

# BLEOMİSİNE BAĞLI ALVEOLİT VE AKCİĞER FİBROZİSİ GELİŞEN BİR OLGUNUN BRONKOALVEOLER LAVAJ HÜCRE ANALİZİ

A. Füsun ÖNER EYÜBOĞLU\*  
Gönül AYDIN\*  
Hakan ÖZKARDEŞ\*\*

## ÖZET

Bleomisin, akciğerde birikimi sonucunda interstisyel fibrozise neden olan sitotoksik bir antibiyotiktir. Alveolit ve interstisyel fibrozisin gelişiminde bleomisin doğrudan toksik etkisine bağlı olarak açığa çıkan reaktif oksijen metabolitlerinin yanısıra inflamatuvar reaksiyonun bir parçası olarak ortama göç eden lenfosit, makrofaj ve epitel hücrelerinden salınan sitokinlerin de rolü vardır. Seminomatöz testis tümörü tanısı ile bleomisin içeren kemoterapi almakta iken interstisyel akciğer fibrozisi saptanan bir olguda, bronkoalveoler lavaj (BAL) yöntemi ile izole edilen hücreler T lenfosit (CD3+, CD4+, CD8+), B lenfosit, doğal öldürücü (natural killer- NK) hücre ve makrofajlara özgül iki-renkli floresan monoklonal antikorlarla boyandı ve flositometrik yöntemle hücre profili değerlendirildi. Transbronşial biyopsi ve BAL sonuçları alveolit ve akciğer fibrozisi ile uyumlu bulunan hastaya kortikosteroid tedavisi başlandı. Tedavi sonrasında elde edilen BAL hücreleri yeniden flositometrik yöntemle incelendi. Sağlıklı birey değerleri ile karşılaştırıldığında; tedavi öncesi ve sonrası BAL örneklerinde CD3, CD4, CD8, B lenfosit, makrofaj hücre dağılımı, sağlıklı grup BAL değerleri ile aynı düzeylerdeyken, NK hücre popülasyonunda sağlıklı bireylere göre belirgin yükseklik saptandı (% 13.9) ve

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi

\* Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz Anabilim Dalı.

\*\* Üroloji Anabilim Dalı, ANKARA

## Yazışma Adresi :

A. Füsun Öner-Eyüboğlu Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz Anabilim Dalı Fevzi Çakmak Cad. 10. Sokak, No: 45 Bahçelievler, 06490 ANKARA  
Tel: (0312) 212 68 68/1197  
(0312) 212 04 34/125  
Faks: (0312) 22373 33

bu yüksekliğin tedavi sonrasında da sürdüğü gözlemlendi (% 16.8). Kortikosteroid tedavisine karşın devam eden NK hücre yüksekliği ilaca bağlı akciğer fibrozisi gelişiminde bu hücrelerin önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Pulmoner interstisyel fibrozis, Bleomisin, Natural killer hücreler.

## SUMMARY

### BRONCHOALVEOLAR LAVAGE ANALYSIS OF A PATIENT WHO DEVELOPED BLEOMYCIN INDUCED ALVEOLITIS AND FIBROSIS

Bleomycin is a cytotoxic antibiotic that accumulates in the lung and causes interstitial fibrosis. The induction of alveolitis and interstitial fibrosis is caused by the production of reactive oxygen metabolites due to the direct toxic effect of bleomycin as well as cytokines and other mediators secreted by the lymphocytes, alveolar macrophages and epithelial cells that migrate into the site as part of the inflammatory process. We isolated lung cells in a seminomatous testis tumor case who developed interstitial fibrosis during combination chemotherapy including bleomycin by means of the bronchoalveolar lavage (BAL) method. The cell profile was determined by flowcytometric analysis of the isolated cells stained with two-color fluorescence monoclonal antibodies against T lymphocytes (CD3+, CD4+, CD8+), B lymphocytes, natural killer (NK) cells and macrophages. As transbronchial biopsy and BAL sampling revealed pulmonary fibrosis the patient was put on corticosteroid therapy. Changes in the cell profile after treatment was determined by repeat BAL sampling and flowcytometric analysis. The pre- and post-treatment BAL CD3, CD4, CD8, B lymphocyte and macrophage distributions were similar with those of the healthy BAL cell profile, while a significant increase was present in the NK cell population (13.9 %) that persisted after treatment (16.8 %). This persistent increase in the NK cell population despite therapy suggested that these cells may have a significant impact on bleomycin induced pulmonary fibrosis.

**Keywords:** Interstitial pulmonary fibrosis, Bleomycin, Natural killer cells.

## GİRİŞ

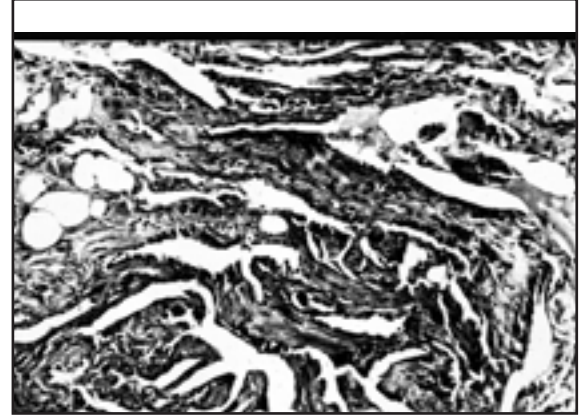
Bleomisin akciğerde akümülyasyon sonucunda interstisyel fibrozise neden olan sitotoksik bir antibiyotiktir.

Özellikle germ hücreli tümör, baş ve boyun kanserleri ve lenfomaların tedavisinde kullanılan bu ilacın toplam dozu 400 mg'ı aştığında akciğerde fibrotik etki başlamaktadır. Bunun yanısıra, bleomisin uygulanan hastanın ileri yaşı, böbrek fonksiyon bozukluğu, eş zamanlı radyoterapi ya da oksijen tedavisi alması da akciğerde fibrozis gelişimini hızlandırır (1, 2). Son yıllarda, bleomisine bağlı gelişen akciğer fibrozisinin patogenezinde ilacın doğrudan toksik etkisine bağlı olarak açığa çıkan reaktif oksijen metabolitlerinin ve ortama göç eden lenfosit, makrofaj, nötrofil, eozinofil ve epitel hücrelerinden salınan sitokinlerin rol oynadığı gösterilmiştir (2).

Seminomatöz testis tümörü nedeniyle bleomisin içeren bir kemoterapi rejimi alan ve interstisyel pulmoner fibrozis gelişen bir hastada bronkoalveoler lavaj ile elde edilen hücrelerin lenfosit altgrupları flovsitometrik yöntemle incelenmiş, elde edilen bulgular tartışılmıştır.

### OLGU

Otuz-beş yaşında, market sahibi, 60 paket-yıl sigara içimi öyküsü olan erkek hasta hematüri yakınmasıyla Eylül 1997'de hastanemiz Üroloji Kliniğine başvurdu. Tetkiklerinde retroperitoneal kitle ve sol testiste lezyon saptanması üzerine radikal orşiektomi yapıldı. Histopatolojik inceleme sonucu seminom ile uyumlu bulunan hastaya bleomisin, etoposid, sisplatin içeren kemoterapi rejimi planlandı. Toplam dört kür kemoterapi alan hastada, total bleomisin dozu 480 mg'a eriştiğinde solunum sıkıntısı başladı. Gittikçe artan efor dispnesi kuru öksürük yakınmaları olan hastanın solunum fonksiyon testi (SFT) sonuçları ileri derecede ve restriktif solunum bozukluğu ile uyumlu idi (FEV1= % 40, FVC= % 37, FEV1/FVC= %90, FEF 25-75= % 63, VC= % 37). Tek nefes karbonmonoksit difüzyon testinde ise (DLCO) difüzyonda orta derecede azalma (% 53) saptandı. Arter kan gazlarında, pH= 7.41, PO<sub>2</sub>= 55 mmHg, PCO<sub>2</sub>= 60 mmHg, parsiyel O<sub>2</sub> satürasyonu % 85 bulunan hastanın postero-anterior akciğer grafisinde sol bazalde daha belirgin olmak üzere bilateral bazallerde havalanmada azalma ve volüm kaybı, yüksek rezolüsyonlu toraks bilgisayarlı tomografisinde (HRCT) ise bilateral lokalize buzlu cam alanları dışında, akciğerde fibrotik değişiklikler ve bal peteği akciğer görünümü saptandı (Resim 1).



**Resim 1.** Tedavi öncesi yüksek rezolüsyonlu bilgisayarlı tomografide (HRCT) buzlu cam ve fibrozis görünümü. Fiberoptik bronkoskopide transbronşiyal akciğer biyopsisi alındı ve BAL yapıldı. BAL materyalinden yayma ve hücre alt gruplarının dağılımını değerlendirilmek flovsitometrik olarak incelendi.

### Antikor ve hücrelerin hazırlanışı ve değerlendirilmesi:

İlk aşamada iki renkli monoklonal antikorlar Phospate Buffered Saline (PBS) ile önerilen dozda flovsitometrik yöntemle incelenmek üzere hazırlandı. İlk aşamada farklı hücre gruplarına göre özgün iki renkli monoklonal antikorlar önerilen düzeyde PBS solüsyonu ile seyreltildi (1:5 oranında). B lenfositler, T lenfositler, T helper, T supressor, NK hücre yüzeylerindeki özgün reseptörlerle bağlanacak özellikte floresan boyalarla işaretlenmiş antikor solüsyonları hazırlandı (Tablo 1).

**Tablo 1:** Flovsitometrik yöntemle lenfosit subpopülasyon incelemesinde kullanılan monoklonal antikorlar.

Makrofaj	CD45-FITC / CD14+PE
T hücre/B hücre	CD3-FITC / CD19+PE
T helper	CD3-FITC / CD4+PE
T supressor	CD3-FITC / CD8+PE
T helper/T supressor	CD4+ FITC / CD8+ PE
NK hücre	CD3-FITC / CD16+CD56+PE

Yeşil renkli Fluorescein Isosiyonat (FC) ve turuncu-kırmızı floresans veren R-phycoerythrin (PE) ile bağlanmış antikorlar BAL hücreleri hazırlanana kadar ışıktan uzak tutularak, 4<sup>0</sup>C'de bekletildi. BAL hücreleri bir gazlı bezden süzülükten sonra oda ısısında, 1200 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edilen hücreler Hanks solüsyonu ile dilue edildi, 200 mc'l'lik örnek alınarak hücre sayımı ve yayması yapıldı. Daha sonra hücreler Hanks solüsyonu ile yıkandı, 4<sup>0</sup>C, 1200 rpm'de

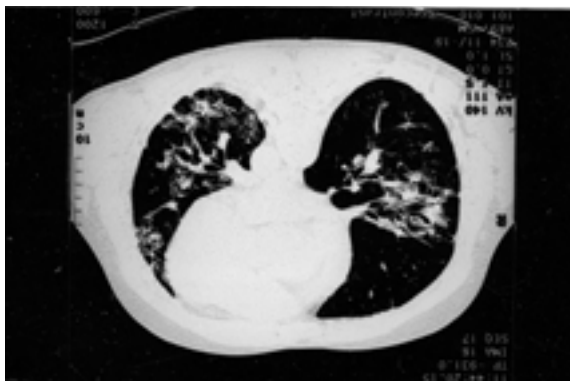
santrifüj edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandıktan sonra kalan hücreler insan serumu ile zenginleştirilmiş RPMI solüsyonunda dilue edildi, ve önceden hazırlanmış olan her bir antikor üzerine 100 µl hücre solüsyonu ilave edildi (200000 hücre/tüp). Floresan boyalarla işaretli antikorların hücre reseptörlerine bağlanabilmesi için tüpler sürekli karıştırılmak suretiyle 20 dk intübasyona bırakıldı. Daha sonra ortamda kalan serbest antikorları temizlemek amacıyla hücre solüsyonları 3 kez PBS ile yıkandı. Hücreler %2 paraformaldehit ile fikse edildi ve Beckton Dickinson FACS-Scan aletinde flovisitometrik olarak değerlendirildi. Özgün boyalarla işaretlenen hücre alt gruplarının toplam hücre popülasyonuna oranı yüzde (%) cinsinden değerlendirildi.

BAL yaymasında, % 86 alveoler makrofaj (AM); % 10 lenfosit; % 4 nötrofil saptandı. Flovisitometrik yöntemle incelenen lenfosit subpopülasyon dağılımları ise, B lenfosit= % 0; CD3 T lenfosit= % 72; CD4 T lenfosit= % 39; CD8 T lenfosit= % 33; CD4/CD8= 1.0; doğal öldürücü (natural killer- NK) hücre= % 13.9 olarak belirlendi (Tablo 2).

**Tablo 2:** Tedavi öncesi ve sonrasında BAL hücreleri ve kanda lenfosit subpopülasyon analizi sonuçları.

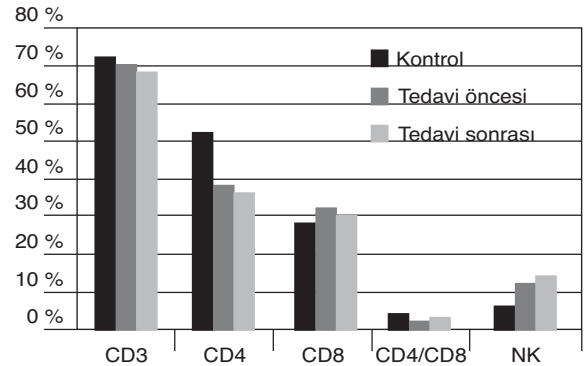
	BAL hücreleri(%)					
	B hücre	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	NK
Ted. öncesi	0.0	72	39	33	1.0	13.9
Ted. sonrası	0.0	68	38	30	1.3	16.8

Bu değer literatürdeki normal NK hücre oranlarına göre de belirgin yüksekti. Transbronşiyal biyopside, akciğerde yer yer alveolit ile uyumlu alanların yanısıra peribronşiyal fibrozis gelişiminin olduğu görülen olguya 1 mg/kg prednizolon tedavisi başlandı (Resim 2).



**Resim 2.** Transbronşiyal biyopside interstisyumda lenfosit infiltrasyonu ve fibrozis formasyonu.

İki hafta sonra efor dispnesi ve öksürük yakınmalarında belirgin gerileme sağlandı. İkişer hafta ara ile kortikosteroid dozu kademeli olarak azaltılan olgunun ikinci ay sonunda yapılan kontrol SFT ve difüzyon testi değerlerinde ise önceki sonuçlarına göre değişiklik gözlenmedi. Tedavinin dördüncü ayında, 10 mg/gün prednizolon almakta iken, sağ kalçada ağrı ve yürüme güçlüğü yakınmaları ortaya çıkan hastada aseptik femur başı nekrozu saptanması üzerine tedavi sonlandırıldı. Altıncı ay sonunda yapılan kontrol BAL lenfosit subpopülasyon incelemesinde, B lenfosit= % 0; CD3= % 68; CD4= % 38; CD8= % 30; CD4/CD8= 1.3; NK hücreler % 16.8 olarak bulundu (Tablo 2). Böylece, toplam 480 mg bleomisin tedavisi sonrasında akciğer fibrozisi gelişen olgunun BAL hücre analizi laboratuvarımızda üç sağlıklı bireyde aynı yöntemle incelediğimiz BAL sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, NK hücre oranında sağlıklı olgu sonuçlarımıza (%3) göre belirgin yükseklik olduğu saptandı. Bu artış kortikosteroid tedavisi sonrasında da devam etmekteydi (%16.8) Buna karşın diğer lenfosit subgruplarında tedavi öncesi ve sonrası değerlerde sağlıklı grup BAL değerlerine göre anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 1).



**Şekil 1.** Tedavi öncesi ve sonrasındaki BAL lenfosit subgruplarının sağlıklı birey değerlerine göre oranı.

Tedavi öncesinde orta derecede var olan difüzyon bozukluğu, tedavi sonrası da aynı düzeyde devam etmekteydi.

## TARTIŞMA

Sitotoksik bir antibiyotik olan bleomisine bağlı akciğerde fibrozis gelişme sıklığı, ilacın kümülatif dozu ile doğru orantılı olarak, % 3 ile % 40 arasında değişmektedir. Toplam doz 400 mg'ı aştığında fibrozis riski başlamakta, 450-500 mg'ın üzerinde ise bu riskin % 20'nin üzerinde olduğu bildirilmektedir (1). Daha önce bir yakınması

yok iken toplam bleomisin dozu 480 mg'a eriştiğinde semptomatik hale gelen ve bilgisayarlı tomogramlarda belirgin fibrozis saptanan olgumuz da bu literatür bilgilerini doğrulamaktadır. Yüksek doz bleomisin tedavisi planlanan hastaların akciğer toksisitesi yönünden HRCT ve difüzyon testi ile düzenli olarak takip edilmelerinin gerekliliği bir kez daha ortaya çıkmaktadır. Buradaki olguda kortikosteroid tedavisi sonrasında belirgin semptomatik iyileşme görülmesine karşın solunum fonksiyon testi ve radyolojik görünümde değişiklik izlenmemiştir. Tedavi sonrasındaki DLCO testlerinde orta derecede difüzyon bozukluğu aynı düzeyde devam eden olgunun, HRCT'sinde ise buzlu cam görünümünde hafif düzelleme dışında fibrozis ve bal peteği görünümünün sürdüğü gözlenmiştir. Bu bulgular kortikosteroidin yalnızca aktif alveoliti düzelterek semptomatik iyileşmeyi sağladığını düşündürmektedir. İleri düzeyde fibrotik değişikliklerin varlığında ise tedavi ile geri dönüş olmadığından fonksiyonel iyileşme gözlenmemektedir.

Bleomisine bağlı olarak gelişen alveol hasarı ve akciğer fibrozisinin patogenezi hayvan modellerinde detaylı olarak incelenebilmiştir. Bleomisin kullanımı sonrasında açığa çıkan reaktif oksijen metabolitlerinin (süperoksit ve hidroksil radikalleri) akciğer hasarına neden olduğu gösterilmiştir (2). Ortamda biriken bu metabolitler akciğerde özellikle Tip I pnömositler ve pulmoner kapiller endotel hücrelerinde DNA hasarı, lipid peroksidasyonu, prostaglandin sentez ve yıkımında değişikliklere neden olmaktadır. Ortaya çıkan bu hücre kaybını tamire yönelik olarak ise, Tip II pnömositlerde hiperplazik ve displazik değişiklikler oluşmakta ve hasarlı bölgeye, nötrofiller başta olmak üzere, lenfosit, eozinofil ve plazma hücreleri göç etmektedir. Bu hücrelerden salınan elastolitik enzimler ve sitokinler fibroblast aktivasyonunu ve kollajen yapımını başlatarak kalıcı fibrozise neden olmaktadır (2). Özellikle nötrofil enzimlerinden nötrofil elastazın fibrozis gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bunun yanısıra sitokinlerden TGF- $\beta$  (transforming growth factor-beta), IL-1 (Interleukin-1), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor-alfa) PDGF (platelet derived growth factor), IGF-I (insulin growth factor) bleomisine bağlı interstisyel hasara neden olan önemli mediatörler olarak belirlenmiştir (5). Lenfositlerin özellikle peribronşiyoler bölgeye ve alveol duvarına akümüle oldukları ve genelde CD4/CD8T lenfosit oranında azalma gözlemlendiği bildirilmiştir (6, 7). Sitotoksik etkiden sorumlu NK hücrelerin pulmoner fibrozisdeki olası fonksiyonları ise kesin olarak bilinmemektedir. Sunulan olgunun BAL hücrelerinde saptanan (% 13.9) ve kortikosteroid tedavisi sonrasında da süren (% 16.8) NK hücre artışı pulmoner fibrozis gelişiminde bu

hücre grubunun da önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Sitolitik etkiye sahip doğal öldürücü (NK) hücreler T ya da B lenfosit grubuna ait olmayan, granüler morfolojiye sahip bir lenfosit alt grubu olarak tanımlanmaktadır (8). Özellikle belli tip tümör hücrelerine karşı öldürücü etkilerinin yanısıra, virüs ya da diğer hücre içi büyüyen mikroorganizmalarca enfekte olmuş antikorla kaplı hücrelerin yok edilmesinden de sorumludurlar. Apoptozisde önemli rol oynayan bu hücreler salgıladıkları sitokinlerle de [ $\gamma$ -IFN (gama-interferon), TNF- $\alpha$ , IL-1] diğer inflamatuvar hücreleri uyararak organizmada immün yanıtın başlamasını ve düzenlenmesini sağlarlar (9). Sağlıklı birey BAL hücre analizinde % 1-5 oranında görülen bu hücre popülasyonunun interstisyel fibrozisli olgumuzda belirgin yüksek düzeylerde bulunuşu farklı şekillerde yorumlanabilir. Birinci olasılık, bleomisin maruziyeti sonrasında NK hücrelerden salgılanan  $\gamma$ -IFN ve TNF- $\alpha$  aracılığıyla alveoler makrofajlardan nitrik oksit ve serbest oksijen radikallerinin salınımının artmasıdır. İkinci olasılık, fibrozis boyunca BAL'da yüksek düzeylerde seyreden NK hücrelerin alveoler makrofajlardan fibroblast proliferasyonundan sorumlu olan, sitokin salınımına neden olmasıdır. Üçüncü olasılık ise, sitolitik potansiyele sahip bu hücrelerin bleomisin maruziyeti sonrasında serbest oksijen radikalleri salgılayarak akciğer hasarından doğrudan sorumlu olmalarıdır. Ancak olgumuzda kortikosteroid tedavisi sonrasında NK hücre yüksekliğinin sebat etmesi bu hücrelerin akut akciğer hasarı (alveolit) aşamasından çok, fibrozis aşamasında rol oynadığını düşündürmektedir.

Pulmoner fibrozis patogenezinde önemli rolü olduğuna inandığımız NK hücrelerin fonksiyonlarını açıklamaya yönelik olarak ileride yapılacak BAL hücre analizlerinin konuya ışık tutacağı inancındayız.

## KAYNAKLAR

1. Jules-Elysee K, White DA. Bleomycin-induced pulmonary toxicity. Clin Chest Med 1990; 11:1-20.
2. Tanoue LT. Pulmonary toxicity associated with chemotherapeutic agents. In: Fishman AP, ed. Pulmonary Diseases and Disorders. 3rd ed. New York, McGrawhill 1998; Vol (1): 66: 1003-1016.
3. Gil J, Daniele RP. Morphology of the lung's immune system. In Daniele RP, ed. Immunology and Immunologic Diseases of the Lung. USA, Blackwell Scientific Publications 1988; 21-54.
4. Khalil N, Berezney O, Sporn M, Greenberg A. Macrophage production of transforming growth

- factor $\beta$  and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. *J Exp Med* 1989; 170: 727-737.
5. Taooka Y, Maeda A, Hiyama K, Ishioka S, Yamakido M. Effects of neutrophil elastase inhibitor on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156: 260-265.
  6. Turner-Warkwick M, Haslan PL. The value of serial bronchoalveolar induced lavages in assessing the clinical prognosis of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 26-34.
  7. Katzenstein AA, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1301-1315.
  8. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 3rd ed. England, Mosby Yearbook 1993; 2.1-2.20.
  9. Janeway CA, Travers P. *Immunobiology*. 2nd ed. New York, Garland Publishing 1996; 9.1-9.46.