

## İLERİ EVRE AKCİĞER KANSERİNDE HÜCRESEL VE HÜMORAL İMMÜNİTE

Ali Nihat ANNAKKAYA, Mustafa YAMAN, Serdar ERTURAN, Günay AYDIN,  
Benan MÜSELLİM, Elif ALTUĞ.

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, İSTANBUL.

### ÖZET

*Çalışmada ileri evre akciğer kanserinin immun sistem üzerine etkisini incelemeyi amaçladık. 4' ü KHAK, 20'si KHDAK toplam 24 akciğer kanserli erkek hasta ile 11 sağlıklı erkek, kontrol grubu çalışmaya alındı. Kanserli olgularda ve kontrol grubunda periferik kanda flowsitometrik yöntemle CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 lenfosit alt gruplarına ve IgA, IgG ve IgM yüzdelere bakıldı.*

*Akcığer kanserli olgularda periferik kan CD4, CD19 ve CD4/CD8 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p<0,05$ ). T evresi arttıkça (T1-4) periferik kan CD3 düzeyinin çok anlamlı olarak azaldığı ( $p<0,001$ ), radyolojik N (lenf nodu tutulumu) arttıkça CD4 düzeyinin azaldığı bulundu ( $p<0,05$ ). Akciğer kanserli olgularda yaşla beraber periferik kan CD16+' liğinin anlamlı olarak arttığı tespit edildi ( $p=0,022$ ). Performansı ve kan albümin düzeyi düşük olan akciğer kanserli hastalarda periferik kan CD16+' lik düzeyi yüksek bulundu ( $p<0,05$ ).*

*Sonuç olarak akciğer kanserinde ilerleyen hastalık ve buna karşı immun yanıtın göstergesi olarak bazı lenfosit alt gruplarında (CD4, CD19, CD4/CD8 oranı) değişiklikler olur. İleri evre akciğer kanserinde matür T ve B-lenfositler (CD3, CD4 ve CD19) anti-tümör immunitede temel rol oynuyor olabilir.*

**Anahtar kelimeler:** Akciğer kanseri; lenfosit subgrupları; kanser immunolojisi.

(Solunum 2002;4:224-228)

### SUMMARY

#### CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY IN ADVANCED LUNG CANCER

*We investigated the effect of advanced lung cancer on the immune system. Histopathologically confirmed and staged 24 male patients (4 patients with SCLC and 20 patients with NSCLC) and 11 healthy male subjects were recruited in the study. Using flowcytometry, CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 lymphocyte subgroups and IgA, IgG and IgM percentages were measured in the peripheral blood samples of both groups.*

*In patients with lung cancer CD4, CD9 and CD4 / CD8 levels in the peripheral blood were low compared to the control group, the difference being statistically significant ( $p<0,05$ ). With progression from stage T1 to T4, peripheral blood CD3 level decreased significantly ( $p<0,001$ ). Likely as radiological N (lymph node involvement) increased, CD4 level diminished ( $p<0,05$ ). Among patients with lung cancer, with age increased peripheral blood CD16 positivity was detected ( $p<0,05$ ). CD16 (+) level was high in peripheral blood of lung cancer patients with poor performance and low albumin levels.*

*As a result, various changes occur in some lymphocyte subgroups (CD4, CD19, CD4/CD8) in lung cancer, as a marker of progressive disease and immune response. In advanced lung cancer, matur T and B-lymphocytes (CD3, CD4 and CD19) may play a major role in anti-tumour immunity.*

**Key words:** Lung cancer; lymphocyte subsets; cancer immunology.

(Solunum 2002;4:224-228)

**Yazışma Adresi:** Dr. Ali Nihat Annakkaya. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı.

Kocamustafapaşa / İSTANBUL

Tel: (0380) 541 40 68 Tel (iş): (0212) 588 48 00 (1679)

e-mail: alianky@hotmail.com

## GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri diğer pek çok kanserin aksine etyolojisi iyi bilinen ve büyük oranda önlenilebilir olan bir kanser türüdür. Buna rağmen insidansdaki artış ve yüksek mortalite oranları, tedavi ve önlem almada yeni alternatifler gerekliliğini göstermektedir. Vücuttaki somatik mutasyonlar sonucu devamlı oluşmakta olan tümör hücreleri, hücrel immün sistem tarafından elimine edilerek, kanser gelişmesi engellenmektedir. Tümörün immunolojik reddi bazı kaçış mekanizmaları nedeni ile gerçekleşmemekte ve böylece klinikte ileri evre hastalıklar ile karşılaşmaktayız (1,2). Biz de çalışmada ileri evre akciğer kanserlerinin immunolojik bazı özelliklerini ve bu özelliklerin hastalığın evresi ile olan ilişkisini incelemeyi amaçladık.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Kliniğimizde Mayıs-Ekim 2000 tarihleri arasında akciğer kanseri tanısı konan ileri evre akciğer kanserli hastalar çalışmaya dahil edildi. Hücre tanıları; balgam sitolojisi, bronkoskopik biyopsi, bronş lavajı veya trans-toraksik iğne aspirasyonu (TTİA) ile kondu. Histolojik tanısı kesinleşen hastalara üst batin BT, kranial BT veya MR, tüm vücut kemik sintigrafisi ve gereken olgulara batin ultrasonu ile evreleme yapıldı. Histolojik olarak kanıtlanmış ve evrelemeleri yapılmış KHAK'li 4 ve ileri evre KHDAK'li 20 olmak üzere toplam 24 hasta çalışmaya dahil oldu. Kontrol grubu olarak ise sigara içen 11 gönüllü, sağlıklı erişkin çalışmaya alındı. Hastaların vücut kitle indeksleri (kilo/boy<sup>2</sup>), Karnofsky performans durumları kaydedildi. Olgular T (tümör) özelliklerine göre (T4 ve T1-2-3), Radyolojik N (lenf nodu tutulumu) özelliklerine göre (N0 ve N+) ve Metastaz durumlarına göre (M0 ve M1) gruplara ayrıldı. Tüm hastalarda hemogram, biokimya (ALT, AST, Üre, Kreatinin, Total protein ve Albümin), kontrolleri yapıldı. Hastalarda ve kontrol grubunda Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Moleküler Onkoloji Laboratuvarında immunolojik parametrelere bakıldı. CD3 (olgun T lenfositleri), CD4 (yardımcı T lenfositleri ve monosit alt grupları), CD8 (sitotoksik T lenfositleri), CD16 (NK hücreleri, granulositler, monositler), CD19 (B lenfosit öncüleri ve olgun B lenfositleri), IgA, IgM ve IgG bakıldı. Hastaların ve kontrol grubunun periferik venöz kanı 4 cc EDTA'lı tam kan sayımı tüpüne sabah 9:00'da alındı ve taze olarak 1 saat içinde çalışıldı. Flowsitometre kullanılarak immün fenotipleme yapıldı. Alınan kan örneğinden 100 mikrolitre bir tüpe pipetlendi ve üzerlerine boyanmak istenen yüzey antijenine karşı olan

monoklonal antikor, floresans boya ile konjüge olarak eklendi. CD4 ve CD8 için PE (Phycoerythrin) floresans boyası, CD3, CD16, CD19, IgM, IgA ve IgG için ise FITC (Fluorescein) floresans boyası kullanıldı. CD3, CD4, CD8, CD16 ve CD19 için IQ Ltd. monoklonal antikorları, immunglobülinler için Dako Ltd. antikorları kullanıldı. Örnek yarım saat karanlıkta oda ısısında inkübe edildi. Ardından Q prep (Coulter Miami, USA) ile eritrositler parçalandı ve yüzey boyası fikse edildi. Boyanmış örnek Coulter Excel (Coulter Miami, USA) Flowsitometre'den geçirilerek floresans aktivitesi kaydedildi. Lenfosit alt grupları ve immunglobülinler yüzde değer olarak bildirildi.

Veriler bilgisayarda SPSS (Statistical Package for Sociences) istatistik programına girildi. Korelasyon analizleri Spearman's testi ile, kontrol grubuyla akciğer kanserli olguların karşılaştırılması ve seçilmiş grupların karşılaştırılması ise Mann Whitney U testi ile yapıldı.

## BULGULAR

Çalışmaya hepsi erkek yaş ortalamaları 58±11 olan 4 KHAK ve 20 ileri evre KHDAK olgusu olmak üzere toplam 24 hasta dahil edildi. Akciğer kanserli olguların sigara anamnezleri (paket-yıl), evreleri, performans durumları (Karnofsky performans durumu), kan albümin değerleri (g/dl), vücut kitle indeksleri (kilo/boy<sup>2</sup>), tablo-1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1:** Akciğer kanserli olguların genel özellikleri

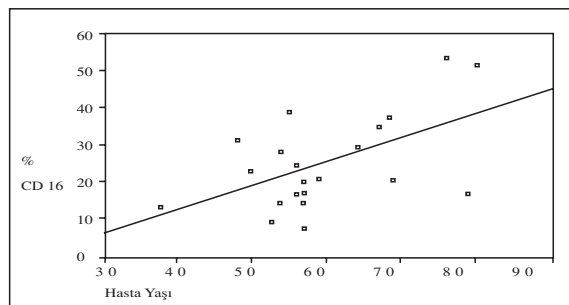
Olgu	Yaş	Sigara (p-yıl)	Hücre cinsi	Evre	Albm (g/dl)	Vücut kütlesi (kilo/boy <sup>2</sup> )	Karnofsky
1	57	60	Epidermoid	IIIb	4.0	28.0	90
2	79	0	KHDAK	IIIb	3.8	20.8	80
3	56	80	Epidermoid	IV	3.7	30.8	70
4	69	5	KHDAK	IIIb	4.0	25.3	80
5	50	60	Adeno	IIIb	4.0	26.6	80
6	59	59	Adeno	IV	4.0	19.1	80
7	57	60	Büyük hüç.	IIIb	4.7	19.6	90
8	68	25	Adeno	IIIb	3.3	17.7	70
9	54	35	Adeno	IV	3.0	24.5	70
10	67	50	Epidermoid	IIIb	3.4	20.8	60
11	48	32	Adeno	IV	3.8	22.9	70
12	55	40	Adeno	IIIb	4.1	30.8	80
13	53	35	KHDAK	IV	3.9	25.3	80
14	56	60	Epidermoid	IIIb	4.4	32.6	80
15	38	100	Epidermoid	IV	4.2	23.0	80
16	54	60	Epidermoid	IV	4.0	19.1	70
17	76	50	KHDAK	IV	3.8	19.2	70
18	57	35	Epidermoid	IIIa	4.7	27.7	80
19	57	0	Adeno	IV	3.7	22.5	60
20	38	20	Epidermoid	IIIa	4.4	27.0	90
21	80	50	KHDAK	IIIb	4.4	24.9	80
22	64	96	KHDAK	IIIa	3.8	17.2	80
23	64	25	KHDAK	IIIb	2.8	28.1	70
24	49	35	KHDAK	IV	3.5	18.6	80

Kontrol grubundaki olguların hepsi sigara içen erkek olgular olup yaş ortalamaları  $53 \pm 7$  dir. Kontrol grubu ve akciğer kanserli olguların yaş ortalamaları ve sigara anamnezleri (paket-yıl) arasında anlamlı fark bulunmadı ( $p > 0,05$ ). Akciğer kanserli olgular ile kontrol grubunun immunolojik parametreleri karşılaştırıldığında; akciğer kanserli olgularda CD4+'lık yüzdesi, CD19+'lık yüzdesi ve CD4/CD8 oranı anlamlı olarak düşük bulundu ( $p < 0,05$ ). Yine akciğer kanserli grupta kontrol grubuna göre IgG yüksek, IgM düşük bulundu ( $p < 0,05$ ). Akciğer kanserli olgularda immunolojik parametrelerin kontrol grubu ile karşılaştırılması Tablo II'de gösterilmiştir.

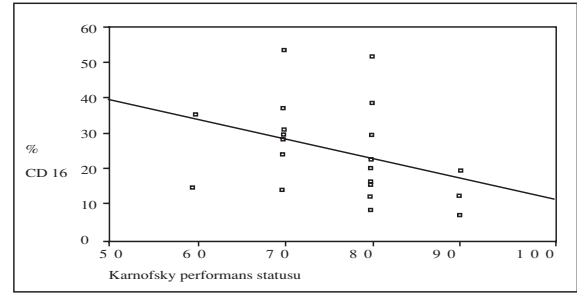
**Tablo II:** Akciğer kanseri ve kontrol grubu bulguları karşılaştırması

	Kontrol Grubu (n=11)	Akciğer Kanseri (n=24)	p
Yaş	$53 \pm 7$	$58 \pm 11$	$p > 0,05$
Sigara (p-yıl)	$34 \pm 12$	$44 \pm 26$	$p > 0,05$
CD3%	$71,1 \pm 5$	$65,6 \pm 13$	$p > 0,05$
CD4%	$60,7 \pm 6$	$42,5 \pm 10$	$p < 0,001$
CD8%	$37,2 \pm 6$	$38,5 \pm 11$	$p > 0,05$
CD4/CD8	$1,67 \pm 0,3$	$1,17 \pm 0,3$	$p = 0,002$
CD16%	$22,1 \pm 6$	$25,1 \pm 12$	$p > 0,05$
CD19%	$28,9 \pm 13$	$11,9 \pm 9$	$p = 0,001$
IgA%	$20,7 \pm 17$	$22,3 \pm 11$	$p > 0,05$
IgG%	$9,7 \pm 7$	$16,5 \pm 8$	$p = 0,023$
IgM%	$27,8 \pm 9$	$16,5 \pm 13$	$p = 0,021$

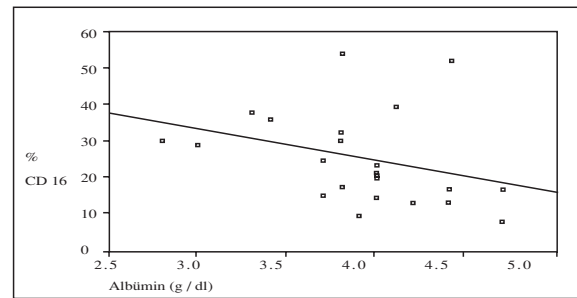
Akciğer kanserli olgularda yaşla beraber periferik kan CD16+'lığının anlamlı olarak arttığı tespit edildi. ( $p=0,022$ ) (Grafik 1). Kontrol grubunda yaş ile lenfosit alt grupları ve immunglobülinler arasında anlamlı korelasyon bulunmadı. Akciğer kanserli hastalarda, Karnofsky performans durumu iyi olan olgularda ve kan albümin düzeyi yüksek olanlarda, periferik kan CD16+'lığının anlamlı olarak azaldığı tespit edildi ( $p < 0,05$ ) (Grafik 2, 3). Hasta performansı ile kan albümin düzeyi pozitif korelasyon göstermektedir ( $p < 0,001$ ).



**Grafik 1:** Akciğer kanserinde CD16+'lığı ileri yaşla beraber anlamlı artmaktadır. ( $p=0,02$ ,  $r=0,474$ )



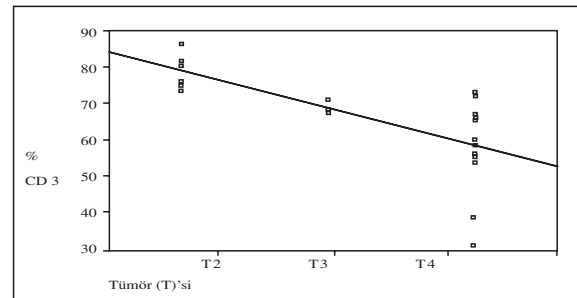
**Grafik 2:** İyi performanslı hastalarda CD16+'lığı azalmaktadır. ( $p=0,04$ ,  $r=-0,430$ )



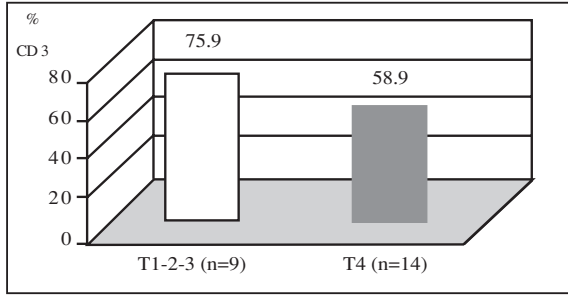
**Grafik 3:** Akciğer kanserinde albümin düzeyi arttıkça CD16+'lığı azalmaktadır. ( $p=0,041$ ,  $r=-0,452$ )

Akciğer kanserinde ve kontrol grubunda sigara içimi (paket-yıl) ile periferik kan lenfosit alt grupları ve immunglobülinler arasında anlamlı korelasyon bulunmadı. Akciğer kanserli olgularda vücut kitle indeksi ile hasta performansı, kan albümin düzeyi ve immunolojik parametreler arasında korelasyon saptanmadı.

Tümör yaygınlığı ve evresi ile laboratuvar parametreleri korelasyonuna bakıldı. T (tümör) komponenti arttıkça CD3+'lığı çok anlamlı olarak azalmaktadır ( $p=0,001$ ) (Grafik 4). T4 olgular ile (n=14) T1-2-3 olgular (n=10) lenfosit sub-grupları ve immunglobülinler açısından karşılaştırıldığında T4 olgularda, diğer gruba göre CD3+'lığı anlamlı olarak daha düşük bulundu ( $p=0,0001$ ) (Grafik 5).



**Grafik 4:** Hastalarda T (tümör) komponenti arttıkça CD3+'lık %si azalmaktadır. ( $p=0,001$ ,  $r=-0,804$ )



**Grafik 5:** T durumuna göre CD3+’liği oranları (p=0,0001)

Radyolojik olarak N arttıkça (N0-3) periferik kan CD4+’liği ve CD4/CD8 oranının anlamlı olarak azaldığı bulundu (p<0,05).

Metastazı olan (M1=10) ve olmayan (M0=14) olgular arasında periferik kan lenfosit alt grupları ve immunglobülinler yönünden anlamlı farklılık saptanmadı.

## TARTIŞMA

Akciğer tümörlerinin ve tüm solid tümörlerin immunolojik harabiyetinde T-hücre kaynaklı immunit temel rol oynar. Bağışıklık sistemini direk veya indirek etkileyen her şey kanser akıbetinde etkili olabilmektedir (3).

Periferik kan lenfosit subgrupları ile akciğer kanserinde klinik ve patolojik bulgular arasında bir çok korelasyonlar bildirilmiştir (4-13). Bağışıklık sistemi sağlıklı bireylerde dahi gün içinde farklılıklar gösterebilmektedir (14, 15).

Çalışmamızda tüm hastalarda ve kontrol grubunda lenfosit alt gruplarına ve immunglobülinlere sabah saat 9:00’da bakılmış olup böylelikle sirkadiyen varyasyondan etkilenme en aza indirilmeye çalışılmıştır. Gorny ve arkadaşlarının (16) yaptığı çalışmada akciğer kanserli hastalarda CD4+ lenfosit fonksiyonlarında azalma olduğu gösterilmiştir. Wesselius ve arkadaşlarının (5) çalışmasında KHAK’de ve ileri evre KHDAK’li olgularda CD4 ve CD8 lenfosit alt gruplarında azalma tespit edilmiştir. Azalma özellikle CD4’de olup kan albümin düzeyi düşük olanlarda daha belirgin bulunmuştur. Tsuyuguchi ve arkadaşlarının (6) yaptığı çalışmada CD4+’lik oranı tüm evrelerde aynı olarak gösterilmiştir. Mazzoccoli ve arkadaşları (7) çalışmalarında akciğer kanserinde CD8+’liğini düşük ve erken evrelerde CD16+’liğini yüksek olarak bulmuşlardır. Brittenden ve arkadaşları (3) da erken evrede yüksek olan sitotoksik yanıtın ileri evrelerde azaldığını göstermiştir.

Çalışmamıza dahil olan olguların hepsi ileri evre KHDAK veya KHAK olgular olmasına rağmen evreden bağımsız olarak radyolojik lenf nodu (N) tutulumu olmayan olgular, radyolojik N+ olgularla karşılaştırıldığında N+ olgularda CD4+’liği (yardımcı T lenfositler) ve CD4/CD8 oranı düşük bulundu. Yine çalışmamızda evreden bağımsız olarak (T) tümör komponenti arttıkça periferik kanda CD3+’liğinin (olgun T lenfositler) çok anlamlı olarak azaldığı bulundu (p=0,001). T4 olgular ile T1-2-3 olgular karşılaştırıldığında yine CD3+’liğinin T4 olgularda anlamlı olarak düşük olduğu görüldü. Johnson ve arkadaşlarının (8) çalışmasında 710 opere akciğer kanserli olgunun piyesleri incelenmiş ve intratümöral CD3+ infiltrasyon yüksek olan hastalarda sürvi anlamlı olarak daha uzun bulunmuştur. Ne kadar çok lenfositin tümöre infiltre olduğu değil, tüm lenfositler içinde CD3+ olanların fazla olması anlamlı bulunmuş. Çalışmamızda T komponenti arttıkça periferik kan CD3+ liğinin azalması tümörün lenfositler tarafından infiltrasyonunda CD3+’lik oranının önemli olduğunu düşündürmektedir. Kumano ve arkadaşlarının (9) yaptığı çalışmada ise kanser hastalarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CD3 miktarında azalma olmadığı gösterilmiştir. Yine Tsuyuguchi ve arkadaşlarının (6) çalışmasında CD3+’liğinin azalmadığı bulunmuştur. Çalışmamızda akciğer kanserli olgularda CD4+’liği, CD19+’liği ve CD4/CD8 oranı kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. Tsuyuguchi ve arkadaşlarının (6) çalışmasında ileri evre olgularda ve hipotalbüminemili olgularda CD4+ ve B-lenfositlerin azaldığı gösterilmiştir. Studnicka ve arkadaşlarının (17) çalışmasında Küçük Hücreli Akciğer Kanserinde CD4/CD8 oranı düşükse cins, yaş ve evreden bağımsız ölüm riski %34 fazla bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da akciğer kanserli olgularda kontrol grubuna göre CD4 düşüklüğü ve buna bağlı CD4/CD8 oranında düşüklük en önemli defekt olarak bulunmuştur.

Cascio ve arkadaşlarının (10) yaptıkları çalışmada primer akciğer malignitelerinde CD19+’lik oranının Bronkoalveoler Lavajda (BAL) yüksek iken periferik kanda yaklaşık 5 kat düşük bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da periferik kanda CD19+’liğinin düşük bulunması akciğerde toplanmaya bağlı olabilir. Ayrıca CD4+’liği azaldıkça CD4 hücrelerden salgılanan interlökin-4 de azalır. İnterlökin-4, B-lenfositler için önemli bir aktivatördür. Buna bağlı olarak CD4 azalmasına CD19 azalmasının eşlik etmesi beklenir (18). Sonuç olarak akciğer kanserinde ilerleyen hastalık ve buna karşı immun yanıtın göstergesi olarak bazı lenfosit alt gruplarında (CD4, CD19, CD4/CD8 oranı) değişiklikler olur. İleri evre akciğer kanserinde matür

T ve B-lenfositler (CD3, CD4 ve CD19) anti-tümör immunitede temel rol oynuyor olabilir.

#### KAYNAKLAR

1. Beverley P. Tumour Immunology. In: Roitt I, Brostoff J, Male D, eds. Immunology 4th ed. London, Mosby, 1996; 20: 1-12.
2. Bright RK. Immunology of Lung Cancer. In: Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turrisi AT, Minna JD eds. Lung Cancer 2nd ed. Philadelphia, Williams and Wilkins, 2000:304-317.
3. Britten J, Heyo SD, Ross J, et al. Natural Killer Cells and Cancer. Cancer 1996;77:1226-1243.
4. Nakamura H, Kawasaki N, Hagiwara M, et al. Cellular Immunologic Parameters to Age, Gender, and Stage in Lung Cancer Patients. Lung Cancer 2000;28:139-145.
5. Wesseliuss LJ, Wheaton DL, Manahan-Wahl LJ, et al. Lymphocyte Subsets in Lung Cancer. Chest 1987;91:725-729.
6. Tsuyuguchi I, Shiratsuchi H, Fukuoka M. T-lymphocyte Subsets in Primary Lung Cancer. Jpn J Clin Oncol 1987;17:13-17.
7. Mazzoccoli G, Balzanelli M, Giuliani A, et al. Lymphocyte Subpopulations Anomalies in Lung Cancer Patients and Relationship to the Stage of Disease. In Vivo 1999;13:205-209.
8. Johnson SK, Kerr KM, Chapman AD, et al. Immune Cell Infiltrates and Prognosis in Primary Carcinoma of the Lung. Lung Cancer 2000;27:27-35.
9. Kumano N, Koinumaru S, Suzuki S, et al. Tumour Histology and the Immunoregulatory T-lymphocyte Subsets in Lung Cancer Patients. Tohoku J Exp Med 1986;150:483-484.
10. Cascio G, Anania A, Mazzetti R, et al. BAL T-lymphocyte Subsets are Reduced in Primary Lung Neoplasias. Panminerva Med 1993;35:127-130.
11. Yasumoto K, Ohta M, Nomoto K. Cytotoxic Activity of Lymphocytes to Bronchogenic Carcinoma Cells in Patients with Lung Cancer. Gann 1976;67:505-511.
12. Brunetti G, Bossi A, Baiardi P, et al. Soluble Interleukin 2 Receptor (sIL2R) in Monitoring Advanced Lung Cancer. Lung Cancer. 1999;23:1-9.
13. Kratikanont P, deShazo RD, Banks DE et al. Cytotoxic cell Function in Bronchogenic Carcinoma. Chest 1987;92:90-94.
14. Mazzoccoli G, Bianco G, Corraera M, et al. Circadian Variation of Lymphocyte Subsets in Health Subjects. Recent Prog Med 1998;89:569-572.
15. Fukuda R, Inohara Y, Takaya M, et al. Circadian Variation and Prednisolone-induced alterations of Circulating Lymphocyte Subsets in Man. Intern Med 1994;33:733-738.
16. Gorny MK, Jezewska E, Skrzypczak A, et al. Immunoregulatory effect of T-cell Subsets on PWM-induced IgG Synthesis by Blood Lymphocyte in Lung Cancer. Arch Immunol Ther Exp 1991;39:243-252.
17. Stunicka M, Wirnsberger R, Neumann M, et al. Peripheral blood Lymphocyte Subsets and Survival in Small-Cell Lung Cancer. Chest 1994;105: 1673-1678.
18. Peakman M, Vergani D. Cellular Immune Responses: Macrophages, Dendritic Cells and B-lymphocytes. In: Peakman M, Vergani D, eds. Basic and Clinical Immunology. First ed. London, Churchill Livingstone, 1997;6:72-80.