

Odgovor antitijela na intravezikalnu instilaciju KLH-a u bolesnika s površnim karcinomom mjehura

Carlos Winkler, Karl Friedrich Klippel

Klinika za urologiju, dječju urologiju i andrologiju, Allgemeines Krankenhaus Celle, Njemačka

Izvorni znanstveni članak

UDK 616:62-006.6:616-097

Prispjelo: 9. kolovoza 2007.

Analizirana je bila dinamika specifične produkcije KLH-antitijela nakon intrakutane i intravezikalne instilacije KLH-a. U razmatranju je bilo 9 bolesnika, i to 7 muškaraca i 2 žene, u dobi od 45 do 75 (prosječna vrijednost 68.6 god.), svi s primarnim površnim karcinomom mjehura. Ti su bolesnici nakon kompletne resekcije tumora bili imunizirani intrakutanom injekcijom 1 mg Keyhole limpet haemocyanin (KLH). Postupak je nastavljen intravezikalnom aplikacijom 20 mg KLH-a u 20 ml fiziološke otopine jedanput tjedno, tijekom sljedećih 6 tjedana, a zatim tijekom godine dana, jedanput mjesečno i konačno, svaka 2 mjeseca tijekom sljedeće 2 godine. Antitijela prema KLH-u bila su u serumu ovih bolesnika određivana pomoću posebno razvijenoga i direktno povezanoga imunosorbentnoga esaja (ELISA: prema H. von Kammer. Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Njemačka). Primjerak krvi uzet je za ispitivanje titra antitijela prije postupka i 8 tjedana nakon postupka.

Titar KLH-antitijela u bolesnika s karcinomom mjehura signifikantno je porastao nakon terapije KLH-om (Mann-Whitney test $P=0.02$), uz napomenu da je ta razina u većem rasponu varirala od bolesnika do bolesnika.

Od tih je 9 bolesnika 6 (67%) pokazivalo povišeni serumski titar antitijela prema KLH-u, dok su 4 bolesnika (44.4%) bila bez tumora tijekom promatranja koje je trajalo od 10 do 45 mjeseci (srednja vrijednost 30.7 mjeseci). Jedan bolesnik koji nije imao povišeni titar antitijela prema KLH-u bio je također bez recidiva, dok su daljnja 2 bolesnika doživjela recidiv tumora, i to nakon aplikacije KLH-a. Dva su bolesnika pokazala recidiv tumora, unatoč povišenom titru antitijela. Ni u jednoga bolesnika s recidivom nakon primjene KLH-a, nije bilo progresije tumora. Četvorica od 5 bolesnika (80%) bez recidiva pokazivali su pozitivni kožni test. Od bolesnika pak s recidivom tumora 50% ih je imalo negativni kožni test. Recidiv tumora imalo je 44.4% bolesnika tretiranih s KLH-om. Stupanj recidiva iznosio je 1.6, dok je vrijeme pojave recidiva bilo 8.75 mjeseci.

Instilacija KLH-a nije uzrokovala značajnije negativne posljedice. Pozitivni kožni test i odgovor antitijela na KLH više su registrirani u bolesnika s pozitivnim odgovorom, tj. u onih koji nakon terapije nisu više imali tumor nego u onih bolesnika koji su bili bez odgovora. Produkcija antitijela na KLH čini se da je biološki odgovor na antigenski stimulus KLH-a.

ključne riječi: Keyhole limpet hemocyanine; Formiranje antitijela; Imunoenzimski test (ELISA); Karcinom, prijelazne stanice; Karcinom mokraćnoga mjehura - terapija

UVOD

KLH je korišten kao nosač molekule antigena prilikom imunizacije u humanoj medicini, kao i na animalnim modelima. Wirguin je izvijestio da imunizacija s KLH-om u Lewisovih štakora inducira produkciju antitijela anti-Gal(beta 1-3) i Gal Nac. To može objasniti djelotvornost lokalne imunoterapije s KLH-om na površni karcinom mjehura (što bi bila ukrštena reakcija odlučujućih faktora Gal(beta 1-3)Gal Nac. Otkriveno je i povišenje titra antitijela BCG-a i interferona nakon imunoterapije s BCG-om (1).

Instilacija jakoga imunogenoga sastava (KLH) u mokraćni mjehur provocira lokalnu alergičnu reakciju u organu s tumorom. Intrakutana injekcija provocira imunološku reakciju kože (odgođeni tip hipersenzitiviteta), pa na taj način predstavlja dijagnostičko imunološko oružje.

Ova studija ima namjeru procijeniti ulogu imunoterapije s KLH-om i ispitati predviđene vrijednosti pozitivne kožne reaktivnosti, kao i odgovor humoralnoga KLH-antitijela u bolesnika s karcinomom mjehura.

MATERIJAL I METODE

Bolesnici i metode

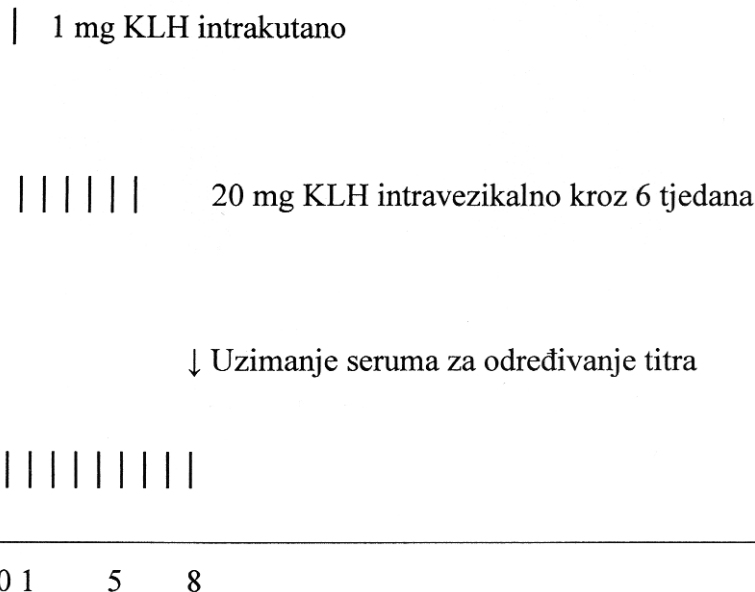
Ukupno je 9 bolesnika nakon kompletne resekcije primarnoga površnoga karcinoma mjehura (pTa/1. G1/3) lokalno tretirano s otopinom KLH-a.

Terapeutski postupak

Najprije je 1 mg KLH-a injiciran intrakutano da bi prouzročio lokalni eritem promjera od najmanje 1 cm. Ta injekcija uzrokuje primarnu imunološku reakciju kože prema KLH-u i u daljnjem postupku služi kao imuno-dijagnostička oznaka.

Pet do 7 dana nakon transuretralne resekcije tumora, mjehur je ispražnjen, mokraća je uzeta za citološko ispitivanje, a zatim je pod sterilnim uvjetima intravezikalno instilirano 20 mg KLH-a u otopini od 20 ml fiziološke otopine. Taj instilat bolesnik mora zadržati u mjehuru najmanje 2 sata nakon instilacije. Postupak je nastavljen tijekom 6 tjedana uz instilacije 20 mg. KLH-a jedanput tjedno. Nakon toga terapija se nastavlja istim instilacijama

Shema primjene



- Shema primjene - application scheme
- 1 mg KLH intrakutano - 1 mg of KLH intracutaneously administered
- 20 mg KLH intravezikalno kroz 6 tjedana - 20 mg of KLH intravesically administered over a 6-week period
- Uzimanje seruma za određivanje titra - extraction of serum for titer examination

SLIKA 1.

Aplikacijska shema za određivanje antitijela na KLH u serumu po Kleinknechtu i sur. (2).

FIGURE 1

Application scheme for determining antibodies against KLH in serum according to Kleinknecht et al. (2).

jedanput mjesečno tijekom 12 mjeseci i konačno, sljedeće dvije godine, također istim instilacijama, svaka dva mjeseca.

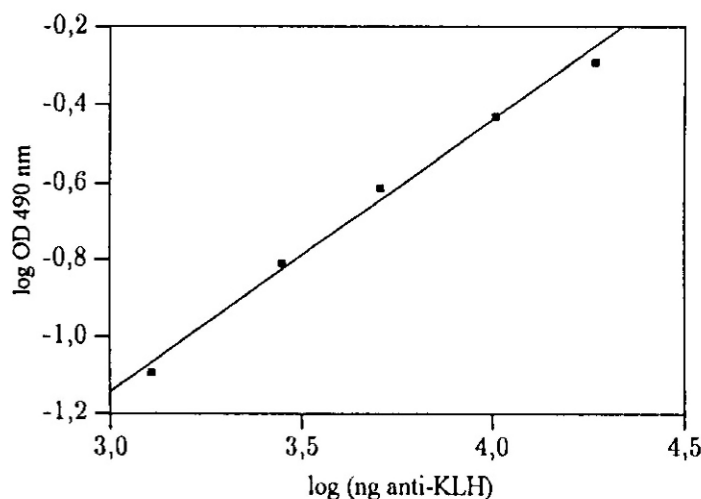
Kontrolni pregledi: Cistoskopija se provodi svaka 2 mjeseca, a citološki pregled mokraće jedanput mjesečno. Svako se područje sumnjivo na tumor uzima za biopsiju, dok se rubne biopsije uzimaju samo ako je citološki nalaz bio pozitivan. Recidivni tumori resekirani su transuretralnim putem, uz napomenu da se na takvim bolesnicima ne poduzimaju nikakve profilaktičke mjere. Na početku postupka izvrši se intravenska urografija te snimka pluća. Ehosonografija abdomena provodi se svakih 6 mjeseci ili prilikom sumnje na relaps tumora. Svi se popratni znakovi zabilježe.

Imunološko-laboratorijska procjena

Analizira se dinamika produkcije specifičnoga KLH-a antitijela nakon intrakutane i intravezikalne instilacije otopine KLH-a. Titar antitijela prema KLH-u kontrolira se dva puta, i to prije intrakutane injekcije KLH-a i 8 tjedana nakon terapije (2) (v. sl. 1).

Antitijela prema KLH-u određuju se pomoću nedavno razvijena eseja imunoglobulina. Posude s pločama mikrotitra napune se sa 100 ul otopine KLH-a (1 ml KLH na ml otopine

neutralizirane fosfatima (PBS)). Tako pripremljene ploče inkubiraju se na 14 sati pri temperaturi od 4°C. Posuda se ispire PBS otopinom i napuni s 200 ul čemu se doda i 10%-tni konjski serum. Nakon toga se ploče inkubiraju na sobnoj temperaturi tijekom 6 sati, sa svrhom da se blokira preostali kapacitet spajanja površine ploča. Nakon (još jednog) ispiranja PBS-om, ploče se deponiraju pri temperaturi od 4 stupnja. Imuni je odgovor bio optimalan pri volumenu od 100 ul seruma. Za određivanje titra antitijela prema KLH-u serum bolesnika bio je razrijeđen u odnosu 1:100 s 10%-tnim konjskim serumom (PBS). Vrijeme inkubacije na 37 stupnjeva C iznosilo je 2 sata. Nakon ispiranja PBS-om, svaka je posuda napunjena sa 100 ul razrijeđenoga antihumanoga imunoglobulinskog antitijela vezanoga na peroksidazu. Posude su smještene u inkubaciju pri 37°C na 1 sat. Nakon ispiranja PBS-om posude su napunjene sljedećim encimskim bufer-sustavom: 12.5 ml 0.2 M Na₂HPO₄, 12.5 ml 0.1 M citrične kiseline, 25 ml H₂O, 20 mg p-phenyl-diamina i 25 ml 30%-tne H₂O. Nakon 10 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi reakcija boje na pločama s mikrotitrom zaustavljena je pomoću 50 ul za ploču od 2.5 H₂SO₄. Pomoću ELISA fotometra određena je razlika između apsorpcije na 490 nm i apsorpcije na 550 nm (v. sl. 3.).



• Izravnanje / Alignment: $y = -3,2833 + 0,71199 x$; $r^2 = 0,995$

SLIKA 2.

Standard krivulje za direktni anti-KLH-ELISA test

FIGURE 2

Standard curve for a direct anti-KLH-ELISA test

Sklonost purifikacije antitijela prema KLH-u u serumu bolesnika.

U namjeri da se stvori jedan afinitetni matriks, pomiješano je 10 mg KLH-a s 5 mg Ph/NaOH kod pH 8.0 i povezano s 1 g. Sefarozе aktivirane s Tressylom (3). U svrhu purifikacije antitijela prema KLH-u, 7.7 ml KLH-antiseruma (tj. serum bolesnika s relativno visokim titrom antitijela protu-KLH) precipitirano je s 50%-tnim amonijum sulfatom. Precipitirani proteini dijaliziraju se pomoću 1 M 0.5 M NaCl pH 7.5, a zatim inkubiraju s prethodno spomenutim matriksom na 4°C tijekom 15 sati. Matriks se zatim ispirе s 0.1 M NaCl pH 7.5, a zatim diluira pomoću 0.2 M octene kiseline/0.5 M NaCl pH 2.5. Koncentracija proteina određena je prema Lowry i sur (4). Čistoća sastava kontrolirana je elektroforezom pomoću SDS polyacrylamida po Laemmliju (5). 105 ug anti-KLH-imunoglobulina izolirano je pomoću afinitetne kromatografije na matriksu KLH-a. Purificirana antitijela protu-KLH-a korištena su u direktnoj ELISA-i za njihovu detekciju. Slika 2. pokazuje standardnu krivulju dinamičkoga mjerenja ELISA-e.

Nije međutim bilo moguće koristiti purificirani imunoglobulin kao izravni standard jer je prilikom purifikacije imunoglobulin izgubio nešto od svojih afiniteta. Zbog visokoga pravocrtnoga tijeka standardne krivulje s izoliranim imunoglobulinima, oni ipak mogu biti korišteni u svrhu kalibriranja vanjskih standarda, koji se koriste za relativnu kvantifikaciju antitijela protu-KLH-a. Četri su različite posude oblikovane od 107 KLH antiseruma u odnosu prema njihovim antitijelima. Prva je posuda sadržavala serume s najvišim titrom antitijela. Druga je posuda sadržavala serume s nižim titrom od prve, itd., dok je ona zadnja sadržavala najniži titar antitijela. Sadržaj prve posude označen je s 1000. Nakon kvantitativne kalibracije pomoću izoliranih imunoglobulina, drugoj je posudi dodijeljena vrijednost od 448, trećoj 190 i četvrtoj posudi 38.5. Ta relativna kvantifikacija anti-KLH-imunoglobulina, korištena je u testiranju 9-orice bolesnika.

Statistička analiza

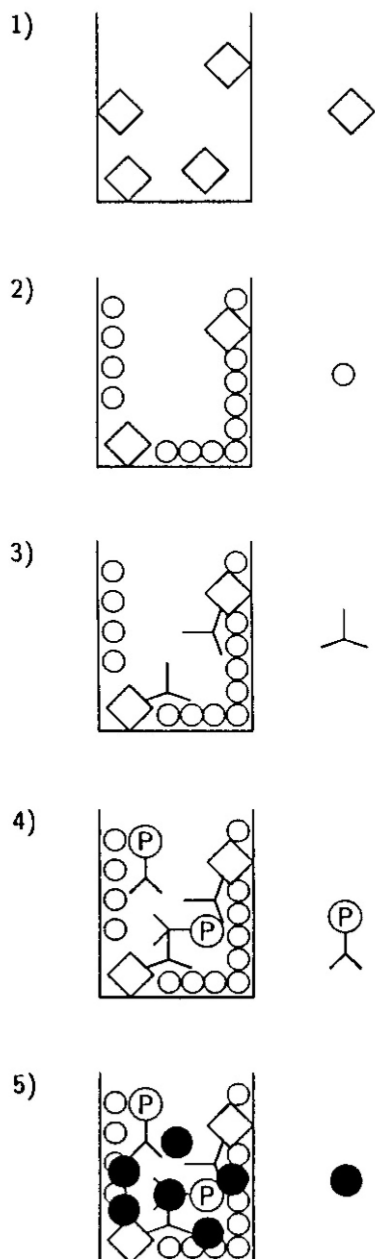
Titri KLH antitijela određivani su prije i poslije imunoterapije pomoću Mann-Whitneyjevog testa (6). Statistička pak analiza provedena je pomoću NCSS programa (7).

REZULTATI

Reakcija antitijela na KLH: liječenje bolesnika s površnim karcinomom mjehura

Signifikantan je bio porast serumskih antitijela pod utjecajem terapije KLH-om (Mann-Whitneyjev test $p=0.02$). Kod ukupno 6 od 9 bolesnika (67%) moglo se dokazati porast titra KLH-antitijela (Br.1,2,4,5,7,8). Između tih 6 bolesnika, 4 su bila bez recidiva u razdoblju od 10 do 45 mjeseci (prosjeak 30.7). Jedan bolesnik kod kojega nije zabilježen porast titra (br. 3), također nije imao recidiva. Dva daljnja bolesnika (br. 6 i 9), u kojih isto tako nije bilo porasta titra, doživjeli su recidiv unutar jedne godine. U dvaju bolesnika također se javio recidiv, ali bez povišenja titra. U ukupno 2 bolesnika javio se (tijekom kontrolnoga razdoblja) i drugi recidiv (br. 4 i 6). Pritom je br. 4 doživio porast titra, dok je br. 6 pod KLH terapijom ostao na istim vrijednostima titra. Ni u jednoga bolesnika nije došlo do progresije bolesti (v.tab.1.), odnosno primarnoga tumora.

U 4 od 5 bolesnika (80%) koji nisu imali recidiv, kožni test je bio pozitivan. Samo u jednog od tih 5 bolesnika bez recidiva, bio je kožni test negativan. Od ukupno 4 bolesnika koji su imali recidiv, kožni je test bio polovično pozitivan i negativan. U dvaju bolesnika s dvostrukim recidivom, kožni je test bio negativan (v.tab.1.).



SLIKA 3:

Mikrotitarska inkubacijska shema za direktni KLH-ELISA. 1) Antigenski sloj s KLH-om (◇+KLH); 2) Blokirani i slobodni kapaciteti spoja na površini ploče s mikrotitra (○ + konjski serum); 3) Inkubacija s primarnim antiserumom (humana sera bolesnika) (Λ + antitijela protiv KLH); (4) Inkubacija sa sekundarnim antitijelom za dokaz KLH-antitijela (P + antitijela vezana na peroksidazu); (5) Obojena reakcija. Između pojedinih reakcija katkad se nalazi sloj ispran PBS-om (● + encimski bufer-sustav).

FIGURE 3:

Microtiter incubation scheme for a direct KLH-ELISA. 1) Antigenic layer with KLH (◇ + KLH); 2) Blocked and free capacities of connection on a board surface with microtiter (○ + horse serum); 3) Incubation with a primary antiserum (humana sera of patients) Λ + antibodies against KLH); 4) Incubation with a secondary antibody to prove KLH antibodies (P + antibodies connected to peroxidase); 5) Stained reaction. There is sometimes a layer washed down with PBS between individual reactions (● + enzyme buffer-system).

RASPRAVA

Moćni imunogen KLH na životinjskom se eksperimentu, ali i na ljudima, već desetljećima koristi kao eksperimentalni antigen, dok je bilo malo vjerojatno njegovo bilo kakvo ranije korištenje (8). KLH posjeduje moć specifične celularne reakcije na antigen (usporenu hipersenzitivnu reakciju, proliferaciju limfocita, produkciju citokina) kao i humoralnu reakciju (produkciju antitijela) koja se održava i godinu dana nakon imuniziranja (9, 10, 11, 12, 13).

Birdsall je sa suradnicima u serumu zdravih ispitanika dokazao topljive imunokomplekse, koji su nakon dvokratnoga intradermalnoga imuniziranja sa 100 ug KLH-a, sadržavali anti-Fab i anti-KLH antitijela (14). Nakon odvajanja antiimunoglobulinske komponente iz tih sastava, pokazala su se skrivena citotoksična antitijela, koja in vitro mogu uništiti humane tumorske stanice, a koja se mogu dokazati u serumu normalnih davatelja (15). Na

mišjem se modelu, međutim, nije mogla izvršiti produkcija citotoksičnih antitijela, koja bi nakon imuniziranja s KLH-om djelovala izravno na tumorske stanice u mjehuru (16). Produkcija se antitijela odvija uz prisustvo T-limfocita, slično kao i prilikom djelovanja BCG-a (17, 18). Na mišjem se modelu isto tako može dokazati da proces prepoznavanja KLH-a pomoću T-limfocita stoji pod kontrolom gena "velikoga histokompatibilnoga kompleksa" (MHC - major histocompatibility complex) (19).

Zdravi ispitanici reagiraju određenom dozom antigena putem celularne i humoralne obrambene reakcije. Na imuni odgovor vjerojatno utječe oblik i doza primijenjenoga KLH-a, pa to između ostaloga vrijedi i kao parametar za imunu kompetenciju pojedinoga individuuma (20, 21, 22, 23, 24). Bowen je sa suradnicima na zdravim ispitanicima promatrao tijekom stvaranja antitijela protu-KLH-a, a istodobno i na jednom bolesniku s akutnom virusnom infekcijom tipa Epstein-Barr (25). Dok je u skupini zdravih ispitanika došlo do deseterostrukih vrijednosti nakon

TABLICA 1.

Tijek titra i bolesti pod terapijom s KLH-om u primarnoga površnoga karcinoma mjehura. (m=muški, ž=ženski, T=stadij, G=stupanj, U=solitarni, M=multifokalni, +=pozitivan kožni test, -=negativan kožni test, ↑=uzlazni, →=nepromijenjen)

TABLE 1

Course of titer and a disease under therapy with KLH in primary superficial bladder carcinoma (m=male, f=female, T=stage, G=degree, U=solitary, M=multifocal, +=positive skin test, -=negative skin test, ↑=rising, →=unchanged)

Bolesnik/ Patient	Godine / Age	m/ž/ m/f	T/G	U/M	Recidiv (mjeseci) / recurrence (months)	Vrijeme kontrola/ Check- up period	Prije KLH / Before KLH	Nakon KLH / After KLH	Antitijela / Antibodies	Kožni test / Skin test
1	73	m	pTaG1	U	-	45	32,2	308,4	↑	+
2	75	ž	pTaG2	M	-	44	16,4	262,5	↑	+
3	72	m	pT1G3	M	-	43	69,6	70,2	→	-
4	74	m	pT1G2	M	pT1G2(12) pT1G2(30)	48	87,9	112,0	↑	-
5	73	ž	pT1G2	M	pT1G2(10)	10	77,0	104,4	↑	+
6	47	m	pTaG2	U	pTaG1 (7) pTaG1(18)	20	83,2	82,6	→	-
7	66	m	pT1G2	M	-	41	100,0	258,2	↑	+
8	71	m	pT1G2	M	-	44	91,3	286,5	↑	+
9	67	m	pTaG1	U	pTaG1 (6)	39	44,4	69,4	→	+

dvokratne intrakutane injekcije 0.1 mg KLH-a, to je bolesnik s mononukleozom najviše vrijednosti imao tek na visini donjih vrijednosti zdravih ispitanika. Za tu se pojavu odgovornom može smatrati povišenje supresora T stanica tijekom akutne infekcije. Potvrdu tomu mogla bi u zdravih ispitanika predstavljati i lokalna kožna reakcija, budući da su ti ispitanici tijekom 3 dana primili 300 mg ciklofosfamida uz injekciju KLH-a, što je popraćeno pojačanim stvaranjem antitijela (26). Međutim, nikakvo poboljšanje kliničkoga tijeka nije donijelo prenošenje toga iskustva na jednoga bolesnika s metastazirajućim karcinomom bubrežnoga parenhima. Taj je bolesnik također bio podvrgnut istoj terapijskoj shemi s KLH-imunomodulacijom i niskim dozama ciklofosfamida (27). Moguće je da u bolesnika s metastazirajućim karcinomom bubrežnoga parenhima, u supresiji imunoga sustava tim tumorom, nisu sudjelovale T-stanice. To je doduše moglo utjecati na terapiju, ali nije bilo mogućnosti korekcije. Svakako, vlastito iskustvo s adjuvantnim dodatkom KLH-režima kod nemetastazirajućega karcinoma bubrežnoga

parenhima (pT2+4N+), nije moglo potvrditi ni produljenje životnoga vijeka ni progresiju bolesti (28). Naprotiv, sužena imunokompetencija smanjuje generiranje i antitijela protiv KLH-a (29, 30).

Direktni dokaz za raznovrsno djelovanje BCG-a predstavlja i nemogućnost bilo kakvoga utjecaja na njegovu učinkovitost, usprkos istodobnoj primjeni selektivnih imunosupresora (31). Na životinjskom je eksperimentu moguće pokazati jačanje imunoterapeutskoga učinka BCG-a, ako se na prethodne aplicira ciklofosfamid. Taj se učinak objašnjava imunomodulatornim mehanizmima (32). Titar antitijela protu-KLH-a može se javiti i prije već postojeće imunizacije. Moroz je sa suradnicima pokazao da normalni humani IgG posjeduje visoki kapacitet na KLH (33). Salvaggio je sa suradnicima kod neimuniziranih ispitanika našao KLH-antitijela, koja su bila rezistentna na merkaptotilen; (to je možda bila posljedica hemaglutinacijskoga eseja na kojemu se zasnivala dokazna metoda obiju skupina) (34). Za

ljudski bi organizam bilo neuobičajeno da stvara antitijela prema stranim antigenima (npr. prema KLH-u), pogotovo s obzirom na malu vjerojatnost da je već postojao neki prethodni antigenski kontakt (npr. preko hranidbenoga lanca). Taj se fenomen može objasniti ukrštenom reakcijom proteinskoga kompleksa KLH-a s antigenima, kojima čovjek u normalnim prilikama nije izložen (35). Primjerice, Markl izvješćuje o visokom titru anti-KLH-antitijela u dokazivanju ELISA-e u bolesnika s akutnom ili kroničnom shistosomiazom. Zbog toga kod sumnje na tu bolest, preporučuje "screening" sa specifičnošću od >95% i senzitivnošću od 75% (36). Napominjem da su i drugi autori potvrdili taj ukršteni antigenitet epitopa KLH i površnoga antigena Shistoosome Mansonii (37, 38). Primijećena je također i mogućnost ukrštene reakcije između hemocijanina i eritrocita iz strome sisavaca (39).

Konačno, ostaje nerazjašnjenim u kolikoj se mjeri generira primarni ili sekundarni odgovor na primjenu KLH-a. Razlike u rezultatima radova pojedinih istraživačkih skupina mogu se objasniti razlikama između pojedinih eseja, zatim u pripremi antigena, načinu imuniziranja, kao i u genetskim varijantama pojedinih ispitanika (40).

Olsson je sa suradnicima ispitivao imunu kompetenciju bolesnika s karcinomom mjehura, nakon intradermalne primjene KLH-a. Sedam je od 35 takvih ispitanika bilo alergično prema imuniziranju, iako su još posjedovali tumor. Samo je 13 od 35 bolesnika razvilo eritem na mjestu injekcije. Nakon 2 godine praćenja tih bolesnika, udio je recidiva u njih značajno opao, odgovarajući stanju njihove imunokompetencije (41, 42). Nerazjašnjenim ostaje pitanje odnosi li se pojačani imunitet samo na antigen ili i na tumorsko tkivo. Isto tako nije objašnjeno ni pitanje može li dokaz imunokompetencije ujedno i prejudicirati razvoj maligne bolesti. Tako su napr. Hortobagyi i suradnici uspjeli pokazati statistički značajnu vezu između pozitivnoga odgovora na intradermalnu injekciju KLH-a i preživjelosti bolesnika s metastazirajućim karcinomom dojke, i to prije početka polikemoterapije (43).

Na temelju priloženih rezultata dobivenih na maloj bolesničkoj grupaciji nije moguće izvesti logični zaključak koji bi se temeljio na variranju titra kao utjecajne vrijednosti na predviđeni razvoj bolesti. Za određivanje direktne ELISA-e, razvijene određivanjem anti-KLH-a antitijela, bilo bi potrebno testiranje na većem bolesničkom materijalu, koji bi omogućio procijenu dinamike titra, uz moguću usporedbu s lokalnom kožnom reakcijom.

Nakon terapije BCG-om ostaju upitnom vrijednosti serumskoga titra BCG-antitijela i kožnoga testa (PPD = purified protein derivative), kao izraza sustavnoga imunoga odgovora na tijek tumorske bolesti u mjehuru (44). Tako su Winters i Lamm našli u svojim ranijim studijama ostatak serumskoga titra BCG-antitijela i u bolesnika koji su tijekom terapije BCG-om dobili recidiv tumora mjehura, ali isto tako i u onih bolesnika koji su ostali bez recidiva (45). Čini se da vrijednost kožnoga PPD testa nadmašuje sposobnost prezentiranja tijekom serumskoga titra pod kombiniranim režimom intravezikalne i intradermalne aplikacije BCG-a, barem u odnosu na predvidljivost tijeka bolesti (46). Prvobitno je iz terapije bolesnika s melanomom prenesen princip "monitoringa" pomoću titra serumskoga BCG-antitijela i kožnoga testa. Taj je titar u 30% bolesnika retrospektivno predvidio

tijek bolesti, čak i uz mogućnost ukrštene reakcije između tumorskih antitijela i BCG-a (47). Nije međutim bilo moguće da se u poznatim publikacijama izvrši jedna signifikantna usporedba između pozitivne kožne PPD konverzije i djelovanja imunoterapije BCG-om (48, 49, 50). Čak ni dodatna usporedba s intravezikalnim granulomima pod terapijom BCG-om ne dopušta nikakve zaključke s obzirom na prognozu bolesti (51).

Kälbler je sa suradnicima podvrgnuo KLH terapiji samo one bolesnike s površnim karcinomom mjehura, koji su imali pozitivnu reakciju na KLH (52). Tek su radovi Lamma i suradnika omogućili prelaz na provođenje kliničkih studija. Oni su naime u eksperimentu kod tumora mjehura primijetili vezu između intradermalne imunizacije i intravezikalne instilacije KLH-a s efikasnošću KLH-režima (53, 54, 55, 56). Još bi trebalo sustavno izračunati broj antitijela na jednom većem broju ispitanika.

ZAKLJUČAK

U dijelu iznesenoga rada pokazano je kako će nakon intravezikalne i intradermalne primjene KLH-a, pomoću eseja koji je u tu svrhu razvijen, biti obuhvaćena dinamika stvaranja specifičnoga KLH-antitijela, uz usporedbu s kliničkim tijekom. Nakon što je kombinirana primjena izvedena i u kliničkim studijama, moglo se u pokusnim serijama sa životinjama utvrditi i povezanost intradermalne imunizacije s intravezikalnim instilacijama KLH-a. Na temelju dostupnih podataka jedne manje skupine bolesnika, čini se da nije moguće izvesti dokaz o značenju promjene titra kao čimbenika koji utječe na tijek bolesti.

LITERATURA

1. Winters WD, Lamm DL. Antibody responses to bacillus Calmette-Guérin during immunotherapy in bladder cancer patients. *Cancer Res.* 1981;41:2672-6.
2. Kleinknecht S, Bichler KH, Strohmaier WL. Postoperative long-term course of peripheral blood immune parameters and immunomodulating effects of keyhole limpet hemocyanine in patients with nonmetastatic renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 1992;21:315-22.
3. Nakamura K, Hoshimoto T, Kato Y, Shimura K, Kasai KI. Effect of type and concentration of coupling on coupling yield in the coupling of protein to a tresylactinated support for affinity chromatography. *J Chromat.* 1990;513:367-9.
4. Lowry OH., Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the foline phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
5. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-5.
6. Green JR, Margerison D. *Statistical treatment of experimental data.* Amsterdam, Oxford, New York: 1978. str. 145-9.
7. Hintze LJ. *NCSS Statistik & Grafik Kaysville.* Utah: Unisoft-Verlag; 1989.
8. Dixon FJ, Jacot-Guillarmod H, McConathey PJ. The antibody response of rabbits and rats to hemocyanin. *J Immunol.* 1966;97:350-5.
9. Ransom JH, Rundell JO, Heinbaugh JA, Evans CH. Biological and biochemical characterization of keyhole limpet haemocyanin-induced guinea pig lymphotoxin. *Cell Immunol.* 1982;67:1-13.
10. Hersh EM, Dyre SE. Cells binding the antigen keyhole-limpet haemocyanin in the peripheral blood and in the lymphocyte culture of non-immune and immunized human subjects. *Clin Exp Immun.* 1974;17:299-309.
11. Moroz C, Magdar I, Twig S, Lindner A, Many M. Disease-related lymphocyte cytotoxicity in rats bearing transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Cancer.* 1982;29:667-72.
12. Curtis JE, Hersh EM, Harris JE, McBride C, Freireich EJ. The human primary immune response to keyhole limpet hemocyanin: interrelationships of delayed hypersensitivity, antibody response, and in vitro blast transformation. *Clin Exp Immunol.* 1970;6:473-91.

13. Reed MJ, Borkow I, Staple PH. Immune response to keyhole limpet hemocyanin and oral Actinomyces antigens in *Macaca arctoides*. *J Peridontol.* 1981;52:111-8.
14. Birdsall HH, Rossen RD. Characterization of anti-Fab'antibodies in human sera: identification of soluble immune complexes that contain hidden anti-KLH and blocking anti-immunoglobulins following immunization with keyhole limpet haemocyanin. *Clin Exp Immunol.* 1983;53(2):497-504.
15. Morgan AC, Rossen RD, McCormick KJ, Stehlin JS, Giovanelle BC. Hidden cytotoxic antibodies that react with allogeneic cultured fetal and tumor cells contained in soluble complexes in normal human sera. *Cancer Res.* 1982;42:881-9.
16. Lamm DL, DeHaven JI, Riggs DR, Ebert RF. Immunotherapy of murine bladder cancer with keyhole limpet hemocyanin (KLH). *J Urol.* 1993;149:648-52.
17. Morimoto C, Reinherz EL, Schlossman SF. Primary in vitro anti-KLH formation of peripheral blood lymphocytes in man: detection with a radioimmunoassay. *J Immunol.* 1981;127:514-7.
18. Ratliff TL, Gillen D, Catalona WJ. Requirement of a thymus-dependant immune response for BCG-mediated antitumor activity. *J Urol.* 1987;137:155-8.
19. Dubreuil PC, Caillol DH, Lemonnier FA. KLH-specific, J-E/C-restricted clones of proliferating T lymphocytes. *Immunogenetics.* 1981;14:469-79.
20. Curtis JE, Hersh EM, Butler WT, Rossen RD. Antigen dose in human immune response, dose response relationship in the human immune response to keyhole-limpet hemocyanin. *J Lab Clin Med.* 1971;78:61-9.
21. Armkraut AA, Malley A, Begles D. Immunogenicity of hemocyanins and their subunits. *J Immunol.* 1969;103:1301-10.
22. Curtis JE, Hersh EM. The human secondary response to keyhole limpet hemocyanin. *Clin Exp Immunol.* 1972;10:171-7.
23. Green AA, Borella L. In vitro response of human leukocytes to associated and dissociated hemocyanin. *J Immunol.* 1971;107:293-7.
24. Swanson MA, Schwartz RS. Immunosuppressive therapy: the relation between clinical response and immunologic competence. *New Engl J Med.* 1967;277:163-70.
25. Bowen TJ, Wedgwood RJ, Ochs HD, Hänle W. Transient immunodeficiency during asymptomatic epstein-barr virus infection. *Pediatrics.* 1983;71:964-7.
26. Berd D, Maguire HC, Mastrangelo MJ. Potentiation of human cell-mediated and humoral immunity by low dose Cyclophosphamide. *Cancer Res.* 1984;44:5439-43.
27. Kleinknecht S, Bichler KH, Strohmaier WL. Immune modulating effects of low doses of cyclophosphamide and keyhole limpet hemocyanine on peripheral blood immune parameters in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Urol Int.* 1992;48(1):1-8.
28. Jurincic-Winkler CD, Horlbeck R, von der Kammer H, Scheit KH, Klippel KF. Adjuvante Immuntherapie mit Keyhole limpet Haemocyanin (KLH) beim Nierenzellkarzinom der Kategorie PT2N+ und PT3-4 N0-N+, M0. *Wiener Klin Wschr.* 1994;106:455-8.
29. Korver K, Zeijlemaker WP, Schellekens PTA, Vossen JM. Measurement of primary in-vivo IgM- and IgG-antibody response to KLH in humans: implications of pre-immune IgM-binding in antigenspecific ELISA. *J Immunol.* 1984;74:241-51.
30. Korver K, Boeschoten EW, Krediet RT, vanSteenis G, Schellekens PTA. Dose-response effects in immunizations with keyhole limpet hemocyanin and rabies vaccine: shift in some immunodeficiency states. *Clin Exp Immunol.* 1987;70:328-35.
31. Davies M. Bacillus Calmette-Guérin as an antitumor agent. The interaction with cells of the mammalian immune system. *Biochem Biophys Acta.* 1982;651:134-9.
32. Adolphs HD. BCG-Immunoprophylaxe beim oberflächlichen Harnblasen-Karzinom. *Urologe.* 1989;B29:89-92.
33. Moroz LA, Krygier V, Kotoulas AO. Normal human IgG with antibody activity for keyhole-limpet haemocyanin. *Immunology.* 1973;25:441-9.
34. Salavaggio J, Castro-Murillo E, Kundur V. Immunologic response of atopic and normal individuals to keyhole limpet hemocyanin. *J Allergy.* 1969;44:344-54.
35. Herscovitz HB, Harold WW, Stravitzky AB. Immunochemical and immunogenetic properties of a purified keyhole limpet hemocyanin. *Immunology.* 1972;22:51-61.
36. Markl J. Specific IgG activity of sera from egyptian schistosomiasis patients to keyhole limpet hemocyanin (KLH). *Naturwissenschaften.* 1991;78:30-1.
37. Grzych JM, Dissous C, Capron M, Torres S, Lambert PH, Capron A. Schistosoma mansoni shares a protective carbohydrate epitope with keyhole limpet hemocyanin. *J Exp Med.* 1987;165:865-78.
38. Dissous C, Grzych JM, Capron A. Schistosoma mansoni shares a protective epitope with freshwater and marine snails. *Nature.* 1986;323:443-5.
39. Frick OL, Shimbor C. Cross reactivity between hemocyanins and erythrocytes. *Fed Proceedings.* 1970. str. 573-82.
40. Burke GP, Smith KA, Stocking RIG, Ferot M, McIntyre RO. Anti-keyhole limpet haemocyanin antibody in normal unsensitized individuals. *J Allergy Clin Immunol.* 1977;59:309-13.
41. Olsson CA, Chute R, Rao CN. Immunologic reduction of bladder cancer recurrence rate. *J Urol.* 1974;111:175-6.
42. Olsson CA, Chute R, Rao CN. Immunologic reduction of bladder cancer recurrence rate. *Trans Amer Ass Gen Urin Surg.* 1973;65:66-72.
43. Hortobagyi GN, Smith TL, Swenerton KD, Legha SS, Buzdar AU, Blumenschein GR, i sur. Prognostic value of prechemotherapy skin tests in patients with metastatic breast carcinoma. *Cancer.* 1981;47:1369-76.
44. Herr HW, Pinsky CM, Whitmore WFJr, Sogani PC, Oettgen HF, Melamed MR. Longterm effect of intravesical bacillus Calmette-Guérin on flat carcinoma in situ of the bladder. *J Urol.* 1986;135:265-7.
45. Winters WD, Lamm DL. Antibody responses to bacillus Calmette-Guérin during immunotherapy in bladder cancer patients. *Cancer Res.* 1981;41:2672-6.
46. Lamm DL, Thor DE, Winters WD, Stogdill VD, Radwin HM. BCG immunotherapy of bladder cancer. Inhibition of tumor recurrence and associated immune responses. *Cancer.* 1981;48:82-8.
47. Wile AG, Sparks FC, Morton DL. Monitoring immunotherapy with bacillus Calmette-Guérin by antibody titer. *Cancer Res.* 1977;37:2251-6.
48. Lamm DL. Bacillus Calmette Guérin immunotherapy of bladder cancer. *J Urol.* 1985;134:40-7.
49. Torrence RJ, Kavoussi LR, Catalona WJ, Ratliff TL. Prognostic factors in patients treated with intravesical BCG for superficial bladder cancer. *J Urol.* 1988;139:941-4.
50. Herr HW. Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for bladder cancer. *J Urol.* 1985;134:47.
51. Kelley DR, Haaff EO, Becich M, Lage J, Bauer WC, Dresner SM, i sur. Prognostic value of purified proteine derivative skin test and granuloma formation in patients treated with intravesical bacillus Calmette-Guérin. *J Urol.* 1986;135:268-71.
52. Kaelble T, Moehring K, Ilkinger U, Riedasch R, Staehler. Intravesikale Rezidivprophylaxe beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom mit BCG und KLH. *Urologe.* 1991;A30:118-21.
53. Jurincic CD, Engelmann U, Gasch J, Klippel KF. Immunotherapy in bladder cancer with keyhole limpet hemocyanin: a randomized study. *J Urol.* 1988;139:723-6.
54. Flamm J, Bucher A, Höltl W, Albrecht W. Recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder: adjuvant topical chemotherapy versus immunotherapy. A prospective randomized trial. *J Urol.* 1990;144:260-3.
55. Flamm J, Bucher A. Adjuvant topical chemotherapy versus immunotherapy in primary superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol.* 1991;67:70-3.
56. Lamm DL, DeHaven JI, Riggs DR, Ebert RF. Immunotherapy of murine bladder cancer with keyhole limpet hemocyanin (KLH). *J Urol.* 1993;149:648-52.

POSVETA

U dovršenju ovoga rada pomogli su mi moj mentor dr. Ruđer Novak, redoviti profesor Medicinskoga fakulteta u Zagrebu i dr. Ante Tucak, profesor emeritus Medicinskoga Fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, na čemu im obojici srdačno zahvaljujem.

ANTIBODY RESPONSE TO INTRAVESICAL KLH INSTILLATION IN PATIENTS WITH SUPERFICIAL TRANSITIONAL CELL CANCER OF THE URINARY BLADDER

Carlos Winkler, Karl Friedrich Klippel

Clinic for Urology, Pediatric Urology and Andrology, Allgemeines Krankenhaus Celle, Germany

ABSTRACT

The dynamics of the specific KLH-antibody production after intracutaneous and intravesical instillation was analysed. Nine patients (male n=7; female n=2 mean 68.6 years, range 47-75) with primary superficial carcinomas of the bladder, were intracutaneously immunized with 1 mg Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH) after the complete resection of tumors. Treatment consisting of 20 mg KLH in 20 ml saline introduced intravesically was continued once a week during the next 6 weeks, then once a month during one year and finally once every two months during the next 2 years. Antibodies against KLH in patients' sera were determined by means of specially developed direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA: according to H. von der Kammer, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany). Blood was taken for antibody-titer examination before the treatment and 8 weeks after the treatment.

The KLH-antibody titer increased significantly after KLH therapy (Mann-Whitney-Test $P=0.02$) in bladder cancer patients, however the level varied considerably from patient to patient. Six out of 9 patients (67%) presented increased serum antibody titers to KLH after immunotherapy, 4 patients (44.4%) remained free of tumor during the established follow-up period of 10-45 months (median 30.7 months). One patient without increased antibody titer to KLH was free of tumor. Two patients however, suffered from tumor recurrence after the KLH course. Two patients presented tumor recurrence in spite of increased antibody titers. No evidence of tumor progression occurred in patients with recurrence after KLH therapy. Four out of 5 patients (80%) without tumor recurrence presented positive skin test. In patients with tumor recurrence, 50% of them had a negative skin test. 44.4% KLH-treated patients had tumor recurrence. The recurrence rate was 1.6. Time span of recurrence was 8.75 months.

KLH instillation did not induce major side effects. Positive skin test reactivity and KLH antibody response were more commonly seen in responding patients (i.e. those who remained tumor-free after the therapy) than in non-responders. The production of KLH antibodies apparently is the biological response to the antigen stimulus of KLH.

Key words: Keyhole-limpet hemocyanine; Antibody formation; Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); Carcinoma, transitional cell; Urinary bladder neoplasms - therapy