



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Haematologica Polonica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem

Praca oryginalna/Original research article

Ocena znaczenia ekspresji błonowej dipeptydylo-peptydazy IV na komórkach hematopoetycznych u chorych ze szpiczakiem plazmocytowym poddawanych mobilizacji komórek krwiotwórczych



Meaning of dipeptidyl-peptidase IV on the haematopoietic cells in multiple myeloma patients undergoing haematopoietic stem cells mobilization

Małgorzata Krawczyk-Kuliś, Anna Kopińska*,
Joanna Dziaczkowska-Suszek, Katarzyna Bieszczad, Krystyna Jagoda,
Sławomira Kyrzcz-Krzemień

Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach,
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Sławomira Kyrzcz-Krzemień, Katowice, Polska

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 31.05.2013

Zaakceptowano: 08.01.2014

Dostępne online: 16.01.2014

Słowa kluczowe:

- ekspresja dipeptydylo-peptydazy IV
- CD26
- mobilizacja komórek hematopoetycznych
- szpiczak plazmocytowy

Keywords:

- Dipeptidyl-peptidase IV expression
- CD26
- Haematopoietic stem cell mobilization
- Multiple myeloma

ABSTRACT

Dipeptidyl peptidase IV is a membrane enzyme involved in intracellular interactions governing processes. Proven its effects on engraftment the transplanted allogeneic hematopoietic cells. The aim of this study was to analyze the expression of CD26 in the mobilization of hematopoietic cells for auto-transplantation in multiple myeloma patients. In 30 patients, who, during the 2011–2012, underwent the mobilization of hematopoietic cells, CD26 was determined on CD34 positive cells as well as on lymphocytes, monocytes and granulocytes, before mobilization procedures, as well as on the cells obtained after separation on cell separator. We found a statistically significant increase in the number of mononuclear cells expressing CD26, non-expression of CD26 on granulocytes, both before and during the mobilization procedures. Additionally we found a week expression of CD26 on CD34 positive cells. The obtained results seem to indicate an important role of bone matrix cells expressing CD26 in the process of mobilization of hematopoietic cells in myeloma multiplex patients.

© 2014 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

* Adres do korespondencji: Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku SUM, ul. Dąbrowskiego 25, 40-032 Katowice, Polska. Tel.: +48 507 312 967.

Adres email: cauda.equina@wp.pl (A. Kopińska).

Wstęp

Wysokodawkowana chemioterapia wspomagana autoprzeszczepieniem krwiotwórczych komórek macierzystych (AHSCT), mimo istotnego postępu w leczeniu chemioterapeutycznym, w ostatnich latach pozostaje nadal leczeniem z wyboru u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym (MM). Aktualnie źródłem macierzystych komórek krwiotwórczych (PBSC) wykorzystywanych do AHSCT w znacznej większości przypadków jest krew obwodowa [1].

Podczas mobilizacji PBSC stosuje się rutynowo chemioterapię mobilizującą i od +5. doby po chemioterapii mobilizującej podaje się czynnik wzrostu granulocytów (G-CSF) w dawce 5–10 µg/kg masy ciała. Leukaferezę komórek krwiotwórczych rozpoczyna się, gdy liczba progenitorowych komórek hematopoetycznych (HPC) wyniesie we krwi obwodowej powyżej 0,025 G/l, a dzieje się tak zazwyczaj około 10.–14. doby od rozpoczęcia chemioterapii mobilizującej. W większości przypadków podczas jednej mobilizacji komórek krwiotwórczych uzyskuje się $>2 \times 10^6$ komórek CD34+/kg masy ciała biorcy. Według wytycznych Europejskiego Towarzystwa Transplantacji Szpiku (EBMT; *European Bone Marrow Transplantation*), za ilość komórek CD34+ bezpieczną dla zapewnienia odnowy hemopoezy po AHSCT uznaje się $2\text{--}3 \times 10^6$ /kg masy ciała [2]. Udowodniono, że proces mobilizacji macierzystych komórek krwiotwórczych ze szpiku kostnego jest oparty na skomplikowanych reakcjach immunologicznych, w które zaangażowanych jest wiele chemokin [3]. Jednymi z lepiej poznanych są chemokiny z osi CXCL12 (SDF1; *stroma direct factor 1*) – CXCR4 (CD184). Jak wiadomo z dotychczas przeprowadzonych badań *in vitro*, jak również z badań na modelach zwierzęcych, dipeptydylo-peptydaza IV (CD26, DPP IV) – enzym błonowy inaktywujący chemokinę CXCL12 powoduje przerwanie połączenia pomiędzy dojrzewającymi komórkami hematologicznymi a macierzą szpiku kostnego poprzez receptor CXCR4 [4]. Sytuacja taka ma miejsce podczas mobilizacji PBSC do krwi obwodowej. Wykazano również, że dodanie do hodowli komórkowej *in vitro* G-CSF powoduje znaczący wzrost liczby komórek z ekspresją antygenu CD26 [4]. *In vivo* w wyniku wzrostu aktywności DPP IV przerywane są połączenie pomiędzy mikrośrodowiskiem szpiku a komórkami CD34+ uwalnianymi do krwi obwodowej [4]. Wykazano natomiast, że u zdrowych dawców na zmobilizowanych komórkach CD34+ ekspresja antygenu CD26 jest niska [5].

Dotychczas nie badano, czy *in vivo* występuje zależność pomiędzy ilością skolekcjonowanych komórek CD34+ a liczbą komórek jednojądrzastych z ekspresją receptora CD26 podczas mobilizacji PBSC u chorych ze szpiczakiem plazmocytowym.

Celem niniejszego badania była ocena liczby limfocytów, monocytów, granulocytów oraz komórek CD34+ z ekspresją enzymu DPP IV pobranych z krwi obwodowej przed mobilizacją oraz z materiału uzyskanego podczas leukaferazy, a także ocena korelacji liczby komórek jednojądrzastych z ekspresją antygenu CD26 z liczbą skolekcjonowanych komórek CD34+ u pacjentów z MM.

Materiał i metody

Badanie zostało zaaprobowane przez Komisję Bioetyczną Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Pacjenci wyrazili świadomą, pisemną zgodę na udział w badaniu.

Do prospektywnego badania zakwalifikowano w latach 2011–2012 w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku w Katowicach kolejnych 35 pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym, zakwalifikowanych do leczenia AHSCT, u których planowano rozpoczęcie leczenia mobilizującego. Trzydziestu z nich (14 kobiet, 16 mężczyzn) z medianą wieku 53 lata (39–71), u których stwierdzono obecność komórek CD34+ we krwi obwodowej przed rozpoczęciem leczenia mobilizującego, włączono do badania. Szczegółowa charakterystyka pacjentów została przedstawiona w tabeli I.

Wszyscy pacjenci jako chemioterapię mobilizującą otrzymali dożylnie cyklofosfamid w dawce 2–4 g/m², a od +5. doby aż do ostatniego dnia mobilizacji podawano im podskórną G-CSF w dawce 10 µg/kg masy ciała/dobę. Aferezę rozpoczęto, gdy liczba komórek HPC we krwi obwodowej wyniosła co najmniej 0,025/µl przy leukocytozie >4 G/l. Zabiegi przeprowadzono na separatorze komórkowym Cobe Spectra. U 5 chorych 1 zabieg leukaferazy był wystarczający do uzyskania bezpiecznej dla przeprowadzenia AHSCT liczby komórek CD34+. W 16 przypadkach przeprowadzono zabieg dwukrotnie, a u pozostałych pacjentów aferezę trzeba było przeprowadzić co najmniej trzykrotnie.

Materiałem do badań fenotypowych była krew obwodowa w ilości 3 ml pobrana do próbówki z EDTA-K2 oraz materiał z worka kolekcyjnego o objętości 2 ml. Odsetek komórek CD34+ oznaczano wg metody ISHAGE na komórkach krwi obwodowej przed rozpoczęciem chemioterapii, jak również z worka kolekcyjnego [6].

Liczbę komórek z błonową ekspresją antygenu CD26 badano w tych samych punktach czasowych, czyli przed rozpoczęciem leczenia mobilizującego, na komórkach pobranych z krwi obwodowej oraz na komórkach z materiału kolekcyjnego po leukaferazach. Do badania użyto przeciwciał monoklonalnych sprzężonych z odpowiednimi fluorochromami: anty-CD26, anty-CD34 (firma Becton-Dickinson). Jako kontroli izotypowych użyto przeciwciał mysich IgG1.

Tabela I – Charakterystyka ogólna pacjentów włączonych do badania

Table I – Characteristic of patients including to the study

Parametry kliniczne	Dane
pleć (k/m)	14/16
mediana wieku (zakres)	53 (39–71)
liczba poprzednich linii leczenia 1/2/3 lub więcej	18/9/3
podtyp szpiczaka plazmocytozowego	12/6/2/5/4/1
IgGκ/IgGλ/IgAλ/IgAκ/ch.ł.l./MM niewydzielający	
odpowiedź na leczenie przed mobilizacją	7/14/9/0
CR/VGPR/PR/NR	
ch.ł.l. – choroba łańcuchów lekkich; MM – szpiczak plazmocytowy; CR – całkowita remisja; VGPR – bardzo dobra częściowa odpowiedź; PR – częściowa odpowiedź; NR – brak remisji	

Tabela II – Ekspresja antygenu CD26 na poszczególnych subpopulacjach leukocytów pobranych z krwi obwodowej przed mobilizacją i z worka kolekcyjnego po separacji
Table II – Expression of CD26 antigen on the subpopulation leukocytes taking from blood before mobilization and the collection bag after the separation

Populacja komórek	Komórki z ekspresją antygenu CD26 w % mediana (zakres) przed mobilizacją	Komórki z ekspresją antygenu CD26 w % mediana (zakres) po mobilizacji	Współczynnik korelacji R	Wartość p
Komórki CD34+	4,5 (0–12,5)	2,7 (0–17,9)	0,30	0,07
Komórki jednojądrzaste	49,65 (24,5–89)	79,95 (57,5–83)	0,38	0,000046
Limfocyty	50,7 (24,1–84,6)	68,4 (52,8–85,8)	0,56	0,000004
Monocyty	4,5 (0,2–8,1)	13,5 (0–92,1)	0,31	0,000013
Granulocyty	0,07 (0–0,7)	1,8 (0–3,8)	0,92	0,34

Próbki krwi obwodowej i z worków kolekcyjnych o objętości 100 µl i komórkowości do 1×10^8 leukocytów inkubowano z przeciwciałami monoklonalnymi przez 15 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła, a następnie poddano lizie w BD FACS Lyse Wash Assistant firmy Becton-Dickinson. Pomiary wykonano metodą wielokolorowej cytometrii przepływowej z użyciem cytometru przepływowego FACS Canto II. Ekspresję antygenu CD26 analizowano na odpowiednio wyreparowanych histogramach na populacjach limfocytów, monocytów, granulocytów oraz na komórkach CD34+.

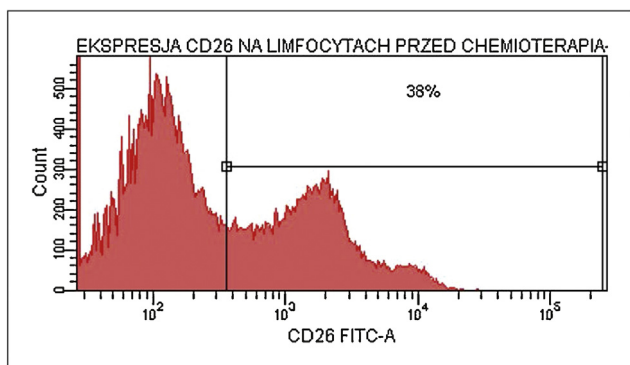
Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu kilku metod statystycznych. Do oceny ekspresji CD26 na komórkach CD34+, limfocytach, monocytach oraz granulocytach pobranych z worka kolekcyjnego oraz z krwi obwodowej przed mobilizacją oraz liczby zgromadzonych komórek CD34+ podczas kolekcji określono medianę. Dla oceny różnic pomiędzy ekspresją CD26 na populacjach leukocytów przed i po separacji zastosowano test Wilcozona. Za krytyczny poziom istotności uznano $p = 0,05$. Celem określenia zależności pomiędzy liczbą komórek jednojądrzastych z ekspresją CD26 a liczbą zebranych komórek CD34+ (rozkład różny od normalnego) obliczono współczynnik korelacji rang Spearmana. Dla oznaczenia poziomu istotności stwierdzonych zależności zastosowano następujące oznaczenia ns- $p > 0,05$ wartość nieistotna statystycznie, $p < 0,05$ wartość istotna statystycznie. Wszystkich obliczeń dokonano w programie statystycznym STATISTICA 9.1

Wyniki

U 28 na 30 (93%) pacjentów zgromadzono wystarczającą liczbę komórek CD34+ do przeprowadzenia AHSCT. U dwóch pacjentów skolekcjonowano jedynie odpowiednio: $1,2 \times 10^6$ /kg mc. oraz $1,63 \times 10^6$ /kg mc. komórek CD34+. Mediana ilości zgromadzonych komórek CD34+ podczas mobilizacji wyniosła $6,5 \times 10^6$ /kg mc. (1,2–13,98). Mediana liczby komórek z ekspresją CD26 na jednojądrzastych leukocytach krwi obwodowej przed mobilizacją wynosiła 49,65% (zakres 24,5–89), natomiast w materiale uzyskanym w trakcie separacji 79,95% (zakres 57,5–183) (Tab. II). Różnica ta była znamienna statystycznie ($p = 0,00002$). Przykładowe cytogramy uzyskane w trakcie oceny CD26 na komórkach jednojądrzastych z krwi obwodowej oraz materiału separacyjnego przedstawiają ryciny 1 i 2.

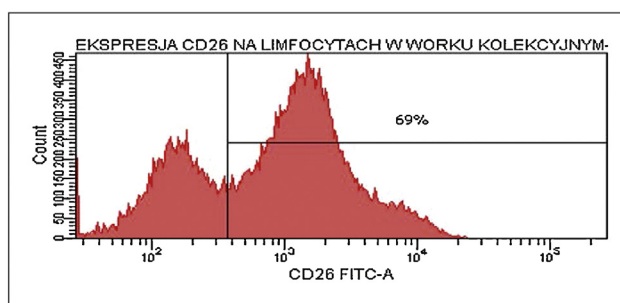
Komórki CD34+ wyizolowane z krwi obwodowej przed leczeniem mobilizującym wykazywały słabą ekspresję antygenu CD26, mediana liczby komórek CD34+CD26+ wynosiła 4,5% (0–12,5%) (Tab. II). W materiale uzyskanym podczas mobilizacji liczba komórek CD34+ z ekspresją enzymu DPP IV nie uległa zwiększeniu – mediana 2,7% (0–17,9%).

Nie wykazano znamienności statystycznej pomiędzy liczbą zmobilizowanych komórek CD34+ a liczbą komórek jednojądrzastych z ekspresją CD26 zarówno przed mobilizacją, jak i z materiału separacyjnego ($R = 0,12$; $p = 0,53$ oraz $R = 0,12$; $p = 0,54$).



Ryc. 1 – Przykładowy wykres ekspresji CD26 na limfocytach przed chemioterapią mobilizującą

Fig. 1 – CD26 expression on lymphocytes before mobilization chemotherapy



Ryc. 2 – Przykładowy wykres ekspresji CD26 na limfocytach pobranych z worka kolekcyjnego

Fig 2 – CD26 expression on lymphocytes from the collecting bag

Podsumowanie wyników

Po chemioterapii mobilizującej cyklofosfamidem oraz G-CSF u chorych ze szpiczakiem plazmocytowym wykazano znamiennej statystycznie wzrost ekspresji CD26 na komórkach jednojądrzastych, głównie limfocytach. Nie wykazano ekspresji dipeptydylo-peptydazy IV na komórkach CD34+ zarówno na pobranych z krwi obwodowej przed leczeniem mobilizującym, jak i na komórkach CD34+ z worka kolekcyjnego po leukaferezie. Nie wykazano zależności pomiędzy liczbą komórek jednojądrzastych z ekspresją CD26 a liczbą komórek CD34+ uzyskanych w czasie separacji.

Omówienie

Autoprzeszczepienie macierzystych komórek krwiotwórczych jest optymalnym sposobem leczenia chorych na szpiczaka plazmocytozowego dającym zarówno wydłużenie czasu wolnego od progresji choroby, jak i wydłużenie całkowitego przeżycia [2]. PBSC niezbędne do wykonania AHSCT są pobierane z krwi obwodowej po poprzedzającym leczeniu mobilizującym i następczym kolekcjonowaniu na separatorach komórkowych. Problemem pozostaje brak możliwości zebrania wystarczającej liczby komórek CD34+ pozwalającej na bezpieczne przeprowadzenie zabiegu autotransplantacji u części chorych. Dipeptydylo-peptydaza IV jest enzymem, który może mieć wpływ na mobilizację komórek krwiotwórczych ze szpiku kostnego do krwi obwodowej. Przeprowadzone badania na myszach potwierdzają, że całkowity brak ekspresji DDP IV na komórkach po zastosowaniu G-CSF wpływa niekorzystnie na skuteczność mobilizacji [4, 7]. Udowodniono, że G-CSF zwiększa ekspresję CD26 na komórkach jednojądrzastych pozyskiwanych z krwi pępowinowej [8]. W naszym badaniu również potwierdzono wzrost liczby komórek jednojądrzastych, szczególnie limfocytów z ekspresją enzymu DPP IV po podaniu leczenia mobilizującego. Przeprowadzone przez nas badania nie wykazały granulocytów z ekspresją CD26 zarówno przed, jak i po leczeniu mobilizującym.

Jak wiadomo, DDP IV bierze udział w wielu reakcjach regulatorowych. Udowodniono znaczenie tego enzymu w patogenezie w cukrzycy typu 2 [9] oraz w przewlekłych chorobach zapalnych z szczególnym uwzględnieniem chorób autoimmunologicznych [10]. W transplantologii oddziaływaniem błonowego enzymu DDP IV wiąże się z immunoregulującym wpływem bezpośrednio na oś SDF-1 – CXCR4 [5]. Zwiększona jego ekspresja na komórkach hematopoetycznych w szpiku kostnym ułatwia ich uwalnianie do krwi obwodowej na zasadzie reakcji enzymatycznej. Większość dotychczasowych badań została przeprowadzona na zwierzętach [4, 7] lub dotyczyła wszczepiania się komórek CD34+ oraz regeneracji układu krwiotwórczego po allotransplantacji macierzystych komórek krwiotwórczych [5, 11]. Prabhash i wsp. w badaniu dotyczącym wpływu ekspresji CD26 na wszczepianie się komórek krwiotwórczych przebadali nie-liczną, niejednorodną pod względem rozpoznania grupę 17 chorych poddanych AHSCT [5]. Wykazali oni ujemną korelację pomiędzy ekspresją CD26 a początkiem regeneracji układu białokrwinkowego. Wykazali oni również wysoką ekspresję

CD26 na komórkach CD34+ [5]. W naszym badaniu nie wykazaliśmy ekspresji enzymu DDP IV na komórkach CD34+ pobranych z krwi obwodowej przed leczeniem mobilizującym, jak również wzrostu liczby komórek CD34+ z ekspresją DDP IV po leukaferezie. Podobną obserwację na myszach opisali Bonig i wsp. [12].

Według naszej wiedzy, przeprowadzone przez nas perspektywne badanie jest jednym z pierwszych dotyczącym oceny wpływu zależności pomiędzy ekspresją CD26 a ilością pozyskiwanych komórek krwiotwórczych u chorych ze szpiczakiem plazmocytozowym. Wykazanie przez nas znaczącego wzrostu liczby komórek jednojądrzastych, a szczególnie limfocytów z ekspresją CD26 podczas mobilizacji, przy braku statystycznie znamiennej korelacji z ilością komórek CD34+ skolekcjonowanych po leczeniu mobilizującym wymaga potwierdzenia w kolejnych badaniach na większej grupie chorych. Wydaje się, że interesujące może być również zbadanie zależności ekspresji DDP IV na komórkach krwiotwórczych względem ekspresji innych chemokin zaangażowanych w mechanizmy interakcji międzykomórkowych jak CXCR4 czy CXCL12.

Podsumowanie

Przeprowadzone przez nas obserwacje ekspresji dipeptydylo-peptydazy IV na komórkach jednojądrzastych podczas mobilizacji komórek krwiotwórczych w szpiczaku plazmocytozowym są badaniami pilotowymi, ale uzyskane wstępne wyniki potwierdzające zwiększenie ich liczby w materiale pozyskiwanym do przeszczepienia komórek krwiotwórczych uzasadniają ich kontynuację.

Wkład autorów/Authors' contributions

MKK – koncepcja i przygotowanie pracy. SKK – koncepcja pracy, pozyskanie środków (finansowania). AK – zebranie danych, analiza statystyczna, przygotowanie pracy, przygotowanie literatury. KB, KJ – interpretacja danych. JDS – przygotowanie pracy, przygotowanie literatury.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Praca powstała w ramach badania statutowego Nr KNW-1-068/P/1/0, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, Wydział Lekarski w Katowicach.

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

- [1] Demiriz IŞ, Bozdağ SC, Tekgündüz E, et al. Predicting the successful peripheral blood stem cell harvesting. *Transfus Apher Sci* 2013;48(3):411-414.
- [2] San-Miguel J, Perez-Simon J, Mateos MV. Multiple myeloma, The EBMT Handbook 6th Edition, Haematopoietic Stem Cell Transplantation, Red. APPerley J, ESH. EBMT Ed Paris 2012;386-401.
- [3] Broxmeyer HE. Chemokines in hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 2008;15:49-58.
- [4] Paganessi L, Walker LA, Tan LL, et al. Effective mobilization of hematopoietic progenitor cells in G-CSF mobilization defective CD26+/- mice through AMD3100- induced disruption of CXCL12-CXCR4 axis. *Exp Hematol* 2011;39:384-390.
- [5] Prabhaskar K, Khattry N, Bakshi A, et al. CD26 expression in donor stem cell harvest and its correlation with engraftment in human haematopoietic stem cell transplantation: potential predictor of early engraftment. *Ann Oncol* 2010;21:582-588.
- [6] Barnett D, Janossy G, Lubenko A, et al. Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34+ haematopoietic stem cells. Prepared by the CD34+ haematopoietic stem cell working party. General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. *Clin Lab Haematol* 1999;21(5):301-308.
- [7] Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, et al. AMD3100 and CD26 modulate mobilization Engraftment and survival of hematopoietic stem and progenitor cell mediated by the SDF-1/CXCL12-CXCR4 axis. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1106:1-19.
- [8] Christopherson KW, Uralil SE, Porecha NK, et al. G-CSF- and GM-CSF-induced upregulation of CD26 peptidase downregulates the functional hemopoietic response of CD34+CD38- human cord blood haematopoietic cells. *Exp Hematol* 2006;34:1060-1068.
- [9] Lee SA, Kim YR, Yang EJ, et al. CD26/DPP4 levels in peripheral blood and T cells in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2013 [epub ahead of print].
- [10] Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Dang NH, Morimoto C. CD26-mediated co-stimulation in human CD8+ T cells provokes effector function via proinflammatory cytokine production. *Immunology* 2013;138:165-172.
- [11] Jiang L, Malik S, Litzow M, et al. Hematopoietic stem cells from poor and good mobilizers are qualitatively equivalent. *Transfusion* 2012;52:542-548.
- [12] Bonig H, Priestley GV, Oehler V, Papayannopoulou T. Hematopoietic progenitor cells (HPC) from mobilized peripheral blood display enhanced migration and marrow homing compared to steady-state bone marrow HPC. *Exp Hematol* 2007;35:326-334.