

Non-Hodgkin Lenfomalı Hastalarda Kemik İliği ve Periferik Stem Cell Ürünlerinin İnterleukin-2'ye Cevaplarının Karşılaştırılması

İbrahim Halil Özerol, MD¹, Mustafa Şenol, MD², Ana Ageitos, MD¹, James E. Talmadge, PhD¹

İnterleukin-2 (IL-2)'ye immün cevap, normal periferik kan lökositleri (PBL) ile karşılaştırılınca otolog kemik iliği (BM) ve granülosit-monosit koloni stimulan faktör (GM-CSF) ile mobilize edilmiş periferik stem cell (PSC) ürünlerinde farklıdır. Non-Hodgkin lenfomalı 24 hastadan elde edilen stem cell ürünlerinin IL-2 ile kültürden önce ve 5 gün IL-2 ile birlikte kültür yapılarak hücre proliferasyonu incelendi. Bu çalışmalara göre PSC'in IL-2 tarafından stimüle edilen proliferatif cevabı normal PBL'den farklı değilken hem PBL ve BM (p=0.0136) hem de PSC ve BM (p=0.0179) arasındaki fark PBL'den istatistiki olarak anlamlı derecede farklı idi. Bu sonuçlar, PSC'deki defektif lenfositlerin transplantasyondan önce in vitro IL-2 ile muamele edilmesi ile düzeltilebileceğini göstermektedir. Bu nedenle hematolojik rekonstitüsyon için PSC transplantasyonu, BM transplantasyonuna üstündür. [Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi 1996;3(2):75-79]

Anahtar Kelimeler: Non-Hodgkin lymphoma, IL-2, kemik iliği hücreleri, periferik stem cell

The comparison of the responses of bone marrow and peripheral stem cell products from patients with non-Hodgkin lymphoma to interleukin-2

The immune response to interleukin-2 (IL-2) differs between autologous bone marrow (BM) and granulocyte-monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) mobilized peripheral stem cell (PSC) products as well as compared to normal peripheral blood leukocytes (PBL). Stem cell products from 24 patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL) were examined both before and following 5 days co-incubation with IL-2, and the cell proliferation in response to IL-2 were examined. These studies show that the IL-2 stimulated proliferative response of PSC was not different than observed with normal PBL, but there was statistically significant decrease between not only PBL and BM but also PSC and BM (p=0.0136 and p=0.0179, respectively). As these results show, ex vivo threat of PSC with IL-2 before PSC transplantation is capable of to increase defective-lymphocyte function. Therefore, the use of PSC transplantation as compared to BM transplantation for hematologic reconstitution is superior. [Journal of Turgut Özal Medical Center 1996;3(2):75-79]

Key Words: Non-Hodgkin lymphoma, IL-2, bone marrow cell, peripheral stem cell

Günümüzde malign hastalıkların tedavisinde yüksek doz kemoterapiyi desteklemek için periferik kan "stem cell" transplantasyonu (PSCT) ve otolog kemik iliği transplantasyonu (ABMT) kullanılmaktadır (1-4). Otolog periferik stem

cell'ler (APSC), kemoterapiden önce veya kemoterapi sırasında "growth faktör" (GF)'ler ile mobilize edilmekte ve hastalara myeloablative tedavi uygulamadan önce aferezis ile toplanmaktadır (4-10). PSC kullanmanın bazı avantajları vardır;

¹ University of Nebraska Medical Center Department of Pathology and Microbiology Omaha, NE, USA

² University of Pittsburgh Children's Hospital Department of Allergy-Immunology, USA

lökoferez ile elde edilebildikleri için kemik iliği (BM) alımında gereken genel anestezi uygulamalarına ihtiyaç kalmamaktadır. Ayrıca PSC kullanılması, kemik iliği metastazı olan veya pelvik radyasyon uygulanan hastalardan elde edilen hücrelerin kullanılmasına da izin verir (4,11,12). Üstelik, BM ürünlerine göre PSC'i kontamine eden tümör hücrelerinin sayısı da düşük olduğu için PSCT daha güvenlidir (4,13). BM hücreleri yerine mobilize PSC ürünlerinin kullanılması ile myeloid ve lenfoid hücrelerin normale dönüş oranı da hızlanmaktadır. Non-Hodgkin lenfoma (NHL) tedavisinde PSCT kullanılması halinde ABMT'na göre hastaliksız yaşama süresi anlamlı olarak artmaktadır (6).

Son çalışmalar, ABMT ve PSCT'dan sonra periferik kan lökositlerinin immün fonksiyonu normal PBL'lere göre süprese olduklarını göstermiştir. Stem cell transplantasyonu yapılan hastalarda T lenfositlerinin antijene verdikleri immün yanıtlarda, mitojenle indüklenen T lenfosit proliferasyonunda ve IL-2 üretiminde yetersizlik oluşmaktadır (14-16). Bu gözlemlerin aksine, antijenik stimülasyon olmadan yüksek doz IL-2 konsantrasyonlarında lenfosit proliferatif cevabı transplantasyondan sonra daha hızla normalleşmektedir (15).

IL-2; T lenfositlerini proliferasyona sokar, sitokin üretilmesini stimüle eder, naturel killer (NK) lenfosit proliferasyonunu destekler, lenfokinle aktive edilmiş killer (LAK) hücrelerinin aktivitesini artırır, monosit sitotoksitesini güçlendirir ve B lenfositlerinin proliferasyonunu stimüle eder (17,18). T, NK ve B lenfositlerinin proliferere olabilmesi için IL-2'nin bu hücrelerin membranında bulunan bir reseptöre bağlanması gerekir (18).

Günümüzde NHL tedavisinde ABMT ve PSCT kullanılmasına rağmen otolog PSCT daha fazla tercih edilmektedir. Bu tercihin nedenleri; 1) PSC tümör hücreleri ile daha az kontamine, 2) BM kullanılırsa tümörlü hücrelerin transplante edilme ihtimali daha fazladır ve 3) Radyoterapiden sonra alınan BM içinde stem cell sayısı azalmaktadır (4,19-21). Bu sebeplerden dolayı, otolog transplantasyonlarda PSC kullanma oranı 1991'de %15 iken 1994'te %72'ye yükselmiştir (22). Tüm avantajlarına rağmen PSCT'unda da başarısızlık ihtimali vardır. Bu nedenle rezidüel hastalığı tedavi etmek için yüksek doz kemoterapi (HDT) ve sitokin

desteği gerekir (23). IL-2 lenfosit proliferasyonunda hayati bir role sahip olduğu için BM ve PSC ürünlerini kısa süre (5 gün) IL-2 ile kültür yaptıktan sonra oluşan lenfosit proliferasyonunu tespit etmek ve normal periferik kan lökositlerinin proliferasyonu ile karşılaştırmak için bu çalışmayı yaptık.

MATERYAL VE METOD

Hastalar. Bu çalışma, Nebraska Üniversitesi Tıp Merkezi (UNMC)'nde HDT ve PSCT (n=14) veya ABMT (n=10) tedavisi yapılacak olan orta derecedeki NHL'lı hastalarda yapıldı. Her hastaya, stem cell toplanacağı ve otolog transplantasyon yapılacağı anlatılarak yazılı onayları alındı. PSCT yapılacak gruba granulosit monosit koloni stimulan faktör (GM-CSF, 250 µg/m²/gün) verildi ve vücut ağırlığına göre 6.5x10⁸ mononükleer hücre/kg toplanarak donduruldu. En az 3 aferez işlemi yapıldı. Tüm örnekler, hem PSC hem de BM, UNMC'de hazırlanan bir protokole uygun olarak alındı. Ayrıca 20 normal sağlıklı gönüllüden PBL'ler elde edildi.

Hücre izolasyonu. Hank's dengeli tuz solusyonu (HBSS) (Gibco BRL, Grand Island, NY) ile, BM veya periferik kan (PB) örnekleri 1:1 oranında, PSC ise 1:2 oranında dilüe edildi ve Ficoll Hypaque (Organon Teknika, Durham, NC) üzerine tabaka yapacak şekilde yayıldı. Daha sonra 25 dakika 1500 rpm'de santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra sulu kısım atılıp mononükleer hücre tabakası başka bir tüpe transfer edildi. Mononükleer hücreler iki kez HBSS içinde santrifüj (1200 rpm'de 10'ar dk) edilerek yıkandı ve bu hücreler %10 fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Logan UT), 10 mM HEPES (Research Organics, Cleveland, OH), 40 µg/ml Gentamycin (Gibco) ve 2 mM L-Glutamine (Gibco) içeren RPMI-1640 (Gibco) içinde 4x10⁶/ml'ye ayarlandı.

Hücre kültürü. PSC, BM ve normal PBL hücre kültürü, %10 FBS, 40 µg/ml Gentamycin ve 2 mM L-Glutamine içeren RPMI-1640 içinde yapıldı. Hücre kültürleri için, T-25 doku kültürü şişesi (Costar, Cambridge, MA) kullanıldı ve her ml için 1x10⁶ hücre eklendi. T-25 şişeleri içine, son konsantrasyonu 100 IU/ml olacak şekilde rekombinan IL-2 (Chiron Corporation, Emeryville, CA) (specific activity 3x10⁶ units/mg) eklendi. Bu

kültürler, %5 CO₂'li etüvde 37°C'de 5 gün inkübe edildi, daha sonra hücreler santrifüj edilerek toplandı ve IL-2 ile stimüle olup olmadıkları (proliferasyon) incelendi.

IL-2 ile indüklenmiş proliferasyon. IL-2, RPMI-1640 içinde 1000, 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03 and 0 U/ml konsantrasyonlarında dilüe edildi. Bu dilüsyonların herbirinden 100 µl alınarak mikroplyet kuyucuklarına kondu. Her dilüsyon için 3 kuyucuk kullanıldı. Daha sonra tüm kuyucuklara ml'de 1x10⁶'ya ayarlanan hücre solusyonundan 100'er µl eklendi. Üç gün inkübe edildikten sonra kuyucuklara 1 µCi ³H-thymidine eklendi ve 24 saat inkübe edildi. Ertesi gün 96 kuyucuklu Scatron cell harvester cihazı ile kuyucuklar yıkanıp hücreler fiberglas striptlere emdirildi. Radyoaktivite "Packard beta scintillation counter" ile ölçüldü.

İstatistikler. Multipl deneylerden elde edilen verilerin ortalaması ve standart hataları hesaplandı. Anlamlılık düzeyleri SPSS for Windows® yazılımı kullanılarak Student t testi ile incelendi.

BULGULAR

Hastalar ve stem cell ürünleri. Bu çalışmaya, Ağustos 1995 ile Nisan 1996 arasında, Nebraska Üniversitesi Tıp Merkezi (UNMC)'nde kemoterapi ve stem cell transplantasyonu yapılacak 24 NHL'lı hasta alındı. Hastalara yapılacak araştırma anlatılıp yazılı onayları alındı. PSCT grubundaki, 8'i erkek 6'sı kadın 14 hastanın ortalama yaşı 45 (32-68), otolog BMT grubunda ise 49 (34-68) yılı.

Tablo 1. NHL'lı hastaların özellikleri

	PSC	BM
Hasta Sayısı	14	10
Cins (E/K)	8/6	7/3
Ortalama Yaş	45	49
BM Tutulumu (Var/Yok)	5/9	0/10
CVB (ferez sayısı)	6.25	-
Ortalama CFU-GM (x10 ⁴ /kg) (alt-üst sınır)	4.85 (3.17-64.49)	3.46 (1.89-7.95)
Ortalama CD34+(x10 ⁶ /kg) (alt-üst sınır)	1.23 (1.09-16.17)	1.17 (0.32-2.74)
BFU-E (x10 ⁴ /kg)	10.63	5.81
Mutlak hücre sayısı >500 ulaşma zamanı	11.67	11.50
Trombosit sayısı >20,000 ulaşma zamanı	9.83	14.75

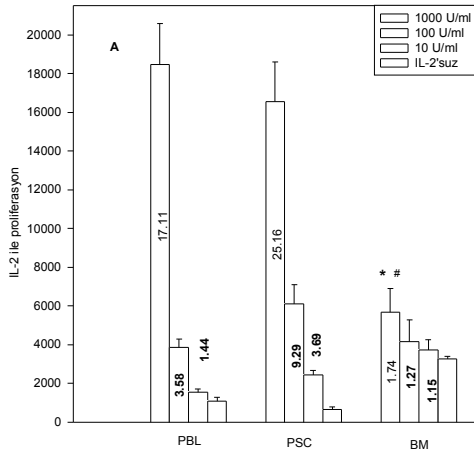
Periferik kan progenitor hücreleri, i.v. 250 µg/M² verilen GM-CSF ile mobilize edildi. Hedef hücre dozu 6.5x10⁸ mononükleer hücre/kg olacak şekilde

toplandı ve donduruldu. GM-CSF verilmesinden sonra 3.ncü ve daha sonraki günlerde en az 3 aferez işlemi uygulandı. Stem cell transplantasyonundan sonra tüm hastalara mutlak nötrofil sayısı ≥ 500/mm³ oluncaya kadar iki gün aralıklarla GM-CSF verildi. Hastaların diğer özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

IL-2 ile PSC proliferasyonu. PSC'in IL-2'ye verdikleri proliferatif cevapların normal PBL'lerine benzer olduğu, her ikisinin de BM lökositlerine göre daha yüksek proliferasyon gösterdiği ve farkın istatistiki olarak anlamlı olduğu tespit edildi (sırasıyla, p<0.01 ve p<0.001). Kontrol kültürlerde (IL-2'siz) ³H-thymidine inkorporasyonu (baz proliferasyon) daha düşük olduğundan PSC stimülasyon indeksi PBL'de gözlenenden daha yüksek bulundu. PBL'lerin, 100 IU/ml IL-2 ile 5 günlük kültürden sonra 10-1,000 IU/ml IL-2'ye proliferasyon cevabı anlamlı olarak daha yüksek olarak tespit edildi. Ayrıca, IL-2 cevapları taze ürünlere göre çok daha yüksek bulundu. Bunun nedeni IL-2 reseptörlerinin artması olabilir. Bu durumda, PSC ürünlerinden elde edilen lökositlerin stimülasyon indeksi 5.7 iken IL-2 ile kültürden sonra 67'ye yükseldiği görüldü. Bunun nedeni PSC ürünlerindeki lökositlerin aktive veya ekspansiyon olma yetersizliği olabilir diye düşünüldü. IL-2 ile kültürden sonra hem PSC hem de BM ürünlerinin IL-2'ye verdikleri cevaplar PBL'e göre anlamlı olarak daha düşüktü (1000 IU/ml IL-2 ile sırasıyla, p<0.01 ve p<0.01) ve bunlar bir birinden istatistiki olarak çok farklı değildi (p=0.462).

TARTIŞMA

Malign hastalıkların tedavisinde myeloablative tedaviden sonra otolog BMT'una bir alternatif olan PSCT daha sık kullanılmaya başlanmıştır. Bu yönelimin en önemli dayanak noktası otolog BMT ile karşılaştırılınca PSCT'unun daha hızlı myeloid (22,24) ve immünolojik rekonstrüksiyon göstermesidir (24,25). PSCT'dan sonra çok daha hızlı immün rekonstrüksiyon görülmesi ilginç bir gözlemdir (25). Hem otolog BMT hem de PSCT'dan sonra toplanan stem cell ürünlerindeki tümör hücrelerinin tekrar infüze edilmesi mümkündür. Cervantes ve ark. (26) otolog BMT yapılan NHL'lı hastaları 11 yıl izlemiş ve 34 hastalık seride %68 oranında kemik iliği tutulumu görüldüğünü bildirmişlerdir. Brada ve ark. (27) ise histolojik olarak kemik iliği normal görünen hastaların %30'unda, dolaşan lenfoma hücreleri tespit etmişlerdir. Kemoterapiye bağlı nötropeni gelişen hastalardan, iyileşme fazı sırasında elde edilen PSC içinde daha az tümör hücreleri olması nedeniyle bunlar, alternatif pluripotent hematopoietik progenitör hücre olarak kabul edilmektedir (28). Son yıllarda, toplanan hücrelerdeki tümör hücrelerinin ayrılması ile daha uzun ortalama yaşam süresi elde edilmiştir (29).



Şekil 1. Normal donörlerden alınan PBL ve NHL'lı hastalardan elde edilen PSC ve BM hücrelerinde IL-2'ye bağlı proliferasyon. Veriler ortalama count per minute (cpm) ± standart hata (SE) olarak, stimülasyon indeksleri ise sütun içinde gösterilmiştir.

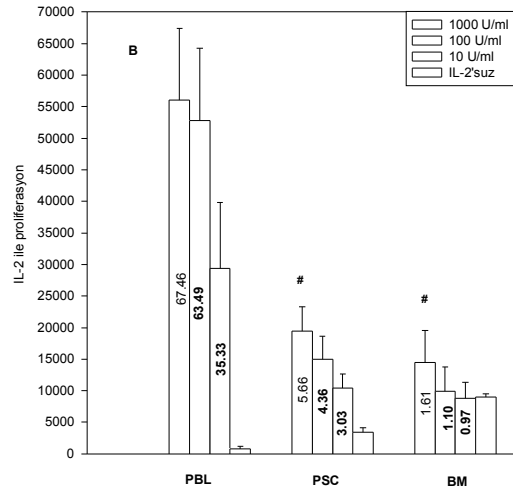
* Normal PBL ile karşılaştırılınca fark anlamlı (p<0.05).

PSC ile karşılaştırılınca fark anlamlı (p<0.05).

Tümör hücrelerinin %100 ayrılmaması nedeniyle halen nüks görülen hastalar vardır. Bu nedenle, bahsedilen farklı terapötik yaklaşımların terapötik etkinliğini artırmak için adjuvan tedavi metodları ile desteklenmesi gerekir. Günümüzde bu amaçla, IL-2 ile çoğaltılmış stem cell ürünlerinin kullanılması (25) veya transplantasyondan sonra IL-2 kullanılması düşünülmektedir (24).

Bu çalışmada, IL-2 ile stimüle edilen PSC proliferasyonu, normal PBL ile gözlenene benzer, fakat PBL ve BM arasında (p=0.014), PSC ve BM arasında (p=0.0189) anlamlı oranda daha düşük bulundu. IL-2 ile kültürden sonra, IL-2 ile stimüle olmuş PSC ve KI proliferasyonu, PBL'den anlamlı olarak daha düşük bulundu. PBL'nin IL-2 ile proliferasyonu anlamlı olarak artarken PSC ve BM proliferasyonları artmadı.

Sonuç olarak, bu çalışma ile NHL'lı hastalarda lökositlerde IL-2 stimülasyon cevabının defektif olduğu ve stem cell ürünlerindeki defektif IL-2 stimülasyonunun IL-2 ile birlikte kültür yapılarak düzeltilebileceği gösterilmiştir. Bu şekilde muamele edilen efektör hücreler, tümör hücrelerine karşı litik aktivite gösterebileceği için



Şekil 2. Normal donörlerden alınan PBL ve NHL'lı hastalardan elde edilen PSC ve BM hücrelerinde IL-2 ile (100 IU/ml) 5 günlük in vitro kültürden sonra IL-2'ye bağlı proliferasyon. Veriler ortalama count per minute (cpm) ± standart hata (SE) olarak, stimülasyon indeksleri ise sütun içinde gösterilmiştir.

* Normal PBL ile karşılaştırılınca fark anlamlı (p<0.05).

PSC ile karşılaştırılınca fark anlamlı (p<0.05).

NHL'lı hastalarda lenfomanın tedavisi için IL-2 verilmesi veya aktive edilen otolog hücrelerin adoptif transferi uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Thomas ED, Storb R, Clift RA, *et al.* Bone marrow transplantation (First of two parts). *N Engl J Med* 1975; 282:832-43.
2. Anderson KC, Dzik WH. Transfusion medicine in hematopoietic stem cell and solid organ transplantation. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, eds. *Hematology, Basic Principles and Practice*. 2nd ed. Churchill Livingstone, USA 1995;2074-87.
3. Thomas ED, Storb R, Clift RA, *et al.* Bone marrow transplantation (Second of two parts). *N Engl J Med* 1975; 282:895-902.
4. Talmadge JE. The combination of stem cell transplantation and immunotherapy: Future potential. *In Vivo* 1994; 8(5):675-90.
5. Goldman JR, Carovsky D, Galton DAG. Reversal of blast cell crisis in CGL by transfusion of stored autologous buffy-coat cells. *Lancet* 1978;1:437.
6. Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, *et al.* Autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation restores hematopoietic function following marrow ablative therapy. *Blood* 1988; 71:723.
7. Lasky LC. Hematopoietic reconstitution using progenitors recovered from blood. *Transfusion* 1989; 29:552.
8. Kessinger A, Armitage JO. The use of peripheral stem cell support of high-dose chemotherapy. *Important Adv Oncol* 1993;167-75.
9. Bierman PJ, Bagin RG, Jagannath S, *et al.* High dose chemotherapy followed by autologous hematopoietic rescue in Hodgkin's disease: Long-term follow-up in 128 patients. *Ann Oncol* 1993; 4(9):767-73.
10. Vose JM, Bierman PJ, Anderson JR, *et al.* Progressive disease after high-dose therapy and autologous transplantation for lymphoid malignancy: Clinical course and patient follow-up. *Blood* 1992; 80(8):2142-8.
11. Joshi SS, Kessinger A, Mann SL, *et al.* Detection of malignant cells in histologically normal bone marrow using culture techniques. *Bone Marrow Transplant* 1987; 1(3):303-10.
12. Langenmayer I, Weaver C, Buckner CD, *et al.* Engraftment of patients with lymphoid malignancies transplanted with autologous bone marrow, peripheral blood stem cells or both. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15:241-6.
13. Greppo PR, Ahmann G, Katzman JA, *et al.* Peripheral blood as a source of stem cells in myeloma, abstracted. *Blood* 1988(suppl);72:243a.
14. Gibson FM, Malkovska V, Myint AA, *et al.* Mechanism of suppression of normal hematopoietic activity by lymphokine-activated killer cells and their products. *Exp Hematol* 1991; 19:659-73.
15. Lum LG. The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood* 1987; 69:369-80.
16. Lum LG, Ueda M. Immunodeficiency and the role of suppressor cells after human bone marrow transplantation. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 63:103-9.
17. Talmadge JE, Reed EC, Kessinger A, *et al.* Immunologic attributes of cytokine mobilized peripheral blood stem cells and recovery following transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17:101-9.
18. Smith KA. Interleukin-2: Inception, impact, and implications. *Science* 1988; 240:1169-76.
19. Kessinger A, Vose JM, Bierman PJ, Bishop M, Armitage JO. Peripheral stem cell transplantation in non-Hodgkin's lymphoma patients. *J Hematother* 1993; 2(3):361-2.
20. El-Haddad SI, El-Ashmawy S, Hassan W, *et al.* Immune deficiency in Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma. *Biomedicine* 1980; 32:128-33.
21. Vose JM, Anderson JR, Kessinger A, *et al.* High-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem-cell transplantation for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1993; 11(10):1846-51.
22. Gratwohl A, Hermans J, Baldomero H. Hematopoietic precursor cell transplantation in Europa: Activity in 1994. Report from the European group for blood and marrow transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant* 1996; 17:137-48.
23. Kessinger A. Utilization of peripheral blood stem cells in autotransplantation. *Hematol Oncol Clin North Am* 1993; 7(3):535-45.
24. Goldman JM. Peripheral blood stem cells for allografting. *Blood* 1995; 85: 1413-6.
25. Korbling M, Juttner C, Henon P, Kessinger A. Autologous blood stem cell versus bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1992; 10 (Suppl 1): 144-8.
26. Cervantes F, Shu XO, McGlave PB, *et al.* Autologous bone marrow transplantation for non-transformed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16:387-92.
27. Brada M, Mizutani S, Molgaard H, *et al.* Circulating lymphoma cells in patients with B & T non-Hodgkin's lymphoma detected by immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement. *Br J Cancer* 1987; 56:147-52.
28. Bell AJ, Figs A, Oscier DG, Hamblin TJ. Peripheral blood stem cell autografts in the treatment of lymphoid malignancies: initial experience in three patients. *Br J Haematol* 1987; 66: 63-8.
29. Gribben JG, Freedman AS, Neuberg D, *et al.* Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 1525-33.

Yazışma adresi : Yard.Doç.Dr.İ.Halil ÖZEROL
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD
44100 MALATYA
Email: ibrahim.halil@ihlas.net.tr