

Spis treści

1. Wprowadzenie	1
1.1 Streszczenie	1
1.2 Cel pracy	1
1.3 Układ pracy	2
2. Wstęp	3
2.1 Procesy nowotworowe	3
2.2 Budowa układu immunologicznego i jego znaczenie w procesie leczenia nowotworów	5
2.2.1 Komórki NK	7
2.2.2 Limfocyty typu T	9
2.2.3 Interleukiny	11
3. Leczenie nowotworów	14
3.1 Chemioterapia	14
3.2 Immunoterapia	16
3.2.1 Nieswoista bierna immunoterapia	18
3.2.2 Swoista bierna immunoterapia	18
3.2.3 Nieswoista czynna immunoterapia	18
3.2.4 Swoista czynna immunoterapia	19
3.3 Leczenie skojarzone	19
4. Model matematyczny	21
4.1 Model nieuwzględniający procesu leczenia	21
4.1.1 Założenia modelu	22
4.1.2 Równania i opis modelu	23
4.2 Model uwzględniający proces leczenia	25
4.2.1 Równania i opis modelu	25
5. Symulacje	29
5.1 Odpowiedź układu immunologicznego na rozwijający się w organizmie nowotwór – brak leczenia	30
5.1.1 Scenariusz I – symulacja wykonana dla modelu nieleczzonego guza	30
5.1.2 Scenariusz II – symulacja wykonana dla modelu nieleczzonego guza	35
5.2 Leczenie metodą chemioterapii	39

5.3	Leczenie metodą immunoterapii	39
5.4	Połączenie metod chemioterapii i immunoterapii	39
6.	Rezultaty	40
7.	Analiza wyników	41
8.	Podsumowanie	42
9.	Rozwój	43
9.1	Interferony	43
10.	Dodatek	50
10.1	Tabela skrótów	50

Spis rysunków

2.1	Podział limfocytów typu T [7].	10
5.1	Wykresy zmian liczby komórek badanych populacji – komórek nowotworowych $T(t)$, komórek NK $N(t)$, limfocytów T_{CD8+} $L(t)$ i limfocytów krążących $C(t)$	32
5.2	Wyniki otrzymane na koniec symulacji, która trwała $T_k = 120$ dni. Liczba komórek nowotworowych na koniec symulacji $T(120)$ w zależności od początkowej liczby komórek nowotworowych $T(0)$	33
5.3	Wyniki otrzymane na koniec symulacji, która trwała $T_k = 120$ dni. Długość promienia nowotworu [mm] na koniec symulacji w zależności od początkowej liczby krążących limfocytów $T(0)$	34
5.4	Wykresy zmian liczby komórek badanych populacji – komórek nowotworowych $T(t)$, komórek NK $N(t)$, limfocytów T_{CD8+} $L(t)$ i limfocytów krążących $C(t)$	36
5.5	Wyniki otrzymane na koniec symulacji, która trwała $T_k = 120$ dni. Liczba komórek nowotworowych na koniec symulacji $T(120)$ w zależności od początkowej liczby krążących limfocytów $C(0)$	37
5.6	Wyniki otrzymane na koniec symulacji, która trwała $T_k = 120$ dni. Długość promienia nowotworu [mm] na koniec symulacji w zależności od początkowej liczby krążących limfocytów $C(0)$	38

Spis tabel

2.1	Mechanizmy obronne odporności nieswoistej i swoistej [7].	5
4.1	Parametry modelu odpowiedzi immunologicznej na rozwijający się nowotwór bez uwzględnienia procesu leczenia.	27
4.2	Dodatkowe parametry modelu odpowiedzi immunologicznej na rozwijający się nowotwór z uwzględnieniem procesu leczenia.	28
5.1	Warunki początkowe dla modelu odpowiedzi immunologicznej na rozwijający się nowotwór bez uwzględnienia procesu leczenia.	29
5.2	Początkowa liczba komórek nowotworowych $T(0)$, liczba komórek nowotworowych po symulacji w chwili $T_k = 120$ dni $T(120)$ oraz szacowana objętość i długość promienia nowotworu po symulacji w chwili $T_k = 120$ dni.	30
5.3	Początkowa liczba limfocytów krążących $C(0)$, liczba komórek nowotworowych po symulacji w chwili $T_k = 120$ dni $T(120)$ oraz szacowana objętość i długość promienia nowotworu po symulacji w chwili $T_k = 120$ dni.	35
10.1	Skróty wykorzystane w pracy	50

1. Wprowadzenie

1.1 Streszczenie

W pracy przedstawiono model opisujący odpowiedź układu immunologicznego na rozwijający się w organizmie nowotwór. Model ten oparty jest na modelu de Pillis [19]. Obejmuje on rozwój komórek nowotworowych w organizmie oraz odpowiedź układu immunologicznego – w tym, tak zwanych „naturalnych zabójców”, czyli komórek NK (ang. Natural Killer cells), limfocytów T_{CD8+} oraz limfocytów krążących. Następnie model został poddany modyfikacji polegającej na uwzględnieniu procesu leczenia nowotworu skojarzonymi metodami chemioterapii (z użyciem leku cytostatycznego) i immunoterapii z użyciem pewnej grupy cytokin¹, tj. interleukin-2 (IL-2).

1.2 Cel pracy

Celem pracy było:

- utworzenie modelu rozwoju nowotworu w organizmie z uwzględnieniem leczenia skojarzonymi metodami chemioterapii i immunoterapii,
- przeprowadzenie symulacji leczenia nowotworu metodą chemioterapii, immunoterapii oraz skojarzonych metod chemioterapii i immunoterapii,
- analiza rozwiązań modelu opisującego leczenie wyłącznie metodą chemioterapii,
- analiza rozwiązań modelu opisującego leczenie wyłącznie metodą immunoterapii,
- analiza rozwiązań modelu opisującego leczenie zarówno metodą chemioterapii, jak i immunoterapii.

¹ Cytokiny – białka o niskiej masie cząsteczkowej biorące udział w przekazywaniu informacji pomiędzy komórkami; odgrywają istotną rolę w odpowiedzi zapalnej, apoptozie, wzroście i różnicowaniu komórek [16].

1.3 Układ pracy

Praca składa się z następujących części:

- wstępu teoretycznego zawierającego informacje na temat rodzajów nowotworów i sposobów ich rozwoju oraz niektórych metod ich leczenia, a także dotyczących budowy i sposobu działania układu immunologicznego,
- przedstawienia zaimplementowanego modelu, na którym przeprowadzano symulacje,
- opisu dokonanych symulacji i scenariuszy, według których zostały przeprowadzone,
- analizy wyników symulacji i wynikających z nich wniosków,
- podsumowania.

2. Wstęp

2.1 Procesy nowotworowe

Nowotworem określa się nieprawidłowe komórki w organizmie, których wzrost odbywa się w sposób niekontrolowany [1, 2]. Czasami (najczęściej w przypadku zmian zapalnych) naprzemiennie z pojęciem nowotwór, stosowane jest określenie guz [24]. W zdrowym organizmie występuje równowaga pomiędzy tempem podziałów komórkowych a utratą komórek. W przypadku nowotworu ginie mniej komórek niż przybywa [3]. W efekcie spontanicznej proliferacji komórek nowotworowych składająca się z nich struktura zaczyna niszczyć narząd, w którym wystąpił proces nowotworowy. Niektóre z tych komórek mogą oderwać się od pozostałych, przedostać do naczyń krwionośnych i limfatycznych, a w konsekwencji dawać przerzuty do innych narządów [2]. Powstawanie nowotworu wiąże się z wieloma zmianami materiału genetycznego. Rozpoczęcie tego procesu zależy zarówno od wagi, jak i miejsca, w którym dana zmiana wystąpiła [3].

Transformacja oznacza wielostopniowy proces, podczas którego komórki prawidłowe stają się złośliwe. Każdy etap tego procesu odpowiada zmianom genetycznym prowadzącym do zaburzeń wzrostu komórek prawidłowych [24].

Na powierzchni komórek nowotworowych pojawiają się zmienione albo obce antygeny, a także zanikają cząsteczki charakterystyczne komórek własnych organizmu. Zmiany te zazwyczaj są rozpoznawane przez układ odpornościowy, co umożliwia skuteczną walkę z komórkami nowotworowymi. Jednak rozwojowi nowotworu towarzyszą różne mechanizmy maskujące, które powodują nierozpoznawalność komórek złośliwie transformowanych, co pozwala na „ucieczkę” nowotworu przed układem immunologicznym. Na tym procesie skupia się immunoterapia, która jest jednym ze sposobów leczenia nowotworów [31].

Zachodzące zmiany genetyczne związane są z różnymi zmianami fizjologicznymi komórki, w szczególności z [24]:

- samowystarczalnością w wytwarzaniu sygnałów do wzrostu,
- niewrażliwością na inhibitory sygnałów wzrostu,
- unikaniem programowanej śmierci komórek,
- nieograniczonym potencjałem replikacyjnym,
- podtrzymywaniem angiogenezy,

- inwazją tkankową,
- przerzutami,
- unikaniem destrukcji immunologicznej.

Warto także zwrócić uwagę na zmiany systemów naprawy DNA oraz zmiany systemów regulujących podstawowe procesy komórkowe (na przykład wzrost, różnicowanie, apoptozę¹). Na skutek zmian systemów naprawczych dochodzi do szybkiej i dużej niestabilności genomu. Zmiany w systemach regulujących powodują natomiast powolny proces zaburzenia homeostazy komórki oraz stopniowo narastającą niestabilność genomu. Choroby nowotworowe w większości rozwijają się w tym drugim przypadku, dlatego od pojawienia się początkowej zmiany do klinicznego wykrycia guza mija zazwyczaj wiele lat [3].

Mechanizmy genetyczne leżące u podstaw wyżej wymienionych zmian fizjologicznych mogą różnić się między sobą dla poszczególnych nowotworów. Mimo to, zmiany fizjologiczne są wspólne dla większości nowotworów i odpowiadają zarówno za przeżycie, jak i ekspresję nowotworu [24].

¹ Apoptoza – śmierć programowana, śmierć samobójcza komórki zachodząca w warunkach fizjologicznych [12].

2.2 Budowa układu immunologicznego i jego znaczenie w procesie leczenia nowotworów

Na układ immunologiczny składają się mechanizmy odporności swoistej (nabytej) i nieswoistej (wrodzonej) [4, 5, 20]. Ich podział przedstawiono w Tab. 2.1. Mechanizmy odporności nabytej są aktywowane, gdy mechanizmy odporności wrodzonej nie zapobiegą wnikaniu lub nie usuną patogenu [20].

Tab. 2.1: Mechanizmy obronne odporności nieswoistej i swoistej [7].

Odporność		Działanie obronne	
Nieswoista (wrodzona)	Humoralna	Lizozym	Bakterioliza bakterii Gram dodatnich, liza bakterii Gram-ujemnych po usunięciu warstwy liposacharydowej
		Laktoferyna	Pozbawienie bakterii dostępu do żelaza poprzez wiązanie go
		Transferyna	Pozbawienie bakterii dostępu do żelaza poprzez wiązanie go
		Białka ostrej fazy	Aktywacja limfocytów, makrofagów, dopełniacza na drodze klasycznej
		Dopełniacz	Uaktywnienie układu dopełniacza
		Interferony	Hamowanie transformacji limfocytów pod wpływem mitogenów
	Komórkowa	Fagocyty	Fagocytoza
		Eozynofile	Produkcja prostoglandyn PGE1 i PGE2, które hamują uwalnianie mediatorów przez komórki tuczne i bazofile
		Komórki K	Cytotoksyczność zależna od przeciwciał
		Komórki NK	Spontaniczne niszczenie komórek zakaźnych wirusem
Swoista (nabyta)	Humoralna	Immunoglobuliny	
		Limfocyty typu B	
	Komórkowa	Limfocyty typu T	

Zasadnicze znaczenie w odporności organizmu mają skóra, błony śluzowe, fagocyty, limfocyty typu T i B², komórki NK, przeciwciała oraz układ dopełniacza [28].

Układ dopełniacza wspiera mechanizmy wrodzonej odporności immunologicznej przez zabijanie drobnoustrojów za pośrednictwem lizy, chemotaksję komórek fagocytarnych oraz ułatwianie procesu fagocytozy. Układ dopełniacza (komplement) tworzy grupa około 40 białek, które zabezpieczają organizm przed atakiem drobnoustrojów. Komplement aktywowany jest kaskadowo (każdy kolejny składnik aktywuje następny).

² Limfocyty typu B – wyspecjalizowane komórki układu immunologicznego, których główna funkcja polega na wytwarzaniu przeciwciał [28].

Można wyróżnić trzy drogi aktywacji dopełniacza [13]:

- klasyczną,
- alternatywną,
- lektynową.

Klasyczna droga aktywacji komplementu zachodzi z udziałem swoistych immunoglobulin, które związane są z powierzchnią drobnoustrojów. Prowadzi ona do śmierci litycznej komórki docelowej (bakterioliza).

Znacznie szybsza jest droga alternatywna (properdynowa), ponieważ kształtuje się ona od momentu wniknięcia patogenu. W tym przypadku drobnoustroje ulegają spontanicznej opsonizacji³ przez cząsteczki C3b dopełniacza. Ułatwia to ich pochłanianie przez komórki fagocytarne.

Podczas lektynowej drogi aktywacji następuje połączenie cząsteczki cukru obecnej na powierzchni bakterii z lektyną wiążącą mannozę MBL (ang. Mannose Binding Lectin). Ta interakcja prowadzi do rozkładu czynników C2 i C4 układu dopełniacza.

Alternatywna droga aktywacji układu dopełniacza jest podstawowym mechanizmem wrodzonego układu odpornościowego. Organizm uruchamia kaskadę nieswoistych reakcji obronnych zanim pojawią się swoiste w stosunku do mikroorganizmu przeciwciała. Zapewnia to oszczędność czasu, ale alternatywna droga aktywacji oddziałuje także na własne tkanki, co ogranicza sprawne funkcjonowanie wielu regulatorów [13].

Funkcjonowanie mechanizmów nieswoistych jest niezależne od wcześniejszej styczności organizmu z czynnikami patogennymi i pełni funkcję obronną przed infekcjami i chorobami będącymi skutkiem działania czynników środowiskowych. Mechanizmy te cechuje mniejsza precyzja, ale są one zdolne do szybkiego rozpoznawania i niszczenia wnikających drobnoustrojów. Odporność wrodzoną warunkują między innymi: komórki NK, makrofagi, granulocyty, monocyty [4].

Odporność swoista rozpoznaje antygeny⁴ bardzo precyzyjnie. Jej ważnymi elementami są limfocyty typu T, limfocyty typu B, cytokiny oraz przeciwciała. Komórki te są zdolne do wytwarzania nieograniczonej liczby receptorów. Dodatkowo, jeśli dojdzie do ich kontaktu z antygenem wytwarza się pamięć immunologiczna [4], dzięki której przy ponownym zetknięciu komórki danego typu z odpowiednim antygenem wytwarzana odpowiedź immunologiczna jest szybsza i silniejsza [20]. W przypadku limfocytów typu T, typ odpowiedzi swoistej określany jest jako komórkowy (tj. związany z aktywnością komórek układu immunologicznego [13]), natomiast dla limfocytów typu B – humoralny (tj. związany z aktywnością immunoglobulin [13]).

³ Opsonizacja – proces ułatwiający fagocytozę [13].

⁴ Antygeny – związki wywołujące reakcje układu immunologicznego; najczęściej substancje wielocząsteczkowe, rozpoznawane swoicie poprzez powierzchniowe receptory limfocytów [20].

Do mechanizmów swoistej odporności należą [6]:

- aktywność cytokin i chemokin,
- cytokinozależna wrodzona oporność leukocytów i innych komórek,
- zabijanie zakażonych lub nowotworowych komórek przez komórki NK, komplement aktywowany lektynami lub drogą alternatywną,
- opsonizacja i fagocytoza⁵.

Pomimo bardzo dużego znaczenia układu immunologicznego dla organizmu, wiele mechanizmów jego działania pozostaje jeszcze niewyjaśnionych [4].

Znaczącą rolę w oddziaływaniu układu immunologicznego na rozwijający się nowotwór pełnią:

- komórki NK,
- limfocyty T_{CD8+} ,
- interleukiny (IL).

W związku z ważną funkcją wyżej wymienionych komórek, ujęto je w opisywanym modelu, natomiast ich znaczenie opisano w dalszej części pracy.

2.2.1 Komórki NK

Swoją rolę w odpowiedzi immunologicznej mają także komórki NK (limfocyty NK), czyli limfocyty cytotoksyczne [30] stanowiące populację odrębną od limfocytów typu B i T [7]. Limfocyty NK stanowią około 10% limfocytów obecnych we krwi [5, 30, 31]. Ich zadaniem jest niszczenie komórek nowotworowych i zainfekowanych wirusami [5].

Komórki NK są szybkie i skuteczne w działaniu, ponieważ nie wymagają wcześniejszej immunizacji, by uruchomić reakcję immunologiczną [31].

Komórki NK to efektorowe komórki cytotoksyczne będące elementem odporności nieswoistej organizmu. Są to duże komórki limfoidalne posiadające umiejętność rozpoznawania wielu konfiguracji molekularnych występujących m.in. na komórkach własnych, zakażonych wirusem oraz komórkach nowotworowych [29].

Limfocyty NK identyfikowane są poprzez ekspresję antygeny powierzchniowego CD56 i jednoczesny brak ekspresji antygeny CD3, a także ekspresję receptorów CD16, CD56 oraz CD57. Na podstawie ilości receptora CD56 można wyróżnić dwie subpopulacje komórek NK [31, 32]:

- subpopulację komórek $NK_{CD56^{bright}CD16^{-}}$ o dużej ekspresji receptora CD56 oraz braku ekspresji receptora CD16, które wytwarzają dużą ilość cytokin i występują głównie w tkankach zmienionych chorobowo oraz węzłach chłonnych,

⁵ Fagocytoza – usuwanie kompleksów immunologicznych i uszkodzonych komórek (ułatwienie fagocytozy immunologicznej). Efektywne niszczenie drobnoustrojów przez fagocyty [13, 14].

- subpopulację komórek $NK_{CD56^{dim}CD16+}$ o umiarkowanej ekspresji receptora CD56 oraz znacznej ekspresji receptora CD16, które charakteryzują się wysoką cytotoksycznością i występują głównie we krwi obwodowej.

Istnieją liczne efektorowe mechanizmy cytotoksyczności służące komórkom NK do zabijania komórek zakażonych przez wirusy lub komórek nowotworowych. Mechanizmy cytotoksyczności podzielono na cytotoksyczność zależną od ziaren cytolitycznych i cytotoksyczność zależną od receptorów dla cząsteczek z rodziny TNF.

Komórki NK są aktywowane, gdy komórki docelowe wykazują ekspresję ligandów wiążących się do receptorów komórek NK [29].

Komórki NK mogą wykazywać ekspresję różnych receptorów, np. [29]:

- receptorów naturalnej cytotoksyczności NCRs (ang. Natural Cytotoxicity Receptors),
- lektyno-podobnych receptorów,
- receptorów aktywujących lub hamujących komórki NK.

Zmiany nowotworowe komórek własnych organizmu mogą być usuwane przez limfocyty NK bezpośrednio lub pośrednio (z udziałem innych komórek immunokompetentnych). Do mechanizmów bezpośrednich należy proces naturalnej cytotoksyczności, cytotoksyczności zależnej od przeciwciał oraz cytotoksyczności indukowanej. W mechanizmach pośrednich największe znaczenie mają interakcje dwukierunkowe komórek NK z komórkami dendrytycznymi, limfocytami typu B i T oraz makrofagami. W ich wyniku uwalniane są cytokiny, które równocześnie mobilizują komórki biorące udział w interakcji oraz pobudzają je do efektywnego niszczenia komórek nowotworowych [31].

Charakterystyczną cechą komórek NK jest brak posiadania markerów czy receptorów antygenowych na powierzchni. Działanie komórek NK opiera się na rozpoznawaniu przez receptor pektynowy reszt cukrowych, co umożliwia im cytotoksyczne zniszczenie komórki docelowej, między innymi nowotworowej. Z kolei receptor hamujący komórki typu „zabójcy” KIR (ang. Killer cells Inhibitory Receptor) zmniejsza aktywność komórek NK, jeśli rozpoznają one prawidłowe komórki organizmu [4].

Aktywacja komórek NK zależy od wypadkowego działania receptorów aktywujących i hamujących. Pozwala to uniknąć atakowania przez komórki NK niezmiennych komórek własnego organizmu. Cząsteczki MHC klasy I są głównymi regulatorami aktywności komórek NK. Cząsteczki te są obecne na każdej jądrzastej komórce organizmu, dzięki czemu możliwe jest rozpoznawanie zdrowych komórek. Obniżenie ekspresji cząsteczek MHC klasy I na komórkach nowotworowych umożliwia skierowanie przeciwko nim odpowiedzi komórek NK. Równocześnie, komórka NK musi otrzymać właściwy sygnał z receptorów aktywujących, aby docelowa komórka została zabita. Takimi receptorami w organizmie ludzkim są cząsteczki NKp30, NKp44, NKp46, CD16 oraz receptory należące do nadrodziny KIR. [30]. Pobudzone komórki NK wywołują lizę komórek nowotworowych lub indukują ich apoptozę [31].

Z wiekiem aktywność komórek NK spada (ze względu na zwiększoną liczbę receptorów KIR [5]), co zwiększa ryzyko śmierci spowodowanej ciężką infekcją. Niekorzystnymi czynnikami mającymi wpływ na układ komórek NK są: stres, niska aktywność fizyczna oraz dieta wysokotłuszczowa [4]. Silna aktywność cytotoksyczna komórek NK może być uznana za oznakę dobrego zdrowia [5].

2.2.2 Limfocyty typu T

Jedną z grup limfocytów są limfocyty typu T, które stanowią odrębny rodzaj komórek układu immunologicznego. Ich wyspecjalizowaną funkcją jest bezpośrednie atakowanie obcych antygenów, na przykład wirusów, grzybów. Pełnią także funkcję regulatorową w obrębie układu immunologicznego [28]. Limfocyty typu T wytwarzane są w szpiku kostnym [7], a na wczesnym etapie życia płodowego trafiają do grasicy (limfocyty grasiczozależne), gdzie dojrzewają. Następnie opuszczają grasicę i przebywają w różnych narządach układu odpornościowego, na przykład śledzionie, węzłach chłonnych, szpiku kostnym oraz krwi obwodowej [28].

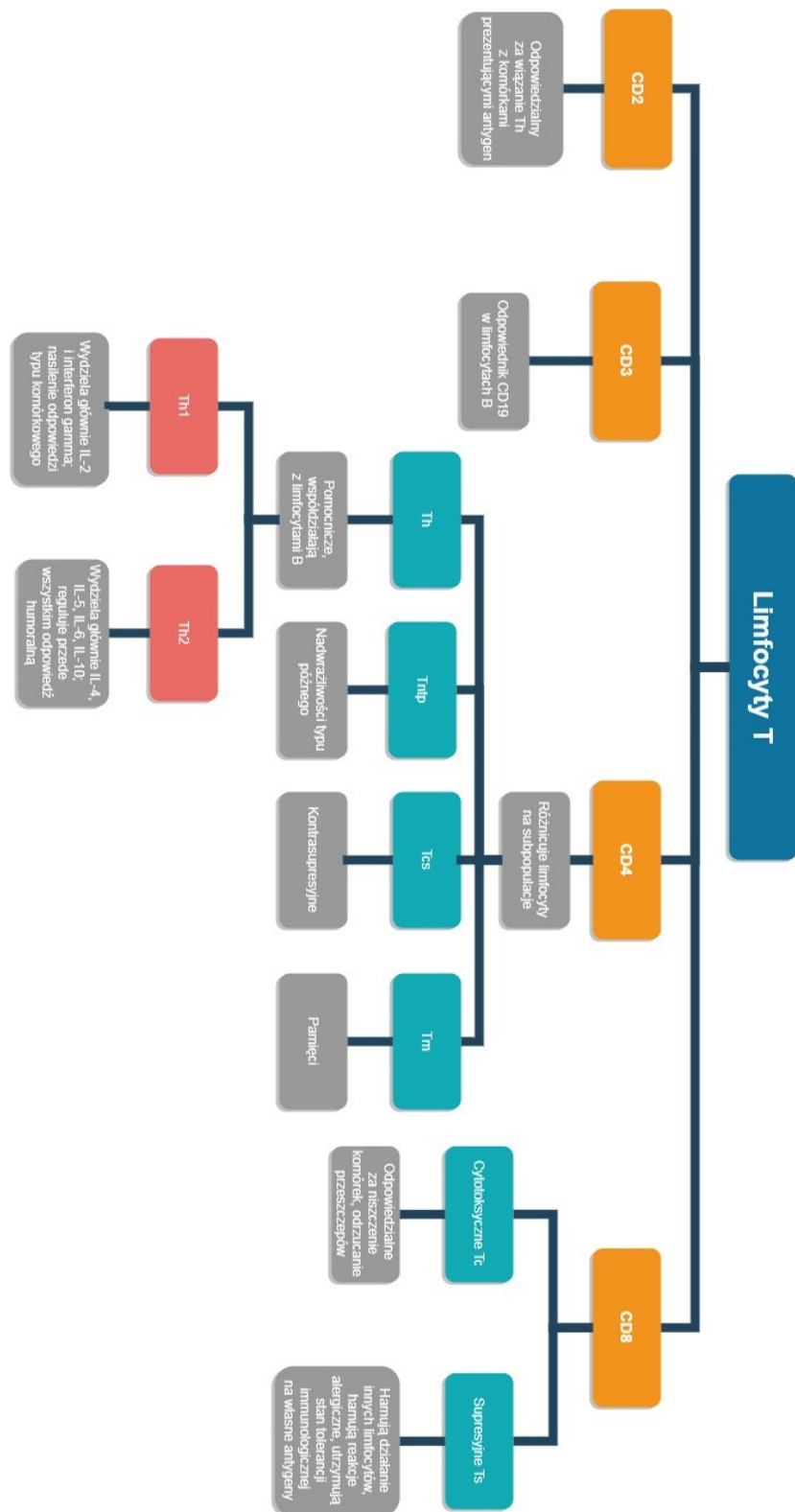
Limfocyty typu T oznaczane jako CD8+ dzielą się na limfocyty [7]:

- cytotoksyczne T_c , które odpowiadają za niszczenie komórek i odrzucanie przeszczepów,
- supresyjne T_s , które odpowiadają za hamowanie działania innych limfocytów, reakcji alergicznych i utrzymanie tolerancji immunologicznej na własne antygeny.

Na Rys. 2.1, na pomarańczowych, niebieskich i różowych polach przedstawiono kolejne podziały limfocytów typu T występujących w organizmie. Dodatkowo, na polach szarych krótko opisano funkcję, jaką one pełnią lub wymieniono ich charakterystyczne cechy.

Podstawą procesów immunologicznych jest prezentacja antygenów przez odpowiednie komórki pomocniczym limfocytom Th. Klasyczne komórki prezentujące antygen APC (ang. Antigen Presenting Cells) to limfocyty typu B, komórki dendryczne oraz makrofagi. Natomiast, nieklasycznymi komórkami są limfocyty typu T, eozynofile, fibroblasty oraz keranocyty [7].

Odpowiedź immunologiczna swoista typu komórkowego, w którą zaangażowane są subpopulacje limfocytów typu T, polega na wywołaniu reakcji zwalczania antygeny. Możliwe są dwa typy tej reakcji. W pierwszym z nich funkcję efektorów pełnią limfocyty CD4+, a makrofagi są komórkami pomocniczymi. Drugi typ reakcji zakłada, że limfocyt cytotoksyczny CD8+ jest komórką efektorową, a limfocyt CD4+ pomocniczą. Odporność komórkowa ma za zadanie, przede wszystkim walczyć z zakażeniami, ale również spełnia ważną rolę w reakcji kontaktowej ze związkami chemicznymi, w odrzuceniu przeszczepu czy tkanek zmienionych nowotworowo i w niektórych reakcjach autoimmunologicznych [4]. Między 5 a 6 dekadą życia ustaje czynność grasicy, czego skutkiem są zmiany w subpopulacjach limfocytów typu T. Z wiekiem głównie wzrasta liczba limfocytów CD4+, natomiast zmniejsza się liczba limfocytów supresorowych i cytotoksycznych CD8+ [4].



Rys. 2.1: Podział limfocytów typu T [7].

Komórki nowotworowe współdziałając z makrofagami TAMs M2 powodują immunosupresję⁶ układu immunologicznego. W początkowym etapie choroby można zaobserwować wzrost poziomu cytokin prozapalnych. Czynniki te hamują cytotoksyczną aktywność makrofagów. Komórki nowotworowe produkują również cytokiny (IL-10, IL-4) stymulujące polaryzację fenotypu w kierunku klasy M2. Makrofagi TAMs M2 wydzielają związki o działaniu przeciwzapalnym, czego efektem jest między innymi indukcja limfocytów T regulatorowych (T_{reg}) oraz supresja limfocytów T_{CD8+} [25]. Zwiększona ilość T_{reg} hamuje aktywność komórek NK, T_{CD4+} i T_{CD8+} , co przyczynia się do rozrostu nowotworu [27].

2.2.3 Interleukiny

Interleukiny są jedną z grup cytokin, która służy, między innymi do komunikacji pomiędzy komórkami układu odpornościowego. Komórki te dotyczą zarówno odporności wrodzonej, jak i nabytej. Interleukiny to białka produkowane głównie przez leukocyty.

Ze względu na cechy biologiczne, w tym różnice w budowie molekularnej i strukturze, interleukiny zostały zgrupowane w trzy rodziny [8]:

- pierwszą – podzieloną na podrodzinę interleukiny-2 i podrodzinę interferonów (reprezentowaną przez interferon- α i interferon- β),
- drugą – rodzinę interleukiny-1,
- trzecią – zawierającą interleukinę 17A, B, C, D, F oraz IL-8, 25 i 27, a także IL-31, 32 i 33.

Największe znaczenie wśród interleukin ma IL-2 stymulująca proliferację komórek NK i wzmagająca działanie cytotoksyczne. Poza IL-2, aktywność komórek NK jest stymulowana również przez: IL-12, IL-18, IL-21, IFN- α , IFN- β oraz IFN- γ . Kolejną ważną interleukiną jest IL-15 odpowiedzialna za różnicowanie i cytotoxiczną aktywność dojrziałych komórek NK. IL-15 ma wpływ na właściwości lityczne komórek NK i może mieć znaczenie w immunoterapii nowotworów.

Bardzo istotna dla odpowiedzi immunologicznej jest interakcja komórek NK z DC, która zależy od działania IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 oraz IL-4. Cytokiny te uwalniane są w miejscu rozwoju odpowiedzi zapalnej zachodzącej z udziałem komórek NK [32].

IL-2 i IL-15 są najlepiej poznanymi naturalnymi stymulatorami komórek NK. Wzmacniają one aktywność efektorową oraz pobudzają proliferację komórek NK. IL-2 stymuluje także regulatorowe i pomocnicze limfocyty typu T. Natomiast IL-15 wspomaga rozwój limfocytów typu T pamięci, równocześnie będąc niezbędnym czynnikiem w utrzymaniu homeostazy komórek NK [31].

⁶ Immunosupresja – stan charakteryzujący się osłabieniem bądź zahamowaniem odpowiedzi immunologicznej; dotyczy zarówno odpowiedzi typu humoralnego, jak i komórkowego. Wiąże się ze zmiennymi niedoborami poszczególnych klas przeciwciał (IgG, IgM, IgA) oraz spadkiem liczby i dysfunkcją komórek układu odpornościowego, głównie limfocytów T, ujawniającym się zahamowaniem wytwarzania cytokin [26].

IL-2 zidentyfikowano po raz pierwszy jako czynnik wzrostu komórek T TCGF (ang. T Cell Growth Factor). Najważniejszymi komórkami wytwarzającymi IL-2 są limfocyty T_{CD4+} , niektóre limfocyty T_{CD8+} oraz komórki NK aktywowane antygenem czy mitogenem. IL-2 jest produkowana także przez komórki nowotworowe niektórych chłoniaków. IL-2 działa endokrynnie na komórki wykazujące ekspresję jej receptora błonowego oraz autokrynnie na komórki, które ją wytwarzają. W procesie odpowiedzi immunologicznej, IL-2 ma za zadanie modulować układ immunologiczny oraz brać udział w mechanizmach odpornościowych w przypadku zakażeń i nowotworów.

IL-2 jest podstawowym czynnikiem proliferacji komórek efektorowych: aktywowanych limfocytów typu T, limfocytów T_{CD4+} i limfocytów T_{CD8+} . Zwiększa ich czas przeżycia oraz efektywność działania. Pod wpływem IL-2 działają także komórki NK, są aktywowane i stymulowane do wydzielania szeregu cytokin. IL-2 oddziałuje również, pośrednio i bezpośrednio, na inne komórki układu odpornościowego, np.: limfocyty typu B, makrofagi lub monocyty [34].

IL-2, wytwarzana przez limfocyty pomocnicze T_{H1} , wspomaga nabytą odpowiedź immunologiczną, podtrzymując proliferację i zwiększając aktywność limfocytów typu T_C i B oraz komórek NK. Dodatkowo, jest odpowiedzialna za indukcję apoptozy komórek aktywowanych i pełni kluczową rolę w powstawaniu limfocytów regulatorowych typu T (T_{reg}) oraz utrzymywaniu ich liczby w organizmie. Bierze również udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej i jej wygaszaniu.

IL-2 jest niezbędnym czynnikiem w aktywacji i pobudzeniu proliferacji cytotoksycznych limfocytów T_{CD8+} . Wzmaga także cytotoksyczność limfocytów CTL i komórek NK. IL-18 i IL-21 aktywują komórki NK i limfocyty CTL, stymulując równocześnie ich cytotoksyczność [15].

W 1992 roku Agencja żywności i leków FDA (ang. Food and Drug Administration) wydała zgodę na zastosowanie IL-2 podczas leczenia raka nerki i czerniaka, mimo pojawiającego się ryzyka ciężkiej toksyczności mogącej prowadzić nawet do zgonu. Ponadto, IL-2 wykazuje krótki okres półtrwania *in vivo* oraz może stymulować rozwój nowotworu poprzez utrzymanie pomocniczych limfocytów regulatorowych typu T i promowanie śmierci komórek indukowanej aktywacją AICD (ang. Activation-Induced Cell Death) limfocytów efektorowych typu T.

Aby zapobiec niepożądanym efektom, zaprojektowano IL-2 - „superkinę” posiadającą zwiększone powinowactwo do IL-2R β . Dzięki niej wspomagana jest proliferacja limfocytów cytotoksycznych typu T bez wpływu na liczbę limfocytów regulatorowych typu T oraz wzmocniona zostaje odpowiedź przeciwnowotworowa.

Obecnie testuje się niską dawkę IL-2 w formie monoterapii, jak i w połączeniu z adaptywnym transferem komórek NK i limfocytów typu T jako szczepionki. Badania [31] potwierdziły także przeciwnowotworowe działanie IL-15. Wykazano zwiększenie liczby komórek NK i limfocytów typu T cytotoksycznych [31].

IL-6 jest cytokiną o znaczącej roli w rozwoju zespołu wyniszczenia. Wytwarzana jest przez makrofagi, monocyty, fibroblasty, komórki śródbłonna oraz niektóre komórki nowotworowe. IL-6 to jeden z najsilniejszych stymulatorów białek ostrej fazy o działaniu prozapalnym. Jej wzmożone wytwarzanie występuje podczas przebiegu licznych ostrych

i przewlekłych zapaleń oraz w czasie przebiegu nowotworów. Innymi prozapalnymi cytokinami są m. in.: czynnik martwicy guza alfa TNF_α (ang. Tumor Necrosis Factor α), IL-1, IL-2, IFN- α oraz IFN- γ [3].

Warto wspomnieć, że IL-2, IL-6 i interferony mają właściwości depresyjne [21].

3. Leczenie nowotworów

Leczenie pacjentów, u których wystąpił nowotwór ma na celu osiągnięcie najkorzystniejszego efektu przeciwnowotworowego, ale także zapewnienie choremu jak najlepszej jakości życia. U wielu pacjentów wskutek choroby nowotworowej dochodzi do jej pogorszenia, a jedną z najczęstszych dolegliwości jest osłabienie, które może być równocześnie podstawowym objawem zespołu przewlekłego zmęczenia (ZPZ). ZPZ jest powodem ograniczenia codziennej aktywności u ponad 80% [38] pacjentów z nowotworami, gdzie objawy dotyczą nie tylko sfery fizycznej, lecz również psychicznej i socjalnej. ZPZ powoduje m. in. pogorszenie zdolności koncentracji uwagi, pacjenci zmuszeni są do ograniczenia lub rezygnacji z aktywności zawodowej, co pogarsza ich status ekonomiczny. Zazwyczaj chorzy nie znajdują zrozumienia wśród otoczenia, także wśród osób sprawujących nad nimi specjalistyczną opiekę. Większość onkologów (61% [38]) uważa, że ból towarzyszący chorobie nowotworowej jest najważniejszą dolegliwością u chorych, podczas gdy większość pacjentów (61% [38]) uważa osłabienie za istotniejszą dolegliwość.

Pierwsze objawy ZPZ pojawiają się najczęściej przy rozpoczęciu leczenia, jednak często występują już podczas badań diagnostycznych. U pacjentów poddawanych chemioterapii objawy nasilają się od momentu dożylnego podania cytostatyku, osiągając maksymalne natężenie po 2-3 dniach, następnie stopniowo się zmniejszają.

Ponad 30% chorych odczuwa osłabienie nawet pół roku po zakończeniu chemioterapii, a objawy ZPZ mogą utrzymywać się czasem nawet do 3 lat [38].

3.1 Chemioterapia

Chemioterapia to metoda leczenia, która polega na niszczeniu komórek nowotworowych, drobnoustrojów oraz bakterii za pomocą środków chemicznych. W przypadku nowotworów, stosuje się różne grupy leków, tzw. cytostatyków. Zależnie od indywidualnych cech pacjenta chemioterapia ma ściśle określony przebieg. Leki mogą być stosowane w monoterapii (stosowanie jednego leku cytostatycznego) lub polichemioterapii (stosowanie kilku leków zgodnie z określonym schematem). Leki cytostatyczne podawane są w sekwencjach co kilka dni, tygodni lub stale, bez przerwy w leczeniu. Leki cytostatyczne działają w określonych fazach podziału komórek nowotworowych, zmniejszając lub spowalniając ich proliferację. Najczęściej podawane są w postaci dożylnych wlewów, lecz niektóre z nich mają formę tabletek. Skutki uboczne chemioterapii można zaobserwować już po kilku dniach terapii, a czasem nawet po kilku godzinach [9].

Około 10% [3] nowotworów złośliwych można pokonać stosując wyłącznie chemioterapię. Do nowotworów tych można zaliczyć m. in. ostre białaczki u dzieci, raka ko-

smówki oraz większość litych nowotworów u dzieci [3].

Działanie cytostatyków opiera się na hamowaniu podziałów komórkowych limfocytów typu B i T. Część leków działa niezależnie od fazy cyklu komórkowego, podczas gdy niektóre leki są aktywne wyłącznie w danej fazie. U pacjentów z nowotworami stosuje się większe dawki niż w przypadku chorób autoimmunizacyjnych. Ze względu na mechanizm działania, leki cytostatyczne można podzielić na [26]

- leki alkilujące,
- antymetabolity,
- antybiotyki cytotoksyczne.

W chorobach nowotworowych często stosuje się pochodne iperytu azotowego będące składnikami leków o działaniu alkilującym. Ich szczególnie korzystne działanie można zaobserwować w terapii u dzieci [26].

Duże znaczenie w chemioterapii ma objętość guza, ponieważ jej skuteczność zależy od początkowej liczby komórek klonogennych reprezentowanej przez objętość, a nie średnicę guza. Im mniejszy jest nowotwór, tym bardziej wrażliwy na leczenie cytostatyczne. Z kolei, im większy guz, tym więcej razy należy podać leki w celu zmniejszenia jego masy. Wzrost dawki leku cyklo-specyficznego (niezależnego od fazy cyklu komórkowego) powoduje zwiększenie efektu cytotoksycznego. W tej grupie leków istnieje zależność liniowa między efektem i dawką, natomiast dla leków zależnych od fazy cyklu zależność ta występuje tylko do określonej granicy. Po jej przekroczeniu, mimo zwiększania dawki, efekt cytotoksyczny nie zwiększa się.

W chemioterapii zazwyczaj stosowane są programy wielolekowe, gdyż tylko bardzo wrażliwe nowotwory poddają się leczeniu z wykorzystaniem pojedynczego leku. W programach tych kojarzy się leki aktywne o różnym mechanizmie działania i odmiennej toksyczności oraz pozbawione wzajemnej oporności krzyżowej. Leki powinny być stosowane zgodnie z właściwym rytmem, tzn. przerwy powinny być możliwie krótkie, ale powinny umożliwiać pełną odnowę najbardziej wrażliwych tkanek prawidłowych. Stosowanie przerw pomiędzy kolejnymi etapami chemioterapii jest uzasadnione tym, że dynamika wzrostu komórek nowotworowych jest mniejsza niż szybko wzrastających komórek prawidłowych. Kombinacje obejmujące więcej niż trzy leki tworzą ryzyko wystąpienia nieobliczalnych wzajemnych interakcji, dlatego tak złożone programy są w chemioterapii wyjątkami [3].

Największym ograniczeniem skuteczności leczenia metodą chemioterapii jest oporność na leki. Istnieją liczne mechanizmy oporności, która często zależy od interakcji kilku z nich. Można wyróżnić mechanizmy: komórkowe, biochemiczne oraz anatomiczne [3]. Aby chemioterapia była skuteczna, proces docelowy musi być wrażliwy na aktywną formę leku. Jednym z mechanizmów powstawania oporności na lek jest obniżenie tej wrażliwości w populacji komórek nowotworowych [12]. Glikoproteina CD133 pomaga zidentyfikować macierzyste komórki nowotworowe, jednak prawdopodobnie odpowiada ona równocześnie za zwiększenie oporności nowotworów na chemioterapię [37].

W efekcie toksycznego działania chemioterapii u osób chorych na nowotwór może wystąpić ból neuropatyczny. Jest to rodzaj bólu patologicznego rozwijającego się wskutek uszkodzenia lub choroby somatosensorycznej części układu nerwowego. Najczęstszym zespołem bólowym wywołanym przez chemioterapię w leczeniu choroby nowotworowej jest obwodowa polineuropatia CIPN (ang. Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy). Może ona wywoływać dolegliwości bólowe w istotnym stopniu obniżające jakość życia pacjentów. Obwodowa neuropatia może być objawem wielu stosowanych w chemioterapii leków, m. in. pochodnych platyny, paklitakselu czy bortezomibu. Leki te oddziałują na włókna nerwowe zmieniając amplitudę potencjału czynnościowego oraz szybkość przewodzenia w aksonach, czego ostatecznym efektem jest ból neuropatyczny.

W przypadku pochodnych platyny, uszkodzenie oraz martwica komórek spowodowane są poprzecznymi wiązaniami nici DNA. Ból zazwyczaj występuje kilka tygodni po rozpoczęciu chemioterapii, a czasem utrzymuje się nawet przez kilka miesięcy po jej zakończeniu. Na początku są to ból i parestezje¹ części kończyn. Mogą one ulec nasileniu wraz z objawami ataksji² czuciowej. Objawom tym mogą towarzyszyć w ostrym okresie neurotoksyczności skurcze mięśni. Czasem może pojawić się objaw Lhermitte'a³ i zaburzenia czynności ośrodkowego układu nerwowego takie, jak: bóle głowy, drgawki, encefalopatia, ubytki neurologiczne [36].

3.2 Immunoterapia

Podczas immunoterapii dochodzi do ingerencji w układ odpornościowy, co ma na celu wzmocnienie lub modyfikację mechanizmów obronnych walczących z nowotworem [10, 27, 31]. Jeżeli nie jest możliwe całkowite wyeliminowanie komórek nowotworowych, to immunoterapia ma za zadanie czasowe zahamowanie rozwoju nowotworu oraz wstrzymanie przerzutów. Cel ten można osiągnąć poprzez zwiększenie aktywności układu immunologicznego lub przez zahamowanie supresyjnego działania nowotworu [27].

Leczenie immunoonkologiczne jest mniej inwazyjne niż stosowane przed jego poznaniem metody chirurgiczne, chemioterapia czy radioterapia, które często przynoszą większe szkody dla organizmu skutkiem działań ubocznych niż uzyskane efekty lecznicze. Podstawą immunoterapii są następujące działania [27]:

- wykrywanie przez układ odpornościowy komórek nowotworowych jako obce dla organizmu dzięki antygenom swoistym dla nowotworu TSA (ang. Tumor Specific Antigens),

¹ Parestezje – objawy nadmiarowe, zespół nietypowych wrażeń czuciowych w postaci mrowienia, drętwienia, uczucia przebiegających prądów, wibracji czy nawet pieczenia [39].

² Ataksja – bezład lub niezdolność kończyn i tułowia, zespół występujących jednocześnie różnych zaburzeń ruchu wynikających z braku właściwej koordynacji skurczu mięśni kończyn i tułowia w czasie ruchu lub postawy, takich jak dysmetria, dekompozycja ruchu, drżenie czy dysdiadochokineza [40].

³ Objaw Lhermitte'a – uczucie przechodzenia „prądu elektrycznego” w dół kręgosłupa przy pochyleniu głowy [36].

- selektywne niszczenie zidentyfikowanych komórek nowotworowych przy jednoczesnym zachowaniu komórek prawidłowych.

Często w immunoterapii wykorzystuje się komórki NK ze względu na ich kluczową rolę w walce ze złośliwie transformowanymi komórkami [31].

Na początku rozwoju immunoterapii stosowano terapię cytokinami lub terapię adaptatywną komórkami ukierunkowaną na komórki nowotworowe bez angażowania układu odpornościowego leczonego pacjenta. Później posługiwano się „aktywną immunoterapią nowotworów” mającą na celu wzmożenie reaktywności immunologicznej pacjenta, jednak efektywność leczenia była bardzo mała. Kolejnym etapem było wykorzystanie swoistych przeciwciał, które miały za zadanie zmieniać część białych krwinek nowotworowych w komórki NK, aby niszczyć komórki nowotworowe, ale równocześnie pobudzać układ immunologiczny [27].

Pewnym postępowaniem w immunoterapii było opracowanie sposobu otrzymywania modyfikowanych cytotoksycznych limfocytów T, które wykazują ekspresję chimerycznych receptorów dla specyficznych antygenów nowotworowych CARs (ang. Chimeric Antigen Receptors). W błonie limfocytów cytotoksycznych receptor chimeryczny połączony jest z regionami sygnałowymi zdolnymi do aktywowania tych limfocytów. Limfocyty cytotoksyczne z ekspresją CARs potrafią wydelać IL-2 powodując liż komórek nowotworowych posiadających odpowiedni antygen nowotworowy. Ponadto, w przypadku aktywacji z wykorzystaniem CARs nie jest konieczna prezentacja antygeny przez komórki prezentujące antygen [41].

Immunoterapia adoptywna jest strategią leczenia polegającą na modyfikacji komórek autologicznych układu odpornościowego pacjenta poza jego organizmem, a następnie podaniu mu ich w formie „szczepionki”. W adoptywnej immunoterapii wykorzystywane są komórki zabójcze aktywowane limfokina LAK (ang. Lymphokine Activated Killers), TIL oraz komórki dendrytyczne DC (ang. Dendritic Cells). Komórki LAK uzyskiwane są jako efekt stymulacji limfocytów interleukiną-2 i następnie namnażane. Limfocyty TIL mogą zostać podane z powrotem choremu po transfekcji genami TNF lub IL-2. Komórki DC są jednymi z najbardziej efektywnych komórek prezentujących antygen. Wytwarza się je w hodowli komórkowej, często z monocytów autologicznych krwi obwodowej i po stymulacji cytokinami i uczuleniu antygenami nowotworowymi podaje się je zwrotnie pacjentowi. W immunoterapii adoptywnej należy każdorazowo opracować procedury pozyskania i modyfikacji komórek pacjenta. Najwięcej trudności pod tym względem stwarzają wysoce zindywidualizowane komórki DC [41].

Skuteczność leczenia metodą immunoterapii jest zależna od istnienia różnych mechanizmów niszczenia komórek nowotworowych oraz różnych swoistych dla nich markerów powierzchniowych, które mogą się zmieniać. Za niszczenie kontroli immunologicznej nowotworzenia odpowiadają limfocyty regulatorowe $T_{reg}FoxP3+$ będące tym samym jedną z najważniejszych barier w działaniu immuno-onkologicznym [27].

Największe korzyści z immunoterapii mogą odnieść pacjenci, których nowotwory charakteryzują się największą liczbą mutacji somatycznych, ponieważ liczba ta zależy od intensywności oddziaływania czynników rakotwórczych [41].

Immunoterapię można podzielić na bierną i czynną o charakterze swoistym albo nieswoistym [10].

3.2.1 Nieswoista bierna immunoterapia

Nieswoista bierna immunoterapia ma za zadanie wywołać nieswoistą aktywację układu immunologicznego, a w konsekwencji działanie przeciwnowotworowe na skutek podawania m.in. aktywowanych komórek efektorowych. Wykorzystuje się tu, na przykład cytokiny czy komórki LAK. Aby wywołać efekt biologiczny konieczne jest połączenie cytokiny ze swoistym receptorem na komórkach docelowych (limfocytach typu T i B, komórkach NK, monocytach, makrofagach i granulocytach). Działanie przeciwnowotworowe cytokin polega na:

- bezpośrednim efekcie cytotoksycznym,
- modyfikacji migracji limfocytów,
- wzroście wrażliwości komórek nowotworowych na efekty cytotoksyczne różnych czynników biologicznych lub chemicznych,
- hamowaniu proliferacji komórek nowotworowych,
- aktywacja komórek NK.

IFN- α to pierwsza rekombinowana cytokina zarejestrowana do stosowania klinicznego [10].

3.2.2 Swoista bierna immunoterapia

Swoista bierna immunoterapia to metoda leczenia nowotworu, która polega na podawaniu pacjentowi m.in. komórek efektorowych swoście ukierunkowanych na daną komórkę nowotworową. Do swoistej biernej immunoterapii zaliczamy [10]:

- przeciwciała podawane przeciwko antygenom, które występują na komórkach nowotworowych,
- terapie komórkowe, które wykorzystują limfocyty naciekające guz (TIL); są one izolowane, następnie namnożone i aktywowane, po czym ponownie przetaczane,
- limfocyty krwi obwodowej stymulowane in vitro komórkami prezentującymi antygen.

3.2.3 Nieswoista czynna immunoterapia

W nieswoistej czynnej immunoterapii pobudzany jest układ odpornościowy, a zwłaszcza odpowiedź komórkowa. Wykorzystywane są do tego antygeny, niewystępujące w komórkach nowotworu. Substancjami stymulującymi procesy odpornościowe są nieswoiste

immunostymulatory (np. mikroorganizmy, elementy ściany komórkowej) i immunomodulatory (m. in. wyciągi z grasicy, syntetyczne hormony grasicy, tuftsyna, enkefaliny, endorfiny, wyciągi z limfocytów) [10].

3.2.4 Swoista czynna immunoterapia

Leczenie metodą swoistej czynnej immunoterapii polega na pobudzaniu odporności na antygeny swoiste dla danego typu nowotworu. Wykorzystuje się w niej immunizację przy użyciu tzw. terapeutycznych szczepionek nowotworowych. Są to szczepionki:

- niekomórkowe, na bazie białek szoku cieplnego HSP (ang. Heat Shock Protein), szczepionki DNA oraz szczepionki wirusowe,
- komórkowe, niemodyfikowane i modyfikowane genetycznie oraz komórki DC „karmione” antygenami nowotworowymi [10].

3.3 Leczenie skojarzone

Leczenie skojarzone polega na połączeniu u pacjenta kilku metod leczenia nowotworu. Ten sposób terapii posiada wiele zalet, między innymi umożliwia wykonanie zabiegu operacyjnego w wielu przypadkach pierwotnie nieoperacyjnych i pozwala zastąpić okaleczające zabiegi chirurgiczne równie skutecznym leczeniem zachowawczym. Ponadto, zmniejsza ryzyko wznowy miejscowej choroby i rozwoju odległych przerzutów, co wpływa na wydłużenie czasu przeżycia chorych. Pomimo wielu zalet, leczenie skojarzone ma również pewne wady, chociażby, znaczne zwiększenie toksyczności w porównaniu z monoterapią czy brak współpracy między specjalistami, co z kolei utrudnia wdrożenie optymalnej terapii.

Wśród metod leczenia skojarzonego można wyróżnić [11]:

- leczenie sekwencyjne – poszczególne metody lecznicze stosowane jedna po drugiej, np.:
 - leczenie wstępne (neoadiuwantowe, indukcyjne) — poprzedza leczenie radykalne. Jego celem jest wczesne oddziaływanie na mikroprzerzuty lub zmniejszenie masy guza u chorych z miejscowo zaawansowanym nowotworem i umożliwienie tym samym przeprowadzenia leczenia radykalnego;
 - uzupełniające (adiuwantowe) — stosowane jest po leczeniu radykalnym, czyli u osób bez cech choroby nowotworowej. Jego celem jest zniszczenie potencjalnie istniejących mikroprzerzutów i zmniejszenie tym samym prawdopodobieństwa nawrotu nowotworu;
- leczenie równoczesne — kojarzenie różnych metod leczenia w tym samym czasie, na przykład równoczesna chemioradioterapia oraz napromienianie śródoperacyjne;

- leczenie naprzemienne — dotyczy kojarzenia radioterapii i chemioterapii.

W tej pracy omawiany jest przypadek leczenia skojarzoną metodą chemioterapii i immunoterapii, zwanej także biochemioterapią [1].

4. Model matematyczny

4.1 Model nieuwzględniający procesu leczenia

Model matematyczny wykorzystany w pracy to model de Pillis [19]. W pierwszym etapie rozważymy model bez uwzględnienia procesu leczenia, który obejmuje cztery populacje komórek, tj.:

- \mathcal{T} – populację komórek nowotworowych,
- \mathcal{N} – populację komórek NK,
- \mathcal{L} – populację limfocytów T_{CD8+} ,
- \mathcal{C} – populację limfocytów krążących,

W drugim etapie model zostaje poddany modyfikacji, uwzględnia proces leczenia i dodatkowo badane są zmiany stężenia w czasie dwóch podawanych leków:

- $M(t)$ – funkcja stężenia cytostatyka użytego w chemioterapii w czasie,
- $I(t)$ – funkcja stężenia interleukin-2 w czasie.

W równaniach modelu przed modyfikacją uwzględniono takie czynniki, jak:

- naturalny rozwój i śmierć komórek,
- śmierć komórek nowotworowych pod wpływem komórek NK, limfocytów T_{CD8+} ,
- wytwarzanie komórek NK i limfocytów T_{CD8+} ,
- dezaktywację komórek NK i limfocytów T_{CD8+} .

Natomiast w modelu zmodyfikowanym wzięto pod uwagę również:

- ilość podawanych leków i czas, w którym zostały podane,
- śmierć komórek nowotworowych pod wpływem podawanych leków.

4.1.1 Założenia modelu

Przyjęto założenia jak w modelu de Pillis [19]:

1. W przypadku braku odpowiedzi układu immunologicznego liczba komórek nowotworowych wzrasta logistycznie.
2. Komórki NK i limfocyty T_{CD8+} są zdolne zniszczyć komórki nowotworu.
3. Pod wpływem komórek nowotworowych komórki NK i limfocyty T_{CD8+} ulegają szybszej proliferacji oraz wzrasta ich aktywność cytolityczna¹.
4. Komórki NK są zawsze obecne w organizmie, także w przypadku braku występowania komórek nowotworowych. Są one częścią wrodzonego układu odpornościowego.
5. W organizmie występuje duża liczba aktywnych limfocytów T_{CD8+} tylko w przypadku obecności komórek nowotworowych jako specyficzna odpowiedź immunologiczna.
6. Komórki NK i limfocyty T_{CD8+} ulegają całkowitej dezaktywacji po pewnej liczbie interakcji z komórkami nowotworowymi.
7. Poziom krążących limfocytów może służyć do oceny zdrowia pacjenta.
8. Odsetek komórek nowotworowych zniszczonych w wyniku chemioterapii zależy od ilości cytostatyka obecnego w organizmie. Maksymalny odsetek zniszczonych komórek wynosi mniej niż 1 ze względu na to, że pokonanie komórek nowotworowych wskutek chemioterapii jest możliwe tylko na niektórych etapach ich rozwoju.
9. Część komórek NK, limfocytów T_{CD8+} i limfocytów krążących jest niszczone podczas chemioterapii.
10. Komórki NK i limfocyty T_{CD8+} uczestniczą w procesie stymulacji i eliminacji aktywowanych komórek (efektorów); uproszczony model ma odzwierciedlać samoregulujący się charakter układu immunologicznego.

¹ Aktywność cytolityczna – jeden z mechanizmów cytotoksyczności limfocytów służący do niszczenia komórek zainfekowanych lub nowotworowych [15].

4.1.2 Równania i opis modelu

W modelu nieleczzonego guza rozważamy cztery populacje komórek. Są to populacja komórek nowotworowych (\mathcal{T}), populacja komórek NK (\mathcal{N}), populacja limfocytów T_{CD8+} (\mathcal{L}) oraz populacja limfocytów krążących (\mathcal{C}).

Model nieleczzonego guza nowotworowego 4.1 jest układem równań różniczkowych zwyczajnych. Równania tego modelu przedstawiają tempo zmian proliferacji komórek nowotworowych oraz tempo zmian liczby komórek układu immunologicznego (komórek NK, limfocytów T_{CD8+} oraz limfocytów krążących) w odpowiedzi na wzrost liczby komórek nowotworowych.

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dT}{dt} = aT(1 - bT) - cNT - DT, \\ \frac{dN}{dt} = eC - fN + g\frac{T^2}{h + T^2}N - pNT, \\ \frac{dL}{dt} = -mL + j\frac{D^2T^2}{k + D^2T^2}L - qLT + (r_1N + r_2C)T - uNL^2, \\ \frac{dC}{dt} = \alpha - \beta C, \end{array} \right. \quad (4.1)$$

gdzie:

- $T(t)$ - liczba komórek nowotworowych w chwili czasowej t ,
- $N(t)$ - liczba komórek NK w chwili czasowej t ,
- $L(t)$ - liczba limfocytów T_{CD8+} w chwili czasowej t ,
- $C(t)$ - liczba limfocytów krążących w chwili czasowej t ,
- $D = d\frac{(\frac{L}{T})^l}{s + (\frac{L}{T})^l}$ - liza nowotworu pod wpływem działania limfocytów T_{CD8+} .

Pierwsze z równań modelu 4.1 opisuje tempo zmian $\frac{dT}{dt}$ liczby komórek nowotworowych, w chwili czasowej t , uwzględniając zarówno proces proliferacji tych komórek, jak i efekt cytotoksyczności wywołany odpowiedzią układu immunologicznego.

Wyrażenie $aT(1 - bT)$ zwiększa prędkość zmian liczebności populacji komórek nowotworowych, gdyż określa liczbę komórek nowotworowych, które powstały w danej chwili czasowej t w wyniku ich proliferacji. Wyrażenia $-cNT$ oraz $-DT$ z kolei hamują tempo zmian liczebności komórek nowotworowych, gdyż przedstawiają odpowiednio:

liczbę komórek nowotworowych zniszczonych na skutek ich interakcji z komórkami NK oraz z limfocytami T_{CD8+} w danej chwili czasowej t .

Drugie równanie modelu 4.1 określa tempo zmian $\frac{dN}{dt}$ liczebności populacji komórek NK, w chwili czasowej t , na które wpływa kilka składników.

Składniki $g\frac{T^2}{h+T^2}N$ oraz eC wpływają na zwiększenie prędkości zmian liczby komórek NK. Pierwszy z nich oznacza liczbę nowych komórek NK powstałych w chwili czasowej t , natomiast drugi określa liczbę komórek NK, które wyodrębniły się z limfocytów krążących w chwili czasowej t . Do czynników hamujących tempo zmian liczebności populacji komórek NK należą $-fN$, ponieważ oznacza liczbę komórek NK ulegających apoptozie w chwili czasowej t oraz $-pNT$ określający liczbę komórek NK dezaktywowanych wskutek ich interakcji z komórkami nowotworowymi w chwili czasowej t .

Trzecim równaniem modelu 4.1 zostało opisane tempo zmian $\frac{dL}{dt}$ liczebności populacji limfocytów T_{CD8+} . Wyrażenia $j\frac{D^2T^2}{k+D^2T^2}L$ oraz $(r_1N+r_2C)T$ zwiększają prędkość zmian liczebności tej populacji. Wyrażenia te określają liczbę limfocytów T_{CD8+} stymulowanych w chwili czasowej t odpowiednio: komórkami nowotworowymi, które są lizowane przez inne limfocyty T_{CD8+} oraz przez komórki NK, a także liczbę limfocytów T_{CD8+} wytwarzanych na skutek interakcji komórek nowotworowych z limfocytami krążącymi. Z kolei wyrażenia $-mL$, $-qLT$ i $-uNL^2$ hamują prędkość zmian liczby limfocytów T_{CD8+} . Wyrażenie $-mL$ oznacza zmniejszenie ekspresji limfocytów T_{CD8+} z powodu braku komórek nowotworowych, w związku z czym w chwili czasowej t powstaje ich mniej. Natomiast liczba dezaktywowanych limfocytów T_{CD8+} w chwili czasowej t na skutek ich interakcji z komórkami nowotworowymi oraz na skutek działania komórek NK została określona poprzez wyrażenia odpowiednio: $-qLT$ i $-uNL^2$.

Równanie czwarte określa tempo zmian liczebności populacji limfocytów krążących $\frac{dC}{dt}$ w chwili czasowej t , które jest modulowane poprzez różnicę między stałą liczbą α krążących limfocytów a stopniem ich degradacji $-\beta C$, gdzie β to stała określająca tempo wyniszczania krążących limfocytów.

4.2 Model uwzględniający proces leczenia

Przyjęto założenia dla modelu jak w rozdziale 4.1.1.

4.2.1 Równania i opis modelu

W modelu 4.2, poza czterema populacjami uwzględnionymi w modelu 4.1, rozważamy dodatkowo zmiany stężenia dwóch podawanych leków, czyli cytostatyka użytego w chemioterapii (M) oraz interleukin-2 (I) wykorzystanych do immunoterapii.

Przedstawione w układzie 4.2 równania określają tempo zmian liczebności populacji, jak w modelu 4.1, ale także opisują wpływ podawanych leków na nowotwór oraz ich rozpad w organizmie. Modyfikacje wprowadzone do modelu, odpowiadające podawanym lekom zaznaczono w układzie 4.2 na czerwono.

Parametry modelu leczonego guza 4.2, ukazano w tabeli 4.2.

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dT}{dt} = aT(1 - bT) - cNT - DT - K_T(1 - e^{-M})T, \\ \frac{dN}{dt} = eC - fN + g\frac{T^2}{h + T^2}N - pNT - K_N(1 - e^{-M})N, \\ \frac{dL}{dt} = -mL + j\frac{D^2T^2}{k + D^2T^2}L - qLT + (r_1N + r_2C)T - uNL^2 - K_L(1 - e^{-M})L + \frac{p_ILI}{g_I + I} + \nu_L(t), \\ \frac{dC}{dt} = \alpha - \beta C - K_C(1 - e^{-M})C, \\ \frac{dM}{dt} = -\gamma M + \nu_M(t), \\ \frac{dI}{dt} = -\mu_I I + \nu_I(t), \end{array} \right. \quad (4.2)$$

gdzie:

- $T(t)$ - liczba komórek nowotworowych w chwili czasowej t ,
- $N(t)$ - liczba komórek NK w chwili czasowej t ,
- $L(t)$ - liczba limfocytów T_{CD8+} w chwili czasowej t ,
- $C(t)$ - liczba limfocytów krążących w chwili czasowej t ,
- $M(t)$ - stężenie cytostatyka w chwili czasowej t ,

- $I(t)$ - stężenie interleukin-2 w chwili czasowej t ,
- $D = d \frac{(\frac{L}{T})^l}{s + (\frac{L}{T})^l}$ - liza nowotworu pod wpływem działania limfocytów T_{CD8+} .

W odróżnieniu od modelu 4.1, w modelu 4.2 występują dwa dodatkowe równania odnoszące się do tempa zmian stężenia cytostatyka $\frac{dM}{dt}$ oraz IL-2 $\frac{dI}{dt}$ w organizmie. Wyrażenia $-\gamma M$ oraz $-\mu_i L$ hamują tempo tych zmian poprzez spadek stężenia odpowiednio: cytostatyka i IL-2 na skutek rozpadu tych substancji.

Wyrażenia $\nu_L(t)$, $\nu_M(t)$ oraz $\nu_I(t)$ odpowiadają zewnętrznemu podawaniu leków: TIL (limfocytów T_{CD8+}), cytostatyka oraz IL-2, w związku z czym zwiększają tempo zmian stężenia tych leków w organizmie.

Wpływ chemioterapii na tempo zmian $\frac{dT}{dt}$, $\frac{dN}{dt}$, $\frac{dL}{dt}$ oraz $\frac{dC}{dt}$ liczebności populacji odpowiednio: komórek nowotworowych, komórek NK, limfocytów T_{CD8+} oraz limfocytów krążących określono za pomocą wyrażenia $-K_i(1 - e^{-M})i$, gdzie $i = T, N, L, C$. Wyrażenie to opisuje działanie cytostatyka hamujące tempo zmian liczebności każdej z wyżej wymienionych populacji. Działanie to wyraża się liczbą komórek nowotworowych, komórek NK, limfocytów T_{CD8+} oraz limfocytów krążących zniszczonych w danej chwili czasowej t .

Wpływ immunoterapii na tempo zmian $\frac{dL}{dt}$ liczebności populacji limfocytów T_{CD8+} został określony poprzez wyrażenie $\frac{p_i L I}{g_i + I}$, które przyspiesza tempo tych zmian, gdyż oznacza liczbę limfocytów T_{CD8+} stymulowanych poprzez podawaną zewnętrźnie IL-2 w danej chwili czasowej t .

Tab. 4.1: Parametry modelu odpowiedzi immunologicznej na rozwijający się nowotwór bez uwzględnienia procesu leczenia.

Nazwa	Jednostka	Opis
a	dzień^{-1}	Tempo wzrostu nowotworu
b	komórka^{-1}	Odwrotność pojemności środowiska
c	$\text{dzień}^{-1} \cdot \text{komórka}^{-1}$	Minimalna liczba komórek nowotworu zabita przez komórki NK
d	dzień^{-1}	Współczynnik skuteczności zabijania komórek nowotworowych przez limfocyty T_{CD8+}
e	dzień^{-1}	Liczba komórek NK wyodrębnionych z limfocytów krążących
l	bezwymiarowe	Współczynnik skalowania skuteczności układu odpornościowego
f	dzień^{-1}	Śmiertelność komórek NK
g	dzień^{-1}	Maksymalna liczba komórek NK wytwarzanych na skutek obecności komórek nowotworowych
h	komórka^2	Współczynnik stromości krzywej rekrutacji komórek NK
j	dzień^{-1}	Maksymalna liczba limfocytów T_{CD8+} wytwarzanych na skutek obecności komórek nowotworowych
k	komórka^2	Współczynnik stromości krzywej rekrutacji limfocytów T_{CD8+}
m	dzień^{-1}	Śmiertelność limfocytów T_{CD8+}
q	$\text{dzień}^{-1} \cdot \text{komórka}^{-1}$	Tempo dezaktywacji limfocytów T_{CD8+} przez komórki nowotworu
p	$\text{dzień}^{-1} \cdot \text{komórka}^{-1}$	Tempo dezaktywacji komórek NK przez komórki nowotworu
s	bezwymiarowe	Wartość $(\frac{L}{T})^l$ konieczna do osiągnięcia połowy maksymalnej wartości cytotoksyczności limfocytów T_{CD8+}
r_1	$\text{dzień}^{-1} \cdot \text{komórka}^{-1}$	Tempo stymulacji wytwarzania limfocytów T_{CD8+} jako rezultat niszczenia komórek nowotworowych przez komórki NK
r_2	$\text{komórka}^{-1} \cdot \text{dzień}^{-1}$	Tempo stymulacji wytwarzania limfocytów T_{CD8+} jako rezultat interakcji komórek nowotworowych z krążącymi limfocytami
u	$\text{komórka}^{-2} \cdot \text{dzień}^{-1}$	Współczynnik funkcji komórek NK regulującej limfocyty T_{CD8+}
α	$\text{komórka} \cdot \text{dzień}^{-1}$	Stała liczba krążących limfocytów
β	dzień^{-1}	Tempo wyniszczania krążących limfocytów

Tab. 4.2: Dodatkowe parametry modelu odpowiedzi immunologicznej na rozwijający się nowotwór z uwzględnieniem procesu leczenia.

Nazwa	Jednostka	Opis
γ	dzień ⁻¹	Tempo rozpadu leku chemioterapeutycznego
K_T	dzień ⁻¹	Ułamek komórek nowotworowych zniszczonych poprzez działanie cytostatyka
K_N	dzień ⁻¹	Ułamek komórek NK zniszczonych poprzez działanie cytostatyka
K_L	dzień ⁻¹	Ułamek limfocytów T_{CD8+} zniszczonych poprzez działanie cytostatyka
K_C	dzień ⁻¹	Ułamek limfocytów krążących zniszczonych poprzez działanie cytostatyka
p_I	dzień ⁻¹	Maksymalna liczba limfocytów T_{CD8+} wytwarzanych na skutek obecności IL-2
g_I	komórka ²	Wartość stężenia interleukiny-2 konieczna do osiągnięcia połowy maksymalnej wartości aktywności cytolitycznej limfocytów T_{CD8+}
μ_I	dzień ⁻¹	Tempo rozpadu interleukiny-2 (leku)

5. Symulacje

W pracy przeprowadzono modelowanie odpowiedzi układu immunologicznego na rozwijający się nowotwór:

- bez uwzględnienia procesu leczenia,
- z uwzględnieniem leczenia wyłącznie metodą chemioterapii,
- z uwzględnieniem leczenia wyłącznie metodą immunoterapii,
- z uwzględnieniem leczenia skojarzonymi metodami chemioterapii i immunoterapii.

Warunki początkowe (Tab. 5.1) dla modelu 4.1 dobrano zgodnie z literaturą [1]. Dla większej czytelności, wielkość nowotworu określono również poprzez długość jego promienia, przyjmując, że nowotwór ma kształt zbliżony do kuli, a na 1 cm^3 przypada 10^9 komórek [23].

Tab. 5.1: Warunki początkowe dla modelu odpowiedzi immunologicznej na rozwijający się nowotwór bez uwzględnienia procesu leczenia.

Wartość [liczba komórek]	Rodzaj komórek	Promień nowotworu [mm]
$T(0) = 1 \cdot 10^6$	Komórki nowotworowe	0,62
$N(0) = 1 \cdot 10^5$	Komórki NK	
$L(0) = 1 \cdot 10^2$	Limfocyty T_{CD8+}	
$C(0) = 6 \cdot 10^{10}$	Limfocyty krążące	

5.1 Odpowiedź układu immunologicznego na rozwijający się w organizmie nowotwór – brak leczenia

5.1.1 Scenariusz I – symulacja wykonana dla modelu nieleczzonego guza

Podejmowany problem:

Analiza zmian odpowiedzi układu immunologicznego w zależności od początkowej wielkości nowotworu (na podstawie wielkości nowotworu po zadanym czasie symulacji).

Warunki początkowe:

Wielkość (tj., liczbę komórek) nowotworu $T(0)$, liczbę komórek NK $N(0)$, liczbę limfocytów T_{CD8+} oraz liczbę limfocytów krążących $C(0)$ dobrano jak w tabeli 5.1, a następnie doświadczalnie zmieniano wartość początkowej wielkości nowotworu $T(0)$.

Przyjęte parametry:

Parametry dla modelu nieuwzględniającego leczenia jak w tabeli 4.1.

Czas symulacji:

$T_k = 120$ dni

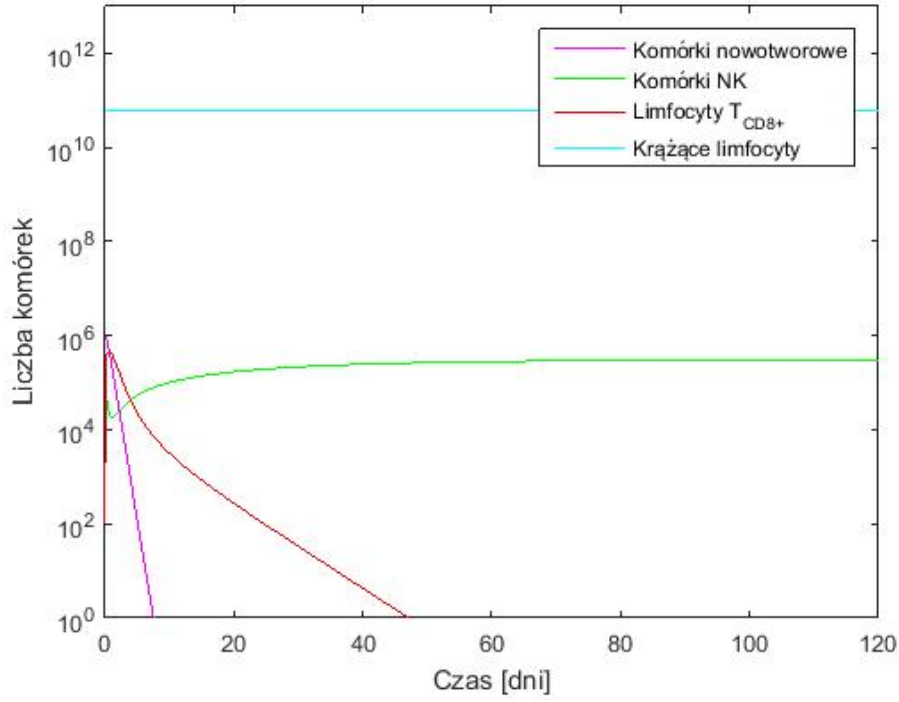
W tabeli 5.2 przedstawiono początkową liczbę komórek nowotworu $T(0)$, liczbę komórek nowotworu po symulacji w chwili $T_k = 120$ dni $T(120)$ oraz szacowaną objętość i długość promienia nowotworu po symulacji w chwili $T_k = 120$ dni.

Tab. 5.2: Początkowa liczba komórek nowotworowych $T(0)$, liczba komórek nowotworowych po symulacji w chwili $T_k = 120$ dni $T(120)$ oraz szacowana objętość i długość promienia nowotworu po symulacji w chwili $T_k = 120$ dni.

$T(0)$ [liczba komórek]	$T(120)$ [liczba komórek]	Objętość nowotworu [mm^3]	Promień nowotworu [mm]
$1 \cdot 10^6$	$6,76 \cdot 10^{-8}$	$6,76 \cdot 10^{-14}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$
$2 \cdot 10^6$	$8,15 \cdot 10^{-8}$	$8,15 \cdot 10^{-14}$	$2,7 \cdot 10^{-5}$
$5 \cdot 10^6$	$2,69 \cdot 10^{-8}$	$2,69 \cdot 10^{-14}$	$1,9 \cdot 10^{-5}$
$1 \cdot 10^7$	$3,44 \cdot 10^{-8}$	$3,44 \cdot 10^{-14}$	$2 \cdot 10^{-5}$
$1,5 \cdot 10^7$	$4,41 \cdot 10^{-8}$	$4,41 \cdot 10^{-14}$	$2,2 \cdot 10^{-5}$
$1,7 \cdot 10^7$	$2,96 \cdot 10^{-8}$	$2,96 \cdot 10^{-14}$	$1,9 \cdot 10^{-5}$
$1,75 \cdot 10^7$	$3,67 \cdot 10^{-8}$	$3,67 \cdot 10^{-14}$	$2,1 \cdot 10^{-5}$
$1,8 \cdot 10^7$	$9,8 \cdot 10^8$	980	6,16
$2 \cdot 10^7$	$9,8 \cdot 10^8$	980	6,16
$5 \cdot 10^7$	$9,8 \cdot 10^8$	980	6,16

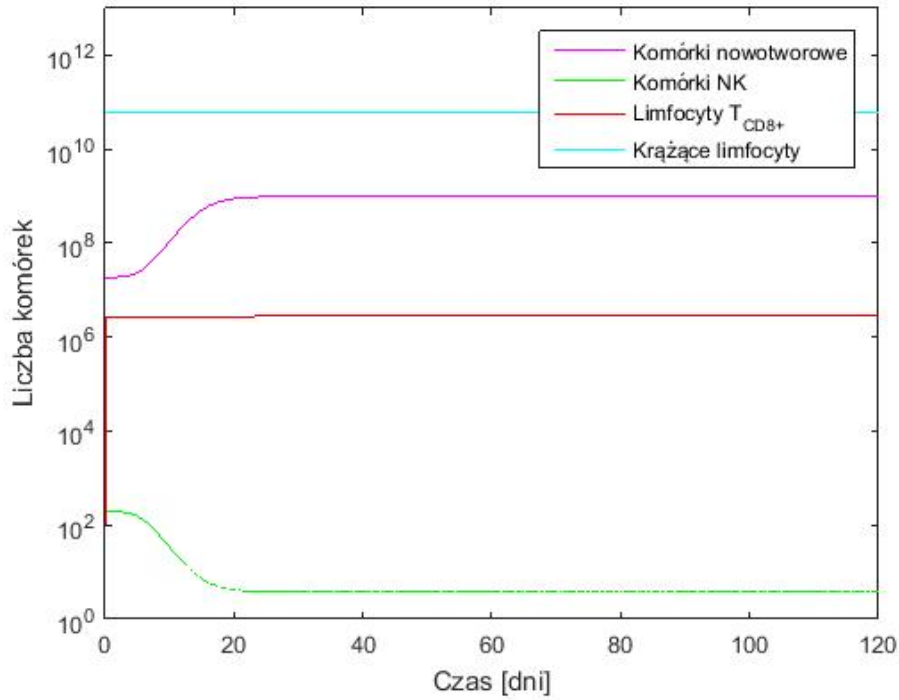
Przykładowe zmiany liczby komórek każdej z czterech badanych populacji - komórek nowotworowych $T(t)$, komórek NK $N(t)$, limfocytów T_{CD8+} $L(t)$ i limfocytów krążących $C(t)$ przedstawiono na poniższych wykresach (Rys. 5.1).

Na pierwszym wykresie (Rys. 5.1a) przedstawiono regresję nowotworu wskutek działania układu immunologicznego po około 7 dniach. Wykres drugi (Rys. 5.1b) obrazuje przypadek, w którym układ immunologiczny nie jest w stanie pokonać nowotworu – liczba jego komórek stabilizuje się po 24 dniach około wartości $9,8 \cdot 10^8$ (odpowiada to objętości 980 mm^3 i długości promienia $6,16 \text{ mm}$).



(a)

Zmiany liczby komórek badanych populacji dla wartości początkowej liczby komórek nowotworowych $T(0) = 1 \cdot 10^6$. Regresja nowotworu po czasie $T_r \approx 7$ dni (168 godzin).

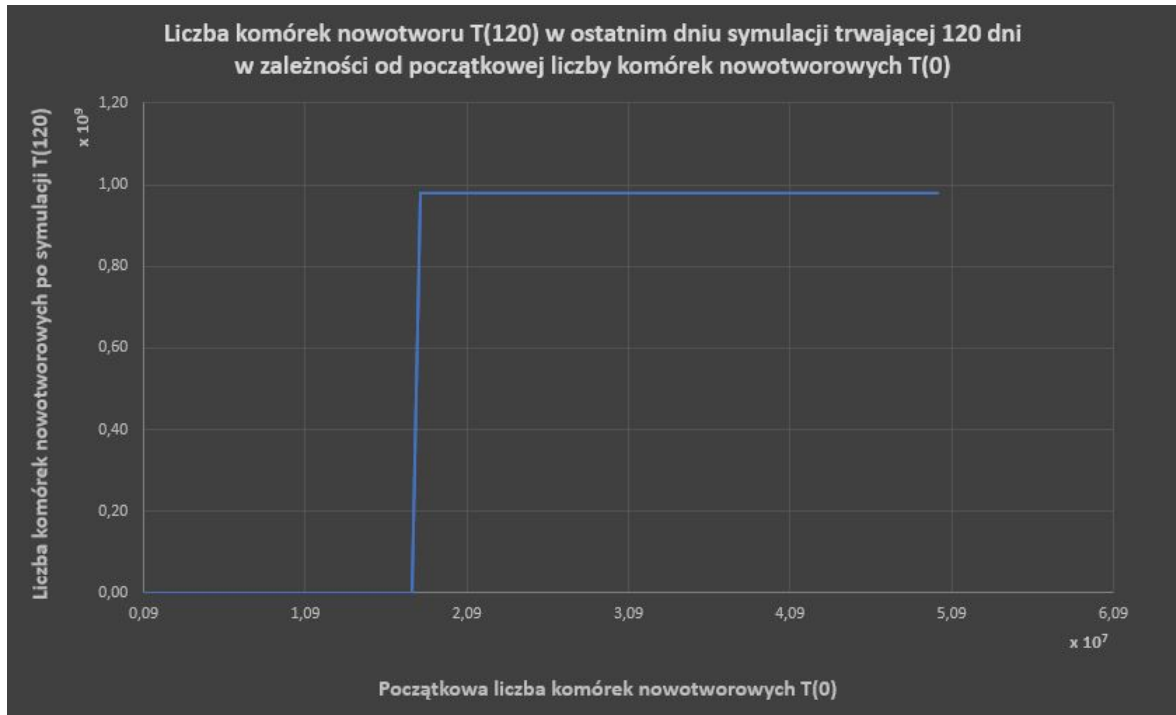


(b)

Zmiany liczby komórek badanych populacji dla wartości początkowej liczby komórek nowotworowych $T(0) = 1.8 \cdot 10^7$. Stabilizacja liczby komórek nowotworowych po czasie $T_s \approx 24$ dni (576 godzin) około wartości $9,8 \cdot 10^8$.

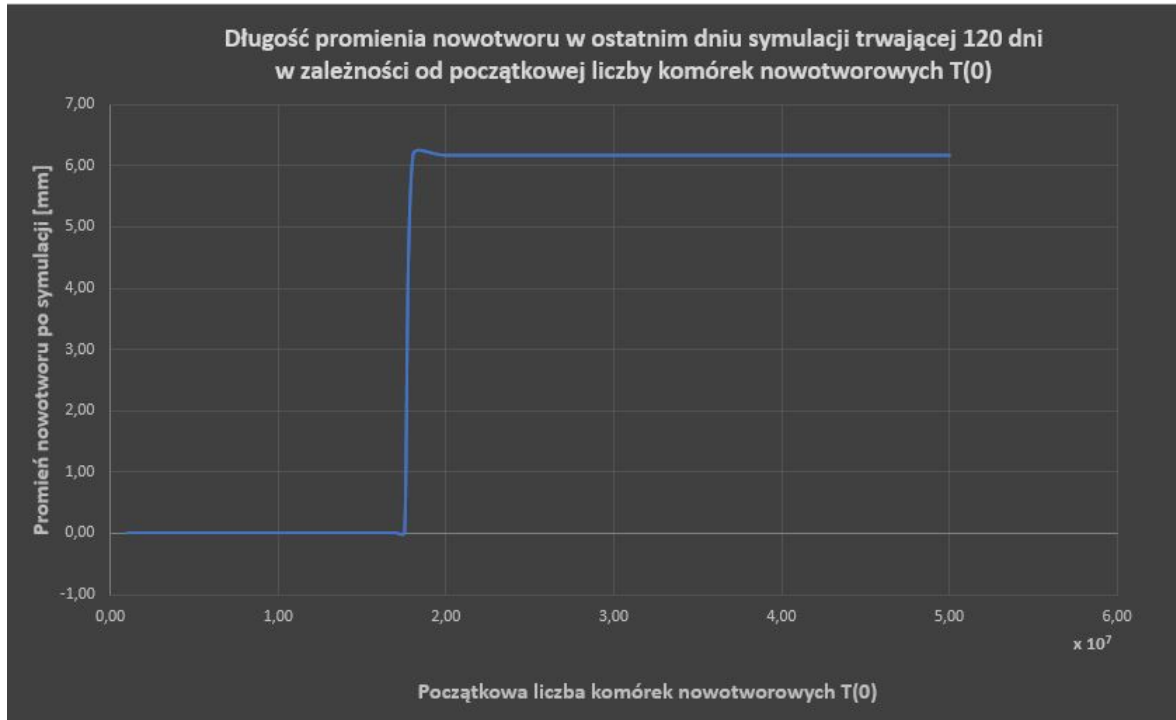
Rys. 5.1: Wykresy zmian liczby komórek badanych populacji – komórek nowotworowych $T(t)$, komórek NK $N(t)$, limfocytów T_{CD8+} $L(t)$ i limfocytów krążących $C(t)$.

Zmiany wielkości nowotworu otrzymane na koniec symulacji trwającej $T_k = 120$ dni w zależności od początkowej liczby komórek nowotworowych $T(0)$ przedstawiono na wykresie (Rys. 5.2).



Rys. 5.2: Wyniki otrzymane na koniec symulacji, która trwała $T_k = 120$ dni. Liczba komórek nowotworowych na koniec symulacji $T(120)$ w zależności od początkowej liczby komórek nowotworowych $T(0)$.

Na wykresie (Rys. 5.3) pokazano zmiany długości promienia nowotworu otrzymane na koniec symulacji trwającej $T_k = 120$ dni w zależności od początkowej liczby komórek nowotworowych $T(0)$.



Rys. 5.3: Wyniki otrzymane na koniec symulacji, która trwała $T_k = 120$ dni. Długość promienia nowotworu [mm] na koniec symulacji w zależności od początkowej liczby krążących limfocytów $T(0)$.

Wnioski:

- zdrowy układ immunologiczny jest w stanie zniszczyć komórki nowotworowe przy wykorzystaniu wyłącznie komórek występujących naturalnie w organizmie (komórek NK, limfocytów T_{CD8+} , limfocytów krążących) bez ingerencji dodatkowych czynników (np. leczenia);
- przy zbyt dużej początkowej liczbie komórek nowotworu ($T(0) = 1,8 \cdot 10^7$) układ immunologiczny nie jest w stanie samoistnie pozbyć się nowotworu.

5.1.2 Scenariusz II – symulacja wykonana dla modelu nieleczzonego guza

Podjęmowany problem:

Analiza zmian odpowiedzi układu immunologicznego w zależności od początkowej liczby limfocytów krążących $C(0)$ (badanie stanu układu immunologicznego na podstawie wielkości nowotworu po zadanym czasie symulacji).

Warunki początkowe:

Wielkość (tj., liczbę komórek) nowotworu $T(0)$, liczbę komórek NK $N(0)$, liczbę limfocytów T_{CD8+} oraz liczbę limfocytów krążących $C(0)$ dobrano jak w tabeli 5.1, a następnie doświadczalnie zmieniano wartość początkowej liczby limfocytów krążących $C(0)$.

Przyjęte parametry:

Parametry dla modelu nieuwzględniającego leczenia jak w tabeli 4.1.

Czas symulacji:

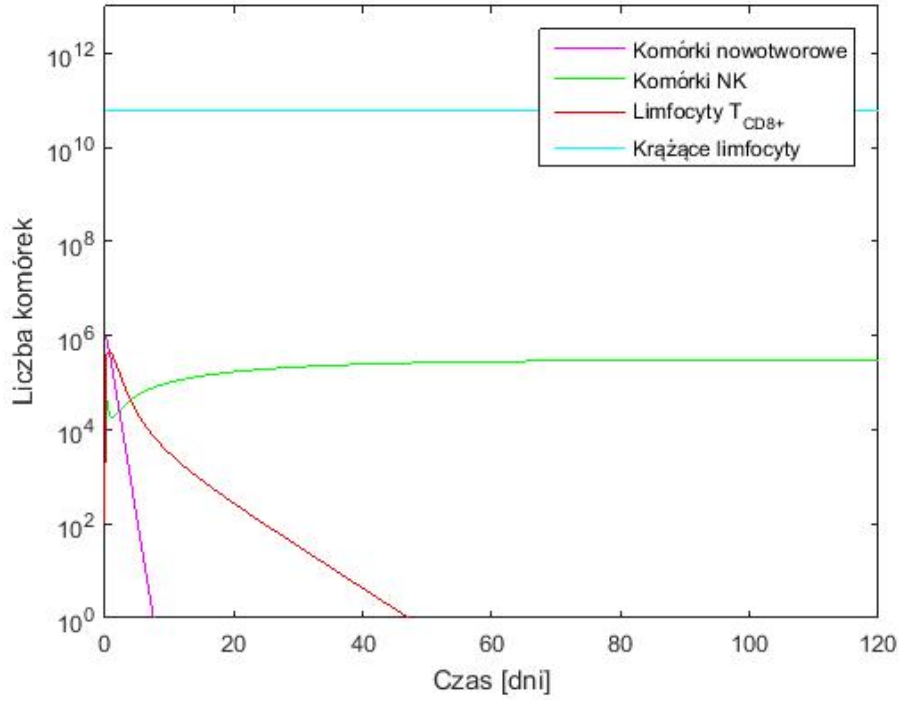
$T_k = 120$ dni

W tabeli 5.3 przedstawiono początkową liczbę limfocytów krążących $C(0)$, liczbę komórek nowotworu po symulacji w chwili $T_k = 120$ dni $T(120)$ oraz szacowaną objętość i długość promienia nowotworu po symulacji w chwili $T_k = 120$ dni.

Tab. 5.3: Początkowa liczba limfocytów krążących $C(0)$, liczba komórek nowotworowych po symulacji w chwili $T_k = 120$ dni $T(120)$ oraz szacowana objętość i długość promienia nowotworu po symulacji w chwili $T_k = 120$ dni.

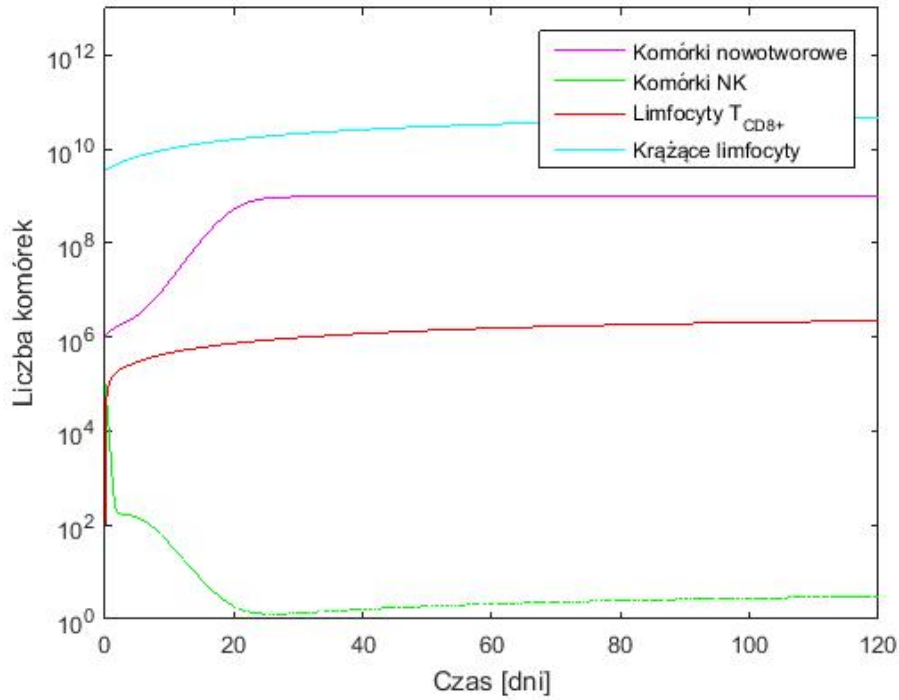
$C(0)$ [liczba komórek]	$T(120)$ [liczba komórek]	Objętość nowotworu [mm^3]	Promień nowotworu [mm]
$6 \cdot 10^{10}$	$6,76 \cdot 10^{-8}$	$6,76 \cdot 10^{-14}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$
$3 \cdot 10^{10}$	$1,69 \cdot 10^{-7}$	$1,69 \cdot 10^{-13}$	$3,4 \cdot 10^{-5}$
$1 \cdot 10^{10}$	$3,09 \cdot 10^{-8}$	$1,33 \cdot 10^{-14}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$
$6 \cdot 10^9$	$4,79 \cdot 10^{-8}$	$4,79 \cdot 10^{-14}$	$2,3 \cdot 10^{-5}$
$4 \cdot 10^9$	$5,72 \cdot 10^{-8}$	$5,72 \cdot 10^{-14}$	$2,4 \cdot 10^{-5}$
$3,5 \cdot 10^9$	$9,8 \cdot 10^8$	980	6,16
$3 \cdot 10^9$	$9,8 \cdot 10^8$	980	6,16
$1 \cdot 10^9$	$9,8 \cdot 10^8$	980	6,16
$6 \cdot 10^8$	$9,8 \cdot 10^8$	980	6,16
$3 \cdot 10^8$	$9,8 \cdot 10^8$	980	6,16

Zmiany liczby komórek badanych populacji - komórek nowotworowych $T(t)$, komórek NK $N(t)$, limfocytów T_{CD8+} $L(t)$ i limfocytów krążących $C(t)$ przedstawiono na wykresach (Rys. 5.4).



(a)

Zmiany liczby komórek badanych populacji dla wartości początkowej liczby limfocytów krążących $C(0) = 6 \cdot 10^{10}$. Regresja nowotworu po czasie $T_r \approx 7$ dni (168 godzin).



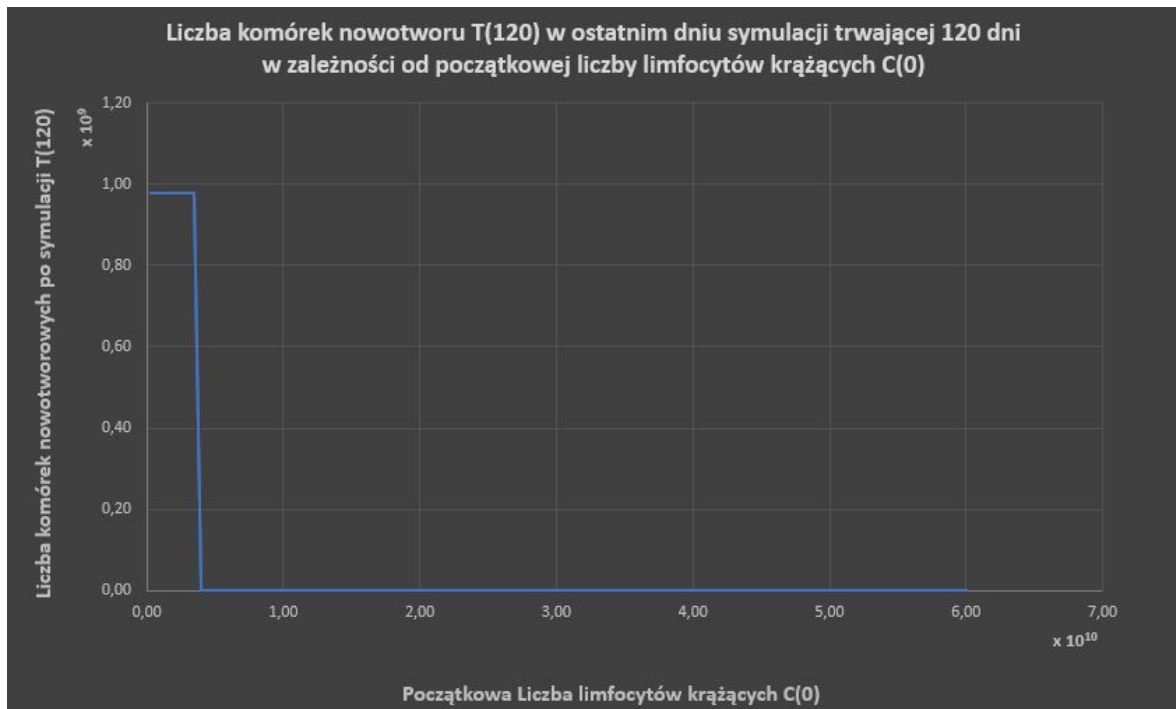
(b) Zmiany liczby komórek badanych populacji

dla wartości początkowej liczby limfocytów krążących $C(0) = 3,5 \cdot 10^9$. Stabilizacja liczby komórek nowotworowych po czasie $T_s \approx 28$ dni (672 godziny) około wartości $9,8 \cdot 10^8$.

Rys. 5.4: Wykresy zmian liczby komórek badanych populacji – komórek nowotworowych $T(t)$, komórek NK $N(t)$, limfocytów T_{CD8+} $L(t)$ i limfocytów krążących $C(t)$.

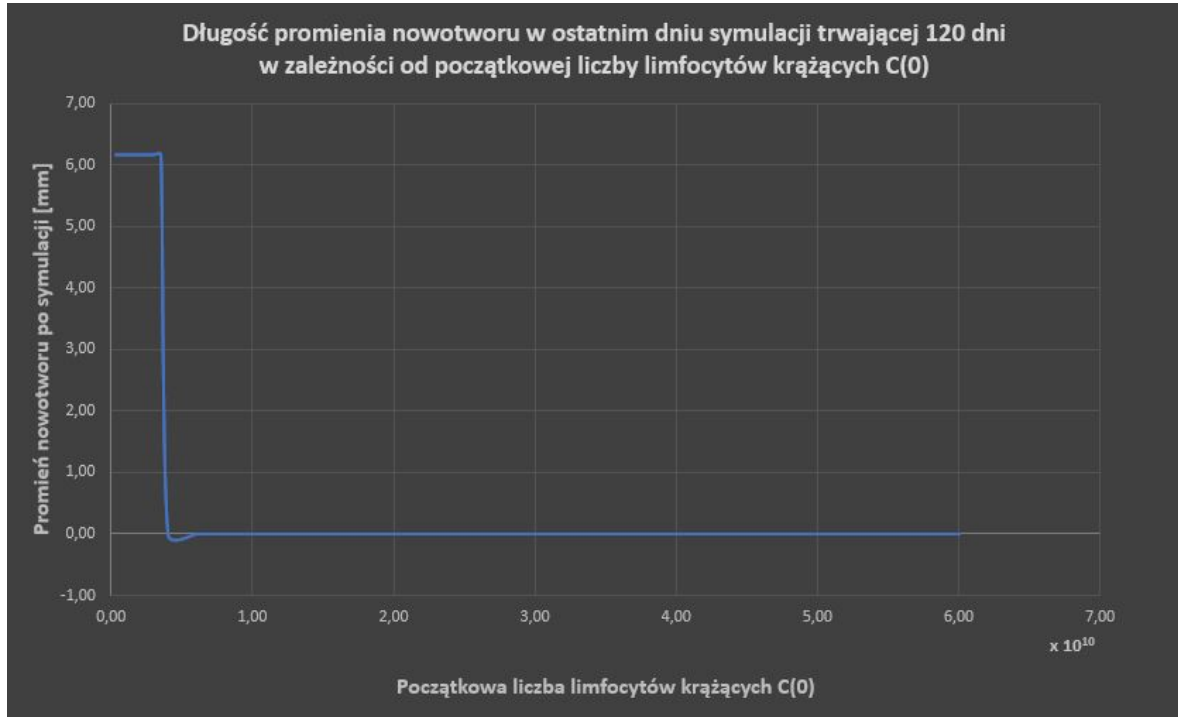
Na pierwszym z nich (Rys. 5.4a) przedstawiono regresję nowotworu wskutek działania odpowiednio silnego układu immunologicznego po około 7 dniach. Na drugim wykresie (Rys. 5.4b) liczba komórek nowotworowych stabilizuje się po 28 dniach około wartości $9,8 \cdot 10^8$ (odpowiada to objętości 980 mm^3 i długości promienia $6,16 \text{ mm}$). Układ immunologiczny ze względu na zmniejszoną liczbę krążących limfocytów jest zbyt słaby, by zniszczyć komórki nowotworu.

Zmiany wielkości nowotworu otrzymane na koniec symulacji trwającej $T_k = 120$ dni w zależności od początkowej liczby krążących limfocytów $C(0)$ przedstawiono na wykresie (Rys. 5.5).



Rys. 5.5: Wyniki otrzymane na koniec symulacji, która trwała $T_k = 120$ dni. Liczba komórek nowotworowych na koniec symulacji $T(120)$ w zależności od początkowej liczby krążących limfocytów $C(0)$.

Na wykresie (Rys. 5.6) pokazano zmiany długości promienia nowotworu otrzymane na koniec symulacji trwającej $T_k = 120$ dni w zależności od początkowej liczby krążących limfocytów $C(0)$.



Rys. 5.6: Wyniki otrzymane na koniec symulacji, która trwała $T_k = 120$ dni. Długość promienia nowotworu [mm] na koniec symulacji w zależności od początkowej liczby krążących limfocytów $C(0)$.

Wnioski:

- przy odpowiednio dużej liczbie krążących limfocytów ($C(0) \approx 4 \cdot 10^9$) układ immunologiczny jest w stanie zniszczyć komórki nowotworowe bez ingerencji zewnętrznych czynników (np. leczenia),
- przy zbyt małej liczbie krążących limfocytów (zły stan układu immunologicznego) organizm nie jest w stanie zniszczyć komórek nowotworowych.

- 5.2 Leczenie metodą chemioterapii**
- 5.3 Leczenie metodą immunoterapii**
- 5.4 Połączenie metod chemioterapii i immunoterapii**

6. Rezultaty

7. Analiza wyników

8. Podsumowanie

9. Rozwój

9.1 Interferony

Interferony to glikoproteiny wytwarzane przez limfocyty, fibroblasty i inne komórki, które biorą udział w odpowiedzi immunologicznej [21]. Należą do humoralnych mechanizmów obronnych odporności nieswoistej. Ich funkcją jest, między innymi hamowanie replikacji wirusów w komórce i proliferacji komórek (w szczególności nowotworowych), aktywowanie syntezy enzymów (rybonukleazy, syntetazy, kinazy białkowej) i cytotoxiczności makrofagów oraz limfocytów typu T, a także zwiększenie aktywności komórek cytotoxicznych [7].

Wśród interferonów można wyróżnić interferony [22]:

- α (leukocytarne) – produkowane głównie przez monocyty, makrofagi i limfocyty, zbudowane z białek zawierających od 165 do 166 aminokwasów. Istnieją 22 znane podtypy interferonów α . Są one kodowane przez co najmniej 23 geny zlokalizowane w chromosomie 9;
- β – produkowane przez fibroblasty. Są podobne do interferonów α (posiadają 30% analogicznych aminokwasów). Odpowiadające sobie geny interferonów obu tych typów mieszczą się w krótszym ramieniu chromosomu 9;
- γ – produkowane przez limfocyty typu T po stymulacji antygenami lub mitogenami. Gen kodujący interferony γ znajduje się w obrębie chromosomu 12.

Spośród wymienionych interferonów, największą liczbę podtypów posiada IFN- α , ponadto niektóre izoformy posiadają kilka odmian allelicznych. Ekspresja interferonów typu I (czyli m. in. IFN- α , IFN- β) zachodzi w komórkach nabłonka i makrofagach.

IFN- α jest wytwarzany głównie przez leukocyty, IFN- β przez fibroblasty, a IFN- γ przez komórki NK oraz aktywowane limfocyty T. Do wytwarzania interferonów typu I dochodzi najczęściej po związaniu dwuniciowego RNA powstałego w procesie replikacji materiału genetycznego RNA wirusów. Efektem jest aktywacja szlaków transdukcji sygnału [33].

Warunkiem koniecznym do działania interferonów jest ich połączenie ze swoistymi receptorami. Interferony α i β działają poprzez receptor typu I, natomiast interferon gamma poprzez receptor typu II [22].

Receptor dla interferonów I typu określany jest jako IFNAR (IFN- α/β receptor). Tworzą go dwa łańcuchy, IFNAR1 o masie 63 kDa oraz IFNAR2c o masie 55 kDa [33].

Liczba receptorów różni się zależnie od poszczególnych komórek (waha się od $2 \cdot 10^2$ do $6 \cdot 10^3$ [22]). Kompleks interferon – receptor aktywuje kinazę tyrozynową. Poprzez

fosforylację odpowiednich białek kinaza tyrozynowa tworzy wraz z nimi czynnik transkrypcyjny. W jądrze komórkowym po połączeniu z elementem odpowiedzi stymulowanej przez interferon ISRE (ang. Interferon-Stimulated Response Element) wzrasta ekspresja genów, które są odpowiedzialne za produkcję białek efektorowych [22].

Interferon α , będący pierwszą cytokiną zarejestrowaną do leczenia nowotworów [10], stymuluje układ immunologiczny ingerując w procesy różnicowania się komórek. Zwiększa również aktywność fagocytarną makrofagów i swoiste działanie cytotoksyczne limfocytów. Działa przeciwnowotworowo poprzez hamowanie angiogenezy i blokowanie syntezy białek. W chorobach nowotworowych dawki interferonu dochodzą do 900 MU w ciągu 6 dni [21].

IFN- $\alpha 2a$ znajduje zastosowanie (w połączeniu z retinoidami) w terapii zaawansowanej postaci raka płaskonabłonkowego skóry i raka szyjki macicy powodując ich regresję. Podczas terapii naczynek oraz czerniaka hamuje proliferację komórek śródbłoka naczyń [33].

Interferon posiada wyraźne powinowactwo do komórek nerwowych i w dużym stężeniu działa neurotoksycznie. Podczas leczenia interferonem mogą wystąpić niepożądane zaburzenia [21]:

- układu serotoninergetycznego,
- układu noradrenergetycznego,
- układu dopaminergicznego,
- układu glutaminianergicznego,
- układu opioidowego,
- hormonalne,
- metabolizmu mózgowego.

Stopień ciężkości zaburzeń występujących po terapii interferonem zależy od dawki oraz częstości podawania. Po podaniu dużych dawek IFN- α najczęściej występują objawy grypopodobne (gorączka, bóle stawów), co spowodowane jest uwolnieniem cytokin: TNF- α , IL-1, IL-6. Cytokiny te są efektem odpowiedzi immunologicznej na interferon. Pobudzają receptory podwzgórza wywołując gorączkę i dreszcze. Istotna jest także indukcja prostaglandyny E2. Można również zaobserwować trombocytopenię i leukopenię w obrazie krwi. Przy długotrwałym leczeniu występują takie skutki uboczne, jak: zaburzenia czynności tarczycy, choroby autoimmunologiczne, retinopatia, cukrzyca, zaburzenia psychiczne, wysypka, utrata włosów [33].

Zaburzenia psychiczne często pojawiają się u pacjentów leczonych przy pomocy interferonu. Mogą to być stany zmęczenia, pogorszenie koncentracji, uwagi i pamięci, ale także pełnoobjawowe epizody depresji, manii, zaburzenia lękowe czy zaburzenia świadomości [21].

Badania [33] wykazały, że niskie dawki rekombinowanego ludzkiego IFN- α mają działanie immunostymulujące, natomiast IFN- α w wysokich dawkach działa immunosupresyjnie, o czym świadczą zmiany aktywności komórek NK, liczby limfocytów i ekspresji β -mikroglobuliny. Doustne podanie IFN- α skutkuje wzrostem liczby limfocytów CD3+, CD4+, CD8+, CD25+.

Bibliografia

- [1] Mustafa Mamat, Subiyanto i Agus Kartono, „Mathematical Model of Cancer Treatments Using Immunotherapy, Chemotherapy and Biochemotherapy”,
- [2] R. Tadeusiewicz, „Biocybernetyka. Metodologiczne podstawy dla inżynierii biomedycznej.”, PWN, 2013
- [3] Redaktor naukowy dr n. med. Janusz Meder, „Podstawy onkologii klinicznej”, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie, 2011
- [4] Ewelina Dymarska, „Czynniki modulujące układ immunologiczny człowieka”, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu, Zeszyty Naukowe Państwowej Wyższej Szkoły Zawodowej im. Witelona w Legnicy nr 19(2)/2016
- [5] Nadzieja Drela, „Immunologiczna teoria starzenia”, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, Instytut Zoologii, Zakład Immunologii, Warszawa, 23 kwietnia 2014
- [6] Marta Sochocka, Zofia Błach-Olszewska, „Mechanizmy wrodzonej odporności”, Laboratorium Wirusologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im L. Hirszfelda we Wrocławiu, Postępy Hig Med Dośw., 59: 250-258, 2005
- [7] Emilia Kolarzyk, „Wybrane problemy higieny i ekologii człowieka”, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 2008, wyd.1
- [8] Beata Tokarz-Deptuła, Tymoteusz Miller, Wiesław Deptuła, „Cytokiny z rodziny interleukiny-1”, Katedra Mikrobiologii i Immunologii, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Szczeciński
- [9] „Chemioterapia, Immunoterapia i Terapia Celowana Informacje dla Pacjenta”, Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej im. św. Jana z Dukli, Lublin, 2011
- [10] Jacek Mackiewicz, Andrzej Mackiewicz, „Immunoterapia nowotworów i perspektywy jej rozwoju”, Zakład Immunologii Nowotworów, Katedra Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu
- [11] Anna Świeboda-Sadlej, „Skojarzone leczenie nowotworów — współpraca chirurga i onkologa klinicznego w zakresie leczenia raka piersi, jelita grubego i płuca”, Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych WUM

- [12] Ewa Sikora, „Cykl komórkowy i apoptoza: śmierć starej komórki”, Polskie Towarzystwo Biochemiczne, „Postępy biochemii”, tom 42, nr 2, 1996
- [13] Izabela Klaska, Jerzy Z. Nowak, „Rola układu dopełniacza w fizjologii i patologii”, Łódź, 2007
- [14] dr hab. Krzysztof Bryniarski, „Immunologia”, 2017
- [15] Włodzimierz Maśliński, Ewa Kontny, „Podstawy immunologii dla reumatologów”, Narodowy Instytut Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji, Warszawa, 2015
- [16] Aleksandra E. Tokarz, Iwona Szuścik, Agnieszka Żyłka, Ewa Stępień, „Wykorzystanie mikromacierzy w ocenie prozapalnych i proangiogennych cytokin w patomechanizmie retinopatii cukrzycowej”, 2014
- [17] K. Morka, G. Bugla-Płoskońska, „Medycyna doświadczalna i mikrobiologia”, 2017
- [18] O.G. Isaeva and V.A. Osipov, „Different strategies for cancer treatment: Mathematical modelling”, 2009
- [19] L.G. de Pillis, W. Gu, A.E. Radunskay, „Mixed immunotherapy and chemotherapy of tumors: modeling, applications and biological interpretations”, 2005
- [20] Krzysztof Wiktorowicz, Krzysztof Kaszkowiak, „Budowa i funkcja ludzkich antygenów zgodności tkankowej. Część 1. Kodowanie i budowa”, Katedra Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2018
- [21] Dominik Strzelecki, Tomasz Pawełczyk, Jolanta Rabe-Jabłońska, „Zaburzenia depresyjne w przebiegu leczenia przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby interferonem α ”, Postępy Psychiatrii i Neurologii, 2005
- [22] Waldemar Halota, Małgorzata Pawłowska, Michał Andrejczyn, „Interferony alfa w leczeniu przewlekłych zakażeń HCV”, Przegląd epidemiologiczny, 2004
- [23] Ugo Del Monte, „Does the cell number 10^9 still really fit one gram of tumor tissue?”, Cell Cycle, 8:3, 505-506, 2009
- [24] Marcus C.B. Tan, Peter S. Goedegebuure, Timothy J. Eberlein, „Chirurgia onkologiczna część V”, Chirurgia Sabistona, rozdział 29 „Biologia nowotworów i markery nowotworowe”, 2012
- [25] Monika Olszówka, Kamil Maciąg, „Choroby nowotworowe: wybrane zagadnienia”, Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL, Lublin, 2015
- [26] Elżbieta Ograczyk, Magdalena Kowalewicz-Kulbat, Sebastian Wawrocki, Marek Fol, „Immunosupresja – wymagający sprzymierzeniec na trudne czasy”, Uniwersytet Łódzki, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Łódź, 2015

- [27] Zdzisław Gliński, Krzysztof Kostro, „Immunoonkologia – nowe dane”, *Życie Weterynaryjne* 91(11), Wydział Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie, 2016
- [28] Lek. med. Marta Adamczyk-Korbel, „Układ odpornościowy człowieka a probiotyki”, *Klinika Pneumonologii, Onkologii I Alergologii*, Lublin, Medycyna i pasje, Medycyna zapobiegawcza, luty 2010
- [29] Zuzanna Wyszynska, Lidia Szulc, Justyna Struzik, Marek Niemiałtowski, „Immunobiologia komórek NK”, *Zakład Immunologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW*, Warszawa, 2012
- [30] Tomasz Jerzy Ślebioda, Lucyna Kaszubowska, Zbigniew Kmiec, „Nowe mechanizmy aktywacji komórek NK w przebiegu infekcji wirusowych”, *Katedra i Zakład Histologii*, Gdański Uniwersytet Medyczny, 2012
- [31] Paulina Kwaśnik, Marta Kinga Lemieszek, Wojciech Rzeski, „Możliwości wykorzystania komórek NK w immunoterapii nowotworów”, *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu* 2020, Tom 26, Nr 1, 8–16
- [32] Marta Sochocka, „Rozpoznawanie patogenów przez wrodzony system odporności”, *Laboratorium Wirusologii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu, Postepy Hig Med Dosw. (online)*, 2008; 62: 676-687
- [33] Anna Głobińska, Marek L. Kowalski, „Interferon alfa: perspektywy zastosowania w leczeniu wirusowych zakażeń dróg oddechowych”, *Klinika Immunologii, Reumatologii i Alergii, Katedra Immunologii Klinicznej i Mikrobiologii Uniwersytet Medyczny w Łodzi*, 2013
- [34] Brygida Knysz, Jacek Gąsiorowski, Małgonata Inglot, Weronika Rymer, Aleksandra Szymczak, Andrzej Gładysz, „Rola i zastosowanie terapeutyczne interleukiny 2 w zakażeniu HIV”, *Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych Akademii Medycznej we Wrocławiu, Przegląd Epidemiologiczny*, 2002; 56:587-93
- [35] Anna Skoczyńska, Rafał Poręba, Adrian Sieradzki, Ryszard Andrzejak, Urszula Sieradzka, „Wpływ ołowiu i kadmu na funkcje układu immunologicznego”, *Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Zawodowych Akademii Medycznej we Wrocławiu, Medycyna Pracy*, 2002, 53; 3; 259-264
- [36] Renata Zajączkowska, Jerzy Wordliczek, Wojciech Leppert, „Mechanizmy i zespoły bólu neuropatycznego u chorych na nowotwór”, *Medycyna Paliatywna w Praktyce* 2014; 8, 2: 66–73
- [37] Beata Zdunek, Monika Olszówka, „Najnowsze badania z zakresu chorób nowotworowych”, Lublin 2016
- [38] Marek Z. Wojtukiewicz, Zbigniew Sawicki, Ewa Sierko, Anna Kieszkowska-Grudny, „Zespół przewlekłego zmęczenia u chorych na nowotwory poddawanych chemioterapii”, *Nowotwory, Journal of Oncology*, 6, 695-701, 2007

-
- [39] dr n. med. Jarosław Strychar, „Zaburzenia czucia kończyn górnych”, Ursynowskie Centrum Zabiegowe
- [40] Andrzej Szczudlik, Monika Rudzińska, „Atlas ataksji”, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 2010
- [41] Kamila Wojas-Krawczyk, Paweł Krawczyk, „Rozwój koncepcji przeciwnowotworowej immunoterapii”, Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego, Onkologia w Praktyce Klinicznej 2015, tom 11, nr 2, 69–75, Lublin, 2015

10. Dodatek

10.1 Tabela skrótów

Tab. 10.1: Skróty wykorzystane w pracy

Skrót	Nazwa angielska	Nazwa polska
TIL	Tumor Infiltrating Lymphocytes	Limfocyty naciekające nowotwór
NK	Natural killers	Naturalni zabójcy
IL-2	Interleukina-2	Interleukina-2
INF- α	Interferon- α	Interferon- α
MBL	Mannose Binding Lectin	Lektyna wiążąca mannozę
APC	Antigen Presenting Cells	Komórki prezentujące antygen
NCRs	Natural Cytotoxicity Receptors	Receptory naturalnej cytotoksyczności
KIR	Killer cells Inhibitory Receptor	Receptor hamujący zabójcze komórki
ISRE	Interferon-Stimulated Response Element	Element odpowiedzi stymulowanej przez interferon
TCGF	T Cell Growth Factor	Czynnik wzrostu komórek T
FDA	Food and Drug Administration	Agencja żywności i leków
AICD	Activation-Induced Cell Death	Śmierć komórek indukowana aktywacją
TNF $_{\alpha}$	Tumor Necrosis Factor α	Czynnik martwicy guza α
CIPN	Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy	Obwodowa polineuropatia wywołana chemioterapią
LAK	Lymphokine Activated Killers	Komórki zabójcze aktywowane limfokiną
HSP	Heat Shock Protein	Białka szoku cieplnego
DC	Dendritic cells	Komórki dendrytyczne
TSA	Tumor Specific Antigens	Antygeny swoiste dla nowotworu
CARs	Chimeric Antigen Receptors	Chimeryczne receptory dla specyficznych antygenów nowotworowych