

Carlos Winkler i suradnici: Razina interleukina-1 α nakon intravezikalne instilacije KLH-a u bolesnika s površnim karcinomom prijelaznih stanica mokraćnoga mjehura. Med Vjesn 2006; 38(1-4): 11-19

Razina interleukina-1 α nakon intravezikalne instilacije KLH-a u bolesnika s površnim karcinomom prijelaznih stanica mokraćnoga mjehura

Carlos Winkler, Karl Friedrich Klippel

Klinika za urologiju, dječju urologiju i andrologiju, Allgemeines Krankenhaus Celle, Njemačka
Izvorni znanstveni rad
UDK 616.62-006.6
Prispjelo: 4. svibnja 2006.

Ova studija potvrđuje mišljenje da instilacija KLH-a stimulira produkciju citokina, koji se zatim izlučuju putem mokraće. Interleukin 1 (IL-1) koji proizvode aktivirani makrofagi, domino-efektom stimulira niz imunih reakcija.

Instilacijski program započinje 5 do 7 dana nakon TUR-a primarnoga površnog karcinoma mjehura. Taj program obuhvaća intravezikalnu instilaciju 20 mg KLH-a, razvodnjena u 20 ml fiziološke otopine, jedanput tjedno, ukupno 6 puta, a zatim jedanput mjesečno tijekom godine dana. Nakon instilacije KLH-a u mjehur, IL-1 α izlučuje se u mokraći. U svrhu analize korišten je specifični enzimski imunosorbent esej (ELISA). ELISA za IL-1 α , utemeljen u našem laboratoriju, pokazuje graničnu vrijednost otkrivanja od 5 pg/ml. Taj IL-1 α ELISA varira od 3 do 7% unutar naših mogućnosti mjerenja, a 5 do 15% od serije do serije. U terapijskoj skupini sekrecija IL-1 α varira u rasponu od 0 do 30.905 pg/24h, dok u kontrolnoj skupini taj se raspon kreće između 0 (razdoblje sakupljanja) i 2.472 pg/4h. Sekrecija IL-1 α nakon instilacije KLH-a u mjehur bolesnika s karcinomom, značajno raste, uz napomenu da visina te sekrecije znatno varira od bolesnika do bolesnika. Maksimum je izlučivanja postignut tijekom 4 do 8 sati nakon instilacije, nakon čega to izlučivanje postupno opada. Pritom se pokazala neuobičajeno izražena razlika u količini izlučenoga IL-1 α tijekom 24 sata u kontrolnoj skupini, od skupine kojoj je instilirano KLH. Osam od 14 bolesnika (57%) koliko ih je reagiralo na KLH, imali su nakon šestotjedne terapije veću koncentraciju IL-1 α u mokraći nego oni bolesnici koji tijekom 12 mjeseci nisu reagirali na KLH, uz napomenu da razlike nisu bile statistički značajne. Smatra se da sekrecija IL-1 α u mokraći predstavlja biološki odgovor mjehura na antigenski stimulus KLH-a.

U primjercima mokraće nije nađen IL-2. Preostaje da se dodatnim ispitivanjima utvrdi prisustvo IL-2 citokina, uz napomenu da je možda količina citokina bila ispod granice detekcije koju zahtijeva ELISA.

Potrebno je utvrditi stimulira li intravezikalno instilirano Keyhole limpet haemocyanin (KLH) lokalni odgovor stanica sluznice mokraćnoga mjehura u bolesnika s površnim karcinomom mjehura.

Ključne riječi: Keyhole limpet hemocyanine, interleukin 1 α , interleukin 2, površni karcinom prijelaznih stanica mokraćnoga mjehura.

UVOD

Olsson je sa suradnicima još 1974. godine izvijestio o smanjenju učestalosti recidiva karcinoma mokraćnoga mjehura u bolesnika liječenih Immunocyaninom (Keyhole limpet hemocyanin, KLH) (1). Jedno drugo izvješće spominje samo umjereni profilaktički učinak takvoga liječenja, ako se s njim počinje 6 tjedana nakon operacije (2). Neka druga ispitivanja pak pokazuju da KLH, kao i neki citostatici (Mitomycin i Epodyl), posjeduju sposobnost sprječavanja recidivne bolesti u površnoga karcinoma mjehura (3, 4, 5, 6). Međutim, još nije otkriven mehanizam pomoću kojega KLH izaziva antitumorsku aktivnost.

KLH je multi-epitopni antigen za koji se pokazalo da posjeduje imunoregulatorni utjecaj na različite produkte limfocita, kao i na makrofage (7, 8, 9, 10). Taj stimulirajući utjecaj sudjeluje u limfocitnoj aktivnosti prema neoplastičkim stanicama (11). Klippel je sa suradnicima dokazao to svojstvo KLH-a injicirajući ga u mjehur, čime je izazvao mononuklearnu staničnu infiltraciju (12).

Distribuciju tkiva, kao i aktivaciju te proliferaciju limfocita i makrofaga regulira nekoliko citokina koje secerniraju makrofagi (monokini) i limfociti (limfokini) (13). IL-1 α je monokin koji igra glavnu ulogu prilikom aktivacije i proliferacije T-limfocita, regulirajući na taj način proliferaciju limfocita. Time se ujedno stimulira citotoksična aktivnost T limfocita (14). IL-1 α također može regulirati i citotoksičnu aktivnost prirodnih "kiler"-stanica (NK), kao i proliferaciju te diferencijaciju B limfocita (15, 16). Osim toga, IL-1 α ima regulirajući utjecaj na neke stanične populacije kao što su fibroblasti, endotelne stanice itd. (17). Nadalje, IL-1 α prepoznat je kao jedan od glavnih posrednika prilikom upalnih procesa u živom tkivu (18). Otkriven je također u mokraći zdravih i bolesnih ljudi (19). Neka druga ispitivanja upućuju na to da se IL-1 α i IL-6 u starijih bolesnika stvara uporedo s bakteriurijom (20).

Jedna je mogućnost da se instilacijom KLH-a (ili drugih imunomodulatora) inducira aktivnost monokina i limfokina, čime se stimulira djelovanje limfocita i makrofaga na sluznici mjehura. Ranije su studije pokazale da je intravezikalna instilacija BCG-a (Bacillus Calmette-Guerin) povezana s povišenjem razine IL-2 i IL-6 u mokraći (21).

U svrhu ove studije ispitivala se visina koncentracije IL-1 α i IL-2 u mokraći 14-orice bolesnika kojima je izvršena kompletna transuretralna resekcija površnoga karcinoma mjehura i kojima je nakon resekcije, instilirana otopina KLH. Ispitalo se nadalje vrijednosti razine IL-1 α i IL-2 prije, u vrijeme i nakon instilacije KLH-a, posebno u odnosu na mehanizam djelovanja otopine KLH, a i s obzirom na moguću usporedbu s kliničkim promjenama.

MATERIJAL I METODE

Bolesnici i metode

Obrađeno je 35 bolesnika razdijeljenih u 4 skupine. Kontrolna se skupina (A,B,C) sastojala od 21 osobe, i to: skupina A, 7 zdravih dobrovoljaca; skupina B, 7 bolesnika s klinički i mikrobiološki utvrđenom mokraćnom infekcijom; skupina C, 7 bolesnika s površnim TCC (karcinom prijelaznog epitela) mokraćnoga mjehura u stadiju pTa/IG1-3, utvrđenim prije bilo kakve terapije.

KLH skupina (D) sastojala se od 4 bolesnika s površnim TCC mjehura, također u stadiju pTa/1 G1-3. Ni u toj skupini nijedan bolesnik nije bio prethodno liječen.

Svi su tumori bili transuretralno resecirani uz postranične biopsije na prividno zdravim dijelovima sluznice. Pretpostavlja se da su svi bolesnici prije početka profilaktičke instilacije bili bez ikakve druge karcinomske bolesti.

Prije instilacije svim je bolesnicima izvršena analiza i citologija mokraće, IVP, kompletna krvna slika, elektrolitski status i rendgenska snimka pluća. Cistoskopija se radila svaka dva mjeseca, citologija mokraće jedanput mjesečno. Čim bi se tijekom tih kontrola pojavila sumnja na karcinom, uzeta bi bila biopsija sumnjivoga tkiva, a posebno i biopsija s ruba toga područja.

U slučajevima sa simptomatskom mokraćnom infekcijom (broj klica >100.000 ml) određena je antibiotska terapija, a instilacije su bile nastavljene tek nakon što je ponovno postignut sterilitet mokraće. Kontrola ispitanika završila bi nakon 12 mjeseci.

Smatra se da su bolesnici pozitivno reagirali na terapiju ako su nakon kliničkoga praćenja bili ili bez tumora ili bez znakova progresije tumora. Bez pozitivne reakcije smatralo se da su oni bolesnici koji su tijekom terapije pretrpjeli jedan ili više recidiva ili je u istom razdoblju došlo do progresije bolesti.

Ni jedan od bolesnika, a ni oni u kontrolnoj skupini, nisu imali neki drugi malignitet koji bi se mogao umiješati u imunu reakciju. Da bi se spriječila infekcija mokraćnoga trakta, antimikrobna terapija primijenjena je prije instilacije KLH-a.

Protokol terapije s KLH

Program instilacije počeo je 5 do 7 dana nakon TUR-a. Bolesniku je najprije ispražnjen mjehur, a zatim mu je instilirano 20 mg KLH pomiješanoga s 20 ml fiziološke otopine.

Postupak je ponavljan svaki tjedan tijekom prvih 6 mjeseci, a zatim jedanput mjesečno tijekom godine dana. Bolesnici nisu smjeli mokriti prvih 2 sata nakon instilacije.

Postupak s uzorkom mokraće

Prije prve i šeste instilacije KLH-a uzimani su primjerci mokraće, i to u intervalima 0-4, 4-8 i 8-24 sata. Ti su uzorci mokraće centrifugirani prije nego su konzervirani na -20 stupnjeva C.

Primjerci iz kontrolne skupine sakupljeni su tijekom 4 sata i nakon određivanja njihova volumena i centrifugiranja, spremjeni su na temperaturi od -20°C. Nakon što su primjerci otpušteni na sobnu temperaturu, pomiješani su s 50 ml fiziološke otopine i 0.1 g/l thimerosala iz bovinoga seruma u svrhu stabilizacije limfokina, a zatim su ti primjerci dijalizirani s 9 g/dl fiziološke otopine na temperaturi od 2 do 8°C tijekom 24 sata. Poslije toga dijalizirana se mokraća podvrgava daljnjem centrifugiranju (3.000 g/15 min./20°C) prije nego li se izvrši kvalifikacijski test za IL-1 α determinaciju: analiza=izolirani primjerak mokraće; pozitivni kontrolni test=uzorak mokraće s 20 pg/ml IL-1alfa, negativni kontrolni test=primjerak mokraće s 10ug/ml anti-IL-1alfa.

Testiranje takvim postupkom omogućuje lociranje nespecifičnih reakcija i njihovu eliminaciju (negativni kontrolni test), a taj postupak omogućuje utvrditi imaju li neki elementi u mokraći inhibirajući učinak na ELISA (pozitivni kontrolni test).

Ploče s mikrotitrom (MTP F 96, Nunc) presvučene su purificiranim humanim IL-alfa protutijelom (5ul/ml), dok je preostali dio ploče saturiran bovinim serumskim albuminom (10 mg/ml). U udubinu na pločama koje su presvučene IL-1 protutijelima iz mikrotitra aplicira se 100 ul mokraće, IL-1alfa mokraće ili IL-1 standardne otopine. Tome se dodaje 100 ul 0.2 mol. natrium fosfatnoga pufera (pH 6.5), kao i 40 ml/l ugrijanoga (56 stupnjeva C/30) fetalnoga bovinog seruma, nakon čega se ploče inkubiraju na 24 sata pri temperaturi od 2 do 8°C. Nakon ispiranja kojim se odstranjuju slobodne tvari, dodaje se 200 ul konjugirane IL-1 peroksidaze, a zatim se ploče ponovno inkubiraju na 24 sata pri temperaturi od 2 do 8°C. Ploče su zatim ponovno isprane da se može provesti enzimatska procjena imunološki povezane peroksidaze. Nakon inkubacije od 15 min. aktivnost se zaustavlja pomoću 100 ul sulfonske kiseline (1 mol/l). Rezultirajući intenzitet boje koji je proporcionalan koncentraciji IL-1, mjeri se na visini od 450 mm. Rukovodeći se standardnim vrijednostima, količine IL-1 u svakom primjerku mokraće mogu se uporediti s kontrolnim primjercima IL-1.

ELISA za IL-2 i IL-1 utvrđene su u našem laboratoriju, pokazavši granice otkrivanja od 50 do 5 pg/ml (22, 23, 24). Devijacije u IL-1alfa kreću se između 3 i 7%, kao i 5-15% od serije do serije.

Određivanje koncentracije IL-2 provedene su pod istim uvjetima ELISE. Za određivanje totalnoga IL-1alfa sekrecije tijekom 24 sata, produkcija IL-1alfa za 4 kao i za 24 sata uzete su u obzir nakon 6 instilacija KLH-a, a u svrhu da se odstrani utjecaj neželjenih čimbenika, kao npr. stupnja hidracije bolesnika (25).

Dobivši komparabilne kontrolne podatke, uzeli smo određenu količinu IL-1alfa u mokraći kontrolne skupine i pomnožili je sa 6 da bismo je mogli uporediti s 24-satnom produkcijom KLH skupine, prema metodi Böhlea i suradnika (26).

Statistička analiza

Statistička vrijednost dobivenih podataka između TCC skupine i kontrolne skupine utvrđena je Mann-Whitneyjevim testom. Dva su primjerka testa upotrijebljena da se utvrdi statistička valjanost između šestotjedne IL-1alfa vrijednosti i kliničkoga odgovora. Statistička je analiza provedena pomoću NCSS programa (27,28).

REZULTATI

Pretrage mokraće u kontrolnoj skupini

Našu studiju započeli smo s određivanjem visine IL-1alfa u kontrolnoj skupini. Upadljiva je najprije bila činjenica da primjerci mokraće u bolesnika s cistitisom uopće nisu sadržavali IL-1alfa, što se uspjelo dokazati tek nakon što je proveden postupak dijalize. Kasnije smo to proveli prilikom svih pretraga mokraće i to tek nakon što ni u terapijskoj skupini s nedijaliziranim mokraćom nismo utvrdili IL-1alfa. Nije jasan uzrok koji ometa stvaranje IL-1alfa u nedijaliziranoj mokraći, pa ćemo to kasnije istražiti. Ni u jednoj od sedam pokusa u zdravih ispitanika IL-1 alfa nije bio utvrđen. U bolesnika s mokraćnom infekcijom, a i u onih s neliječenim karcinomom mjehura, visina IL-1alfa u mokraći pokazivala je jako varijabilne individualne vrijednosti (Tablica 1.).

Nalaz IL-1alfa u mokraći bolesnika liječenih s KLH-om (Skupina D)

Izlučivanje IL-1alfa u mokraći četrnaestorice bolesnika s neinvazivnim karcinomom mokraćnoga mjehura, određivalo se prije početka intravezikalnih instilacija KLH-a, kao i 6 tjedana kasnije, nakon završetka instilacija.

Prije početka instilacija KLH-a, 5 je bolesnika pokazivalo povišene vrijednosti IL-1alfa u mokraći. Instilacije KLH-a tijekom 6 tjedana uzrokovale su povišenje razine IL-1alfa u mokraći. Maksimalno izlučivanje IL-1alfa u mokraći ustanovljeno je nakon 4 i 8 sati. Nakon što je dosegnut maksimum koncentracije IL-1alfa u mokraći, uslijedio bi pad tih vrijednosti tijekom sljedeća 24 sata (Slika 2.). Iznimka je bio samo bolesnik br. 7 u kojega je koncentracija IL-1alfa u mokraći ostala i kasnije povišena, uz napomenu da su te vrijednosti kod njega i na početku terapije bile povišene. Znakovite razlike u izlučivanju IL-1alfa postoje tijekom 24 sata u kontrolnoj i u terapijskoj skupini (Tablica 1. i 2., Slika 1. i 2.).

Nije se moglo utvrditi granice IL-2 razine u mokraći prema ELISA testu ni u terapijskoj niti u kontrolnoj skupini. Usprkos najnovijim istraživanjima s identičnim esejem i mokraćom koncentriranom s faktorom 5, od svih istraženih skupina (A-D) samo se u jednoj uspjelo dokazati IL-2.

Usporedba kliničkoga tijeka s izlučivanjem IL-1alfa u mokraći

Osnovu promatranja činila je moguća veza između izlučivanja IL-1alfa i kliničkoga odgovora na intravezikalnu KLH-terapiju prilikom primarnoga TCC mokraćnoga mjehura. To je promatranje izvršeno tijekom 12 mjeseci nakon 6-tjedne terapije (Tablica 3., Slika 2.).

U mokraći jednoga bolesnika (br.2) nismo ni prije niti poslije terapije našli IL-1alfa. Međutim, u 8 daljnjih bolesnika (br. 3,4,6,9,10,11,13,14) koji su prije terapije imali nulte vrijednosti IL-1alfa u mokraći, nakon terapije smo našli znatno povišenje. Jednako smo tako našli povišenje IL-1alfa u mokraći kod bolesnika (br.1,5,7,8,12) koji su to povišenje imali i prije početka terapije. Svih 5 bolesnika s povišenom razinom IL-1alfa u mokraći prije terapije, imali su pozitivan kožni test, čak i oni koji prije terapije nisu imali dokazani IL-1alfa u mokraći (br. 4,6,9,10).

TABLICA 1.

Nalaz IL-1alfa u mokraći bolesnika (kontrolna skupina pg/4h) sakupljeni tijekom 4 sata; 24 sata po Böhleu i sur. (26)

TABLE 1

IL-1 alpha finding in patients' urine samples (control group pg/4hrs) collected during 4 hours; 24 hours according to Böhle et al (26)

Bolesnik/ Patient	Skupina A Kontrolni bolesnici/ Group A Control patients	Skupina B Bolesnici s mokraćnom infekcijom/ Group B Patients with urinary infection	Skupina C Površinski TCC/ Group C Superficial TCC
1	0	0	796
2	0	0	0
3	0	0	208
4	0	296	0
5	0	304	550
6	0	332	0
7	0	2472	370
IL-1 alfa/ IL-1alpha produkcija/ production	0 pg/ 4h 0 pg/ 4hrs 0 pg/ 24h 0 pg/24 hrs	486 pg/ 4h 486 pg/ 4hrs 2918 pg/ 24h 2918 pg/24hrs	275 pg/ 4h 275 pg/ 4hrs 1649 pg/ 24h 1649 pg/24hrs

TABLICA 2

Nalaz IL-1alfa u mokraći bolesnika liječenih KLH-om (Skupina D) prije prve i šeste instilacije KLH-a, u intervalima 0-4, 4-8 i 8-24 sata, kao i 24 satnom produkcijom (pg/4h, pg/24h) po Böhleu i sur. (26)

TABLE 2

IL-1alpha finding in the urine samples of the patients treated with KLH (D group) before the first and the sixth KLH instillation, in the following time periods 0-4, 4-8 and 8-24 hrs, as well as in 24-hour production (pg/4hrs, pg/24hrs) according to Böhle et al (26)

Bolesnik/ Patient	Prije KLH -4-0 h/ Before KLH-4-0 hrs	Faza I 0-4 h/ Phase I 0-4 hrs	Faza II 4-8 h/ Phase II 8-24 hrs	Faza III 8-24 h/ Phase III 8-24 hrs	24 h/ 24 hrs
1	404	2302	6325	2117	10745
2	0	0	0	0	0
3	0	373	940	1473	2786
4	0	399	1283	2673	4355
5	320	1303	1102	1550	3955
6	0	2672	500	2643	5815
7	1952	6067	2626	2675	11368
8	612	7993	805	6397	15195
9	0	19287	8101	6517	33905
10	0	13327	8885	5088	27300
11	0	2244	1216	1230	4690
12	1130	9041	11451	9018	29510
13	0	416	308	956	1680
14	0	637	1137	1031	2805

TABLICA 3

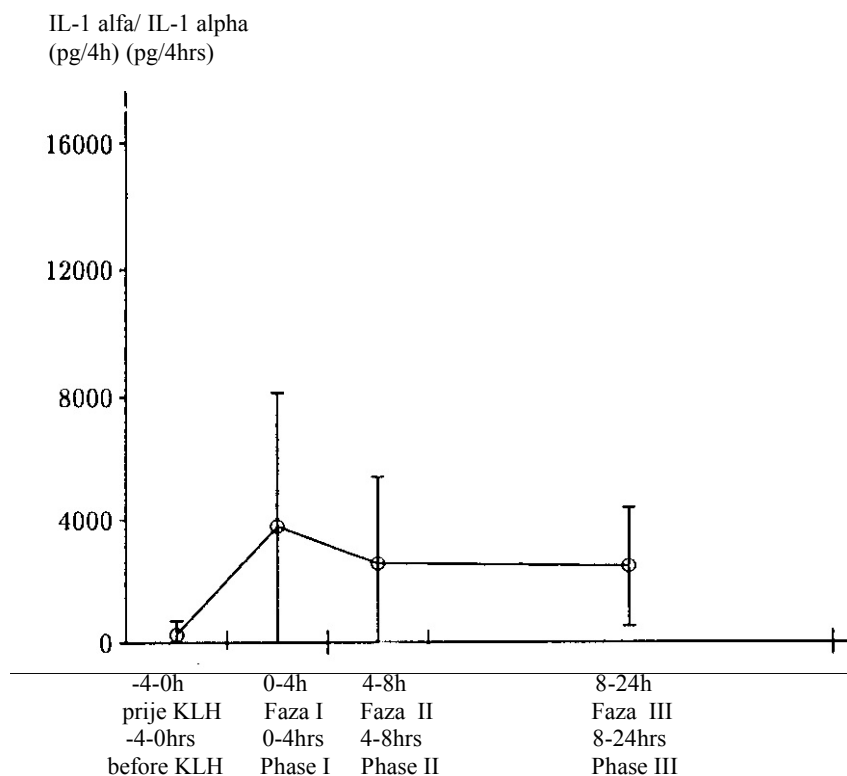
Usporedba kliničkoga tijeka s izlučivanjem IL-1alfa u mokraći, prije KLH, nakon šeste instilacije prilikom primarnoga TCC mokraćnoga mjehura (U=unifokalni, M=multifokalni)

TABLE 3

Comparison of primary TCC (urinary bladder) clinical course with IL-1alpha excretion in urine, before KLH and after the 6th instillation (U=unifocal, M=multifocal)

Skupina D/
Group D

Bolesnik/ Patient	Godine/ Age	m/ž male/ female	T/G	IL-1alfa prije terapije (pg/4h)/ IL-1alpha before therapy (pg/4hrs)	Kožni test/ Skin test	IL-1alfa nakon 6xKLH (pg/24h)/ IL-1alpha after 6xKLH (pg/24hrs)	Recidiv nakon mjeseci/ Recurrence after (months)
1	76	m	pTaG1 U	404	+	10745	-
2	65	m	pTaG1 U	0	-	0	-
3	69	ž/f	pTaG1 U	0	-	2786	-
4	64	m	pTaG1 U	0	+	4355	pTaG1 U(7)
5	72	ž/f	pTaG1M	320	+	3955	-
6	79	m	pTaG1 U	0	+	5815	-
7	72	ž/f	pTaG1 U	1952	+	11370	pTaG1 M(9)
8	66	m	pTaG1 U	612	+	15195	-
9	71	ž/f	pT1G1M	0	+	30905	-
10	84	ž/f	pTaG1M	0	+	27300	-
11	80	m	pT1G1M	0	-	4690	pTaG1 U (8)
12	79	m	pT1G3 U	1130	+	29510	pT1G2 U (6)
13	47	m	pT1G2M	0	-	1680	pT1G2U(10)
14	44	ž/f	pTaG2M	0	-	2805	pTaG3 U (9)



SLIKA 1.
IL-1alfa u mokraći bolesnika, prosječno razdoblje sa standardnom devijacijom
IMAGE 1
IL-1alpha in patients' urine samples. Average time period with standard deviation

Moguće je pronaći jednu signifikantnu razliku izlučivanja citokina u sljedećoj usporedbi (Mann-Whitneyev test):

Skupina A vs. skupina D nakon 6 tjedana terapije: $p < 0.008$

Skupina B vs. skupina D nakon 6 tjedana terapije: $p < 0.016$

Skupina C vs. skupina D nakon 6 tjedana terapije: $p < 0.01$

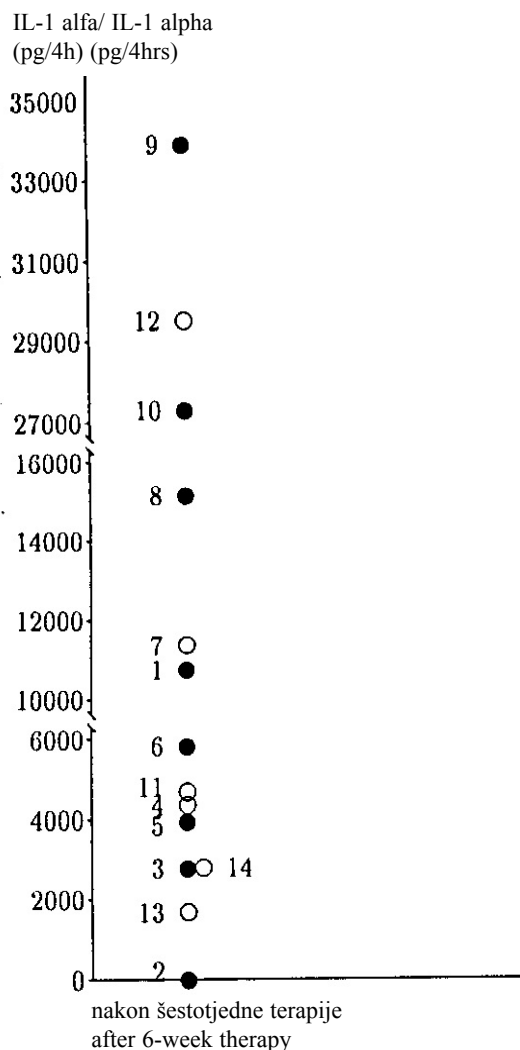
Skupina D prije terapije vs. nakon terapije $p = 0.001$

Od 14 bolesnika prije početka liječenja, 9 je imalo pozitivnu kožnu reakciju (br. 1,4,5,6,7,8,9,10,12) prije intrakutane imunizacije, a od njih šestorica nisu imala recidiv (br. 1,5,6,8,9,10). Tri su bolesnika (br. 4,7,12) unutar razdoblja promatranja dobili recidiv. Od 5 bolesnika koji su na početku imali negativni kožni test dva su ostala bez recidiva (br. 2 i 3), dok su trojica razvila recidiv bolesti (br. 11,13,14).

DISKUSIJA

KLH je moćni ksenogeni modifikator biološkoga odgovora ("Biological response modifier") (29, 30). U ljudi može izazvati opće aktiviranje imunostava (31). Način djelovanja KLH-a još uvijek je nejasan, i to usprkos činjenici da je već decenijama poznat kao eksperimentalni antigen i kao nosilac brojnih haptena (32,33); poznato je i njegovo lokalno djelovanje na profilaksu recidiva TCC, i to ne samo na životinjskom modelu već i u kliničkoj praksi (34, 35, 3, 4, 36). U istraživanju načina djelovanja KLH-a, razmatra se i o mogućnosti da KLH lokalno aktivira

imunostav. Neosporno je međutim sudjelovanje imunostava u kontroli tumorskoga rasta (37). U obrambenim reakcijama sudjeluje više populacija imunostava, među kojima makrofagi, T limfociti i prirodne stanice "ubojice" (15, 16). Aktiviranje i proliferaciju tih stanica stimuliraju citokini (limfokini i monokini). Interleukin-1 (IL-1alfa) zauzima dapače središnju funkciju u stimulaciji T limfocita i NK stanica. Do sada nije procijenjeno ni kliničko značenje niti praktična vrijednost povišene razine citokina u mokraći bolesnika s površnim TCC mokraćnoga mjehura, a koje nastaje pod utjecajem intravezikalne instilacije imunomodulatora (25, 38). Intravezikalna instilacija otopine BCG-a inducira između ostaloga i povišenje IL-1 i IL-2 u mokraći, a i razinu Interferon-gamme (39, 21, 36, 40, 41). DeBoer sa suradnicima nakon instilacije BCG-a nije mogao u mokraći bolesnika, pokraj IL-1alfa, IL-2alfa i IL-6 alfa, a i TNF-a, dokazati i nalaz IFN-gamme. Ista je skupina autora u jednoj sljedećoj studiji ispitivala moguće prognostičko značenje visine izlučenoga citokina u mokraći, u vrijeme i poslije BCG terapije. Međutim, nije još razjašnjeno ni kliničko značenje tih nalaza, a niti antitumoralni mehanizam djelovanja BCG-a. U tom se smislu tek naslućuje aktiviranje T-stanica (42). Isto se tako instilaciji BCG-a pripisuje nespecifično upalno djelovanje, možda i sa specifičnom imunološkom komponentom (43). Našom smo studijom uspjeli dokazati da se intravezikalnom instilacijom KLH-a u bolesnika s površnim TCC-om mokraćnoga mjehura povisuje koncentracija IL-1alfa u mokraći. Pri tome se moglo utvrditi statistički značajno povišenje IL-1alfa izlučivanja u mokraći u usporedbi s kontrolnom skupinom. Također se moglo usporediti povišenu razinu IL-1alfa u mokraći bolesnika liječenih s KLH-om s istodobnom infiltracijom stijenke



SLIKA 2.

Izlučivanja IL-1alfa i kliničkoga odgovora na intravezikalnu KLH-terapiju nakon šestotjedne instilacije (● bez recidiva, ○ recidiv 1...14 broj bolesnika)

IMAGE 2

IL-1alpha excretion and clinical response to intravesical KLH-therapy after 6-week instillation (● no recurrent cases, ○ recurrent cases 1...14 number of patients)

mokraćnoga mjehura makrofagima; pri tome se ne može isključiti ni produkcija drugih sojeva stanica (44).

Pokraj drugih svojstava, interleukin može na različite načine sprječavati rast tumora, primjerice indukcijom interleukina 2 (45), aktiviranjem makrofaga (46) i citotoksičnih T-limfocita (47), ali i izravnom inhibicijom tumorskih stanica (48). U kombinaciji s interleukinom-2 i interferonom gamma, interleukin-2, uz pomoć NK-stanica inducira razaranje tumorskih stanica (49). Nedavno smo mogli pokazati da KLH modulira citotoksičnu aktivnost NK-stanica (50). Osim toga, postoje znakovi da anti-tumoralno djelovanje KLH-a u mokraćnom mjehuru ovisi o visini koncentracije limfocita u tkivu, drugim riječima da to djelovanje ovisi o aktiviranju limfocita, a ne o specifičnom vezivanju proteina na tumorske stanice (51). Prisustvo IL-1 u mokraći može prema tome biti samo izraz upalne reakcije stijenke mokraćnoga mjehura na intravezikalnu aplikaciju KLH-a. Može se samo naslućivati u kolikoj je mjeri povišeno izlučivanje IL-1alfa u mokraći nakon instilacije KLH-a uzrok ili možda posljedica povećane migracije imunokompetentnih stanica u sti-

jenci mjehura. Najviša se razina IL-1 nalazi u mokraći onih bolesnika koji su nakon dvanaestomjesečne kontrole ostali bez tumora. Razlika je prema kontrolnoj skupini u tom smislu bila statistički značajna.

Iznenadujući je bio izostanak nalaza IL-2 u primjercima mokraće. Taj je izostanak za nas bio neočekivan budući da su prethodni nalazi pokazivali nakon instilacije KLH-a i jasnu infiltraciju stijenke limfocitima i makrofagima (44, 52). Prije bi se očekivalo da nakon predimuniziranja i instilacije KLH-a neće doći do bilo kakvoga izlučivanja IL-2. Može se pretpostaviti da se koncentracije IL-2 nalaze ispod mogućnosti ELISA testa koji smo koristili u tu svrhu. Dolazi u obzir i mogućnost metodičke pogreške u postupku s primjercima mokraće, pogotovo ako se pretpostavlja da su epitopi citokina kratkoročni, barem što se tiče njihove aktivnosti i dokazljivosti. Ili pak da na taj fenomen utječe promjenljivost okolne temperature npr. u mjehuru, u posudi, prilikom uronjavanja epruvete itd., kako je to već primijetio Prescott prilikom Gamma interferona u mokraći (41).

Fleischmann je sa suradnicima primijetio da se nakon instilacije BCG-a, IL-2 javlja u mokraći pretežno u obliku IL-2-inhibitor-kompleksa, što je zapravo IL-2 povezan s jednim drugim proteinom; taj međutim, za razliku od IL-2 inhibitora u serumu, nije termolabilan (38, 53, 54). Konačno, ne može se isključiti niti individualno izlučivanje citokina, kao reakcije na instilaciju imunomodulatora. Zbog toga bi se za postavljanje individualnoga profila citokina, trebalo stremiti što kraćem vremenu njihova sakupljanja i određivanja. Na osnovi dosadašnjih spoznaja, nije moguće provesti nikakvu usporedbu između nalaza kožne KLH reakcije nakon intrakutane injekcije i one prije početka terapije, kao ni mokraćnih vrijednosti IL-1alfa prije i nakon instilacije KLH-a zbog površnoga karcinoma mjehura.

Bilo bi poželjno provesti jednu kontrolnu studiju relevantnih citokina uz korištenje dokazne metodike po međunarodnim standardima. Takva bi studija trebala omogućiti kraće vrijeme sakupljanja mokraće s neposrednom obradom mokraćnih primjeraka, i to na jednom većem bolesničkom materijalu. Istodobno, trebalo bi produljiti i vrijeme naknadnih kontrola. Od osnovnoga bi značenja bilo određivanje profila citokina u mokraći prilikom evaluiranja novih bioloških imunomodulatora. Također bi trebalo provesti "screening" isplativoga i brzoga nastavka takvoga ispitivanja, kako su to već i drugi autori predložili (42, 55). Na taj bi se način moglo obuhvatiti značenje takvoga ispitivanja, pogotovo u usporedbi profila citokina s drugim već prokušanim preparatima, kao što je to npr. BCG.

ZAKLJUČAK

U dijelu iznesenoga rada pokazano je da se nakon intravezikalne instilacije KLH-a stimulira lokalna produkcija citokina koji se u mjerljivim količinama izlučuju mokraćom. Primjenom enzimske spojenoga specifičnog imunoezaja (ELISA), u svrhu analize citokina, može se u mokraći bolesnika čiji je karcinom mjehura liječen KLH-om, slijediti kinetiku koncentracije IL-1alfa. Tijekom te terapije bilo je znakovito pojačano izlučivanje interleukina-1alfa u mokraći. Nakon 6 instilacija došlo je do znatno pojačanoga izlučivanja IL-1alfa putem mokraće. Maksimalno izlučivanje postignuto je 4-8 sati nakon instilacije.

Što se tiče ukupnoga izlučivanja IL-1alfa u mokraći, postoji jedna znakovita razlika između kontrolne i terapijske skupine. Najveća koncentracija IL-1alfa u mokraći utvrđena je u bolesnika koji su tijekom dvanaestomjesečne kontrole bili bez tumora. Pozitivni kožni test tekao je usporedo s povišenjem izlučivanja citokina, kao i s izostankom recidiva. Prema tome može se pretpostaviti da izlučivanje IL-1alfa u mokraći predstavlja odgovor na antigenski stimulus KLH-a. Naročito aktivirani makrofagi secerniraju IL-1alfa, inducirajući tako jednu kompleksnu imunokaskadu. Na taj se način čini i za KLH vjerojatnim postojanje određenoga mehanizma koji bi bio sličan mehanizmu djelovanja BCG-a. Zapravo bilo bi poželjeno uzeti u razmatranje i određivanje profila citokina u mokraći prilikom procjene novih bioloških imunomodulatora (screening, npr.), slično kao što su razmišljali i drugi autori. Na taj bi se način moglo obuhvatiti njihovo značenje, posebno u usporedbi s profilom citokina u drugih, poznatih preparata, npr. u BCG-vakcini.

LITERATURA

1. Olsson CA, Chute R, Rao CN. Immunologic reduction of bladder cancer recurrence rate. *J Urol.* 1974;11:175-6.
2. Kaelble T, Moehring K, Ilkinger U, Riedasch R, Staehler. Intravesikale Rezidivprophylaxe beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom mit BCG und KLH. *Urologe* 1991;A30:118-21.
3. 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.
4. Flamm J, Bucher A, Hölt 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.
5. 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.
6. Flamm J, Donner G, Bucher A, Hölt W, Albrecht W, Havelec L. Topische Immunotherapie (KLH) vs. Chemotherapie (Ethoglucid) in der Rezidivprophylaxe oberflächlicher Harnblasenkarzinome. Eine prospektiv randomisierte Studie. *Urologe A.* 1994;33:138-43.
7. Sylverster RJ, van der Meijden APM, Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol.* 2002;168:1964-70.
8. Harris JR, Markl J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron.* 1999;30:597-623.
9. Mark J, Lieb B, Gebauer W, Altenhein B, Meissner U, Harris JR. Marine tumor vaccine carriers: structure of the molluscan hemocyanins KLH and HtH. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2001;127(Suppl 2):S3-9.
10. McGhee RB, DeMaria TH, Okazaki N, Lim DJ. Selective induction of macrophages in the middle ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1983;92:510-7.
11. Moltó LM, Carballido J, Jurincic CD, Lapena P, Manzano L, Salmerón I, Klippel KF, Alvarez-Mon M. Keyhole Limpet Hemocyanin can enhance the natural killer activity of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol.* 1991;19:74-8.
12. Klippel KF, Paulini G, Hutschenreiter B. The effect of keyhole limpet hemocyanin (KLH) on the rat bladder. *Cancer Immunol Immunother* 1997;3:65-7.
13. Roitt IM. *Essential Immunology.* Oxford: Blackwell; 1977. str. 63-4.
14. Farrar JJ, Benjamin WR, Hilfiker ML, Howard M, Rarrar WL, Fuller-Farrar J. The biochemistry, biology and role of interleukin 2 in the induction of cytotoxic T cell and antibodyforming B cell responses. *Immunol Res.* 1982;63:2177-82.
15. Demsey RA, Dinarello CA, Mier JW, Rosenwasser IJ, Allegretta M, Brown TE, Parkinson DR. The differential effects of human leukocytic pyrogen/lymphocyte-activating factor, T cell growth factor, and interferon on human natural killer activity. *J Immunol.* 1982;129:2504-10.
16. Onozaki K, Matsushima K, Kleinermann ES, Saito T, Oppenheim JJ. Role of Interleukin 1 in promoting human monocyte-mediated tumor cytotoxicity. *J Immunol.* 1985;135:314-20.
17. Schmidt JA, Mittel SB, Cohen D, Green. Interleukin I: a potential regulator of fibroblast proliferation. *J Immunol.* 1982;28:2177-82.
18. Dinarello CA. An update on human Interleukin-1: from molecular biology to clinical relevance. *J Clin Immunol.* 1985;5:287-92.
19. Cannon JG, Kluger MJ. Endogenous pyrogen activity in human plasma after exercise. *Science.* 1983;220:617-19.
20. Nicolle LE, Brunka J, Orr P, Wilkins J, Harding GKM. Urinary immunoreactive Interleukin-1a and Interleukin-6 in bacteriuric institutionalized elderly subjects. *J Urol.* 1993;149:1049-53.
21. Schamhart DHJ, de Boer EC, de Reijke ThM, Kurth KH. Urinary cytokines reflecting the immunological response in the urinary bladder to biological response modifiers: their practical use. *Eur Urol.* 2000;37(Suppl 3):S16-23.
22. Elsässer-Beile U, von Kleist S, Stähöe W, Schurhammer-Fuhrmann C, Schulte Mönning J, Gallati H. Cytokine levels in whole blood cell cultures as parameters of the cellular immunologic activity in patients with malignant melanoma and basal cell carcinoma. *Cancer* 1993;71:231-6.
23. Gallati H, Pracht I, Schmidt J, Haering P, Gavotta G. A simple, rapid and large capacity. ELISA for biologically active native and recombinant human. *IFNJ Biol Reg Hom Ag.* 1987;1:109-18.
24. Elsässer-Beile U, Leiber C, Wolf P, Lucht M, Mengers U, Wetterauer U. Adjuvant intravesical treatment of superficial bladder cancer with a standardized mistletoe extract. *J Urol.* 2005;174:76-9.

25. Haaf EO, Catalona WJ, Ratliff TL. Detection of interleukin 2 in the urine of patients with superficial bladder tumors, after treatment with intravesical BCG. *J Urol.* 1986;136:970-4.
26. Boehle A, Nowc CH, Musehold J, Gerdes J, Hofstetter AG, Flad HD. Elevations of cytokines interleukin-1, interleukin-2 and tumor necrosis factor in the urine patients after intravesical bacillus Calmette-Guérin immunotherapy. *J Urol.* 1990;144:59-64.
27. Green JR, Margerison D, editors. Statistical treatment of experimental data. Amsterdam, Oxford, New York; 1978. str. 145-9.
28. Hintze LJ. NCSS Statistik α Grafik Kaysville. Utah: Unisoft-Verlag; 1989.
29. 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.
30. Kleinknecht S, Strohmaier WL, Bichler KH. Cellular and humoral immune parameters in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with keyhole limpet hemocyanine (KLH). U: Stiefel T, Porcher H, urednici. *Immucothel-Workshop II.* Stuttgart: Walter-Druck; 1989. str. 57-75.
31. Quesada JR. Biologic response modifiers in the therapy of metastatic renal cell carcinoma. *Sem Oncol.* 1988;15:396-407.
32. 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.
33. Good AH, Wofsy L, Henry C, Kimura J. Preparation of hapten modified protein antigens. U: Mishell BB, Shiigi SM, urednici. *Selected methods in cellular immunology.* San Francisco: Freeman; 1980. str. 343-7.
34. Lamm DL, Reyna JA, Reichert DF. Keyhole-limpet haemocyanin and immune ribonucleic acid immunotherapy of murine transitionell cell carcinoma. *Urol Res.* 1981;9:227-30.
35. Olsson CA, Chute R, Rao CN. Immunologic reduction of bladder cancer recurrence rate. *Trans Am Assoc Genitourin Surg.* 1973;65:66-72.
36. Lamm DL, DeHaven JI, Riggs DR, Ebert RF. Immunotherapy of murine bladder cancer with keyhole limpet hemocyanin (KLH). *J Urol.* 1993;149:648-52.
37. Oppenheim JJ, Kovacs EJ, Matsushima K, Durum SK. There is more than one interleukin-1. *Immunol Today.* 1986;7:45-56.
38. Fleischmann JD, Toossi Z, Ellner JJ, Wentworth DB, Ratliff TL, Imbebo AL. Urinary interleukins in patients receiving intravesical bacillus Calmette-Guérin therapy for superficial bladder cancer. *Cancer.* 1989;64:1447-54.
39. De Boer LC, Steerenberg PA, Van der Meijden PM, Van Klinger B, De Jong WH, Elgersma A, i sur. Impaired immune response by isoniazid treatment during intravesical BCG administration in the guinea pig. *J Urol.* 1992;148:1577-82.
40. Böhle A, Nowc Ch, Ulmer AJ, Musehold J, Gerdes J, Hofstetter AG, Flad HD. Elevations of cytokines interleukin-1, interleukin-2, and tumor necrosis factor in the urine of patients after intravesical bacillus Calmette-Guérin immunotherapy. *J Urol.* 1990;144:59-64.
41. Prescott S, James K, Hargreave TB, Chisholm GD, Smyth JF. Radio-immunoassay detection of interferon-gamma in urine after intravesical Evans BCG therapy. *J Urol.* 1990;144:1248-51.
42. De Boer EC, De Jong WH, Steerenberg PA, Aarden LA, Tetteroo E, De Groot ER, i sur. Induction of urinary interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-6, and tumour necrosis factor during intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guérin in superficial bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 1992;34:306-12.
43. Stark B, Thalmann G, Studer UE, Gallati H. IL-4 und 8, TNF 55 und 75 nach intravesikaler Instillation von BCG bei Patienten mit oberflächlichem Blasenkarzinom. (Abstract). *Urologe A.* 1993;(Suppl.2):41.
44. Jurinic CD, Stöcker W, Carballido J, Alvarez-Mon M, Markl J, Klippel KF. Hallazgos inmunohistológicos en biopsias de pacientes con carcinoma superficial de vejiga luego del tratamiento intravesical con hemocianina keyhole-limpet. *Proceedings 54th Congr. Nacional Urol.* Madrid: ENE Ediciones; 1989. str. 53.
45. Nissenkorn I, Lavie G, Keidari Y, Leib Z, Vilcovsky E, Servadio C, Shachter H. Experience with bacillus Calmette-Guérin in patients with superficial bladder tumors. Value of monocyte activation in intravesical bacillus Calmette-Guérin therapy. *Eur Urol.* 1987;13:246-50.
46. Catalona WJ, Hudson MA, Gillen DP, Andriole GL, Ratliff TL. Risk and benefits of repeated courses of intravesical bacillus Calmette-Guérin therapy for superficial bladder cancer. *J Urol.* 1987;137:220-4.
47. Droller MJ. Bacillus Calmette-Guérin in the management of bladder cancer. *J Urol.* 1986;135:331-3.
48. Heinen E, Cormann N, Kinet-Denoel C. The lymph follicle: a hard nut to crack. *Immunol Today.* 1988;9:240-6.
49. Haaff EO, Dresner SM, Ratliff TL, Catalona WJ. Two courses of intravesical bacillus Calmette-Guérin for transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol.* 1986;136:820-4.
50. Molto LM, Carballido J, Jurinic CD, Lapena P, Manzano L, Salmeron I, i sur. Keyhole Limpet Hemocyanin can enhance the natural killer activity of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol.* 1991;19:74-8.
51. Kleinknecht S, Nelde NJ, Strohmeier WL, Bichler KH. Immunohistological investigations of a possible binding of keyhole limpet hemocyanine (KLH) to bladder and kidney tissue. U: Stiefel TH, Porcher H, urednici. *Immucothel Workshop II, Proc. Int. Symp.* Avignon, Stuttgart: Walter Druck; 1989. str. 37-43.
52. Jurinic CD, Stöcker W, Markl J, Engelmann U, Gasch J, Klippel KF. Immunotherapy with keyhole limpet haemocyanin (KLH) as prophylaxis against superficial bladder tumor recurrence. U: de Kernion JB, urednici. *Immunotherapy of urological tumors.* Edinburgh, London, Melbourne, New York: Churchill Livingstone; 1990. str. 139-43.
53. Fleischmann JD. Biologic response modifiers and urologic malignancies. *Surg Clin North Am.* 1988;68:1125-45.
54. Djeu JY, Kasahara T, Ballow JE, Tsokos GC. Decreased interleukin-2 inhibitor in sera of patients with autoimmune disorders. *Clin Exp Immunol.* 1986;65:279-85.
55. Bettex-Galland M, Studer UE, Walz A, Dewald B, Baggolini M. Neutrophil-activating peptide-1/Interleukin-8 detection in human urine during acute bladder inflammation caused by transurethral resection of superficial bladder cancer and bacillus Calmette-Guérin administration. *Eur Urol.* 1991;19:171-5.

POSVETA

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

THE LEVEL OF INTERLEUKIN-1 α AFTER 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

Our study confirms the theory that instillation of KLH stimulates production of cytokines, resulting in their secretion in urine. Interleukin-1 (IL-1) stimulates the immune cascade through a domino effect and is produced mainly by activated macrophages.

The instillation program was started 5-7 days after TUR of primary superficial cell carcinoma. Twenty mg KLH in 20 ml of 0.9% NaCl was instilled into the bladder each week for 6 consecutive weeks and then monthly for one year. When KLH is instilled into the bladder, IL-1 α is secreted in the urine. A specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used for analysis. The ELISA for IL-1 α was established in our laboratory and showed a detection limit of 5 pg/ml. This IL-1 α ELISA deviation amounts to 3-7% within a series of measurements, and 5-15% from series to series. In the therapy group the IL-1 α secretion ranged from 0 to 30,905 pg/24 h and in the control group from 0 (collection period) to 2,472 pg/4 h. IL-1 α production increased significantly after KLH instillation in bladder cancer patients; however, the level varied considerably from patient to patient. Maximum production was achieved within a period of 4-8 h, decreasing within 24 h. There was a striking difference between the amount of IL-1 α produced over the 24-hour period in the control group and that of the KLH group. 8 of 14 patients (57%) who responded to KLH therapy, had higher urine IL-1 α levels after 6 weeks of KLH treatment than those who failed to respond within 12 months, but the levels were not of statistical significance.

The secretion of IL-1 α in urine is the biological response of the bladder to the antigen stimulus of KLH.

No IL-2 was detected in the urine samples. It remains to be determined whether no IL-2 cytokine was present, or whether the amount was smaller than the minimal detection limit required for the ELISA.

Key words: Keyhole Limpet Hemocyanine, Interleukin 1 α , Interleukin 2, transitional cell carcinoma of the urinary bladder.

