

Praca oryginalna

Ocena niektórych funkcji granulocytów obojętnochłonnych u chorych na raka płuca leczonych lekami cytoredukcyjnymi**Evaluation of some functions of polymorphonuclear granulocytes in lung cancer patients during chemotherapy.**

Beata Panek, Elżbieta Chyczewska, Maria Ossolińska, Wojciech Naumnik,
Tomasz Iżycki-Herman, Małgorzata Korniluk

Z Kliniki Chorób Płuc i Gruźlicy Akademii Medycznej w Białymstoku
Kierownik Kliniki: Dr hab. n. med. E. Chyczewska

Summary: Lung cancer (NSCLC and SCLC) is one of most frequent carcinoma. Lung cancer is at the top of the list of cancers causing mortality in males.

Many patients are qualified to chemotherapy which causes neutropenia.

The aim of this work was to evaluate the number and function of (phagocytosis, test of NBT reduction and MPO activity) of leukocytes in patients with lung cancer before chemotherapy, during leukopenia and after stimulation with granulocyte colony stimulating factor (G-CSF).

Patients with lung cancer have increased number of leukocytes before the treatment. After chemotherapy the number of leukocytes decreases. Treatment with G-CSF increases the number of leukocytes but it doesn't increase their ability to phagocytosis and to NBT reduction.

Pneumonol. Alergol. Pol. 2005, 73, 167:171

Key words: lung cancer, chemotherapy, neutropenia, GCSF

Wstęp

Rak płuca jest najczęstszym nowotworem złośliwym u mężczyzn i stanowi jednocześnie najczęstszą przyczynę zgonów z powodu chorób nowotworowych. Odsetek przeżyć 5 letnich chorych na raka płuca nie przekracza w krajach wysoko rozwiniętych 13-14% (9).

W leczeniu raka zdyskwalifikowanego od operacji stosuje się radioterapię, chemioterapię lub leczenie skojarzone: radio- i chemioterapię. Prace doświadczalne wskazują, że odpowiedź komórek nowotworowych na leczenie chemiczne jest zależna od stosowanych dawek leków (4). W praktyce klinicznej możliwości zwiększenia dawek leków są ograniczone narastającą toksycznością przejawiającą się uszkodzeniem szpiku kostnego i zmniejszeniem liczby granulocytów we krwi obwodowej. Granulocytopenia zwiększa ryzyko zakażeń, a tym samym ogranicza intensywność leczenia i w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia jego skuteczności (7). Objawy mielotoksyczności można zmniejszyć podając czynniki pobudzające tworzenie kolonii komórek szpiku, szczególnie czynnik stymulujący wzrost liczby granulocytów (G-CSF) (3).

Celem przeprowadzonych badań była ocena liczby i funkcji granulocytów obojętnochłonnych

u chorych na raka płuca przed leczeniem cytoredukcyjnym, w trakcie leukopenii polekowej oraz po stymulacji granulopoezy czynnikiem wzrostu (G-CSF).

Materiał i metody

Badania kliniczne przeprowadzono u 60 mężczyzn chorych na raka płuca diagnozowanych i leczonych w Klinice Chorób Płuc i Gruźlicy AM w Białymstoku. W badanej grupie było 30 chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) w stadium IIIB (17 chorych) i IV (13 chorych) i 30 chorych na drobnokomórkowego raka płuca (DRP), w tym 12 z postacią ograniczoną (LD) i 18 z postacią rozległą (ED). Grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych mężczyzn. Każdy z chorych był badany przed rozpoczęciem każdego kursu chemioterapii, podczas leukopenii towarzyszącej leczeniu cytostatykami oraz po zastosowaniu G-CSF. Chorzy na DRP w postaci ograniczonej i rozległej, leczeni byli według schematu Cysplatyna 30 mg/m² w 1,2,3 dobie + Etopozyd 100mg/m² w 1,3,5 dobie cyklu. Chorzy na NDRP w stadium klinicznym IIIB i IV, leczeni byli według schematu Cysplatyna 30 mg/m² w 1,2,3 dobie + Winorelbina 30 mg/m² w 1 i 8 dobie. Kontrolę leukocytozy rozpoczynano w 4 dobie cyklu bez względu na rodzaj chemioterapii. W przy-

padku tendencji zniżkowej kontrolę prowadzono codziennie aż do obniżenia się liczby leukocytów poniżej 2000 μl . Wówczas podawano podskórnie filgrastim w dawce 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c, codziennie, do czasu normalizacji leukocytozy.

U wszystkich chorych wykonywano test fagocytozy, test redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) i oznaczano aktywność mieloperoksydazy w 3 punktach czasowych: przed rozpoczęciem chemioterapii, w trakcie zmniejszenia liczby leukocytów poniżej 2000 μl i po podaniu filgrastimu.

Liczbę leukocytów oceniano z próbki krwi obwodowej w komorze Bürkera. Dla oceny składu odsetkowego wykonywano rozmaz krwi obwodowej zabarwiony metodą Pappenheima, który oglądano pod immersją. Fagocytozę oceniano metodą mikroskopową jako odsetek granulocytów pochłaniających lateks o średnicy 81 mikronów. Test redukcji NBT przeprowadzono wg Parka, oceniano samoistną redukcję NBT i po stymulacji endotoksyną bakteryjną (lipopolisacharyd B z *E. coli*), w celu oceny sprawności bójczej. Aktywność mieloperoksydazy (MPO), która wchodzi w skład obrony p/bakteryjnej neutrocyta, oceniana była metodą Grahama-Knolla (6).

Analizę rozkładu danych przeprowadzono testem Shapiro-Wilksa. Dla cech o rozkładzie normalnym hipotezy statystyczne testowano przy pomocy testu t-Studenta. Dla cech o rozkładzie innym niż normalny hipotezy statystyczne testowano stosując test Manna-Whitney'a i Wilcozona. W każdym przypadku za istotną statystycznie przyjmowano wartość współczynnika $p < 0,05$.

Wyniki

Liczba leukocytów u chorych na NDRP i DRP, przed rozpoczęciem leczenia cytoredukcyjnego, mieściła się w granicach normy ale była znacznie większa od całkowitej liczby leukocytów u osób zdrowych (Tab. I). W grupie chorych na NDRP wynosiła $8080 \pm 355/\mu\text{l}$ ($p < 0,001$ vs. zdrowi), natomiast u chorych na DRP wynosiła $7920 \pm 346/\mu\text{l}$ ($p < 0,001$ vs. zdrowi). W trakcie leczenia cytoredukcyjnego obserwowano istotne statystycznie zmniejszenie jej do $1600 \pm 57/\mu\text{l}$ u chorych na NDRP ($p < 0,001$) oraz do $1708 \pm 56/\mu\text{l}$ u chorych na DRP ($p < 0,001$) w porównaniu do wartości wstępnych. Po podaniu G-CSF całkowita liczba leukocytów zwiększyła się istotnie statystycznie do $11381 \pm 539/\mu\text{l}$ w grupie chorych na NDRP ($p < 0,001$) i do $11660 \pm 868/\mu\text{l}$ w grupie chorych na DRP ($p < 0,001$), w stosunku do leukopenii polekowej. Liczba leukocytów po podaniu G-CSF zwiększyła się istotnie statystycznie

także w porównaniu ze wstępną leukocytozą w obydwu grupach ($p < 0,001$). Zmiany liczby leukocytów nie były zależne ani od histologii ani od stadium zaawansowania raka.

Odsetek granulocytów obnojętnochłonnych (PMN) w grupie chorych na NDRP przed leczeniem wynosił $63,42 \pm 1,15\%$ i nie wykazywał istotnych różnic w porównaniu do odsetka PMN u osób zdrowych. Natomiast odsetek PMN w grupie chorych na DRP przed leczeniem wynosił $66,16 \pm 1,21$ i był znamienne większy w porównaniu z odsetkiem PMN w grupie kontrolnej ($62,13 \pm 1,52$) ($p < 0,001$ vs. kontrola). W trakcie leczenia cytoredukcyjnego odsetek PMN zmniejszył się do $59,70 \pm 2,37\%$ w grupie chorych na NDRP ($p < 0,02$) oraz do $60,57 \pm 1,60$ w grupie chorych na DRP ($p < 0,01$). Po podaniu G-CSF odsetek PMN uległ zwiększeniu do $67,40 \pm 1,49\%$ w grupie chorych na NDRP ($p < 0,01$) i do $69,17 \pm 1,74\%$ w grupie chorych na DRP ($p < 0,001$). W obydwu grupach odsetek PMN przekroczył wartości obserwowane w kontroli (odpowiednio $p < 0,05$ i $p < 0,01$).

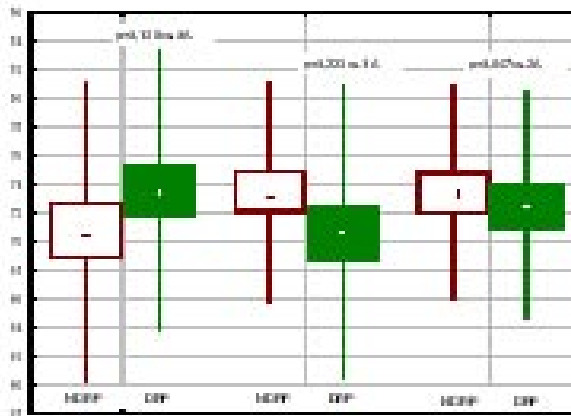
Fagocytoza

Fagocytoza PMN u chorych na raka płuca, przed rozpoczęciem leczenia cytoredukcyjnego była znacznie mniejsza w porównaniu do fagocytozy PMN u osób zdrowych. W grupie chorych na NDRP przed leczeniem odsetek fagocytujących granulocytów wynosił $70,76 \pm 1,93\%$ w porównaniu z $88,52 \pm 1,97$ w grupie kontrolnej, natomiast w grupie chorych na DRP przed leczeniem wynosiła $73,51 \pm 1,80$ ($p < 0,001$ vs. kontrola - $88,52 \pm 1,97$). W trakcie leczenia cytoredukcyjnego oraz po podaniu G-CSF odsetek fagocytujących granulocytów nie zmienił się. Fagocytoza PMN nie była również zależna od stadium zaawansowania raka. Fagocytoza PMN, nie wykazywała istotnych statystycznie różnic między chorymi na NDRP i DRP (Ryc. 1).

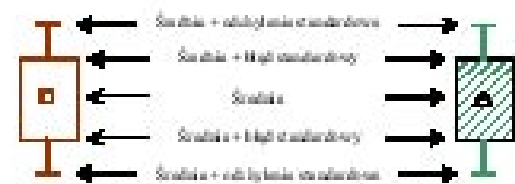
Test redukcji NBT

U chorych na raka płuca, przed rozpoczęciem leczenia cytoredukcyjnego odsetek komórek samoistnie redukujących NBT był znacznie większy w porównaniu do granulocytów osób zdrowych. W grupie chorych na NDRP wynosił $16,73 \pm 0,91\%$ ($p < 0,001$ vs. kontrola), w grupie chorych na DRP $16,30 \pm 1,00\%$ ($p < 0,001$ vs. kontrola). W trakcie leczenia cytoredukcyjnego oraz po podaniu G-CSF nie uległ on istotnym zmianom. Odsetek komórek, w których dochodziło do spontanicznej redukcji NBT nie zależał ani od stadium zaawansowania ani

% kontrakt fagocytozy

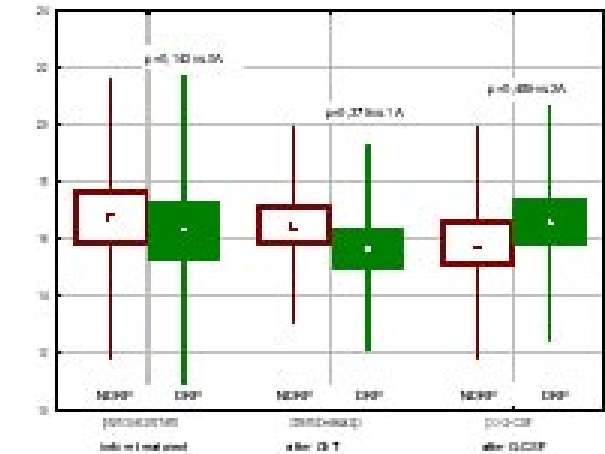


Legenda:



Rycina 1. Fagocytoza PMN.
Figure 1. Phagocytosis of PMN.

% kontrakt NBT spontanicznej



Legenda:



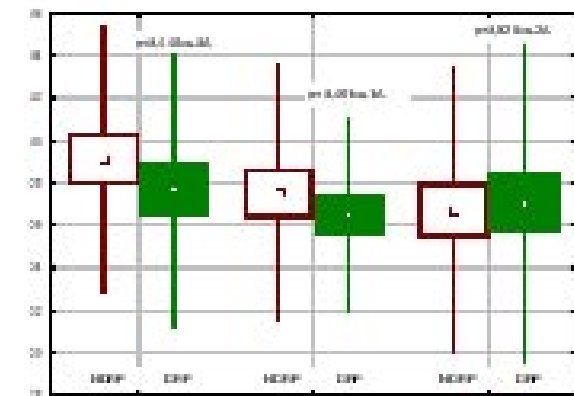
Rycina 2. Test NBT spontaniczny.
Figure 2. Spontaneous NBT test.

od typu histologicznego raka płuca (NDRP i DRP). (Ryc.2)

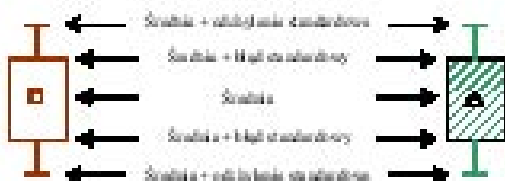
Odsetek granulocytów redukujących NBT po stymulacji endotoksyną u chorych na raka płuca, przed rozpoczęciem leczenia cytotoredukcyjnego

był znacznie większy w porównaniu do testu NBT stymulowanego u osób zdrowych i większy niż odsetek w teście samoistnej redukcji NBT. W grupie chorych na NDRP przed leczeniem wynosił on $39,10 \pm 1,15\%$ ($p < 0,001$ vs. kontrola), a w grupie

% kontrakt NBT stymulowanej

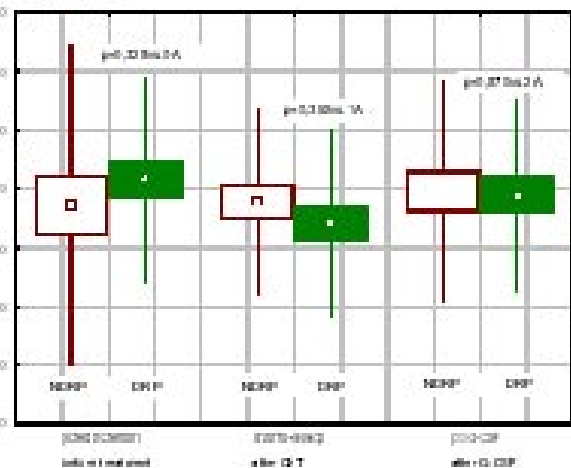


Legenda:

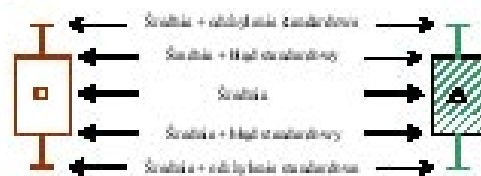


Rycina 3. Test NBT stymulowany.
Figure 3. Stimulated NBT test.

wskazanie aktywności „miopero”



Legenda:



Rycina 4. Aktywność mieloperoksydazy.
Figure 4. Activity of mieloperoksydaza.

chorych na DRP $37,67 \pm 1,18\%$ ($p < 0,001$ vs. kontrola). W trakcie leczenia cytotoredukcyjnego oraz po podaniu G-CSF nie uległ on istotnym zmianom.

Wynik testu stymulowanej redukcji NBT nie zależał od typu histologicznego ani stadium zaawansowania raka. (Ryc.3).

Aktywność mieloperoksydazy

Aktywność mieloperoksydazy oceniana jako wartość wskaźnika barwy „score”, u chorych na raka płuca, przed rozpoczęciem leczenia cytotoredukcyjnego była znamiennej mniejsza w porównaniu do aktywności u osób zdrowych. W grupie chorych na NDRP przed leczeniem wynosiła ona $267,2 \pm 5,05$ ($p < 0,001$ vs. kontrola), natomiast w grupie chorych na DRP wynosiła $271,5 \pm 3,22$ ($p < 0,001$ vs. kontrola). W trakcie leczenia cytotoredukcyjnego oraz po podaniu G-CSF nie uległa ona istotnym zmianom. Aktywność mieloperoksydazy nie była również zależna od typu histologicznego ani od stadium zaawansowania raka (Ryc.4).

Tabela I. Wartości badanych parametrów przed w trakcie chemioterapii oraz po podaniu G-CSF

Table I. Examined parameters before during chemotherapy and after G-CSF

	NDRP	SRP	Kontrola
Przed leczeniem / Before treatment			
Leukocyty (N)	8080 ± 355	7920 ± 346	5593 ± 342
%PMN	$63,4 \pm 1,2$	$66 \pm 1,2$	$62,13 \pm 1,52$
Fagocytoza (%)	$70,76 \pm 1,93$	$73,5 \pm 1,8$	$88,5 \pm 1,97$
Spontaniczna redukcja NBT	$16,73 \pm 0,91$	$16,3 \pm 1,0$	$7,47 \pm 0,76$
Stymulowana redukcja NBT	$39,1 \pm 1,15$	$37,67 \pm 1,18$	$29,13 \pm 1,37$
MPO	$267,2 \pm 5,05$	$271,5 \pm 3,22$	$288,0 \pm 1,22$
Po chemioterapii / After course of Cht			
Leukocyty (N)	1600 ± 57	1708 ± 56	5593 ± 342
%PMN	$59,7 \pm 2,37$	$60,57 \pm 1,6$	$62,13 \pm 1,52$
Fagocytoza (%)	$73,52 \pm 1,42$	$70,65 \pm 1,9$	$88,5 \pm 1,97$
Spontaniczna redukcja NBT	$16,47 \pm 0,64$	$15,67 \pm 0,66$	$7,47 \pm 0,76$
Stymulowana redukcja NBT	$37,53 \pm 1,11$	$36,5 \pm 0,82$	$29,13 \pm 1,37$
MPO	$267,9 \pm 2,89$	$264,2 \pm 2,93$	$288,0 \pm 1,22$
Po podaniu GCSF/After GCSF			
Leukocyty (N)	11380 ± 540	11660 ± 870	5593 ± 342
%PMN	$67,4 \pm 1,49$	$69,17 \pm 1,74$	$62,13 \pm 1,52$
Fagocytoza (%)	$73,4 \pm 1,38$	$72,49 \pm 1,45$	$88,5 \pm 1,97$
Spontaniczna redukcja NBT	$15,83 \pm 0,76$	$16,57 \pm 0,76$	$7,47 \pm 0,76$
Stymulowana redukcja NBT	$36,9 \pm 1,18$	$37,07 \pm 1,39$	$29,13 \pm 1,37$
MPO	$269,6 \pm 3,41$	$268,9 \pm 3,0$	$288,0 \pm 1,22$

Omówienie

U chorych na NDRP podobnie jak u chorych na DRP przed leczeniem stwierdzono znamiennej większą całkowitą liczbę leukocytów we krwi obwodowej w porównaniu do osób zdrowych. Nie wykazano zależności pomiędzy liczbą leukocytów, a stopniem zaawansowania ani typem histologicznym raka płuca. W trakcie chemioterapii, liczba leukocytów zmniejszyła się zarówno u chorych na NDRP jak i DRP. Zgodnie ze standardami leczenia, chorzy z leukopenią powstała w następstwie chemioterapii podawano G-CSF. U tych chorych obserwowano znaczne zwiększenie liczby leukocytów we krwi obwodowej. Zwiększenie odsetka granulocytów obojętnochłonnych nastąpiło głównie w wyniku pobudzenia proliferacji komórek prekursorowych granulocytów obojętnochłonnych (1).

W trakcie chemioterapii, zarówno u chorych na NDRP jak i chorych na DRP fagocytoza granulocytów obojętnochłonnych wyrażona jako odsetek komórek zdolnych do fagocytozy cząstek lateksu, był znamiennej niższy niż w grupie kontrolnej. Znamiennej spadek liczby granulocytów obojętnochłonnych, o upośledzonej funkcji fagocytarnej, jest równoznaczny z obniżeniem nieswoistej odporności organizmu. Ujemny wpływ procesu nowotworowego na aktywność fagocytarną granulocytów stwierdził też Roilides i wsp. oraz Wysocka i wsp. Być może, że antygeny nowotworowe i kompleksy immunologiczne powodują degranulację ziarnistości azurofilnych i w procesie odwrotnej endocytozy zaburzają fagocytozę (11,15). Podanie czynnika wzrostu nie zwiększa odsetka komórek fagocytujących. Aktywność fagocytarna może być wyrównywana przez zwiększenie liczby bezwzględnej granulocytów, do czego dochodzi po podaniu G-CSF

U chorych na NDRP i DRP obserwowano zwiększoną aktywność metaboliczną PMN ocenianą testem redukcji NBT. Test NBT jest miarą aktywności NADP - zależnej oksydazy i służy do wykrywania pobudzonych, aktywnych PMN. W piśmiennictwie nie ma doniesień dotyczących oceny funkcji granulocytów badanych testem redukcji NBT u chorych na raka. Prawdopodobną przyczyną pobudzenia granulocytów obojętnochłonnych może być stan zapalny, który toczy się zwykle wokół guza nowotworowego.

W skład systemu obrony przeciwbakteryjnej granulocytów obojętnochłonnych wchodzi mieloperoksydaza (14). Katalizuje ona proces powstawania nadtlenu wodoru, kwasu podchlorynowego i reaktywnych form tlenu (6). W badaniach własnych stwierdzono, że niezależnie od typu histo-

logicznego i stopnia zaawansowania raka płuca, w granulocytach obojętnochłonnych aktywność mieloperoksydazy jest mniejsza niż u zdrowych. W procesie zabijania bakterii w fagolizosomie, nadtlenek wodoru występujący w wysokich stężeniach, mając zdolność przenikania przez błony komórkowe, wywiera bezpośrednie działanie toksyczne (10). Istnieją przesłanki aby sądzić, że G-CSF zwiększa produkcję rodników tlenu (5) i wydajność fagocytozy (2, 11). Nie potwierdzono tego w niniejszej pracy. Wewnątrzkomórkowe zabijanie bakterii jest procesem złożonym, jest zależne od współdziałania wielu procesów zachodzących w komórce i od wielu czynników, w tym także enzymów lizosomalnych tworzących nietlenowy system bakteriobójczy (13). Wydaje się zatem, że u chorych na raka płuca fizjologiczna funkcja mieloperoksydazy sprowadzająca się do udziału tego enzymu w odporności na zakażenie oraz w reakcjach cytotoksycznych w stosunku do nowotworów, jest upośledzona. Lisiewicz i wsp. sugerowali, że u chorych na raka płuca, spadek aktywności mieloperoksydazy w granulocytach, może być uważany za mechanizm

obronny chroniący te komórki przed toksycznym wpływem nadtlenu wodoru (8).

Wyniki niniejszej pracy nie pozwalają wnioskować o przyczynach obniżenia aktywności mieloperoksydazy. Można jednak, opierając się na badaniach Sanokowskiej i wsp. (12) przypuszczać, że przyczyną obniżenia aktywności mieloperoksydazy u chorych na NDRP i DRP mogą być niedobory pierwiastków śladowych, w tym niedobór żelaza.

Wnioski

1. U chorych na raka płuca (NDRP i DRP) przed leczeniem dochodzi do istotnego zwiększenia całkowitej liczby leukocytów, która uległa obniżeniu w trakcie chemioterapii.

2. U chorych na raka płuca (NDRP i DRP) przed leczeniem, jak i w trakcie chemioterapii, aktywność fagocytarna granulocytów obojętnochłonnych (PMN) jest istotnie obniżona.

3. W trakcie leukopenii polekowej oraz podczas leczenia G-CSF zdolność granulocytów do fagocytozy (odsetek granulocytów fagocytujących) nie zmienia się istotnie.

Piśmiennictwo

1. Avalos B.R., Gasson J.C., Hedvat C. i wsp.: Human granulocyte colony stimulating factor: biologic activities and receptor characterization on hematopoietic cells and small cell lung cancer cell lines. *Blood*, 1990, 75:851-857.
2. Dale D.C.: Leczenie neutropenii wywołanej chemioterapią przy użyciu czynników stymulujących wzrost kolonii. *Onkol. w Prakt. Klin.*, 2005, 1, nr1:49-53
3. Hartmann L.C.: Granulocyte colony stimulating factor in severe chemotherapy - induced afebrile neutropenia. *N Engl J Med*, 1997, 336:1776-1780.
4. Hryniuk W., Levine M.N.: Analysis of dose intensity for adjuvant chemotherapy trials in stage II breast cancer. *J Clin Oncol*, 1986, 4:1162-1170.
5. Kitagawa S., You A., Souza L.M i wsp.: Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor enhances superoxide release in human granulocytes stimulated by chemotactic peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987, 144:1143-6.
6. Klebanoff S.J.: Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.*, 2005, 2,
7. Kondo M., Oshita F., Kato Y. i wsp.: Early monocytopenia after chemotherapy as a risk factor for neutropenia. *Am J Clin Oncol*, 1999, 22:103-105.
8. Lisiewicz J., Zduńczyk A.: Rola neutrofilów w immunologicznej odpowiedzi przeciwnowotworowej. *Pol Tyg Lek*, 1981, 36:579-582.
9. Levi F., Lucchini F., Negri E. i wsp.: Cancer mortality in Europe, 1995-1999, and an overview of trend since 1960. *Int J Cancer*, 2004, 111:981.
10. Prasad K., Chandhary A. K., Klara J.: Oxygen derived free radicals producing activity and survival of activated polymorphonuclear leukocytes. *Mol Cell Biochem*, 1991, 103:51.
11. Roilides E., Walsh T.J., Pizzo P.A. i wsp.: Granulocyte Colony-Stimulating Factor enhances the phagocytic and bactericidal activity of normal and defective human neutrophils. *J Infect Dis*, 1991, 163: 579-583
12. Sanokowska E., Chomiak-Stachura E., Turowski G.: Aktywność mieloperoksydazy (MPO) granulocytów obojętnochłonnych krwi obwodowej u dzieci i dorosłych osób zdrowych. *Diagn Lab*, 1986, 22:49-53.
13. Stendahl O., Coble B. I., Dahlgren C., Hed J.: Myeloperoxidase modulates the phagocytic activity of polymorphonuclear neutrophil leukocytes. Studies with cells from a myeloperoxidase-deficient patient. *J Clin Invest*, 1984, 73:366-373.
14. Pawelski S. : Diagnostyka laboratoryjna w hematologii, PZWL, Warszawa, 1990.
15. Wysocka J., Kemon H., Kiluk S., Prokopowicz J.: Aktywność fagocytarna granulocytów i własności bakteriobójcze osocza w przebiegu radioterapii raka płuca. *Nowotwory*, 1986, 36:89-97.

Wpłynęła: 18.11.2003 r.
Klinika Chorób Płuc i Gruźlicy AM w Białymstoku, ul. Żurawia 14