Evre I küçük hücreli dışı akciğer kanserinde tümör dokusuna natural killer hücre infiltrasyonunun prognoza etkisi

Şule KARADAYI[1], Ayten KAYI CANGIR[1], Sibel ÖZTÜRK[2], Serpil DİZBAY SAK[2], Murat AKAL[1], Hadi AKAY[1]

[1] Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı,
[2] Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Evre I küçük hücreli dışı akciğer kanserinde tümör dokusuna natural killer hücre infiltrasyonunun prognoza etkisi

Akciğer kanseri, gelişmiş ülkelerde kadınlarda ve erkeklerde en sık görülen kanser türüdür. Günümüzde akciğer kanseri olan hastaların beş yıllık sağkalım oranları %14'tür. Akciğer kanserinin gelişim ve yayılımında immün sistemin çok önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada, evre I küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olan 40 hastada tümör dokusunda natural killer (NK) hücre infiltrasyonu değerlendirilerek prognoza etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda, 1994-1998 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı'nda KHDAK nedeniyle rezeksiyon yapılan 40 hastanın doku örnekleri incelendi. Hastaların hepsi evre I'di ve hepsinin hücre tipi yassı hücreli karsinomdu. Postoperatif dönemde tüm hastalar dört-sekiz yıl arasında takip edildi. NK hücre sayısı 1 ile 86 arasında değişmekte olup, ortalama 13.63 ± 11.86 idi. Hastalar NK hücre sayısı yüksek olan grup (n= 16) ve NK hücre sayısı düşük olan grup (n= 24) olmak üzere iki gruba ayrıldı. NK hücre sayısı düşük olan grupta median sağkalım 52 ± 6 ay ve beş yıllık ortalama sağkalım %51 idi. NK hücre sayısı yüksek olan grupta ise median sağkalım 58 ± 4 ay ve beş yıllık ortalama sağkalım %68 idi. İki grup arasında beş yıllık ortalama sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (p= 0.15). Sonuç olarak, çalışmamızda evre I KHDAK'da tümör dokusuna NK hücre infiltrasyonunun prognoza anlamlı bir etkisi saptanmadı.

Anahtar Kelimeler: *Akciğer kanseri, prognoz, natural killer.*

Yazışma Adresi (Address for Correspondence):
Dr. Şule KARADAYI, Emrah Mahallesi Yusufcuk Sokak No: 14/6 06120 Etlik Keçiören ANKARA - TURKEY
e-mail: sulekaradayi73@yahoo.com

SUMMARY

The prognostic effect of natural killer cell infiltration to tumoral tissues in stage I non-small cell lung cancer

Şule KARADAYI[1], Ayten KAYI CANGIR[1], Sibel ÖZTÜRK[2], Serpil DİZBAY SAK[2], Murat AKAL[1], Hadi AKAY[1]

[1] Department of Chest Surgery, Faculty of Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey,
[2] Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey.

Lung cancer is the most common type of cancer among males and females in developed countries. Currently, the five-year survival rate of lung cancer patients is 14%. Immune system has been considered to play an important role in the development and metastasis of lung cancer. In this study, natural killer (NK) cell infiltration was evaluated in the tumor tissues of 40 patients with stage I non-small cell lung cancer (NSCLC) to evaluate its effect on the prognosis. The evaluation included the tissue samples of 40 patients who underwent resection due to NSCLC between 1994 and 1998 in Ankara University Medical School, Chest Surgery Department. All the patients had stage I squamous cell carcinoma. The patients were followed-up for 4-8 years postoperatively. NK cell counts varied between 1 and 86 (mean: 13.63 ± 11.86). The patients were divided into two groups according to their cell counts as low (n= 24) and high (n= 16). The mean survival time of the group with low NK cell count was 52 ± 6 months and the mean five-year survival rate was 51%. The mean survival time of the group with high NK cell count was 58 ± 4 months and the mean five-year survival rate was 68%. No statistically significant difference was detected between the two groups for five-year survival time (p= 0.15). As a result, in our study we did not find any significant effect of natural killer infiltration on tumoral tissue in prognosis of stage I NSCLC.

Key Words: *Lung cancer, prognosis, natural killer.*

Tedavi olmaksızın bazı akciğer kanserlerinin spontan regresyonuyla ilgili nadir yayınlar, benzer histolojik özellikleri olan tümörlerin farklı progresyon hızlarına sahip olmaları, özellikle küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)'nde tümör dokusunda immün hücre infiltrasyonunun gözlenmesi gibi faktörler akciğer kanserinin gelişim ve yayılımında immün sistemin çok önemli rolü olduğunu düşündürmektedir (1). Natural killer (NK) hücreleri, lenfositlerin küçük bir alt grubudur. Tümör hücrelerini, daha önceden sensitizasyona gerek olmaksızın, in vitro şartlarda lizis edebilirler. İn vivo olarak da tümör hücrelerine karşı ilk savunma görevini yaptıkları düşünülmektedir (2).

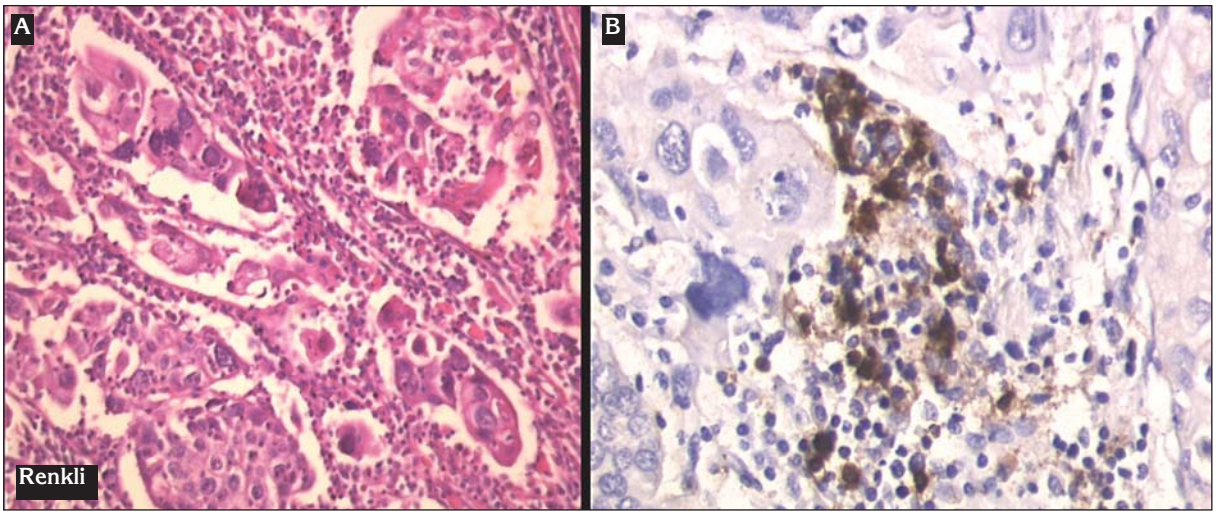
Bu çalışmada, evre I KHDAK'lı 40 hastada, tümör dokusunda NK hücre infiltrasyonu değerlendirilerek, prognoza etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

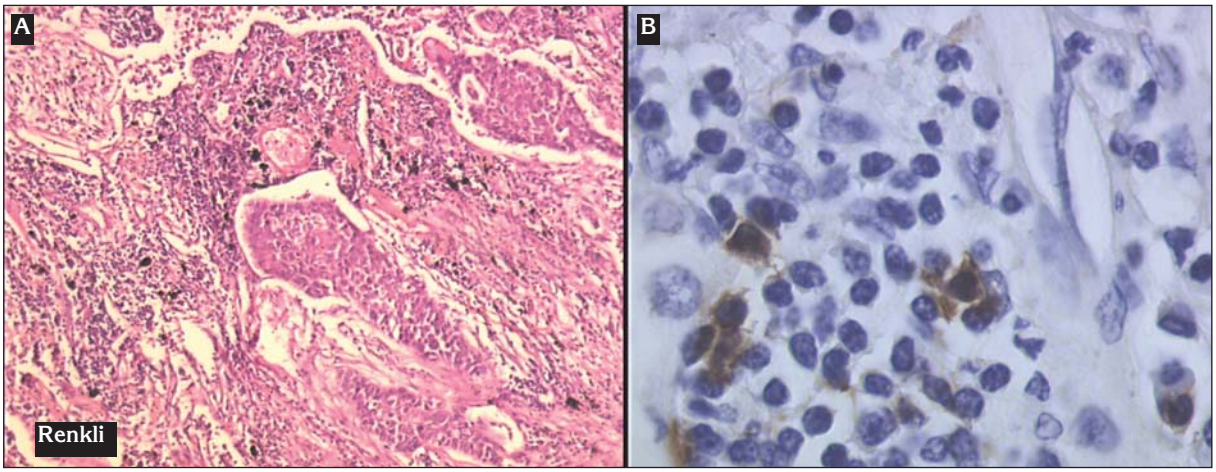
Çalışmamızda, 1994-1998 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı'nda cerrahi tedavi uygulanan evre I KHDAK'lı 40 hastanın doku örnekleri retrospektif olarak incelendi. Postoperatif dönemde tüm hastalar dört-sekiz yıl arasında takip edildi. Operasyondan sonraki ilk bir ay içinde ölen hastalar, eksploratris torakotomi yapılan hastalar ve başka bir kanser öyküsü olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

İmmünhistokimyasal İnceleme

Fakültemiz Patoloji Anabilim Dalı'nda, tümör tipini ve diferansiasyon derecesini en iyi yansıtan %10'luk formalin tesbitli parafin bloklardan immünhistokimyasal inceleme için 4 µm'lik kesitler hazırlandı. Adhesivli lama alınan kesitlerde, rutin deparafinizasyon işlemini izleyerek immünhistokimyasal olarak "Streptavidin-Peroksidaz" yöntemi uygulandı. Deparafinizasyon işlemi için kesitler; 37°C'lik etüvde gece inkübasyonu ve sabah 70°C'lik etüvde bir saatlik inkübasyondan sonra üçer kez ksilen, üçer kez alkol ve distile suda beş dakika bekletildi. Kesitler numaralı



Resim 1. Yassı hücreli karsinom; HE x400 (A). Natural killer hücreleri; DAB x400 (B).



Resim 2. Yassı hücreli karsinom; HE x200 (A). Natural killer hücreleri; DAB x1000 (B).

barkotların yapıştırılmasından sonra Ventana Nexes otomatik immün boyama cihazına yerleştirildi. Antijenin tekrar açığa çıkarılması veya enzime gereksinim duyulmadan 1.5 saatlik boyama işleminden geçirildi. Kesitlere 1/50 (Zymed) ve 1/100 (Byogenex) dilüsyonlarda CD57 (Clone: NK-1) primer antikoru uygulandı. Kromojen olarak DAB (diamino benzidin) kullanıldı. CD57 için reaktif lenf nodülü pozitif kontrol kabul edildi, NK hücrelerindeki membranöz boyanma pozitif boyanma olarak kabul edildi. Neoplastik hücreler çevresindeki NK hücreler sayıldı, neoplastik hücrelerden uzak veya bronş assosiye lenfoid doku olan organize mukozal lenfoid follikül-ler içerisinde yer alan NK hücreler değerlendirme dışı bırakıldı. CD57 antijeni, aynı zamanda nöroendokrin hücreler tarafından da eksprese edildiği için nöroendokrin hücre morfolojisi gösteren CD57 pozitif hücreler değerlendirmeye alınmadı. Bu kriterler eşliğinde, Olympus Bx50 ışık mikroskobu ile x100 veya x200'lük büyütme alanında en yoğun NK hücre içeren altı alan belirlendi. Bu alanlar immersiyon yağı ile yağlandı ve x1000'lik büyütme alanında NK hücreler tek tek sayıldı (Resim 1,2). Bir olgu için toplam altı sayısal değer kaydedildi.

İstatistiksel Değerlendirme

Gruplar arası NK sayısı karşılaştırmaları t-testi ve ki-kare testi kullanılarak yapıldı. Sağkalım olasılıkları Kaplan-Meier yöntemiyle hesaplandı. Gruplar arası sağkalım karşılaştırmaları log-rank

testiyle yapıldı. İstatistiksel analizler SPSS for windows 10.0 paket programı kullanılarak yapıldı.

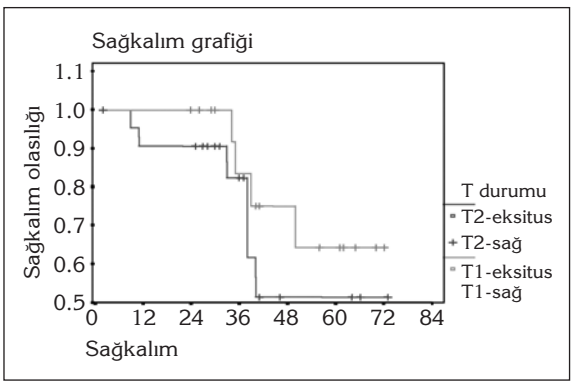
BULGULAR

1994-1998 yılları arasında KHDAK nedeniyle rezeksiyon yapılan 40 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastaların tümü erkekti (%100). Yaşları 35-83 yıl arasında değişmekteydi ve ortalama yaş 59.2 ± 10.2 idi. Hastaların 17 (%42.5)'si evre IA, 23 (%57.5)'ü evre IB idi. Tümörün lokalizasyonu, 6 (%15) hastada sağ üst lobda, 1 (%2.5) hastada sağ orta lobda, 11 (%27.5) hastada sağ alt lobda, 12 (%30) hastada sol üst lobda, 6 (%15) hastada sol alt lobda, 1 (%2.5) hastada sağ hiler lokalizasyonda, 3 (%7.5) hastada sol hiler lokalizasyonda idi.

Hastaların tamamının hücre tipi yassı hücreli karsinomdu ve median sağkalımları 57 ± 4 ay, beş yıllık ortalama sağkalımları ise %58 idi.

T grupları göz önüne alındığında T1 olan grupta (n= 17) median sağkalım 61 ± 5 ay, T2 olan grupta (n= 23) median sağkalım 53 ± 6 ay idi. T1 olan grubun beş yıllık sağkalımı %64, T2 olan grubun beş yıllık sağkalımı %52 idi. İki grup arasında sağkalım süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p= 0.32) (Şekil 1).

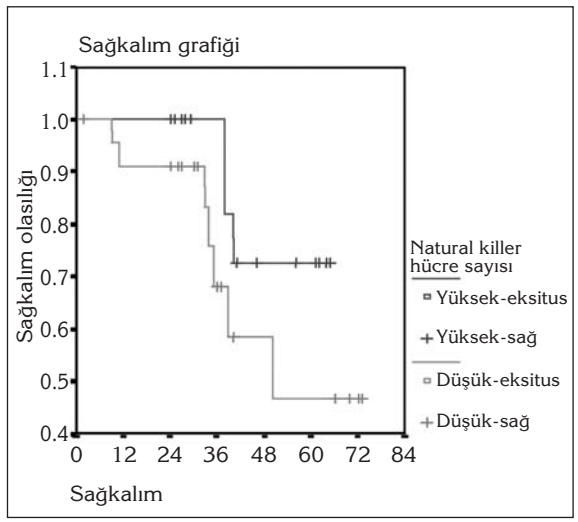
Hastaların 29 (%72.5)'u 65 yaş altı, 11 (%27.5)'i 65 yaş ve üstü grupta idi. Altmış beş yaş altı grupta median sağkalım 60 ± 4 ay, 65 yaş ve üstü grupta ise 38 ± 3 ay idi. Yaş grupları arasında median sağkalım süresi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (p= 0.20).



Şekil 1. Hastaların T durumlarına göre sağkalımları.

Hastaların 32 (%80)'si sigara içiyor, 8 (%20)'i sigara içmiyordu. Sigara içen ve içmeyen gruplar sağkalım süreleriyle karşılaştırıldığında; sigara içen grupta median sağkalım 59 ± 4 ay, sigara içmeyen grupta 49 ± 9 aydı. Sigara içen grubun beş yıllık ortalama sağkalımı %60, sigara içmeyen grubun beş yıllık ortalama sağkalımı ise %54 idi. İki grup arasında sağkalım süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (p= 0.18).

NK hücre sayısı 1 ile 86 arasında değişmekte olup, ortalama 13.63 ± 11.86 idi. Daha önceden NK sayısı düşüklüğü ya da yüksekliğiyle ilgili hiçbir yayında kriter bulunmadığı ve tek benzer çalışma olan Takanami ve arkadaşlarının akciğer adenokanserli hastalarda NK hücre infiltrasyonunun prognoza etkisini araştırdıkları çalışmalarında, hastalarının ortalama NK hücre sayılarını kriter aldıkları için, biz de çalışmamızda ortalama NK hücre sayısı olan 13 rakamını kriter aldık (3). Hastaları iki gruba ayırdık: NK hücre sayısı 13'ten fazla olan grup (n= 16) ve NK hücre sayısı 13 ya da daha az olan grup (n= 24). NK hücre sayısı düşük olan grupta (n= 24) median sağkalım 52 ± 6 ay ve beş yıllık ortalama sağkalım %51 idi. NK hücre sayısı yüksek olan grupta (n= 16) ise median sağkalım 58 ± 4 ay ve beş yıllık ortalama sağkalım %68 idi. İki grup arasında beş yıllık ortalama sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (p= 0.15) (Şekil 2). Tablo 1'de NK hücre sayısı



Şekil 2. Natural killer hücre sayısı yüksek ve düşük olan grupların sağkalım eğrisi.

Tablo 1. NK hücre sayısı ve diğer klinikopatolojik parametreler arası ilişki.

	NK hücre sayısı		
Değişken	Düşük (< 13) (n= 24)	Yüksek (> 13) (n= 16)	p
Yaş ortalaması	58.04	61.0	> 0.05
Yaş grubu			
65 yaş altı	19	10	> 0.05
65 yaş ve üstü	5	6	
T faktör			
T1	11	7	> 0.05
T2	13	9	
Sağkalım (5 yıllık)	%51	%68	> 0.05
Sigara			
İçen	17	15	> 0.05
İçmeyen	7	1	

NK: Natural killer.

düşük ve yüksek olan grubun diğer klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Tümöre karşı immün yanıt, kanser hastalarında prognozun belirlenmesinde önemli bir rol oynamasına rağmen, sadece birkaç immünolojik parametrenin sağkalımı etkilediği gösterilebilmiştir. Bu immünolojik parametrelerden akciğer kanseri için; cilt hipersensitivite süresinin gecikmesi, lenfoblastogenez ve NK hücre aktivitesinin yaşam süresiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (3-5). Akciğer kanseri hastalarında immünite üzerine birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, bu çalışmaların birçoğunda hasta sayısı çok az olduğu için istatistiksel bir anlamlılık bulunamamıştır ya da sıklıkla hücre tipi ile akciğer kanserini karşılaştırılan parametrelerin arasındaki ilişki göz ardı edilmiştir. Bu nedenle immün parametrelerin akciğer kanserindeki prognostik önemi hâlâ açık değildir.

Nakamura ve arkadaşları, akciğer kanserli 287 hastada NK hücre aktivitesini 65 yaş altı grupta anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır (5). Bizim çalışmamızda 65 yaş altı ile 65 yaş ve üstü grupta tümör dokusunda NK hücre infiltrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi (p> 0.05).

Takanami ve arkadaşları, akciğer kanserli 150 hastanın tümör dokusundaki NK hücre infiltrasyonunu CD57 monoklonal antikoru kullanarak tespit etmişler; yaş, cinsiyet ve pulmoner adenokarsinomun subtipleri arasında NK hücre infiltrasyonu açısından belirgin farklılık bulamamışlardır (3). Ancak T sınıflaması, N sınıflaması ve evre ile belirgin ilişki bulmuşlardır (T sınıflaması ya da evre için p= 0.01, N sınıflaması için p= 0.02). Evre II ve III'te yüksek NK infiltrasyonu bulunan grupta prognozu daha iyi bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise grubun homojen olması açısından yalnızca evre I yassı hücreli kanserli hastalarda tümör dokusunda NK hücre infiltrasyonuna bakıldı. İstatistiksel olarak NK infiltrasyonu yüksek ve düşük grup arasında sağkalımda anlamlı farklılık bulunmadı.

NK hücrelerin aktivitesiyle ilgili de pek çok çalışma vardır. De Shazo ve arkadaşları çalışmalarında, dokuz akciğer kanserli hastada, kontrol grubuna göre NK hücre aktivitesinin azaldığını göstermişlerdir (6). Bordignon ve arkadaşları akciğer kanserinde NK aktivitesini araştırmışlar, rezeke edilen akciğer dokusundan parçalama tekniğiyle hastalıksız akciğer dokusundan elde ettikleri lenfositlerdeki NK aktivitesini eşzamanlı periferik kan lenfositlerinden daha düşük bulmuşlardır (7). Moy ve arkadaşları, akciğer kanserli hastaların tümör dokusundaki NK aktivitesinin periferik kandaki NK aktivitesine göre azalmış olduğunu bulmuşlardır (8). Okubo ve arkadaşları, tüberküloz ve maligniteye bağlı gelişen plörezilerde plevral sıvının NK aktivitesini periferik kan NK aktivitesi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirmişlerdir. NK aktivitesi tüberküloz plörezilerde periferik kandaki NK aktivitesi ile aynı bulunurken, malignitelerde NK aktivitesi periferik kandaki NK aktivitesinden düşük bulunmuştur (9). Kanserli hastalarda NK hücre aktivitesinin azalması, tümör tarafından indüklenen litik aktivite veya tümörün salgıladığı diğer faktörlerin etkileri nedeniyle olabilir.

NK hücrelerinin akciğerde, bronkoalveoler dokudan ziyade interstisyumda bulunduğu gösterilmiştir (4,10). Bizim çalışmamızda neoplastik hücrelerin çevresindeki NK hücreler sayıldı, neoplastik hücrelerden uzak veya bronş assosiye lenfoid doku olan organize mukozal lenfoid folli-

küller içerisinde yer alan NK hücreleri değerlendirme dışı bırakıldı. Akciğer kanserli hastalarda bronkoalveoler lavaj yöntemiyle elde edilen NK hücrelerinin defonksiyone olduğu daha önceki çalışmalarla gösterildiği için ve çalışmamızın retrospektif olması sebebiyle sadece tümör dokusunda NK hücre infiltrasyonuna baktık (10,11).

Sonuç olarak, akciğer kanseri olgularında, kanserin büyüme ve yayılımında immünolojik defans mekanizmasının önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Hücresel immün yanıtın bir parçası olan NK hücrelerin pek çok kanser türünde prognoza olumlu katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bizim çalışmamızda tümör dokusunda yüksek NK infiltrasyonu bulunan grup ile düşük NK infiltrasyonu bulunan grup arasında sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. Bu durum hasta sayısının yeteri kadar fazla olmaması ya da çalışmamıza sadece evre I hastaların alınmasıyla ilgili olabilir. Zira Takanami ve arkadaşları, akciğer adenokanserlerinde ileri evre (evre II ve evre III) hastalarda NK hücre infiltrasyonunun prognoza etkisini anlamlı bulmuşlardır. Hasta sayısı daha çok olan ileri çalışmalarla NK hücrelerinin akciğer kanserinin prognozuna etkisine dair bize yol gösterecek anlamlı sonuçlara ulaşmak mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

1. *Pisani RJ. Bronchogenic carcinoma: Immunologic aspects. Mayo Clin Proc 1993; 68: 386-92.*
2. *Pitchenik AE, Guffee J, Stein-Streilein J. Natural killer and interleukin activity in lung cancer. Am Rev Res Dis 1987; 136: 1327-32.*
3. *Takanami I, Takeuchi K, Giga M. The prognostic value of natural killer cell infiltration in resected pulmonary adenocarcinoma. J Thorac Cardiovasc Surg 2001; 121: 1058-63.*
4. *Anderson TM, Ibayashi Y, Holmes EC, Golub SH. Modification of natural killer activity of lymphocytes infiltrating human lung cancers. Cancer Immunol Immunother 1987; 25: 65-8.*
5. *Nakamura H, Saji H, Ogata A, et al. Immunologic parameters as significant prognostic factors in lung cancer. Lung Cancer 2002; 37: 161-9.*
6. *De Shazo RD, Moulder PV, Bozelka B, Chapman Y. Diminished natural killer cell activity of interstitial pulmonary cell populations from patients with carcinoma of the lung. Chest 1987; 91: 26-8.*
7. *Bordignon C,Villa F, Vecchi A. Natural cytotoxic activity in human lungs. Clin Exp Immunol 1982; 47: 437-44.*
8. *Moy PM, Holmes EC, Golub SH. Deppression of natural killer cytotoxic activity in lymphocytes infiltrating human pulmonary tumors. Cancer Res 1985; 45: 57-60.*
9. *Okubo Y, Nakata M, Kuroiwa Y, et al. NK cells in carcinomatous and tuberculous pleurisy. Chest 1987; 92: 500-4.*
10. *LeFever A, Funahashi A. Lymphokine-activated killer cell activity in lung cancer. Chest 1991; 99: 292-7.*
11. *Kariya Y, Inoue N, Kihara T. Activation of human natural killer cells by the protein-bound polysaccharide PSK independently of interferon and interleukin 2. Immunol Lett 1992; 31: 241-6.*