

59486

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

HEMATOLOJİ-ONKOLOJİ BİLİM DALI

AKUT MYELOBLASTİK LÖSEMİ BLAST KÜLTÜRÜNDE
İTERLÖKİN-1'İN İTERLÖKİN-1 β NÖTRALİZAN
ANTİKÖR VE İTERLÖKİN-1 RESEPTÖR ANTAGONİSTİ
ARACILIĞI İLE İNHİBİSYONUNUN BLAST
PROLİFERASYONU ÜZERİNE İNHİBİTÖR ETKİSİ;
İTERLÖKİN-1'İN AKUT MYELOBLASTİK LÖSEMİ'DE
OTOKRİN BÜYÜME FAKTÖRÜ OLARAK ÖNEMİ

Dr. G. Hayri ÖZSAN
HEMATOLOJİ UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Cavit ÇEHRELİ

İZMİR, 1997

Hematoloji uzmanlık eğitimim sırasında başta Dr. Cavit Çehreli, Dr. Bülent Ündar ve Dr. Mehmet Alakavuklar olmak üzere deneyim ve bilgilerinden yararlandığım tüm öğretim üyelerine, dostluk ve yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma, tezimin materyal ve metodunda bana destek olan biyolog Halil Ateş ve Faize Yüksel'e, kimyager Cahide Deveci'ye teşekkür ederim.

3



ÖZET

İnterlökin-1 (IL-1)'in otokrin büyüme faktörü olarak akut myeloblastik lösemi (AML) blastlarının üremesi üzerine etkilerini araştırmak amacıyla 9 AML'li hastadan alınan kemik iliği (KI) blastları, adaran hücreler ve T-Lenfositlerden arındırılarak birincisinde 15ng/ml granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) içeren standart vasat (SV), ikincisinde SV+500ng/ml IL-1 reseptör antagonisti (IL-1 Ra), üçüncüsünde SV+ 200ng/ml IL-1 β nötralizan antikor (IL-1 β NA), dördüncüsünde SV+ 500ng/ml IL-1RA+200ng/mlIL-1 β NA bulunan ortamlara ekildi. Kontrol grubundaki koloni sayısı %100 olarak kabul edilerek diğer vasatlardaki koloni sayılarının buna oranları hesaplandı. IL-1RA içeren vasatta elde edilen koloni sayılarının oranlarının ortalaması %63.7 $\pm$ 21.5 ($p<0.01$), IL-1 β NA'lu vasatlarda %69.5 $\pm$ 19 ($p<0.01$), her ikisinin de olduğu vasatlarda %53.4 $\pm$ 23.7 ($p<0.01$) olarak bulundu. IL-1RA+IL-1 β NA'nın tek başına IL-1 β NA'a göre daha belirgin koloni inhibisyonu yaptığı gözlemlendi ($p<0.01$). IL-1 inhibisyonu ile oluşan AML blast proliferasyonunda inhibisyon FAB alt grupları ile ilişkili bulunmadı ve inhibisyon oranında bireysel farklılıklar gözlemlendi. Sonuç: Gerek IL-1 β NA, gerek IL-1RA gerekse de ikisinin bir arada kültür ortamına ilavesi, koloni sayılarında değişen oranlarda düşmelere neden olmaktadır. Otokrin IL-1 β salınımı AML'de otonom blast proliferasyonunu sağlayan faktörlerden biridir. Tüm kültür ortamlarında egzogen GM-CSF bulunması nedeniyle IL-1 inhibisyonunun AML blast proliferasyonunda inhibitör etkisi, otokrin GM-CSF salgısında baskılanmadan kaynaklanmamaktadır. AML'de, efektif bir IL-1 inhibitörü olan ve insanlarda önemli bir yan etki potansiyeli gözlenmeyen IL-1RA ve yine hayvan modellerinde herhangi bir yan etki potansiyeli göstermeyen, IL-1 β 'yı aktif forma dönüştüren IL-1 β konverting enzim (ICE) inhibitörleri yakın bir zamanda yeni tedavi modaliteleri olarak gündeme gelebilecektir. Bu tedavi yöntemlerinin, daha önceden blastik hücrelerinin IL-1 inhibisyonuna belirgin duyarlılığı saptanmış AML'li hastalarda kullanılması uygun bir yaklaşım olacaktır.

GİRİŞ

AML, myeloid öncü hücrelerin anormal proliferasyonu ve matürasyon duraklaması ile karakterize klonal, hematolojik bir hastalıktır(1). AML blastları diğer myeloid prekürsörlere benzer şekilde kemik iliği stroması ve aksesuar hücrelerden salgılanan büyüme faktörlerine (BF) gereksinim duymakla birlikte, bazı AML blastları ek BF gereksinimi olmaksızın otonom büyüme özelliğine sahiptir. AML blastlarının GM-CSF, IL-1 gibi BF'ni salgıladığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir(2,3). İn vitro çalışmalarda IL-1'in gerek parakrin, gerekse de otokrin yolla AML blast hücrelerinin büyümesini stimüle ettiği(4,5) ve IL-1 etkisini antagonize eden IL-1RA ve solubl IL-1 reseptörünün(sIL-1R), kültür ortamında AML lösemik blastlarının proliferasyonunu önlediği gösterilmiştir(6).

IL-1, prototipik multifonksiyonel sitokinlerden biri olup, koloni stimüle edici faktörlerden farklı olarak hemen hemen tüm hücre tiplerine etki edebilir ve sıklıkla diğer sitokin ve mediatör moleküllerle birlikte çalışır. IL-1 ailesi, agonist olan IL-1 α , IL-1 β ve antagonist olan IL-1 RA olmak üzere 3 üyeden oluşur. IL-1 α ve β prekürsör halinde salınır(7). IL-1 α prekürsörü biyolojik aktiviteye sahip iken, IL-1 β prekürsörü ancak IL-1 β konverting enzim(ICE) aracılığı ile aktif formuna dönüştükten sonra biyolojik aktivite kazanır(8,9).

Çalışmamızda GM-CSF içeren kültür ortamında, IL-1 β NA, IL-1RA ve ikisinin birarada AML blast proliferasyonuna etkisi araştırıldı.

GENEL BİLGİ

AML VE BİYOLOJİSİ

AML, klinik olarak benzerlik gösteren ancak farklı morfolojik ve sitogenetik özelliklere sahip kemik iliği kökenli neoplazmaların bir grubunu oluşturur. Hemen hemen her yaş grubunda görülebilmekle birlikte daha çok erişkin yaşlarda görülür. Tüm yaş gruplarında benzer klinik özellikler göstermekte olup, semptomlar, blastik hücrelerin kemik iliği hücrelerinin yerini alması sonucu bozulmuş hematopoiezis ve buna bağlı gelişen sitopenilere dayanır. AML blastlarının çoğu myeloid veya monositik diferansiasyon gösterir. Hastaların yaklaşık %5-10'u ise eritroid ya da megakaryositik diferansiasyon gösterir. Yüzey marker incelemeleri AML'nin stem cell'den daha matür formlara kadar uzanan heterojeniteye sahip olduğunu göstermektedir(10). Sitogenetik analiz sonuçları ve bakan AML'li hastalarda blastlarda G6PD izoenzim tipinin homojen olması, hastalığın tek bir klondan kaynaklandığını düşündürmektedir (11). Patogenez kesin aydınlanmamış olmakla birlikte hastaların yaklaşık %50-70'inde kromozomal anomaliler mevcuttur. Diğer bir yandan hastaların bir kısmında toksik maddelere ve radyasyona maruz kalma veya altta yatan genetik sendromlar söz konusudur. Ve yine kesin kanıtlanmamış olmakla birlikte bazı protoonkogenlerle ilişki tanımlanmıştır (10)

Günümüzde AML tedavisinde en geçerli yol kombine kemoterapi (KT) rejimlerinin kullanımıdır. Randomize çalışmalarda standart indüksiyon KT (Daunorubisin, Ara-C, Tioguanin) ile AML'de tam remisyon oranları %50-80 arasında bildirilmektedir. Bu hastalarda median remisyon 8-12 ay, median yaşam süresi 9-16 aydır (12). Genç hastalarda konsolidasyon amaçlı postremisyon yüksek doz Ara-C kullanımı yaşam süresi ve remisyon devamlılığı açısından önemli bir avantaj sağlamıştır (13). Allojeneik

hematopoietik stem cell transplantı ilk remisyonunda uygulandığı taktirde %50-60 oranında 5 yıllık hastalıksız yaşam elde edilebilmektedir(14).

French-American-British (FAB) klasifikasyonu, AML'yi morfolojik ve sitokimyasal kriterlere göre 8 alt grupta (M0-M7) toplar. İmmunofenotipleme ise FAB gruplarına göre, andifferansiye lösemi (M0), eritrolösemi (M6) ve megakaryoblastik (M7) lösemilerin tanısında yardımcı bir yöntem olarak yer almaktadır (15). Bu sınıflama her ne kadar klinik özellikleri ve sitogenetik özellikleri hesaba katmasa da yaygın kullanım alanı bulmuştur. FAB subtipleri prognostik kriter olarak önemli bir değere sahip olmayıp lösemik hücrenin biyolojisi için yeterli bilgi vermemektedir (11).

AML'li hastalarda tedavideki gelişmeler, artan bir oranda hastalığın kürünü sağlamakla birlikte halen hastaların önemli bir kısmı hastalıklarından ölmektedir. Hastalığının biyolojik davranışının bilinmesi hastalığın seyrine yaklaşımları etkilemiş ve promyelositik lösemide (FAB M3) all-trans retinoic acid (ATRA) tedavisi gibi spesifik tedavi modalitelerini kullanıma sokmuştur (16).

Gerçekten de lösemik hücrelerin bireysel davranış özellikleri tedaviye yanıt yönünden önemli bir belirleyicidir ve lösemi biyolojisinin aydınlatılması bu hastalığın tedavisinde yeni gelişmelerin ve ATRA örneğinde olduğu gibi yeni biyolojik tedavi modalitelerinin yer almasını sağlayacaktır.

AML'de Prognozu Etkileyen Biyolojik Özellikler:

AML'de tedaviye yanıt kişiden kişiye değişim göstermektedir. Özellikle ileri yaşlarda görülen AML'de tedaviye yanıt gençlere göre daha kötüdür. İleri yaşlarda gelişen AML daha çok pluripotent öncü hücrelerden kaynaklanırken genç yaşlarda görülen AML ise nispeten farklılaşmış (committed) belirli bir seriye ait öncü hücrelerden kaynaklanır. Pluripotent hücreden kaynaklanan AML'ler, yüksek kendini yenileme kapasitesi, aktif

ilaç atım pompası (multi drug resistance, MDR1) ve yüksek anti-apoptotik gen proteini içeriği (bcl-2, bcl-xL) gibi özellikleri nedeniyle konvansiyonel kemoterapi (KT) uygulamalarına direnç gösterirler (17).

Hastanın yaşı yanısıra tedaviye yanıtı etkileyen en önemli faktörlerden biri, spesifik sitogenetik anomalilerin varlığıdır. Monozomi 5 ya da 7, 5q delesyonu, 11q23 anomalileri ve multipl sitogenetik değişiklikler tedaviye kötü yanıtı gösterirken, t(15;17), t(8;21) ve inv16 yüksek tam remisyon oranı ve iyi prognoz ile yakından ilişkilidir (18). Bunun yanısıra CD34 ekspresyonu tüm çalışmalarda olmamakla birlikte çalışmaların çoğunda kötü klinik yanıt ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (11). MDR1 ekspresyonu sıklıkla kötü prognostik özelliği olan sitogenetik anomalilerle birlikte olup tedavide ana grupta kullanılan (örn.: antrasiklin) ilaçlara dirençten sorumludur(19). AML’de kötü prognostik faktörler Tablo 1’de özet olarak verilmiştir.

Tablo 1

	Kötü prognoz
Yaş	>2, <45
Sitogenetik	-5, -7, 5q-, 11q23
İmmunofenotip	CD34+'lığı, bifenotip
İlaç rezistansı	MDR1 ekspresyonu
Apoptoza direnç	p53 mutasyonu, yüksek bcl-2 ekspresyonu
İnvitro hücre kültürü	yüksek otonom büyüme kapasitesi

AML blastları, hematopoietik hücrelere benzer şekilde G-CSF, GM-CSF, IL-3 gibi büyüme faktörleri ile metilsellülozlu ortamda koloni oluşturma kapasitesine sahiptir. Bazı AML blastlarının normal hematopoietik hücrelere avantajları, ekzojen büyüme faktörlerine gereksinim duymaksızın otokrin BF aracılığı ile otonom proliferere olabilme yetenekleridir (20). AML blastlarının otonom büyüme özellikleri GM-CSF, IL-1 gibi salgıladıkları otokrin büyüme faktörleri aracılığı ile olmaktadır (2,3,21).

Normal KI'ne ait erken progenitör hematopoietik hücrelerde de (CD34+/CD38-) IL-1 β mRNA'sının exprese olması, bu özelliğin lösemi spesifik olmaktan çok AML blastlarının erken hematopoietik hücrelerden (primitive multilineage stem cells) kaynaklandığı görüşünü desteklemektedir (22). Bu nedenle AML blast hücrelerin “self renewal” otonom büyüme özellikleri kötü prognostik faktör olarak ortaya çıkmaktadır (20). Benzer şekilde AML blastlarında IL-1 β mRNA ekspresyonu kısa remisyon süresi ile ilişkili bulunmuştur(23).



IL-1

IL-1, 1970'li yılların başında ilk olarak makrofaj kökenli lenfosit aktive edici faktör olarak tanımlanmıştır . IL-1, primer olarak monosit ve makrofajlarca sentezlenmekle birlikte, birçok organda çeşitli hücreler tarafından sentezlenebilmektedir (24).

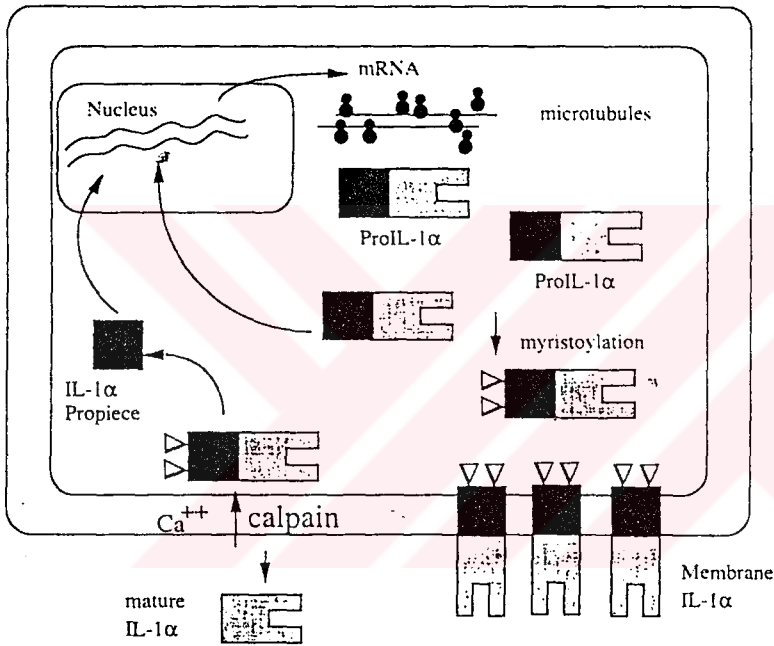
IL-1(α ve β) prototipik multifonksiyonel sitokinlerden biridir. Koloni sitümüle edici faktörlerden farklı olarak hemen hemen tüm hücre tiplerine etki edebilir ve sıklıkla diğer sitokin ve diğer mediatör moleküllerle birlikte çalışırlar. CSF'ler terapötik olarak kullanılabilirle birlikte IL-1 toksisitesi kabul edilebilir düzeylerde değildir. Buna karşın IL-1 etki ve üretimini engelleyen ajanlar klinik tıpta uygulama alanı bulabilir (7). IL-1 ailesinin 3 üyesi vardır: IL-1 α , IL-1 β ve IL-1 RA. IL-1 α ve β agonist iken, IL-1RA spesifik antagonist etki gösterir. IL-1 ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) anlamlı bir aminoasit homolojisi gösterir. IL-1 α ve β prekürsör halinde salınır. Her bir prekürsörün molekül ağırlığı 31 kD'dur ve spesifik proteazlar aracılığı ile 17 kD'luk matür formlara dönüşürler. Buna karşın IL-1RA solubl IL-1RA olarak hızla hücre dışına çıkabilir (7).

IL-1 α :

Monositlerde hücre içinde 31 kD ağırlığında proIL-1 α olarak bulunur ve IL-1 β 'nın tersine bu formu aktiftir (8,25). Hücre ölümünü takiben pro IL-1 α extrasellüler matrixte bulunan proteazlarla kesilerek 17 kD ağırlığında matür IL-1 α formuna dönüşebilir (26). IL-1 α hücre ölümü olmaksızın "calpain" adı verilen kalsiyuma bağımlı membranla ilişkili sistein proteazların aktivasyonu ile de matür forma dönüşebilir (27) (Şekil 1). IL-1 β "knock-out" farelerde yeterli IL-1 α sentezi olmasına karşın akut faz cevabının ve lokal inflamatuvar olaylarda ateş yanıtının olmaması ve yine farelerde anti-IL-1 β ile

kollagenin indüklediği artrit gelişmesi önlenirken anti-IL-1 α 'da bu etkinin görülmemesi, bu hastalık modellerinde IL-1 β 'nın daha ön planda olduğunu göstermektedir (28,29,30).

Şekil 1 Monositlerde IL-1 α üretimi

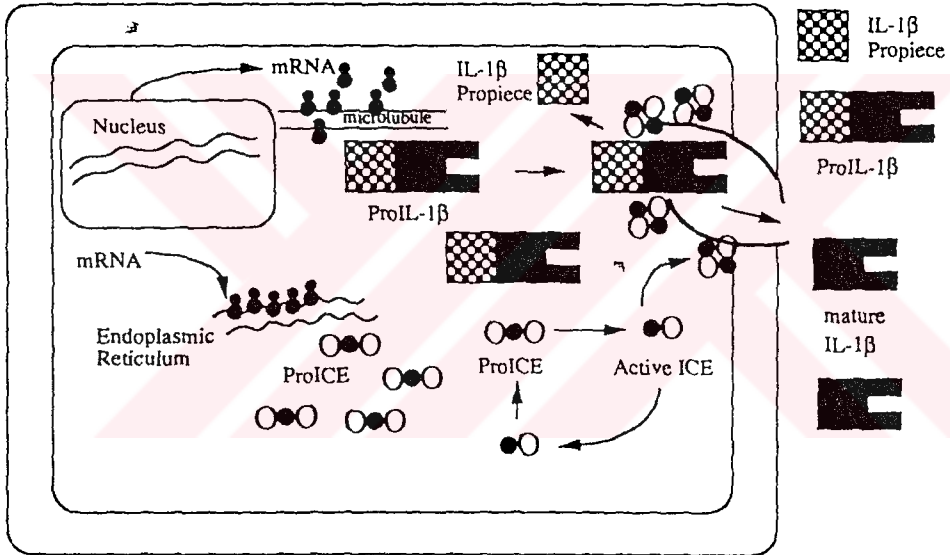


Mikrotübüllerde proIL-1 α 'yı kodlayan IL-1 α mRNA translasyonu olur. Myorilize IL-1 α hücre membranına transloke olur. Myorilize IL-1 α calpain aracılığı ile matür formuna dönüştürülebilir.

IL-1 β :

Hücre içinde pro IL-1 β olarak sentezlenir, kesilene ve hücreyi terk edinceye kadar prematür formda sitozolde yer alır. IL-1 α 'dan farklı olarak membran formu yoktur ve prematür formu sınırlı aktiviteye sahiptir (31). IL-1 β 'nın matür formunun salınımı ICE aracılığı ile aspartik asit-alanin(116-117) peptidinin kesilmesi sayesinde olur (32) (Şekil 2).

Şekil 2 Monositlerde IL-1 β üretimi



Sitozol ve mikrotübüllerde proIL-1 β 'yı kodlayan IL-1 β mRNA translasyonu olur. proIL-1 β ICE ile parçalanana kadar sitozolik kalır. Aktif ICE dominant olarak membranın iç yüzeyinde bulunur.

ICE:

ProIL-1 β 'nın aktif matür forma dönüşmesi için ICE'e ihtiyacı vardır (Şekil 2). IL-1 β 'nın kesilmesi aspartik asit-alanin(116-117) peptid pozisyonunda ICE olarak bilinen

intraseküller sistein proteazlarca olur (32). ICE, IL-1 α 'nın matür formuna dönüşümünde rol oynamaz. Elastaz ve granzyme A gibi enzimler de ProIL-1 β 'yı 112. ve 120. amino asitlerinden keserek biyolojik olarak aktif IL-1 β oluşumunu sağlayabilir (33,34). ICE "deficient" fareler letal endotoksemiye direnç gösterirler (35). ICE veya homologlarının apoptozu indüklediğinin saptanması ilginç bir gözlemdir (7). Bu inhibisyon, FAS aracılıklı apoptoz ile ilişki göstermektedir (36). Ancak bu bulguların tersine ICE inhibisyonunun AML hücre kültüründe apoptotik ölümü azaltmak ve dolayısıyla hücre surveyini uzatmak yerine hücre proliferasyonunu engellemesi (37,38), IL-1 β 'nın lösemik hücreler için bir büyüme faktörü olarak rol oynamasından kaynaklanabilir.

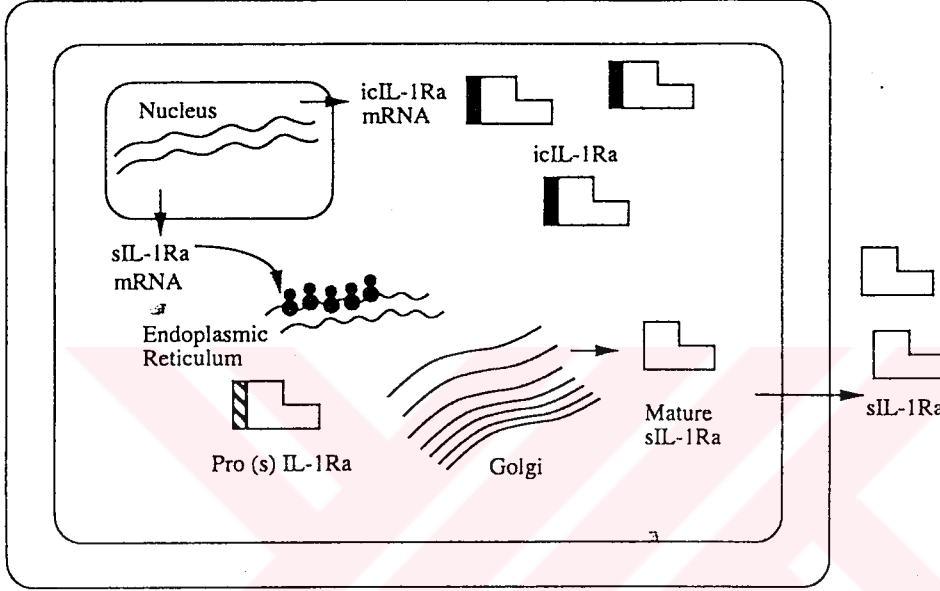
IL-1RA:

22-25kD ağırlığındaki IL-1RA, ilk olarak insan monosit kültür süpernatantlarında ve ateşli veya myelomonositik lösemili hastaların idrarında saptanmıştır (24). IL-1 aktivitesini inhibe eden IL-1RA, gerek sitokinler için gerekse de hormon benzeri moleküller için doğal olarak sentez edilen reseptör antagonistlerinden ilk tanımlananıdır (24). Zaman içindeki gelişmeler IL-1RA'nın rekombinant teknoloji ile üretimine kadar uzanmış ve insanlardaki bir çok hastalığın tedavisinde araştırma alanı bulmuştur (24).

İntrasitoplazmik ve solubl formları mevcuttur (24). Sekrete edilen IL-1RA 22kD ağırlığında glikolize bir proteindir (24,39) (Şekil 3). Primer aminoasit homolojisi IL-1 β ile IL-1RA arasında %26 olup, IL-1 β ile IL-1 α arasındaki homolojiden daha fazladır (7,24). IL-1RA'nın Tip I IL-1 reseptör (IL-1RI)'e bağlanması IL-1 β ve α 'ya benzemekle birlikte agonist etki göstermez. İnsanlarda IL-1 α ve β 'dan 1.000.000 (1-10mg/kg) kat daha fazla IL-1RA enjekte edildiğinde agonist aktivite görülmemiştir (40). Bu Faz I çalışmada hemen hemen hiç bir anlamlı yan etki gözlenmemiştir (40). Hayvan

modellerinde IL-1 'in sistemik inflamatuvar yanıtını önlemek amacı ile 100-1.000 kat fazla IL-1RA dozuna gereksinim olmuştur (41,42). IL-1RA ile yapılan Faz II çalışmada sepsisli hastalarda mortaliteyi düşürücü etkisinin gözlenmesi Faz III çalışmaların başlamasına yol açmıştır (24).

Şekil 3 Lipopolisakkaritlerle stimüle edilen monositlerde IL-1RA üretimi



Primer transkript proIL-1RA'dır. Endoplazmik retikulumda translasyonu takiben golgiye transportu olur. Kesilmeyi takiben sIL-1RA olarak hücreyi terketmeye hazır hale gelir.

IL-1 Reseptörleri:

Günümüze kadar iki IL-1 bağlayıcı protein (reseptörü) ve bir aksesuar protein (IL-1AcP) tanımlanmıştır. Her iki reseptörün extrasellüler domeyni ve IL-1AcP, Ig süper ailesinin üyeleridir (43,44). IL-1RI ve tip II IL-1 reseptörü (IL-1RII) geni insanlarda 2. kromozomun uzun kolunda yer alır (45). IL-1RI, 80kD'luk bir glikoprotein olup endotelial hücreler, düz kas hücreleri, epitelial hücreler, hepatositler, keratinositler, epidermal dentritik hücreler ve T lenfositlerde bulunur. IL-1RI büyük oranda glikolize

olup, glikolizasyonda azalma IL-1 bağlanmasını azaltır (46). IL-1RI sinyal iletimi yaparken IL-1RII, IL-1'in bağlanmasını sağlar ancak sinyal iletimi yapmaz. IL-1RII IL-1 β için bir tuzak görevi yapar ve "Decoy receptor" olarak adlandırılır (47). IL-1 IL-1RI'e bağlandığında oluşan kompleks IL-1R-AcP'e bağlanır (43). IL-1R ve IL-1RAcP'nin sitoplazmik domeininin heterodimerizasyonu IL-1 sinyal iletimini tetikler.

Solubl IL-1R:

IL-1RI ve II'nin solubl formu kanda ve çeşitli biyolojik sıvılarda bulunur. sIL-1RI'in IL-1 ligantlarına bağlanma affinitesi IL-1RA > IL-1 α > IL-1 β şeklinde iken IL-1RII için IL-1 β > IL-1 α > IL-1RA şeklindedir (7)

Extrasellüler ya da soluble IL-1RI ve II hastalık ve sağlık durumlarında IL-1 α , IL-1 β ve IL-1RA ile bağlanarak doğal tampon görevi yapar.(7)

IL-1 üretiminin azaltılması:

Kortikosteroidler, birçok sitokine etki ettikleri gibi spesifik olmayan bir şekilde IL-1 transkripsiyonunu bloke ederler. Diyetle omega-3 yağ asitlerinin suplementasyonunun periferik kan MNC'den IL-1, IL-6 ve tümör nekroz faktör (TNF) üretimini %50-60 oranında azalttığı gösterilmiştir (7,48). IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 ve "transforming growth factor" (TGF) IL-1, TNF α ve diğer sitokinlerin gen ekspresyonunu baskılayıcı etki gösterir (7). İnterferon α (IFN- α) da, IL-1'in indüklediği IL-1 sentezini suprese edici etkiye sahiptir (49).

IL-1 'in biyolojik etkileri Tablo 2'de, yüzey reseptörlerine etkisi Tablo 3'de, sinerjistik aktivitesi Tablo 4'te özetlenmiştir.

Tablo 2: IL-1'in Biyolojik etkileri:

Sistemik enjekte edilen IL-1'in etkileri	Ateş, artmış uyku, depresyon, anoreksi, hipotansiyon, taşikardi, laktik asidoz, artmış dolaşan nitrikoksit, hiperinsülinemi, hiper ve hipoglisemi, hipotalamik monoamin ve nöropeptid salınımı, nötrofili, KI sellülaritesinde artma, trombositoz, hepatik akut faz proteinleri sentezinde artma, hipotalamik-pitiüter-adrenal aksisin stimülasyonu, hipoferremi, artmış sodyum ekskresyonu, hiperlipidemi, hipoalbuminemi, artmış metastaz, artmış nonspesifik enfeksiyon rezistansı
Lokal enjekte edilen IL-1'in etkileri	Tavşanlarda:nötrofillerin diz eklemine infiltrasyonu, diz eklemine proteoglikanlarda artma. İntra vitreal injeksiyon ile üveit gelişimi, gözün ön kamerasında anjiogenez, serebral ventriküllerde hücre infiltrasyonu ve sitokin üretimi, intratrakeal uygulamada akciğere nötrofil ve albumin akımı
İmmünolojik yanıtta değişiklikler	Artmış antikor yapımı, artmış lenfokin sentezi, artmış IL-2 reseptörü, tip 2 insan T hücre klonunun gelişimi, protein antijenlere toleransın inhibisyonu, dalağın lipopolisakkaritlere hücre mitojenik yanıtının güçlenmesi
IL-1'in kültüre hücre ve dokulara etkisi	ELAM-1, ICAM-1, VCAM-1 ekspresyonunda artma, insülin üreten adacık hücrelerine sitotoksikite,Tirositlerde tiroglobulin sentezinin inhibisyonu, kemikten kalsiyum salınımı, araşidonik asit, prostanoit ve eikosanoid salınımında artma, intestinal hücrelerde artmış mukus üretimi, beyin sinaptozomlarında GABA reseptöründe artış, fibroblast, düz kas hücreleri ve mezenşial hücrelerin proliferasyonu, saç follikül hücrelerinin büyümesinin inhibisyonu, adrenalde artmış kortikosteron sentezi, artmış HIV-1 ekspresyonu

Tablo3: IL-1'in yüzey reseptörlerine etkisi

Artmış yüzey reseptörü yada reseptöre bağlanma	Azalmış yüzey reseptörü yada reseptöre bağlanma
Hepatositlere LDL bağlanması*	Mürin Th2 hücrelerinde IL-1RI
Hücre adezyon molekülleri*	Makrofaj hücre serilerine PGE2 bağlanması
Endotelial hücrelerde CD55 (DAF)	Endotelial hücrelerde CD59
IL-3, IL-5 ve GM-CSF beta subüniti*	Endotelial hücrelerde FGF
KI hücrelerinde c-kit*	Makrofajlarda FcγRIII ≠
Deksametazon için nükleer reseptör	PDGF α ve β reseptörleri*
Endotelial hücrelere IgG bağlanması	Granüloza hücrelerinde LH reseptörü
Fibroblastlarda kompleman C1q reseptörü	Periferik tip benzodiazepin reseptörü
Yüksek endotelial lenfosit reseptörü	TNF reseptörü (p55) * #
Fibroblastlarda transferrin reseptörü*	IL-6 solubl reseptör (p80)*
makrofajlarda interferon γ reseptörü*	Lenfositlerde CD4
Makrofaj ve lösemik hücrelerde Fc reseptörü	Endotelial hücrelerde laminin reseptörü*
Nötrofillerde kompleman C3b reseptörü	Paratiroid hormon reseptörü
Gama aminobutirik asit reseptörü**	Astrositlerde substans P reseptörü
Lösemik hücre serilerinde IL-2 ve IL-4 reseptörü	Epidermal büyüme faktörü reseptörü ξ
T hücrelerinde TGF beta reseptörü	
Tümör hücrelerinde HLA klas II***	
Beta2 adrenerjik reseptörler	
Kondrositlerde IGF reseptörü	
TNF reseptörü (p75)*	
Epidermal büyüme faktörü reseptörü	

*gen ekspresyonundaki değişiklik ile ilişkili

**Klorid kanallarını hızlandırır

***IFγ gama prodüksiyonuna bağlı

≠ Azalmış fagositoz ile ilişkili

Artmış reseptör salınımı ile ilişkili

ξ IL-1 aracılıklı fosforilasyona bağlı affinite de geçici azalma

Tablo 4: IL-1'in sinerjistik aktivitesi

IL-1 + Bradikinin	Anjiogenezis, Snoviositlerde araşidonik asit sentezi, uterin desiduada PGF2α sentezi, hepatoma hücreleri ve fibroblastlardan IL-6 sentezi
IL-1 + TNF	Tavşanlarda hemodinamik şok ve laktik asidoz, radyoproteksiyon, Schwartzman reaksiyonunu, luteal hücre PGF2a sentezi, fibroblastlarda PGF2α sentezi, galaktozaminin indüklediği hepatotoksiste, insülin salınımı ve beta hücre ölümü, insülin rezistansı, mezotelial hücrelerde IL-8 sentezi
IL-1 + IL-6 veya CSF	Antijenin indüklediği T-hücre IL-2 üretimi, asit glikoprotein ve C3'ün hepatik sentezi, LPS bağlayıcı proteinin hepatik sentezi, stem cell proteksiyonu, hematopoiezis, progenitor hücre proliferasyonu
IL-1 + FGF veya PDGF veya EGF veya TGFα	dermal fibroblastlarda PGE2 sentezi, snovial hücrelerde PGE2 sentezi, fibroblastlarda kemotaksis, snoviositlerden fosfolipaz A2 salınımı, artiküler kartilajın yıkımı, osteoblastik hücrelerde PGE2 sentezi

IL-1'in Hematopoiezsiteki Rolü:

IL-1'in normal hematopoieziste rolü olduğuna dair direkt bulgu yoktur. IL-1 "deficient" farelerde 10 jenerasyon sonra dahi hematolojik bozukluğa ait bulgu saptanmamıştır. Ancak inflamatuvar olaylarda kemik iliği yanıtı IL-1 baskılanması sonucu azalmaktadır (7). İnsanlarda da IL-1Ra uygulanması sonrası herhangi bir hematolojik değişiklik gözlenmez iken, endotoksinlerin indüklediği nötrofili ve G-CSF düzeylerinde %50 oranında azalmanın saptanması bu görüşü desteklemektedir (50). IL-1'in hematopoieziste en iyi tanımlanmış rolü CSF ve SCF'ün üretimini arttırmasıdır (51). IL-1, eksvivo CD34+ hücrelerin ekspansiyonunda diğer sitokinlerle sinerjistik etkisinden dolayı kullanılmaktadır (52).

AML ve IL-1:

Birçok çalışma spontan IL-1 gen ekspresyonu ve sentezinin AML, akut lenfoblastik lösemi (ALL), kronik myelositik lösemi (KML) ve kronik lenfositik lösemi (KLL)'de gerek periferik kan, gerekse de KI kökenli lösemik klon tarafından yapıldığını göstermiştir (53,54,55,56,57). AML ve KML'de spontan IL-1 salınımının patogeneizde rol oynadığı gösterilmiştir (57,58,59,60,61). Bazı çalışmalar hastaların %70'inde AML blastlarının spontan çoğalma özelliğinin olduğunu ve bunun blastlarca otokrin olarak eksprese olan IL-1 β ile ilişkili olduğunu göstermektedir (57,62). Sağlıklı kişilerin periferik kan mononükleer hücrelerinde sensitif PCR yöntemleri ile IL-1 β gen saptanmamasına karşın (63) periferik kanda dolaşan AML blastlarında IL-1 β gen ekspresyonu gösterilmiştir. AML blast kültürlerine IL-1 ilavesi GM-CSF salgısında artma ve blast proliferasyonunun artması ile sonuçlanmıştır (64). Ekzojen IL-1 α invitro AML blast proliferasyonunu stimüle etmesine karşın IL-1 α geni lösemik blastlarca spontan olarak eksprese edilmemekte ve kültür ortamına anti IL-1 α antikorlarının

eklenmesi spontan AML blast proliferasyonunu engellememektedir (58). AML blast proliferasyonunda IL-1'in önemini gösteren en önemli çalışmalar IL-1'in spesifik blokajı sonucu proliferasyonun azaldığının gösterilmesi olmuştur. IL-1 β NA (58,59,65), IL-1RA (6,62), sIL-1R (6) ve ICE'e karşı antisens oligonükleotidler (38) GM-CSF salgısında ve blast proliferasyonunda azalmaya neden olmaktadır. Benzer bir şekilde ICE'in kompetitif antagonistleri de koloni proliferasyonunda azalmaya yol açmaktadır (37).



MATERYAL VE METOD

Çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji-Onkoloji Bilim Dalı'nda takip edilen 9 yeni tanı AML'li hasta alındı.

Tüm hastalardan tanı anında yapılan KI aspirasyon materyalinden kültür öncesi dış kaynaklı IL-1 kaynağını indirmek amacıyla adheran hücre ve T-hücre depleksyonu yapıldı.

Mononükleer Hücrelerin Elde Edilmesi:

Hastalardan 500 Ü prezervatifsiz heparin içeren enjektöre 3-5 ml KI aspirasyon örneği alındı. Örnekler Isocoves Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Sigma, Chemical Company, St. Louis, MO, USA) ile 1/1 oranında sulandırıldıktan sonra dansitesi 1077 olan Histopaque (Sigma, Chemical Company, St. Louis, MO, USA) üzerinde tabakalandırıldı ve 1600 rpm'de 30 dakika santrifuj edildi. İnterfazda toplanan mononükleer hücreler (MNC) pastör pipeti ile alındı ve 5ml %10 fetal calf serum (FCS)(Biochrom KG, Seromed, Berlin, Germany) içeren α -medium (Biochrom KG, Seromed, Berlin, Germany) ortamında resüspanse edildi. 10 dakika 1200 rpm'de santrifuj edildikten sonra tekrar aynı ortamla resüspanse edildi ve aynı işlem tekrarlandı ve böylece örnekler 2 kez yıkanarak fikolden arındırıldı.

Aderan Hücre Depleksyonu:

Elde edilen MNC %10 FCS içeren α -medium ortamında plastik 25cm²'lik kültür flasklarına (Corning, NY, USA) konarak %5 CO₂ içeren 37°C'lik ortamda 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plastik kaba yapışmayan hücreler alındı. İşlem öncesi ve

sonrası monosit içeriğini saptamak amacıyla, flow sitometri aracılığı ile CD14 %'leri saptandı. CD14'ün %3'ün altına düşmesi yeterli arındırma olarak kabul edildi.

T Lenfositlerin Arındırılması (T-hücre deplesyonu):

Koyun alyuvarları ile rozet (E Rozet) yöntemi kullanıldı. Aderan hücrelerden arındırılmış MNC 10^7 hücre/ml olacak şekilde %10 FCS içeren α -medium ile resüspanse edildi. Santrifuj edilmiş koyun alyuvarları tüpün alt kısmından pastör pipeti ile elde edilerek %10 FCS içeren serum fizyolojik içinde 10^8 eritrosit/ml olacak şekilde resüspanse edildi. MNC ile eritrosit süspansiyonu eşit hacimde karıştırıldıktan sonra oda ısısında 300g'de 10 dakika santrifuj edildikten sonra yine oda ısısında 60 dakika inkübe edilerek MNC içindeki T lenfositlerin eritrositlerle rozet oluşturmaları sağlandı. Hücre pelletinden pastör pipeti aracılığı ile alınan küçük miktardaki örnek $+4^{\circ}\text{C}$ 'de soğutulmuş temiz lam üzerine zig-zag çizilerek yayıldı ve havada kurutulmuş preparatlar Wright boyası ile boyanarak rozet oluşturmuş T lenfositler gözlemlendi (Resim1).

Hücre pelleti %10 FCS içeren α -medium ortamında vortekslenmeden rozetleri bozmamak amacıyla dikkatli ve yavaşça sallanarak tekrar hücre süspansiyonu haline getirildi ve takiben fikol üzerinde tabakalandırma yöntemi ile koyun alyuvarları ve bunlarla rozet oluşturmuş T lenfositlerden arındırıldı. İşlem öncesi ve sonrası MNC'in T-Lenfosit içerikleri flow sitometri aracılığı ile anti CD2 monoklonal antikorları kullanılarak yapıldı. İşlem sonrası CD2'nin %3'ün altına düşmesi yeterli arındırma işlemi olarak kabul edildi.

Aderan hücreler ve T lenfositlerinden arındırılmış MNC'den kültür öncesi viabilite (Trypan Blue) testleri ve sitosantrifuj yaymaları yapıldı ve sitosantrifuj yaymaları Wright yöntemi ile boyandı (resim 2).

Wright boyası:

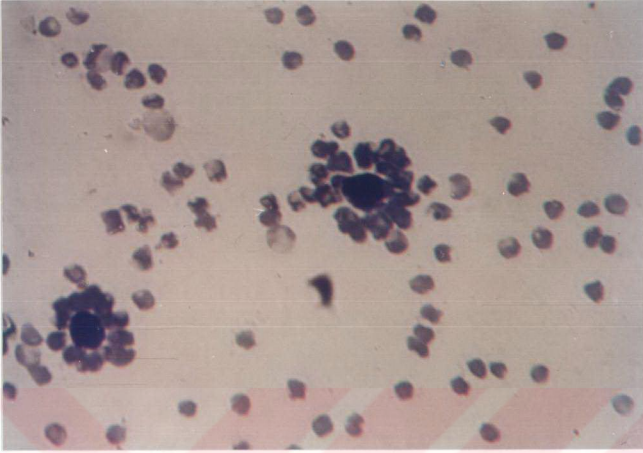
Kurutulan preparatlar metil alkolde 1 dakika tespit edildi. Tekrar kuruduktan sonra üzerlerine Wright boyası eklendi ve 2.5 dakika sonra Wright boyasının üzerine tampon solüsyon (1.5 misli volümde) ilave edildi. Sürekli homojenize olması sağlanarak 10 dakika daha bekletildikten sonra boyalar dökülerek su ile yıkandı. Kurumalarını takiben ışık mikroskobu altında incelendi.

Trypan Blue:

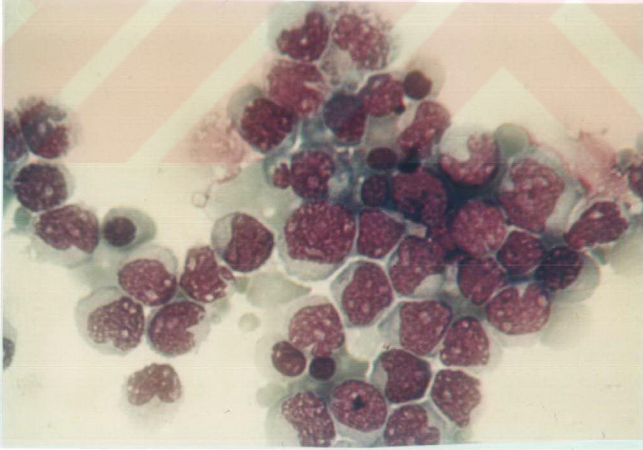
Lam üzerinde örnek 1/1 oranında %0.04'lük Trypan Blue boyası ile homojenize edildi ve taze olarak ışık mikroskobu altında incelendi. Mavi boya almış hücreler viabilitesini kaybetmiş olarak değerlendirildi. 200 hücre sayılarak viabilite oranı saptandı.

Flow Sitometri ile CD14 ve CD2 Sayımları:

50µl MNC üzerine 5µl PE anti human CD14 MoAb (Dako A/S, Copenhagen, Denmark) eklenerek karanlık ortamda +4C'de 30 dakika inkübe edildi. Takiben üzerine 1 ml PBS (Phosphate buffered saline) ilave edilip 1600 rpm'de 5 dakika santrifuj edildikten sonra süpernatant atıldı. Kalan hücre fraksiyonu üzerine tekrar PBS 1ml eklendi ve flowsitometrik analiz (Epics Profile II Analyzer/Coulter, Hialeah, FL, USA)) yapıldı. Aynı işlem CD2 için FITC anti human CD2 MoAb (Dako A/S, Copenhagen, Denmark) kullanılarak yapıldı. CD2 için izotipik kontrol olarak FITC anti human IgG1, CD14 için PE anti human IgG2a (Dako A/S, Copenhagen, Denmark) kullanıldı.



Resim 1: Koyun alyuvarları ile rozet oluşturmış T-Lenfositler



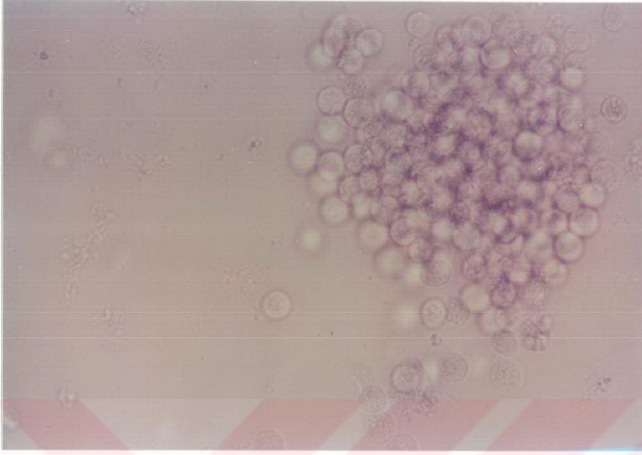
Resim 2: Aderan ve T-Lenfosit depleksyonu yapılmış MNC'in ekim öncesi sitosantrifüj yayması

AML Blast Koloni Kùltürü:

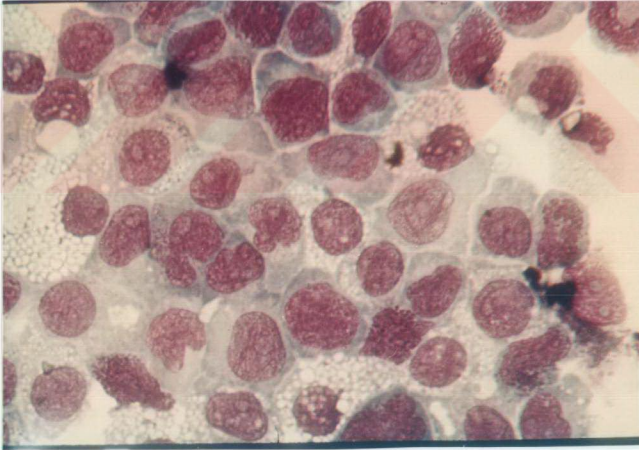
Aderan ve T lenfositlerden arındırılmış hücreler; %0.8 metilsellüloz (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), %20 FCS, 25µl L-Glutamin (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), 15ng/ml GM-CSF (Schering) içeren α-medium'dan oluşan ortama (2ml) 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde ekildi ve 35 mm'lik plastik kùltür flasklarına (Falcon, Becton Dickinson, Plymouth, England) konuldu. Diğer üç kaba sırasıyla 200ng/ml IL-1βNA, 500ng/ml IL-1RA ve aynı oranlarda IL-1βNA+IL-1RA (Genzyme, Cambridge, MA, USA) ilave edildi. Kùltür kapları 37°C'de %5 CO2 içeren nemli ortamda inkübe edildi. 7. gün sonunda inverted mikroskop altında koloni sayımları yapıldı. 20 ve üzerinde hücreden oluşan "cluster"lar CFU-AML koloni olarak kaydedildi (Resim 3). Takiben pastör pipeti aracılığıyla hücreler alındı, santrifüj sonrası süpernatantları alınarak gereğinde kullanılmak üzere -70°C'de saklandı, kalan hücrelerden sitosantrifüj yaymaları yapıldı ve Wright boyası ile boyandı (Resim 4).

İstatistiksel Analiz:

Koloni sayıları arasındaki farklılığın istatistiksel anlamının saptanmasında non-parametrik (Mann-Whitney) test kullanıldı (SPSS for Windows).



Resim 3: AML-Blast kolonisi

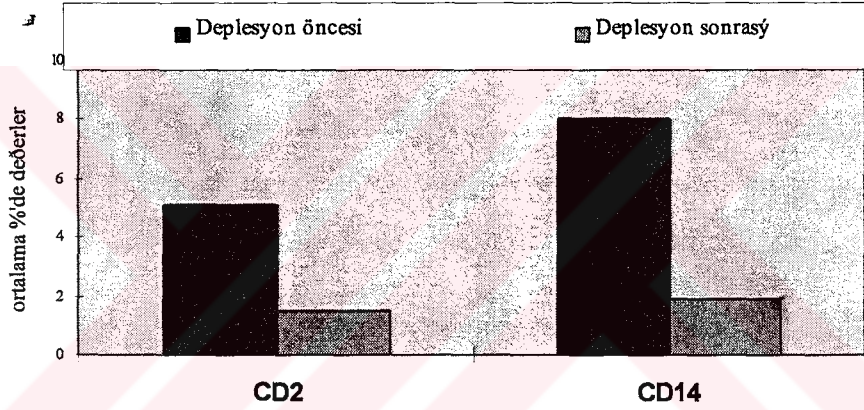


Resim 4: Kültür sonrası sitosantrifuj yayması

SONUÇLAR

Aderan hücre ve T-Hücre deplesyonunu takiben CD2 ve CD14 oranları ortalama %3'ün altına düştü(Şekil 4). Aderan hücre deplesyonu sonrası CD14 3 ve 6 no'lu hastalarda sırasıyla %29.1 ve %10.5 gibi yüksek değerlerde bulundu. Ancak aynı hastalara ait deplesyon öncesi CD14 değerleri sırasıyla %57 ve %21.4 idi. Bu yüksek değerler CD14'ün blastik hücrelerce aberan ekspresyonuna bağlandı. Ekim öncesi yapılan sitosantrifuj yaymalarında tüm hastalara ait örneklerde blast popülasyonu ve viabilite %90'ın üzerinde saptandı.

Şekil 4: Deplesyon öncesi ve sonrası ortalama CD2 ve CD14 %'leri



Hastalara ait koloni sayıları ve deplesyon öncesi-sonrası CD 14 ve CD2 değerleri Tablo

5'te , kontrole göre % koloni düşüşleri Şekil 5'te yer almaktadır.

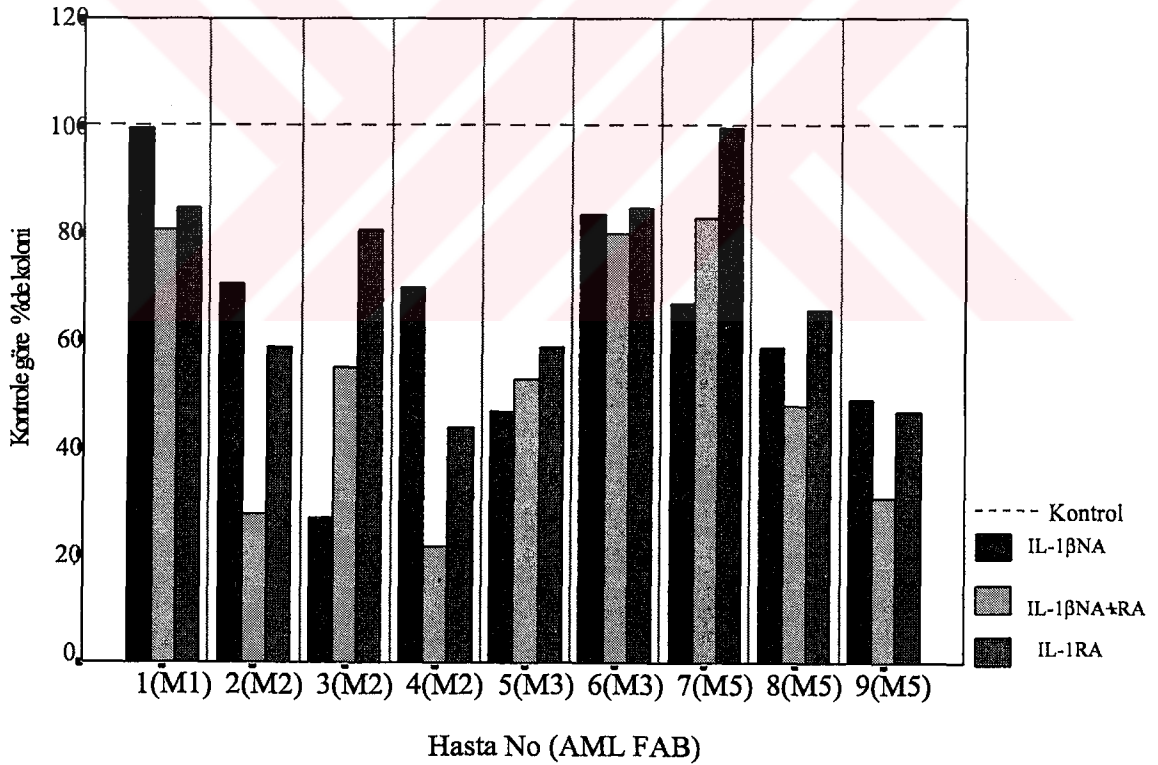
Tablo 5: Hastalara ait koloni sayıları, kontrole göre koloni yüzdeleri ve deplesyon öncesi ve sonrası CD2,CD14 yüzdeleri

FAB	N o Y	Kontrol		IL-1RA		IL-1bNA		IL-1bNA+RA		CD2%		CD14%	
		*	%	*	%	*	%	*	%	dep ö	dep s	dep ö	dep s
1:55y M1		52	100	52	100	44	85	42	81	14,4	2,3	10,4	3,4
2:35y M2		271	100	193	71	160	59	76	28	7,6	3,8	5	1,9
3:58y M2		11	100	3	27	9	81	6	55	0,6	0,1	57	29,1
4:55y M2		23	100	16	70	10	44	5	22	6,3	1,1	10,9	2,5
5:35y M3		17	100	8	47	10	59	9	53	4,2	1,5	4,4	0,9
6:53y M3		525	100	442	84	449	85	420	80	3,8	2	21,4	10,5
7:83y M5		12	100	8	67	12	100	10	83	5,1	1,4	3,5	0,1
8:36y M5		330	100	196	59	218	66	160	48	5,1	2	3,4	0,6
9:46y M5		59	100	29	49	28	47	18	31	1,4	0,6	8	1,9

*Koloni sayıları N: Hasta no, y: yaş, dep ö: deplesyon öncesi, dep s: deplesyon sonrası

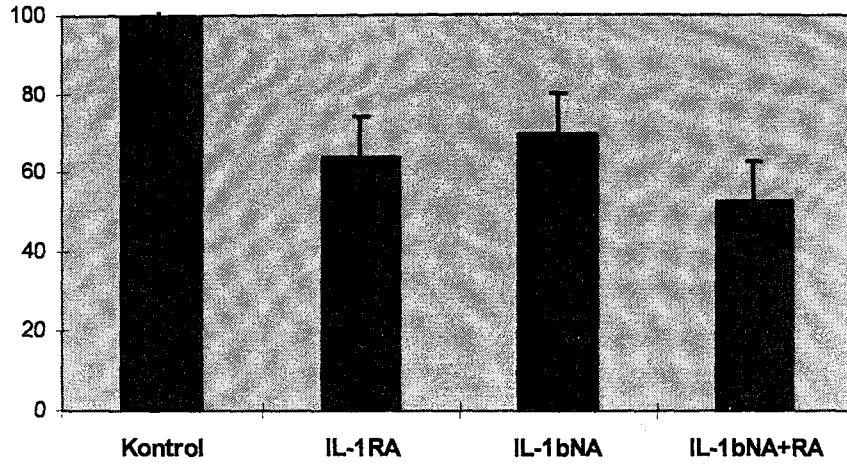
Kontrol grubuna göre % koloni değerleri, sırasıyla IL-1 β NA (69.5+19), IL-1RA (63.7+21.5) ve IL-1 β NA+IL-1RA (53,4+23.7) ilavesi ile anlamlı şekilde düştü ($p<0.01$) (Şekil 6). IL-1RA eklenmesi ile IL-1 β NA+IL-1RA eklenmesi arasında anlamlı fark gözlenmezken, IL-1 β NA+IL-1RA eklenen ortamda, yalnızca IL-1 β NA eklenen ortama göre daha belirgin düşme saptandı ($p<0.01$). Hastalar bireysel olarak ele alındığında IL-1 inhibisyonu ile %0'dan %78'e kadar değişen oranlarda koloni oluşumunun inhibe olduğu gözlemlendi. Hastalar FAB gruplarına göre değerlendirildiğinde gruplar içinde koloni inhibisyonu yönünden homojenite gözlenmedi (Şekil 5).

Şekil 5: Tüm hastalara ait kontrol grubuna göre koloni azalma oranları



Kültür kablarından yapılan sitosantrifuj yaymalarında benzer oranda makrofaj popülasyonunun jenere olduğu gözlemlendi (ortalama %15).

Şekil 6: Kontrol grubuna göre ortalama % koloni azalma oranları



TARTIŞMA

Bazı AML blastlarının otonom büyüme özellikleri salgıladıkları otokrin BF ile yakından ilişkili olup, diferansiasyon aşamasında oldukça primitif hücrelerden köken aldıklarına işaret eder(2,3,22). Bu nedenle AML blastlarının otonom büyüme özellikleri kötü prognoz ile yakından ilişkilidir ve Hunter ve ark yaptıkları çalışma bu görüşü desteklemektedir (20). Benzer şekilde Preisler ve ark AML blastlarında IL-1 β mRNA ekspresyonunun kısa remisyon süresi ile ilişkili olduğunu belirtmiştir(23).

IL-1'in AML blast proliferasyonunda önemli rol oynadığı ve IL-1 inhibisyonunun AML blast proliferasyonunu engellediği bir çok çalışmada gösterilmiştir(3,4,6). Estrov ve ark IL-1RA ve sIL-1R ile koloni formasyonunda azalma saptarken (6) Cozzolino ve ark 3H Timidin uptake yöntemi ile IL-1 β inhibisyonu ile blast proliferasyonunun inhibe olduğunu göstermişlerdir (3). Çalışmamızda IL-1 β ve IL-1RA gibi IL-1 antagonisti moleküllerin AML blast koloni formasyonunu azalttığını ve blast proliferasyonunun efektif bir inhibitörü olduğunu gördük. Bulgularımız; bu inhibisyonun FAB alt grupları ile ilişkili olmadığını, hastalarda IL-1 inhibitör moleküllere karşı olan AML blast duyarlılığının bireysel özellik taşıdığını ortaya koymaktadır.

IL-1'in blast hücrelerinde BF sentezini arttırdığı bir çok çalışmada gösterilmiştir (6,64). Çalışmalar, IL-1 inhibisyonunun AML blast proliferasyonu üzerine negatif etkisinin blast hücrelerinden GM-CSF salınımının inhibisyonu aracılığı ile olabileceğini düşündürmektedir (6,66). Çalışmamızda kültür ortamlarında ekzojen GM-CSF ilave edilmiş olmasına karşın, IL-1 antagonist moleküllerle AML blast proliferasyonunda inhibisyonun saptanması bu inhibisyonun GM-CSF salınımında azalma ile ilişkili olmadığını düşündürmektedir. Bunun yanısıra IL-1 β 'nın Fas aracılıklı apoptozu inhibe ettiği gözlenmiştir (67). Bu gözlem ve bulgular, IL-1'in, blast hücrelerinde BF

sentezini arttırması yanısıra başka mekanizmalarla da AML blast proliferasyonunda rol oynayabileceğini akla getirmektedir.

Çalışmamız sonucunda IL-1 β NA ve IL-1RA'nın benzer oranda koloni formasyonunu inhibe ettiğini gözlemlememize karşın, kültür ortamında her iki antagonistin varlığında bu inhibitör etkinin yalnızca IL-1 β NA içeren ortama göre daha da potansiyalize olduğunu gördük. Bu sonuç, rezidüel IL-1 β 'nın IL-1RA aracılığı ile inhibisyonu ya da IL-1 α 'nın da AML blastları üzerine stimülatör etkisinin olabileceğini akla getirmektedir. Ancak ekzojen IL-1 α AML blast proliferasyonunu arttırmakla birlikte IL-1 α geninin spontan olarak blastlarda eksprese olmaması (58) bu son mekanizmayı olasılık dışı bırakmaktadır.

IL-1'in AML blastlarınca otokrin salındığına dair birçok veri olmakla birlikte, kültür ortamlarından elde ettiğimiz sitosantrifuj yaymalarında makrofaj popülasyonunu az da olsa görmemiz, salt otokrin fonksiyondan söz etmemizi güçleştirmektedir.

Estrov ve ark yaptıkları çalışmada ICE inhibitörlerinin de gerek AML hücre serilerinin gerekse de taze AML blastlarının proliferasyonunda inhibisyon yaptığını göstermişlerdir (37). IL-1RA'nın insanlarda güvenle kullanılmış olması (40), "ICE deficient" farelerin maturasyonunun ve sağlığının normal olduğunun gözlenmemiş olması (35), yakın bir gelecekte AML tedavisinde, IL-1RA ve efektif bir IL-1 inhibitörü olan ICE inhibitörlerinin tek başına ya da kombine kullanımını gündeme getirebilir. Ancak çalışmamızda IL-1 inhibitör moleküllerle AML blast proliferasyonundaki inhibisyonun bireysel farklılıklar gösterdiğinin saptanması, bu biyolojik tedavi yönteminin, AML blast kültüründe IL-1 inhibisyon testi ile blast proliferasyonunda belirgin azalma gösteren hastalarda yararlı olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- 1) Lichtman MA, Henderson ES: Acute myelogenous leukemia, in Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA(eds): Hematology (ed4).New York, NY, McGraw-Hill,1990,p261
- 2) Young DC,Griffin JD: Autocrine secretion of GM-CSF in acute myeloblastic leukemia. Blood 1986;68:1171
- 3) Cozzolino F, Rubartelli A, Aldinucci D: Interleukin 1 as an autocrine growth factor for acute myeloid leukemia cells. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:2369
- 4) Leslie KB, Ziltener HJ, Schrader JW: The role of interleukin-1 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor in the paracrine stimulation of an in vivo-derived murine myeloid leukemia. Blood 1991;78:1301
- 5) Rodriguez-Cimadevilla JC, Beauchemin V, VillemeuveL: Coordinate secretion of interleukin-1b and granulocyte -macrophage colony stimulating factor by the blast cells of acute myeloblastic leukemia: role of interleukin-1 as endogenous inducer. Blood 1990;76:1481
- 6) Estrov Z, Kurzrock R, Estey E: Inhibition of acute myelogenous leukemia blast proliferation by interleukin-1(IL-1) receptor antagonist and soluble IL-1 receptors. Blood 1992;79:1938
- 7) Dinarello C: Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood 1996;87:2095
- 8) Mosley B, Urdal DL, Prickett KS: The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 α precursor but not the interleukin-1 β precursor J Biol Chem 1987;262:2941

- 9) Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR: A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature* 1992;356:768
- 10) Greer JP, Kinney MC: Acute nonlymphocytic leukemia, in Lee GR, Bithell TC Foerster J, Athens JW, Lukens JN (eds): *Wintrobe's Clinical Hematology* (ed9) Pennsylvania, Lea&Febirger, 1993, p1920
- 11) Russell NH: Biology of acute leukaemia. *Lancet* 1997;349:118
- 12) Bishop JF: The treatment of adult acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 1997;24:57
- 13) Hiddemann W: Cytosine arabinoside in the treatment of acute myeloid leukemia: The role and place of high-dose regimens. *Ann Hematol* 1991;62:119
- 14) Appelbaum FR: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemia. *Semin Oncol* 1997;24:114
- 15) Bennet J, Catovsky D, Daniel MT et al: Proposals for classification of acute leukemias. A report of the French-American-British co-operative group. *Br J Haematol* 1976;33:451
- 16) Huang M, Yu-Chen Y, Su-Rong C, et al: Use of all trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1988;72:567
- 17) Greaves MF: Stem cell origins of leukemia and curability. *Br J Cancer*.1993;67:413
- 18) Swanbury GJ, Lawler SD, Alimera G et al: Long-term survival in acute myelogenous leukemia: a second follow-up of the 4th International Workshop on chromosomes in Leukemia. *Cancer Gene Cytogenet* 1994;73:1
- 19) Del Poeta B, Stasi R, Aronica C et al: Clinical relevance of P-glycoprotein expression in de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 1996;87:1992

- 20) Hunter AE, Rogers SY, Roberts IAG Barret A, Russel NH: Autonomous growth of blast cells is associated with reduced survival in acute myeloblastic leukemia. Blood 1994;82:899
- 21) Reilly IAG, Kozlowski R, Russell NH: Heterogeneous mechanisms of autocrine growth of AML blasts. Brj Haematol 1989;72:363
- 22) Watari K, Lansdorp PM, Drogowska W, Mayani H, Schrader J: Expression of interleukin-1bmRNA in candidade hematopoietic stem cells. Blood 1994;84:36
- 23) Preisler HD, Raza A, Kukla C, Larson R, Goldber J, Bowman G: Interleukin-1b expression, and treatment outcome in acute myelogeneous leukemia. Blood 1991;78:849
- 24) Arend WP: Interleukin-1 receptor antagonist. Adv Immunol 1993; 54:167
- 25) Lonnemann G, Endres S, van der Meer JW, Cannon JG, Koch KM, Dinarello CA: Differences in the synthesis and kinetics of release of interleukin I alfa, interleukin 1 beta and tumor necrosis factor from human mononuclear cells. Eur J Immunol 1989; 19:1531
- 26) Kobayashi Y, Oppenheim JJ, Matsushima: Human pre-interleukin 1- α and β : Structural features revealed by limited proteolysis. Chem Pharmaceut Bull 1991; 39:1513
- 27) Watanabe N, Kobayashi Y: Selective release of a processed form of interleukin-1 α . Ctokine 1994; 6:597
- 28) Fantuzzi G, Faggioni R, Sironi M, Ghezzi P, Sipe JD, Zheng H, Shaw AR, van der Ploeg LTH, Dinerello CA: Defective inflammatory response and cytokine synthesis in IL-1 β deficiet mice. Ctokine 1995; 7:608

- 29) Zheng H, Fletcher D, Kozak W, Jiang M, Hoffman K, Conn CC, Siszynski D, Grabiec C, Trumbauer MA, Shaw AR, Kostura MJ, Stevens K, Rosen H, Nort RJ, Chen HY, Tocci MJ, Kluger MJ, van der Ploeg LTH: Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin -1 β deficient mice . *Immunity* 1995; 3:9
- 30) Van der Berg WB, Joosten LAB, Helsen M, van de Loo FAJ: Amelioration of established murine collagen-induced arthritis with anti IL-1 treatment. *Clin Exp Immunol* 1994; 95: 237
- 31) Jobling SA, Auron PE, Gurka G, Webb AC, McDonald B, Rosenwasser LJ, Gherke L: Biological activity and receptor binding of human prointerleukin- 1 β and subpeptides. *J Biol Chem* 1988;263:16372
- 32) Black RA, Kronheim SR, Cantrell M, Deeley MC, March CJ, Prickett KS, Wignall J, Conlon PJ, Cosman D, Hopp TP: Generation of biologically active interleukin -1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor. *J Biol Chem* 1988; 263:9437
- 33) Dinarello CA, Conon JG, Mier JV, Bernheim HA, Lo Preste G, Lynn DL, Love RN, Webb AC, Auron PE, Reuben RC, Rich A, Wolff SM, Putney SD: Multiple biological activities of human recombinant interleukin-1. *J Clin Invest* 1986; 77:1734
- 34) Irmeler M, Hertig S, MacDonalds HR, Sadoul R, Becherer JD, Proudfoot A, Solari R, Tschopp J: Granzyme A is an interleukin-1 β converting enzyme. *J Exp Med* 1995;181:1917
- 35) Li P, Allen H, Barenjee S, Franklin S, Herzog L, Jhonstone C, McDowell J, Paskind M, Rodman L, Salfeld J, Towne E, Tracey D, Wardwell S, Wei F-Y, Wong W, Kamen R, Seshardi T: Mice deficient in interleukin converting enzyme (ICE) are

defective in production of mature interleukin-1 β and resistant to endotoxic shock. *Cell* 1995;80:401

- 36) Enari M, Hug H, Nagata S: Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature* 1995;375:78
- 37) Estrov Z, Black RA, Sleath PR: Effect of IL-1 β converting enzyme inhibitor on acute myelogenous leukemia blast proliferation. *Blood* 1995;86:4594
- 38) Stosic-Grujicic S, Basara N, Milenković P, Dinerello CA: Modulation of acute myeloblastic leukemia (AML) cell proliferation and blast colony formation by antisense oligomer of IL-1 β converting enzyme (ICE) and IL-1 receptor antagonist (IL-1ra). *J Chemoter* 1995;7:67
- 39) Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, Armes LG, Sommer A, Eisenberg SP, Thompson RC: Interleukin -1 receptor antagonist activity of a human interleukin -1 inhibitor. *Nature* 1990; 343:336
- 40) Granowitz EV, Porat R, Meir JW, Pribble JP, Stiles DM, Bloedow DC, Catalano MA, Wolff SM, Dinarello CA: Pharmacokinetics, safety, and immunomodulatory effect of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in healthy humans. *Cytokine* 1992;4:353
- 41) Ohlsson K, Bjork P, Bergenfeldt M, Hageman R, Thompson RC: Interleukin-1 receptor antagonist reduced mortality from endotoxic shock. *Nature* 1990;348:550
- 42) Fischer E, Marano MA, Barber AE, Hudson AA, Lee K, Rock CS, Hawes AS, Thompson RC, Hayes TV, Anderson TD, Benjamin WR, Lowry SF, Moldawer LL: A comparison between the effects of interleukin-1 α administration and sublethal endotoxemia in primates. *AM J Physiol* 1991;261:R244

- 43) Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G: Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin-1 receptor complex. *J Biol Chem* 1995;270:13757
- 44) Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, MacDonald HR, McMahon CJ, Grubin CE, Wignall JM, Jackson JL, Call SM, et al: cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 1988;241:585
- 45) Sims JE, Painter SL, Gow IR: Genomic organization of the type I and type II IL-1 receptors. *Cytokine* 1995;7:483
- 46) Haskill S, Martin M, VanLe L, Morris J, Peace A, Bigler CF, Jaffe GJ, Sporn SA, Fong S, Arrend WP, Ralph P: cDNA cloning of a novel form of the IL-1 receptor antagonist associated with epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3681
- 47) Collota F, Dower SK, Sims JE, Mantovani A: The type II "decoy" receptor: A novel regulatory pathway for interleukin-1. *Immunol Today* 1994;15:462
- 48) Endresse S, Ghorbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonnemann G, van der Meer JW, Cannon JG, Rogers TS, Klempner MS, Weber PC, Wolff SM, Dinarello CA: The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acid on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Eng J Med* 1989;320:265
- 49) Schindler R, Ghezzi P, Dinarello CA: IL-1 induces IL-1. IV. IFN- γ suppresses IL-1 but not lipopolysaccharide-induced transcription of IL-1. *J Immunol* 1990;144:2216
- 50) Granowitz EV, Porat R, Meir JW, Orencole SF, Callahan MV, Cannon JG, Lynch EA, Ye K, Poutsika DD, Vannier E, Shapiro L, Pribble JP, Stiles DM, Catalano MA, Wolff SM, Dinarello CA: Hematological and immunomodulatory effects of an interleukin-1 receptor antagonist coinfusion during low dose endotoxemia in healthy humans *Blood* 1993;82:2985

- 51) Bagby GC Jr: Interleukin-1 and hematopoiesis. *Blood Rev* 1989;3:152
- 52) Brugger W, Mocklin W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelmann R, Kanz L: Ex vivo expansion of enriched peripheral Blood CD34+ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1b, IL-6, IL-3, IFNg and erythropoietin. *Blood* 1993;81:2579
- 53) Shirakawa F, Tanaka Y, Ota T, Eto S, Yamashita U: Autocrine stimulation of interleukin -1 α in the growth of adult T cell leukemia, *Cancer Res* 1989;49:1143
- 54) Maeda Y, Hattori T, Sakai K, Yamamura Y, Murakami T, Asou N, Tsudo M, Takatsuki K: Regulatory mechanisms for the expression beta chain of interleukin-2 receptor on T4 chronic lymphocytic leukemia cells. *Growth Factors* 1991;4:289
- 55) Komada Y, Zhou W-Y, Zhang S-L, Azuma E, Sakurai M: Role of growth regulation of cytokine and cytokine receptors in acute lymphoblastic leukemia expressing myeloid markers. *Br J Haematol* 1993;84:408
- 56) Mori N, Shirakawa F, Murakami S, Oda S, Eto S: Interleukin -1 α as an autocrine growth factor for acute lymphoblastic leukemia cells. *Br J Haematol* 1994;86:386
- 57) Kurrzock R, Kanaarjian H, Wetzler M, Estrov Z, Estey E, Troutman-Worden K, Gutterman JU, Talpaz M: Ubiquitous expression of cytokines in diverse leukemia of lymphoid and myeloid lineage. *Exp Hematol* 1993;21:80
- 58) Cozzolino F, Rubartelli A, Aldunizzi D, Sitia R, Torcia M, Shaw A, Di Guiglielmo R: Interleukin 1 as an autocrine growth factor for acute myeloid leukemia cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2369
- 59) Sissolak G, Hoffbrand AV, Mehta AB, Ganeshaguru K: Effects of interferon- α , on the expression of interleukin-1b, IL-6, granulocyte macrophage colony stimulating factor, and tumor necrosis factor- α in acute myeloid leukemia (AML) blasts. *Leukemia* 1992;6:1155

- 60) Bagby GCJ, Dinarello CA, Neerhoud RC, Ridgway D, McCall E: Interleukin-1-dependent paracrine granulopoiesis in chronic granulocytic leukemia of the juvenile type. *J Clin Invest* 1988;82:1430
- 61) Shiro R, Longoni D, Rossi V, Maglia O, Doni A, Arsura M, Carrara G, Masera G, Vannier E, Dinarello CA, Rambaldi A, Biondi A: Suppression of juvenile chronic myelogenous leukemia colony growth by interleukin 1 receptor antagonists. *Blood* 1993;83:460
- 62) Rambaldi A, Torcia M, Bettoni S: Modulation of cell proliferation and cytokine production in acute myeloblastic leukemia by recombinant IL-1 receptor antagonist and lack of its expression by leukemic cells. *Blood* 1990;76:114a
- 63) Mileno MD, Margolis NH, Clark BD, Dinarello CA, Burke JF, Gelfand JA: Coagulation of whole blood stimulates interleukin-1 β gene expression: absence of gene transcript in anticoagulated blood. *J Infect Dis* 1995;172:308
- 64) Russel NH: Autocrine growth factors and leukemic haematopoiesis. *Blood Rev* 1992;6:149
- 65) Cohen A, Grunberger T, Wanek W, Dube ID, Doherty PJ, Letarte M, Roifman C, Freedman MH: Constitutive expression and role in growth regulation of interleukin 1 and multiple cytokine receptors in a biphenotypic leukemia cell line. *Blood* 1991;78:94
- 66) Bradbury D, Bowen G, Kozlowski R, Reilly I, Russel N: Endogenous interleukin-1 can regulate the autonomous growth of the blast cells of acute myeloblastic leukemia by inducing autocrine secretion of GM-CSF. *Leukemia* 1990;4:44
- 67) Tatsuta T, Cheng J, Moutz JD: Intracellular IL-1 β is an inhibitor of Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 1996;157:3949