

# Akut Lenfoblastik Lösemili Çocuklarda Kemoterapinin Doğal Öldürücü (NK) Hücreler Üzerine Etkileri

Tuğçe AKSU UZUNHAN \*, Zeynep KARAKAŞ \*\*, Serap ERDEM KURUCA \*\*\*, Beyza ÇETİN \*\*\*, Sabriye KARADENİZLİ \*\*\*, Nilgün AKDENİZ \*\*\*\*, Belkıs ATASEVER \*\*\*\*\*, Günnur DENİZ \*\*\*\*

## Akut Lenfoblastik Lösemili Çocuklarda Kemoterapinin Doğal Öldürücü (NK) Hücreler Üzerine Etkileri

**Amaç:** Kemoterapi almakta olan ve tedavisi kesilmiş akut lenfoblastik lösemili çocuklarda immünitenin önemli elemanı NK hücrelerinde kemoterapi ile değişiklikler oluşabilir.

**Yöntemler:** Yaşları 2 ile 19 arasında değişen otuz üç ALL'li çocuk hasta immünofenotipleri, risk grupları ve klinik özellikleri kaydedilerek grup 1 (ALL TRALL 2000 protokolüne göre protokol M'i bitirmiş), grup 2 (idame kemoterapisi alan) ve grup 3 (tedavisi kesilmiş) olarak sınıflandırıldı. Kontrol grubu (grup 4) ise 2 ile 13 yaşları arasındaki bir sağlıklı çocuktan oluşturuldu. Hasta ve kontrol grubundan bilgilendirilmiş onam ile alınan kan örneklerinde NK sitotoksitesite deneyi, NK alt gruplarının flow sitometri ile tayini, sitokin ölçümü yapıldı, litik ünite hesaplandı ve sonuçlar hastaların klinik özellikleri ile birlikte değerlendirildi. SPSS 14.0 ile "oneway ANOVA" testi kullanılarak analiz edildi.

**Bulgular:** Grup 2'nin 1:1 E: H oranında NK sitotoksitesite diğer gruplardan anlamlı derecede yüksekti ( $p<0.05$ ). Reseptör ekspresyonları değerlendirildiğinde grup 2'de CD16+CD56+, CD16+NKG2D+, CD94+NKp46+ alt gruplarının grup 4'ten anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlendi ( $p<0.05$ ). NK hücre popülasyonu (CD16+CD56+'lığı) standart risk grubunda daha yüksekti, ancak fark anlamlı değildi. Tedavi kesilme süreleri açısından anlamlı fark yoktu. Tedavisiz grupta B ve T hücre immünofenotipleri arasında CD16+CD56+'lığı açısından anlamlı farklılık saptandı ( $p<0.05$ ). IFN $\gamma$  ve IL-15 açısından yalnızca tümör hücreleri ile uyarılmamış örneklerde grup 2 ve grup 3 kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p<0.05$ ).

**Sonuç:** Risk gruplarına göre kemoterapinin yoğunluğu NK hücrelerini sayısal olarak etkilemektedir. Tedavi kesilme süresi ise NK hücrelerinin fonksiyonlarını yeniden kazanmasında önemlidir. Kemoterapi ile fonksiyonlarında değişiklikler meydana gelen NK hücrelerini daha iyi anlamak ve bu sayede fonksiyonlarını arttıran tedavi yöntemleri geliştirmek, ALL'li çocukların hayat kalitelerine katkıda bulunacaktır.

**Anahtar kelimeler:** Akut lenfoblastik lösemi, kemoterapi, NK sitotoksitesite, NK reseptörleri, sitokinler

Çocuk Dergisi 2011; 11(4):160-169

**Alındığı tarih:** 12.03.2012

**Kabul tarihi:** 13.04.2012

\* İ. Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

\*\* İ. Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji-Onkoloji Bilim Dalı

\*\*\* İ. Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı

\*\*\*\* İ. Ü. Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı

\*\*\*\*\* Sabancı Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyolojik Bilimler Programı

**Yazışma adresi:** Uzm. Dr. Tuğçe Aksu Uzunhan, İ. Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul

**e-posta:** druzunhan@ttmail.com

## The Impact of Chemotherapy on Natural Killer Cells in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia

**Objective:** Chemotherapy may induce changes in NK cells which are important components of the immune system in children with acute lymphoblastic leukemia who are on chemotherapy or have completed therapy.

**Methods:** Thirty three children aged between 2 and 19 were included in the study. Their immunophenotypes, related risk groups, and clinical characteristics were recorded. According to ALL TRALL 2000 protocol patients were classified into three groups: Group 1 (patients who fulfilled requirements of protocol M), Group 2 (patients still on maintenance chemotherapy) and Group 3 (patients who completed therapy). Control group (group 4) consisted of eleven healthy children aged between 2 and 13. NK cytotoxicity test, flow cytometric analysis of NK subgroups, cytokine analysis were performed in blood samples taken with informed consent from parents of the patients and the controls. Clinical characteristics of the patients were evaluated based on these results. Analysis was performed with "one way ANOVA" statistical test using SPSS 14.0.

**Results:** In 1:1 E:T ratio, Group 2's NK cytotoxicity was significantly higher than any other group ( $p<0.05$ ). As the receptor expressions evaluated, in Group 2 expressions of CD16+CD56+, CD16+NKG2D+, CD94+NKp46+ subgroups were at a significantly lower level than group 4 ( $p<0.05$ ). NK cells (CD16+CD56+ cell positivity) were more populated in the standard risk group without any significant difference between Groups 2, and 4 ( $p>0.05$ ). When the effect of time after treatment discontinuation is evaluated, there was no significant difference between groups. In Group 3, there was a significant difference between B and T cell leukemia patients in terms of CD16 and CD56 positivities ( $p<0.05$ ). Only in samples which weren't stimulated by tumor cells, IFN $\gamma$  and IL-15 was found significantly lower in Groups 2 and 3 compared with the control group ( $p<0.05$ ).

**Conclusion:** Intensity of chemotherapy determined by the risk groups may affect NK cells quantitatively. Time passed since the completion of the therapy is important for NK cells to regain their functions. Improved comprehension of the changes occurring in NK cells by chemotherapy and by this way developing treatment modalities that reinforce functions of NK cells will contribute to the quality of life of children with acute lymphoblastic leukemia.

**Key words:** Acute lymphoblastic leukemia, chemotherapy, NK cytotoxicity, NK receptors, cytokines

J Child 2011; 11(4):160-169

## GİRİŞ

İmmatür lenfohematopoetik hücrelerin malign proliferasyonu olan lösemi, en sık görülen çocukluk çağı kanseridir. En sık görülen alt tipi olan akut lenfoblastik lösemi vakaların % 75-80'ini oluşturur. Çocukluk çağı ALL'de 5 yıllık olaysız sağ kalım güçlendirilmiş kemoterapiler ile % 80'inin üzerinde bildirilmektedir<sup>(1)</sup>. Kemoterapinin yalnızca lösemik blastları değil immün sistemin diğer normal elemanlarını da etkilediği uzun süredir bilinen bir gerçektir<sup>(2)</sup>. Akut lenfoblastik lösemili çocuklarda uygulanan yoğun kemoterapiler infeksiyon, kanser kontrolü ve fetal implantasyonda görevli, sitokinlerin yapımında kritik role sahip, direkt sitotoksik etkili hücreler<sup>(3)</sup> olan NK hücrelerini de immün sistemin diğer elemanları gibi hem kantitatif hem de kalitatif olarak olumsuz etkilemektedir<sup>(4)</sup>. Pek çok immün olayda kilit rolü olan NK hücrelerinin etkilenmesi, akut lenfoblastik çocuklarda hem infeksiyonla hem de kanserle savaşı güçleştirecektir.

Amacımız, kemoterapi almakta olan ve tedavisi kesilmiş akut lenfoblastik lösemili çocuklarda immünitinin önemli elemanı NK hücrelerinde, kemoterapi ile oluşan değişiklikleri hem aktivite bazında hem de reseptör tayini ile çeşitli alt gruplarının sayılarını saptayarak incelemektir. Bu sayede lösemilerin tedavisinde immünoterapi alternatifleri sunabilecek gelecek çalışmalara da yol gösterebilmektir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Hasta seçimi

Çalışmaya İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji ve Onkoloji Bilim Dalı tarafından takipli otuz üç ALL tanılı hasta alındı. Hastaların; cinsiyetleri, doğum tarihleri, yaşları, tanı konma yaşları, risk grupları, idameye başlama tarihleri, idame kemoterapi süreleri, tedavi kesim tarihleri, tedavisiz geçen süreleri, ALL immüfenotipleri ve mevcut kromozom anomalileri kaydedildi. Kontrol grubu ise İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı kan alma ünitesine başvuran medikal sorunu olmayan elektif cerrahi planlanan on bir sağlıklı çocuktan oluşturuldu. Hasta ve kontrol grubundan 6 cc periferik kan heparinli tüpe alındı.

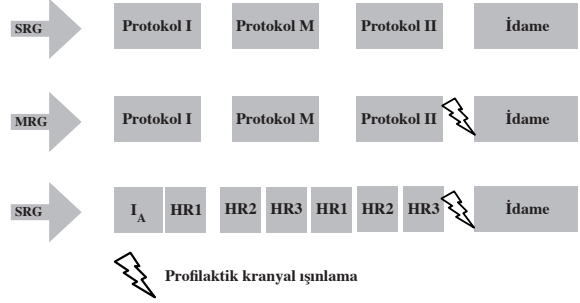
Vakalar aşağıda görüldüğü gibi düzenlendi.

**Grup 1:** protokol M'i tamamlayan;

**Grup 2:** idame kemoterapisi alan;

**Grup 3:** kemoterapisi kesilmiş

**Grup 4:** sağlıklı kontrol grubu



Şekil 1. BFM TRALL 2000 risk gruplarına göre tedavi protokolü.

Grup 1 ve grup 2'nin vakaları BFM TRALL 2000 protokolü ile tedavi edilmekteydi.

Hastalar risk gruplarına uygun kemoterapi protokolleri ile tedavi edildiler (Şekil 1). Protokol 1 faz 1'de prednisolon, vinkristin, daunorubisin, L-asparaginaz, intratekal (İT) metotreksat (MTX) uygulanmıştı. Protokol 1 faz 2'de ise siklofosamid, ARA-C (sitozin arabinozid), oral 6-MP ve İT MTX kullanılmıştı. Protokol M ise dört 5 g/m<sup>2</sup> MTX infüzyonu, oral 6-merkaptopürin (MP) ve İT MTX tedavilerinden meydana gelmişti.

HR bloklar yüksek risk grubu hastalara uygulandı, altı HR bloktan meydana gelmişti. Birinci HR bloкта yüksek doz ARA-C, yüksek doz MTX, deksametazon, siklofosamid, L-asparaginaz, İT MTX, ARA-C, Prednisolon vardı. Protokol II ise deksametazon, vinkristin, doksorubisin, L-asparaginaz, siklofosamid, ARA-C, oral thioguanin ve İT MTX'dan oluşmuştu. Koruyucu kranyal ışınlama protokol II'den sonra, idame kemoterapisinden hemen önce uygulandı. İdame kemoterapisinde oral 6-MP 50 mg/m<sup>2</sup>/gün ve MTX 20 mg/m<sup>2</sup>/hafta olarak verildi. Tedavinin toplam süresi tedavinin başlangıcından itibaren SRG grubundaki erkeklerde 36 ay, diğerlerinde 24 ay olarak belirlenmişti.

Grup 3 tedavisi kesilmiş hastalardan oluştu. Bu has-

talar CCG-1891 ile tedavi edildi. On yaş altındaki çocuklar lökosit sayıları  $<50,000/\text{mm}^3$  ise standart risk grubu kabul edildi. Yüksek risk grubu ise lökosit sayısı  $>50,000/\text{mm}^3$  veya yaşı  $>10$  veya  $t(4,11)/t(9,22)$  pozitifliği olan hastalardan meydana gelmişti.

### Etik Kurul Onayı ve Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Desteği

Çalışmaya katılan gönüllülerin aileleri çalışma hakkında bilgilendirildi, her hastadan aydınlatılmış yazılı onam alındı. Araştırma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 12 Nisan 2006'da onaylandı (Etik Kurul dosya no: 2006/519) ve İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklendi (Proje no T-889/02062006).

### NK sitotoksitesinin ölçülmesi

Çalışmamıza katılan gönüllü kişilerin NK aktivitesine İÜ İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında bakıldı. Hedef olarak eritrolösemi hücreleri (K562) kullanıldı. K562; blast krizinde kronik miyeloid lösemili bir hastadan elde edilen multipotansiyelli hematopoetik standardize edilmiş hücre dizisidir. K562; MHC sınıf I negatif olan bir hücre dizisi olduğu için, NK hücreleri bu hücre dizisine karşı doğal sitotoksik aktivite gösterebilmektedir.

NK sitotoksitesinde testlerinde, NK hücreleri (effektör = E) ve NK'ya duyarlı olan eritrolösemi hücreleri (K562, target (hedef) = H) farklı oranlarda karşılaştırılarak, NK'nın bu oranlarda K562'yi öldürebilme potansiyeline bakıldı. E:H oranları olarak 1:1, 10:1, 20:1, 30:1, 50:1 kullanıldı.

Çalışmamızda NK aktivitesine mononükleer hücreler arasında bakıldı. Direkt olarak hücre sayısı, efektör hücre sayısı olarak hesaplandı. K562 sayısı tüm oranlarda sabit tutuldu. Oranların yapılabilmesi için efektör hücrenin sayısı her oranda değiştirildi. Bu nedenle her E:T oranında farklı efektör kontrolü kullanıldı.

Örnekler ELISA spektrofotometresinde, 655 nm referans dalga boyuna göre 570 nm'de okundu. Hesaplama yapılırken NK/K562'nin birlikte bulunduğu 3 kuyunun ortalaması alınıp, NK kontrollerinin ortalama değerinden çıkartılarak K562'nin absorbanı bulundu.

Bulunan değer, K562 kontrollerinin ortalamasına bölünerek bu hücrelerin ne kadarının canlı kaldığına bakıldı ve 1'den çıkartılarak 100 ile çarpıldı.

$$\% \text{ NK sitotoksitesi} = \frac{(1 - [(NK + K562_{OD}) - (NK_{OD})] / (K562_{OD})) \times 100}{}$$

### Litik ünite (LU) hesaplanması

NK sitotoksitesini sonuçları litik üniteye (LU) çevrilerek tek bir değerle belirtildi. Bir litik ünite hedef (H) hücrelerin % 50'sini lizise uğratmak için gereken efektör (E) hücrelerin sayısı olarak tanımlandı. Elde edilen bu sayılar yine % 100 NK olarak kullanılan hücre sayısına (10-5) bölündü<sup>(5)</sup>.

### Flow sitometri ölçümü

ALL hastalarında ve sağlıklı kişilerde; NK aktivitesi deneyinden önce NK hücrelerinin yüzey işaretleyicileri ve NK aktivatör reseptörlerin ekspresyonu flow sitometri ile DETAE laboratuvarları kullanılarak tayin edildi. Deneylerin incelemesi FACS Calibur, Becton Dickinson ile yapıldı. Floresanzitotiosiyanat (FITC, 518 nm) ile konjuge CD56, CD2; allofikosiyanın (APC, 660 nm) ile konjuge NKG2D, NKp46; fikoeritrin (PE, 575 nm) ile konjuge CD16, CD94 ve allofikosiyanın-siyanın-7 (APC-Cy7, 785 nm) ile konjuge CD3 antikorlarıyla işaretlendi. Negatif kontrol olarak antikorla işaretlenmemiş hücreler kullanıldı. Yirmi dk. karanlıkta bekletildi. 2 ml Phosphate buffered saline (% 1 bovine serum albumin, % 0.1 sodium azide) (PBS) eklendi. 1000 g 5 dk. +4°C' de santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez yapıldı. Lenfosit popülasyonunun tanımlanabilmesi için ileri saçılım kanal dedektörü ve yana saçılım kanal dedektörü kullanıldı. Her data set için 10000 hücre sayıldı. Floresan yoğunluğuna göre sonuçlar incelendi. CD56, CD3, NKp46, CD2, CD94, NKG2D ve CD16 reseptörlerinin ve bunların ikili kombinasyonlarının ekspresyonu tayin edildi.

### Sitokin Ölçümü

ALL'li hastalarda ve sağlıklı kişilerden; deney öncesi plazma ve mononükleer hücreler arasındaki NK aktivitesi deneyinin sonunda sitokin ölçümü yapıldı. INF- $\gamma$  ve IL-15 düzeyleri ELISA kitleri aracılığıyla pg/ml olarak ölçüldü.

## İstatistiksel İnceleme

Çalışmaya katılan ALL'li hastalar ile kontrollerin izole olarak NK aktivitesinin karşılaştırılması, kontrollerle hastalar arasındaki reseptör ekspresyonu ve sitokin düzeyi farkı SPSS 14.0 ile "oneway ANOVA" testi kullanılarak yapıldı. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$  olan sonuçlar anlamlı kabul edildi.

## SONUÇLAR

### Grupların özellikleri

Protokol M'i tamamlamış vakalardan oluşan grup 1 (n=6)'in % 33'ü kız, % 66'sı erkek olup, yaş ortalaması  $7.31 \pm 4.45$  idi. İdame kemoterapisi almakta

olan vakalardan oluşan grup 2 (n=12)'nin % 17'si kız, % 83'ü erkekti ve yaş ortalaması  $10.14 \pm 4.08$  idi. Kemoterapisi kesilmiş vakalardan oluşan grup 3'ün (n=15) % 40'ı kızlardan, % 60'ı erkeklerden oluşuyordu ve yaş ortalamaları  $13.09 \pm 4.32$  idi. Sağlıklı kontrollerden oluşan grup 4'ün (n=11) % 36'sı kız, % 64'ü erkek olup, yaş ortalaması  $8.56 \pm 3.92$  idi. Grupların sırasıyla ortalama tanı yaşları  $7.07 \pm 4.45$ ,  $8.33 \pm 4.39$ ,  $6.56 \pm 3.92$  idi. Vakaların immüfenotipleri, risk grupları, kromozom anomalileri, idame kemoterapisi aldıkları süreler, tedavisiz geçen süreleri ve gruplar arası farklar Tablo 1'de belirtilmiştir.

### Vakaların NK sitotoksitesinin değerlendirilmesi

Gruplar NK sitotoksitesi yönünden 1:1, 10:1, 20:1,

Tablo 1. Grupların genel özellikleri.

	Grup 1 (Protokol M bitmiş) n:6	Grup 2 (İdame KT) n:12	Grup 3 (Ted. kesilmiş) n:15	Grup 4 (Kontrol grubu) n:11	p
<b>Cinsiyet</b>					
• Kız, n (%)	2 (% 33)	2 (% 17)	6 (% 40)	4 (% 36)	Grup 1, 4:>0.05 Grup 2, 4:>0.05 Grup 3, 4:>0.05
• Erkek, n (%)	4 (% 67)	10 (% 83)	9 (% 60)	7 (% 63.7)	Grup 1, 4:>0.05 Grup 2, 4:>0.05 Grup 3, 4:>0.05
<b>Yaş (yıl)</b>					
• Ort±SD	7.31±4.45	10.14±4.08	13.09±4.32	8.56±3.92	Grup 1, 4:>0.05
• Minimum	2.67	2.83	6.42	2	Grup 2, 4:>0.05
• Maksimum	12.25	16.58	19.17	13.75	Grup 3, 4:0.044
<b>Tanı yaşı (yıl)</b>	7.07±4.45	8.33±4.39	6.56±3.92	-	>0.05 (Gruplar arası)
<b>İmmüfenotip</b>					
• B hücreli	5 (% 83)	5 (% 42)	12 (% 80)	-	
• T hücreli	1 (% 17)	7 (% 58)	3 (% 20)	-	
<b>Risk grubu</b>					
• Standart	3 (% 50)	2 (% 17)	7 (% 47)	-	
• Orta	3 (% 50)	4 (% 33)	-	-	
• Yüksek	-	6 (% 50)	8 (% 53)	-	
<b>Kromozom anomalisi</b>					
• t(4,11)	-	1 (% 8)	-	-	
<b>İdame kemoterapisi süresi (yıl)</b>					
• Ort±SD	-	1.2±0.9	-	-	
• Minimum	-	0.08	-	-	
• Maksimum	-	2.75	-	-	
<b>Profilaktik Kranyal Işınlama</b>	-	10 (% 83)	8 (% 53)	-	
<b>Tedavisiz süre (yıl)</b>					
• Ort±SD	-	-	3.5±3.6	-	
• Minimum	-	-	0.08	-	
• Maksimum	-	-	9.58	-	

Tablo 2. Gruplara göre NK sitotoksinite deneyinin farklı efektör, hedef hücre oranlarında ortalama ve standart sapma değerleri.

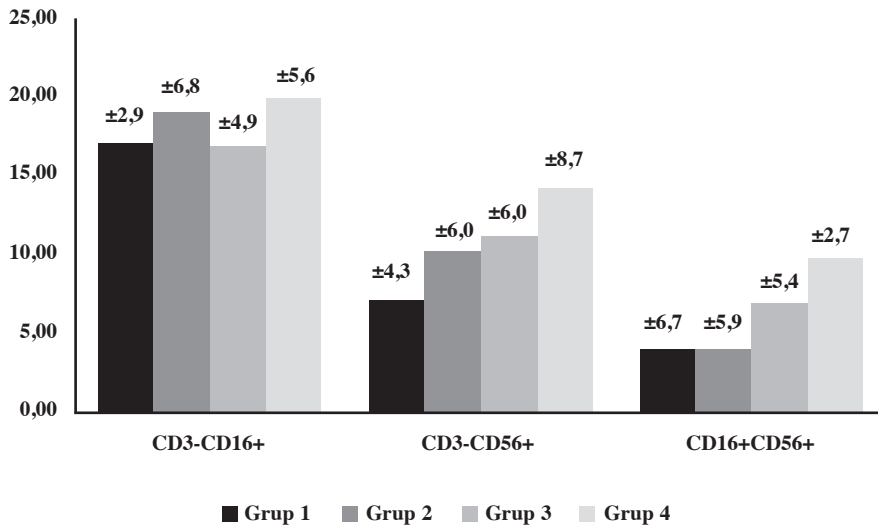
E:H oranları	Grup 1 (Prot. M bitmiş) n:6	Grup 2 (İdame KT) n:12	Grup 3 (Ted. kesilmiş) n:15	Grup 4 (Kontrol grubu) n:11	p
1:1 (%)	20.35±3.61	48.22±10.78	24.34±16.49	20.61±10.98	Grup 1, 2:<0.01 Grup 1, 4:>0.05 Grup 2, 3:<0.01 Grup 2, 4:<0.001 Grup 3, 4:>0.05
10:1 (%)	37.13±14.41	63.43±20.01	51.62±20.55	40.61±14.85	Grup 1, 4:>0.05 Grup 2, 4:>0.05 Grup 3, 4:>0.05
20:1 (%)	42.04±15.73	61.54±18.37	62.67±25.03	50.57±15.86	Grup 1, 4:>0.05 Grup 2, 4:>0.05 Grup 3, 4:>0.05
30:1 (%)	56.05±16.12	76.81±17.54	63.98±29.38	69.61±13.33	Grup 1, 4:>0.05 Grup 2, 4:>0.05 Grup 3, 4:>0.05
50:1 (%)	69.51±20.48	81.73±20.81	71.49±33.81	77.66±10.73	Grup 1, 4:>0.05 Grup 2, 4:>0.05 Grup 3, 4:>0.05
LU <sub>50</sub> /10 <sup>5</sup>	1.38±0.41	1.77±0.64	1.64±0.30	1.55±0.22	Grup 1, 4:>0.05 Grup 2, 4:>0.05 Grup 3, 4:>0.05

30:1, 50:1 E:H oranları ile değerlendirildi. 1:1 E:H oranında grup 2'nin değeri grup 1 ile grup 3'ten anlamlı derecede yüksekti ( $p<0,01$ ). Grup 2'nin değeri grup 4'ten anlamlı derecede yüksekti ( $p<0,001$ ). Gruplar arasında 10:1, 20:1, 30:1, 50:1 E:H oranlarında anlamlı fark yoktu. NK aktivitesi litik ünite (LU) olarak belirlendiğinde aralarında anlamlı fark yoktu. Gruplara göre NK sitotoksinite

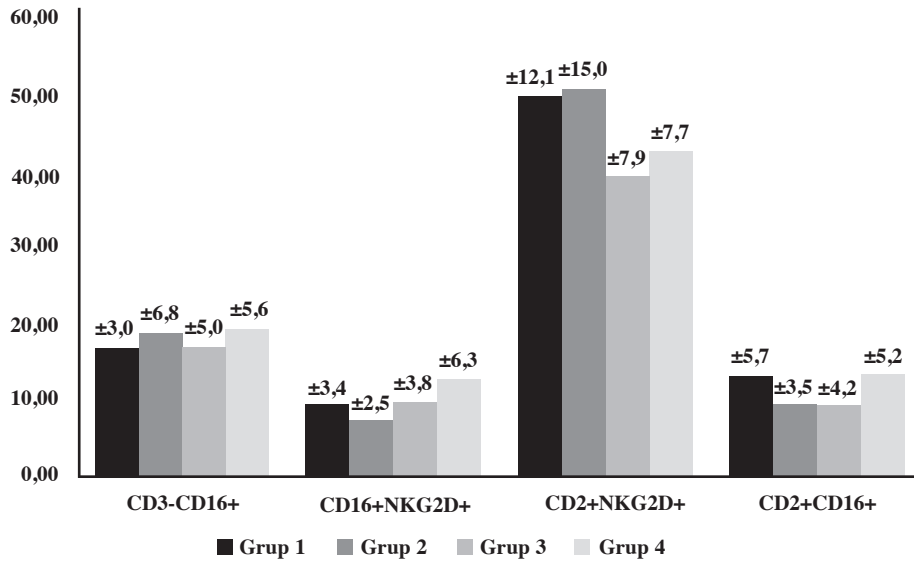
deneyinin farklı efektör, hedef hücre oranlarında ve LU olarak ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 2'de sunulmuştur.

### NK Reseptörleri

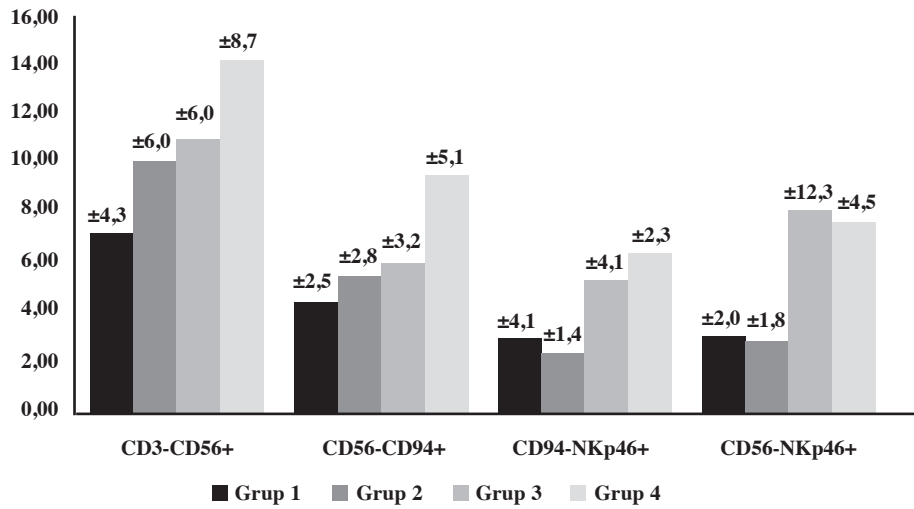
Gruplar hücrelerin reseptör ekspresyonu yönünden değerlendirildi (Tablo 3 ve Şekil 2). NK hücre popü-



Şekil 2. Gruplara göre NK hücre popülasyonlarının karşılaştırılması.



Şekil 3. Reseptör ekspresyonlarının gruplara göre karşılaştırılması-1.



Şekil 4. Reseptör ekspresyonlarının gruplara göre karşılaştırılması-2.

lasyonunu yansıtan CD16+CD56+ hücreler idame kemoterapisi alan grupta (grup 2) kontrol (grup 4) grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ( $p<0.05$ ). Protokol M'i tamamlamış olan grup 1 ile kontrol grubu olan grup 4 arasında ise anlamlılık açısından sınırdaki bir değer elde edildi ( $p=0.06$ ).

İdame kemoterapisi alan grupta (grup 2) CD16+NKG2D+ hücrelerin oranı kontrol grubuna göre (grup 4)'e göre anlamlı derecede düşüktü ( $p<0.05$ ) (Şekil 3).

İdame kemoterapisi alan grupta (grup 2) CD94+NKp46+ hücrelerin oranı kontrol grubuna (grup 4)

göre anlamlı derecede düşüktü ( $p<0.05$ ).

Protokol M'i tamamlamış hastalardan oluşan grupta (grup 1) CD56+CD94+ hücrelerin oranı kontrol grubuna (grup 4) göre anlamlı derecede düşüktü ( $p<0.05$ ) (Şekil 4). Grup 2 ile grup 4 arasındaki fark ise anlamlılık sınırındaydı ( $p=0.05$ ).

#### Grupların risk gruplarına göre karşılaştırılması

Risk gruplarına göre gruplar kendi içlerinde NK hücre popülasyonu ve NK hücre aktivitesi yönünden değerlendirildi (Tablo 4). Grup 1 vakalarının % 50'si standart, geri kalanı ise orta risk grubundandı. Grup 2

**Tablo 4. NK hücre yüzdesinin ve NK sitotoksitesinin (LU) risk gruplarına göre karşılaştırılması\*.**

	Grup 1 (Protokol M bitmiş)		Grup 2 (İdame KT)			Grup 3 (Tedavi kesilmiş)	
	Standart	Orta	Standart	Orta	Yüksek	Standart	Yüksek
<b>n</b>	3	3	2	4	6	7	8
<b>LU<sub>50</sub>/10<sup>5</sup></b>	1.51±0.49	1.20±0.25	1.81	1.47±0.47	2.00±0.78	1.75±0.31	1.49±0.24
<b>CD16+ CD56+ (%)</b>	4.48±3.31	3.60±2.42	5.00±1.4	3.75±0.96	3.83±2.79	8.05±4.01	5.81±3.98

\*p&gt;0,05

**Tablo 5. Tedavi kesilme sürelerine göre NK popülasyonu ve NK aktivitesi\*\*.**

	*TK≤1 yıl	TK>1 yıl	Kontrol grubu
<b>n</b>	7	8	9
<b>E:H 1:1</b>	% 22.36±15.87	% 26.32±18.35	% 20.61±10.98>0.05
<b>LU<sub>50</sub>/10<sup>5</sup></b>	1.57±0.3	1.71±0.32	1.55±0.22>0.05
<b>CD16+ CD56+ (%)</b>	% 5.05±3.58	% 8.06±4.02	% 9.75±6.80>0.05

\*TK: Tedavi kesimi

\*\*p&gt;0.05

vakalarının % 17'si standart, % 34'ü orta, % 50'si yüksek risk grubundandı. NK hücre popülasyonunu belirten CD16+CD56+'lığı açısından standart risk grubu değerleri yüksek risk grubundan daha yüksekti ,ancak fark anlamlı değildi. Grup 3 vakalarının % 47'si standart risk grubu, % 53'ü yüksek risk grubundandı.

### Tedavi kesilme sürelerine göre vakaların değerlendirilmesi

Tedavisinin kesilmesinin üzerinden bir yıldan az süre geçen vakalarla, aynı gruptaki diğer vakalar ve kontrol grubu NK popülasyonu ve NK aktivitesi yönünden kıyaslandı (Tablo 5). E:T oranı 1:1 için değerlendirildiğinde TK≤1 yıl olan vakaların değeri % 22.36±15.87, bir yıldan uzun süre olan vakaların değeri ise % 26.32±18.35 bulundu. CD16+CD56+'lığı TK≤1 yıl için % 5.05±3.58, TK>1 yıl için % 8.06±4.02 saptandı. Gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

### Grupların immünofenotiplerine göre karşılaştırılması

Gruplar immünofenotip durumlarına göre NK sitotoksitesi ve NK hücrelerini yansıtan CD16+CD56+ hücre oranı yönünden karşılaştırıldı (Tablo 6).

**Tablo 6. Grupların immünofenotip dağılımlarına göre NK hücre oranlarının ve NK aktivitelerinin karşılaştırılması.**

	Grup 1 (Protokol M bitmiş)		Grup 2 (İdame KT)		Grup 3 (Tedavi kesilmiş)		p*
	B hücre	T hücre	B hücre	T hücre	B hücre	T hücre	
<b>n</b>	5	1	5	7	12	3	
<b>1:1 E:H (%)</b>	19.67±3.79	23.04	41.36±11.58	50.18±10.60	24.11±17.95	24.80±15.64	>0.05
<b>LU<sub>50</sub>/10<sup>5</sup></b>	1.49±0.38	0.95	2.31±0.71	1.54±0.49	1.64±0.26	1.65±0.41	>0.05
<b>CD16+ CD56+ (%)</b>	4.56±2.58	1.43	4.00±1.58	4.00±2.45	5.03±3.85	9.90±1.88	0.38**

\*p:Her grup kendi içinde \*\*Grup 3 ve p &lt;0.05

**Tablo 7. Gruplar arasında deney öncesi ve sonrası IL-15, INF- $\gamma$  düzeylerinin karşılaştırılması.**

pg/ml	Grup 1 (Prot. M bitmiş)	Grup 2 (İdame KT)	Grup 3 (Tedavi kesilmiş)	Grup 4 (Kontrol grubu)	P
IL-15 (Uyarılmamış)	9.94±5.82	8.01±9.27	11.31±8.60	10.61±5.01	Grup 1, 4: >0.05 Grup 2, 4: >0.05 Grup 3, 4: >0.05
INF- $\gamma$ (Uyarılmamış)	238.53±115.17	173.94±338.94	106.73±178.05	637.59±336.04	Grup 1, 4: .070 Grup 2, 4: .007 Grup 3, 4: .001
IL-15 (Uyarılmış)	48.21±86.28	43.63±121.39	9.72±16.86	24.92±38.32	Grup 1, 4: >0.05 Grup 2, 4: >0.05 Grup 3, 4: >0.05
INF- $\gamma$ (Uyarılmış)	11.31±3.51	18.29±23.89	12.33±3.03	10.88±2.47	Grup 1, 4: >0.05 Grup 2, 4: >0.05 Grup 3, 4: >0.05

Tedavisi kesilmiş grupta (grup 3) B hücreli ALL vakalarının NK hücre popülasyonunu yansıtan CD16+CD56+ hücre oranı T hücreli ALL vakalarına göre anlamlı derecede düşüktü ( $p < 0.05$ ).

#### Sitokin düzeylerinin gruplara göre dağılımı

Vakaların deney öncesi (uyarılmamış- serum düzeyi) ve deney sonrası (uyarılmış-tümör hücreleri ile) alınan örnekleriyle ölçülen IL-15 ve INF- $\gamma$  düzeyleri gruplara göre değerlendirildi. Deney öncesi alınan örneklerde INF- $\gamma$  düzeylerinde grup 2 ve grup 3 değerleri grup 4'ten anlamlı derecede düşüktü ( $p < 0.05$ ) (Tablo 7). Diğer farklılıklar anlamlı değildi.

#### TARTIŞMA

Yoğun sitotoksik tedaviler, lösemi başta olmak üzere neoplastik hastalıkların iyileşme oranlarında çok ciddi artışlar sağlarken, beraberinde tedaviden kaynaklanan çeşitli komplikasyonları da getirmiştir. Sitostatiklerin yan etkilerinden biri de immün sistemi baskılamasıdır. İmmün sistem disfonksiyonları hem kalitatif hem de kantitatifdir<sup>(6)</sup>. Kombine kemoterapinin öncülleri bu immün disfonksiyonun farkında olmuşlar ve tedavi altındaki çocuklarda immün fonksiyonları güçlendirmek için aralıklı BCG uygulamaları gibi çeşitli girişimlerde bulunmuşlardır<sup>(7)</sup>. Tüm bu girişimlere rağmen, immün fonksiyonların düzelmesi ancak idame kemoterapisi kesildikten sonra olmaktadır<sup>(8)</sup>. Yine de günümüze kadar bu konuda çalışmalar yoğun olarak süregelmiştir.

NK hücreleri immün sistemin doğal immün yanıtları için kritik öneme sahip hücrelerdir. Akut lenfoblastik lösemili çocuklarda NK aktivitesi hem hastalığın kökenini anlamak hem de kemoterapi sürecince gelişebilecek enfeksiyonlardan korunmak için çok önemlidir. Çalışmamızda ALL'li çocukların kemoterapinin çeşitli aşamalarında NK aktivitelerini, sayısal ve fonksiyonel olarak değerlendirmeyi ve bu özellikleri klinik ile ilişkilendirmeyi hedefledik.

NK hücre aktivitesini ALL'li çocuklarda değerlendiren Sørskar ve ark.'nın<sup>(4)</sup> çalışmasında tanı anında ALL'li çocukların periferik kanda ve kemik iliğinde NK aktivitesi normal sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak düşük saptanmıştır. Remisyondaki hastaların ise NK aktivitesi kontrol grubundan farklı bulunmamıştır. Ancak, hasta sayısının az olması ve kontrol grubunun çocuklar yerine sağlıklı erişkinlerden oluşması bu çalışmanın sonuçlarını yorumlamayı zorlaştırmaktadır. Daha geniş vaka serisi olan bir çalışmada idame kemoterapisi alan ALL'li çocukların NK aktivitesinin (LU/107 % 20 öldürme oranından hesaplanarak) erişkin ve çocuk kontrollere göre anlamlı olarak düşük olduğu, tedavisi kesilmiş grupla kontrol arasında litik ünite açısından anlamlı fark olmadığı belirlenmiştir<sup>(9)</sup>. Benzeri sonuçlar elde eden bir başka çalışmada idame kemoterapisi alan yirmi iki ALL'li çocuk sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, NK hücre sayısı normal olsa bile NK aktivitesinin düşük olduğu, ancak NK aktivitesinin tedavinin kesimi ile birkaç ay içinde normale döndüğü saptanmıştır<sup>(10)</sup>.



Çalışmamızda NK aktivitesi hem farklı E:H oranlarında % sitotoksinite olarak hem de  $LU_{50}/10^5$  olarak değerlendirildi.  $LU_{50}/10^5$  olarak bakıldığında grup 2'nin ortalama değeri en yüksekti, ancak fark anlamlı değildi. İdame kemoterapisi alan grubun (grup 2) 1:1 E:H oranlarında NK aktivitesi gruplar arasında en yüksekti. Grup 1 ile grup 2, grup 2 ile grup 3, grup 2 ile grup 4 arasında anlamlı farklılıklar vardı. Bu bulgu söz konusu çalışmalardan farklıydı. Çocukluk-tan erişkinliğe uzanan yaşamda NK hücrelerinin hem sayısında hem de aktivitesinde artış olduğu bilinmektedir<sup>(11)</sup>. Yaş dağılımında diğer gruplardan farklı olmayan idame kemoterapisi alan grubun (grup 2) NK aktivitesindeki yükseklik bu durumla açıklanamamaktadır.

Aktivite reseptör ilişkisini değerlendirmek için; gruplara göre reseptör ekspresyonları incelendiğinde, NK hücrelerini yansıtan CD16+CD56+ popülasyonu grup 1 (protokol M bitmiş) ve grup 2'de (idame kemoterapisi alan), grup 4'e (kontrol grubu) göre anlamlı olarak azalmıştı. Mazur ve ark.'nın<sup>(6)</sup> yaptığı bir çalışmada ALL'li çocuklar protokol II'nin sonunda ve tedavileri kesildikten bir yıl sonra CD16+CD56+ popülasyonu açısından kontrol grubu ile karşılaştırıldı ve yoğun kemoterapi alan grupta bu popülasyon diğer gruplara göre düşük saptandı.

Eyrich ve ark.'na ait prospektif bir çalışmada standart ve orta risk, radyoterapi almamış yirmi ALL'li çocuğun kemoterapinin çeşitli aşamalarında hücresele ve humoral immünitesi değerlendirildi. NK hücrelerinin tanıda normal sınırlar içinde olduğu, ancak yoğun kemoterapi ile diğer lenfositler gibi sayılarının azaldığı, indüksiyon faz II'nin sonunda kısa bir toparlanma sürecinden sonra reindüksiyon ve idame kemoterapi süresince normal sınırların altında devam ettiği belirtilmektedir. Tedavinin kesilmesinden 3-6 ay sonra yine yükseldikleri görüldü<sup>(12)</sup>. Benzeri bulgular NK hücre popülasyonu açısından çalışmamızda da elde edilmiştir. Bu prospektif çalışmada sitokinler de araştırıldı. IL-4, IL-7, IL-13, IL-15, IFN $\gamma$  ve TGF $\beta$  düzeyleri değerlendirildi, bu sitokinlerin düzeylerinde tedavinin seyri sırasında minör değişiklikler görüldü. Çalışmamızda çeşitli tedavi gruplarında IFN $\gamma$  ve IL-15 düzeyleri mononükleer hücreler tümör hücreleri ile uyarılmadan ve uyarıldıktan sonra değerlendirildi ve yalnızca tümör hücreleri ile uyarılmamış örneklerde grup 2 ve grup 3 kontrol grubuna göre

anlamlı olarak düşük bulundu.

Çalışmamızda CD16+NKG2D+ hücre popülasyonu idame kemoterapisi alan grup 2'de kontrol grubu (grup 4)'na göre düşük saptandı ( $p<0.05$ ). NKG2D ligandları MICA, MICB ve ULBP olan aktivatör bir reseptördür. Tek başına NKG2D sinyallerinin NK hücre fonksiyonlarını başlatmakta yeterli olduğu belirtilmektedir<sup>(13)</sup>.

Kemoterapinin yoğunluğu, süresi immün fonksiyonları önemli ölçüde etkilemektedir. Kemoterapinin yoğunluğunu belirleyene risk gruplarıdır. Ek ve ark.'nın<sup>(14)</sup> yaptığı çalışmada çocukluk çağı ALL'inde standart, orta ve yüksek risk grupları karşılaştırılmış ve tedaviden altı ay sonra bile yüksek risk grubunda T, B ve NK hücrelerinin alt gruplarında kalıcı anormalliklerin olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda vakaların risk gruplarına göre değerlendirilmesinde grup 1 (protokol M bitmiş) içindeki standart risk grubunun LU ve NK hücre popülasyonu ortalamaları orta risk grubundan fazlaydı. Grup 2 (idame kemoterapisi alan)'de NK aktivitesini yansıtan LU değeri yüksek risk grubunda standart ve orta risk grubundan fazlaydı. CD16+CD56+'lığı açısından ise standart grup değeri diğer risk gruplarından fazlaydı. Grup 3 (tedavisi kesilmiş)'de ise hem NK aktivitesi, hem NK hücre sayısı açısından standart risk grubu daha üstündü. Grup 2'de yüksek risk grubunda gözlenen NK aktivitesindeki artışın nedeni bu grubun hepsine profilaktik kranyal ışınlama uygulanması olabilir. Onun dışındaki diğer gruplarda Ek'in çalışmasına benzer şekilde standart risk grubunda yani daha az yoğun kemoterapi alan vakalarda NK fonksiyonları kalitatif ve kantitatif daha fazlaydı. Grupların immünofenotiplerine göre değerlendirilmesi risk grupları değerlendirmesi ile benzerdi. T hücreli grup yüksek risk grubunu ifade ederken, B hücreli grup ya standart ya da orta risk grubunu yansıtmaktaydı.

Vakaların tedavi kesilme sürelerine göre değerlendirilmesinde grup 3 vakaları kullanıldı. Bu grup vaka sayısının az olması nedeniyle tedavi kesiminin üzerinden 1 ay ve 6 ay geçmiş çocuklar olarak ayrıldı. E:H 1:1, LU ve CD16+CD56+açısından tedavi kesimi  $\leq 1$  yıl olan vakalar, tedavi kesimi TK  $> 1$  yıl olanlara göre anlamlılık sağlanamasa da daha düşük değerlere sahipti. CD16+CD56+değerleri ise kontrol grubuna göre daha düşüktü. Kovacs ve ark.'nın<sup>(15)</sup>

yaptığı çalışmada, lösemili çocukların % 41.9'unda kemoterapi kesilmesinden 15±4.4 ay sonra sellüler immünitete ait parametrelerden en az biri normal sınırların altındaydı. NK aktivitesi lösemili çocukların % 16.3'ünde, ADCC % 18.6'sında azalmıştı.

Çalışmamızda literatürden farklı olarak hem NK aktivitesini hem de NK hücreleri reseptörlerini risk gruplarını da dikkate alarak değerlendirdik. Gruplara düşen vaka sayısının az olması ve homojen dağılması istatistiksel olarak değerlendirmeyi zorlaştırmıştır. NK aktivitesinin ve sayısının sağlıklı bireylerde yaşla birlikte değişmesi daha geniş vaka serilerinde her grup içinde yaş gruplarını ayırmayı gerekli kılmaktadır. Ayrıca her vakayı diğerinden ayıran kişisel özellikler nedeniyle (hastanın tanısından tedavi kesilinceye kadar geçen sürede çeşitli aralıklarla takibi) ve kemoterapinin değişik aşamalarını içeren prospektif bir çalışma gereklidir. ALL'li çocuklarda immün sistemi hem hümmoral hem de hüccresel olarak değerlendirmek, bu sisteme tüm yönlerden bakmayı sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

1. **Pui CH, Campana D.** Childhood Leukemia. in: Abeloff M, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WB(eds). Abeloff: Abeloff's Clinical Oncology, 4th ed. Churchill Livingstone, An Imprint of Elsevier, 2008.
2. **Wehinger H&Karitzky D.** T and B lymphocytes before, during, and after cytostatic therapy of acute lymphoblastic leukemia (ALL) in children. *Klinische Paediatric* 1977; 189:234-41. PMID:301585
3. **Miller JS.** The biology of natural killer cells in cancer, infection and pregnancy. *Experimental Hematology* 2001;29:1157-68. [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-472X\(01\)00696-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-472X(01)00696-8)
4. **Sørskaa D, Førre O, Lie SO.** Natural Killer Cell Activity of Peripheral Blood and Bone Marrow Mononuclear Cells from Patients with Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Acta Paediatr Scand* 1985;74:433-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1651-2227.1985.tb10998.x>
5. **Pross HF, Baines MG, Rubin P, Shragge P, Patterson MS.** Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. IX. The quantitation of natural killer cell activity. *J Clin Immunol* 1981;1(1):51-63. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00915477> PMID:7334070
6. **Mazur B, Olejnik I, Wylezol I, Sonta-Jakimczyk D, Szczepanski T, Karpe J.** Assessment of chosen parameters of the immune system in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 2003;20(4):303-8. PMID:12746162
7. **Ekert H, Jose DG.** Letter: Chemotherapy and B.C.G. in acute lymphocytic leukaemia. *Lancet* 1975;11(7937):713-4. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(75\)90818-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(75)90818-1)
8. **Alanko S, Salmi TT, Pelliniemi TT.** Recovery of blood T-cell subsets after chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 1994;11(3):281-92. <http://dx.doi.org/10.3109/08880019409141671>
9. **Jermy A, Lilleyman JS, Jennings R, Rees RC.** Spontaneous natural killer cell activity in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987;23(9):1365-70. [http://dx.doi.org/10.1016/0277-5379\(87\)90121-0](http://dx.doi.org/10.1016/0277-5379(87)90121-0)
10. **Aricò M, Lanfranchi A, Molinari E, Maccario R, Nespoli L, Burgio GR.** Cell-mediated cytotoxicity in children during and after therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 1988;5(4):279-86. <http://dx.doi.org/10.3109/08880018809037367>
11. **Abo T, Cooper MD, Balch CM.** Postnatal expansion of the natural killer and killer cell population in humans identified by the monoclonal HNK-1 antibody. *J Exp Med* 1982;155(1):321-6. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.155.1.321> PMID:7054358
12. **Eyrich M, Wiegering V, Lim A, Schrauder A, Winkler B, Schlegel PG.** Immune function in children under chemotherapy for standard risk acute lymphoblastic leukaemia - a prospective study of 20 paediatric patients. *Br J Haematol* 2009;147(3):360-70. Epub 2009 Aug 19. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07862.x> PMID:19694715
13. **V.P.C.P. de Toledo et al.** Natural Killer Cells: Deciphering Their Role, Diversity and Functions. in: Zimmer J (editor). Natural killer cells. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg* 2010:1-38. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-02309-5\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-02309-5_1)
14. **Ek T, Mellander L, Andersson B, Abrahamsson J.** Immune reconstitution after childhood acute lymphoblastic leukemia is most severely affected in the high risk group. *Pediatr Blood Cancer* 2005;44(5):461-8. <http://dx.doi.org/10.1002/pbc.20255>
15. **Kovacs GT, Barany O, Schlick B, et al.** Late immune recovery in children treated for malignant diseases. *Pathol Oncol Res* 2008;14(4):391-7. Epub 2008 Jun 25. <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-008-9073-5>