekrozu i regresiju tumora.

Za razliku od ovoga, homozigotni embrioni bez tkivnog faktora imaju smanjenu vaskulogenezu i angiogenezu, što ukazuje da tkivni faktor može takođe stimulirati angiogenezu. Faktori koagulacije se ne stvaraju sve do kasnog embrionalnog razvoja, i zbog toga se smatra da signal koga proizvodi tkivni faktor nije u isto vreme i signal za iniciranje koagulacije. Tkivni faktor se ponaša kao bifunkcionalni molekul koji stimuliše angiogenezu još uvek nedovoljno ispitanim mehanizmom, ali takođe dovodi do smanjenja prokrvljenosti tumora, doprinoseći nastanku trombotične infarkcije¹⁶.

Kako je E-selektin utvrđen u endotelu karcinoma dojke *in vivo*, ekspresija TNF gena može predstavljati ciljno mesto delovanja promotora E-selektina. Na taj način primljena terapija ima kliničkog uspeha, a istovremeno se izbegavaju sistemski toksični efekti TNF- α .

Klinička aplikacija

TNF je veoma važan faktor koji učestvuje u patogenezi različitih oboljenja kao što su sepsa, dijabetes, karcinom, osteoporoza, multipla skleroza, reumatoidni artritis i inflamatorna bolest creva⁵. TNF u kombinaciji s Melphalanom i/ili IFN- γ , primenjuje se kod pacijenata s metastatskim sarkomima i melanomima. U kliničkim studijama TNF je pokazao sinergistički efekat sa IFN- γ . Štaviše, u sekretima humanih tkiva navedeni sinergistički efekat odgovara povećanoj ekspresiji adhezivnih molekula E-selektina i adhezivnog molekula vaskularnih ćelija (*vascular cell adhesion molecule 1 - VCAM-1*), koji predstavljaju prospektivne markere senzitivizacije endotela¹¹. VCAM-1 ima važnu ulogu u interakciji T-ćelija sa aktiviranim endotelom, i u izvesnim tkivima regrutuje različite subpopulacije T-ćelija. Ispitivanja na miševima navode nas na zaključak da indukcija tolerancije na toksične efekte TNF ili na primenu mutančnih proteina TNF (muteina), koji samo reaguju sa jednim od dva TNF receptora, može omogućiti više terapijske doze TNF- α .

Uloga citokina i T ćelija

Nespecifični imunološki odgovor realizuju fagociti (polimorfonukleari i makrofagi), NK ćelije, izvesni antimikrobni (lizozim) i antivirusni (interferon) faktori, kompleks komplementa i sistem kinina. Pored fagocitoze, makrofagi imaju baktericidnu i tumoricidnu aktivnost. Ove funkcije se pojačavaju pod uticajem citokina¹¹. Makrofagi i monociti su od primarnog značaja za specifični imunitet, delujući kao akcesorne ćelije u inicijalnoj aktivaciji limfocita. Oni su u stanju da podvrgnu fagocitozi i metabolišu različite antigene, kao i da prezentiraju antigene na sopstvenoj membrani limfocitima, zajedno sa specifičnim markerima glavnog histokompatibilnog kompleksa. NK ćelije imaju citotoksičnu aktivnost bez apsolutne specifičnosti prema nekim antigenima niti ćelijama sa prezentiranim antigenima. Makrofagi i NK ćelije su od velikog značaja za uništavanje tumorskih ćelija.

Antitumorska aktivnost različitih citokina u eksperimentalnom modelu izučavana je korišćenjem tumorskih ćelija u koje su implementirani citokini. Sastav izmenjenih ćelija domaćina varira u zavisnosti od citokina koji se koriste¹⁸. Regresija tumora ubacivanjem interleukina 12 u tumorske ćelije, u direktnoj je korelaciji s nivoom infiltrirajućih CD8⁺ T ćelija i produkcijom CD8⁺ tumor specifičnih citotoksičnih T limfocita, naročito posle smanjenja nivoa CD4⁺ T ćelija. Slična nehemoragična nekroza koja zavisi od T ćelija može se izazvati amino β -1,3-D-glukonom, sintetskim imuno modulatorom. Ovaj agens selektivno povećava produkciju IL-1, bez uticaja na produkciju TNF u makrofagima.

Uloga imunih T ćelija dokazana je u inhibiciji metastaza. Inokulacija živih T ćelija limfoma (podgrupa EB) u dozama koje ne dovode do nastanka tumora, ili EB ćelija koje sadrže IL-4, dovodi do razvoja dugotrajnog antitumorskog odgovora posredovanog specifičnim T ćelijama, a koji zahteva prisustvo kako CD4⁺, tako i CD8⁺ T ćelija. Transfer T ćelija, nastalih u *in vivo* uslovima protiv tumorskih ćelija limfoma (podgrupa EB), može zaštititi od nastanka metastaza ovog visokometastatskog limfoma. Ovakav odgovor se može pojačati dodavanjem antitela protiv TNF, što ukazuje da TNF ima suprotan efekat u odnosu na zaštitnu ulogu T ćelija. TNF pojačava metastatski potencijal tumora, a mogući model *in vivo* koji ovo potvrđuje je povećanje broja integrinskih receptora na endotelu pod uticajem ovog faktora nekroze tumora. Povećavanje broja integrinskih receptora pojačava adhezivnost tumorskih ćelija za endotel *in vitro*.

Nedavno je sprovedena analiza lečenja Kronove (Crohn) bolesti i reumatoidnog artritisa antagonistima TNF³. Posle samo osam nedelja od započetog lečenja Etanerceptom i Infliximabom, antagonistima TNF, došlo je do nastanka limfoproliferativnih bolesti. Kod najvećeg broja pacijenata (81%) utvrđen je non-Hodgkin limfom. Regresija tumora odmah posle prestanka ordiniranja antagonista TNF, bez istovremenog davanja specifične citotoksične terapije protiv limfoma, konstatovana je kod dva bolesnika. Navedena studija

ukazuje na pozitivnu korelaciju između antagonista TNF i nastanka limfoproliferativnih bolesti. Međutim, mora se uzeti u obzir da kod pacijenata s reumatoidnim artritisom i sa Kronovom bolešću postoji predispozicija za nastanak limfoma, kao i da je učestalost limfoma veća kod imunokompromitovanih osoba¹⁴.

Zaključci

Tumorska nekroza koja nastaje kao odgovor na različite terapijske modalitete, najčešće je posledica drastičnog smanjenja vaskularizacije tumora. Ovi tumori neizbežno ponovo nastaju zahvaljujući spoljnom sloju preživelih ćelija, osim ako je nekroza povezana sa specifičnim imunim odgovorom T ćelija domaćina. Dosadašnji rezultati ukazuju na potrebu za daljim fundamentalnim istraživanjima interakcije između tumorskih i ćelija domaćina.

Milan Terzić¹
Sasa Kovacevic¹
Snezana Zivkovic²
Sanja Maricic³

¹ Institute of Obstetrics and Gynecology,
Clinical Center of Serbia, Belgrade

² Republic Institute for Public Health, Belgrade

³ Public Health Center "Savski venac", Belgrade

Tumor necrosis - factors and principles

Key words

Cytokines

Tumor necrosis factor α and β

E-selectin

Abstract

Tumor necrosis, which occurs in response to a variety of therapeutic modalities, is frequently a consequence of vasculature shutdown. These tumors inevitably recur, due to an outer rim of surviving cells, unless necrosis is associated with a specific, T-cell dependent host immune response.

Tumor necrosis factor α and β (TNF- α i TNF- β), cytokines produced by activated monocytes and lymphocytes, have different biological effects, including: cytotoxic-cytostatic activity against tumors cells, immuno modulatory functions, interreactions with other biological response modifiers, and modulations of gene expressions. Due to systemic toxic effects occurring after intravenous application, tumor necrosis factors have limited clinical application. Decreased toxicity was noted with injection of TNF directly into tumor.

The effect of TNF is synergistic with IFN- γ . This synergy corresponds with the increased expression of adhesion molecules (E-selectin and vascular cell adhesion molecule 1 - VCAM-1), that are prospective markers for endothelial sensitization. VCAM-1 plays an important role in the interaction of T-cells with activated endothelium, and distinct subpopulations of T cells are recruited into certain tissues. Induction of tolerance to the toxic effects of TNF might permit higher therapeutic dosages of those cytokines.

Many conventional chemiotherapeutic agents induce cytokine production by the host cells, sometimes accompanied by apoptosis of tumor cells. Therefore, the initial damaging effect of chemotherapeutic agents may lead to necrosis in the tumor indirectly, through activation of host effector mechanisms.

Literatura

1. Baxter GT, Kuo RC, Jupp OJ, Vandenabeele P, MacEwan DJ. *Tumor necrosis factor- α mediates both apoptotic cell death and cell proliferation in a human hematopoietic cell line dependent on mitotic activity and receptor subtype expression.* J Biol Chem 1999;274(14): 9539-9547.
2. Beletsky IP, Moshnikova AB, Proussakova OV. *Cytotoxic signal transduction pathways via TNF family receptors.* Biochemistry (Mosc) 2002; 67(3): 312-328.
3. Brown SL, Greene MH, Gershon SK, Edwards ET, Braun MM. *Tumor necrosis factor antagonist therapy and lymphoma development: Twenty-six cases reported to the Food and Drug Administration.* Arthritis Rheum 2002;46:3151-3158.
4. Cavaillon JM. *Cytokines and macrophages.* Biomed Pharmacother 1994;48:445-453.
5. Chen G, Goeddel DV. *TNF- α signaling: a beautiful pathway.* Science 2002;296(5573):1634-1635.
6. Gupta S. *Molecular steps of tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis.* Curr Mol Med 2001;1(3):317-324.
7. Gupta S. *Tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR-I and downstream signaling molecules.* Exp Gerontol 2002; 37(2-3): 293-299.
8. Kimura H, Minakami H, Shoji A. *Ultraviolet B irradiation modulates susceptibility to tumour necrosis factor- α -induced apoptosis via induction of death receptors in murine fibroblasts.* Cell Biol Int 2001;25(12):1221-1228.
9. Lans TE, De Wilt JH, Van Geel AN, Eggermont AM. *Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for non-resectable stewart-treves lymphangiosarcoma.* Ann Surg Oncol 2002; 9:1004-1009.
10. Leong KG, Karsan A. *Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor α .* Histol Histopathol 2000;15(4):1303-1325.
11. Liu ZG, Han J. *Cellular responses to tumor necrosis factor.* Curr Issues Mol Biol 2001; 3(4): 79-90.
12. MacEwan DJ. *TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences.* Cell Signal 2002;14(6):477-492.
13. Malek NP, Pluemp J, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. *Molecular mechanisms of TNF receptor-mediated signaling.* Recent Results Cancer Res 1998; 147: 97-106.
14. McDermott MF. *TNF and TNFR biology in health and disease.* Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 2001;47(4):619-635.
15. Rath PC, Aggarwal BB. *TNF-induced signaling in apoptosis.* J Clin Immunol 1999;19(6):350-364.
16. Reed JC. *Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer.* Curr Opin Oncol 1999;11(1):68-75.
17. Smyth MJ, Johnstone RW. *Role of TNF in lymphocyte-mediated cytotoxicity.* Microsc Res Tech 2000;50(3):196-208.
18. Vincenz C. *Death receptors and apoptosis. Deadly signaling and evasive tactics.* Cardiol Clin 2001;19(1):31-43.
19. Wajant H, Scheurich P. *Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling.* Int J Biochem Cell Biol 2001; 33(1): 19-32.
20. Yang YC, Hsu TY, Chen JY, Yang CS, Lin RH. *Tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in cord blood T lymphocytes: involvement of both tumor necrosis factor receptor types 1 and 2.* Br J Haematol 2001;115:435-441.