

Dr n. przyr. Maria WYSOCKA

Streszczenie wykładu:

Aspekty immunologiczne skórnej postaci chłoniaka T-komórkowego (CTLC)

Immunoterapia nowotworów – manipulowanie układem immunologicznym na przykładzie chłoniaka CTLC

Skórny chłoniak limfocytów T (Cutaneous T Cell lymphoma, CTCL) jest stosunkowo rzadko występującą chorobą wywodzącą się z komórek T CD4 osiedlonych w skórze. Najczęściej spotykane są dwie postaci tej choroby: mycosis fungoides (MF) i Sezary Syndrome (SS). U chorych na MF obecność komórek nowotworowych stwierdzana jest głównie w skórze, podczas gdy u chorych z SS komórki nowotworowe wykrywane są nie tylko w skórze, ale i w krążeniu, a w zaawansowanych stadiach choroby także w węzłach chłonnych. Jak w przypadku wszystkich nowotworów, wczesne wykrycie choroby jest bardzo istotne, szczególnie dla pacjentów z SS, którzy w porównaniu z pacjentami z MF, mają znacznie gorsze rokowanie, czyli szanse przeżycia powyżej 5 lat.

Rozpoznanie choroby nie jest łatwe, nieznane są markery diagnostyczne, które byłyby swoiste tylko dla tej choroby. W pobieranych wycinkach skóry i w limfocytach wyizolowanych z krwi poszukiwane są komórki o nietypowej morfologii, z jądrem komórkowym kształtem przypominającym zminiaturyzowany mózg (*cerebriform nuclei*). We wczesnym etapie choroby rozpoznanie jest szczególnie trudne ze względu na brak wyraźnych objawów, co skutkuje koniecznością pobierania wielu wycinków skóry od pacjenta na przestrzeni kilku miesięcy w celu ustalenia rozpoznania.

Według obecnego stanu wiedzy, komórki chłoniaka skórniego mają następujący fenotyp: CD4+CD45RO+CCR4+CLA+CD26-T-plastin+. Poza markerem T-plastin-wewnątrz komórkowym białkiem wykrywanym tylko w komórkach chłoniaka, wszystkie inne markery wykrywane są także na powierzchni normalnych pobudzonych komórek T CD4, jednakże w mniejszych ilościach niż na komórkach nowotworowych. Dlatego też nie ustają poszukiwania nowych markerów powierzchniowych, które pozwoliłyby na odróżnienie komórki nowotworowej od pobudzonego limfocyta T CD4.

Jak dotąd nie jest znany czynnik, który wywołujący tę chorobę. Fakt, że komórki nowotworowe znajdowane w skórze pacjentów skupiają się wokół komórek Langerhansa, tj. skórnych komórek dendrytycznych, wydaje się sugerować obecność antygeny, który powoduje utrzymującą się stymulację komórek T, prowadzącą do transformacji nowotworowej i niekontrolowanego rozrostu komórek T CD4 z określonym receptorem TCR β . Natura i pochodzenie tego stymulującego antygeny nadal pozostaje nieznana. Pojawiająca się w konsekwencji tej domniemanej stymulacji

antygenowej populacja komórek nowotworowych ma cechy limfocytów pomocniczych (Th2) produkujących cytokiny/interleukiny: IL-4, IL-5 i IL-10. Postęp choroby oznacza wzmocnienie odpowiedzi typu Th2 i stopniowe obniżanie odpowiedzi komórkowej Th1 powodując spadek produkcji interleukiny IL-2 i interferonu gamma (IFN- γ).

Brak silnej odpowiedzi komórkowej ma konsekwencje na poziomie odporności wrodzonej, co przejawia się głównie brakiem aktywowanych naturalnych komórek cytotoksycznych (NK), jak i na poziomie odpowiedzi wtórnej osłabionej brakiem cytotoksycznych komórek T CD8 rozpoznających także komórki nowotworowe.

W naszym laboratorium, badając przyczyny obniżonej odpowiedzi komórkowej u pacjentów z CTCL zauważyliśmy zależność pomiędzy postępującą chorobą i niskim poziomem produkowanych interleukin, takich jak IL-12, IFN- α czy IFN- γ , czyli czynników kluczowych w rozwoju odpowiedzi typu 1-ego. Dalsze badania wykazały, że przyczyną niskich poziomów tych cytokin u pacjentów jest spadek liczby szpikowych komórek dendrytycznych, produkujących IL-12 i limfoidalnych (plazmacytoidalnych) komórek dendrytycznych, produkujących IFN- α . Podanie pacjentom czynnika krwiotwórczego stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) okazało się być jednym ze sposobów zwiększenia liczby szpikowych komórek dendrytycznych. Oprócz komórek dendrytycznych, pacjenci wykazują obniżoną liczbę komórek NK i cytotoksycznych komórek T CD8, które to komórki są głównymi producentami IFN- γ .

Badania przeprowadzone na modelu mysim, a także wyniki doświadczeń *in vitro* z limfocytami obwodowymi pacjentów wyraźnie sugerowały, że wzmocnienie odpowiedzi komórkowej może spowodować obniżenie, a nawet zahamowanie odpowiedzi odpornościowej typu 2-iego, co w przypadku pacjentów z CTCL mogłoby oznaczać wyzdrowienie lub zahamowanie choroby i utrzymanie kontroli nad jej postępem. Wzmacnianie odpowiedzi komórkowej pacjentów przy pomocy tzw. immunomodulatorów aktywujących różne populacje komórkowe układu odporności wrodzonej jest obecnie szeroko stosowane w klinice CTCL Uniwersytetu Pensylwania.

Obserwacja, że u pacjentów z chłoniakiem, niska odpowiedź komórkowa typu 1-ego jest częściowo wynikiem niskiego poziomu cytokin odpowiedzialnych za wywołanie tego typu odpowiedzi, uzasadniała zastosowanie cytokin w leczeniu tych chorych. Dodatkowym czynnikiem przemawiającym za stosowaniem cytokin w leczeniu pacjentów były obiecujące wyniki badań przeprowadzone na modelu mysim.

IL-12, IFN- γ i IFN- α są obecnie najczęściej stosowanymi cytokinami w leczeniu chorych na chłoniaka skórno. Podawane są pacjentom albo w formie czystych cytokin albo są wytwarzane przez komórki układu immunologicznego pacjentów w odpowiedzi na podanie czynników stymulujących układ immunologiczny poprzez receptory tzw. Toll-podobne (*Toll-like receptor, TLR*), które są obecne na powierzchni różnych komórek układu odpornościowego, włącznie z komórkami dendrytycznymi.

Interleukina-12, cytokina produkowana głównie przez szpikowe komórki dendrytyczne, a także przez aktywowane makrofagi, wykazała zdolność do indukcji silnej odpowiedzi przeciwnowotworowej w modelu mysim. Wyniki badań z naszego laboratorium, przeprowadzone na limfocytach pobranych z krwi pacjentów z chłoniakiem wykazały, że IL-12 zwiększa aktywność cytotoksyczną komórek NK, ich zdolność do produkcji IFN- γ i aktywuje komórki T CD8.

Na podstawie tych wyników przeprowadzono próby kliniczne: u 50% pacjentów zanotowano zanik nacieków komórek nowotworowych w skórze wskazujący na terapeutyczny efekt stosowania IL-12. Szczegółowe badania wykazały nagromadzenie się komórek T CD8 w skórze leczonych pacjentów, sugerując krytyczną rolę tych komórek w eliminacji komórek nowotworowych.

Interferon- α (IFN- α), produkt plazmocytoidalnych komórek dendrytycznych odpowiadających na infekcje wirusowe, jest cytokiną aktywującą różne komórki m.in. T CD8 i NK. Komórki T CD8 i komórki NK mają zdolność eliminacji komórek różniących się od komórek gospodarza, czyli komórek nowotworowych. IFN- α , ze względu na swoje zdolności do wzmacniania komórkowej odpowiedzi typu 1-go i obniżania odpowiedzi typu 2-giego, jest stosowany w leczeniu chłoniaka skórniego, często w połączeniu z innymi lekami.

Wspomniane wyżej receptory Toll określane są jako receptory rozpoznające wzorce (*pattern recognition receptors- PRR*). Wzorce, czyli najbardziej charakterystyczne cząsteczki drobnoustrojów posiadające stałą strukturę nazywane są wzorcami molekularnymi związanymi z patogenami (*pathogen associated molecular patterns-PAMP*). Przykładem takich molekularnych wzorców może być LPS, lipopolysacharyd obecny w ścianach bakterii Gram ujemnych, bakteryjny DNA czy wirusowy RNA. Repertuar receptorów Toll jest różny na różnych komórkach, co znajduje odbicie w produkowanych przez te komórki cytokinach. Ludzkie komórki dendrytyczne mają na swej powierzchni szereg receptorów Toll, ale są różnice w repertuarze pomiędzy szpikowymi i plazmocytoidalnymi komórkami; szpikowe komórki dendrytyczne mają na swej powierzchni receptor TLR4, który rozpoznaje LPS i receptor TLR 8 rozpoznający wirusowe RNA, podczas gdy plazmocytoidalne komórki mają receptor TLR7, również rozpoznający wirusowe RNA i receptor TLR9, który rozpoznaje bakteryjne DNA.

Syntetycznie uzyskane ligandy wiążące się z receptorami Toll na komórkach dendrytycznych i aktywujące te komórki, jak również cały układ immunologiczny, otworzyły możliwości zastosowania tych ligandów w klinice, także w leczeniu skórniego chłoniaka. Wyniki uzyskane w naszym laboratorium pokazały, że w warunkach *in vitro*, limfocyty pacjentów z chłoniakiem odpowiadały na stymulację z syntetycznymi oligonukleotydami stymulującymi TLR9 a także na stymulację z syntetycznymi ligandami dla TLR7 i TLR8. Stymulacja TLR7 i TLR9 inicjowała produkcję IFN- α przez plazmoidalne komórki dendrytyczne a stymulacja TLR8, obecnego na szpikowych komórkach dendrytycznych, indukowała produkcję IL-12. W konsekwencji, obserwowaliśmy także wzrost aktywności komórek T CD8 i komórek NK. Zakończona próba kliniczna, w której zastosowano podane podskórnym syntetyczne oligonukleotydy (CpG-ODN) stymulujące TLR9, wykazała skuteczność tego typu terapii u większości pacjentów z chłoniakiem, co przejawiało się całkowitym zanikiem nacieków komórek T w skórze. Aktualnie przeprowadzane są próby kliniczne z zastosowaniem syntetycznego ligandu stymulującego jednocześnie TLR7 and TLR8. Wstępne wyniki wykazują zanik skórnych nacieków nowotworowych po miesiącu leczenia u dwóch pierwszych pacjentów. Badania biopsji skórnych wykazały wysoką liczbę limfocytów T CD8 i komórek NK w otoczeniu komórek nowotworowych.

Efektywnie działający układ immunologiczny zapewnia obronę przed infekcją jak też i przed nowotworem. Jednakże, z przyczyn bardzo często jeszcze niezbyt dobrze

rozumianych, nasz układ immunologiczny nie wypełnia skutecznie swojego zadania i wymaga pomocy. Stosowanie cytokin czy syntetycznych ligandów receptorów Toll jest próbą wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej, co w przypadku pacjentów z chłoniakiem skórnym często decyduje o powodzeniu w walce z chorobą nowotworową. Nasze badania wykazują, że aktywacja różnych populacji komórkowych poprzez zastosowanie kombinacji kilku różnych czynników terapeutycznych, prowadzi do rozwoju optymalnej i silnej odpowiedzi typu 1-ego, tak bardzo ważnej dla pacjentów obarczonych chorobą nowotworową.