

AKCİĞER KANSERİNDE KEMOTERAPİNİN HÜCRESEL VE HÜMORAL İMMÜNİTEYE ETKİSİ

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 kanserinde kemoterapinin immun sistem üzerine etkisini, kemoterapi yanıtı ve en önemli kemoterapi komplikasyonu olan nötropenik enfeksiyonlar ile immun sistem ilişkisini incelemeyi amaçladık.

4'ü KHAK, 20'si KHDAK toplam 24 akciğer kanserli erkek hasta çalışmaya alındı. Periferik kanda flowsitometrik yöntemle CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 lenfosit alt gruplarına ve IgA, IgG ve IgM yüzdesine bakıldı. Olgulara 21 gün ara ile 2 kür sistemik kemoterapi uygulandıktan sonra aynı immunolojik parametrelere tekrar bakıldı.

Kanserli olgularda KT ile CD16 yüzdesinin azaldığı ve CD19 yüzdesinin ise arttığı tespit edildi ($p<0,05$). Kemoterapiye yanıt veren olgularda ($n=13$) CD8+'lıği kemoterapiye yanıtı olmayan olgularda ($n=11$) göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). Kemoterapi ile nötropenik enfeksiyon komplikasyonu gelişen olguların, KT öncesi CD4 ve CD19 düzeyleri diğer hastalardan anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,05$).

Sonuç olarak akciğer kanserinde uygulanan sistemik kemoterapi bazı lenfosit alt gruplarını etkilemektedir. Lenfosit alt gruplarına bakılarak kemoterapiye yanıt ve kemoterapiye bağlı nötropeni gelişme olasılığı önceden tahmin edilebilir.

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

(Solunum 2002;4:229-233)

SUMMARY

THE EFFECT OF CHEMOTHERAPY ON CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY IN LUNG CANCER

We investigated the effect of chemotherapy on the immune system by the advanced lung cancer. The relationship between the immune system and the response to chemotherapy, as well as the incidence of the neutropenic infections occurring as the most important complication of chemotherapy was evaluated.

4 male patients with SCLC and 20 male patients with NSCLC (total 24 male patients) 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 patients. The patients with lung cancer had 2 courses of chemotherapy within 21 days interval. Then, the same immunological parameters were remeasured.

After the 2nd course of chemotherapy, a decrease in CD16% and an increase in CD19% were detected when compared to the initial levels ($p<0,05$). CD8 (+) level was higher in chemotherapy responsive cancer patients ($n=12$) compared to unresponsive ones ($n=11$) and the difference was statistically significant ($p<0,05$). Initial CD4 and CD19 levels of patients who developed neutropenic infections were significantly less than the patients with not having this complication.

As a result, systemic chemotherapy effects some lymphocyte subgroups. Therefore, lymphocyte subgroups analysis may be guiding in predicting the neutropenic infection complication which is the leading cause of mortality of chemotherapy and the response to chemotherapy.

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

(Solunum 2002;4:229-233)

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 önlenbilir 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 immun 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). Tamı sırasında ileri evre hastalık nedeni ile hastaların çoğunda temel tedavi yaklaşımı olan cerrahi uygulanamamaktadır. Rezeksiyon yapılan hastaların da çoğunda zamanla nüks ve metastatik hastalık gelişmektedir.

KHAK'de ve ileri evre KHDAK'de sistemik kemoterapi (KT), hastalığı kontrol altına almak ve tedavi etmek için halen uygulanan standart yaklaşımdır. Kemoterapi doğası gereği kanser hücreleri üzerine öldürücü etkileri yanında, vücudun hızla çoğalan birçok hücrelerini de etkilemektedir. İmmun sistemin temel taşlarını oluşturan hemopoetik hücreler bu etkilenmenin en önde gelen elemanlarıdır. Kemoterapinin immun sistem elemanları üzerine yaptığı geçici ve sayısal negatif etkiler dışında ne gibi başka etkileri olduğu araştırma konusudur. (Öm: Kemoterapiye bağlı apoptozis)

Biz de çalışmada ileri evre akciğer kanserlerinde kemoterapinin immun sistem üzerine etkisini, kemoterapi yanıtı ve en önemli KT komplikasyonu olan nötropenik enfeksiyonlar ile immun sistem ilişkisini incelemeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Kliniğimizde Mayıs-Ekim 2000 tarihleri arasında akciğer kanseri tanısı konan inoperabl hastalar çalışmaya dahil edildi. Hücre tanıları; balgam sitolojisi, bronkoskopik biyopsi, bronş lavajı veya trans-torasik iğne aspirasyonu (TTİA) ile kondu. Histolojik tanısı kesinleşen hastalara üst batın BT, kranial BT veya MR, tüm vücut kemik sintigrafisi ve gereken olgulara batın 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. Takipleri boyunca kan transfüzyonu gereken hastalar çalışmaya alınmadı. Hastaların KT yanıtları, vücut kitle indeksleri (kilo/boy²), kemoterapiye bağlı sitopeni atakları ve enfeksiyon atakları kaydedildi. Olgular kemoterapi yanıtlarına göre (Yanıt var: stabil, parsiyel yanıt, tam yanıt

ve Yanıt yok: progresif hastalık) gruplara ayrıldı. Hastaların Karnofsky performans durumu 60 ve üzeriydi. KHAK'li olgulara 21 gün ara ile Haloksan 2 g/gün D1, Cisplatin 25 mg/m² D1-3, Etoposid 100 mg/m² D1-3 tedavisi uygulandı. KHDAK'li olgulara ise yine 21 gün ara ile Gemsitabine 1250 mg/m² D1, D8, Cisplatin 80 mg/m² D2 şeklinde tedavi uygulandı. 2 kür KT sonrası hastaların tedavisine hücre tanılarına ve KT yanıtlarına göre devam edildi.

Tüm hastalarda KT öncesi ve 2. kür KT sonrası (3. kür başlamadan önce; D 21'de) hemogram, biokimya (ALT, AST, Üre, Kreatinin, Total protein ve Albümin), PA akciğer grafisi kontrolleri yapıldı. Yine KT öncesi ve 2. kür sonrası 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, granülositler, monositler), CD19 (B lenfosit öncüleri ve olgun B lenfositleri), IgA, IgM ve IgG bakıldı.

Olguların 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 immun 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, KT öncesi ve sonrası immun profil değerleri Wilcoxon testi ile, 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.

Tüm olguların hücre tanıları, evreleri, 2. kür sonrası

kemoterapi yanıtları ve KT sonrası nötropeni komplikasyonları (WHO kemoterapi nötropeni değerlendirmesi) Tablo I'de gösterilmiştir. Kemoterapi öncesi ve sonrası laboratuvar parametreleri değerlendirildiğinde CD16'da kemoterapi sonrası öncesine göre anlamlı azalma ($p=0,042$) ve CD19'da kemoterapi sonrası anlamlı artış ($p=0,007$) tespit edildi. CD3, CD4, CD8, CD4/CD8 oranı, IgA, IgG ve IgM değerlerinde kemoterapiye bağlı anlamlı değişiklik saptanmadı (Tablo II).

Tablo I: Tüm olguların genel özellikleri.

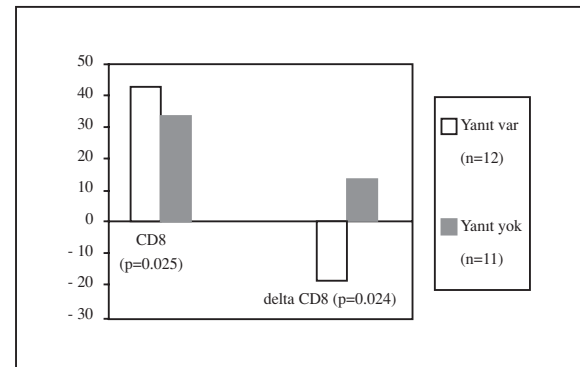
	Olgu sayısı	Oran (%)
Hücre cinsi		
KHAK	4	% 17
KHDAK	20	% 83
Evre		
IIIA	3	% 12
IIIB	11	% 42
IV	10	% 46
Kemoterapi yanıtı		
Yanıt var	13	% 58
Yanıt yok	11	% 42
Nötropeni		
Yok	12	% 50
Grade I	3	% 12
Grade II	1	% 4
Grade III	-	-
Grade IV	8	% 34

Tablo II: Akciğer Kanserinde KT öncesi ve 2. kür sonrası bulgular.

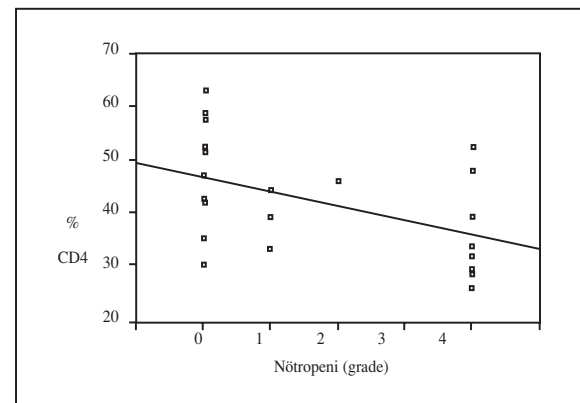
	KT öncesi	2 kür KT sonrası	p
Lökosit/mm ³	9300±4000	9200±5900	>0.05
Hct (%)	38.2±5	33.0±6	0.002
Hgb (g/dl)	12.8±2	11.4±1	0.009
Trombosit/mm ³	317000±104000	306000±143000	>0.05
Karnofsky PS	76±8	80±9	0.021
CD3%	65.6±13	63.3±17	>0.05
CD4%	42.5±10	44.5±13	>0.05
CD8%	38.5±11	37.0±14	>0.05
CD4/CD8	1.17±0.3	2.08±4.1	>0.05
CD16%	25.1±12	20.5±10	0.042
CD19%	11.9±9	21.2±17	0.007
IgA%	22.3±11	17.3±10	>0.05
IgG%	16.5±8	14.0±9	>0.05
IgM%	16.5±13	19.0±9	>0.05

Olguların 2 kür kemoterapi sonrası yapılan yanıt değerlendirmesinde 13 (%54) olguda yanıt alınırken (stabil hastalık 5, parsiyel yanıt 7, tam yanıt 1), 11 (%46) olguda yanıt alınmadı (Progresif hastalık 11). Kemoterapiye yanıt alınan (n=13) ve alınmayan (n=11) olguların laboratuvar parametreleri karşılaştırıldı. Kemoterapi yanıtı olan olgularda başlangıç CD8+'lığı anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,025$). KT'ye yanıt alınan olgularda CD8+'lığı azalırken, yanıt alınmayan olgularda ise artma görüldü ($p=0,024$) (Grafik 1). Kemoterapi yanıtı ile CD3, CD4, CD4/CD8 oranı, CD16, CD19, IgA, IgG ve IgM parametreleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

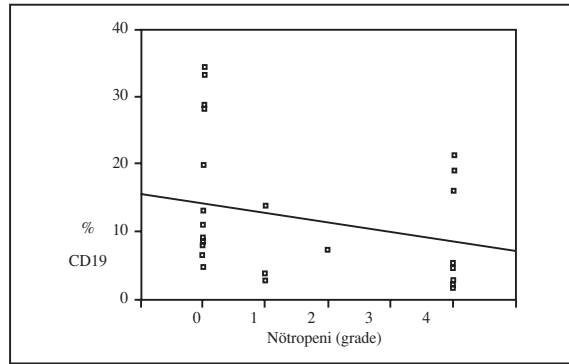
Kemoterapi komplikasyonlarından nötropeni gelişmesi ile lenfosit alt grupları ve immunglobülinlerin korelasyonuna bakıldı. KT öncesi bakılan CD4 ve CD19+'lık yüzdesi düşük olan olgularda, anlamlı olarak daha fazla nötropeni ve enfeksiyon geliştiği bulundu (Grafik 2 ve 3).



Grafik 1: KT yanıtına göre anlamlı fark olan laboratuvar parametreleri.



Grafik 2: Başlangıç CD4+'lık yüzdesi azaldıkça kemoterapi sonrası nötropeni miktarı anlamlı olarak artmaktadır ($p=0,014$, $r=-0,503$).



Grafik 3: Başlangıç CD19+’lik yüzdesi azaldıkça kemoterapi sonrası nötropeni miktarı anlamlı olarak artmaktadır ($p=0,033$, $r=-0,446$).

Takipleri boyunca (ort. takip süresi 6 ay) exitus olan olguların (n=10) sürvileri ile periferik kan lenfosit alt grupları ve immunglobülinler arasında anlamlı korelasyon bulunmadı.

TARTIŞMA

Akciğer tümörlerinin ve tüm solid tümörlerin immunolojik harabiyetinde T-hücre kaynaklı immunité temel rol oynar. Bağışıklık sistemini direkt 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. Premedikasyonda kullanılan steroid etkisi KT sonrası 21 güne ulaşmayacağından steroide bağlı lenfopeni etkisi de ekarte edilmiştir (15).

Kemoterapi (KT) öncesi ve 2 kür KT sonrası yapılan karşılaştırmada periferik kan CD16+’liğinde anlamlı azalma, CD19+’liğinde ise anlamlı artış tespit edildi. LeFever ve arkadaşlarının (16) yaptığı çalışmada akciğer kanserli olgularda NK aktivitesinde azalma gösterilmiştir. Çalışmamızdaki KT sonrası periferik kan CD16+’liği azalması KT’nin tetiklediği apoptozisde CD16+ lenfositlerin periferden tümör bölgesine göçü sonucu olabilir. Kim ve arkadaşlarının (17) yaptığı çalışmada ise cerrahi ve kemoterapiye bağlı NK aktivitesinin değişmediği sonucuna varılmıştır. Nakamura’ya ve Mazzoccoli’ye ait 2 ayrı çalışmada

akciğer kanserli olgularda periferik kan CD16+’liği erken evrede yüksek iken, ileri evrede düşük bulunmuştur (4, 7). Çalışmamızda zaten ileri evre olan olgularda KT’ye rağmen hastalığın ilerlemesi sonucu CD16+’liği azalması gözlenmiş olabilir. Çalışmamızda KT sonrası başlangıca göre CD19+’liğinin artmış bulunması, KT’nin tümör yükünü azaltmasına bağlı akciğerde toplanmanın azalması(10) veya KT komplikasyonu olan sistemik enfeksiyonların tetikleme sonucu olabilir.

Çalışmamızda tümör immunitesinde en önemli hücreler olan CD8+ lenfosit (sitotoksik T lenfositler) yüzdesi yüksek olan olgularda KT yanıtı anlamlı olarak yüksek bulundu. Yasumoto ve Tsuyuguchi’ye ait 2 ayrı çalışmada erken evrelerde CD8+’liğinin yüksek olduğu ve buna bağlı prognozun iyi olduğu söylenmiştir (6, 11). Bizim olgularımız ileri evre olmasına rağmen KT’ye yanıt alınanlarda CD8+’lik oranının yüksek olması, ilaç etkinliği yanında kişinin kendi immunitesinin de KT yanıtında önemli rol oynadığını göstermektedir.

Çalışmada periferik kan CD4+’liği ve CD19+’liği düşük olan akciğer kanserli olgularda KT’ye bağlı nötropeni gelişme olasılığı anlamlı olarak yüksek bulundu. CD4+ lenfositlerin enfeksiyon ile mücadelede ne kadar önemli olduğu ve düşüklüğünde fırsatçı enfeksiyonlarda artış iyi bilinmektedir (18-20). CD19+ lenfositler (olgun B lenfositler) immunglobülin yapma potansiyeline sahip olup bakteriel enfeksiyonlarda çok önemli koruyucu rolleri vardır (21, 22). Ayrıca CD4+’liği azaldıkça interlökin-4 de azalır, CD19 azalması buna eşlik eder (23).

Sonuç olarak akciğer kanserinde uygulanan sistemik kemoterapi tümör yükünü azaltarak veya immun sistem hücrelerine direkt etki ile bazı lenfosit alt gruplarını (CD16, CD19) etkilemektedir. KT yanıtında kişinin immunitesini yansıtan bazı lenfosit alt gruplarının (CD8) yüzdesi etkili olabilir. En önemli KT toksisitesi olan ve KT mortalite sebeplerinin başında gelen nötropenik enfeksiyon riskini önceden kestirmede bazı lenfosit alt grupları (CD4, CD19) yol göstertici 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. Brittenden 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. Kratkanont 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. *Recenti Prog Med* 1998;89:569-572.
15. Fukuda R, Inchikawa Y, Takaya M, et al. Circadian Variation and Prednisolone-induced alterations of Circulating Lymphocyte Subsets in Man. *Intern Med* 1994;33:733-738.
16. LeFever AV, Funahashi A. Phenotype and Function of Natural Killer Cells in Patients with Bronchogenic Carcinoma. *Cancer Res* 1991;51:5596-5601.
17. Kim SK, Cho CH, Ahn CM, et al. Natural Killer Activity and Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity in Patients with Primary Lung Cancer. *Yonsei Med J* 1992;33:41-47.
18. Gaga M, Bentley AM, Humbert M, et al. Increases in CD4+ T-lymphocytes, Macrophages, Neutrophils and IL-8 Positive in the Airways of Patients with Bronchiectasis. *Thorax* 1998;53:685-691.
19. Rook G. Cell-Mediated Immune Reactions. In: Roitt I, Brostoff J, Male D, eds. *Immunology*. 4th ed. London, Mosby, 1996;9 :1-15.
20. Storek J, Gooley T, Witherapson RP, et al. Infectious Morbidity in Long-term Survivors of Allogenic Marrow Transplantation is Associated with Low CD4 T-cell Counts. *Am J Hematol* 1997;54:131-138.
21. Opitz O, Pietsch K, Ehlers S, et al. Cytokine Gene Expression in Immune Reinfected with *Mycoplasma pneumoniae*; the Role of Subsets in Aggravating the Inflammatory Response *Immunobiology* 1996-97;196:575-587.
22. Pizzichini MM, Pizzichini E, Efthimiadis A, et al. Markers of Inflammations in Induced Sputum in Acute Bronchitis Caused by *Chlamydia pneumoniae*. *Thorax* 1997;52:929-931.
23. 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.