

Granulocita-markofág kolonia stimuláló faktor szubkután adagolásának hatása a perifériás vér polimorfonumleáris granulocitákra

Dr. Fűrész József, dr. Dezsőfy Tibor, dr. Liptay László,
dr. Pállinger Éva, dr. Schweitzer Katalin
Érkezett: 1991. 10. 26.

Kulcsszavak: rhGM-CSF, citosztatikus kezelés, PMNG aktivitás vizsgálat

A szerzők egy citosztatikus kezelés kapcsán súlyos agranulocitózis és szeptikus állapot kialakulását tapasztalták mamma tumor miatt kezelt betegeiknél. A terápia folytatása érdekében a citosztatikus kezelés 3. és 4. napján szubkután GM-CSF kezelést alkalmaztak. Megállapították, hogy a GM-CSF kezelést követő első órában a PMNG-k számának nagy mértékű csökkenése következett be, melyet jelentős PMNG szaporulat követett már a 4. és 5. órában. A szerzők vizsgálták a PMNG-k funkció változását, [teljes vér zimozán indukálta luminol dependens kemilumineszcencia (LDCL) meghatározásával] a kezelés során. Megállapították, hogy a PMNG aktivitást jelző LDCL a kezelést követő órában jelentősen csökkent, majd fokozatosan növekedett. A 4-5. órában a kiindulási értéket meghaladó aktivitást mértek.

A granulocita-makrofág kolonia stimuláló faktor (GM-CSF) kémiai szerkezetét tekintve glikoprotein, mely 127 aminosavból áll. Molekulatömege a glikoziláltság mértékétől függően 14500–35000 D között változik. A polipeptid láncon belül két diszulfid kötés stabilizálja a harmadlagos szerkezetet.¹

A szénhidrát tartalom meghatározó szerepet játszik a molekula specifikus aktivitásának és a molekula clearance-nek szabályozásában (az N glikoziláció a specifikus aktivitást csökkenti, míg a féléletidőt növeli).² A GM-CSF a kutatások kezdetén a granulocita és a makrofág progenitor sejtek in vitro tenyésztéséhez szükséges növekedési faktorként került jellemzésre.³

A GM-CSF in vitro sejtenyészeteken tapasztalt proliferációt és érést elősegítő hatását ionizáló sugárzás ill. gyógyszeres kezelés miatt csontvelő sérült kísérleti állatokon is sikerült kimutatni.^{4, 5.}

Az utóbbi években számos közlemény jelent meg a géntechnológia módszereinek segítségével előállított ú. n. rekombináns emberi GM-CSF (rhGM-CSF) klinikai alkalmazásáról.^{6, 7, 8.} A GM-CSF hatásmechanizmusának vizsgálata során ismertté vált, hogy a progenitor sejtek proliferációjára és érzésére gyakorolt hatásán túl megfigyelhető egy, a már kiértelt sejtek funkcionális aktivitására kifejtett hatás is.

Számos szerző leírta a GM-CSF u. n. priming hatását.^{2, 9, 10.} Ezt azt jelenti, hogy az előkezelt sejt a specifikus stimulusra gyorsabban és/vagy erőteljesebben reagál mint előkezelés nélkül. A GM-CSF a polimorfonukleáris granulocitákban (PMNG) de novo fehérjeszintézist indukál,⁹ fokozza a komplement receptorok sejt felszíni kifejeződését,¹¹ a lizozomális enzimek stimulus indukálta kiszabadulását¹² és az aktív oxigéngyökök^{13, 14} termelődését. Feltehetően ezen mechanizmusok révén fokozódik a PMNG-k baktericid és fungicid aktivitása.^{5, 12, 15.} Ezek a hatások a kezelés után rövid időn belül megfigyelhetők.

A közelmúltban intézetünkben egy mamma tumoros betegünkönél citosztatikus kezelés következtében súlyos agranulocitózis és szepszikus állapot lépett fel, melyet gyógyszeresen szanáltunk. A citosztatikus terápia folytatása a kiterjedt többgócú metasztatízisok miatt vitális volt, ugyanakkor a csontvelő károsodásának kivédése nélkül a közvetlen életveszély miatt nem volt végrehajtható.

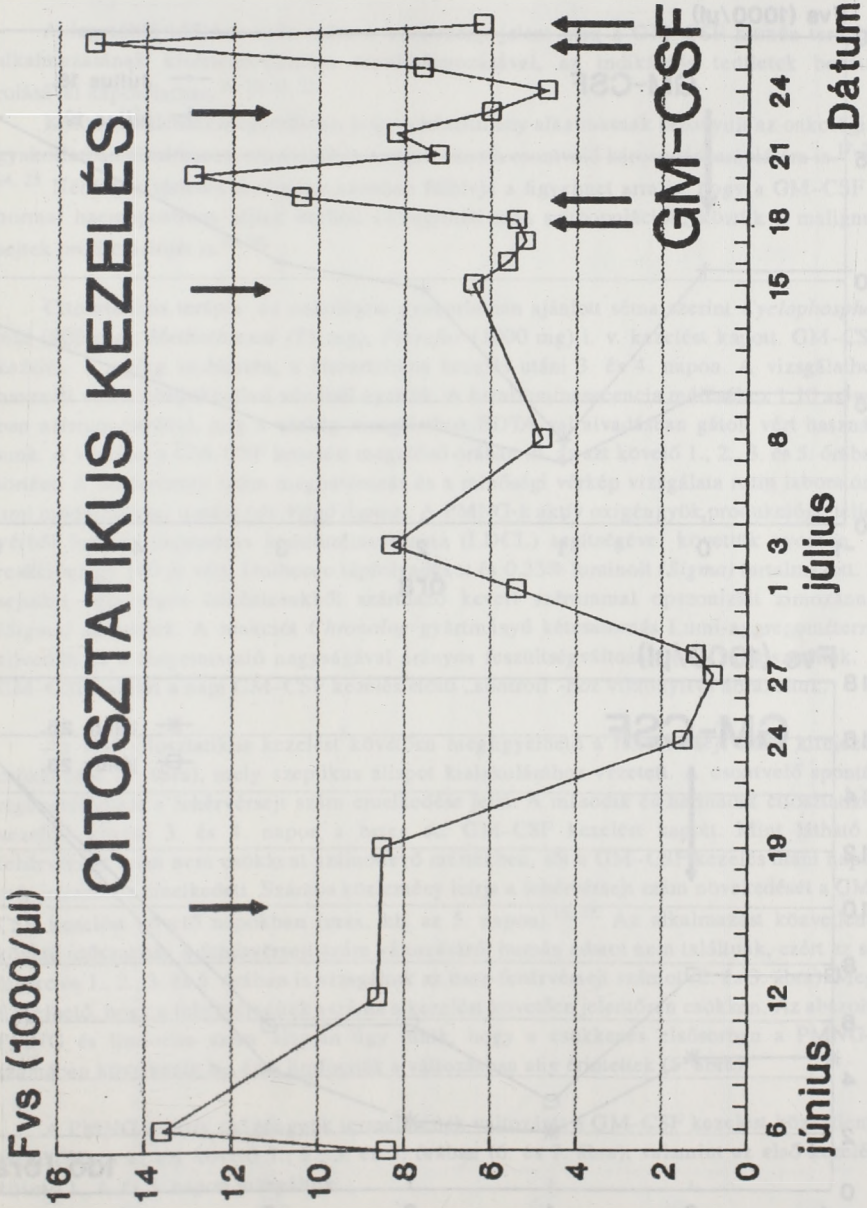
A szakirodalom az agranulocitózis terápiájának lehetséges gyógyszereként tartja számon a GM-CSF-t, ezért a készítmény gyártójához fordultunk. Kérésükre a *Sandoz AG* volt szíves térítés nélkül a rendelkezésünkre bocsájtani a még klinikai kipróbálás alatt álló rhGM-CSF készítményüket, mely lehetővé tette a kezelési ciklus befejezését. A GM-CSF kezelés alatt a beteg számos paraméterét követtük nyomon klinikai és laboratóriumi módszerekkel. Közleményünkben a PMNG-k funkcionális aktivitására és a fehérvérsejt számára kifejtett hatását foglaljuk össze.

Megfigyelhető, hogy a GM-CSF kezelést követő órában a PMNG-k zymozan indukálta kemilumineszcenciája jelentősen csökkent, majd a következő órákban fokozatosan normalizálódott a sejtek aktivitása, mígnem az 5. órára a kiindulási értéket meghaladó aktivitást tapasztaltunk. Az aktivitás maximális értéke minden esetben a 12. perc körül volt. Ila az aktivitás abszolút értékét vizsgáljuk, látható, hogy az egyes mérési napokon jelentős különbségek voltak. (Felhívjuk a figyelmet az Y tengely eltérő léptékeire.) A júl. 18. és 19. GM-CSF kezelés előtti ún. kontroll értékek egymással jól egybevetethetők épp úgy, mint ahogy a júl. 25. és 26. kontrollok is. Ezzel szemben az első vizsgálati periódusban a kontroll jelentősen magasabb aktivitást mutatott, mint a második esetben.

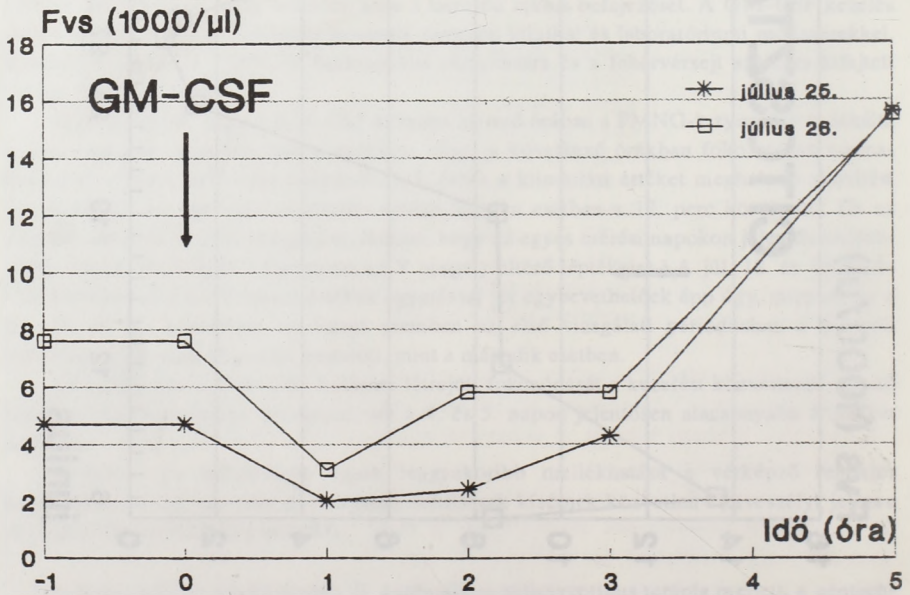
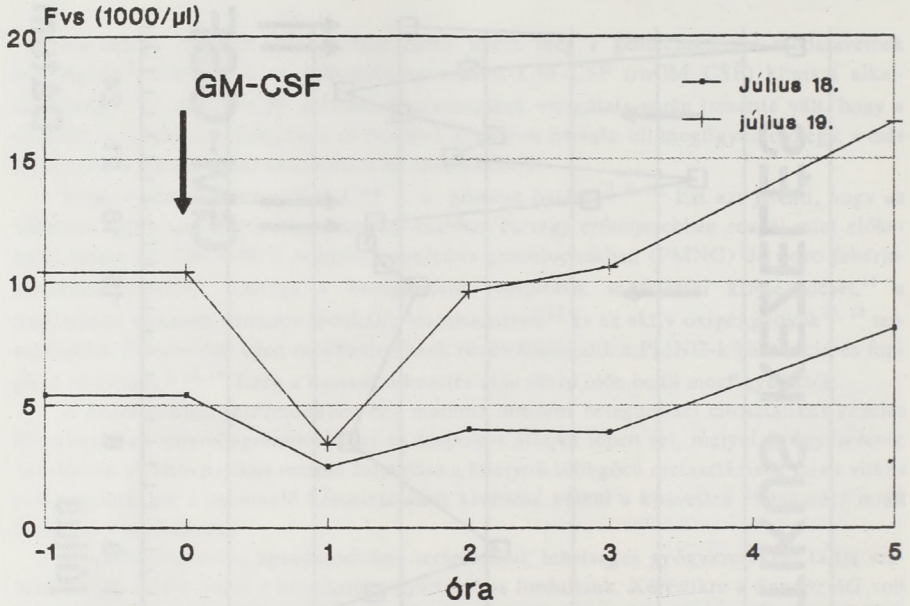
Az LDCL-nek a GM-CSF hatására létrejött fokozódását a kezelést közvetlenül követő napokon már nem tudtuk kimutatni, sőt a 4. és 5. napon jelentősen alacsonyabb értékeket mértünk.

A kemo- és radioterápia egyik leggyakoribb mellékhatása a vérképző rendszer károsodása, melyet gyakran opportunistá fertőzések kísérnek közvetlen életveszélyt jelezve az immunszuprimált beteg számára.

A hagyományos szubsztitucios ill. antibiotikus-antimycotikus terápia mellett, a géntechnológiai úton előállított kolónia-stimuláló faktorok megjelenésével új, terápiás lehetőség előtt állunk. A csontvelő károsodott myelo-monocytá rendszerének regenerálódását kísérleti állatokon granulocita kolónia-stimuláló faktor ill. GM-CSF segítségével már számos kísérleti rendszerben sikerült elősegíteni.^{1, 2, 18.}



1. ábra. A perifériás fehérvérsejt koncentráció változása a citosztatikus és az rhGM-CSF kezelés alatt.



2-3. ábra. A perifériás fehérvérsejt koncentráció változása az rhGM-CSF kezelést megelőző első és a kezelést követő első 5 órában.

A legutóbbi időkben már számos közlemény jelent meg a GM-CSF humán terápiás alkalmazásának kísérletes-klinikai tanulmányozásával, az indikációs területek behatárolásával kapcsolatban.^{19, 20, 21, 22.}

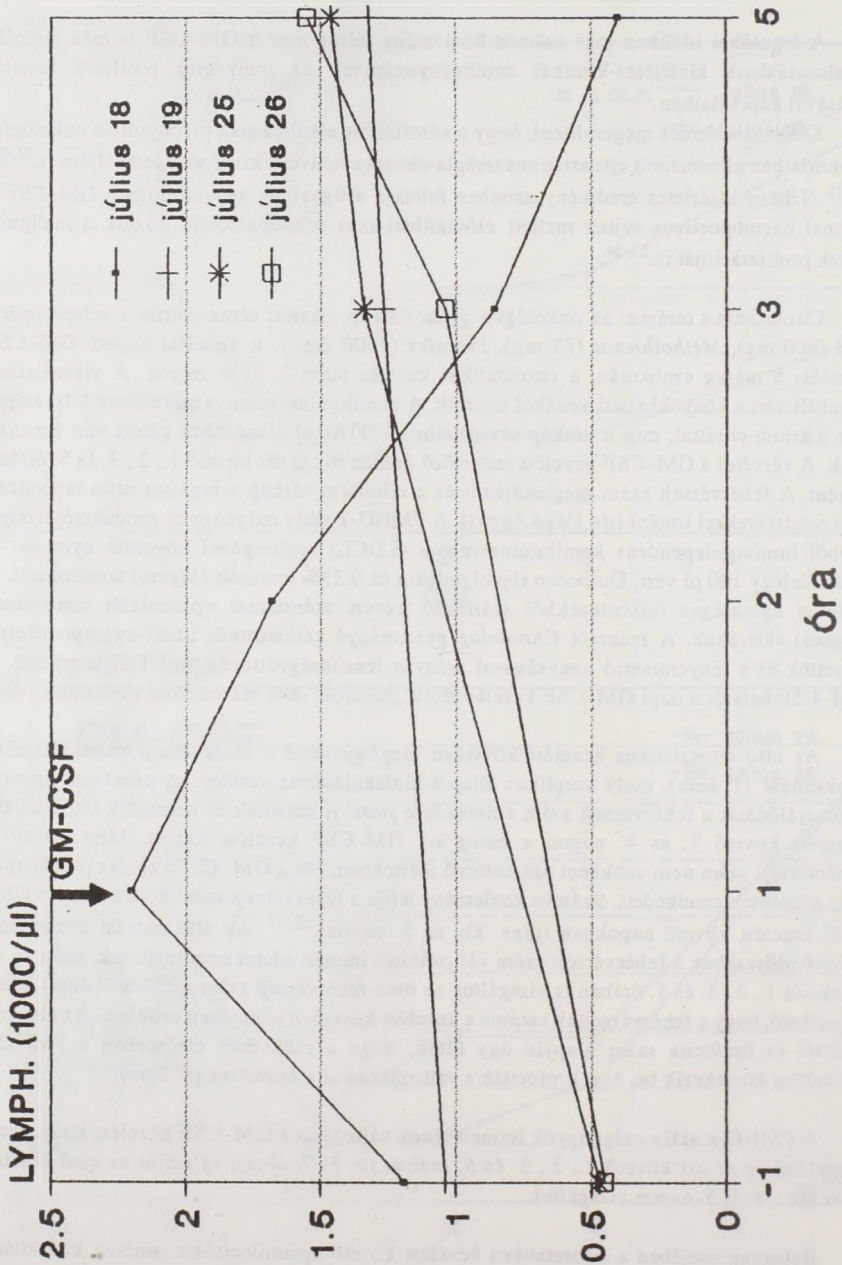
Külön is érdemes megemlíteni, hogy a készítmény alkalmasnak bizonyult az onkológiai gyakorlatban alkalmazott citosztatikus terápia okozta csontvelő károsodás terápiájára is.^{17, 23, 24, 25.} Néhány kísérletes eredmény azonban felhívja a figyelmet arra is, hogy a GM-CSF a normal haemopoeticus sejtek mellett elősegítheti más sejtpopulációk, köztük a malignus sejtek proliferációját is.^{23, 24.}

Citosztatikus terápia: az onkológiai gyakorlatban ajánlott séma szerint *Cyclophosphamid* (800 mg), *Methothrexat* (75 mg), *Ftorafur* (1000 mg) i. v. kezelést kapott. GM-CSF kezelés: 5 mg/kg szubkután, a citosztatikus kezelés utáni 3. és 4. napon. A vizsgálathoz használt vért a könyökhajlati vénából nyertük. A kemilumineszcencia méréséhez 1:10 arányban nátrium-citráttal, míg a vérkép vizsgálathoz EDTA-val alvadásban gátolt vért használtunk. A vérvétel a GM-CSF kezelést megelőző órában ill. az azt követő 1., 2., 3. és 5. órában történt. A fehérvérsejt szám meghatározás és a minőségi vérkép vizsgálata rutin laboratóriumi módszerekkel történt (*dr. Vágó Ágnes*). A PMNG-k aktív oxigéngyök produkcióját teljes vérből luminol-dependens kemilumineszcencia (LDCL) segítségével követtük nyomon. A reakcióelegy 100 µl vért, Dulbecco tápfolyadékot és 0.33% luminolt (*Sigma*) tartalmazott. A sejteket egészséges önkéntesekből származó kevert szérummal opsonizált zimozánnal (*Sigma*) aktiváltuk. A reakciót *Chronolog* gyártmányú kétcatornás Lumi-aggregométerrel követtük és a fényemisszió nagyságával arányos feszültségváltozást (mV) regisztráltuk. A GM-CSF hatását a napi GM-CSF kezelés előtti „kontroll”-hoz viszonyítva ábrázoltuk.

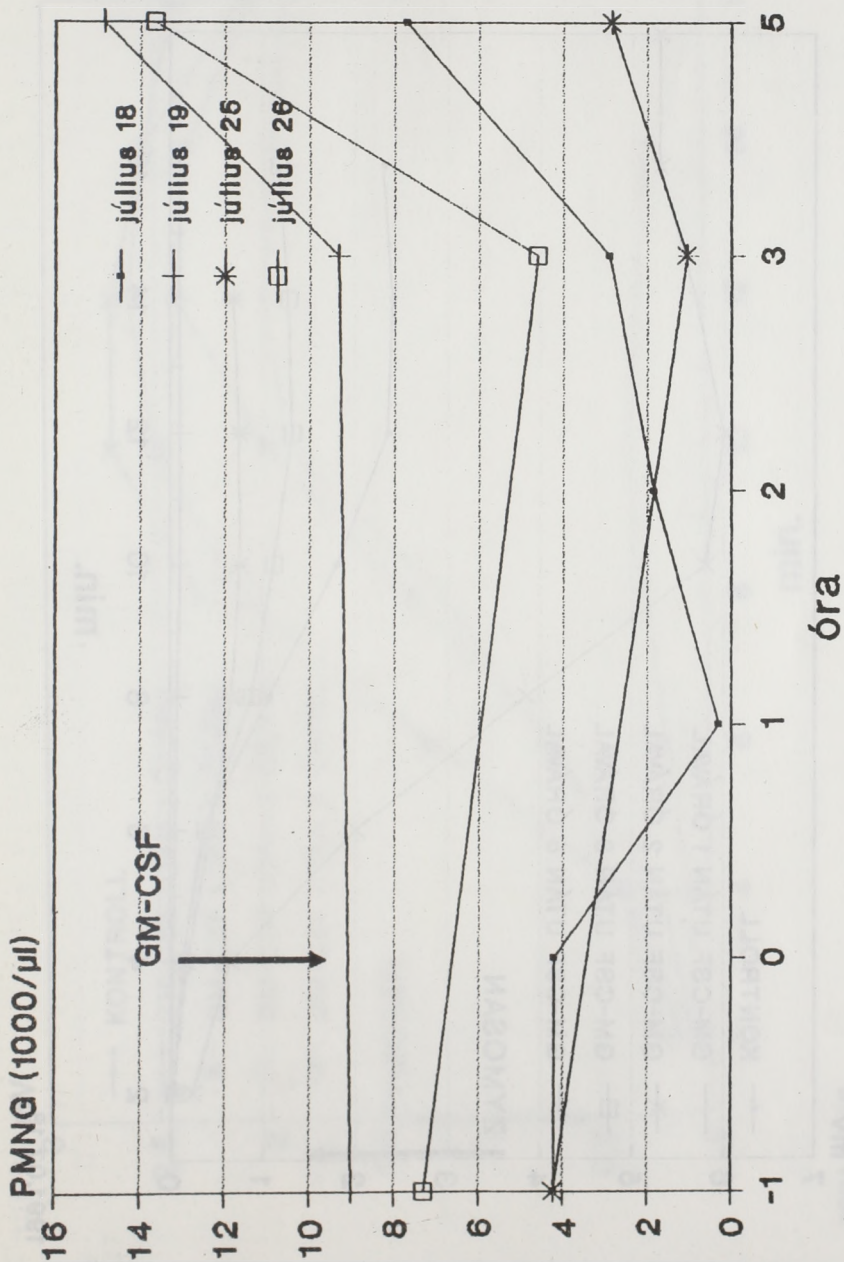
Az első citosztatikus kezelést követően megfigyelhető a fehérvérsejt szám kifejezett csökkenése (1. ábra), mely szeptikus állapot kialakulásához vezetett. A csontvelő spontán regenerálódását a fehérvérsejt szám emelkedése jelzi. A második és harmadik citosztatikus kezelést követő 3. és 4. napon a beteg sc. GM-CSF kezelést kapott. Mint látható a fehérvérsejt szám nem csökkent számottevő mértékben, sőt a GM-CSF kezelés utáni napon már jelentősen emelkedett. Számos közlemény leírja a fehérvérsejt szám növekedését a GM-CSF kezelést követő napokban (max. kb. az 5. napon).^{16, 17.} Az alkalmazást közvetlenül követő időszakban a fehérvérsejt szám változásáról humán adatot nem találtunk, ezért az sc. injekciót 1., 2., 3. és 5. órában is vizsgáltuk az össz-fehérvérsejt számot (2. és 3. ábra). Megfigyelhető, hogy a fehérvérsejtek száma a kezelést követően jelentősen csökken. Az abszolút PMNG és limfocita szám alapján úgy tűnik, hogy a csökkenés elsősorban a PMNG-k számában következik be, és a limfociták a változásban alig érintettek (5. ábra).

A PMNG-k aktív oxigéngyök termelésének változását a GM-CSF kezelést közvetlenül megelőző és az azt követő 1., 2., 3. és 5. órában (6. és 7. ábra), valamint az első kezelést követő 1., 4. és 5. napon vizsgáltuk.

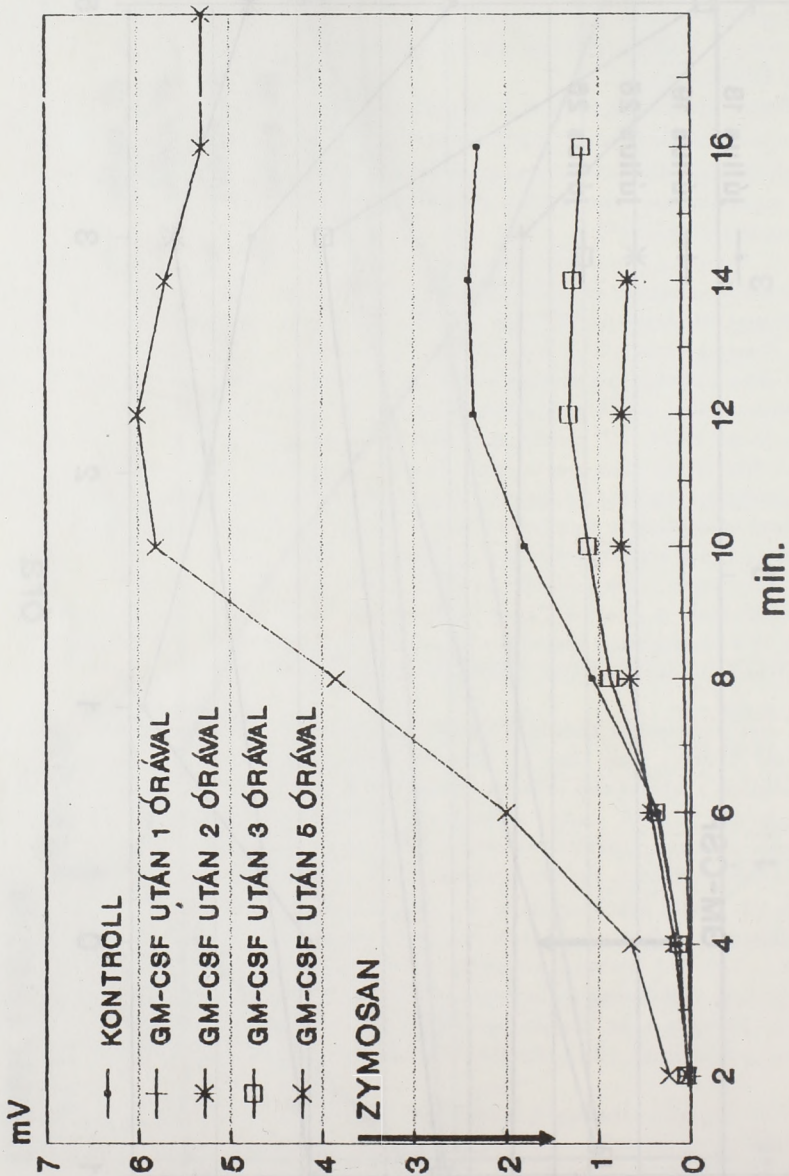
Betegünk esetében a citosztatikus kezelést követő agranulocitózis ismételt kialakítását az rhGM-CSF kezeléssel ki tudtuk védeni, sőt mérsékelt leukocitózis is megfigyelhető volt. Meglepő módon a GM-CSF kezelést követő 1. és 2. órában viszont a fehérvérsejt szám jelentős csökkenése volt megfigyelhető, mely egyértelműen a granulociták keringésből



4. ábra. Az abszolút limfocita szám változása az rhGM-CSF kezelést megelőző első és a kezelést követő első 5 órában.

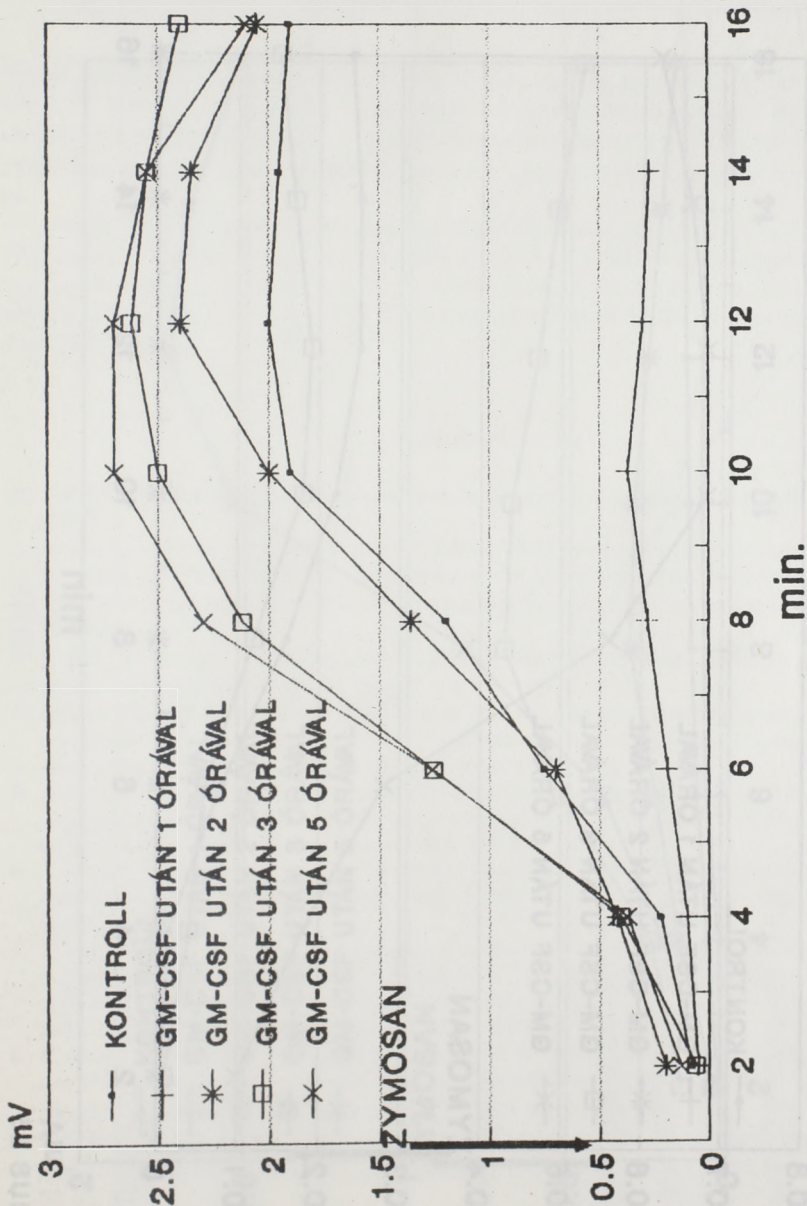


5. ábra. Az abszolút granulocita szám változás a rhGM-CSF kezelést megelőző első és a kezelést követő első 5 órában.



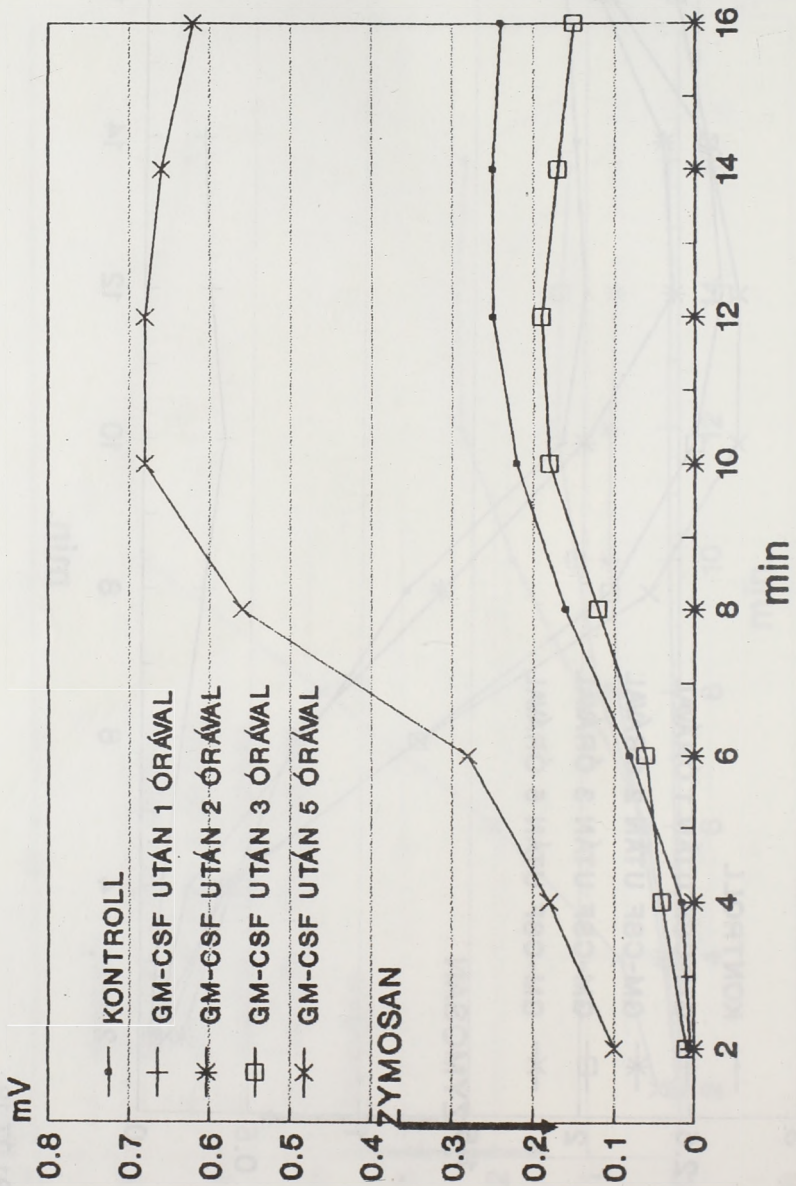
1991.07.18.

6. ábra. A teljes vér kemilumineszcencia változása az első cytostaticus kezelést követő GM-CSF adás utáni első napon.



1991.07.19.

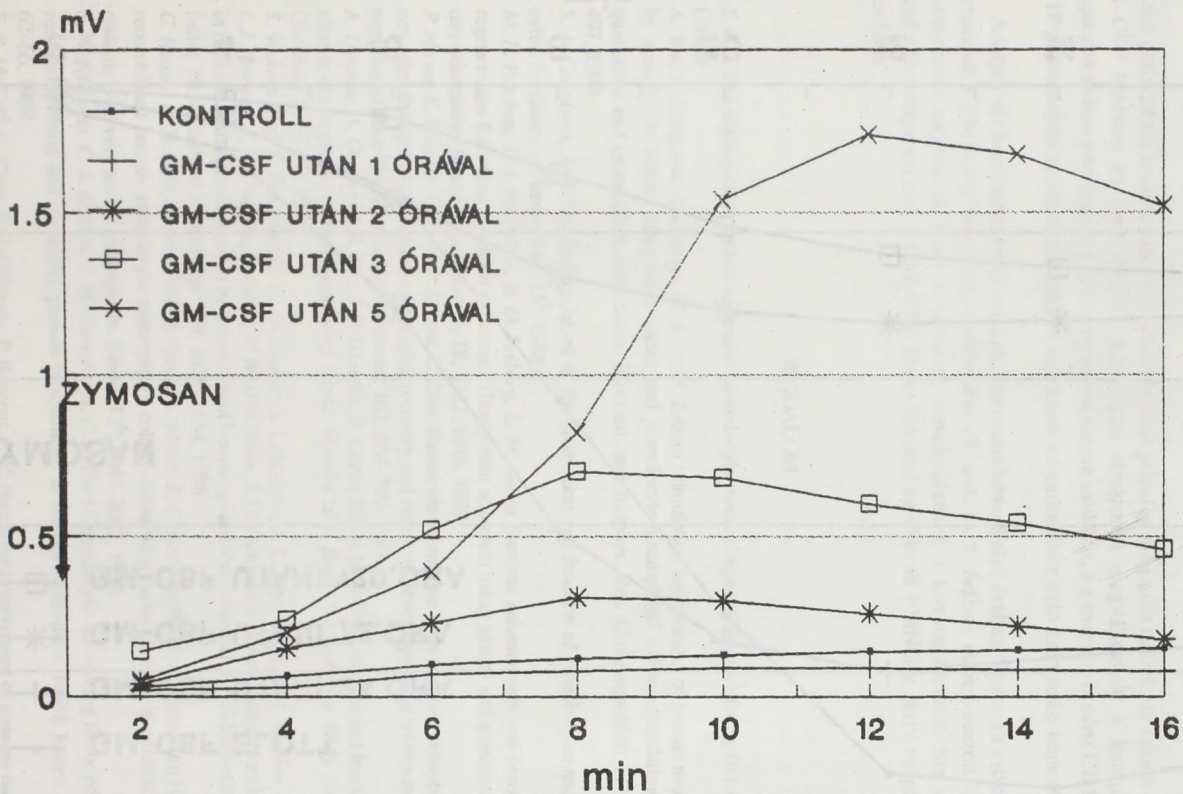
7. ábra. A teljes vér kemilumineszcencia változása az első cytostaticus kezelést követő GM-CSF adás utáni második napon.



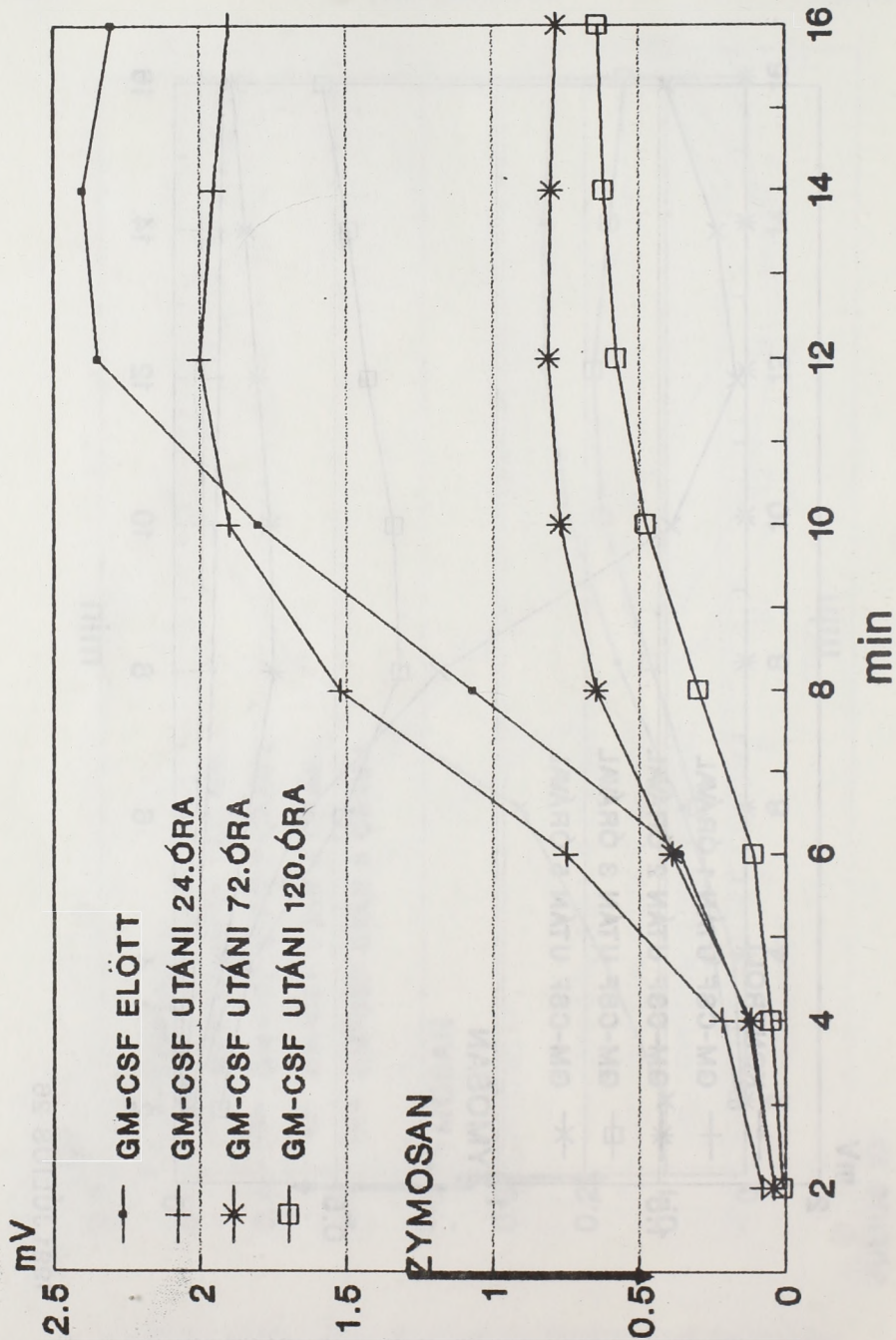
JÚLIUS 25

8. ábra. A teljes vér kemilumineszcencia változása a második GM-CSF adás utáni első napon.

9. ábra. A teljes vér-kemilumineszcencia változása a második GM-CSF adás utáni második napon.



1991. JÚLIUS 26



10. ábra. A teljes vér kemilumineszcencia változása az első GM-CSF adás utáni 1., 2. és 4., 5. napon.

történő eltűnésével magyarázható. E jelenség okát jelenleg még nem tudjuk, de ismert hogy a GM-CSF hatására az érett PMNG sejtfelszíni strukturáli megváltoznak: a komplement receptorok száma növekszik, az Fc receptorok száma csökken, s a megnövekedett CD11B ill. CD18 glikoprotein révén fokozódhat a sejteknek az endotélhez való kitapadási képessége.^{11, 28.}

A teljes vér kemilumineszcenciának a kezelést követő első órában tapasztalt csökkenése származhat a PMNG-k számának csökkenéséből. a 4. és 5. órában mért fokozott kemilumineszcencia ugyancsak lehet a sejszám növekedésének a következménye, bár számos szerző véleménye szerint, a GM-CSF képes fokozni az aktivált PMNG-k aktív oxigéngyök termelését.

IRODALOM

1. S. C. Clark Biological activities of human granulocyte macrophage colony-stimulating factor. Int. J. (1988)
2. A. You, S. Kitagawa, A. Ohsaka, M. Saito, F. Takaku Stimulation and priming of human neutrophils by granulocyte colony stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: qualitative and quantitative differences. Biochim. and Biophys. Res. Communication 171¹, 491-497, 1990
3. S. A. Cannistra, J. D. Griffin Regulation of the production and function of granulocytes and monocytes. Seminars in Hematology 25³, 1988
4. M. L. Patchen, T. J. MacVittie, B. D. Solberg, L. M. Souza Survival enhancement and hemopoietic regeneration following radiation exposure: Therapeutic approach using glucan and granulocyte colony-stimulating factor. Exp. Hematol. 18, 1042-1048, 1990
5. P. Mayer, E. Schütze, C. Lam, F. Kricek, E. Liehl Recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments neutrophil recovery and enhances resistance to infections in myelo-suppressed mice The J. Infectious Diseases: 163, 584-590, 1991
6. A. Dieterle, A. Gratwohl, R. Ritz, J. P. Obrecht, R. Obrist Single high-dose recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor: Results of a phase I tolerability study Annals of Oncology 2, 69-70, 1991
7. S. Vadhan-Raj, S. Buescher, H. E. Broxmeyer, a. LeMaistre, J. L. Lepe-Zuniga, G. Ventura, S. Jeha, I. J. Horwitz, J. M. Trujillo, S. Gillis, W. N. Hittelman, J. U. Gutterman Stimulation of myelopoiesis in patients with aplastic anemia by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. New England J. Medicine: 319, 1628-1634, 1988
8. C. Nissen, A. Tichelli, A. Gratwohl, B. Speck, A. Milne, E. C. Gordon-Smith, J. Schaedelin Failure of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy in aplastic anemia patients with very severe neutropenia. Blood: 72⁶, 2045-2047, 1988
9. S. W. Edwards, C. S. Holden, J. M. Humphreys, C. A. Hart Granulocyte-stimulating factor primes the respiratory burst and stimulates protein biosynthesis in human neutrophils. FEBS letters: 256^{1, 2} 62-66, 1989
10. S. R. McColl, C. Kreis, J. F. DiPersio, P. Borgeat, P. H. Naccache Involvement of guanine nucleotide binding proteins in neutrophil activation and priming by GM-CSF. Blood: 73², 588-591, 1989
11. D. Mauer, G. F. Fischer, T. Felzmann, O. Majdic, E. Gschwantler, W. Hinterbrger, A. Wagner, W. Knapp Ratio of complement receptor over Fc-receptor III expression: A sensitive parameter to monitor granulocyte-macrophage colony-stimulating factor effects on neutrophils. Ann. Hematol: 62, 135-140, 1991

12. I. C. Kowanko, A. Ferrante, D. P. Harvey, K. L. Carman Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments neutrophil killing of *Torulopsis glabrata* and stimulates neutrophil respiratory burst and degranulation. *Clin. Exp. Immunol.*: 83, 225–230, 1991
13. M. O. DeNichilo, A. G. Stewart, M. A. Vadas, A. F. Lopez Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is stimulant of platelet activating factor and superoxide anion generation by human neutrophils. *J. Biol. Chemistry*: 266⁸, 4896–4902, 1991
14. A. Knapp, G. Zeck-Kapp Activation of the oxidative metabolism in human polymorphonuclear neutrophilic granulocytes: The role of immuno-modulating cytokines. *J. Investigative Dermatology*, 95⁶, 94s–98s, 1990
15. M. Tamura, M. Matsumoto, T. Yoshino, S. Matsubara, N. Imai, M. Ono, T. Yokota Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on the mice receiving bone marrow transplantation following lethal irradiation: Acceleration of recovery of the peripheral blood neutrophils and potentiation of anti-*Pseudomonas* resistance. *Exp. Hematol.* 19, 18–23, 1991
16. A. A. Hollander, H. C. Kluin-Nelemans, H. R. Haak, A. C. Stern, R. Willemze, W. E. Fibbe Correction of neutropenia associated with chronic lymphocytic leukemia follow treatment with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Ann-hematol.*: 62¹, 32–34, 1991
17. A. Gratwohl, H. Dazzi, A. Tichelli, C. Stebler, M. Wernli, C. Thomsen, I. Kim, A. Dieterle, R. Obrist, A. Stern Emergency therapy with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Schweiz-Med.-Wochenschr.*: 121¹², 413–417, 1991
18. M. Tamura, M. Matsumoto, T. Yoshino, S. Matsubara, N. Imai, M. Ono, T. Yokota Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on the mice receiving bone marrow transplantation following lethal irradiation: Acceleration of recovery of the peripheral blood neutrophils and potentiation of anti-*pseudomonas* resistance. *Exp. Hematol.*: 19, 18–23, 1991
19. P. Marin, M. Rovira, C. Sanz, E. Montserrat, C. Rozman Effect of administration of rhGM-CSF in a patient with bone marrow aplasia resistant to immunosuppressive treatment. *Sangre-(Barc)*: 35⁵, 397–9, 1990
20. J. Palmblad, B. Jonson, L. Kanerud Treatment of drug-induced agranulocytosis with recombinant GM-CSF. *J. Intern.-Med.*: 228⁵, 537–9, 1990
21. A. M. Gianni, C. Tarella, S. Sienna, M. Bregni, M. Bossadoro, F. Lombardi, C. Bengala, G. Bonadonna, A. Pileri Durable and complete hematopoietic reconstitution after autografting of rhGM-CSF exposed peripheral blood progenitor cells. *Bone-marrow Transplant.*: 6², 143–145, 1990
22. M. Sai, Y. Kawanishi, K. Kuriyama, T. Kuratsuji, K. Toyama Changes in neutrophil counts and functions after the administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in a patient with chronic idiopathic neutropenia. *Rinsho-Ketsueki*: 31⁴, 484–486, 1990
23. A. A. Hollander, H. C. Kluin-Nelemans, H. R. Haak, A. C. Stern, R. Willemze, W. E. Fibbe Correction of neutropenia associated with chronic lymphocytic leukaemia following treatment with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Ann-Hematol.*: 62¹, 32–34, 1991

Szerző címe: Dr. Fűrész József, Budapest 1151
Váécgresi út 11.

J. Fűrész M. D., T. Dezsőfy M. D., L. Liptay M. D., Éva Pállinger M. D., Katalin Schweitzer Ph. D.

**EFFECT OF SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION
OF GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING
FACTOR ON POLYMORPHONUCLEAR GRANULOCYTES
IN PERIPHERAL BLOOD**

During cytostatic treatment of a patient with breast tumor the authors observed development of severe agranulocytosis and septic state. In order to continue the treatment, the patient was given GM-CSF subcutaneously on the 3rd and 4th day of cytostatic therapy. Within the first hour after GM-CSF administration, a marked decrease of PMNG occurred which was then followed by a significant increase in the 4th and 5th hours. The authors investigated functional changes of PMNG (using zymosan induced luminol dependent chemiluminescence - LDCL) during the treatment. They have concluded that LDCL indicative of PMNG activity showed a significant decrease in the first post-treatment hour, and then progressively increased. In the 4th and 5th hours the activity measured was the same as the initial value.

