

# Pooperacyjna terapia genokomórkowa z ekspresją IGF-1 glejaka wielopostaciowego przy zastosowaniu techniki antysensu i tripleksu anti-IGF-1

## *Usefulness of the antisense and triplex anti-IGF-1 techniques for postoperative cellular gene therapy of malignant gliomas expressing IGF-1*

Heliodor A. Kasprzak<sup>1</sup>, Jerzy Trojan<sup>2</sup>, Maciej Bierwagen<sup>1</sup>, Piotr Kopiński<sup>2</sup>, Piotr Jarocki<sup>3</sup>, Karina Bartzak<sup>2</sup>, Joanna Czapiewska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Neurochirurgii i Neurotraumatologii, Collegium Medicum UMK w Toruniu

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Genoterapii, Collegium Medicum UMK w Toruniu

<sup>3</sup>Pracownia Genoterapii i Kliniki Chirurgii Ogólnej, Collegium Medicum UJ w Krakowie

Neurologia i Neurochirurgia Polska 2006; 40, 6: 509–515

### Streszczenie

**Wstęp i cel pracy:** Celem pracy było ustalenie przydatności szczepionki przeciwnowotworowej w leczeniu złośliwych guzów mózgu. Nadal nie znaleziono sposobu wyleczenia tego typu guzów.

**Materiał i metody:** Badaniem objęto 10 osób płci obojga w wieku od 17 do 76 lat. Wśród leczonych było 5 mężczyzn oraz 5 kobiet. Średnia wieku wynosiła 40,8 roku. W badaniu histopatologicznym u 4 chorych stwierdzono glejaka wielopostaciowego, a u 6 chorych rozpoznano gwiaździankę anaplastyczną. Czas obserwacji obejmował lata 2001–2005.

W trakcie planowego zabiegu operacyjnego po dotarciu do guza pobierany był jego fragment, makroskopowo najbardziej zmienionej części, wielkości 1 cm<sup>3</sup>. Komórki hodowano, transfekowano episomalnym wektorem pMT EP (kodującym alternatywnie oligonukleotyd tworzący strukturę typu triple-helix z genem IGF-1 lub antysens przeciw mRNA IGF-1), hodowano ponownie, naświetlano i zawieszano w odpowiednim medium. Przygotowana w ten sposób szczepionka była podawana podskórnie. Odpowiedź immunologiczną chorych oceniano badaniem subpopulacji limfocytów krwi obwodowej.

### Abstract

**Background and purpose:** The aim of the study was to estimate the usefulness of the antineoplastic vaccination in treatment of malignant brain tumors. According to medical knowledge there is no cure for this kind of tumors.

**Material and methods:** Between 2001 and 2005, ten patients suffering from malignant glial tumors were treated. There were 5 male and 5 female individuals, aged from 17 to 76 (mean age: 40.8 years). The histopathological examination showed 4 cases of glioblastoma and 6 cases of anaplastic astrocytoma. Initially, patients were operated on with dissection of 1 cm<sup>3</sup> of the most representative part of tumor. The neoplasm cells were cultured, transfected with episomal pMT EP vector (expressing alternatively oligonucleotide sequence forming triple helix with IGF-I gene or antisense against IGF-1 mRNA), re-cultured, irradiated and resuspended in medium to prepare antineoplastic vaccine. The patients were vaccinated subcutaneously. We examined peripheral blood lymphocyte subsets to assess the immunological response of the patients.

**Results:** We observed prolongation of the survival time to 21.7 months compared to 9–11 months observed in literature. The patients were additionally treated oncologically with

Adres do korespondencji: prof. dr hab. med. Heliodor A. Kasprzak, ul. Wyspiańskiego 8, 85-073 Bydgoszcz, tel. +48 602 237 978

Pracę otrzymano: 4.11.2005; przyjęto do druku: 6.10.2006

**Wyniki:** U chorych stwierdzono wydłużenie średniej przeżycia do 21,7 mies., w porównaniu z dotychczas obserwowaną średnią 9–11 mies. Chorzy oprócz leczenia operacyjnego i genoterapii poddani byli także wszystkim dostępnym i racjonalnie uzasadnionym metodom leczenia onkologicznego obejmującego przede wszystkim radioterapię i chemoterapię (temozolomid). Z tego powodu niemożliwa jest pełna ocena tej metody jako uzupełniającej monoterapii onkologicznej.

**Wnioski:** Zastosowana metoda wydłuża czas życia chorych z nisko zróżnicowanymi guzami glejowymi ośrodkowego układu nerwowego. Zastosowanie jej jako onkologicznej monoterapii uzupełniającej wymaga dalszych badań.

**Słowa kluczowe:** glejak niedojrzały wielopostaciowy, genoterapia, IGF-1.

## Wstęp i cel pracy

Dotychczasowe wyniki leczenia guzów ośrodkowego układu nerwowego pochodzenia glejowego są nadal wysoce niezadowolające i kończą się niepomyślnie. Szczególnie guzy nisko zróżnicowane, a wśród nich glejaki wielopostaciowe i gwiaździaki III stopnia wg skali WHO wymagają nadal badań, których celem musi być poprawienie wyników ich leczenia. Obecnie dostępne metody leczenia, takie jak próba całkowitego bądź częściowego chirurgicznego usunięcia guza, naświetlanie oraz chemioterapia zmuszają nas do poszukiwania innych sposobów wspomagających dotychczas stosowane terapie. Czas przeżycia chorego z glejakiem wielopostaciowym waha się od 6 do 11 mies. i jest nadal, poza nielicznymi wyjątkami, smutną rzeczywistością. Radykalne chirurgiczne usunięcie guza pozwala na spowolnienie ekspansji procesu nowotworowego oraz wdrożenie w tym okresie uzupełniających metod w postaci radioterapii klasycznej lub stereotaktycznej oraz na wdrożenie chemioterapii, w miarę możliwości temozolomidem.

Obecnie istnieje tendencja do ustalania rozpoznania histopatologicznego guza za pomocą biopsji stereotaktycznej i na jej podstawie kwalifikowania lub dyskwalifikowania od dalszego leczenia uzupełniającego, w zależności od wielkości i lokalizacji zmiany. Wspomniany już brak zadowolających wyników leczenia guzów pochodzenia glejowego o wysokim stopniu złośliwości legł u podstaw poszukiwania nowych, mamy nadzieję, że bardziej skutecznych metod leczenia. Taką nadzieję pokłada się w terapii genowej nowotworów, w której zastosowano komórki nowotworowe sprzężone z limfocy-

radiotherapy and chemotherapy (temozolomide) according to the reasonable indications. Therefore, the comprehensive assessment of the genotherapy as the supplemental monotherapy was impossible.

**Conclusions:** The method of treatment used in this study prolongs the survival time of patients with high-grade gliomas of the central nervous system. This gene therapy needs further investigations as a method of oncological monotherapy of brain malignant gliomas.

**Key words:** glioblastoma, gene therapy, IGF-1.

tami B [1], w której używano wektora retrowirusowego zawierającego gen kodujący kinazę tymidynową wirusa opryszczki, czy też wektor kodujący IL-2. Niestety, tego rodzaju terapie jak dotychczas nie dały pozytywnych rezultatów w leczeniu nowotworu. Uwaga badaczy skierowała się na insulinowy czynnik wzrostu (IGF-1) i pierwsze badania przedkliniczne dały optymistyczne rezultaty. Te badania stały się bodźcem do stosowania czynników hamujących IGF-1 w guzach różnego pochodzenia [2,3]. Od 1999 r. w Cleveland technika hamująca IGF-1 stosowana jest w guzach pochodzenia glejowego, natomiast od 1998 r. w Szanghaju ta sama technika stosowana jest w guzach wątroby [4].

Dotychczasowe doniesienia kliniczne są zachęcające, bowiem przeżywalność w glejakach wielopostaciowych dochodzi do 18 mies. w porównaniu z 6–11 mies. przy zastosowaniu terapii klasycznej. W przypadkach raka wątroby przeżywalność wzrosła do 100% przy wyraźnym zmniejszaniu się masy guza. Terapia genowa znalazła także zastosowanie w leczeniu czerniaka skóry [4], w której to metodzie fragment materiału DNA nowotworowego jest *podwieszony* do prawidłowych limfocytów gospodarza, co powoduje, że są one traktowane jak materiał genowo obcy, przyczyniając się w ten sposób do odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Sposób wywoływania odpowiedzi immunologicznej przypomina technikę szczepień stosowaną, z jakże wielkim powodzeniem, od wielu lat w leczeniu chorób zakaźnych szczególnie wieku dziecięcego.

Proponowana w niniejszej pracy metoda wykorzystuje technikę *antisensu* skierowaną przeciw genowi dla IGF-1, co prowadzi do zahamowania syntezy białka

na poziomie translacji oraz odmiany tej techniki, tzw. tripleksu, pozwalającej na zahamowanie powstawania białka na poziomie transkrypcji. Komórki nowotworowe transfekowane wektorem hamującym ekspresję IGF-1 rozpoczynają produkcję białek zgodności tkanekowej MHC-1 oraz cząsteczek pomocniczych B-7 (CD80 i CD86), stając się w ten sposób podatnymi na działanie układu odpornościowego [5]. Co więcej, udowodniono doświadczalnie, że podobny efekt można osiągnąć hamując ekspresję genu kodującego receptor dla IGF-1 [6-8].

Wspomniany tu IGF-1 wydaje się pełnić szczególnie ważną rolę w karcynogenezie. Wykazano jego obecność w komórkach nowotworów takich narządów, jak wątroba, okrężnica, sutek, płuca, mózgowie. Czynnikiem ten należy do najważniejszych czynników wzrostu nowotworu. Obecność IGF-1 we krwi pacjenta może być wykorzystana jako jeden z potencjalnych wskaźników czynnego procesu nowotworowego. Zahamowanie syntezy IGF-1 może być kluczem do zatrzymania wzrostu guza. W różnych chorobach nowotworowych próbowano więc stosować technikę *antisensu* lub *tripleksu*, hamując eks-

presję IGF-1 na różnych poziomach (odpowiednio translacji i transkrypcji) [9,10]. Komórki nowotworowe, w których zahamowano syntezę IGF-1 wstrzyknięte podskórnie szczurom nie tylko nie rozwijały się formując guzy, ale powodowały silną odpowiedź immunologiczną typu komórkowego, głównie limfocytów T (CD8) powodując zmniejszanie bądź zanik guza pierwotnego [11]. Zahamowanie syntezy IGF-1 nasila odpowiedź immunologiczną, jak również powoduje aktywację procesów apoptozy w komórkach nowotworu. Należy zaznaczyć, że IGF-1 jest znanym od wielu lat czynnikiem chroniącym komórkę przed apoptozą, co udowodniono w odniesieniu do komórek nerwowych, komórek układu krzepnięcia, komórek jajnika i fibroblastów [12].

## Materiał i metody

Badaniem objęto 10 osób płci obojga w wieku od 17 do 76 lat (tab. 1. i 2.). Wśród leczonych było 5 mężczyzn oraz 5 kobiet. Średnia wieku wynosiła 40,8 lat.

W badaniu histopatologicznym u 4 chorych stwierdzono glejaka wielopostaciowego, a u 6 chorych rozpo-

**Tabela 1.** Chorzy z nisko zróżnicowanym guzem ośrodkowego układu nerwowego leczeni szczepionką przeciwnowotworową

**Table 1.** Patients suffering from malignant tumors of CNS treated by antineoplastic vaccine

LP	Inicjały	Wiek/Age	Data pierwszej operacji (dd-mm-rr)/ Date of first operative treatment	Typ rozpoznania histopatologicznego (AA-Anaplastic Astrocytoma, G-Gliosarcoma)/ The type of histopathological diagnosis	Żyje/Alive Tak/Nie (data zgonu, dd-mm-rr)/ Yes/No (date of death)	Czas przeżycia (obserwacja na dzień 22.09.2005 r.) w tygodniach/ The time of outcome (observation time – 22.09.2005) in weeks
1	LP	40	19.07.02	AA	N (6.12.2004)	80
2	BP	67	2.08.03	G	N (29.07.2005)	154
3	RP	52	13.10.02	AA	N (15.06.2003)	36
4	CK	33	1.04.03	AA	N (19.06.2003)	13
5	NA	17	4.04.00	AA	T	284
6	KJ	20	26.03.04	AA	N (14.11.2004)	96
7	CD	76	31.03.04	G	N (15.01.2005)	43
8	JŁ	19	9.11.04	G	T	46
9	KE	19	27.01.01	G	N (27.06.2005)	231
10	PH	65	1.11.04	AA	T	46

**Tabela 2.** Chorzy z nisko zróżnicowanym guzem ośrodkowego układu nerwowego leczeni szczepionką przeciwnowotworową (dane kliniczne)

**Table 2.** Patients suffering from malignant tumors of CNS treated by antineoplastic vaccine (clinical dates)

LP	Lokalizacja/ Localization	Stan chorego (Karnofsky Index)/ The examination of activity	Stopień radykalności operacji/ The radicality of excision	Zastosowana radioterapia (Tak/Nie)/ Radiotherapy used (Yes/No)	Zastosowana chemioterapia (Tak/Nie)/ Chemiotherapy used (Yes/No)	Stosowany deksametazon (minimalna–maks. dawka dobową)/ Dexametason used (min-max. daily dose)
1	BF	100	ST	T	N	0–16 mg
2	T	100	ST	T	N	0–24 mg
3	BO	100	ST	T	N	0–16 mg
4	BF	80	ST	N	N	0–16 mg
5	T	100	ST	T	T (temozolomid-3 cykle)	0–16 mg
6	BF	100	ST	T	T (temozolomid-2 cykle)	0–24 mg
7	F	90	ST	T	N	0–24 mg
8	T	100	ST	T	N	0–16 mg
9	T	100	ST	T	T (temozolomid-6 cykli)	0–16 mg
10	BF	100	ST	T	N	0–16 mg

BF – bifrontal, F – frontal, T – temporal, BO – bioccipital, ST – subtotal

znano gwiazdZIaka anaplastycznego. W grupie leczonych znajdowało się 6 chorych, którzy operowani byli po raz pierwszy w Klinice Neurochirurgii i Neurotraumatologii i tam też mieli wykonywaną diagnostykę histopatologiczną. Pozostali 4 chorzy operowani byli w innych ośrodkach neurochirurgicznych w kraju, natomiast w klinice mieli badanie weryfikujące i potwierdzające uprzednio postawione rozpoznanie. Wszyscy chorzy przed przyjęciem do kliniki mieli wykonywane badania obrazowe potwierdzające i zarazem lokalizujące zmianę nowotworową. Po leczeniu operacyjnym, którego celem było radykalne zmniejszenie objętości guza lub jego makroskopowe usunięcie, wszyscy chorzy mieli dalsze leczenie uzupełniające w postaci naświetlania w dawce sumarycznej 6000 cGy, wykonywane w sposób konwencjonalny lub stereotaktyczny. U 3 chorych zastosowano również chemioterapię z użyciem temozolomidu i w tych przypadkach leczenie uzależnione było od przychylności regionalnych oddziałów Narodowego Funduszu Zdrowia lub rodziny.

Na przeprowadzenie projektu badawczego otrzymano zgodę Komisji Bioetycznej przy Akademii Medycznej w Bydgoszczy w 2001 r. Każdy z chorych po poinformowaniu o celu projektu badawczego podpisywał indywidualną świadomą zgodę na udział w badaniu. Czas obserwacji obejmuje lata 2001–2005.

W trakcie planowego zabiegu operacyjnego po dotarciu do guza pobierany był jego fragment makroskopowo najbardziej zmienionej części. Fragment guza wielkości co najmniej 1 cm<sup>3</sup> umieszczano w 50 ml podłoża (*Dulbecco Minimal Essential Medium*, DMEM, surowica FCS, 5%, penicylina 100U/ml i streptomycyna 100 ug/ml). W laboratorium zmieniano podłoże, tkankę guza dezagregowano mechanicznie, a następnie enzymatycznie (z użyciem kolagenazy, pronazy i DNA-azy). Otrzymaną zawiesinę komórek nowotworowych wirowano, zawieszano w podłożu DMEM z dodatkiem glutaminy 2 mmol/l oraz antybiotyków i wysiewano na płytki hodowlane. Hodowlę pierwotną komórek nowotworowych prowadzono 3–4 tyg. w podłożu zawierającym DMEM/medium Hama F10 w proporcji 1:1 z dodatkiem surowicy (FCS), 20%, czynników wzrostu (EGF, bFGF i PDGF), antybiotyków i insuliny. Po uzyskaniu wzrostu konfluentnego, komórki transfekowano zestawem Fugene 6 Transfection Reagent (Roche, nr kat. 181443) w proporcji Fugene/plazmidowy DNA 3:1. Użyto 1 µg wektora pMT-EP, skonstruowanego w sposób opisany uprzednio. W skrócie, wektor zawierał promotor metalotioniny indukowanej solami metali ciężkich, miejsce początku replikacji *ori* wirusa Epsteina-Barra, sekwencje wzmacniające tego wirusa (EBNA) oraz geny oporności dla higromycyny

i ampicyliny. Jako gen reporterowy posłużył lacZ (gen beta-galaktozydazy), transkrypcję indukowano jonami Zn ( $50 \mu\text{mol/L}$ ). Pod kontrolą promotora znajdował się transgen zawierający sekwencję oligopurynową, kodującą oligonukleotydy tworzący strukturę *triple-helix* (tripleks) z promotorem genu dla IGF-1. W niektórych eksperymentach posłużono się identycznym wektorem kodującym zamiennie typowy antysens genu IGF-1 (anty-IGF-1). Transkrypcję transgenu indukowano roztworem siarczynu cynku  $50 \mu\text{M}$ . Wydajność transfekcji sprawdzono barwieniem techniką X-Gal (substratu reakcji barwnej katalizowanej przez beta-galaktozydazę), wynosiła ona zwykle 5–8%. Hodowlę komórek po transfekcji prowadzono w podłożu z dodatkiem higromycyny B ( $0,5 \mu\text{g/ml}$ ), w którym komórki nietransfekowane ginęły. Komórki hodowano przez kolejne 3–4 tyg. tak, by uzyskać ilość odpowiednią do sporządzenia szczepionki. Po tym czasie komórki w ilości 4–5 mln naświetlano promieniowaniem jonizującym o energii X-10 MV i w dawce 5000 cGy w celu zahamowania podziałów komórkowych. Tak spreparowane komórki zawieszano w 1 ml soli fizjologicznej (ok. 1 mln komórek/ml) i podawano w równych odstępach, co 4 tyg. podskórnie typowo w okolicę ramieniową [13,14].

Do genoterapii z zastosowaniem techniki antysensu i tripleksu anty-IGF-1 można kwalifikować chorych w każdym stadium klinicznym glejaka, a więc także chorych z odrostem. Terapia genokomórkowa u naszych chorych miała charakter uzupełniający i w niczym nie zmieniała uznanego racjonalnie i zasadniczego leczenia tego typu nowotworów – chorzy byli operowani, naświetlani i w indywidualnych przypadkach mieli stosowaną chemioterapię. Jedynym warunkiem było uzyskanie odpowiedniej populacji komórek nowotworowych w hodowli i ich przygotowanie zgodnie z powyżej opisaną techniką.

Chorzy poddawani byli również klasycznie w tych przypadkach stosowanej steroidoterapii w dużym zakresie dawek terapeutycznych.

Ocena kliniczna chorych obejmowała wystąpienie, rozległość i czas trwania zmian miejscowych po podaniu szczepionki, pomiar tętna, ciśnienia tętniczego, OB, badanie morfologii krwi, ocenę obrazową zmiany nowotworowej przed i po operacji w celu oceny radykalności zabiegu operacyjnego, stan neurologiczny przed i po operacji. Reakcję immunologiczną oraz wielkość jej odpowiedzi oceniano badaniami subpopulacji limfocytów krwi obwodowej (tab. 3.).

**Tabela 3.** Markery oznaczone we krwi chorych poddanych terapii szczepionką przeciwnowotworową w leczeniu nisko zróżnicowanych guzów OUN celem oznaczenia immunologicznej odpowiedzi komórkowej

**Table 3.** The blood markers of immunological cell answer of the patients suffering from malignant tumor of CNS treated by antineoplastic vaccine

Marker/Marker	Znakowana subpopulacja limfocytów/Marked lymphocytes subpopulation
CD 3	limfocyty T
CD 4	limfocyty T pomocnicze (T helper cells, Th)
CD 8	limfocyty T cytotoksyczne T cytotoxic/suppressor cells, Tc/Ts)
CD 19	limfocyty B
CD 3-(16+56)+	limfocyty NK
CD 25	limfocyty z receptorem dla interleukiny-2 (IL-2R, marker wczesnej aktywacji limfocytów, charakterystyczny dla komórek proliferujących)
CD 4+25+	limfocyty Th dodatnie IL-2R
CD 8+25+	limfocyty Tc/Ts dodatnie z IL-2R
CD 45 R 0	limfocyty z markerem charakteryzującym uczulone komórki
CD 4+ 45R 0+	uczulone komórki pamięci Th
CD 8+ 45R 0+	uczulone komórki pamięci Tc
CD 11 b	komórki z receptorem dla fragmentu dopełniacza C3bi (jedna z odmian łańcucha alfa cząsteczki integriny)
CD 8+ 11b+	komórki CD 8 o fenotypie komórek limfocytów supresorowych (Ts+)
CD 8+11b-	komórki CD 8 o fenotypie komórek limfocytów supresorowych (Ts-)
CD 5	limfocyty T i subpopulacja limfocytów B
CD 19+ 5+	subpopulacja limfocytów B uczestniczących w odpowiedzi na antygeny T-niezależne

## Wyniki

Z grupy 10 chorych leczonych z powodu nowotworu – glejaka wielopostaciowego lub gwiaździaka anaplastycznego 7 chorych zmarło wskutek rozwoju objawów związanych z rozrostem guza. Średnia czasu przeżycia tych chorych wynosiła 93,3 tyg., co oznacza 21,7 mies. Jest to wyraźnie wydłużenie czasu przeżycia tych chorych o 10 mies., jednak z dużą ostrożnością przypisywalibyśmy to tylko podawanej szczepionce. Nie obserwowaliśmy dynamiki procesu nowotworowego w tym okresie, w którym chorzy mieli podawane szczepionki zawierające zmienione komórki nowotworowe. Na takie wyniki wpływać może również to, że chorzy równolegle mieli realizowaną terapię przewidywaną w leczeniu glejaka. W badanej grupie znajdowała się chora, u której rozpoznano glejaka wielopostaciowego w roku 2001 i jej czas przeżycia wyraźnie wydłuża średnią czasu przeżycia całej siedmioosobowej grupy. Po wyłączeniu tej chorej z analizy czas przeżycia 6 chorych, którzy zmarli wynosi 60,3 tyg., czyli 14, 8 mies.

Z obserwowanej grupy 10 chorych 3 osoby żyją nadal i czas przeżycia do chwili obecnej wynosi średnio 29,2 mies. W grupie tej znajduje się jedna osoba obserwowana 284 tyg., co stanowi 66,2 mies. Pozostałe 2 osoby żyją już po 46 tyg., czyli 10,7 mies. U 2 żyjących chorych w kolejnych badaniach nie obserwuje się dynamiki procesu nowotworowego, a u 1 chorego w badaniu rezonansu magnetycznego głowy nie stwierdza się procesu nowotworowego. Na takie wyniki może wpływać nie tylko stosowanie wspomnianej szczepionki, ale również i to, z czego zdajemy sobie sprawę, że chorzy równolegle mieli realizowaną terapię onkologiczną, jako leczenie uzupełniające.

Oznaczanie i zmiany w subpopulacji limfocytów krwi obwodowej wykonywane przed operacją oraz w kolejnych dniach podawania szczepionki, wykazywały tendencję do wzrostu odsetka komórek Th z markerem wczesnej aktywacji CD 25 oraz wzrost odsetka uczulonych komórek pamięci we krwi obwodowej badanych chorych (CD4+CD45RO+ lub CD8+CD45RO+) w serii kolejnych oznaczeń. Były to jedyne obserwowane zmiany w subpopulacji limfocytów. Nie można wykluczyć, że stanowiły one wyznacznik zmienionej odczynowości skierowanej przeciw antygenom nowotworu.

## Omówienie

Glejaki są najbardziej złośliwymi nowotworami ośrodkowego układu nerwowego i ich leczenie jak dotychczas kończy się niepomyślnie. Dotychczasowe wyniki, leczenia obejmujące cytoredukcję radykalną oraz leczenie uzupełniające w postaci radioterapii konwencjonalnej i/lub stereotaktycznej oraz chemioterapię łącznie z temozolomidem zmuszają do poszukiwania innych, alternatywnych metod leczenia glejaków wielopostaciowych. Radykalna cytoredukcja, czyli operacyjne usunięcie zmiany może za sobą pociągać znaczne ubytki neurologiczne, zmieniające sprawność chorego i pogarszające jego komfort życiowy. Pozostawienie stosunkowo dużego fragmentu guza, którego usunięcie może spowodować zagrożenie dla życia chorego jest z pewnością niekorzystne dla dalszego prognozowania. Fragment guza o grubości ściany 1,5–2 cm lub masa guza o średnicy przekraczającej 3 cm stanowić będzie znaczne utrudnienie dla radioterapii. Taka wielkość pozostawionego fragmentu guza lub sam guz można naświetlać i/lub stosować leczenie brachyterapią. Doniesienia podsumowujące wyniki leczenia glejaków każdą z tych metod wskazują na dużą bezradność i niepowodzenie w tej walce o życie chorego lub choćby o jego przedłużenie, stąd poszukiwanie nowych metod leczenia, które wykorzystują reakcję organizmu na wprowadzone do niego antygeny. Stosowano szczepionki składające się z komórek nowotworowych sprzężonych z limfocytami B, stosowano retrowirus zawierający gen kodujący kinazę tymidynową albo wektor kodujący IL-2. Te terapie genowe nie dały pomyślnych rezultatów i nie spełniły pokładanych w nich nadziei i dlatego uwaga badaczy skierowała się na różne czynniki wzrostu, stymulujące komórki nowotworowe do namnażania się. Dużą przedkliniczną skuteczność prezentowało zablokowanie insulinowego czynnika wzrostu-1 i 2. Zastosowanie techniki antysensu do IGF-1 w badaniach przedklinicznych wykazało dużą skuteczność, powodując nawet zniknięcie nowotworu. Było to ogromnym zaskoczeniem, a zarazem bodźcem do poszukiwania w tej metodzie nowego oręża w walce z nowotworem. Dzięki opisanej metodzie pozwalającej na uzyskanie szczepionki, komórki nowotworowe transfekowane wektorem wirusa mają wyraźnie podwyższoną immunogenność, a poprzez naświetlanie pozabawiane są złośliwości. Są to niejako *własne* komórki nowotworowe, podawane w miejsce łatwo dostępne, położone z daleka od okolicy operowanej, wywołujące

reakcję odpornościową pacjenta. Kilkakrotnie, w odstępach co 4 tyg. podawana szczepionka wyzwała odpowiedź immunologiczną, która niszczy komórki podawane w szczepionce oraz niszczy komórki, które mają ten sam genotyp w guzie, powodując jego zmniejszenie się lub zahamowanie ekspansji. Wzrost immunogenności komórek transfekowanych i podawanych choremu w formie szczepionki jest bardzo istotnym i korzystnym zjawiskiem dla organizmu, potęgującym jego zdolności obronne. Pozostaje to w kontraście do słabej odpowiedzi immunologicznej, jaką obserwujemy w chorobach nowotworowych, co może być spowodowane tym, że na powierzchni tych komórek, które nazywano kiedyś *lysymi* istnieją nieliczne, jak wykazały ostatnie badania, prezentowane receptory.

Z pewnością nie do końca poznaliśmy rolę IGF-1 w rozwoju nowotworu, ale komórki nowotworowe zmienione wektorami syntetyzują białka zgodności tkankowej MHC-1 oraz cząsteczki B-7 stając się podatnymi na rozpoznanie i odpowiednie działanie układu immunologicznego gospodarza. Jakby potwierdzeniem tego kierunku działania są prace doświadczalne w leczeniu równie groźnego nowotworu, a mianowicie czerniaka. W leczeniu czerniaka wykorzystuje się komórki autologiczne z *podłączonym* fragmentem genowym komórek nowotworowych.

Wszyscy objęci badaniem chorzy poddawani byli steroidoterapii. Nieznany w momencie rozpoczęcia badania wpływ podawania szczepionki na stan ogólny chorych nie pozwalał na wyłączenie tego typu farmakoterapii z leczenia objętych badaniem chorych.

W badaniach nie stosowano wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej w inny sposób, tak jak czynił to Apuzzo. Wzmoczoną odpowiedź immunologiczną typu komórkowego ze strony limfocytów T (CD8) uzyskano wstrzykując komórki nowotworowe, w których zahamowano syntezę IGF-1. Zahamowanie syntezy IGF-1 powoduje nie tylko zwiększenie odpowiedzi immunologicznej, ale również powoduje uaktywnienie procesów apoptozy w komórce, a przeciwieństwo IGF-1 chroni przed apoptozą między innymi komórki nerwowe. Uzyskane wyniki leczenia chorych z glejakami z wykorzystaniem techniki antysensu i tripleksu anty IGF-1 stwarzają pewną nadzieję w leczeniu tych najgroźniejszych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego.

## Wnioski

Stosowana metoda jest metodą nową i musi być sprawdzona i poparta dalszymi obserwacjami klinicznymi. Z dużą ostrożnością pozwala wyrażać nadzieję, że może być ona leczeniem uzupełniającym w leczeniu glejaka w celu wydłużenia czasu przeżycia chorego.

### Oświadczenia i podziękowania

Praca została wykonana dzięki finansowaniu w ramach grantu KBN nr 3PO5B08923.

### Piśmiennictwo

- Guo Y., Wu M., Chen H. i wsp. Effective tumor vaccine generated by fusion of hepatoma cells with lymphocytes B cells. *Science* 1994; 263: 518-520.
- Apuzzo M.L., Mitchell M.S. Immunological aspects of intrinsic glial tumors. *J Neurosurg* 1981; 55: 1-18.
- Ly A., François J.C., Lia C. i wsp. Alterations in tumorigenicity of embryonal carcinoma cells by IGF-1 triple helix induced changes in immunogenicity and apoptosis. *Life Sci* 2000; 68: 307-319.
- Lia C., Upegui-Gonzalez L., François J.C. i wsp. Use of the IGF-1 antisense strategy in the treatment of the hepatocarcinoma. W: Walden i wsp. [red.]. *Gene Therapy of Cancer. Plenum Press, New York* 1998, s. 35.
- Wysocki P.J., Karczewska A., Mackiewicz A. Gene modified tumor vaccines in therapy of malignant melanoma. *Otolaryngol Pol* 2002; 56: 147-153.
- Trojan J., Blosser B.K., Johnson T.R. i wsp. Loss of tumorigenicity of rat glioblastoma directed by episome-based antisense cDNA transcription of insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4874-4878.
- Trojan L.A., Kopinski P., Wei M.X. i wsp. IGF-I: from diagnostic to triple-helix gene therapy of solid tumors. *Acta Biochim Pol* 2002; 49: 979-990.
- Szpechcinski A., Trzos R., Jarocki P. i wsp. Presence of MHC-I in rat glioma cells expressing antisense IGF-I-receptor RNA. *Ann Acad Med Bial* 2004; 49 (supl. 1): 98-104.
- Upegui-Gonzalez L.C., Ly WSP., Sierzeża M. i wsp. IGF-I triple helix strategy in hepatoma treatment. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 656-662.
- Ly A., François J.C., Duc H.T. i wsp. IGF-I triple helix technology changes tumorigenicity of embryonal carcinoma cells by immune and apoptotic effects. *Life Sci* 2000; 68: 307-309.
- Trojan L.A., Kopinski P., Mazurek A. i wsp. IGF-1 triple helix gene therapy of rat et human gliomas. *Ann Acad Med Bial* 2003; 48: 18-27.
- Trojan J., Duc H., Upegui-Gonzalez L. i wsp. Presence of MHC-1 and B-7 molecules in rat and human glioma cells expressing antisense IGF-1 mRNA. *Neurosci Lett* 1996; 212: 9-12.
- Baserga R., Resnicoff M., D'Ambrosio C. i wsp. The role of the IGF-I receptor in apoptosis. *Vitam Horm* 1997; 53: 65-98.
- Kasprzak H.A., Bierwagen M., Śniegocki M. Wpływ zastosowania genoterapii na biologię reoperowanych niedojrzałych glejaków wielopostaciowych. *Neurol Neurochir Pol* 2004; 38 (supl. 2): S100.