

# MALIGN MELANOMA TIL KÜLTÜRLERİNDE IFN-alfa'NIN SİTOTOKSİSİTE'YE ETKİSİ

Sühendan Ekmekçioğlu, Tamer Yağcı, Sıdıka Kurul, Emel Demiralp,  
Nurcan Ertürk, Hakan Ağır, Mahmut N. Çarın

*İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü*

## ÖZET

*Bağışık savunma mekanizmalarının uyarılmasına dayanan biyolojik tedavi yaygın bir tedavi yaklaşımı olarak kullanılmakta ve başta malign melanom ve böbrek kanseri olmak üzere bazı kanserlerde tümör regresyonunu sağlamaktadır. Bu tedavi tek başına interleukin-2 (IL-2) uygulanmasının dışında, IL-2+Lenfokinle Aktiflenmiş Katil (LAK) hücreler ve IL-2+ Tümör İstilacı Lenfositleri (TIL)'i de içerir. Majör Histokompatibilite Kompleksi'ne (MHC) bağımlı bir sitotoksosite gösteren TIL'ler LAK hücrelerinden 50-100 kez daha etkilidir.*

*Bu çalışmada, malign melanom kökenli 10 TIL hücre popülasyonunun çoğalması, yaşam süreleri, hücre yüzey özellikleri ve sitotoksik aktiviteleri incelendi. Hücreler %96.57±2.72 CD3+ ve %88.19±11.64 CD8- idi. Az sayıda CD4+ hücrelere de rastlandı (%7.27±7.46). Bütün olgularda CD25 ekspresyonu (IL-2 reseptörü - alfa zinciri) düşük olarak bulundu. Interferon alfa (IFN-alfa) ile işlemden geçirilen ve geçirilmeyen ologojik tümör hücrelerine karşı TIL sitotoksiteleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanamadı.*

**Anahtar Kelimeler:** Malign Melanom, TIL, IL-2, IFN-alfa.

## GİRİŞ

Son yıllarda biyolojik tedavi, bazı kanserli olgularda tümörün regresyonunu sağlayan bir tedavi yöntemi olarak yaygınlaşmıştır. Biyolojik tedavi bir kavram olarak, konvansiyonel tedavi yöntemleri olan RT, KT ve Cerrahi'den ayrılır. Burada tümörü direkt hedefleme değil, konağın savunma mekanizmaları uyarılarak kanser regresyonu sağlanmaktadır. Başlıca savunma mekanizması ise bağışıklık sistemidir.

Rekombinant sitokinler ve immün kompetan hücrelerin birlikte kullanılması ile ilk olarak, IL-2 nin klinik çalışmaları başlatılmıştır. Daha

## SUMMARY

*The biotherapy, based on the activation of immun defense mechanisms, is widely used as a therapeutic modality which can regress tumors in some cancers, mainly in malignant melanomas and renal cell carcinomas. The therapy includes the administration of Interleukin-2(IL-2) alone, IL-2 + Lymphokine Activated Killer (LAK) cells and IL-2 + Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL). TIL (s) showing a Major Histocompatibility Complex (MHC) dependent cytotoxicity are 50-100 times more efficacious than LAK cells.*

*In this study, the proliferation, lifetime, cell-surface characteristics and cytotoxic activity of ten malignant melanoma derived TIL(s) were investigated. Cells were 96.57±2.72 %CD3 (+) and 88.19±11.64 %CD8(+). A small population of CD4(+) cells was also observed (7.27±7.46). In all cases, the expression of CD25 (IL-2 receptor- alpha chain) was low. There was no statistically significant difference between TIL cytotoxicity against IFN-alpha treated and non-treated autologous tumor cells.*

**Key Words:** Malignant melanoma, TIL, IL-2, IFN-alpha.

sonra IL-2 ile inkübe edilen lenfositlerin taze tümör hücrelerini in-vitro öldürebildikleri saptanmış ve Lenfokinle Aktiflenmiş Katil (LAK) hücre kavramı geliştirilmiştir. LAK hücrelerinin geliştirilmesinde, tüm mononükleer hücreler IL-2 ile aktiflenirken, Tümör İstilacı Lenfosit (TIL)'lerin in-vitro çoğaltılmasında sadece T lenfositleri ön plana çıkar<sup>(1)</sup>. LAK hücre sitotoksitesinin aksine, TIL'lerin daha özgün bir etkinlik gösterdikleri ve LAK hücrelerine göre 50-100 kez daha etkin oldukları saptanmıştır<sup>(2)</sup>. TIL'le ilgili ilk klinik çalışmalar A.B.D.'nde Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI)'nde

Dr. Rosenberg ve ark. ları tarafından başlatılmıştır. Malign melanom'lu bu ilk olgularda TIL ve IL-2'nin birlikte infüzyonu yapılırken, daha sonraları IL-2'ye IL-4'ün eklenmesi ve en sonunda da TIL'lere gen transferi yapmak şeklinde klinik gelişmeler yaşanmıştır<sup>(3,4)</sup>.

Hücrel Adöptif İmmünoterapi olarak adlandırılan bu tedavi biçiminde en başarılı sonuçlar, immünojenik tümörler olarak bilinen Malign Melanom ve Böbrek kanserlerinde elde edilebilmiştir<sup>(5,6,7)</sup>.

Çalışmamızda kanser tedavisinde kullanılan bir sitokin olan IFN-alfa'nın, bu anti-kanser özelliğinin yanında efektör hücreler tarafından kanser hücresinin tanınmasını kolaylaştıran bazı genlerin ekspresyonunu indüklemesi etkisinden faydalandık<sup>(8)</sup>. Bu amaçla melanoma olgularında otolog tümör hedeflerinin IFN-alfa ile işlemiden geçirilmesinin TIL sitotoksitesine etkisini araştırdık.

#### GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalar İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Cerrahi Ünitesi ve İst. Tıp Fakültesi, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi A.B.D.'na başvuran Malign Melanom'lu olgulardan seçilmiştir. Toplam 10 melanom olgusu çalışmaya dahil edilmiştir.

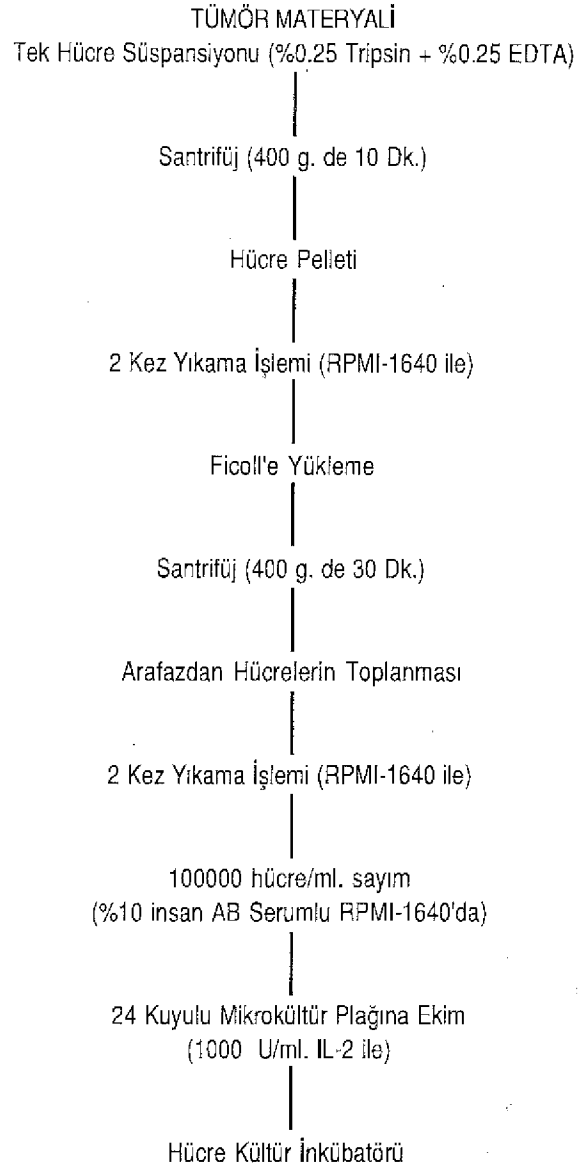
Cerrahi olarak çıkarılan tümör dokusu laboratuvar ortamına steril koşullarda taşınmış ve tümörden tek hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu aşamada ikiye ayrılan tümör hücre süspansiyonlarından biri tümörü istila eden lenfositlerin (TIL) geliştirilmesi için 1000 U IL-2 varlığında kültür şartlarına alınmıştır. Kültüre alınmayan diğer hücreler ise sitotoksitesite deneylerinde hedef tümör hücresi olarak kullanılmak üzere dondurulmuştur (Şekil 1).

TIL'ler kültürde çoğalmaya başladıktan sonra fenotipik analizleri yapılmak üzere anti-CD3 (olgun T hücre marker'ı); CD8 (sitotoksik T hücre marker'ı) ve CD25 (IL-2 reseptör marker'ı) monoklonal antikorları ile FACScan de incelenmiştir.

Sitotoksitesite deneyleri için efektör hücre olarak, kültürde geliştirilen TIL hücre süspansiyonları, hedef hücre olarak ise daha önceden dondurulan otolog tümör hücreleri

kullanılmıştır. Hedef hücrelerin yarısı kontrol olarak 24 saat öncesinden 1000U/mL IFN-alfa2a (Roferon A;Roche) ile indüklenmiştir. Sitotoksitesinin değerlendirilmesi "4 saatlik Cr 51 Salınım Testi" ile yapılmıştır. Sitotoksik aktivite % Lizis olarak bulunmuştur<sup>(9)</sup>. İstatistiksel değerlendirmeler, student-t testi ile yapılmıştır.

Şekil 1: Hücrelerin Kültüre Alınması



#### BULGULAR

Değerlendirmeye alınan toplam 10 Malign Melanom olgusunun 4'ü kadın 6'sı erkek idi.

Hastaların yaş ortalaması  $50.3 \pm 10.9$  idi (Tablo I).

**Tablo I:** Hastaların Genel Özellikleri

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Lezyon Bölgesi
1	39	Kadın	Met.M.M.	Diz arkası
2	40	Kadın	Pri.M.M.	Sağ üst Bacak
3	58	Kadın	Pri.M.M.	Karın altı
4	70	Erkek	Met.M.M.	Kafa Derisi
5	49	Kadın	Met.M.M.	Sol baş parmak tırnak altı
6	50	Erkek	Met.M.M.	Sol Üst Bacak
7	41	Erkek	M.M.	-
8	58	Erkek	M.M.	Rektum
9	38	Erkek	M.M.	Sol Skapula
10	60	Erkek	M.M.	Anal Bölge
Ortalama Yaş: 50.3				Standart Sapma : 10.9

1000 U/mL **IL-2** varlığında kültüre alınan tek hücre süspansiyonlarının erken takibinde ilk TİL klonlarının, kültürün 2. haftası içinde görüldüğü saptandı. Bütün olgular açısından değerlendirildiğinde ilk TİL görülme zamanının  $12 \pm 3.2$  gün olduğu bulundu. Sürekli pasajları yapılarak kültürde bırakılan TİL'lerin toplam yaşam süreleri ortalama  $78.5 \pm 15.28$  gün bulundu (Tablo II).

**Tablo II:** Kültürde TİL Gelişimi ve SITOtoksisitesi

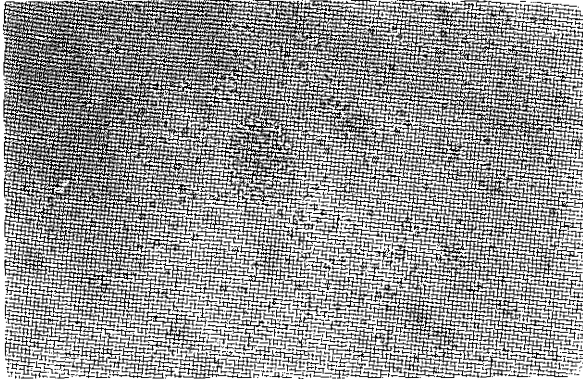
Hasta No	Kültürde TİL		% Lizis	
	İlk Görülme Zamanı	Total Yaşam Süresi	IFN-alfa 2a ile	IFN-alfa 2a 'sız
1	11.Gün	90 Gün	14.65	13.61
2	14.Gün	45 Gün	17.42	10.81
3	12.Gün	65 Gün	16.32	8.91
4	20.Gün	90 Gün	13.34	12.86
5	14.Gün	90 Gün	18.62	16.53
6	9.Gün	80 Gün	24.66	16.85
7	10.Gün	85 Gün	10.77	9.56
8	11.Gün	90 Gün	27.51	16.81
9	11.Gün	85 Gün	13.84	12.12
10	10.Gün	65 Gün	29.97	23.85
Ortalama	12	78.5	18.71	14.19
Standart Sapma	3.2	15.28	6.49	4.47

**Tablo III:** TİL Fenotipinin Özellikleri

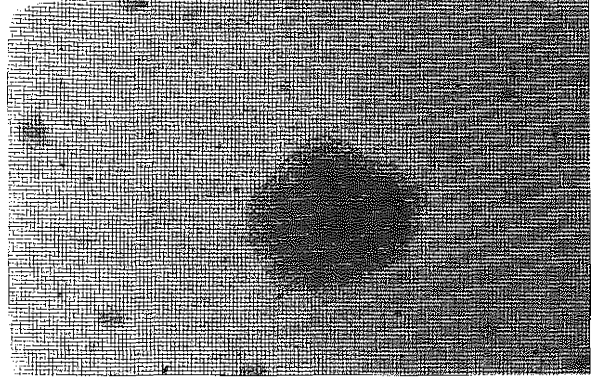
Hasta No	%CD3	%CD4	%CD8	%CD25
1	99.68	1.63	99.16	4.33
2	96.18	2.04	98.13	4.58
3	97.13	2.26	98.21	4.89
4	95.16	4.37	92.76	6.17
5	97.64	4.03	79.89	12.33
6	97.9	4.37	95.91	9.36
7	92.17	20.13	70.65	13.51
8	100.32	9.13	77.7	7.13
9	92.34	21.53	72.29	12.26
10	97.16	3.18	97.17	5.8
Ortalama	96.57	7.27	88.19	7.94
Standart Sapma	2.72	7.46	11.64	3.67

Hücre fenotipinin incelenmesi, kültürde TİL'lerin baskın bir yoğunluğa erişmesinden sonra gerçekleşti. Bu sürece genellikle ilk TİL klonlarının görülmesinden sonraki 3. hafta sonunda ulaşıldı (Şekil 2-6). Anti-CD3 ile yapılan incelemede, olguların tümünde, olgun T hücre hakimiyeti gözlemlendi. Malign Melanom olgularında CD3 pozitifliği  $\%96.57 \pm 2.72$  idi (Tablo III). Sitotoksik T hücre özelliğinde olan TİL'lerin, bu özelliğe uygun olarak, CD8 oranı da yüksek bulundu.  $\%88.19 \pm 11.64$  CD8 (+) olan TİL popülasyonunun çok düşük oranda ( $\%7.27 \pm 7.46$ ) CD4(+) hücre topluluğunu içerdiği de gözlemlendi. Ancak CD8 T hücre popülasyonu tüm olgularda, CD4 hücre popülasyonundan baskındı ve bu fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulundu ( $p > 0.001$ ). **IL-2** reseptörü-alfa zinciri ekspresyonu (CD25) zayıf olarak bulundu ( $\%7.94 \pm 3.67$ ). CD25 oranındaki bu düşüklüğün, kültür ortamında yoğun olarak bulunan **IL-2** molekülünün reseptörü ile birleşerek, kompleksin hücre içine alınmasına bağlı olduğu düşünüldü.

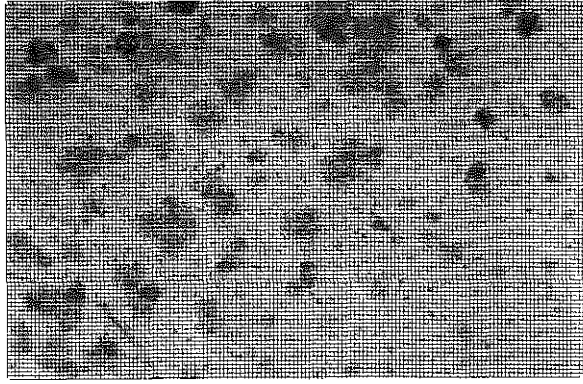
4 saatlik Cr 51 salınım testi sonucunda, IFN-alfa2a ile muamele edilen hücrelerin ortalama  $\%18.71 \pm 6.49$ 'luk lizise yol açtığı görüldü. Buna karşın sitokine tabi tutulmayan hücrelerde bu oran  $\%14.19 \pm 4.47$  idi (Tablo III) (Şekil 7). İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ( $p > 0.05$ ).



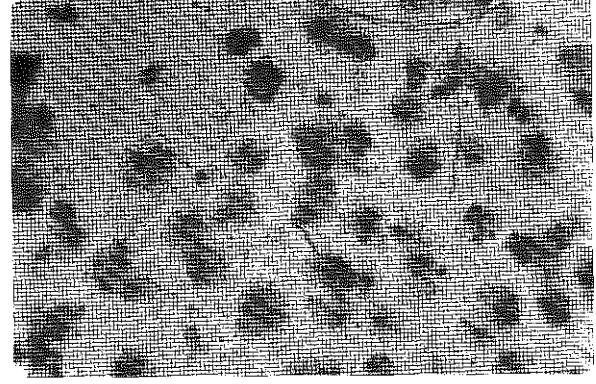
Şekil 2: Kültürde TIL'lerin ilk gözlendiği gün (5. olgu, 14. gün) (x200)



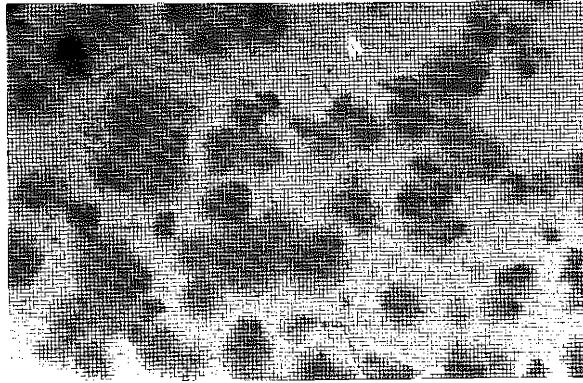
Şekil 3: 10. günde bir TIL klonu (3. olgu)(X100)



Şekil 4: 2. hafta sonunda kültürde TIL klonları (3. olgu)(X100)

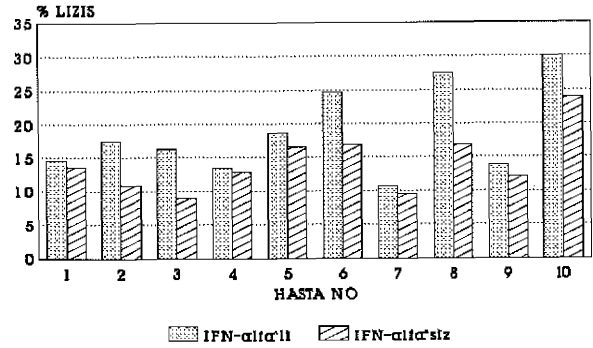


Şekil 5: 30. günde kültürde TIL klonları (3. olgu)(X100)



Şekil 6: 70. günde kültürde TIL klonları (3. olgu)(X100)

## TIL SITOTOKSİSİTESİ IFN-alfa'nın Etkisi



Şekil 7: IFN-alfa uygulanan ve uygulanmayan grupların %Lizis Diagramı

**SONUÇ**

Sonuç olarak malign melanomlu pekçok olguda yapılan kültür çalışmalarında TIL fenotipi belirgin bir şekilde CD3 ve CD8(+) bildirilmiştir<sup>(10,11)</sup>. Bizim çalışmamızda da bu bulgulara benzer olarak CD3 ve CD8(+) hücre popülasyonu baskın bulunmuş ve tek başına, yüksek düzeyde IL-2 kullanımının bir sonucu olarak CD25 ekspresyonu düşük bulunmuştur<sup>(12)</sup>. Çalışmamızda Malign Melanomlu olguların taze tümör materyalinden elde edilen TIL'lerin kültürde çoğaltılması, yaşam süreleri, hücre yüzey özellikleri ve sitotoksik aktiviteleri saptanmış ve IFN-alfa ile inkübasyonun TIL sitotoksitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği bulunmuştur.

*Sühendan Ekmekçioğlu,  
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü  
34390 Çapa - İstanbul*

**KAYNAKLAR**

1. Rosenberg S.A.: The Immunotherapy and Gene Therapy of Cancer, J. Clin. Oncol. 10, 180-199, (1992)
2. Chapman P.B., Kolitz J.F., Hakes T.B., Gabrilove J.L., Welte K., Merluzzi V.J., Engert A., Bradley E.C., Konrad M., Kertelsmann R.: A Phase I Trial of Intraperitoneal Recombinant Interleukin-2 (IL-2) in Patients with Ovarian Cancer, Invest. New Drugs 6, 179-188, (1988)
3. Kawakami., Rosenberg S.a., Lotze M.T.: Interleukin-4 Promotes the Growth of Tumor Infiltrating Lymphocytes Cytotoxic for Human Autologous Melanoma, J. Exp. Med. 168, 2183-2191, (1988)
4. Rosenberg S.a., Aebbersold P., Cormetta K., Kasid A., Morgan R.a., Moen R., Karson E.M., Lotze M.T., Yang J.C., Topalian S.L.: Gene Transfer into Humans: Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma Using Tumor Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction, N.Engl. J.Med. 323,570-578,(1990)
5. Rosenberg S.A., Lotze M.T., Muul L.M., Chang A.E., Avis F.P., Leitman S., Linehan W.M., Robertson C.N., Lee R.F., Rubin J.T.: A Progress Report on the Treatment of 157 Patients with Advanced Cancer Using Lymphokine Activated Killer Cells and Interleukin-2 or High-Dose Interleukin-2 Alone, N.Engl. J. Med. 316, 889-897, (1987)
6. Rosenberg S.a., Lotze M.T., Muul L.M., Leitman S., Chang A.E., Ettinghausen S.e., Matory Y.L., Skibber J.M., Shiloni E., Vetto J.T.: Observations on the Systemic Administration of Autologous Lymphokine-Activated Killer Cells and Recombinant Interleukin-2 to Patients with Metastatic cancer, N. engl. J. Med. 313, 1485-1492, (1985)
7. Rosenberg S.a., Lotze M.T., Yang J.C., Aebbersold P.M., Linehan W.M., Seipp G.a., White D.E.: Experience with the Use of High-Dose interleukin-2 in the Treatment of 652 Cancer Patients, Ann. Surg. 210(4), 474-485, (1989)
8. Friedman R.L., Manly S.P., McMahon M.: Transcriptional and Post-transcriptional Regulation of Interferon-Induced Gene Expression in Human Cells, Cell 38-745-755, (1984)
9. Pross F., Maroun J.A.: The Standardization of NK Cell Assays for Use in Studies of Biological Response Modifiers, J.Immunol. Meth. 68, 235-242, (1984)
10. Ghosh A., Moore M.: Tumor Infiltrating Lymphocytes in Cervical Carcinoma, Eur. J.Cancer 28A(11), 1910-1916, (1992)
11. Itoh K., Platsoucas C.D., Balch C.M.: Autologous Tumor-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in the Infiltrate of Human Metastatic Melanomas. "Activation by Interleukin-2 and Autologous Tumor Cells, and Involvement of the T Cell Receptor", J. Exp. Med. 168, 1419-1441, (1988)
12. Becker J.C., Schwinn A., Dummer R., Burg G., Brocker E.B.: Tumour-Infiltrating Lymphocytes in Primary Melanoma: Functional Consequences of Differential IL-2 Receptor Expression, Clin. Exp. Immunol. 91(1), 121-125,(1993)