

SPOSOBNOST IMUNSKIH METODA U KLINIČKOJ ONKOLOGIJI

Plesničar, S.

Sažetak: Prikazan je pokušaj analize vrednosti imunskih testova koji se danas primenjuju u kancerologiji. Upotrebljava se više vrsti testova, bilo nespecifičkih, koji prikazuju sposobnost organizma da se odazove antigenu, ili specifičkih za pojedini tip tumora. Ovaj rad obuhvata pretežno testove koji se već rutinski upotrebljavaju.

Iz razloga što u odazivanju organizma prema rakavim ćelijama glavnu ulogu igraju limfociti, većina testova koji se primenjuju u kancerologiji ustanavlja u prvom redu osobine T- limfocita. Zbog toga medju testove nespecifične prirode, koji prikazuju sposobnost odazivnosti organizma, ubrajamo broj perifernih limfocita, sposobnost transformacije limfocita u perifernoj krvi i, konačno, kao jedini »in vivo« test, test aplikacije antigena u epidermis, tzv. kutani test. Danas možemo ocenjivati odazivnost organizma i na taj način da na osnovu histološkog nalaza ustanovimo stanje žlezda, i to onih koje ukazuju na odazivnost imunskog sistema pa onih koje pokazuju potpuno iscrpljenje organa. Osim toga se pokazalo da je dobar pokazatelj i inhibicijski test migracije leukocita. Od poznatih specifičkih testova upotrebljavaju se u kliničkoj onkologiji u glavnom samo dva, i to: karcino-embrionijski antigen (CEA) i alfa-foto-protein (AFP).

UDK 616-006-077.3

Deskriptorji: neoplazme, imunološki testi, klasifikacija

Radiol. Jugosl., 1; 47—60, 1977

Uvod. — Karakteristično za rakavu bolest je da može trajati samo nekoliko tjedana, a može i više godina (1).

U svakom trenutku tog obdoblja razvoj bolesti zavisi od proširenosti rakavog tkiva po organizmu, od njegove biološke aktivnosti i od brzine malignog rasta. Zato su diagnostičke metode koje mogu doprinositi k ocenjivanju stanja rakave bolesti u organizmu, vanredno dobrodošle, jer samo na osnovu utvrđenja koliko je rakavog tkiva u organizmu i u kakvoj je fazi njen biološki potencijal, može se terapiju pravilnije dozirati.

U zadnje dve decenije razvila se tumorska imunologija. Vrednost te grane kancerologije je u tome da je ona dokazala da organizam nije nemi pratioc razvoja rakave bolesti, već da na sve promene reagira, makar ponekad u svoju štetu, npr. sintezom blokirajućih protivtela.

Zbog toga medju najvažnija sticanja imunologije u kancerologiji ubrajamo

imunološke testove koji ocenjuju kako stanje organizma, tako i rast tumora u tom organizmu (2).

Imunološki testovi. — Imunološki testovi koji ocenjuju opšte stanje organizma zovu se nespecifički testovi. Obzirom na to da je kod toga odazivnost ćelija od prvenstvenog značaja, ti testovi na razne načine proveravaju stanje ćelične imunosti organizma, a u manjoj meri i stanje humoralne imunosti (3).

Neki od tih testova u praksi već se primenjuju i to: brojenje limfocita, blastna transformacija limfocita, određivanje broja T-limfocita, određivanje stanja limfne žlezde i kožni testovi. Medju humoralne testove ubrajamo određivanje koncentracije imunoglobulina u serumu.

Druga vrsta testova koji se već upotrebljavaju, određuje kvantitet tumorskog tereta. To su u prvom redu testovi kojima proveravamo neke sastavine tumorskih će-

lija, kao što su: alfa-feto-protein (AFP) i karcino-embrionski antigen (CEA). To su dva testa koji se danas svestrano upotrebljavaju, mada osim njih ima još i drugih testova za dokazivanje prisutnosti i količine tumorskog tkiva u organizmu.

U manjoj meri upotrebljavaju se još ti testovi: fluorescentni metod, metod određivanja blokirajućih antitela, tehnika inhibicije migracije leukocita i drugi manje poznati metodi.

Za tumor specifične antigene otkrivamo pomoću nekih drugih metoda. Ti specifični antigeni su: alfa α -H-feto-protein, beta S-feto protein, leukemijski antigeni, heterofilni fetalni antigen i fetalni sulfoglikoproteinski antigen.

Ima još nekih drugih imunskih testova koji se primenjuju u manjoj meri. To su: Makarijev kožni test, određivanje elektroforetske mobilnosti makrofaga, karcinoplascentarna alkalna fosfataza i radioimunske metode kod tumora sa ektopičnom sintezom hormona (4).

Nespecifični imunski testovi. — U tu vrstu ubrajamo testove koje već godina ma upotrebljavamo, i druge, nove testove kojih izvedba postala je u poslednje vreme tako jednostavna da ćemo ih moći ru-

tinski izvoditi u bilo kojoj hematološkoj laboratoriji (npr. transformacija leukocita).

a. Broj limfocita u perifernoj krvi. — Normalno nadjemo u perifernoj krvi odraslog čovjeka od 20—30 $\%$ limfocita, ako je srednja vrednost za leukocite 7000 ćelija/mm³. Kod odraslog čovjeka zahvaća 95 $\%$ područje od 1000 do 3500 limfocita, sa srednjom vrednošću 2200 limfocita na mm³.

Kod malignih bolesti, sa iznimkom limfoproliferativnih bolesti, broj limfocita obično je snižen samo u kasnim stadijima (tabela 1). Ali, takvo sniženje odraz je sniženog celokupnog broja limfocita, tako da je postotni iznos identičan bez obzira na stadij bolesti.

Od većeg značenja je iatrogeno izazvana leukopenija, koja se javlja redovno kao posledica zračenja (slika 1). Njena težina ovisi od veličine polja, od zračenog područja, od celokupne doze i od nominalne standardne doze (5, 6). Istotako se jake leukopenije pojavljuju posle primene mono- ili poli- kemoterapije. Kasne limfopenije mogu značiti lošu prognozu kao što to može biti slučaj kod karcinoma dojke (7).

	Stadij II (No. 31)	Stadij III (No. 24)	Stadij IV (No. 26)
Leukociti*	8.319 (5.200—14.200)	9.346 (4.400—18.100)	10.619 (4.800—34.400)
Limfociti*	1.682 (500—4.180)	2.349 (1.330—5.900)	1.779 (846—3.940)
Monociti*	440 (176—1.210)	673 (122—1.690)	634 (74—1.704)
Limfociti kao $\%$ leukocita	21,6 $\%$ (6—38)	26,5 $\%$ (14—56)	20,0 $\%$ (9—39)
Monociti kao $\%$ leukocita	5,6 $\%$ (2—11)	6,6 $\%$ (1—12)	5,6 $\%$ (1—12)

* Broj ćelija izražen kao aritmetička sredina i sa varijacijskom širinom (broj ćelija mm³).

Tabela 1. — Promjene u vrednostima ćelija periferne krvi kod serije pacijenata sa plućnim rakom za vreme prve diagnoze (Onkološki Institut, Ljubljana).

U glavnom možemo reći da nam broj limfocita dobro služi kao biološki monitor kod radio- i kemoterapije, a izgleda da može imati i prognostičku vrednost, jer indirektno pokazuje trenutno funkcionalnu sposobnost imunskog sistema.

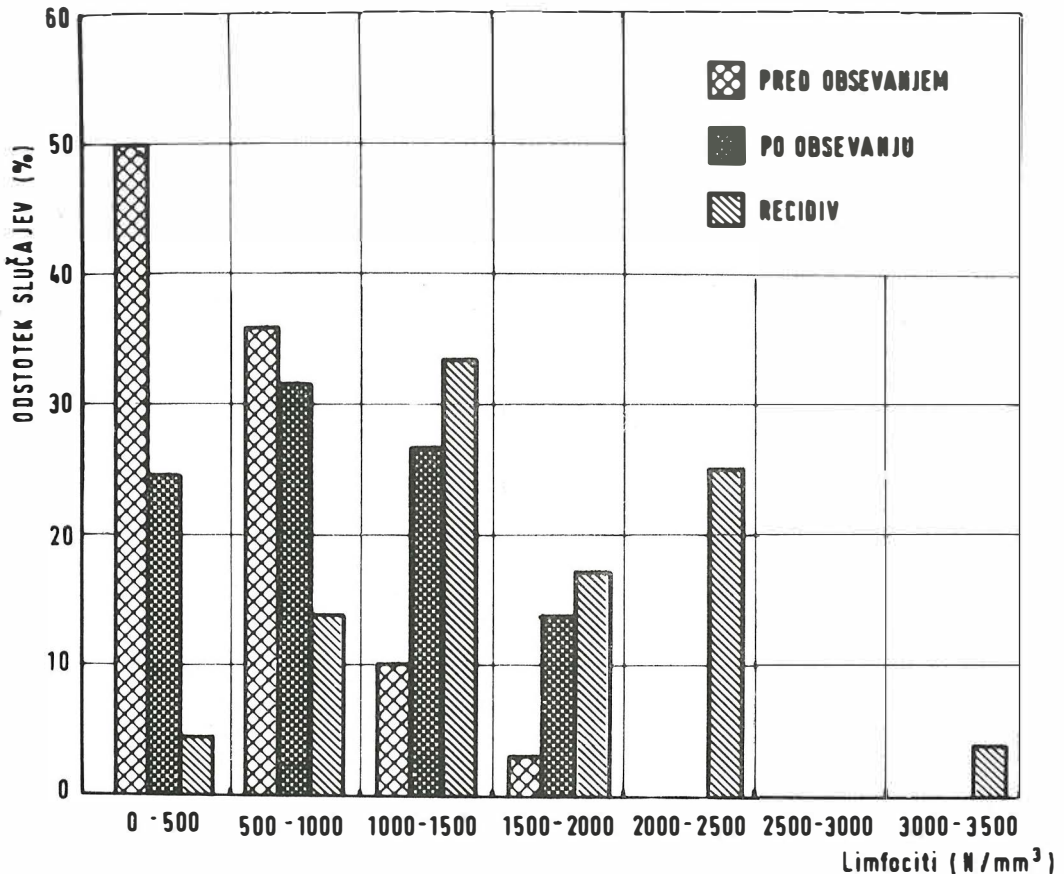
b. Test blastne transformacije limfocita (8). — Taj test se oslanja na svojstvo limfocita, da stimuliran antigenom prelazi u blastni oblik, tj. u veliku ćeliju sa velikim jezgrom i sa snažnom bazofilnom citoplazmom u kojoj su brojne vakuole. Jezgro sadrži brojne nukleole. Proces traje 3 dana, što znači da je limfocit u svoj meta-

bolizam utisnuo sećanje na taj antigen i da se zbog toga kadgod može ponovo odazvati tom antigenu.

Iz razloga što nas kod samog testa zanima samo broj limfocita koji prelaze u blastnu transformaciju, možemo upotrebjavati nespecifične biljne antigene. Među nje ubrajamo fitohemaglutinin (PHA), koji transformira T- i B-limfocite i concanavalin — A (Con — A), koji transformira pretežno T₁ — i T₂ — limfocite.

Test se odvija tako da limfocitima dodamo antigen, bilo PHA ili Con-A, i inkubiramo ih kod temperature 37° C tri dana.

Posle toga limfocite skupimo na mikro-



Slika 1. — Pad broja limfocita kod serije pacienata sa bronhialnim karcinomom pre i posle zračenja i kod pojava recidive (Onkološki Institut, Ljubljana)

skopskom staklu, obojimo ih po May-Grünwaldu i Giemsi i brojimo transformirane i obične limfocite do ukupno barem 300 ćelija. Iz toga izračunamo postotak transformiranih, blastnih oblika. Danas su u prodaji već jednostavne podloge, kod kojih nam, ako upotrebimo mikrometode, za eksperiment treba samo 300 mikro L krvi (8 kapi)* (9).

Normalno prelazi u transformaciju od 70—80 % svih limfocita.

Snižen broj transformiranih limfocita nadjemo pre svega kod urođenih imunodeficitarnih stanja, kao što su Di Georgejev sindrom, timusna hipoplazija i drugo. Ali, te promene možemo naći i kod pridobivenih imunodeficitarnih stanja. Na primer, kod nekih malignih bolesti postotak blastnih oblika vrlo se snizi, i to kod malignih limfoma (limfosarkom, retikulosarkom), kod limfatične leukoze i u kasnim stadijima Mb. Hodgkina (10). Istotako nadjemo snižen broj blastnih oblika kod solidnih tumora (11), npr. kod karcinoma dojke i kod bronhijalnog karcinoma (12, 13, 14). Posle uspešne terapije broj blastnih oblika ponovo se diže, mada vrlo retko postiže iste vrednosti. Kod malignoma pokušavaju sprovesti test transformacije uporabom ekstrakta tumorskih tkiva. Sa najviše uspeha stimuliraju limfocite autoloni ekstrakti tumorskih tkiva.

Opšte uzeto, brojenjem limfocita dobijemo uvid u kvantitet ćelija; transformacija pak nam prikazuje njihov kvalitet, to jest, funkcionalne sposobnosti.

c. Rozetni test T-limfocita

Pošto je T-limfocit jedna od ćelija koje su citotoksične za malignu ćeliju, znanje o tome, koliko je tih ćelija, T-limfocita, u krvnom optoku, moglo bi nam dati pomoćne podatke za ocenjivanje stanja organizma.

To je moguće napraviti tako zvanim rozetnim testom. Kod tog testa mešamo lim-

focite sa ovčjim eritrocitima zbog svojstva T-limfocita da vežu na svoju membranu ovčje eritrocite. Tako se stvori figura, slična ruži, i zato nazivamo takvu kombinaciju limfocita sa eritrocitima rozetom. Za obrazovanje tih rozeta nije potreban nikakav pregradni humoralni faktor, zbog toga se te rozete zovu spontane E-rozete.

Kod tehnike inkubiranja limfocita sa eritrocitima preko noći, nadjemo normalno prosečno 48 % limfocita koji tvore E-rozete. Variacijska širina kreće se od 30 do 75 %.

Koncentracija T-limfocita snižena je kod brojnih malignih bolesti (15), tako kod karcinoma dojke (16), bronha (17), glave i vrata (18), kod intrakranijalnih tumora (19), kod tumora creva, želuca, ezofagusa, epifarinksa, prostate i pankreasa i kod sarkoma različitih izvora (20).

Opšte uzeto, zapaža se da koncentracija T-limfocita pada kod napredovalih stadija i kod recidivantnih situacija sa metastazama. Naročito u primerima koji su lečeni hemoterapijom, bile su utvrđene vanredno niske vrednosti za T-limfocite (ponekad samo 5 % E-rozetnih limfocita). Ipak se u remisiji vrednosti mogu ponovo povisiti i postići normalne vrednosti. Bolest kod koje nadjemo samo lokaliziran tumor, daje nam samo malo snižene vrednosti, a isto tako situacije kod kojih je tumor bio iako radikalno, ali pre kratko vreme odstranjen (tabela br. 2).

Tehniku tvorbe rozeta upotrebljavamo isto tako za određivanje B-limfocita. U tom primeru potrebni su za vezanje ovčjih eritrocita na B-limfocit serumski humoralni faktori. To su C₃ frakcija komplemента i antitela. Najprije vežemo ih na eritrocite, i tek zatim te eritrocite mešamo sa suspenzijom limfocita. B-limfociti vežu na svoju membranu eritrocite, na kojima se nalazi pomenuti pripremljeni kompleks. U primerima kad se radi o određivanju B-limfocita, služimo se i nekog drugog njihovog svojstva, naime toga, da se na membrani i u citoplazmi B-limfocita

* »Blasto Kit« — Istituto Sieroterapico Milanese S. Belfanti, Milano — Italia.

	kontrolne vrednosti (No = 31)	prvo lečenje (rani primeri) T1 ili T2 sa NO ili 3-godišnja remisija (No = 11)	prvo lečenje (kasni primeri) T3 ili T4 sa N2 i/ili M1 ili generalizacija (No = 14)	kasno lečenje (kasni primeri) već lečeni primeri, sada metastaze ili generalizacija (No = 14)
Rozetne ćelije %				
— aritm. sredina	46,1 %*	36,0 %**	21,3 %	31,7 %
— varijacijska širina	32,9—56,0	27,0—43,0	5,0—48,7	6,0—44,8
Limfociti (No/mm ³)	—			
— aritm. sredina	—	2290	1640	810
— varijacijska širina	—	1110—5740	720—2430	430—1000

* Vrednosti za normalnu populaciju iz literature: 1. Bach. J. F.: 20—80 %, *Transplant. Rev.*, 16, 196, 1973; 2. Belpomme D. et al.: 50 % (30—75 %), *Bull. Cancer*, 61, 387, 1974; 3. Michlmayer G. et al.: 52,1 ± 3,8 %, *Schweiz. Wochenschr.*, 104, 815, 1974.

**Svi primeri nelečeni ili lečeni samo operativno.

Tabela 2. — Postotak E-rozetnih ćelija (T-limfocita) periferne krvi kod 39 primera malignoma različitih lokalizacija. (Onkološki Institut, Ljubljana).

nalazi obilica imunoglobulina, zbog čega za određivanje tih ćelija upotrebljavamo imunofluorescentne tehnike. Direktnim metodom markiramo antitelo sa fluorescentnom materijom, npr. sa fluorescentnim izotiocianatom. Na taj način markirano antitelo veže se sa membranskim antigenima na B-limfocitu, što možemo videti u fluorescentnom mikroskopu (3).

Mogućnost određivanja pojedinih markera na limfocitima (tabela 3), i time sposobnost identifikacije T- i B- limfocita i njihovih podgrupa pokazala se korisna kod identifikacije ćelije izvora pojedinih vrsti malignih limfoma (21). Tako je uspešno sa određivanjem markera utvrditi kod kojih malignih limfoma je početna ćelija T-limfocit. U grupu malignih limfoma koji polaze iz T-limfocita ubrajamo: manji postotak hroničnih limfatičkih leukoza, mycosis fungoides, Sezaryjev sindrom i limfoblastni limfom. Ipak, većina malignih limfoma pripada grupi koje izvor je u različitim variantama B-limfocita. U tu grupu idu: većina hroničnih limfatičkih leukoza, makroglobulinemija Waldenström, bolesti

teških lanaca, multipli mielom i maligni limfomi germinalnih centara. Interesantno je da u grupu retikulosarkoma spada maligna varijanta transformiranog limfocita, zbog toga poznamo T- ili B- imunoblastom, odnosno po pređašnjoj klasifikaciji retikulosarkom (22) (tabela 4).

Razume se da granice medju pojedinim vrstama tih bolesti nisu tako oštre; kod hronične limfatičke leukoze možemo naći

Karakteristika ćelije	Limfocit T	Limfocit B
Rozete »E«	+	0
Rozete »EA«	0	+
Rozete »EAC«	0	(+)
Imunoglobulini na membrani (S-Ig)	0	+
Imunoglobulini u citoplazmi (Ip-Ig)	0	+
Recirkulacija	+	0

Tabela 3. — Imunske osobine ćelija koje služe identifikaciji T- i B-limfocita

npr. takvu heterogenost ćelija da se ona rasteže od B₁- do B₃- limfocita.

d. **Histologija limfnih žlezda.** — U tom primeru ne radi se o imunskom testu u uskom smislu reči, već o reevaluaciji histološke slike žlezda, koja bazira na savremenom poznavanju funkcije limfocita. Poznato je da u germinalnim centrima žlezde nadjemo pre svega B- limfocite, u parakortikalnim regijama T-limfocite, a u medularnim predelima plazmatke i monocite. Dokazano je da je dužina preživeća pacijenta u korelaciji sa određenom strukturom žlezde kod karcinoma glave i vrata (23), vrata materice (24), kolona (25) i dojke (26).

Uglavnom kod rakavih bolesti poznajemo 4 histološke tipe žlezda: Prvi je limfocitno predominantni tip žlezde za koji je karakteristična populacija malih limfocita, a pojavljuje se obično u vezi sa dužim preživećem. Drugi su razviti germinalni centri, gde je doba preživeća, ako je uporedjujemo sa prvom, kraća, ali je duža u uporedjenju sa onom kod trećeg histološkog tipa, to je tipa sa histološkom slikom limfocitne deplecije, gde limfociti iščezavaju iz žlezda. Četvrti je histološki

tip nepromenjene, nestimulirane žlezde. Ne možemo isključiti mogućnosti da se po određenom redosledu u jednoj te istoj žlezdi odvijaju sve gore opisane promene, od stadija predominance limfocita do stanja deplecije žlezda. Zbog toga histološka slika deplecije limfocita može biti prognostički slab znak, tako možda popuštanje imunske odzivnosti sa nastupajućom kakeksijom. Svakako nam evaluacija histološke slike žlezda može dati uvid u otpornost organizma odnosno limfnog sistema u određenoj fazi rakave bolesti.

e. **Kožni testovi kasne preosetljivosti.** —

Kožni testovi već se godinama upotrebljavaju za testiranje odzivnosti organizma kod različitih bolesti (npr. Kweim antigen kod sarkoidoze).

Patofiziološki osnov kožnog testa je u tome da pomoću intrakutane ili topične aplikacije antigena pokrenemo reakciju kasne preosetljivosti na mestu aplikacije tog antigena.

Reakcija se razvija tako da se na kraju gde smo aplicirali antigen, sakupe makrofagi koji fagocitiraju antigen i započinju reakciju zajedno sa imunokompetentnim limfocitima. Kod toga se oslobadaju neki

LIMFOMI, KOJI PROIZLAZE IZ »T« LIMFOCITA

T₀ limfocit: limfoblastni limfom

T — imunoblast: T — imunoblastom

T₁ i T₂ limfocit: akutna limfatična leukoza, hronična limfatična leukoza, mycosis fungoides, sindrom Sezary

LIMFOMI, KOJI PROIZLAZE IZ »B« LIMFOCITA

B₁ limfocit: »dobro diferenciran« maligni limfom, hronična limfatična leukoza

B₂ leukocit(imunoblast): Burkitt'ov limfom, »slabo diferencirani« maligni limfom

B₃ limfocit (ćelija pamćenja): hronična limfatična leukoza

B₄ limfocit: (limfoplazmocitoidna ćelija): makroglobulinemija Waldenström, bolesti teških lanaca

B₅ limfocit (plazmatka): multipli mielom

B-ćelije kliničnih centara: limfom centrocita (germinocita), limfom centroblasta (germinoblasta)

B? limfocit: Mb. Hodgkin, angioimunoblastni limfom

Tabela 4. — Podjela malignih limfoma s obzirom na proizvodnju maligno alteriranu ćeliju imunskog sistema

farmakološki faktori, limfokini, u kojih vidu je da se (1) na mestu injiciranog antigena sakupi dovoljan broj limfocita i (2) da su ti limfociti upereni prema antigenu. To događanje vrši se oko 3 dana, a posle tog vremena proverimo reakciju. Ako je reakcija pozitivna, na mestu aplikacije možemo opipati čvrstu, iznad nivoa kože podignutu zatvrdlinu koja je posledica lokalnog ćeličnog infiltrata.

U kancerologiji kožnim testovima merimo sposobnost imunskog odazova organizma pomoću reakcije zakašnjele preosetljivosti. Kod toga se služimo više vrstama antigena (27) (tabela 5). U načelu poznajemo: antigene, koje organizam već poznaje, jer je sa njima već prije nekad došao u dodir (npr. PPD, Varidase) i antigene, sa kojima se organizam po prvi put susreće. Sa njima merimo sposobnost organizma sa kojom se ponovo imunski odaziva na antigen. Takav je tipičan antigen DNCB (dinitrohlorobencen). Konačno upotrebljavamo još specifične antigene — ekstrakte tumorskih autolognih ili alogernih ćelija odnosno tkiva, kao npr. tkiva malignog melanoma.

Vrednost kožnih testova je u jednostavnoj izvedbi i u dobroj korelaciji sa prognozom bolesti. Ipak, kod testa, koji je ispao negativno, ne možemo razabrati koji od mehanizama, pokrenutih kod reakcije zakašnjele preosetljivosti, je okvaren. Zato kožni test mjeri celokupnost ove reakcije. U najboljoj korelaciji sa kliničkim tokom bolesti i sa prognozom je kožni test sa upotrebom DNCB-ja (28).

Tehnika sprovođenja kožnog testa sa DNCB (slika 2): U stražnju stenu pazuha apliciramo 2000 gama DNCB-ja, rastopljenog u 0,1 ml acetona, i to na površinu od oko 20 mm u promeru. Kad se aplicirani rastvor osuši, prekrijemo ga flasterom i pustimo ga barem jedan dan. Posle te senzibilizacije organizma pričekamo 14 daa; u to vreme u područnim žlezdama umnože se imunokompetentni limfociti. Zatim apliciramo na podlakticu iste ruke 100 gama DNCB-ja, rastopljenog u 0,1 ml acetona, i to na površinu sa promerom od ca. 20 mm. Posle 72 sata otčitamo, kakva je reakcija. Sam eritem još ne znači da je reakcija pozitivna; na mestu aplikacije mora se pojaviti i induracija, a ponekad još vezikulacija ili u jako pozitivnim primerima i ulceracija.

Vrednost kožnih testova proverena je proučavanjem različitih lokalizacija, naročito kod raka dojke, kod malignog melanoma, kod raka na glavi i na vratu i kod bronhogenog karcinoma (29).

Na našem materijalu, to jest na seriji pacijenata sa bronhogenim karcinomom epidermoidnog tipa, koji još nisu bili lečeni i koje smo na osnovu TNM klasifikacije podelili u 3 stadije, upotrebili smo 3 kožne testove: PPD, Varidase i DNCB. Rezultati su pokazali da je doba preživuća najkraća u primerima gde je svih troje testova bilo negativnih. U toj grupi najviše bolesnika bilo je u trećem stadiju bolesti, dok je u grupi pacijenata koji su pozitivno reagirali na sve tri aplicirane antigene, doba preživuća bila je najduža, a kod većine pacijenata bolest je bila u prvom stadiju (slika 3). Iz toga proizlazi

1. Testovi sa pozitivnim antigenima

(»Recall antigens«)

- a) PPD (Protein Purified Derivate)
- b) Varidase (Streptokinase Streptodornase)
- c) Mumps — antigen

2. Testovi za »de novo« imunizaciju

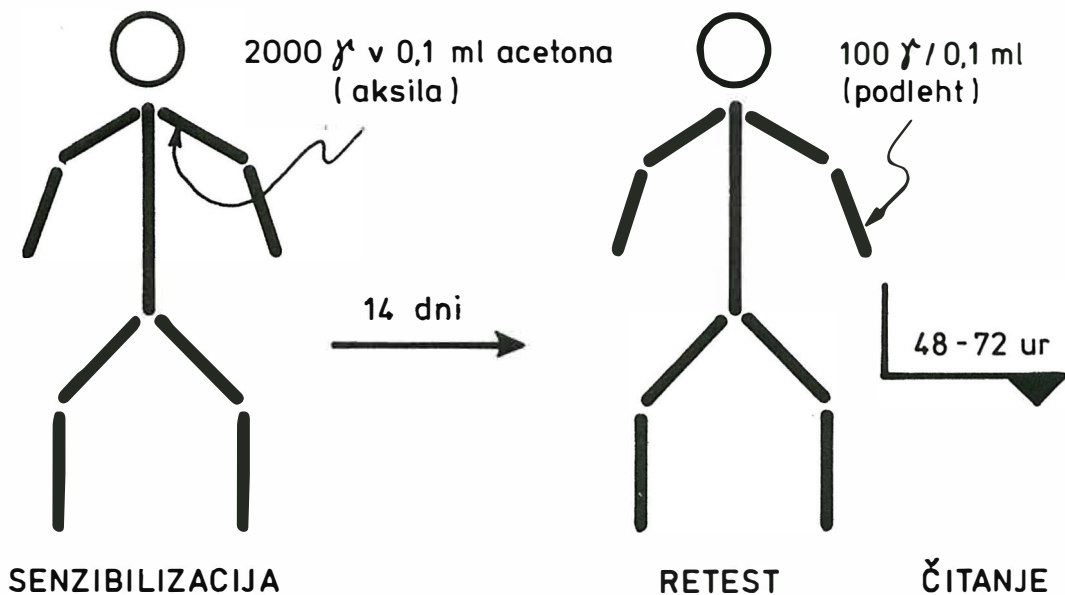
- a) DNCB (1-chloro, 2,4 — dinitrobenzene)
- b) PHA (Phytohaemagglutinin)

3. Testovi sa antigenima, koji su specifični za tumor

- a) Ca colli — antigen (Mol. težina: ca. 175.000)
- b) Ca bronchi — antigen (Mol. težina: 45.000)
- c) Melanoma malignum — antigen

Tabela 5. — Kožni testovi u imunodiagnostici malignoma

Kožni test z DNCB*



* Dinitroklorobencen

Slika 2. — Shema sprovođenja kožnog testa sa DNCB (dinitrochlorobencen)

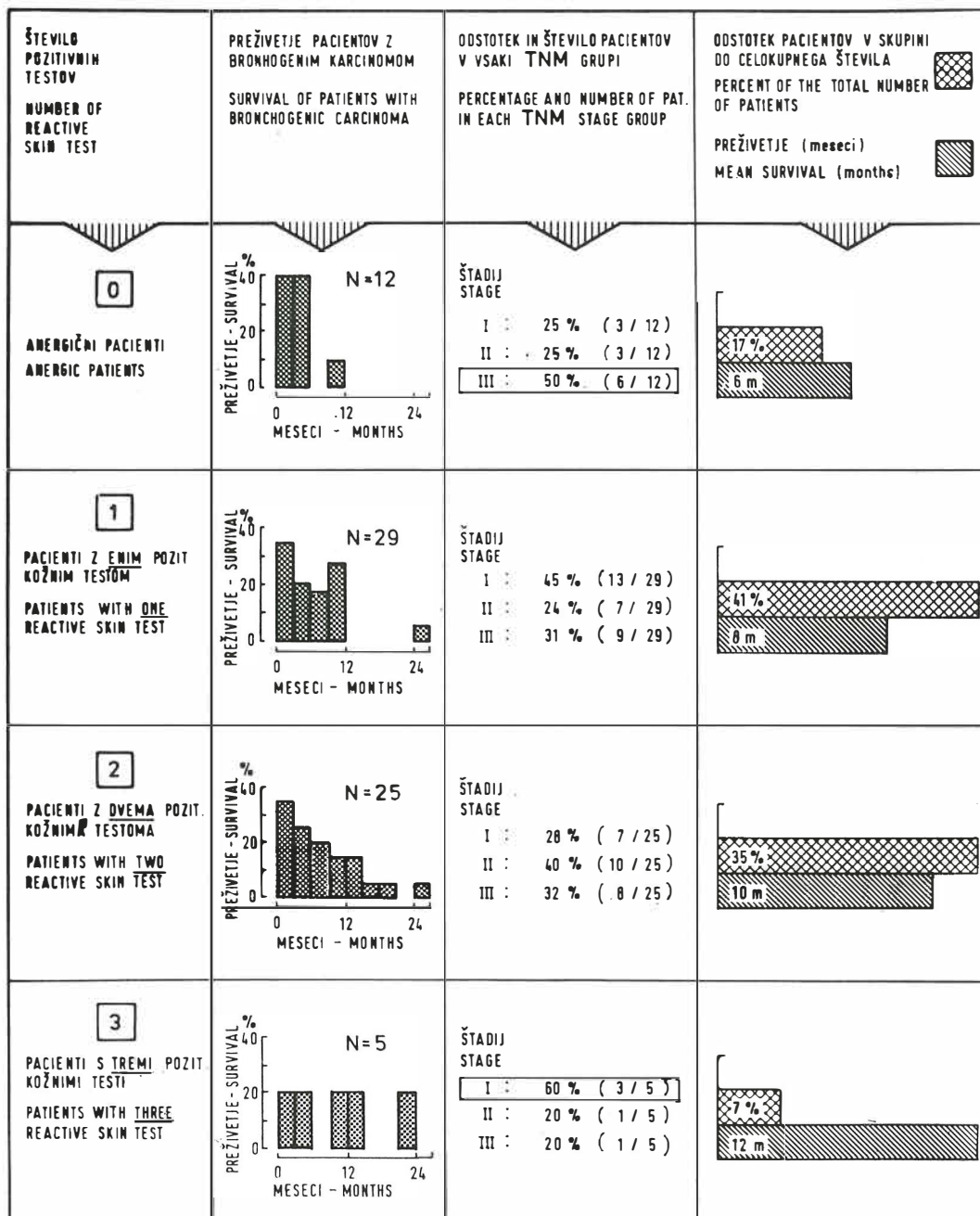
da su kožni testovi zbog jednostavne primene, zbog neopasnosti i zbog dobre prognostičke vrednosti u kancerologiji svestrano upotrebljivi.

f. **Inhibicija migracije leukocita.** — Ova pretraga oslanja se na svojstvo limfocita da u kontaktu sa antigenom izlučuju farmakološki faktor koji inhibira migraciju leukocita iz kapilare. Tehnički zahtevi te pretrage su prilično veliki, pa se zbog te činjenice nije ekstenzivno upotrebljavala. Ipak su dosadašnji rezultati tog testa u dobroj korelaciji sa sposobnošću organizma da se odazove antigenu pomoću reakcije zakašnjele preosetljivosti (30).

Ustanovilo se da ekstrakti rakavine dojke, a i brojnih drugih tumora uopšte, i tkiva malignih limfoma inhibiraju migraciju leukocita.

Ipak, ukoliko nam je poznato, dosada još nije bila izradjena studija o korelaciji između tog testa i kožnih testova, zbog čega danas nije moguće kazati nešto više o tome da li test inhibicije migracije leukocita ima prognostičku vrednost.

g. **Karcino-embrionični antigen (CEA).** — Karcino-embrionični antigen je glikoprotein sa molekularnom težinom između 200.000 i 300.000, koji se sintetizira i zatim izlučuje iz ćelije rakavih tkiva ento-



Slika 3. — Rezultati ispitivanja imunске reaktivnosti pomoću triju kožnih testa (PPD, Varidase, DNCB) kod serije 71 pacienata sa bronhogenim karcinomom podjeljenih u tri grupe na bazi TNM klasifikacije (Onkološki inštitut Ljubljana)

CEA koncentracija	ZNAČENJE	
	kod malignoma	kod nemalighnih bolesti
0,0—2,5 ng/ml	26,8 % malignoma entodermalnog izvora i 51,5 % malignoma neentodermalnog izvora nema povišene koncentracije CEA	
2,6—5,0 ng/ml	malignom možda prisutan	23,8 % pacijenata sa nemalighnim bolestima u toj grupi (ciroza, kolitis, ecc.) i 22,1 % teških pušača
5,1—10,00 ng/ml	malignom verovatno prisutan	8,1 % pacijenata sa nemalighnim bolestima i 8,3 % teških pušača u toj grupi
10,1—20,0 ng/ml	verovatnost prisutnosti malignoma visoka	1,6 % svih primera nemalighnih bolesti i 0,7 % teških pušača u toj grupi
nad 20,0 ng/ml	ukazuje na prisutnost malignoma kolona ili pankreasa ili metastaza	vanredno retko kod benignih bolesti

Tabela 6. — Značenje različitih koncentracija karcino-embrioničkog antigena u serumu kod malignih bolesti

dermalnog izvora (kolon, rektum, bronhus, pankreas, dojka) (31).

Raspon normalne koncentracije CEA u serumu je od 0—2,5 ng/ml seruma, ali je kod 18 % svih pušača koncentracije CEA povišena do 5,0 ng/ml seruma.

Koncentracija CEA obično je povišena kod karcinoma gastrointestinalnog trakta, bronhusa i dojke. Najčešće najdramatičnije povišene vrednosti kod karcinoma pankre-

asa (87 % svih slučajeva su pozitivni), kod kolorektalnog karcinoma (72 %), plućnog karcinoma (76 %) i želučanog karcinoma (61 %).

Kod nemalighnih bolesti koncentracija je najviše puta povišena kod alkoholne ciroze (u 71 % svih testiranih slučajeva) (32). Dakako, najviše vrednosti su kod gore pomenutih karcinoma lokalizacija. Iz izloženog sasvim je očito da je danas kon-

Koncentracija CEA (ng/ml)	primarni proces		metastaze	
	(bez obzira na metastaze)		(bez obzira na primarni proces)	
	progres	regres	prisutne	otsutne
Aritmetička sredina	15,00	2,63	19,04	6,11
Varijacijska širina	1,4—25,00	0,0—25,00	1,7—25,00	0,0—25,00*

* Vrednosti 25 ng/ml ponavljaju se kao najviše zbog toga, jer smo te serume testirali samo sa indirektnom Hansen-ovom metodom koja omogućuje određivanje koncentracije CEA samo do te visine.

Tabela 7. — Prikaz koncentracije karcinoembrioničkog antigena (CEA) kod 105 pacijenata sa malignomima gastro-intestinalnog trakta obzirom na prisutnost metastaza ili stanja primarnog procesa (Onkološki institut — Ljubljana)

statovanje koncentracije CEA kod određenih karcinomskih lokalizacija od velike vrednosti (tabela 6).

Ako posmatramo vremenski tok razvoja malignoma gastrointestinalnog trakta, nađjemo na pitanje, za koje razdoblje tog razvoja se CEA test može upotrebiti (33). Dosadašnji eksperimenti pokazali su da CEA test nije upotrebljiv kao »screening« metod, ali da je vrlo efikasan kao metod kod »follow-up« bolesnika, to znači, posle završene primarne terapije malignoma. Zbog toga bi se trebali pridržavati pravila da se test rutinski izvodi prije početka primarnog lečenja, a posle lečenja da se prati kretanje tih vrednosti. U primeru uspešne, radikalne terapije vrednosti za CEA padaju na normalu, dok su u primeru neradikalnog tretiranja koncentracije CEA u serumu još uvek povišene. U slučaju recidiva ili pojava metastaza koncentracija CEA počinje da se diže 2—3 meseca prije nego što se recidiv klinički manifestira. Koncentracije iznad 20 ng/ml ukazuju u većini primera na metastaze u jetri. Izuzetni su karcinomi pankreasa sa jetrenih metastaza gde su vrednosti mnogo više od pomenutih. U izveštajima nađjemo da se koncentracija CEA menja i kod kemo- i/ili radioterapije (34), što zavisi od uspešnosti te terapije. Uglavnom danas smatramo da

stalno i postepeno dizanje koncentracije CEA opravdava upotrebu daljih diagnostičkih postupaka (tabela 7).

U svrhu odredjivanja koncentracije CEA danas se najviše upotrebljava Hansen Z-gel metod* koji primenjujemo i kod nas. Metod je senzibilan, vrednosti za normalnu populaciju bile su postavljene na osnovu eksperimenata na visokom broju bolesnika; metod nije previše skup, ali je izvedba umereno zahtevna, tako da nam je potrebna dobro opremljena laboratorija (35).

h. Test odredjivanja alfa-feto-proteina (AFP). — U klinici se upotrebljava, makar u manjoj mjeri, i test odredjivanja alfa-feto-proteina (AFP). To je fetalni protein koji kod elektroforeze migrira u alfa-1 regiji i čija molekularna težina je 70.000. U fetusu se sintetizira u kesici žutanjka, a kasnije u jetri. Kod odraslog čovjeka iznosi koncentracija AFP od 0 do 5,0 ng/ml seruma, u serumu trudnica do 100 ng/ml seruma, a u krvi fetusa od 2 do 6×10^6 ng/ml seruma (36, 37) tabela 8).

Koncentracija alfa-feto-proteina povišena je kod primarnih hepatoma i iznosi često do 500 ng/ml seruma, dok se kod hepatopatije podiže najviše do 30 ng/ml. Masivni nodularni oblik hepatoma i razdife-

1. Serumski protein, glikoprotein, migrira u alfa-regiji
2. Molekularna težina: 70.000
3. Sedimentacijska konstanta: 5,05
4. Sadrži 4% ugljikovih hidrata (heksoze), 14,7% dušikovih sastavina
5. Koncentracija kod odrasle osobe: 0—5 ng/ml seruma
Koncentracija u fetalnom serumu: $2—3 \times 10^6$ ng/ml seruma, ona je najviša u 10. do 16. mjesecu trudnoće
6. Raspolovna doba 2 do 3,5 dana
7. Koncentracija kod trudnice: do 100 ng/ml seruma
8. Sinteza: fetalna jetra i placenta, vrećica od žutanjka, gastro-intestinalni trakt. U jetri sintetiziraju ćelije, koje su u okolini ožilja. Tvori se u fetalnim hepatocitima
9. Biološka funkcija: supstitut za albumin sa funkcijom ozmoze i transporta, veže estrogene i suradjuje kod procesa metabolizma. Koncentracija AFP-ja sa narastanjem koncentracije albumina pada

Tabela 8. — Karakteristike alfa-feto proteina (AFP)

* F. Hoffman — La Roche et Co. A. G. — CEA »Roche« Test, Basel, Švica

rencirani tip hepatoma sintetiziraju više alfa-feto-proteina nego ostali oblici hepatoma. AFP povišen je i kod embrionalnih tumora ovarija i testisa, npr. kod teratocarcinoma. U poslednje vreme ustanovili su da je AFP često povišen kod nekih primera malignoma želuca i prostate. Kod hepatoma je AFP povišen u 70 % svih slučajeva (38, 39).

Najčešće se upotrebljava metod radialne difuzije u agarju, ali je osetljivost tog metoda niska: količina koju možemo konstatovati je iznad 0,3 ng/100 ml seruma. Takve koncentracije mogu se naći kod hepatoma i kod embrionalnih tumora. Za preciznije određivanje moraćemo primeniti metode radioimunskog tipa, sa kojima se može konstatovati koncentracije alfa-feto-proteina u zdravim osobama, gde koncentracija može postići i vrednosti do 25 ng/ml seruma.

Zaključak. — U zaključku moramo reći da je vrednost opisanih testova prije svega statistične prirode, pa zato negativan test kod napredovale bolesti potvrđuje slabu prognozu, dok je pozitivan test ne odbija.

Ustanovljeno je da sa prognozom još najbolje koreliraju rezultati kožnih testova. Kad bi kao antigen upotrebljavali autoili alo-ekstrakte tumorskih tkiva, korelacija bi bila još bolja. U literaturi možemo naći podatke koji govore o tome da su se i bolesnici sa negativnom reakcijom na nespecifične antigene, još odazivali na tumorske antigene. Pomoću rezultata kod upotrebe ekstrakta tumora kao antigena, mogli bi da dobijemo još bolji uvid u tekući patofiziološki proces. Pitanje, koje je još potrebno da se rešava, je, da li postoji i na koji način se izražava eventualna korelacija između »in vivo« i »in vitro« testova, npr. kožnih testova sa blastnom transformacijom limfocita (40).

Otvoreno je i pitanje o reproducibilnosti tih testova jer postoji u primeru kad je test dobro reproducibilan, mogućnost standardizacije tog testa.

Danas se u glavnom razvijaju testovi koji su specifički za tumor i koji pokazuju funkcionalnu sposobnost onih ćelija koje direktno sudjeluju kod procesa zavrtaanja i početka rasti tumora. Tu mislimo u prvom redu na određivanje T-ćelija, K-ćelija, aktiviranih T-limfocita i makrofaga.

Bez obzira na navedene nedostatke, kod nekih lokalizacija već prije terapije određujemo tako zvani imunski profil bolesnika (41). Taj profil bi trebao da zahvati rezultate kožnih testova, transformacije limfocita, inhibiciju migracije leukocita i kod specifičkih lokalizacija specifički test, kao npr. kod karcinoma entodermalnog izvora određivanje karcinoembrionalnog antigena. Ipak, i ta slika ne informira nas dovoljno, i to iz razloga, jer neznamo savim dobro koji tip imunoprofila najverodostojnije reflektira sposobnost imunske odzivnosti bolesnika.

Po tom pitanju najviše odgovara test sa karcino-embrionalnim antigenom. Mogućnost konstatovanja recidiva već nekoliko meseci prije nego je taj postao klinički evidentan, zaista je veliko dostignuće; makar i u tom primeru ostaje otvoreno pitanje usmerenosti terapijske intervencije.

Summary

THE ROLE OF IMMUNOLOGICAL ASSAYS IN CLINICAL ONCOLOGY

The purpose of this paper is to extract and describe from a large number of known immunological tests, those assays which are in use in clinical oncology. Largely, non specific tests are used for assessment of patient's immune capabilities, and, specific tests, like alpha-feto-protein are used for detection of the malignant disease.

Since in host resistance to the growth of neoplastic cells, T-cells appear to play a major role, the majority of so far used tests are connected with the determination of the number and/or function of lymphocytes. Among tests in clinical use the following are mentioned: number of lymphocytes in peripheral blood, transformation capability of lymphocytes stimulated by plant anti-

gens, determination of T- and B-cell concentration in peripheral blood, and finally as the unique »in vivo« test the use of skin reactivity. The host resistance can be assessed by a reevaluation of the lymph node structure. Pathomorphologic changes of the lymph nodes can indicate a good reactivity of the immune system, or, on the other side, a breakdown of the immune resistance. Leukocyte migration inhibition test was also found to correlate satisfactorily with the clinical course.

Among the so called specific test two of them, namely, carcino-embryonic-antigen and alpha-feto-protein, are of clinical interest. Carcino-embryonic-antigen is useful as an indicator of the metabolic activity of tumors arising from entodermal tissue and is used in the follow-up of patients after the primary therapy was accomplished. The determination of alpha-feto-protein in patients with hepatomas and embryonal tumors of testes and ovaries has its clinical value, but the usefulness of this test is restricted by the fact that the incidence of these tumors account for only a small percentage of all cases registered yearly.

So far, a small number of known in vitro and in vivo immunological test, have been introduced in clinical practice. This is due to the fact that the majority of tests lack a correlation with the clinical course of the disease, or are not giving pertinent informations concerning the extent of the disease or the immune resistance of the host.

Literatura

- Ritts E., Jr., H. B. Neel: An overview of cancer immunology. *Mayo Clin. Proc.* 49, 118—131, 1974.
- Plesničar S.: Zmogljivost imunske diagnostike pri malignih boleznih. *Zdrav. Vestn.* 45, 421—425, 1976.
- Nakamura R. M.: *Immunopathology. Clinical laboratory concepts and methods.* Little, Brown and Company, Boston 1974.
- Stevenson G. T., D. J. R. Laurence: Report of a workshop on the immune response to solid tumours in man. *Int. J. Cancer* 16, 887—896, 1975.
- Cosimi A. B. et al.: Cellular immune competence of breast cancer patients receiving radiotherapy. *Arch. Surg.* 107, 531 do 535, 1973.
- McCredie J. A., W. R. Inch, R. M. Sutherland: Peripheral blood lymphocytes and breast cancer. *Arch. Surg.* 107, 162—165, 1973.
- Stjernswärd J. et al.: Lymphopenia and change in distribution of human B and T lymphocytes in peripheral blood induced by irradiation for mammary carcinoma. *Lancet*, 2, 1352—1356, 1972.
- Rubin A. D.: The human lymphocyte in short-term tissue culture. *Postgrad. Med.* 41, 244—251, 1967.
- Nikolić Lj. et al.: With reference to a simple kit for short-term lymphocyte culture tested in experimental animals. *Boll. Ist. Sieroter. Milan.* 55, 5—11, 1976.
- Papac R. J.: Lymphocyte transformation in malignant lymphomas. *Cancer* 26, 279—286, 1970.
- Kumar S., G. Taylor: The response to phytohaemagglutinin (PHA) of lymphocytes from cancer patients. *J. Clin. Pathol.* 26, 476—479, 1973.
- Jenkins V. K., M. H. Olson, H. N. Ellis: In vitro methods of assessing lymphocyte transformation in patients undergoing radiotherapy for bronchogenic cancer. *Tex. Rep. Biol. Med.* 31, 19—28, 1973.
- Thomas J. W. et al.: Effect of therapeutic irradiation on lymphocyte transformation in lung cancer. *Cancer* 27, 1046—1050, 1971.
- Babušíkova O., J. Medzihradský: Survival of human peripheral blood lymphocytes in short-time PHA cultures in cancer patients and healthy controls. *Neoplasma* 21, 655—658, 1974.
- Wybran J., H. H. Fudenberg: Thymus-derived rosette-forming cells in various human disease states: cancer, lymphoma, bacterial and viral infections, and other diseases. *J. Clin. Invest.* 52, 1026—1032, 1972.
- Keller S. E. et al.: Decreased T-lymphocytes in patients with mammary cancer. *J. Clin. Pathol.* 65, 445—449, 1976.
- Anthony H. M. et al.: E and EAC rosetting lymphocytes in patients with carcinoma of bronchus. II. A sequential study of thirty patients: effects of BCG. *Clin. Exp. Immunol.* 20, 41—54, 1975.
- Olkowski Z. L., S. A. Wilkins, Jr.: T-lymphocyte levels in the peripheral blood of patients with cancer of the head and neck. *Am. J. Surg.* 130, 440—444, 1975.
- Krooks W. H., T. L. Roszman, A. S. Rogers: Impairment of rosette-forming T lymphocytes in patients with primary intracranial tumors. *Cancer* 37, 1869—1873, 1976.
- Benešova E., F. Hermansky, J. Šalkova: E rosettes in lymphoproliferative diseases. *Neoplasma* 23, 23—30, 1976.
- Belpome D. et al.: La nature T ou B des cellules néoplasiques des leucémies lymphoïdes. *Bull. Cancer* 61, 387—402, 1974.

22. Astaldi G., G. C. B. Astaldi: Immunologia dei linfociti nella leucemia. *Recent. Prog. Med. (Roma)* 59, 246—265, 1975.
23. Berlinger N. T. et al.: Immunologic assessment of regional lymph node histology in relation to survival in head and neck carcinoma. *Cancer* 37, 697—705, 1976.
24. Tsakraklides V., O. T. Anastasiades, J. H. Kersey: Prognostic significance of regional lymph node histology in uterine cervical cancer. *Cancer* 31, 860—868, 1973.
25. Patt D. J. et al.: Mesocolic lymph node histology is an important prognostic indicator for patients with carcinoma of the sigmoid colon: an immunomorphologic study. *Cancer* 35, 1388—1396, 1975.
26. Ellis R. J. et al.: Immunologic competence of regional lymph nodes in patients with breast cancer. *Cancer* 35, 655—659, 1975.
27. Harris J., D. Copeland: Impaired immunoresponsiveness in tumor patients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 230, 56—85, 1974.
28. Lee Y-T. N. et al.: Delayed cutaneous hypersensitivity and peripheral lymphocyte counts in patients with advanced cancer. *Cancer* 35, 748—755, 1975.
29. Herberman R. B.: Cell-mediated immunity to tumor cells. *Adv. Cancer Res.* 19, 207—263, 1974.
30. House A. K., S. Wisniewski, T. L. Woodings: Immunity in colonic tumor patients after operation: Determination by leukocyte-migration inhibition. *Dis. Colon Rectum* 18, 100—106, 1975.
31. Zamcheck N.: Carcinoembryonic antigen. Quantitative variations in circulating levels in benign and malignant digestive tract diseases. *Adv. Intern. Med.* 19, 413—433, 1974.
32. Rule A. H. et al.: Circulating carcinoembryonic antigen (CEA): Relationship to clinical status of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 14, 880—884, 1973.
33. Kamholz S. L.: Immunologic diagnosis of human digestive tract cancer. Carcinoembryonic antigens. *Am. J. Gastroenterol.* 59, 233—243, 1973.
34. Vider M. et al.: Carcinoembryonic antigen (CEA) monitoring in the management of radiotherapeutic and chemotherapeutic patients. *Am. J. Roentgenol.* 124, 630—635, 1975.
35. Martin E. W. Jr. et al.: Carcinoembryonic antigen. Clinical and historical aspects. *Cancer* 37, 62—81, 1976.
36. Abelev G. I.: Alpha-fetoprotein as a marker of embryospecific differentiations in normal and tumor tissues. *Transplant. Rev.* 20, 3—37, 1974.
37. Martin F., M. S. Martin, C. Bourgeaux: Perspectives in cancer research. Fetal antigens in human digestive tumors. *Eur. J. Cancer* 12, 165—175, 1976.
38. Kohn J. et al.: Serum-alpha₁-fetoprotein in patients with testicular tumours. *Lancet* 2, 433—436, 1976.
39. Gassner M., P. J. Grob: Alpha₁-Fetoprotein, Hepatom und Teratom, Schweiz. Med. Wochenschr. 102, 465—471, 1972.
40. Herberman R. B.: Cellular immunity to human tumor-associated antigens. A review. *Isr. J. Med. Sci.* 9, 300—307, 1973.
41. Lurie B. B. et al.: Diagnosis and prognosis in colon cancer based on a profile of immune reactivity. *J. Natl. Cancer Inst.* 54, 319—325, 1975.

Adresa autora: Prof. dr. S. Plesničar, Onkološki inštitut, Vrazov trg 4, 61105 Ljubljana.