

KLİNİK ARAŞTIRMA

**RİTUKSİMAB VE ZOLEDRONİK ASİTİN
MULTİPL MİYELOM HÜCRE SERİLERİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

THE EFFECT OF RITUXIMAB AND ZOLEDRONIC ACID COMBINATIONS
AGAINST MULTIPLE MYELOMA CELL LINES

Cengiz CEYLAN
Özden PİŞKİN
Halil ATEŞ
Güner Hayri ÖZSAN
Mehmet Ali ÖZCAN
Mine MİSKİOĞLU
Fatih DEMİRKAN
Ertan ÖZDEMİR
Bülent ÜNDAR

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada multipl miyelom hücre serilerinde CD 20 antijeni pozitif ve negatif hücre serilerinde rituksimab ve zoledronik asitin anti-miyelom etkilerini araştırdık.

Gereç ve Yöntem: ARH-77 (CD20 pozitif) ve RPMI-8226 (CD20 negatif) multipl miyelom hücre serileri rituksimab ve zoledronik asit ile tek veya birlikte kültüre edildi. ARH-77 hücre serileri ve RPMI 8226 hücre serilerinde CD20 baskılayıcı etkileri araştırıldı.

Bulgular: Çalışmada bu iki maddenin antagonistik aktivite gösterdiklerini saptadık. Kompleman tek başına RPMI 8226 hücre serilerinde proliferatif etki gösterdi.

Sonuç: Multipl miyelom ve plazma hücre lösemilerinde rituksimab kullanımının uygun bir yaklaşım olmadığını düşünüyoruz.

Anahtar Sözcükler: Multipl miyelom, CD20, Zoledronik asid, Rituksimab, Kompleman

Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Hematoloji, İzmir
(Uzm. Dr. C Ceylan)

Dokuz Eylül Üniversitesi, Hematoloji Bilim Dalı, İzmir

(Prof. Dr. GH. Özsan, Prof. Dr. M.A. Özcan, Prof. Dr. F. Demirkan, Prof. Dr. B. Ündar, Yrd. Doç. Dr. Ö. Pişkin, Biyolog H. Ateş)

Celal Bayar Üniversitesi, Hematoloji Bilim Dalı, İzmir

(Prof. Dr. E. Özdemir, Yrd. Doç. Dr. M. Miskioğlu)

Yazışma: Uz. Dr. Cengiz Ceylan

SUMMARY

Aim: In this study, we have investigated the anti-myeloma effect of the combination of these two agents againsts CD 20 antigen positive and negative multiple myeloma (MM) cell lines.

Material and Method: ARH-77 and RPMI-8226 were cultured with rituximab and zoledronic acid singly or combination. After evaluation for proliferation inhibition CD20 measurements is made for ARH-77 cell line and RPMI-8226 cell line in efficient concentrations.

Findings: We have found that these two agents had antagonistic activity againsts both ARH-77 and RPMI-8226 cell lines. As an unexpected finding, complement alone exhibited prominent proliferative activity on RPMI -8226 cells.

Conclusion: In MM and plasma cell leukemia in which there is potential for rituximab use, it is suggested that combination with zoledronic acid may not be a suitable approach.

Key words: Multiple myeloma, CD20, Zoledronic acid, Rituximab, Complement

GİRİŞ

Multipl miyelom (MM) plazma hücrelerinin neoplastik hastalığıdır. Standart doz kemoterapiler ile iyileşme olasılığı yoktur. Günümüzde % 30-40 oranında standart doz yüksek doz kemoterapiler sonrasında yapılan olog kök hücre nakilleri ile tam gerileyebilir (1-3). Kemik iliği üzerine miyelosupresyon yapan miyeloablative ve miyelosupresyon yapmayan miyeloablative olmayan allojenik ilik nakilleri ile umut verici sonuçlar alınmaktadır (4,5). Bununla birlikte hastaların %30'dan daha azı allojenik kemik iliği nakillerine adaydır. Osteoklastik kemik yıkımı üzerine bifosfonatların koruyucu etkisi iyi bilinmektedir. En potent bifosfonat zoledronik asittir (ZA) ve anti-proliferatif, apoptotik etkiler farklı hücre serilerinde gösterilmiştir (6), 100-500 µM konsantrasyonlarda ZOL'un MM hücre serilerinde apoptozisi indüklediği ve interlöin-6'nın proliferatif etkilerini inhibe ettiği gösterilmiştir (7,8). Paklitaksel ile kombine kullanıldığında tamoxifen ve dexametazon in vitro olarak MM ve meme kanserli hücre serilerinde sinerjistik aktivite göstermektedirler (9,10).

CD20 prekürsör ve olgun B lenfositlerinde trans membran antijenidir. İlk çalışmalar plazma hücrelerinin CD 20 içermediğini göstermiştir (11). Daha sonraki çalışmalarda neoplastik plazma hücrelerinde CD 20 ekspresyon oranlarının % 20-100 arasında olduğu gösterilmiştir (12,13). CD20 pozitif MM hastaları ile negatif olanların karşılaştırılması yapıldığı zaman bu antijenin ekspresyonunun daha agresif fenotip ile ilişkili olabildiği belirtilmiştir (13).

RTX,B-hücreli lenfomalarda kullanılan ve CD20 antijenine karşı geliştirilmiş monoklonal antikordur. Anti-neoplastik etkisi üç şekilde ortaya çıkmaktadır: Antikor bağımlı selluler sitotoksiste, kompleman

bağımlı sitotoksiste ve apoptozu başlatma (14-16). RTX klasik? aktivasyonu ve kompleman bağımlı sitotoksiste izole B lenfoma hücreleri ve B hücre serilerinde son derecede etkilidir (16-18). Kompleman aktivasyonunu sağlar (19). Kompleman aktivasyonu imunglobulinlerin Fc bölgesi C1q bölgesine bağlanarak sağlanır (20). RTX başlandıktan sonra 6.ncı ayda olog kemik iliği nakli gerçekleştirilen 2 hastada tam gerileme olduğunu gösteren çalışma ile RTX etkinliğini gösteren bulgular saptanmıştır (21). Ayrıca yeni teşhis edilen MM'lu hastalarda melfalan-prednizolon tedavisi ile birlikte tüm sağ kalım sürelerini uzattığı saptanmıştır (22). Bu çalışmanın amacı RTX ve ZA-RTX birlikteliğinin CD20 pozitif ve CD 20 negatif MM hücre serilerinde etkinliğini araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

İlaçların temini

ZA,Novartis Pharma AG (Basel, İsviçre)'den sağlandı ve üretici direktifleri doğrultusunda hazırlandı ve depolandı. RTX Roche AG (Basel, İsviçre)'den sağlandı ve üretici direktifleri doğrultusunda hazırlandı ve depolandı. Tavşan komplemanı INNO-TRAIN Diagnostic GmbH (Kronberg/Taunus) den sağlandı.

Hücre serileri

CD20(+) ARH 77 ve CD 20(-) RPMI 8226 hücre serileri Dr. Ali Uğur Ural tarafından hediye edildi. Hücre serileri %10 ısı inaktive fetal sığır serumu (Biological Industries,İsrael), 1 mmol/L L-glutamin 100 U/ml penisilin (Biological Industries, Israel), 100 µg/ml streptomisin (Biological Industries,İsrael) ve 4 µg/ml amfoterisin B (Biological Industries, Israel) 37 C de % 5 CO2 ortamda 1 hafta ile RPMI 1640 da üretildi.

Sitotoksik ölçüm

XTT (Roche Diagnostik, Almanya) inhibisyon ve proliferasyon ölçümleri, ilgili makaledeki direktifler doğrultusunda yapıldı (23). Her bir hücre serisi ortamdan toplandı ve 1×10^4 hücre içeren yuvacıklara yerleştirildi. RTX 4,8,16,32 ve 64 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlar, ZA 1,10,50,100,200 $\mu\text{mol/l}$ konsantrasyonlar eklendi. 25 $\mu\text{g/ml}$ tavşan komplemanı RTX içeren yuvacıklara eklendi (24,25). Yuvacıklar % 5 CO₂ de 37C'de inkübe edildi. ZOL ve RTX ile ARH 77 hücre serisinin 48 saatlik inkübasyon periyodu (ikileşme zamanı: 30 saat) ve RPMI 8226 hücre serisinin 72 saatlik inkübasyon periyodu (ikileşme z.:60 saat) sonrasında, XTT solüsyonu yuvacıklara eklendi ve tekrar 4 saat inkübe edildi. Örneklerin spektrofotometrik absorbans dalgası, (ELISA) okuyucuda ölçüldü. Absorbans 450 nm da okundu. Referans dalga boyu 650 nm idi ve her bir ölçüm 3 kez tekrarlandı. Sonraki ilaç dozları IC50 değerine göre seçildi. Tablo 1 deki gibi farklı ZA ve RTX birleşimi ölçüldü. 25 $\mu\text{m/l}$ tavşan komplemanı hücrelere eklendi. Hücreler RTX olmadan da komp-

laman ile kontrol amaçlı ölçüldü. ARH-77 inkübasyonun 48.saatinde, RPMI 72.saatinde XTT ile ölçüldü.

Hücre serilerinde CD20 antijeninin ölçülmesi

CD20 antijeni RTX öncesi ve sonrasında ARH 77 ve RPMI 8226 hücre serilerinde akım sitometrisinde (FACS calibur) analize edildi.

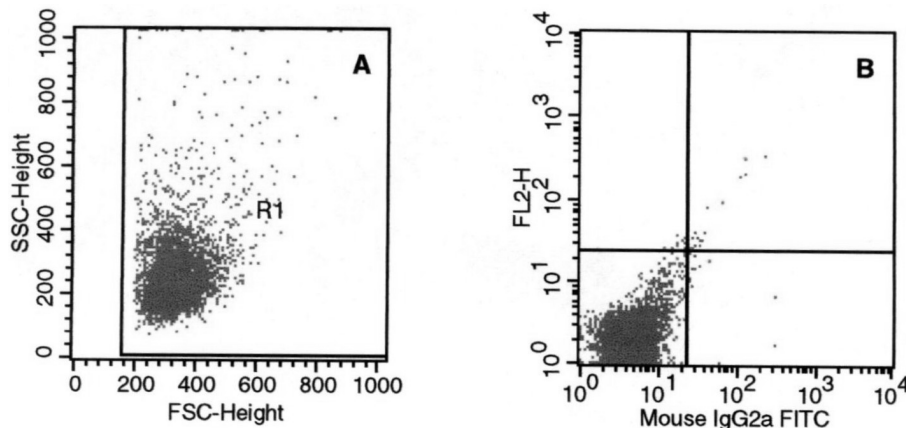
BULGULAR

ARH 77 hücrelerinin bazal CD20 ekspresyonu % 96 dan fazla saptandı. ZOL ile ARH 77 hücrelerinin CD20 ekspresyonu üzerine etkisinin olmadığı, RTX ise CD20 antijeni ekspresyonunu tamamen kaplamaktaydı (Şekil 1 ve 2). RPMI 8226 hücre serilerinin CD20 ekspresyonu % 6 idi ve RTX tamamını bloke etmişti (Şekil 3 ve 4). ARH-77 hücreleri üzerine ZOL doz bağımlı inhibitör etkisi mevcuttu (Şekil 5). ZOL IC50 39 μM . ZOL RPMI-8226 üzerine 1-10 μM konsantrasyonlarda doz bağımlı etkisi mevcuttu. Ancak 10 μM üzerinde etki olmadığı saptandı (Şekil 5). IC50 6 μm saptandı.

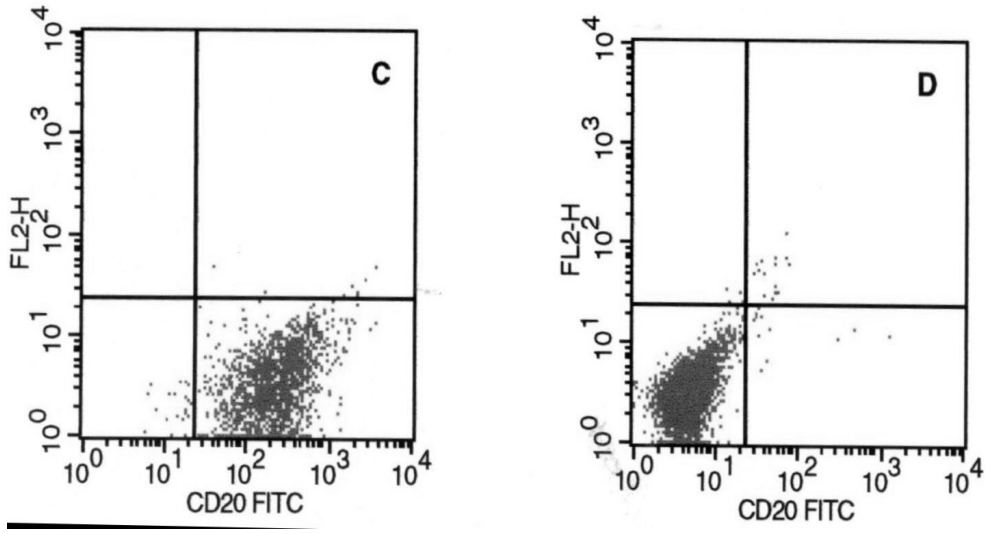
Tablo 1. ZA(μM) ve RTX ($\mu\text{g/ml}$) için kullanılan doz şeması

ZA Dozu	RTX(1)	RTX(5)	RTX(10)	RTX(20)	RTX(40)
(1)	A	A,R	A,R	A,R	R
(10)	A	A,R	A,R	A,R	R
(50)	A	A,R	A,R	A,R	R
(100)	A	A,R	A,R	A,R	R

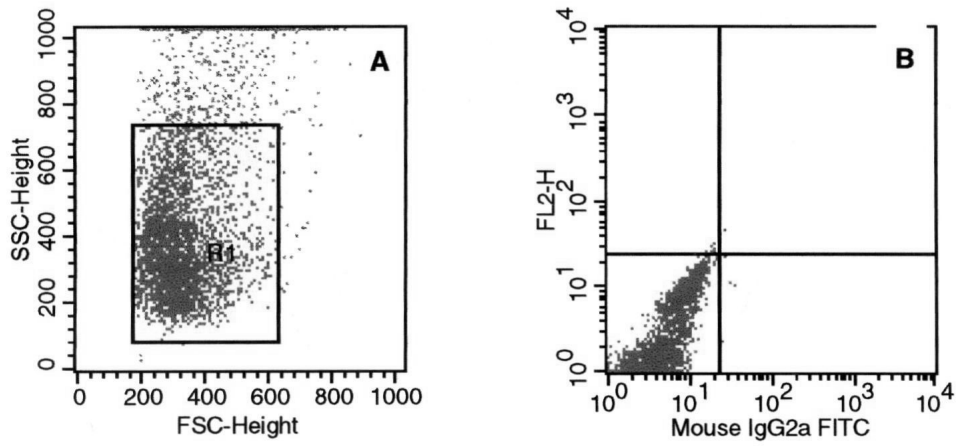
A: ARH 77 hücre serileri için yapılan kombinasyon dozları, R: RPMI 8226 hücre serileri için kullanılan kombinasyon dozları



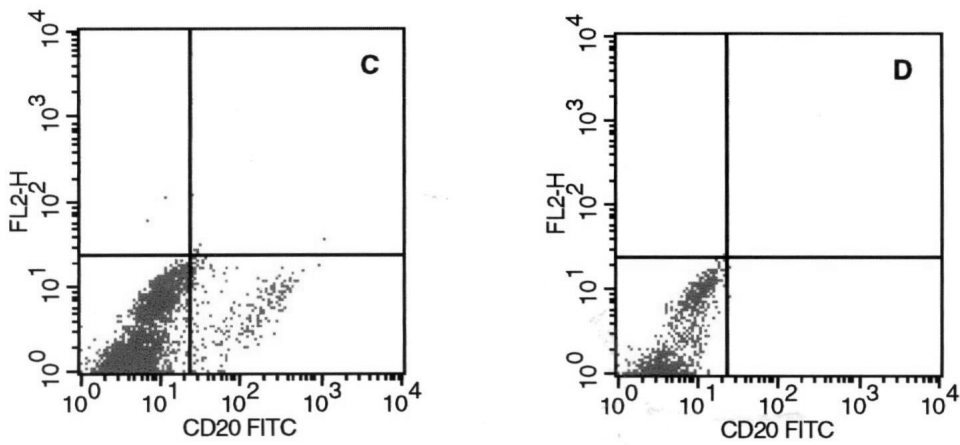
Şekil 1. ARH-77 hücre serisinde A:Hücrelerin R1 kapı ekspresyonları, B: izotipik kontrol



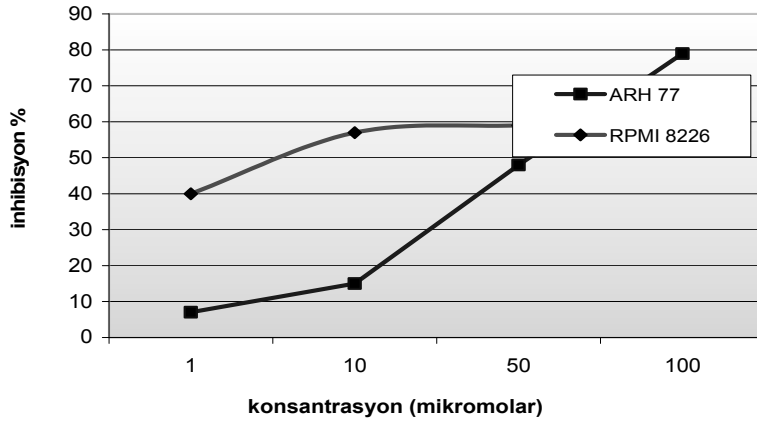
Şekil 2. C: ARH-77 hücre serisinin CD 20 ekspresyon düzeyi (% 96), D: RTX sonrası CD20 ekspresyonları (Tamamı ile blokaj oluşmakta)



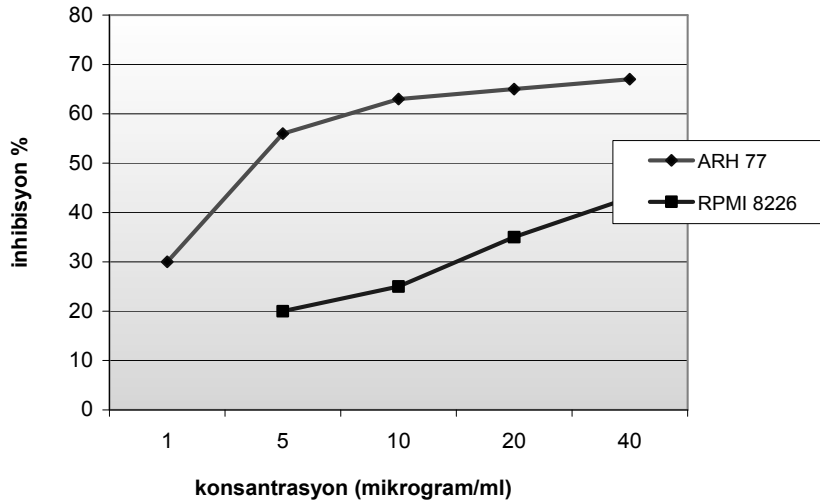
Şekil 3: A: RPMI-8226 hücre serisinin R1 kapı görünüşü, B: izotipik kontrol



Şekil 4. C: RPMI-8226 hücre serisinin CD20 ekspresyon düzeyi (% 6), D: RTX sonrası blokaj oluşmakta



Şekil 5. Zoledronik asit'in hücre serilerine etkileri

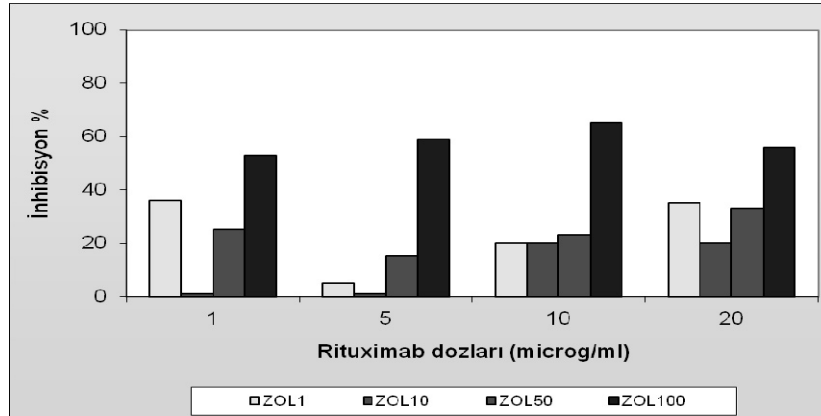


Şekil 6. Rituksimab'ın hücre serilerine etkileri

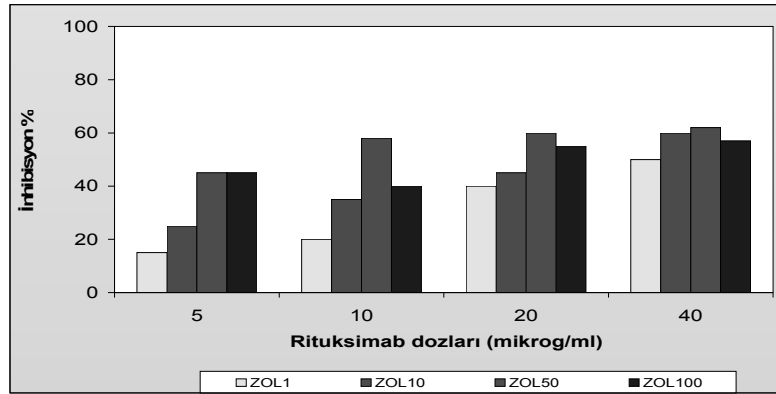
Beklendiği gibi RTX CD 20 negatif RPMI 8226 hücreleri üzerine tavşan komplemanı ekmeden etkili değildi, ilginç bir şekilde RTX olmadan tavşan komplemanının RPMI 8226 hücreleri üzerinde % 80 büyüme gösterdi. ARH 77 hücreleri üzerine tavşan komplemanı eklenmesi baskılayıcı etki gösterdi ve IC50 4.3 µg/ml saptandı. RPMI 8226 hücreleri üzerinde kısmi baskılayıcı etki elde etmek için yüksek yoğunlukta RTX eklenmesi gerekti. Tavşan komp-

lemanı varlığında IC 20 ve IC 50 değerleri sırasıyla 10 µg/ml ve 45 µg/ml olarak saptandı (Şekil 6).

Kombinasyon indeksi(CI) $CI = d1/D1 + d2/D2$ formülü ile hesaplandı. ZA ve RTX etkili konsantrasyonları arasında tüm kombinasyon çalışmaları (Tablo 2 ve 3) çalışıldı ve her iki hücre serilerinde antagonistik etki saptandı(CI>1) (Şekil 7 ve 8).



Şekil 7. CD20(+) ARH 77 hücre serisinde kombinasyonun etkileri



Şekil 8. CD 20(-) RPMI 8226 hücre serisinde kombinasyon etkileri

Tablo 2. Kombinasyon ile ARH-77 hücrelerinin baskılama yüzdesi

ZA Dozu(µM)	RTX(5µg/ml)	RTX(10µg/ml)	RTX(20µg/ml)
1	5*	20	35
10	1	20	20
50	15	23	33
100	59	65	56

Tablo 3. Kombinasyon ile RPMI-8226 hücrelerinin baskılama yüzdesi

ZA Dozu (µM)	RTX(5µg/ml)	RTX(10µg/ml)	RTX(20µg/ml)
1	15*	20	40
10	25	35	45
50	45	58	60
100	45	40	55

TARTIŞMA

Jackson ve arkadaşları tarafından yapılan ilk çalışmalarda plazma hücrelerinde CD20 antijeni negatifti (11), sonraki çalışmalarda MM hastaların % 22'sinde kısmi veya tamamen CD 20 antijeni içeren plazma hücreleri saptandı (12,13). CD20 pozitifliği ve

küçük şekilli olgun görünen plazma hücrelerinin arasındaki ilişki ilk kez Bartl ve arkadaşları arasında ilk keşfedildi (26). Sindekan-1 (CD138) malin plazma hücrelerinde, MM hücre serilerinin çoğunda ve hasta örneklerinde eksprese edilir (27,28). CD138 ekspresyonu terminal safhadaki plazma hücrelerinde de eksprese edilmekte çünkü son derece proliferatif

normal plazmablastlar ve tüm erken B-hücre evreleri bunlarda yoktur (29,30). William ve arkadaşları hem insan MM hücre serileri ve primer hasta örneklerinden yüksek derece klonojenik olanların CD138 eksprese etmediklerini gösterdiler. (31).

Hofer ve arkadaşları 64 yaşında CD20 negatif kötü diferansiye ve otoimmun hemolitik anemili bir hastanın RTX tedavisine cevap verdiğini gösterdiler. Bu hastada CD 20 negatif olmasına rağmen dramatik yanıt verdi ve IgM farkı düştü. RTX tedavisinden sonra 10. haftada yapılan kemik iliği biyopsisinde miyelom hücrelerinde belirgin azalma izlendi. CD 20 MM hücreleri üzerinde beklenmedik RTX etkisinin mekanizmasını; ilacın prekürsör CD20 pozitif hücreler üzerine etkisi ile açıkladılar (32). Pıllarski ve arkadaşları miyelomlu hastaların periferik kanlarında klonotipik B hücreleri tespit edip, 5 aylık anti CD20 tedavisi sonrası hastaların yaşam oranlarında etki etmediğini saptadılar ve bu sonucu verilen anti-CD20 tedavisinin klonotipik B hücrelerini azaltamayışına bağladılar (38).

ZA'in, MM hücrelerinde apoptozu başlattığı ve proliferasyonu baskıladığı bilinmektedir (8,33). Bu çalışmanın amacı ZA'in anti-proliferatif etkisini, RTX ve kombinasyonlarının CD20 (+) ve CD20 (-) MM hücre serilerine etkisini araştırmaktır. Beklendiği gibi RTX CD 20 pozitif hücrelere karşı daha etkilidir (IC50 4.3 µg/ml vs 45 µg/ml). Sürpriz bir şekilde kompleman tek başına RPMI 8226 hücreleri üzerine belirgin proliferatif aktivite gösterdi. Benzer bulgular Servis ve ark.larınca sentetik C3 peptitlerin lenfoblastoid B hücrelerinin büyümesinde artış şeklinde gözlemlendi(34). Kompleman bağımlı sitotoksik aktivite anti-tümör etkinlik için önemli bir mekanizmadır. Çalışmamızda sitotoksik T lenfositlerin yokluğunda kompleman proliferatif sinyal yolunu aktive eden spesifik reseptörlere bağlanan bir ligand gibi hareket edebilir.

ZA ile ARH 77'nin proliferasyon baskılanması doza bağımlıdır (Şekil 9) ve IC 50 39 µM bulundu. Bu bulgular bildirilen değerler ile uyumlu bulundu (35). Bununla birlikte RPMI hücrelerinde ZA'in 10 µM üzerinde doz bağımlı anti-proliferatif etki saptanmadı. Kemorezistan DHL-4 B hücrelerinde RTX ile adriyamisin kombinasyonlarında adriyamisin ve sisplatin duyarlılık izlenirken, etoposid'de bu etki izlenmedi (36). Kimura ve arkadaşları lösemi hücre serilerinde ZA ile farklı ajanları çalıştılar ve metot-raksat, vinkristin ile antagonistik etkilerini gösterdiler

(37). Çalışmamızda RTX ile ZA'in kombinasyon çalışmaları yapıldı ve antagonistik etki saptandı. İleride klinik çalışmalara uygulanması için daha fazla çalışmaya gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelom. *New Engl J Med.* 1996; 335: 91-7
2. Cunningham D, Paz-Ares L, Milan S, Powles R, Nicolson M, Hickish T, Selby P, Treleavan J, Viner C, Malpas J, et al. High-dose melphalan and autologous bone marrow transplantation as consolidation in previously untreated myeloma. *J Clin Oncol.* 1994; 12: 759-63.
3. Lenhoff S, Hjorth M, Holmberg E, Turesson I, Westin J, Nielsen JL, Wisloff F, Brinch L, Carlson K, Carlsson M, Dahl IM, Gimsing P, Hippe E, Johnsen H, Lamvik J, Lofvenberg E, Nesthus I, Rodger S. Impact on survival of high-dose therapy with autologous stem cell support in patients younger than 60 years with newly diagnosed multiple myeloma: A population-based study. *Nordic Myeloma Study Group. Blood.* 2000;95:7-11.
4. Bjorkstrand BB, Ljungman P, Svensson H, et al. Allogeneic bone marrow transplantation versus autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: a retrospective case-matched study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood.* 1996; 88: 4711.
5. Lee CK, Badros A, Barlogie B, Morris C, Zangari M, Fassas A, van Rhee F, Cottler-Fox M, Jacobson J, Thertulien R, Muwalla F, Mazher S, Anaissie E, Tricot G. Prognostic factors in allogeneic transplantation for patients with high-risk multiple myeloma after reduced intensity conditioning. *Exp Hematol.* 2003; 31: 73-80.
6. Seneratne SG, Pirianov G, Mansi JL, Arnett TR, Colston KW. Bisphosphonate induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 2000; 82: 1459-68.
7. Derenne S, Amiot M, Barille S, et al. Zoledronate is a strong inhibitor of myeloma cell growth and secretion of IL-6 and MMP-1 by the tumoral environment. *J Bone Miner Res.* 1999; 14: 2048-56.
8. Aparico A, Gardner A, Tu Y, et al. In vitro cytoreductive effects on multiple myeloma cells induced by bisphosphonates. *Leukemia.* 1998; 12: 220-29.
9. Judgev SP, Croucher PI, Coleman RE. Zoledronate induces apoptosis of breast cancer cells in vitro- evidence for additive and synergistic effects with taxol and tamoxifen. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 2000; 19: 664a Abstract 2619.
10. Tassone P, Forciniti S, Galea e, et al. Growth inhibition and synergistic induction of apoptosis by zoledronate and dexamethasone in human myeloma cell lines. *Leukemia.* 2000; 14: 841-44.
11. Jackson N, Ling NR, Ball J, Bromidge E, Nathan PD, Franklin IM. An analysis of myeloma plasma cell phenotype using antibodies defined at the IIIrd international workshop on human leucocyte differentiation antigens. *Clin Exp Immunol.* 1988; 72: 351-56.
12. Harada H, Kawano MM, Huang N, et al. A Phenotypic difference of normal plasma cells. *Blood* 1993; 81: 2658-63.

13. San Miguel F, Gonzalez M, Gascon A, et al. Immunophenotypic heterogeneity of multiple myeloma: influence on the biology and clinical course of disease. *Br J Haematol.* 1991; 77: 185-190.
14. Reff ME, Carner K, Chambers KS, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric Mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 1994; 83: 435-45.
15. Maloney DG, Smith B, Appelbaum FR. The anti-tumor effect of monoclonal anti-CD20 antibody (mAb) therapy includes direct anti proliferative activity and induction of apoptosis in CD20 positive Non-Hodgkin's lymphoma (NHL) cell lines. *Blood* 1996; 88(suppl 1): 637A (Abstract 2535).
16. Maloney DG, Lies TM, Czerwinski DK, et al. Phase I clinic trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood* 1994; 84: 2457-66.
17. Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, Vecchi A, Grieco V, Scanziani E, Botto M, Introna M, Golay J. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol.* 2003; 171: 1581-87.
18. Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A, Marce S, Esteve J, Campo E, Colomer D, Montserrat E. Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. *Blood.* 2001; 98: 2771-77.
19. van der Kolk LE, Grillo-Lopez AJ, Baars JW, Hack CE, van Oers MH. Complement activation plays a key role in the side-effects of rituximab treatment. *Br J Haematol.* 2001; 115: 807-11.
20. Hughes-Jones NC, Gardner B. Reaction between the isolated subunits of the complement component C1q and IgG-complexes. *Mol Immunol.* 1979; 16: 697-701.
21. Lim SH, Zhang Y, Wang Z, Varadarajan R, Periman P, Esler WV. *Blood.* 2004; 103: 1971-72.
22. Boye J, Elter T, Engert A. An overview of the current clinical use of the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. *Ann Oncol* 2003; 14: 520-35.
23. Chou TC, Zhang XG, Balog A, Su DS, Meng D, Savin K, Bertino JR, Danishefsky SJ. Desoxyepothilone B: an efficacious microtubule-targeted antitumor agent with a promising in vivo profile relative to epothilone B. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 9642-47.
24. Chow KU, Sommerland WD, Boehrer S, Schneider B, Seipelt G, Rummel MJ, Hoelzer D, Mitrou PS, Weidmann E. Anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8, rituximab) enhances efficacy of cytotoxic drugs on neoplastic lymphocytes in vitro: role of cytokines, complement, and caspases. *Haematologica* 2002; 87: 33-43.
25. Wu AM, Tan GJ, Sherman MA, Clarke P, Olafsen T, Forman SJ, Raubitschek AA. Multimerization of a chimeric anti-CD20 single-chain Fv-Fc fusion protein is mediated through variable domain Exchange. *Protein Engineering (Oxford University Press)* 2001; 14: 1025-33.
26. Bartl R, Frisch B, Fateh-Moghadam A, Kettner G, Jaeger K, Sommerfeld W. Histologic classification and staging of multiple myeloma. A retrospective and prospective study of 674 cases. *Am J Clin Pathol.* 1987; 87: 341-55.
27. Chilosi M, Adami F, Lestani M, Montagna L, Cimarosto L, Semenzato G, Pizzolo G, Menestrina F. CD 138/syndecan-1: a useful immunohistochemical marker of normal and neoplastic plasma cells on routine trephine bone marrow biopsies. *Mod Pathol.* 1999; 12: 1101-06.
28. Wei A, Juneja S. Bone marrow immunohistology of plasma cell neoplasms. *J Clin Pathol* 2003; 56: 406-11.
29. Jego G, Robillard N, Puthier D, Amiot M, Accard F, Pineau D, Harousseau JL, Bataille R, Pellat-Deceunynck C. Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood.* 1999; 94: 701-12.
30. Jego G, Bataille R, Pellat-Deceunynck C. Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood.* 2001; 97: 1817-22.
31. Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanheco Y, Smith BD, Civin CI, Jones RJ. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood.* 2004; 103: 2332-36.
32. Hofer S, Hunziker S, Dirnhofer S, et al. Rituximab effective in a patient with refractory autoimmune hemolytic anaemia and CD20-negative multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2003; 122: 686-91.
33. Jagdev SP, Coleman RE, Shipman CM, Rostami-H A, Croucher PI. The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells. Evidence for synergy with paclitaxel. *Br J Cancer.* 2001; 84: 1126-34.
34. Servis C, Lambris JD. C3 synthetic peptides support growth of human CR2-positive lymphoblastoid B cells. *J Immunol.* 1989; 142(7): 2207-12.
35. Croucher P, Jagdev S, Coleman R. The anti-tumor potential of zoledronic acid. *The Breast.* 2003; suppl 2: S30-S36.
36. Demidem A, Lam T, Alas S, et al. Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitises a B cell line to cell killing by cytotoxic drugs. *Cancer Biother Radiopharm* 1997; 12: 177-86.
37. Kimura S, Kuroda J, Segawa H, et al. Antiproliferative efficacy of the third-generation bisphosphonate, zoledronic acid, combined with other anticancer drugs in leukemic cell lines. *Int J Hematol* 2004; 79: 37-43.
38. Pilarski LM, Baigorri E, Mant MJ, Pilarski PM, Adamson P, Zola H, Belch AR. Multiple myeloma includes phenotypically defined subsets of clonotypic CD20+ B cells that persist during treatment with rituximab. *Clinical Medicine. Oncology* 2008; 2: 275-87.

İLETİŞİM

Uz. Dr. Cengiz CEYLAN
Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Hematoloji Bölümü, İzmir
Tel: 0 232 469 69 69
Cep tel.: 0 532 5630278
e-posta: ceylanceng@hotmail.com