

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI

**LARENKS KANSERLİ HASTALARDA PERİFERİK KAN VE INTRATÜMÖRAL
T-LENFOSİTLERİNİN AKIM SİTOMETRİSİ İLE ANALİZİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. DEVRİM BEKTAŞ

TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. ABDÜLCEMAL Ü. IŞIK

TRABZON – 2002

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
MATERYAL VE METOD	17
BULGULAR	22
TARTIŞMA	32
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	41
ÖZET	42
İNGİLİZCE ÖZET	43
KAYNAKLAR	44

GİRİŞ

Bağışıklık sistemi organizmayı mikroorganizmalardan ve habis tümörlerin ortaya çıkması ve yayılmasından korumak için gelişmiş, yokluğunda yaşamın sürdürülemeyeceği bir sistemdir. İdeal bir bağışıklık sistemi, organizmaya ait hücrelerle yabancı hücrelerin ayrımını yapabilmeli, amacına konakta oluşacak en az hasarla varmalıdır.

Malign tümörlere karşı gelişen bağışıklık yanıtı, tümör immünolojisinin çalışma alanını oluşturur. Tümör hücrelerinin in vivo humoral ve hücresele yanıtı yol açtığı uzun zamandan beri bilinmektedir. Tümör immünolojisi hakkındaki bilgi geliştikçe ve organizmanın tümör hücrelerine yanıtı ve yanıtın oluşma mekanizması anlaşıldıkça, kanser teşhis ve tedavisinde “immüno diyagnoz” ve “immüno terapi” gibi kavramlar ortaya çıkmıştır.

Baş-boyun epidermoid hücreli kanserlerindeki araştırmalar tümörün moleküler patogenezi ve immüno biyolojisi hakkında ümit verici sonuçlar doğurmasına rağmen, kanser biyolojisini temel alan immüno terapi gibi tedaviler rutin olarak klinik kullanıma girmemiştir. İmmüno lojik ajanlarla yapılan deneysel klinik çalışmalar, bu tedavi seçeneğinin gelecekte bu kanserlerin tedavisinde önemli rol oynayacağını göstermektedir.

Kanserli hastalardaki en önemli savunma mekanizmasının hücresele immünite olduğu düşünülmektedir. Hücresele immünitenin en önemli kısmı lenfositler tarafından oluşturulur. Periferik kanda total lenfosit sayısındaki azalmanın kanser nedeniyle tedavi alan hastalarda bağışıklık sistemine ve bu hastaların prognozu na olan etkisi halen tartışmalıdır. Baş-boyun kanseri olan hastaların periferik kan lenfositlerinin normal kişilerle kıyaslandığı birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan bazılarında baş-boyun kanseri olan kişilerle, kontrol grupları arasında toplam lenfosit sayısı yönünden anlamlı fark bulunamamıştır. Bazılarında ise belli hücre tiplerinin kanserli hastalarda azaldığı saptanmıştır.

Bizim çalışmamızın amacı, tümöral immünitede önemli fonksiyon gören lenfositlerin özellikle de T lenfositlerin larenks kanserli hastaların periferik kanında ve intratümöral dokularında ölçümünün yapılmasıdır. Bu sayede larenks epidermoid kanserinin immunobiyolojisi hakkında daha fazla bilgi edinilmesi planlanmaktadır. Diğer bir amaç da tümöre infiltre lenfositlerin saptanması amacıyla daha önce diğer sistem tümörlerinde kullanılmış olan akım sitometri yönteminin larenks epidermoid kanserinde ilk kez kullanılmasıdır. Lenfositlerin yanı sıra diğer tümör infiltre edici hücreler ve lenfosit aktivitesini belirleyici HLA-DR ölçümü de yapılmış ve sonuçlar literatür ışığında tartışılmıştır. Hastaların tümöre karşı immün yanıtları değerlendirilmiş, periferik kan-intratümöral doku lenfosit değerleri karşılaştırılmış ve periferik kan lenfosit düzeyi ve dağılımının intratümöral yanıtı ne derece yansıttığı ortaya konmaya çalışılmıştır.

GENEL BİLGİLER

Yabancı etkenlerin invazyonuna karşı olduğu kadar organizmadaki kanser gibi doğal olmayan değişikliklere karşı da korunmayı sağlayan bağışıklık sistemi, XIX. yy'ın sonlarına doğru anlaşılmaya başlanmıştır. 1798'de Edward Jenner'in çiçek aşısını bulması, 1880'de Pasteur'un attenué mikroorganizmalar kullanılarak aşılar hazırlanabileceğini göstermesi ve bu gelişmeleri Robert Koch, Emile Roux, Alexandre Yersin ve Goodpasture tarafından bulunan çeşitli tiplerde aşılar izlemesine rağmen vücudun bağışıklık özelliği tam olarak anlaşılammıştı. Metchnikoff 1884'te organizmanın korunmasında, dolaşan hücrelerin rolü olduğunu bildirerek ve fagositozu tarif ederek yeni bir dönem başlattı. Metchnikoff lökositlerin infeksiyonlara karşı koymada önemli rol oynadığını ve makrofajların mikroorganizmaları yutarak yok ettiğini gösterdi. 1888'de Nuttall hayvanların serumunda bazı koruyucu maddelerin olduğunu ve bunların bakterileri öldürdüğünü bildirdi. Behring ve Kitasato 1890'da özellikle difteri ve tetanozda fagositik hücrelerin değil, dolaşan antikorların etkin olduklarını bildirdiler. 1897'de Ehrlich antikorun plazma hücresi tarafından salgılandığını ve hücrelerin yüzeyinde bulunduğunu gösterdi. Antijenle antikorun etkileşebilmesi için anahtarla kilit gibi birbirlerine uygun olmaları gerektiğini açıkladı. 1908 yılında Metchnikoff hücrel immünite, Ehrlich ise humoral immünitedeki çalışmalarıyla Nobel ödülü kazandılar. Bu dönemden sonra çalışmalar humoral ve hücrel immünite üzerinde yoğunlaştı. Wright ve Douglas bu iki yolun birbiriyle bağımlı olduğunu, antikorların hedef mikroorganizmayı makrofaja tanıtarak fagositozunu sağladığını gösterdiler. 1966'da Clamaa, Chaperon ve Triplett T ve B lenfositlerinin ayrı özelliklerini belirlediler. Mitchison ve Rajewsky T helper lenfositlerini, Benacerraf ve McDevitt T supressor lenfositlerini tarif ettiler. Schlossman ise T hücre alt gruplarını belirleyen 'marker'ları gösterdi.

İmmün Sistem

İnsanların yaşamlarını sürdürebilmeleri için savaşmaları gereken patojen, vücuda dışardan giren bir mikroorganizma veya vücutta gelişen bir neoplastik hücre olabilir. İmmün sistem vücut sıvılarında, kanda, dokularda, hücre yüzeyi veya hücre içinde bulunan her cins etkene karşı yanıt oluşturabilir. İmmünite iki tiptir:

1. Doğal immünite: Doğuştan mevcut olan ve esas olarak monosit, makrofaj ve granülositler gibi lenfoid sistemin yardımcı hücreleri tarafından geliştirilen immünitedir. Dışardan gelip çeşitli 'kapı'lardan vücuda giren yabancı ve zararlı maddelere karşı ilk savunmadır. Vücut yüzeyleri (deri ve mukozalar) ve bunların salgıları (ter, tükürük, gözyaşı, idrar, barsak sıvısı, bronş sekresyonu) bu savunmada birinci derecede önemlidir. Bakteriler, vücut yüzeylerindeki sekresyonlarda bulunan lizozimler ve komplemanlar tarafından direkt olarak yıkılarak fagositler (makrofajlar, nötrofiller) tarafından ortadan kaldırırlar. Virüslerle infekte hücreler ise Natural Killer (NK) hücreler tarafından direkt olarak öldürülürler. İnterferonlar ve akut faz proteinleri de bu tip reaksiyonlarda rol oynar. Doğal immünite antijene spesifik değildir ve hafızada tutulup hatırlanmaz. Yabancı maddelerle önceden karşılaşma, bu tip immüniteyi güçlendirmez. Doğal immünite, spesifik immün cevabın antijen giren yerlere yönelmesi sonucu güçlenir ve etkisi artar.

2. Kazanılmış immünite: Vücuda giren belli bir patojene karşı lenfositler tarafından spesifik olarak geliştirilen ve bellek oluşturulan yanıttır. Bu immünite sayesinde aynı patojenle ikinci kez karşılaşıldığında bellek hücreler tarafından birinci yanıtta göre daha erken ve çok daha güçlü bir immün yanıt gelişir. Bu tip immünitenin temel elemanları; T lenfositler, B lenfositler, antijen sunan hücreler ile bu hücrelerin protein yapısındaki ürünleridir (antikorlar, lenfokinler). Kazanılmış immün cevabın 2 tipi vardır:

a. Humoral immünite: Antijenlere karşı spesifik olarak meydana gelen ve antikorlar aracılığı ile oluşan immün cevap tipidir. B lenfositleri yabancı antijenlerle karşılaşınca plazma hücrelerine dönüşerek antikorları yaparlar. Bu immünite, pasif immünizasyonla, daha önceden immünize olmamış kişilere serum veya plazma ile nakledilebilir.

b. Hücresel immünite: Bu immünitede rol oynayan ve antijeni spesifik olarak tanıyan hücreler T lenfositleridir. Hücre içi virüslere, bazı bakterilere ve tümör hücrelerine karşı

oluşur. Daha önce immünize olmamış kişilere hücrelerle nakledilebilir.

İmmün Sistemin Yapısı

İmmün sistem, immün yeteneği olan hücreler (lenfositler) ile bunları olgunlaştıran, barındıran ve/veya immün cevabın meydana geldiği lenforetiküler organ ve dokulardan (timus, kemik iliği, dalak, lenf düğümleri, bazı mukozalar vb) oluşan dinamik bir sistemdir. Normalde kan ve lenf dolaşımında bulunan immün yetenekli hücrelerin kan, lenf ve dokular arasında devamlı bir değişimi vardır.

İmmün Sistemin Hücreleri

A. Lenfositler: Bu hücreler yabancı antijenleri spesifik olarak tanıyabilen ve bunlara karşı özel tipte cevaplar verebilen immün yetenekli “immünocompetant” hücrelerdir. Lenfositler lenf düğümlerindeki parakortikal bölgedeki germinal merkezlerin etrafında, dalakta periarterioler bölgenin etrafında bulunurlar. İmmün cevap bu organlarda oluşur. Lenfositler monoklonal antikolarla belirlenen ve farklılaşma kümeleri (CD) denen yüzey işaretleri ile birbirinden farklı 3 gruba ayrılırlar: T lenfositleri, B lenfositleri ve Natural Killer “NK” hücreleri.

1. T lenfositleri : Kemik iliğinden ayrılan kök hücrelerinin, timusa göç ederek burada olgunlaşmaları ile meydana gelirler (Şekil 1). “T” timusla olan bu ilişkiyi belirtir. T lenfositleri antijeni ancak antijeni sunan hücre yüzeyinde ve bu hücrenin major histokompatibilite kompleksi (MHK) molekülü ile birlikte tanıyabilir. T lenfositlerinin yüzeyinde antijen reseptörleri ile birçok yardımcı molekül bulunur. T lenfositlerinin fonksiyonca birbirinden farklı 2 alt grubu vardır: Yardımcı “helper” T lenfositleri (T helper) ve sitotoksik veya sitolitik olarak adlandırılan T lenfositleri (T sitotoksik).

Yardımcı T lenfositleri (T helper) CD4+ hücrelerdir. Bu hücreler B hücre cevabını artırır, CD8+ T lenfositlerinin yönlendirdiği hücrel immün cevabı güçlendirirler. Antijen sunan hücrelerin yüzeyindeki MHK-sınıf II'ye bağlanmış peptid antijenleri tanıyabilirler. T helper lenfositleri bu kompleksle karşılaştıktan sonra aktive olup çoğalmaya başlar. Antijen uyarısı ile aktive olmuş T helper hücreleri lenfokin denen protein yapısındaki

hormonlar salgılar. Bunlar başta T lenfositler olmak üzere B lenfositlerin ve makrofajların çoğalma ve farklılaşmasını hızlandırır.

Baskılayıcı T lenfositleri (T sitotoksik) CD8+ hücrelerdir ve antijen spesifik sitotoksiteden sorumludurlar. Virüsle infekte hücreleri veya transplantasyonla gelen allojenik hücreleri öldürürler. T sitotoksik hücreleri antijen sunan hücrelerin yüzeyindeki parçaları MHK-sınıf I antijenleri ile birlikte tanır. Bu hücreler de IL-2, γ -interferon gibi çeşitli lenfokinler yaparlar. Bu hücreler ayrıca immün cevabı da baskılayabilirler.

T lenfositlerin bu iki alt grubundan başka minör alt grupları da vardır. Bu hücrelerin fonksiyonları tam olarak belli değildir.

2. B lenfositleri: Antikor aktivitesi gösteren immünoglobulinleri yaparlar. Kemik iliğindeki “pluripotent” kök hücrelerinden oluşurlar. Kuşlarda kök hücrelerinden bir bölümü Fabricus bursasında B lenfosit özelliğini kazanır ki insanda bu bursanın eşdeğeri kesin olarak belli değildir ve insanda kemik iliğinde oluştukları kabul edilmektedir. B lenfositleri kök hücrelerinden hücre bölünmesi ile birkaç günde bir ayrılarak olgunlaşma zincirini tamamlarlar ve böylece devamlı olarak yenilenirler. Bu yenilenme ve olgunlaşma hayat boyu sürer.

3. Natural Killer Hücreler (NK): Bu hücreler yüzeylerinde T ve B lenfosit işareti taşımayan hücrelerdir. Belli bir antijenik uyarı olmadan virüsle infekte hücrelerle bazı tümör hücrelerini öldürürler. Bunların fonksiyonları non-spesifiktir yani antijene özgü değildir ancak hedefi öldürmede sitotoksik T lenfositlerine benzer etki mekanizmaları sahip oldukları sanılmaktadır.

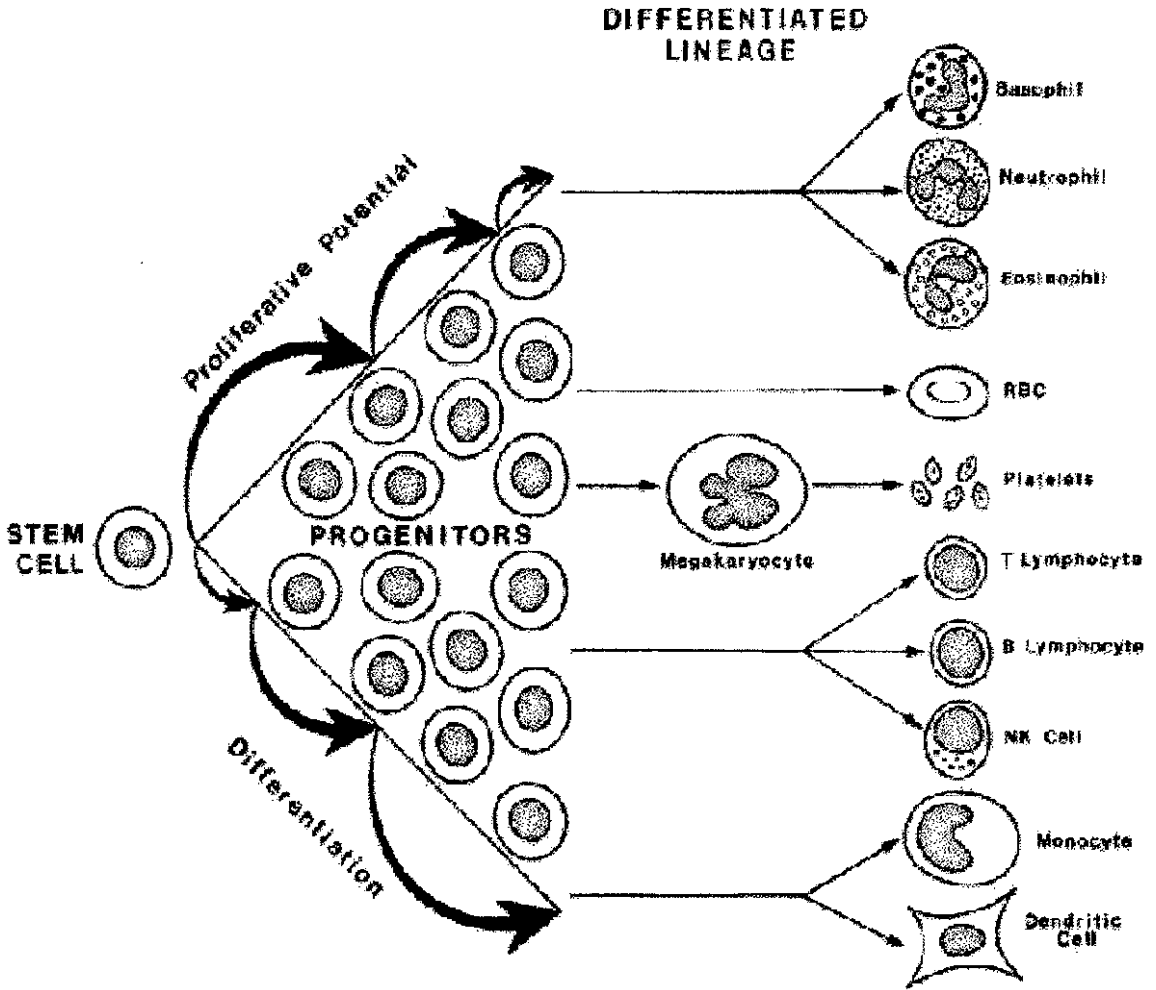
B. Yardımcı Hücreler: Temel fonksiyonu fagositoz olan, immün sistemin ikinci önemli hücre topluluğudur. Bunlara Retiküloendotelial sistem de denir.

1. Mononükleer Fagositler: Ortak bir kemik iliği ön hücresinden oluşurlar. Dolaşıma giren monositler farklılaşması tamamlanmamış hücrelerdir. Daha ileri farklılaşmaları taşıdıkları dokularda olur. Dokulara ulaşan monositler olgunlaşır ve makrofaj adını alır. Makrofajlar çeşitli uyarılarla aktive olup farklı hücrelere dönüşür (epiteloid hücreler, çok çekirdekli dev hücreler). Makrofajlar bütün organ ve bağ dokularında bulunup değişik

isimler alırlar. Temel fonksiyonları; mikroplar ve antijenler gibi makromolekülleri fagosite etmek, (özellikle nötrofiller gibi iltihap hücrelerini toplayan) sitokinler salmak ve antijenleri (antijene spesifik T helper hücrelerinin tanıyabileceği şekilde, yani MHK-sınıf II antijenleriyle birlikte) T lenfositlerine sunmaktır. Bu fonksiyonu yapan makrofajlara antijen sunan hücre denir.

2. Granülositler: Bunlara iltihap hücreleri denir. Çünkü bunların iltihap oluşumunda ve doğal immünyetede önemli rolleri vardır. Periferik kanda 3 tip granülosit vardır; kemotaktik uyarılara hızla cevap veren ve akut iltihapta yoğun olarak bulunan humoral immünyetenin etkin hücreleri Nötrofiller, özellikle allerjik reaksiyonlarda görev yapan Eosinofiller ve erken aşırı duyarlılığın aracı hücreleri olan Basofillerdir.

Şekil 1: Hematolenfopoez



İmmün Sistem Hücrelerinin Ürünleri

A. İmmunoglobulinler: B lenfositlerinin yaptığı, antikor aktivitesi olan proteinlerdir. Antijenle spesifik bağlanarak humoral immün cevabı oluştururlar. Bunların ayrıca antijene bağlı olmayan çeşitli sekonder aktiviteleri (kompleman bağlama, fagositozu kolaylaştırma) de vardır. Yani çift fonksiyonlu moleküllerdir. IgG, IgM, IgA, IgD ve IgE olmak üzere 5 tiptirler.

B. Sitokinler: Doğal ve spesifik immünitinin protein mediatörlerine sitokin denir. Doğal immünitinin efektör sitokinleri mononükleer fagositler tarafından yapılır ve monokinler olarak adlandırılır. Spesifik immünitede görev yapan birçok sitokin de aktive olmuş T lenfositlerinin ürünü olan lenfokinlerdir. Aynı sitokin birçok farklı hücre tipi tarafından yapılabileceği gibi, birçok farklı hücre tipine de etki edebilir ve birbirlerini de etkileyebilirler. Genel olarak sitokinler iltihabi veya antijenik uyarılara cevap olarak yapılır. Lokal olarak hücreye veya hedef hücrelerdeki reseptörlere bağlanarak otokrin veya parakrin tipte etki gösterirler. Sitokinler arasında; interlökinler (IL), interferonlar (IF), tümör nekrozu yapan faktör (TNF), koloni stimüle edici faktör (CSF) ve transforming growth factor- β (TGF- β) sayılabilir. Sitokinler doğal ve spesifik immünite arasında bağ kurarlar, lenfositlerin büyüme farklılaşmasını etkileyerek immün cevabın özelliklerini belirlerler ve az sayıdaki lenfositin birçok etkili mekanizmayı aktive etmesini sağlayarak güçlendirici etkiler gösterirler. Sitokinlerin fazla yapılması doku hasarı hatta ölüme yol açar.

Tümör İmmünolojisi

Vücudun hemen her türlü dokusunda ortaya çıkabilen malign tümörler çok basamaklı bir süreçte değişik karsinojen faktörlerin (kimyasal, fiziksel, viral) etkisiyle uzun bir sürede gelişirler. Malign tümörlerin; tek bir hücreden gelişebilme, kontrolsüz çoğalabilme, invazyon ve metastaz yapabilme gibi ortak özellikleri vardır. Membran antijenik yapıları da aynı dokunun normal hücrelerinden farklıdır.

Vücudun tümör hücrelerine karşı oluşturduğu yanıt ilk olarak Macfarlane Burnet ve Lewis Thomas tarafından tanımlandı. Bu araştırmacılar spontan olarak ortaya çıkan ve malign değişime uğramış hücrelerin daha tümör haline dönüşmeden immün sistem

tarafından tanınıp yok edilebileceğini, hatta tümör geliştiğinde bile anti-tümör yanıtın koruyucu olabileceğini ileri sürdüler. Bu hipoteze “İmmün Gözetim” olarak Türkçe’ye çevrilebilecek olan “Immune Surveillance” adı verildi. Bu kavrama göre malign hücre ve tümörlere karşı immün yanıt oluşabilmesi için bu hücrelerin konak tarafından yabancı olarak tanınabilecek yani immünojenik olan ve normal hücrelerden ayırdedilmesine yarayan “Tümör Antijenleri” taşınması gerekir. Bu hipoteze göre immün sistem anormal hücreleri saptayacak şekilde organizmayı devamlı gözetim altında bulundurur. Bu nedenden dolayı tümöre olan immün cevabın erken safhada oluştuğu ve tümörlerin çoğunun klinik olarak ortaya çıkmadan önce ortadan kaldırıldığı varsayılır. Aynı zamanda immün sistemin tümör büyümesini geciktirdiği ve bazı tümörleri de ortadan kaldırdığı öne sürülmüştür.

Bu hipotezi destekleyen kanıtlar arasında; çoğu tümörde lenfoid infiltrasyon olması ve tümörlerin bazı çeşitlerinde bunun iyi prognoz işareti olması, bazen tümörlerin spontan olarak regresyona uğraması, tümör gelişim sıklığının immün sistem fonksiyonlarının en zayıf olduğu neonatal ve yaşlılık döneminde en yüksek olması, immün supresyonu olan kişilerde tümör gelişiminin sık olması ve yapılan otopsilerde klinik olarak tesbit edilen malignitelere oranla daha fazla malign tümöre rastlanması sayılabilir (1).

Hayvan çalışmalarından elde edilen bilgiler immün gözetimin tümörlerden daha çok virüsler üzerinde etkili olduğunu ortaya koymuştur. Anti-lenfositik serumla immün supresyona uğratılmış olan farelerde tümör sıklığında bir artışa rastlanmamıştır. Ancak bu hayvanların bir kısmında, normal hayvanlarda nadiren tümör oluşumuna neden olan bazı virüslerle tümör gelişimi olduğu saptanmıştır. Bu bulgu tümörlere karşı immün yanıt gelişmediğini düşündürmemeli, tümörlere karşı gelişen immün yanıtın göreceli olarak geç ve yetersiz olabileceğini akla getirmelidir (2).

Tümör hücrelerinin kontrol altına alınmasında en önemli basamak T lenfosit basamağıdır. T lenfositler hem tümör hücrelerini öldürür hem de diğer immün sistem elemanlarını uyarırlar. T lenfositlerin tümörlere karşı cevabında T lenfosit alt grupları kendi görevlerini yerine getirirler. T helper lenfositler lenfokinler salgı tümöre karşı cevapta rol oynayacak diğer hücreleri aktive eder ve inflamatuvar yanıtı uyarır. T sitotoksik lenfositler de bir miktar lenfokin salarlar ama asıl görevleri tümör hücrelerini öldürmektir

(2). Tümör hücrelerinin çoğu T helper lenfositlerinin hücreyi tanıyabilmesi için gerekli olan MHK sınıf II molekülleri taşımaz. Bu nedenle antijen sunan hücrelerin tümör antijenlerini T helper lenfositlere sunması gereklidir. Daha sonra T helper lenfositler lenfokin salgı, T sitotoksik lenfositleri, makrofajları, NK hücrelerini ve B lenfositlerini aktive ederler. T sitotoksik lenfositler ise tümör hücrelerini MHK sınıf I molekülleriyle ilişkili olarak doğrudan tanıyıp hücre membran ve çekirdek bütünlüklerini bozarak öldürürler. Yeterli ve etkin T sitotoksik lenfosit aktivasyonu ve proliferasyonu için gerekli faktörleri sağlayacak T helper lenfosit katkısı gereklidir.

T sitotoksik lenfositlerin oluşturduğu lizis antijen spesifiktir ve hücreyle teması gerektirir. T sitotoksik lenfositler membrana bağlı sitoplazmik granüller içerirler. Bu granüllerin içinde perforin denen hücre membranlarında delik açıcı bir protein, granzim adı verilen proteazlar, protein toksinler ve proteoglikanlar gibi maddeler vardır.

Tümör hücresinin ölümünün, her biri hedef hücrenin yokedilmesini sağlayan iki mekanizmayla gerçekleştiği düşünülmektedir (2).

1. T sitotoksik lenfosit hedef hücreyle temas sırasında sitoplazmik granül içeriklerini eksositozla hücre dışına boşaltır. Perforin, sitolizin ya da pore-performing protein denen delik oluşturucu protein hedef hücrenin membranında membran atak kompleks gibi kanallar açar. Bu kanallardan yeterli sayıda oluşmuşsa hedef hücrede ozmotik şişme ve lizis gelişir. Bu olay kalsiyum bağımlıdır.

2. T sitotoksik lenfositler tarafından salgılanan ve lenfotoksin ya da benzeri bir madde olduğu düşünülen bir madde hedef hücrede DNA parçalanmasına yol açar. Nükleer DNA'dan sonra hedef hücre çekirdeği de parçalanır. Bu mekanizmada hedef hücrede ozmotik şişme olmaz.

Tümör infiltre eden lenfositlerin (TIL), tümörleri lizise uğratabildikleri bildirilmiştir (1). Ancak periferik kan ya da tümörlerden elde edilen T sitotoksik lenfositlerin spesifitesi çok iyi ortaya konamamıştır. Tümörlerde yapılan histolojik çalışmalar çoğunda belirgin şekilde inflamatuvar hücre infiltrasyonu olduğunu göstermiştir (1). Bu infiltrasyonda genellikle lenfosit ve makrofaj hakimiyeti mevcuttur ancak dendritik hücreler, granülositler ve mast hücreleri de tümörlerde saptanmışlardır. Lenfoid hücrelerin bazı subtipleriyle

kanser hastalarının prognozu arasında bağlantı kurulan çalışmalar olmasına rağmen bunların sayısı fazla değildir. Bu, tümörlü dokuya infiltre olmuş olan hücrelerden sadece küçük bir kısmının inceleniyor olabilmesine bağlı olabilir.

Tümöre karşı gelişen immün yanıtta B lenfositler, tümör kontrolünde rolü olabilecek Ig'lerin yapımını sağlayarak ve antijen sunan hücre rolünü görerek rol alırlar. Tümörlü insanların serumlarında tümör antijenleri için spesifik bazı antikorlar saptanabilmektedir. Bu immün cevabı uyaran antijenler muhtemelen normal dokular üzerinde bulunmadıklarından tolerans oluşturmamış proteinlerdir. Bu antikorların tümör gelişimi ve büyümesindeki inhibitör etkilerine ait kesin bulgular yoktur.

İn vitro antikor aracılı tümör hücre lizisi yapabilen 2 ana mekanizma tanımlanmıştır:

1. Kompleman bağımlı lizis: Kompleman bağlayabilen antikorlar tümör hücresinin membranına bağlanarak kompleman sistemini aktive eder ve hücre membranında delikler açılmasına yol açar. Böylece tümör hücresinin ozmotik ve biyokimyasal bütünlüğü bozularak lizise uğrar.

2. Antikora bağımlı hücrel sitotoksosite (ABHS): IgG sınıfından antikorlar Fab kısımlarıyla hedef tümör hücresindeki spesifik antijenlerine, Fc parçalarıyla da Fc reseptörü taşıyan efektör hücrelere bağlanarak iki hücre arasında köprü oluştururlar. Effektör hücre NK, makrofaj ya da granülosit olabilir. Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar bu yolun kompleman aracılığıyla olan sitotoksositeye göre daha etkin bir yol olduğunu düşündürmektedir. Tümör hücresini öldürmek için gerekli kompleman sayısının ABHS'de kompleman bağımlı lizise göre daha az olduğu gösterilmiştir. Antikor bağımlı mekanizmaların in vivo tümör hücre ölümündeki rolü kesin olarak bilinmemektedir.

Natural Killer hücrelerinin de tümör immünitesindeki rolleri kesin olarak belli değildir. Bu hücrelerin MHK moleküllerinden bağımsız olarak işlev gördükleri ve hedef hücre ölümünü T sitotoksik lenfositlere benzer mekanizmalarla oluşturdukları sanılmaktadır (3). Bu hücrelerin sitotoksik aktiviteleri in vitro ve in vivo IL-2 ve Interferon- γ (IFN γ) eklenmesi ile artırılabilir. Bu da NK aktivitesinin aktif T lenfosit cevaplarıyla kuvvetlendirilebileceğini akla getirir. NK aktivitesinin kuvvetlendirildiği durumlarda tümör metastazlarının azaldığı gösterilmiştir (3). NK hücreler hem primer hem de

metastatik tümör bölgesinde transforme olmuş hücreye karşı ilk ve nonspesifik konak korunma sistemini oluşturmakta, hem de aktif T lenfosit ürünlerinin etkisiyle spesifik anti-tümör yanıtı da katılmaktadır. NK hücreleri, IgG için düşük afiniteli Fc reseptörleri de (CD16) taşıdığından antikorla kaplanmış hedef hücrelerinde ABHS cevabında da rol alabilir.

Lenfokinle aktive olmuş öldürücü hücreler (LAK) NK hücrelerine benzer ama bazı özellikleri farklıdır. Tümörlü insanların periferik kan lenfositleri ya da tümörü infiltre eden lenfositleri in vitro yüksek doz IL-2 ile muamele edildiğinde ortaya çıkan LAK hücrelerinin etki spektrumları NK hücrelerinden çok daha geniştir (2).

Makrofajlar tümör immünolojisinde hem antijen sunan hücre olarak immün yanıtı başlatırlar hem de tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında potansiyel efektör hücre olarak görev yaparlar. Makrofajlar ancak aktive edici faktörlerin etkisiyle sitolitik hale geçerler. Aktif makrofajlar in vitro tümör hücrelerini öldürürken normal hücrelere bir şey yapmaz. Makrofaj aktive eden faktörler spesifik antijen uyarımını takiben aktif T lenfositler tarafından salındığı için makrofajların tümör immünitesindeki efektör hücre fonksiyonları T lenfosit immünitesine bağımlıdır. T lenfosit lenfokinlerinden IFN γ , TNF β ve granülosit-makrofaj uyarıcı faktörü başlıca makrofaj aktive edici faktörlerdir.

Makrofajlar yüzeylerinde Fc reseptörü taşıdıkları için antikorla kaplı tümör hücrelerinde ABHS cevabı oluşturabilirler. Hedef hücre öldürülmesinde kullandıkları mekanizmalardan bazıları infeksiyöz organizmaları öldürmekte kullandıklarıyla aynıdır (lizozomal enzimler, reaktif oksijen radikalleri vb). Aktif makrofajlardan salınan TNF α , makrofajlara bağlı tümör ölümünde önemli rol oynamaktadır. Bu madde tümör hücrelerini öldürmesine rağmen normal hücreye zarar vermez. İn vitro TNF α ile öldürülmeye dirençli olan tümörlerin makrofajlarca da öldürülmeye dirençli olduğu gösterilmiştir (2). TNF tümörü en az 2 farklı mekanizmayla öldürür (2):

1. TNF'ün hücre yüzeyindeki yüksek afiniteli TNF reseptörlerine bağlanması tümör hücreleri için doğrudan sitotoksiktir. Bu toksisite serbest radikal oluşumu ile ilişkili olabilir. Normal hücreler TNF'e karşı serbest radikalleri inaktive eden süperoksit dismutaz sentezleyerek cevap verirler. Tümör hücrelerinin çoğu ise TNF'e maruz kaldığında bu enzimi yapamaz.

2. TNF reseptörü taşımayan bazı fare tümör hücrelerinin bile TNF ile öldürülebildiği gösterilmiştir. TNF'ün seçici olarak vaskülarize tümörleri öldürdüğü ve avasküler tümörlerde çok daha az etkili olduğu gözlenmiştir. TNF'ün tümör damarlarında Schwartzman reaksiyonuna benzer bir reaksiyon oluşturarak damar trombozuna ve dolayısıyla tümörün iskemik nekrozuna yol açtığı düşünülmektedir.

LARENKS EPİDERMOİD KANSERİ

Larenksin epidermoid kanseri tüm kanserlerin %2-5'ini kapsar. En sık karşılaşılan baş-boyun tümörü larenks kanseridir. Larenks kanserinin tüm kanserlere oranı yapılan bir çalışmada tüm kanserler için erkeklerde 1:54, kadınlarda 1:775 olarak bulunmuştur (4). Kadınlardaki sigara kullanımındaki artışa bağlı olarak erkeklerle kadınlar arasındaki bu fark giderek azalmaktadır (4). Tüm dünyada erkekler arasında en sık görüldüğü yaş grubu 55-65'tir. En önemli etyolojik faktör olan sigara kullanımının azalmakta olduğu gelişmiş ülkelerde larenks kanser sıklığında son yıllarda belirgin bir değişiklik olmamıştır (5). Türkiye'de larenks kanseri epidemiyolojisiyle ilgili güvenilir ve geniş çaplı bir araştırma bulunmamaktadır. Genç nüfusun önemli bir oranının sigara kullandığı ülkemizde larenks kanserinin görülme sıklığında, gelişmiş ülkelerin aksine artış beklenmesi olağandır. Alkolle sigaranın birlikte kullanımı özellikle supraglottik kanser gelişiminde sinerjistik etki yapar. Asbest ile uğraşanlar, nikel madeni çalışanları, çiftçiler ve makinistler larenks kanseri yönünden biraz daha fazla risk taşımaktadırlar. Radyasyon da larenkste epidermoid kansere ve sarkomlara neden olabilir. Larenks kanserinin primer tedavisi birlikte veya tek başına uygulanan radyoterapi ve cerrahidir.

Klinik Anatomi: Larenks; klasik olarak supraglottik, glottik ve subglottik olmak üzere 3 anatomik bölgeye ayrılır. Klinik olarak bunların yanı sıra bir de transglottik bölge terimi kullanılır.

a. Supraglottik Bölge: Epiglotun uç ve serbest kenarlarından başlayıp aşağıda larengeal ventriküle kadar uzanır. Bu bölgeye; epiglotun larengeal yüzü, band ventriküller, aryepiglottik plikalar ve larengeal ventriküller dahildir.

b. Glottik Bölge: Supraglottik bölgeden ventrikülle ayrılır. Ventriküldeki respiratuar mukoza ile vokal kordlardaki yassı epitelin birleşim yerini klinik olarak kestirmek zor

olacağı için ventriküllerin lateral köşesi sınır olarak kabul edilir. Glottik bölge her iki vokal kordu, anterior ve posterior komissürü kapsar.

c. Subglottik Bölge: Yukarıda vokal kordlardan aşağıda krikoid kartilajın alt kenarına kadar uzanır. Genellikle yassı epitelin bitiş yeri olan vokal kord serbest kenarından 0.5 cm aşağısı üst sınır olarak kabul edilir.

d. Transglottik Bölge: Normal olarak anatomik bir bölge olarak kabul edilmemesine karşın buradaki tümörün larengeal kartilajı invaze etmesi ihtimalinin yüksek olmasından dolayı genellikle ayrı bölge olarak sınıflandırılır. Sınırlarını anterolateralde tiroid kartilaj ala'sı, inferomedialde conus elasticus, superomedialde quadrangüler membran ve posteriorda da piriform sinüs mukozası oluşturur.

Evreleme

Evrelemede American Joint Committee on Cancer (AJCC)'in 1992 tarihli sınıflaması kullanıldı (5).

Supraglottik, glottik ve subglottik tümörlerin TNM sınıflamasında N ve M kategorileri aynı olmasına rağmen T kategorisi farklılık gösterir.

T (Tümör)

Tx: Evrelendirilemiyor

T0: Primer tümör yok

Tis: Karsinoma in situ

Supraglottik Tümörler

T1: Bir bölgeye (bant ventrikül, aritenoid, epiglot) sınırlı, normal mobilite.

T2: Komşu supraglottik bölge veya bölgeleri ya da glottis tutulmuş. Mobilite normal.

T3: Fiksasyon yapmış ya da post-cricoid, sinüs piriformis medial duvarı, preepiglottik boşluğa yayılan tümör.

T4: Kartilaj invazyonu veya larenks dışına yayılım.

Glottik Tümörler

T1: Vokal kordda (VK) sınırlı (anterior ve posterior tutulum da dahil)

T1a: Tek VK tutulmuş

T1b: Her iki VK tutulmuş

T2: Supraglottik veya subglottik yayılım. VK mobilitesi bozulmuş olabilir.

T3: Larenks içine sınırlı, VK fiksasyonu yapmış.

T4: Kartilaj invazyonu veya larenks dışına yayılım.

Subglottik Tümörler

T1: Subglottik bölgede sınırlı.

T2: VK'a yayılım, mobilite bozulmuş olabilir.

T3: Larenks içinde sınırlı, VK fiksasyonu mevcut.

T4: Kartilaj invazyonu veya larenks dışına yayılım.

N (Nod)

N0: Klinik olarak lenf nodu yok.

N1: Tek, 3cm'den küçük ipsilateral nod.

N2: 6cm'den küçük nod.

N2a: Tek ipsilateral 3-6 cm arasında

N2b: Birden fazla ipsilateral 6 cm'den küçük

N2c: Bilateral veya kontralateral 6 cm'den küçük

M (Metastaz)

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var.

Stage

Stage 1: T1N0M0

Stage 2: T2N0M0

Stage 3: T3N0M0, T1-2-3N1M0

Stage 4: T4N0M0, T1-2-3-4N2-3M0, T1-2-3-4N1-2-3M1

Akım Sitometrisi

Akım sitometrisi'nin (Flow cytometry, FCM) temel özelliği, hücrelerin büyüklüğüne, viskozitesine ve granülaritesine bağlı olarak tek hücre düzeyinde araştırma olanağı sağlayan bir yöntem olmasıdır. Bu yöntem hücrelerin fiziksel ve biyolojik özelliklerinin kantitatif ölçümünün hızlı ve objektif olarak yapılmasına olanak sağlar (6).

Akım sitometrisinin temeli, Coulterin 1949 yılında bulduğu hücre sayıcısı ve volüm analizatörüne dayanır. Önce florokrom boyalarla işaretlenen örneklerden bir hücre suspansiyonu hazırlanır. Hidrodinamik odaklama denilen bir işlemle bir hücre suspansiyonu "sheath fluid" adı verilen hızlı hareket eden bir sıvı içine injekte edilir. Bu sıvı tipik olarak injekte edilen hücrelerden 10000 kez daha hızlı hareket eder. Daha hızlı hareket eden bu sheath fluid sayesinde hücreler tek sıra haline geçip "flow chamber"a ulaşırlar. Burada lazer ışığı ile uyarılarak görünür hale gelirler. Lazer kaynağı olarak genellikle Argon iyonu kullanılır. Hücreye bağlı fotokromun lazer ışınları ile aktifleşmesi, ışığın yoğunluğuna bağlı olarak, hücrenin boyutu, iç yapısı, yüzey morfolojisi ve hücrelerin canlılığı hakkında bilgi verir. Boyanın floresan emisyonu hassas fotodiodlarda toplanır ve "Photomultiply Tubes" ismi verilen özel sistemle aktarılır. Böylece birkaç dakika içinde 10.000-1.000.000 hücrenin herbirinin özellikleri teker teker belirlenebilir.

Akım sitometrisinin kullanım alanları arasında; heterojen hücre popülasyonlarının tanımlanması, tek hücre seviyesinde analiz, hücre büyüklüğü ve granülarite tayini, hücre içi ve yüzey antijenlerinin saptanması, total DNA içeriğinin ve/veya kromozomlardaki DNA içeriğinin saptanması, total hücre protein tayini ve enzim aktivitesi ve lokalizasyonu hakkında bilgi sahibi olunması vardır (6).

MATERYAL VE METOD

Bu tez çalışması Trabzon Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda, Histoloji Anabilim Dalı ve Patoloji Anabilim Dallarının katkılarıyla gerçekleştirildi. 2001 Mayıs-Aralık tarihleri arasında KTÜ Tıp Fakültesi KBB polikliniğine başvurarak larenks kanseri tanısı alan ve cerrahi tedavi uygulanan 30 hasta çalışmaya dahil edildi. Bu olguların seçimi ve çalışma metodları şöyleydi.

Hastalar: Çalışmaya 30 adet larenks kanserli hasta ve 30 adet de kontrol grubu görevi görecektir gönüllü katıldı. Hastaların 1'i kadın 29'u erkekti. Yaş dağılımı 41-68 arasındaydı (58.17 ± 5.8). Çalışmaya alınan hastalar daha önce larenks kanseri tanısı almamışlardı. Hepsi 2001 Mayıs-Aralık tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Kulak Burun Boğaz polikliniğine başvurmuş ve alınan biyopsileri sonuçları larenks epidermoid kanseri olarak rapor edilmişti. Yapılan tetkiklerde hiçbirinde metastatik hastalığa ait bulgu bulunamadı. Hiçbir hasta immün sistemi etkileyecek ilaç tedavisi almamıştı. Hastaların hepsine KTÜ Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalında cerrahi tedavi uygulandı. Tüm hastalara operasyon öncesi KBB muayenesi yapıldı. Hastalardan alınan imzalanmış bilgilendirilmiş onam belgesiyle operasyondan 1 gün önce venöz kanlarından kan örnekleri alındı. Kontrol grubu olarak yaş ortalaması 55.65 ± 6.8 olan sağlıklı bir grup seçildi. Kontrol grubunda 2 kadın ve 28 erkek bulunuyordu. Hastaların yaş, cinsiyet, lezyon yeri, hastalıklarının TNM sınıflandırmasına göre durumu ve uygulanan cerrahi tedavinin niteliği Tablo 1'de gösterildi.

Tablo 1: Hastaların Genel Özellikleri

Hasta	Yaş	Cinsiyet	Lezyonun Yeri	TNM	Stage
1	41	E	Supraglottik	T4N0M0	4
2	64	E	Glottik	T1bN0M0	1 → 1b
3	52	E	Glottik	T1aN0M0	1 → 1c
4	62	E	Glottik	T3N0M0	3 3
5	60	E	Glottik	T1aN0M0	1 → 1c
6	51	E	Glottik	T2N0M0	2 2
7	53	E	Glottik	T1aN0M0	1 → 1c
8	59	E	Glottik	T3N3M0	3 4
9	55	E	Glottik	T2N2aM0	2 4
10	53	E	Supraglottik	T1N2aM0	→ 4b
11	63	E	Supraglottik	T3N0M0	3
12	57	E	Supraglottik	T4N0M0	4
13	59	E	Transglottik	T4N0M0	4
14	66	E	Glottik	T1aN0M0	1 → 1c
15	59	E	Glottik	T1aN0M0	1 → 1c
16	61	E	Transglottik	T3N0M0	3
17	68	K	Glottik	T3N3M0	3 4
18	63	E	Glottik	T3N1M0	3 3
19	60	E	Transglottik	T3N1M0	3
20	55	E	Supraglottik	T4N0M0	4
21	66	E	Supraglottik	T1N2aM0	→ 4b
22	57	E	Glottik	T3N0M0	3 3
23	65	E	Glottik	T1aN0M0	1 → 1c
24	59	E	Transglottik	T3N2aM0	4
25	55	E	Supraglottik	T3N0M0	3
26	51	E	Glottik	T1aN0M0	1 → 1c
27	62	E	Glottik	T1aN0M0	1 → 1c
28	62	E	Glottik	T2N2aM0	2 4
29	54	E	Glottik	T2N0M0	2 2
30	53	E	Glottik	T1aN0M0	1 → 1c

Hastaların evrelendirilmesinde American Joint Committee for Cancer'in (AJCC) TNM evrelemesi kullanıldı.

Kan Örneklerinin Alınması: Hastalardan operasyondan 1 gün önce iki adet 2cc'lik venöz kan steril ve ethylenediamine tetra-asetik asid (EDTA) içeren tüplere alındı. Bu EDTA'lı örnekler; tam kan sayımı, periferik kanda CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD16+56+, CD45+ ve HLA-DR+ lenfositlerin ölçümünde kullanıldı. Yapılan testlerdeki güvenilirliğin kontrolü için oluşturulan sağlıklı kontrol grubundan da örnekler aynı şekilde alınıp hasta grubuna uygulanan tüm kan testleri uygulandı.

Total Lenfosit sayısının hesaplanması: Total lenfosit sayısı hemogramdaki total beyaz küre sayısı ve lenfosit yüzdesinden yararlanarak ölçüldü. Toplam T lenfosit sayısı, total lenfosit sayısının CD3 yüzdesi ile çarpımı ile hesaplandı.

1. EDTA'lı tüplere toplanmış olan tam kana standart Ficoll-Hypaque gradient seperasyon tekniği uygulanarak mononükleer hücreler izole edildi. Ficoll ve kontamine edici serum komponentleri, hücrelerin iki kez 10mM PBS (Dulbecco PBS) yıkayıp tekrar 10mM PBS içinde suspanse edilmesiyle temizlendi. Sonuçta oluşan hücre konsantrasyonunun 10mM PBS'de 4×10^6 hücre/ml olması sağlandı.

2. 12x75mm.lik tüpteki yıkanmış 25 μ L'lik hücre süspansiyonuna biotinlenmiş sitokin reagentten toplam reaksiyon hacmi 35 μ L olacak şekilde 10 μ L eklendi.

3. Hücreler 2-8° C'de 60 dakika inkübe edildi.

4. Tüpe 10 μ L avidin-FITC reagent eklendi.

5. Karışım 2-8° C'de tekrar inkübe edildi.(karanlıkta)

6. Hücreler 2ml'lik 1XRDF tampon solüsyonunda iki kez yıkayıp reaksiyona girmemiş avidin-floresandan temizlendi. Akım sitometri analizi için hücreler 0.2 ml.lik 1XRDF1 tampon solüsyonunda suspanse edilip akım sitometrik analiz için hazır hale getirildi. 1XRDF1 tampon solüsyonunun hazırlanması için kit ile birlikte verilmiş konsantre RDF1 tampon solüsyonunun (10X) her 1 ml.sine 9ml steril distile su eklendi. Hazırlanan solüsyon +4° C'de saklandı.

CD Tayini: Periferik kan örneklerinin akım sitometrik olarak değerlendirilmesi için EDTA'lı tüplere 2 cc venöz kan örneği alındı. Karışım sağlanarak pıhtılaşma önledi. 20 µl monoklonal antikor konulup işaretlemelerin yapıldığı tüplerin üzerine kan örneğinden 100'er µl ilave edildi.

Monoklonal antikorlar CD4 FITC / CD8 PE, CD3 FITC / CD19 PE, CD45 FITC, CD16+56 PE, HLA-DR PE olarak çalışıldı (Tablo 2). 20 dakikalık inkübasyondan sonra tüpler Coulter Multi Q prep. Cihazından geçirilerek otomatize olarak Immunprep A, B, C solüsyonları ile muamele edildi. Eritrositler lizise uğratıldı ve 15 dakikalık inkübasyon sonrası hazır hale getirildi. Tüpler akım sitometri cihazından geçirilerek yaklaşık 5000 hücre sayımı yapıldı. Monoklonal antikor olarak seçilen CD3, CD4, CD8, CD19, CD45, CD16+56 ve HLA-DR pozitiflikleri % olarak saptandı.

Tablo-2: Çalışılan parametreler ve özellikleri

CD	Antikor özelliği gösterilen hücre
Anti-CD3	Pan T lenfosit markeri
Anti-CD4	T helper
Anti-CD8	T sitotoksik
Anti-CD19	Pan B lenfosit antijeni
Anti-CD16+56	NK hücreleri
Anti-CD45	(Leukocyte common antigen) Tüm lökositlerde bulunur.

Tümöre İnfiltrat Lenfositlerin (TIL) Saptanması İçin Dokunun Hazırlanması: Hücre yüzey reseptörleri çalışılacak olduğundan taze doku örnekleri kullanıldı. Önceden biyopsi ile epidermoid hücreli larenks kanseri tanısı konmuş hastaların operasyonu esnasında spesimen çıkarılınca hemen tümör ve sağlam doku sınırını içerecek şekilde, ağırlıklı olarak tümörün içinden ve sağlam dokuya yakın yerlerden 3'er örnek alındı. Örnekler periferik kan kontaminasyonundan sakınmak için birkaç dakika süreyle serum fizyolojikle yıkandı. Daha sonra örnekler PBS solüsyonu içine kondu. Akım sitometri analizi süspansiyon halindeki hücrelerde yapılacağı için önce taze doku mekanik parçalama yöntemi ile muamele edilerek hücre süspansiyonu hazırlandı.

Tümöre İnfiltrasyon Olan Lenfositlerin Saptanması: Hazırlanmış olan hücre süspansiyonundan 250-300 µl'lik bir miktar monoklonal antikorların 20 µl kadar konulup işaretlemelerin yapıldığı tüplerin üzerine eklendi. Tüpler akım sitometri cihazından geçirilerek yaklaşık olarak 5000 hücre sayımı yapıldı. Monoklonal antikor olarak seçilen CD3, CD4, CD8, HLA-DR gibi T lenfositlere özgü antikorların yanısıra CD19, CD45 ve CD16+56 gibi monoklonal antikorlar da çalışıldı ve pozitiflikleri % olarak saptandı.

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı bünyesinde bulunan çift lazerli Coulter Epics Elite ESP FCM Cihazı kullanılarak testler yapıldı.

Akım Sitometrisi ile Ölçümlerin Yapılması: Cihazın lazer ayarı polystyren kaplı partiküller içeren DNA Check (plastic beads) ile standardize edildi. Tüplerdeki hücreler sayıldıktan sonra 488 nm argon iyon lazer ile 15 mW'ta analize alındı. Hücre akım hızı numunedeki hücre yoğunluğuna göre ayarlandı. FCM'de boyanmış hücreler hızlı bir şekilde yoğun lazer alanından geçirilirken hücreye bağlı fluorokromun lazer ışığı ile aktifleşmesi sağlandı. Boyanın floresan emisyonu hassas fototüp (Multiply Tubes, PMT's) tarafından belirlenerek amplifiye edildi ve FCM bilgisayarına aktarıldı.

İstatistiksel Yöntem

Ölçümle elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile incelenmiştir. İncelenen değişkenlerin verileri normal dağılıma uyan veriler parametrik testlerle, uymayanlar non parametrik testlerle değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara göre varyans analizi, student t testi, Pearson ve Spearman korelasyon analizleri yapılmıştır.

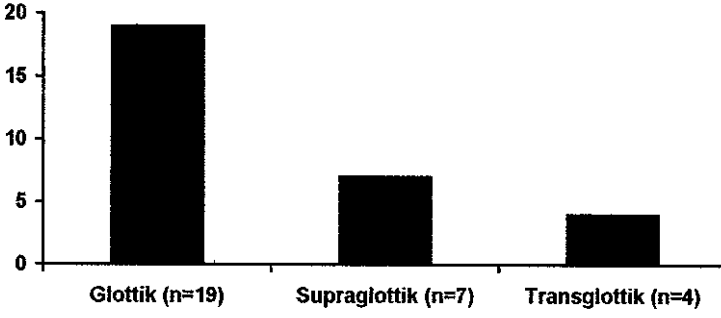
Ölçümle elde edilen veriler aritmetik ortalama ± standart sapma ile sunulmuştur.

Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak alınmıştır. Anlamlılık düzeyi çoklu karşılaştırmalarda (post hoc) ise "0.05/karşılaştırma sayısı" olarak alınmıştır.

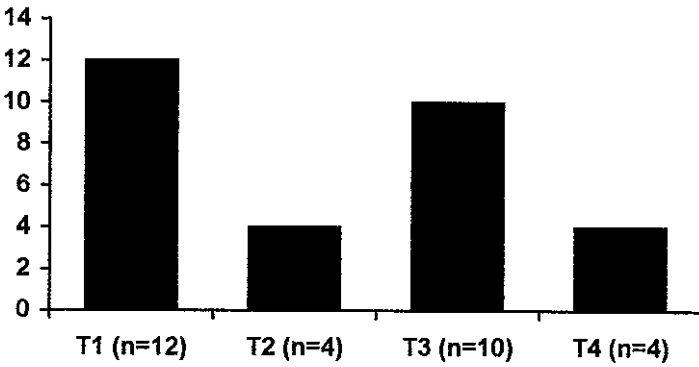
BULGULAR

Hastaların tümörlerinin larenksteki yerleşimine göre ve TNM sınıflamasına göre özet Şekil 2-5’de grafik olarak gösterilmiştir.

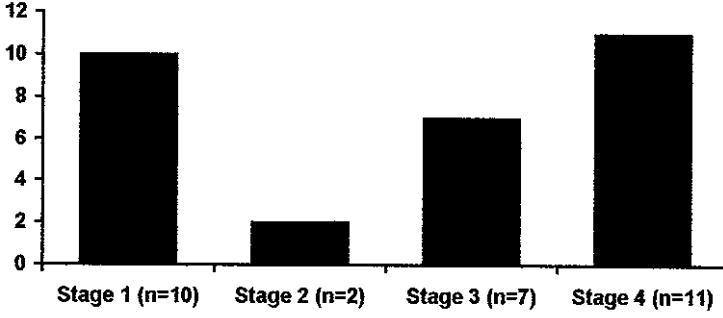
Şekil 2: Hastaların Tümör Lokalizasyonuna Göre Sınıflanması



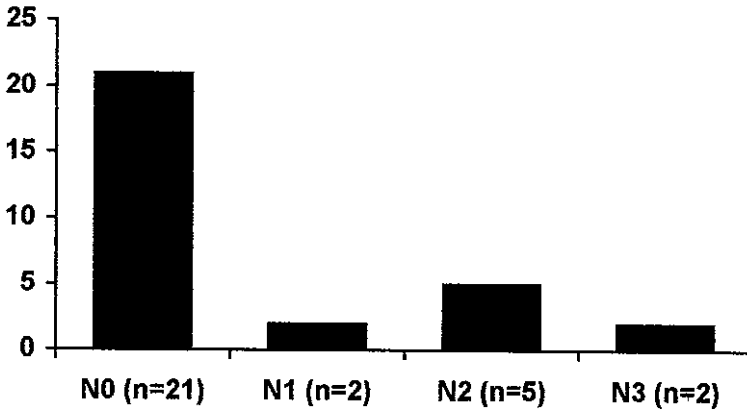
Şekil 3: Hastaların T evrelerine Göre Sınıflanması



Şekil 4: Hastaların Stage'lerine Göre Sınıflanması



Şekil 5: Hastaların lenf nodu metastaz durumlarına göre sınıflanması



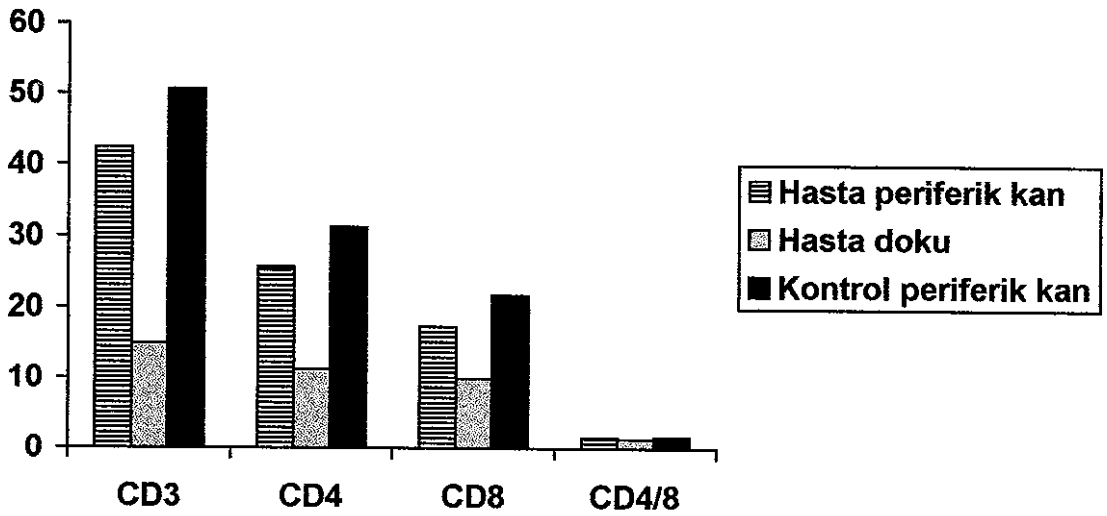
Hasta grubunun total beyaz küre miktarı $6856 \pm 2980/\text{mm}^3$, kontrol grubunun ise $6511 \pm 2381/\text{mm}^3$ 'tü. Her iki grup arasında total beyaz küre miktarı yönünden anlamlı fark saptanmadı ($p=0.884$). Buna karşın total lenfosit sayısı hasta grubunda ($1810 \pm 992/\text{mm}^3$) kontrol grubundan ($2486 \pm 780/\text{mm}^3$) anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.009$).

Hasta ve kontrol gruplarının tüm analiz sonuçlarının özeti Tablo 3'de ortalama± standart sapma şeklinde verildi.

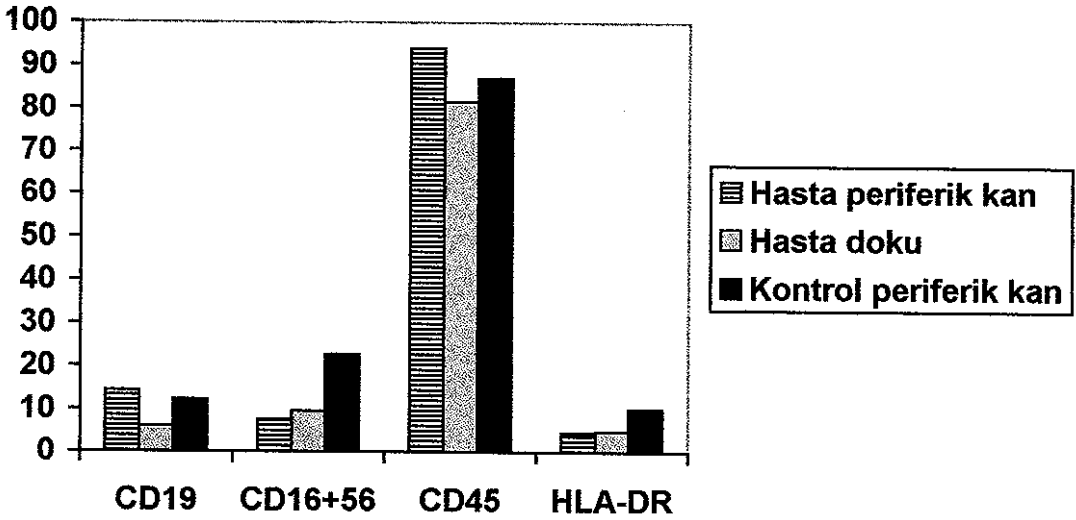
Tablo 3: Hasta ve kontrol gruplarının analiz sonuçları özeti (ortalama±standart sapma)

	Hasta periferik kan n=30	Hasta doku n=30	Kontrol grubu periferik kan n=30
CD3	42.5±9.2	14.9±13.4	50.6±13.8
CD4	25.6±8.2	11.2±3.9	31.2±9.9
CD8	17.3±6.7	9.9±6.65	21.7±7.2
CD4/8	1.57±0.39	1.37±0.54	1.60±0.78
CD19	14.3±5.9	6.0±3.0	12.2±7.9
CD16+56	7.6±3.0	9.5±4.3	22.8±15.1
CD45	93.9±4.5	81.4±10.6	86.9±11.1
HLA-DR	4.5±2.7	4.7±1.5	10.1±5.2

Şekil 6: CD3, CD4, CD8 ve CD4/8 sonuçları



Şekil 7: CD19, CD16+56, CD45 ve HLA-DR sonuçları



Tablo 4'te Hasta ve kontrol gruplarının periferik kan analizlerinin karşılaştırılması ve p değerleri görülmektedir. Hasta grubunda, kontrol grubuna göre CD3, CD4, CD8, CD19, CD16+56 ve HLA-DR anlamlı olarak düşük bulunmuşken; CD45 anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. CD4/8 oranı arasında her iki grupta anlamlı bir farka rastlanmamıştır.

Tablo 4: Hasta-Kontrol gruplarının periferik kan analizlerinin sonuçlarının karşılaştırılması

	Hasta grubu (n=30)	Kontrol Grubu (n=30)	P
CD3	42.5±9.2	50.6±13.8	p=0.010
CD4	25.6±8.2	31.2±9.9	p=0.020
CD8	17.3±6.7	21.7±7.2	p=0.018
CD4/8	1.57±0.39	1.60±0.78	p=0.882
CD19	14.3±5.9	22.8±15.1	p=0.007
CD16+56	7.6±3.0	12.2±7.9	p=0.005
CD45	93.9±4.5	86.9±11.1	p=0.003
HLA-DR	4.5±2.7	10.1±5.2	p=0.000

Tablo 5’de erken T evreli hastalarla (T1-2), ileri T evreli hastaların (T3-4) periferik kan sonuçları karşılaştırılmıştır. Erken T evreli hastalarda CD3 ve CD45 anlamlı derecede yüksekken, diğer parametrelerde istatistiki anlamlı farka rastlanmamıştır.

Tablo 5: Erken T evreli (T1-2) ve ileri T evreli (T3-4) hastaların periferik kan sonuçlarının karşılaştırılması

	T1-2 (n=16)	T3-4(n=14)	
CD3	45.6±9.7	38.9±7.3	p=0.046
CD4	24.6±6.1	26.7±10.3	p=0.489
CD8	17.5±7.3	17.1±6.3	p=0.880
CD4/8	1.49±0.25	1.66±0.50	p=0.264
CD19	16.2±6.2	12.2±4.9	p=0.064
CD16+56	7.3±2.9	7.9±3.2	p=0.637
CD45	95.9±2.9	91.6±5.0	p=0.008
HLA-DR	5.3±2.9	3.6±2.2	p=0.093

Tablo 6’da ise erken T evreli hastalarla, ileri T evreli hastaların doku analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. Görülen tek anlamlı fark, ileri T evreli hastalarda CD4/8 oranının daha düşük olmasıdır.

Tablo 6: Erken T evreli (T1-2) ve ileri T evreli (T3-4) hastaların doku sonuçlarının karşılaştırılması

	T1-2 (n=16)	T3-4(n=14)	
d.CD3	16.7±17.5	13.0±6.2	p=0.449
d.CD4	12.2±5.0	10.0±1.5	p=0.110
d.CD8	8.3±3.0	11.7±8.9	p=0.192
d.CD4/8	1.56±0.56	1.15±0.42	p=0.033
d.CD19	9.3±4.9	9.7±3.6	p=0.759
d.CD16+56	5.2±2.5	6.99±3.6	p=0.133
d.CD45	78.9±13.9	84.2±3.9	p=0.162
d.HLA-DR	4.7±1.6	4.7±1.5	p=0.985

Tablo 7’de Erken ve geç T evreli hastalarla kontrol grubunun varyans analizi yapıldı. Kontrol grubunda CD3 ve CD19 düzeyi T3-4 grubuna göre, CD16+56 düzeyi ise T1-2

grubuna göre anlamlı derecede yüksekti. HLA-DR düzeyi ise hem T1-2 hem de T3-4 grubuna göre yüksek olarak bulundu. CD4, CD8 ve CD4/8 düzeyleri gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi.

Tablo 7: Evre (T) Varyans Analizi

	T1-2	T3-4	Kontrol	P
CD3	45.6±9.7	38.9±7.3	50.6±13.8	p=0.010
CD4	17.5±7.3	17.1±6.3	31.2±9.9	p=0.055
CD8	17.5±7.3	17.1±6.3	21.7±7.2	p=0.062
CD4/8	1.49±0.25	1.66±0.50	1.60±0.78	p=0.747
CD19	16.2±6.2	12.2±4.9	22.8±15.1	p=0.141
CD16+56	7.3±2.9	7.9±3.2	12.2±7.9	p=0.016
CD45	95.9±2.9	91.6±5.0	86.9±11.1	p=0.004
HLA-DR	5.3±2.9	3.6±2.2	10.1±5.2	p=0.000

N0 ve N+ olan hastaların periferik kanlarının karşılaştırıldığı Tablo 8’de N0 olan grupta CD8 düzeyinin diğer gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmektedir.

Tablo 8: N0 ve N+ (N1-2-3) hastaların periferik kan analizlerinin karşılaştırılması

	N0 (n=21)	N1-2-3 (n=9)	
CD3	43.6±9.7	39.8±7.6	p=0.310
CD4	26.0±8.2	24.4±8.7	p=0.618
CD8	18.8±7.0	13.8±4.4	p=0.027
CD4/8	1.49±0.42	1.77±0.23	p=0.071
CD19	14.5±6.6	13.8±4.1	p=0.748
CD16+56	7.6±3.3	7.5±2.4	p=0.967
CD45	93.8±5.0	94.2±3.2	p=0.797
HLA-DR	4.8±3.0	3.7±1.5	p=0.191

Tablo 9’da N0 ve N+ hasta gruplarının doku analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. N+ grupta CD4/8 oranı anlamlı miktarda yüksek bulunmuştur.

Tablo 9: N0 ve N+ (N1-2-3) hastaların doku analizlerinin karşılaştırılması

	N0 (n=21)	N1-2-3 (n=9)	
d.CD3	14.4±14.9	16.3±9.6	p=0.726
d.CD4	10.8±2.6	12.3±6.0	p=0.478
d.CD8	11.0±7.4	7.1±2.4	p=0.134
d.CD4/8	1.22±0.51	1.72±0.45	p=0.018
d.CD19	9.9±4.3	8.6±4.2	p=0.446
d.CD16+56	6.2±3.7	5.7±1.4	p=0.619
d.CD45	79.5±11.7	85.7±6.4	p=0.150
d.HLA-DR	4.7±1.4	4.6±1.8	p=0.912

Tablo 10’da N0 ve N+ hastalarla kontrol grubunun periferik kan sonuçlarının varyans analizi yapıldı. CD3 düzeyi en yüksek kontrol grubu, en az da N+ grup olmak üzere 3 grup arasında da anlamlı derecede farklı bulundu. CD19 ve Cd16+56 düzeyleri N0 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük, CD 45 seviyesi ise yüksek olarak bulundu. Hem N0 hem de N+ grupta HLA-DR seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu.

Tablo 10: Node (N) Varyans Analizi

	N0	N1-2-3	Kontrol	P
CD3	43.6±9.7	39.8±7.6	50.6±13.8	P=0.026
CD4	26.0±8.2	24.4±8.7	31.2±9.9	P=0.060
CD8	18.8±7.0	13.8±4.4	21.7±7.2	P=0.012
CD4/8	1.49±0.42	1.77±0.23	1.60±0.78	P=0.519
CD19	14.5±6.6	13.8±4.1	22.8±15.1	P=0.021
CD16+56	7.6±3.3	7.5±2.4	12.2±7.9	P=0.016
CD45	93.8±5.0	94.2±3.2	86.9±11.1	P=0.010
HLA-DR	4.8±3.0	3.7±1.5	10.1±5.2	P=0.000

Tablo 11’de erken Stage’li (1-2) ve ileri Stage’li (3-4) hastaların periferik kan analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. Erken evreli grupta CD3 ve CD45 düzeyleri diğer gruba oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Tablo 11: Erken (1-2) ve ileri (3-4) Stage’li hastaların periferik kan analizlerinin karşılaştırılması

	Stage1-2 (n=12)	Stage3-4 (n=18)	
CD3	48.4±8.8	38.5±7.3	p=0.002
CD4	26.2±6.2	25.2±9.5	p=0.745
CD8	19.2±7.7	16.0±5.9	p=0.240
CD4/8	1.46±0.28	1.65±0.44	p=0.189
CD19	16.6±7.0	12.7±4.7	p=0.076
CD16+56	7.0±3.2	8.0±2.9	p=0.365
CD45	96.0±2.7	92.5±5.0	p=0.035
HLA-DR	5.8±3.2	3.6±2.0	p=0.054

Erken ve ileri Stage’e sahip hastaların doku analizlerinin karşılaştırılması sonucu her iki grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo12).

Tablo 12: Erken (1-2) ve ileri (3-4) Stage’li hastaların doku analizlerinin karşılaştırılması

	Stage1-2 (n=12)	Stage3-4 (n=18)	
d.CD3	15.4±19.4	14.7±7.9	P=0.908
d.CD4	11.2±3.15	11.3±4.4	P=0.942
d.CD8	8.7±2.8	10.7±8.2	P=0.369
d.CD4/8	1.36±0.50	1.38±0.57	P=0.947
d.CD19	9.9±5.1	9.2±3.8	P=0.721
d.CD16+56	4.8±2.8	6.9±3.2	P=0.091
d.CD45	76.0±14.3	84.5±5.3	P=0.057
d.HLA-DR	4.5±1.8	4.7±1.4	P=0.730

Tablo 13'te erken ve ileri Stage'e sahip hastalarla kontrol grubunun periferik kan sonuçlarının varyans analizi yapıldı. İleri Stage'e sahip grupta CD3, CD8 ve CD19 seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüktü. Erken stage'li grupta CD16+56 seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşükken, CD45 seviyesi anlamlı derecede yüksekti. HLA-DR seviyesi her iki hasta grubunda da kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı.

Tablo 13: Stage Varyans Analizi

	Stage1-2	Stage 3-4	Kontrol	P
CD3	48.4±8.8	38.5±7.3	50.6±13.8	p=0.002
CD4	26.2±6.2	25.2±9.5	31.2±9.9	p=0.064
CD8	19.2±7.7	16.0±5.9	21.7±7.2	p=0.030
CD4/8	1.46±0.28	1.65±0.44	1.60±0.78	p=0.698
CD19	16.6±7.0	12.7±4.7	22.8±15.1	p=0.014
CD16+56	7.0±3.2	8.0±2.9	12.2±7.9	p=0.015
CD45	96.0±2.7	92.5±5.0	86.9±11.1	p=0.005
HLA-DR	5.8±3.2	3.6±2.0	10.1±5.2	p=0.000

Periferik kan ve doku düzeylerinin korelasyonunun karşılaştırıldığı Tablo 14 ve 15'deki tek anlamlı sonuç, dokudaki düzeyi periferik kanla pozitif korelasyon gösteren CD16+56'ydi.

Tablo 14: Periferik kan ve doku düzeyleri arasındaki korelasyon (CD3, CD4, CD8, CD4/8)

Periferik Kan				
Doku	CD3	CD4	CD8	CD4/8
d.CD3	r= 0.30 p= 0.102			
d.CD4		r=-0.14 p= 0.459		
d.CD8			r= 0.23 p= 0.218	
d.CD4/8				r=0.35 P=0.052

Tablo 15: Periferik kan ve doku düzeyleri arasındaki korelasyon (CD19, CD16+56, CD45, HLA-DR)

Periferik Kan				
Doku	CD19	CD16+56	CD45	HLA-DR
d.CD19	r= -0.29 p=0.116			
d.CD16+56		r=0.40 p=0.029		
d.CD45			r= -0.03 p= 0.874	
d.HLA-DR				R= -0.08 P= 0.665

TARTIŞMA

Hücresele immünitening kanserlere karşı konağın önemli bir mekanizması olduğunun ortaya çıkmasından sonra baş-boyun kanserli hastaların immünolojik parametrelerindeki bozulmayı gösteren bir çok çalışma yapılmıştır (7-10). Bu konudaki ilk araştırmalar genellikle hastaların periferik kanlarındaki lökosit/lenfosit sayımı ve IgG düzeyleri gibi hastanın genel immünolojik düzeyini göstermişler ve bunların çoğunda genel immün aktivite durumu ile klinik seyir arasında bağlantı bulunmuştur (11). Yapılan ilk yayınlarda nonspesifik hücresele immünitening bir göstergesi olarak genellikle dinitroklorobenzene (DNCB) gibi maddelere karşı gecikmiş kutanöz hipersensitivitenin gösterilmesi kullanılmıştır. Klinik olarak lokalize baş-boyun kanserleri olan hastalarda cerrahi rezeksiyon sonrası rekürrens, DNCB'ye karşı anerjiyle korele olarak bulunmuştur (11). DNCB'ye karşı olan reaktivitenin, inkürabl tümörü olan hastalarda da surviyle paralel olduğu rapor edilmiştir (11). Larenks kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada ise T lenfositlerinin diğer immün hücrelerin toplamına oranı, lenfosit blastoid reaksiyonu (PHA-phytohemagglutinin, concavalin A) ve cilt reaksiyonları (PHA) genel olarak normal aralıkta, ancak T lenfositleri ve total lenfositlerin total sayısı düşük olarak bulunmuştur (7).

Vücudun genel immünolojik durumunu değerlendiren bu çalışmaları daha spesifik in vivo ve in vitro araştırmalar izlemiştir. Bunlar arasında periferik kan lenfositlerinin subtipleri, sitokinler ve tümör infiltre eden lenfositler (TIL) üzerine yapılan çalışmalar önemli bir yer tutmaktadır (12- 24).

Bizim çalışmamızda periferik kan immün hücrelerinin analizi yanı sıra, tümör immünolojisinde birinci derecede önemli olan tümöre infiltre lenfositlerin düzeyleri de ölçüldü. Tüm bu ölçümler akım sitometrisi ile yapıldı. Total T lenfosit, T helper, T sitotoksik, aktive T lenfositlerin (HLA-DR+) yanı sıra, NK hücreleri, B lenfositleri ve lökositlerin de toplam inflamatuvar yanıt içerisinde ne miktarda temsil edildikleri tümöre ve

hastaya bağılı değişkenlere göre saptandı. Buna rağmen çalışmamızda belirli bir miktardaki tümör kitlesindeki infiltrate olmuş lenfosit ve diğer inflamatuvar hücrelerin tümör hücrelerine oranı yani penetrasyon yüzdesi hesaplanmadı. Bu çalışmada akım sitometrisi yöntemi kullanılmasının ve penetrasyon yüzdesinin hesaplanmamasının nedenleri şunlardır:

1. Akım sitometrisi ile hücre yüzeyindeki reseptörlerin tayini yapıldığından hücrenin canlı olması gerekmektedir. Hücrelerin canlı kalabilme gücü lenfosit, NK ve lökosit gibi lenfopoetik orijinli hücrelerle, tümör hücreleri arasında çok farklılık göstermektedir. Akım sitometrisi ile özellikle solid tümörlerde penetrasyon derecesinin saptanmaya çalışılması, bu yüzdenin olduğundan daha farklı olarak saptanmasına yol açacaktır (25).

2. Hücrelerin akım sitometri analizine hazırlanma aşaması da penetrasyon derecesinin saptanmasında sapmaya yol açan bir faktördür. Mekanik parçalama yöntemi sonucu, tümör hücrelerinin invaze olmuş inflamatuvar hücreleri kadar kolayca hücre suspansiyonu oluşturacak şekilde birbirlerinden ayrılmama ihtimali de vardır. Bu da lenfositlerin ve diğer hücrelerin penetrasyon derecesinin normalden daha yüksek düzeyde saptanmasına yol açabilecektir (26).

3. Bu iki olumsuz özelliğin yanısıra immünohistokimyasal olarak inflamatuvar hücrelerinin penetrasyon derecelerinin araştırıldığı nisbeten yeterli sayıda çalışma vardır. Ancak bu hücrelerin tek tek toplam inflamatuvar hücrelere göre hesaplanmış yüzdesi larenks kanserli hastalarda yeterli miktarda çalışılmamıştır. Bu yüzden, immünohistokimyasal yöntemle oranla çok daha fazla hücrenin spesifik karakterinin tanınmasına olanak sağlayan akım sitometrik analiz yöntemi bu çalışmada lenfosit ve diğer hücrelerin birbirlerine olan oranlarının saptanmasında kullanılmıştır (26,27).

Larenks kanserli hastaların immünolojik profiliyle ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Larenks kanserli hastalarda T lenfositlerin azalmasıyla DNCB ile gecikmiş hipersensitivitenin de azaldığı gösterilmiştir (11). Lenf nodlardaki hücresel infiltrasyon araştırılmış, hücresel infiltrasyondaki artışın iyi prognozla, azalmanın ise hücresel immünitedeki yetmezlik ve kötü prognozla uyumlu olduğu öne sürülmüştür (28). Periferik kandaki NK aktivitesinin sağlıklı kişilere göre belirgin şekilde azaldığı bulunmuştur. Blast hücre transformasyonu, immunoglobulin seviyeleri, total lenfosit sayısı, lenfokinler, interferon aktivitesi ve hücresel migrasyonun da azaldığı görülmüştür. Baş-boyun multipl

kanserlerinin hücrel immün yetmezlikle ilişkili olduğu ve radyasyon tedavisinden sonra hücrel cevabın azaldığı birçok kereler bildirilmiştir (11,34).

Baş-boyun kanseri olan hastalarda lenfosit sayısı ve subtiplerinin normal olduğunu iddia eden çalışmalar (8,9,30) bulunduğu gibi bunun aksine bir veya birkaç lenfosit subtipinde veya NK gibi diğer hücre tipinde azalma bildiren yayınlar da vardır (31).

Yapılan bir çalışmada T lenfositlerin yüzdesinde azalma olmamasına karşın, total lenfosit ve total T lenfosit sayısının baş-boyun kanserli hastalarda anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir (7). Bu çalışmada ayrıca total lenfosit ve T lenfosit sayısının düşük olduğu grupta, nispeten daha yüksek olan gruba nazaran daha yüksek oranda rekürrens gözlenmiştir. Larenks kanserli hastalarda yapılan diğer bir çalışmada ise pan T lenfosit markeri olan CD3+ hücresi dışında bir azalma saptanmamıştır (12).

Baş-boyun kanserli hastalardaki periferik kandaki lenfosit subtiplerinin düzeylerinin değerlendirildiği çalışmalarda birbirleriyle çelişen sonuçlar ortaya çıkmıştır. Wolf ve arkadaşlarının 1986'da yaptıkları bir çalışmada baş-boyun kanserli hastaların periferik kanlarında kontrol grubuna göre T helper lenfositleri yüksek olarak bulunmuştur (13). Wolf'un daha sonra benzer bir hasta grubunda yaptığı çalışmada ise T helper lenfositleri ile kontrol grubu arasında bir fark saptanmamış ancak T sitotoksik lenfositlerin azaldığı rapor edilmiştir (14). Schantz ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise baş-boyun kanserli hastalarda T helper lenfositlerde azalma saptanmıştır (15).

Yaptığımız çalışmaya katılan hastalarda tümör 19 adetle en sık glottik yerleşim gösteriyordu. Bunu 7 adetle supraglottik, 4 adetle ise transglottik tutulum izledi (Şekil 2). Tümörlerin gösterdiği bu dağılım, karşılaşılan sıklıklarıyla yaklaşık olarak uyumluydu (5). Larenks kanseri olan hastaların periferik kan miktarlarındaki total beyaz küre miktarı kontrol grubuyla anlamlı fark göstermedi. Total beyaz küre miktarındaki bu düşüşe total lenfosit yüzdesi ve total lenfosit sayısındaki düşüşler de eşlik etti. Monoklonal antikör yöntemi ile ölçülen T lenfositler (CD3+) kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüktü ve literatürle uyumlu bulundu (8,12). Bu düşüklük hem T helper (CD4+) hem de T sitotoksik (CD8+) lenfositler için de geçerliydi. T helper/T sitotoksik (CD4/CD8) oranı iki grup arasında anlamlı derecede farklı bulunmadı (Tablo 4). Özellikle T lenfositlerde görülen bu

düşüşler, hastaların kontrol grubuna göre hücrel immünitelerinin ne derece defektli olduğunun gösterilmesi açısından anlamlıydı.

Antitümöral immünitede önemli olan NK hücreleri (CD16+56+) de kontrol grubuna göre azalma göstermekteydi. Bu da literatürdeki bulgularla uyumlu bulundu (31).

Humoral immünitenin araçları olan B lenfositler de (CD19+) bu çalışmada azalmış olarak bulunmuştur. Bu bulgu da, her ne kadar önem derecesi tam olarak ortaya konmamış olsa bile baş-boyun kanseri olan hastalarda humoral immünitenin de bozulduğunu göstermektedir.

Hastalar TNM sınıflamasına göre gruplara ayrılıp değerlendirildiğinde ortaya kısmen değişik sonuçlar çıkmıştır. Hastalar 16 kişiden oluşan erken T evreli (T1-2) ve 14 kişiden oluşan ileri T evreli (T3-4) gruplara ayrılıp periferik kan değerleri karşılaştırıldığında ortaya çıkan sonuçlar şöyledir (Tablo 5):

İleri T evresine sahip hastalar erken T evresine sahip olan hastalara oranla daha düşük seviyede total T lenfosit sayısına sahipti. Bu da tümörün kitlesi arttıkça immüniteyi baskılamasının da artacağı prensibiyle uyum gösteriyordu (1). Buna rağmen T lenfositler T helper ve T sitotoksik olarak ayrı ayrı değerlendirildiğinde her iki grup arasında anlamlı fark bulunmadı. Bu T-helper/T sitotoksik oranı için de geçerliydi. T lenfosit subtiplerinin sonuçları Gonzalez ve arkadaşlarının çalışmasıyla uyumluydu (12). Soysal ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise TNM evrelemesi ile baş-boyun kanserli hastaların periferik kanlarındaki total T lenfosit ve T lenfosit subtipleri arasında ilişki kurulamamıştır (20). Çalışmamızda T lenfosit aktivasyon durumunu gösteren HLA-DR+ lenfosit yüzdesi yönünden iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır. İlerleyen T evresiyle birlikte T lenfositlerin sayısında azalma olmasına rağmen aktivasyonlarında azalma olmamıştır. Bu da ilk bakışta, sadece tümör kitle artışıyla T lenfositlerde nicelik yönünden azalma görülmesine karşın fonksiyonel bozukluğun olmadığını düşündürmektedir. Ancak bu her iki grubun karşılaştırılmasında oluşmayan fark kontrol grubunun da karşılaştırmaya eklenmesiyle ortaya çıkmaktadır (Tablo 7). Bu durumda erken ve ileri T evreli gruplar arasında yine fark olmamasına karşın, ileri T evreli grupta HLA-DR+ lenfositler kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Bu da beklenebileceği gibi ileri T

evresinde T lenfosit fonksiyonlarında bozulmanın ortaya çıkmaya başladığını ve bu fonksiyonel eksikliğin erken evrelerde henüz oluşmadığını göstermektedir.

Bizim çalışmamızda, T evresiyle, periferik kandaki NK hücrelerinin ve B lenfositlerinin miktarı arasında ilişki görülmedi. Ancak NK hücre seviyesi ileri T evreli grupta daha yüksekti. Lökositlerin miktarı ise erken T evreli hastalarda daha yüksek olarak bulundu.

Erken ve ileri T evresine sahip hastalarla kontrol grubu karşılaştırıldığında, total T lenfosit düzeyi ileri T evreli grupta kontrol grubuna göre düşük bulundu (Tablo 7). Erken T evreli grupla kontrol grubu arasında ise total T lenfosit düzeyi yönünden fark yoktu. T helper ve T sitotoksik düzeyi ile T helper/T sitotoksik oranı üç grup arasında farklılık göstermedi.

NK hücre düzeyi, erken T evreli grupta kontrol grubuna göre daha düşük, lökosit düzeyi ise daha yüksek olarak bulundu. B lenfosit seviyesi ise ileri T evreli hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti.

Larenks kanserli hastalarda en önemli prognostik faktörün lenf noduna metastaz varlığı olduğu uzun zamandır bilinmektedir (32). Bu nedenle hastaların analiz sonuçları lenf nodu metastazı yönünden de değerlendirildi. Hastalar boyun lenf nodlarına metastazı olan (N0) ve olmayan (N+) gruplara ayrılıp bunların periferik kanlarının karşılaştırılması yapıldı (Tablo 8). Boyun metastazı olmayan grup (N0) 21 kişiden, boyun metastazına sahip grup (N+) ise 9 kişiden oluşuyordu.

Nodal metastazı olmayan grupta T sitotoksik lenfositlerin sayısı, metastaz olan gruba oranla anlamlı düzeyde yüksek çıktı. Bu da en önemli antitümör hücrelerden olan T sitotoksiklerin önemini göstermektedir. Total T lenfosit, T helper lenfositler ve T helper/T sitotoksik oranı yönünden gruplar arasında fark yoktu. Gonzalez ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise lenf nodu metastazı olan larenks kanserli hastalarda total T lenfosit sayısı azalmış olarak bulunmuş, T lenfosit subtiplerinde ise farklılık gözlenmemişti (12). T sitotoksik hücrelerin kanser immünesindeki görevleri dikkate alındığında bizim bulgularımızın daha beklenen sonuçlar olduğu söylenebilir.

Gruplar arasında NK hücreleri, B lenfositleri ve lökosit seviyesi yönünden anlamlı farka rastlanmadı.

N0 ve N+ grupla, kontrol grubunun periferik kanları 3 grup halinde karşılaştırıldığında ortaya şu sonuçlar çıktı (Tablo 10):

Total T lenfosit miktarı her üç arasında anlamlı fark gösteriyor ancak bu anlamlı farklılık herhangi iki grup arasında belirginlik göstermiyordu. T helper lenfositler yönünden iki grup arasında farka rastlanmadı. Ancak T sitotoksik lenfositler N+ olan grupta kontrol grubuna göre düşüktü. T helper/T sitotoksik oranında ise gruplar arasında farka rastlanmadı.

HLA-DR+ liği hem N0 hem de N+ grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha düşük bulundu.

Hastalar Stage'lerine göre de erken Stage'li (Stage1-2) ve ileri Stage'li (Stage3-4) olarak sınıflandırıldılar (Tablo 11). Erken Stage'li grupta 12, ileri Stage'li grupta ise 18 hasta bulunuyordu.

İleri Stage'li grupta total T lenfosit düzeyi erken Stage'e sahip gruba nazaran anlamlı derecede düşük çıktı. T helper, T sitotoksik ve T helper/T sitotoksik düzeyleri arasında fark saptanmadı. Bu bulgu ilerlemiş hastalığı olan larenks kanserli hastalarındaki T helper seviyesinde azalma bulunan Gonzalez ve arkadaşlarının çalışmasıyla ve uyumlu bulunmadı (12).

İki grup arasında HLA-DR+'liği, NK hücreleri, B lenfositleri ve lökosit seviyesi arasında fark bulunmadı.

Erken ve ileri Stage'li hastalarla kontrol grubunun periferik kan tetkik sonuçları 3 grup şeklinde karşılaştırıldığında şu sonuçlara ulaşıldı (Tablo 13):

İleri Stage'li hastalarda hem total T lenfosit hem de T sitotoksik düzeyi kontrol grubuna göre daha düşüktü. T helper ve T helper/T sitotoksik düzeyi yönünden hasta grupları ve kontrol grubu arasında fark saptanmadı.

HLA-DR+'liği ileri Stage'li grupta daha düşük olmak üzere her iki grupta da kontrol grubuna göre daha düşüktü. Bu da tümörün lokal progresyonunun, rejyonel progresyonuyla (N) birlikte olduğu durumlarda, daha ileri seviyede fonksiyonel immün defekt oluştuğunu göstermektedir.

Çalışmamızın ikinci aşaması ise tümöre infiltre olan immün sistem hücrelerinin analiziydi. Kanserli hastaların çoğunda konağın immün savunma mekanizması aktiftir ve çoğu tümörde görülen lenfosit infiltrasyonu bu mekanizmanın direkt bir kanıtı olarak gösterilebilir (33). Bulgular TIL'in tümör-konak ilişkisini periferik kan lenfositlerinden daha iyi yansıttığını göstermektedir (34). Ancak bunun patofizyolojik önemi henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Tümöre infiltre olan immün hücrelerin oranları periferik kandan farklıdır. T lenfositler tümöre en fazla infiltre olan immün sistem hücreleridir. B lenfositleri, NK hücreleri, lökositler ve diğer hücreler tümör ortamında genellikle daha az bulunmuşlardır (35-37). Antitümöral yanıtın önemli bir komponenti olan NK hücrelerinin tümör dokusuna infiltrasyonunun önemi tartışmalıdır. Bu hücrelerin in vitro olarak tümöre karşı reaktif olmalarına rağmen tümör dokusunda birikme konusundaki yetersizlikleri tümör rejeksiyonunda sanıldığı kadar önemli olmayabileceklerini akla getirmektedir. İnflamatuvar hücre infiltrasyonunun kapsamı konak immün sisteminin tümör hücresinin yüzeyindeki antijenik determinantları MHC ve MHC benzeri moleküller yardımıyla tanınmasına bağlı olabilir.

Meme ve kolon kanserinde lenfosit infiltrasyonunun diğer faktörlerden bağımsız olarak surviyle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (38,39). Bu çalışmalarda infiltre lenfositlerin immünofenotipi ölçülmemiştir. Shimokawara ve arkadaşlarının 1982'de meme kanserli hastalarda yaptıkları araştırmada infiltre T lenfositlerin iyi bir prognostik faktör olduğu görülmüştür (40). Stewart ve arkadaşlarının 1993 yılında yine meme kanserli hastalarda yaptıkları araştırmada ise bunun aksi görülüp, tümör büyümesinin, tümör stromasına infiltre olan hücrelerce stimüle edildiği öne sürülmüştür (41). Bu görüşe göre tümör infiltre eden lenfositler immün sistemi inhibe edici etkiye sahiptirler (42,43).

Tümöre infiltre olan lenfosit ve diğer immün sistem hücrelerinin içeriğinin prognozla ilişkisiyle ilgili yapılan birçok çalışma mevcuttur (44,45). Sarıoğlu ve arkadaşlarının, dil epidermoid kanseri olan hastalarda yaptıkları araştırmada, yaşam süresinin peritümöral

lenfosit infiltrasyonunun yoğunluğu ile orantılı bulunduğu bildirilmiştir (46). Bu gibi tümör infiltrasyonunun önemine dair bulgular sonucu, tümörün ve tümörle sağlam doku sınırındaki lenfosit infiltrasyonunun değerlendirilip buradaki lenfosit sayısının temel alındığı “Tumor Front Grading” denen bir evreleme metodunun kullanıldığı çalışmalar olmuştur (28,32).

Tümör infiltrasyonunun yanı sıra önemli bir faktör de infiltre olmuş hücrelerin aktivasyon düzeyidir. Çalışmalar TIL’in fonksiyonel olarak suprese veya aktive oldukları ve antitümör cevabı oluşturdukları veya engelledikleri konusunda çelişkili sonuçlar vermektedir (47).

Baş-boyun kanserli hastalarda yapılan araştırmalarda tümöre infiltre olan hücre miktarının hastalık ilerledikçe azaldığı gösterilmiştir (21,46,48).

Erken ve ileri T evreli hasta gruplarının tümör dokusuna infiltre olan hücrelerin düzeyi yönünden karşılaştırılması sonucu hiçbir hücre tipi iki grup arasında farklı seviyede bulunmadı (Tablo 6). Bir başka deyişle hiçbir hücre tipinin infiltrasyon derecesi tümörün lokal progresyon derecesiyle değişmiyordu. Her iki grup arasındaki tek anlamlı fark T helper/T sitotoksik oranları arasında görüldü.

Benzer sonuçlar N0 ve N+ hastaların tümör dokusunun analizi sonucunda da görüldü (Tablo 9). Rejyonel hastalığın varlığı ile hücrelerin infiltrasyon derecesi arasında bağlantı bulunmadı. Tek anlamlı bulgu ise nodal metastazı olan grupta T helper/T sitotoksik oranının anlamlı derecede yüksek bulunmasıydı.

Erken ve ileri Stage’e sahip hasta grupları arasında da dokuya infiltre olan hücrelerde çalışılan parametrelerin hiçbiri arasında fark gözlemlenmedi (Tablo 12). Yani çalışmamızda değerlendirilen T evresi, lenf nodu metastazı ve stage faktörlerinden hiçbiri tümöre infiltre olan hücre kompozisyonuna etkili bulunmadı. Daha önce tartışılan periferik kan sonuçlarında gruplar arasında saptanan (erken-ileri T, N0-N+, erken-ileri S) farklara rağmen aynı sonuçların hastaların tümör dokusunda ortaya çıkmaması, tümör dokusunda gelişen immünolojik reaksiyonun periferik kan tarafından yeterince yansıtılmadığını düşündürmektedir. Diğer bir olası cevap ise hasta sayısının yeterli olmaması olabilir.

Çalışmamızda ayrıca, hastaların periferik kanlarındaki analiz sonuçlarının, yine kendi tümör doku analizi sonuçlarıyla korelasyon gösterip göstermediği araştırıldı. Sadece NK hücrelerinin değerleri periferik kan ve doku arasında pozitif korelasyon gösteriyordu. Diğer parametrelerden hiçbirinde pozitif veya negatif korelasyon bulunamadı.

Bu tez çalışmasında akım sitometrisi yöntemiyle larenks kanserli hastaların periferik kan ve dokusunda immün sistemin başlıca hücreleri ve onların aktivasyon durumları incelenmesi amaçlanmıştır. Daha önce renal hücreli karsinom, glioma gibi tümörlerin immün hücrelerce infiltrasyonunu değerlendirmede kullanılan akım sitometrisi yöntemi (26,49) ilk kez bu amaçla larenks kanserli hastalarda kullanıldı.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Larenks kanserli hastaların periferik kanlarında total T lenfosit, T helper, T sitotoksik, B lenfosit ve HLA-DR+ lenfosit yüzdesi düşük, lökosit düzeyi yüksek olarak bulundu.
2. Erken T evresine sahip hastaların periferik kanlarında, ileri T evreli hastalara göre total T lenfosit ve lökosit miktarı yüksekti.
3. İleri T evreli hastaların tümörlerinde T helper/T sitotoksik oranı daha düşük bulundu.
4. Lenf nodu metastazı olmayan grupta (N0), metastaz olan gruba (N+) nazaran periferik kanda T sitotoksik düzeyi daha yüksekti.
5. Lenf nodu metastazı olan grubun tümör dokusunda T helper/T sitotoksik oranı daha yüksekti.
6. Erken Stage'e sahip hastaların periferik kanlarında total T lenfosit ve lökosit seviyesi, ileri Stage'e sahip hastalara nazaran yüksekti.
7. Tümöre infiltrate hücrelerin dağılım oranlarının;T evresi, lenf nodu metastazı ve tümör stage'inden etkilenmediği saptandı..
8. Periferik kandaki NK hücre seviyesi ile tümör dokusuna infiltrate olan miktarı korelasyon gösterdi.
9. Akım sitometri yöntemi, larenks tümörlerine infiltrate olan immün hücre tiplerinin değerlendirilmesinde ilk kez kullanıldı.

ÖZET

LARENKS KANSERLİ HASTALARDA PERİFERİK KAN VE İNTRATÜMÖRAL T-LENFOSİTLERİNİN AKIM SİTOMETRİSİ İLE ANALİZİ

Tümörlere karşı vücudun yanıt gösterdiğinin ortaya çıkmasından beri tümör immünolojisinde önemli gelişmeler olmuştur. Bu ilerlemeler, immunoterapinin gelecekte kanserli hastalarının tedavi protokollerinin önemli bir parçası olacağına vaad etmektedir.

Tümörlere karşı immünolojik tedavinin geliştirilmesinden önce elbette tümörle organizma arasındaki ilişkinin tam olarak anlaşılması gerekmektedir. Yapılan çalışmalar tümöre karşı vücudun savunmasında görevli en önemli hücrenin T lenfositleri olduğunu göstermiştir. Bu hücreler başta IL-2 olmak üzere, salgıladıkları lenfokinlerle diğer T lenfositlerini ve diğer immün hücreleri aktive ederek tümöre karşı yanıt oluştururlar. Araştırmaların önemli bir kısmını, bu hücrelerin periferik kan ve tümör dokusundaki görevlerinin ortaya konması oluşturmaktadır.

Bu çalışmamızda akım sitometrisi yöntemiyle, larenks kanserli hastaların periferik kan ve tümör dokularındaki antitümör yanıt açısından önemli hücreler incelendi. Çalışmanın amacı, larenks kanserli hastaların periferik kan ve tümörlerindeki immün durumun ortaya konulmasının yanı sıra, birim zamanda fazla sayıda hücrenin incelenmesine olanak sağladığından istatistiki güvenilirliği yüksek olan akım sitometrisi yönteminin, larenks kanserinde ilk kez doku incelenmesinde kullanılmasıydı.

Çalışmamızda larenks kanseri tanısı konmuş hastaların periferik kanlarında ve tümör dokularındaki immünolojik supresyon hücre seviyesinde gösterildi. Hastalar Tümör (T), Nodal metastaz (N) ve Stage evrelerine gruplara ayrılarak bulgular karşılaştırıldı. Periferik kan ve doku analizlerinin sonuçları arasında korelasyon araştırıldı. Larenks kanserli hastaların periferik kanlarında total T lenfosit, T helper, T sitotoksik, B lenfosit ve aktive lenfositleri gösteren HLA-DR+ lenfosit yüzdesi kontrol grubuna göre düşük bulundu. Erken T evreli (T1-2) hastaların periferik kanlarında ileri T evreli (T3-4) gruba göre total T lenfosit ve lökosit miktarı yüksek olarak bulundu. Lenf nodu metastazı olmayan grupta periferik kan T sitotoksik düzeyi, lenf nodu metastazı olan gruba nazaran daha yüksekti. Erken Stage'li hastaların periferik kanlarında total T lenfosit seviyesi ileri Stage'li hastalara nazaran daha yüksek olarak bulundu. Tümöre infiltre olan hücre oranlarının T evresi, lenf nodu metastazı ve tümör stage'inden etkilenmediği saptandı. Periferik kan ile tümöre infiltre olan hücreler arasında korelasyon araştırıldığında sadece Natural Killer hücrelerinin periferik kan düzeyleri tümöre infiltre olan hücre düzeyleri ile korelasyon gösterdi.

İNGİLİZCE ÖZET

FLOW-CYTOMETRIC ANALYSIS OF T-LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD AND TUMOR TISSUE IN LARYNGEAL CANCER PATIENTS

There have been great improvements in tumor immunology since it has been shown that the body has a response against tumors. These advances promise that immunotherapy will possibly be a part of the treatment protocols of patients with cancer .

Before developing any kind of immunotherapy against tumors, understanding the relationship between tumors and the organism is mandatory. The studies have shown that T lymphocytes are the primary defensive cells of the body against tumor tissue. These cells activate other T lymphocytes and other immun cells by secreting lenfokines such as IL-2 and initiate the antitumor response. Most of the studies that have been reported depend on the function of these cells in peripheral blood and tumor tissue.

In this study, we have evaluated the local and systemic antitumoral response in laryngeal cancer patients. The aims of the study were to establish the immun sytem of laryngeal cancer patients as well as to use flow-cytometry first time in detecting tumor infiltrating cells in laryngeal cancer, a technique that allows high statistical relevance by detecting high number of cells in a unit of time.

The supression in the blood of laryngeal cancer patients were demonstrated in cell basis. The patients were grouped and the results were discussed according to their Tumor (T) stage, Nodal status (N) and Stage. The correlation between the results of peripheral blood and tumor microenvironment were also analyzed. In the peripheral blood of laryngeal cancer patients; the percentage of total T lymphocyte, T helper , T cytotoxic, B lymphocyte and activated T lymphocyte marker HLA-DR+ cells were found lower than the control group. Total T lymphocyte and leucocyte levels were higher in the early T (T1-2) group than the late T (T3-4) group. The group that did not show lymph node metastases had higher T cytotoxic levels than the group with lymph node metastases.. Early Stage group had higher levels of total T lymphocyte levels. The composition of tumor infiltrating cells were not influenced by T stage, nodal status and S stage of the tumor. Only Natural Killer cell levels have found to be correlated between the peripheral blood and tumor tissue.

KAYNAKLAR

1. Roitt I, Brostoff J, Male D: Immunology. Mosby, Barcelona , 1996, pp 20.1-20.11.
2. Tokgöz G: Klinik İmmünoloji. Antıp AŞ, Ankara, 1997 s. 189-199.
3. Vaquero J, Coca S, Magallon R, Ponton P, Martinez R: Immunohistochemical study of natural killer cells in tumor-infiltrating lymphocytes of primary intracranial germinomas. Journal of Neurosurgery, 72: 619-625, 1990.
4. Ballenger JJ, Snow JB: Otorinolaringoloji Baş ve Boyun Cerrahisi. Onbeşinci edisyon. Nobel Tıp Kitabevi, 2000, pp. 587-590.
5. Myers EN, Suen JY: Cancer of the head and neck. Third ed. WB. Saunders Co. Philadelphia, 1996, pp. 381-387.
6. Yılmaz MT, Deniz G: Flow Cytometry ve Tıpta Kullanımı. İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul, 1997, s. 1-9.
7. Makimoto K, Tamada A, Kishimoto S, Kanoh N, Hoshino T: Observations on Immunologic Parameters in Laryngeal Cancer Patients. Archives of Otorhinolaryngology, 238: 241-250, 1983.
8. Huang AT, Mold NG, Fisher SR, Brantley BA, Cole TB, Wallman MJ, Crocker IA: A prospective study of squamous head and neck carcinoma. Immunologic aberrations in patients who develop recurrent disease. Cancer, 59: 1721-1726, 1987.
9. Dawson DE, Everts EC, Vetto RM, Burger DR: Assessment of immunocompetent cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma. Annals of Otology Rhinology and Laryngology, 94(4 Pt 1):342-5, 1985.

10. Wanebo HJ, Jun MY, Strong EW, Oettgen H: T-cell deficiency in patients with squamous cell cancer of the head and neck. *American Journal of Surgery*, 130(4):445-451, 1975.
11. Gray WC, Chretien PB, Suter CM, Blanchard CL, Goldstein AL, Chretien PB: Effects of radiation therapy on T-lymphocyte subpopulations in patients with head and neck cancer. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 93(5):650-60, 1985.
12. Gonzalez FM, Vargas JA, JC Gea-Banacloche, Garcia JR, Berrocal E, Gorriz C, Durantez A: Functional and Phenotypic Analysis of T-lymphocytes in Laryngeal Carcinoma. *Acta Oto-Laryngologica*, 114: 663-668, 1994.
13. Wolf GT, Hudson JL, Peterson KA, Miller HL, Mc-Clatchey KD: Lymphocyte subpopulations infiltrating squamous carcinomas of the head and neck: Correlations with extent of tumor and prognosis. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 95: 142-152, 1986.
14. Wolf GT, Schmaltz S, Hudson J, Robson H, Stackhouse T, Peterson KA, Poore JA, Mc-Clatchey KD : Alterations in T-lymphocyte subpopulations in patients with head and neck cancer. Correlations with prognosis. *Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 113: 1200-1206, 1987.
15. Schantz SP, Clayman G, Racz T, Grimm EA, Liu FJ, Lavedan P, Taylor D, Pellegrino C, Savage H: The in vivo biologic effect of interleukin 2 and interferon alfa on natural immunity in patients with head and neck cancer. *Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 116(11):1302-8, 1990.
16. Heimdal JH, Aarstad HJ, Klementsens B, Olofsson J: Disease stage related in vitro responsiveness of peripheral blood T-lymphocytes in patients with head and neck carcinoma. *Acta Oto-Laryngologica*, 118: 887-891, 1998.
17. Cortesina G, De Stefani A, Giovarelli M, Barioglio MG, Cavallo GP, Jemma C, Forni G: Treatment of recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck with low doses of interleukin-2 injected perilymphatically. *Cancer*, 15;62(12):2482-2485, 1988.
18. Rivoltini L, Gambacorti-Passerini C, Squadrelli-Saraceno M, Grosso MI, Cantu G, Molinari R, Orazi A, Parmiani G: In vivo interleukin 2-induced activation of lymphokine-activated killer cells and tumor cytotoxic T-cells in cervical lymph nodes of patients with head and neck tumors. *Cancer Research* 1;50(17):5551-5557, 1990.

19. Li D, Jiang W, Bishop JS, Ralston R, O'Malley BW Jr: Combination surgery and nonviral interleukin 2 gene therapy for head and neck cancer. *Clinical Cancer Research*, 5(6):1551-1556, 1999.
20. Soysal V, Yiğitbaşı G, Alper M, Patıroğlu T, Güney E: Total lymphocyte and T lymphocyte subpopulation levels in head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 17(2):207-212, 1998.
21. Synderman CH, Snyderman CH, Heo DS, Chen K, Whiteside TL, Johnson JT: T-cell markers in tumor-infiltrating lymphocytes of head and neck cancer. *Head Neck*, 11(4):331-336, 1989.
22. Wustrow TP, Kabelitz D: Interleukin-2 release from lymphocytes of patients with head and neck cancer. *Annals of Otology Rhinology and Laryngology*, 98(3):179-184, 1989.
23. Melioli G, Margarino G, Scala M, Mereu P, Bertoglio S, Schenone G, Barbaresi M, Machi AM, Santi L, Badellino F, Moretta L: Perilymphatic injections of recombinant interleukin-2 (rIL-2) partially correct the immunologic defects in patients with advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*, 102(5):572-578, 1992.
24. Eskinazi DP, Perna JJ, Ershow AG, Mihail RC: Depressed PMNC blastogenic response in patients with cancer of the head and neck: a study of IL-2 production, IL-2 consumption, and IL-2 receptor expression. *Laryngoscope*, 99(2):151-157, 1989.
25. Garcia CF, Weiss LM, Lowder J, Komoroske C, Link MP, Levy R, Warnke RA: Quantitation and estimation of lymphocyte subsets in tissue sections. Comparison with flow cytometry. *American Journal of Clinical Pathology*, 87(4):470-477, 1987
26. Badie B, Schartner JM: Flow cytometric characterization of tumor-associated macrophages in experimental gliomas. *Neurosurgery*, 46(4):957-961, 2000.
27. Kuchnio M, Sausville EA, Jaffe ES, Greiner T, Foss FM, McClanahan J, Fukushima P, Stetler-Stevenson MA: Flow cytometric detection of neoplastic T cells in patients with mycosis fungoides based on levels of T-cell receptor expression. *American Journal of Clinical Pathology*, 102(6):856-860, 1994.
28. Gabriel A, Namyłowski G, Ziolkowski A, Morawski K, Steplewska-Mazur K, Urbaniec P: Immunohistochemical analysis of lymphocytic infiltration in the tumor

microenvironment in patients operated on for laryngeal cancer. *European Archives of Otorhinolaryngology*, 256: 384-387, 1999.

29. Tisch M, Heimlich F, Daniel V, Opelz G, Maier H: Cellular immune defect caused by postsurgical radiation therapy in patients with head and neck cancer. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 119(4):412-7, 1998.
30. Dietz A, Heimlich F, Daniel V, Polarz H, Weidauer H, Maier H: Immunomodulating effects of surgical intervention in tumors of the head and neck. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 123(1 Pt 1):132-9, 2000. cells in patients
31. Wolf GT, Amendola BE, Diaz R, Lovett III EJ, Hammerschmidt RM, Peterson KA: Definite vs Adjuvant Radiotherapy; Comparative Effects on Lymphocyte Subpopulations in Patients With Head and Neck Squamous Carcinoma. *Archives of Otorhinolaryngology*, 111: 716-726, 1985.
32. Welkoborsky HJ, Hinni M, Dienes HP, Mann WJ: Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading, and proliferation markers. *Annals of Otology Rhinology and Laryngology*, 104(7):503-510, 1995.
33. Stavropoulos NE, Ioachim E, Pavlidis N, Pappa L, Kalomiris P, Agnantis NJ. Local immune response after intravesical interferon gamma in superficial bladder cancer. *British Journal of Urology*, 81(6):875-879, 1998.
34. Holmes EC: Immunology of tumor infiltrating lymphocytes. *Annals of Surgery*, 201(2):158-163, 1985.
35. Balch CM, Riley LB, Bae YJ, Salmeron MA, Platsoucas CD, von Eschenbach A, Itoh K: Patterns of human tumor-infiltrating lymphocytes in 120 human cancers. *Archives of Surgery*, 125(2):200-205, 1990.
36. Rabin BS, Johnson J, Claassen D: Identification of subsets of lymphocytes infiltrating head and neck tumor tissue: a preliminary report. *Laryngoscope*, 94(5 Pt 1):688-690, 1984.
37. Ritchie AW, James K, Micklem HS, Chisholm GD: Lymphocyte subsets in renal carcinoma--a sequential study using monoclonal antibodies. *British Journal of Urology*, 56(2):140-148, 1984.

38. Kubota Y, Petras RE, Easley KA, Bauer TW, Tubbs RR, Fazio VW: Ki-67-determined growth fraction versus standard staging and grading parameters in colorectal carcinoma. A multivariate analysis. *Cancer*, 70(11):2602-2609, 1992.
39. Marques LA, Franco EL, Torloni H, Brentani MM, da Silva-Neto JB, Brentani RR: Independent prognostic value of laminin receptor expression in breast cancer survival. *Cancer Research*, 50(5):1479-1483, 1990.
40. Shimokawara I, Imamura M, Yamanaka N, Ishii Y, Kikuchi K: Identification of lymphocyte subpopulations in human breast cancer tissue and its significance: an immunoperoxidase study with anti-human T- and B-cell sera. *Cancer*, 1;49(7):1456-1464, 1982.
41. Stewart TH, Tsai SC: The possible role of stromal cell stimulation in worsening the prognosis of a subset of patients with breast cancer. *Clinical and Experimental Metastasis*, 11(4):295-305, 1993.
42. Fulton AM: Interactions of natural effector cells and prostaglandins in the control of metastasis. *Journal of the National Cancer Institute*, 78(4):735-741, 1987.
43. Vose BM, Bonnard GD: Human tumour antigens defined by cytotoxicity and proliferative responses of cultured lymphoid cells. *Nature*, 25;296(5855):359-361, 1982.
44. Busam KJ, Antonescu CR, Marghoob AA, Nehal KS, Sachs DL, Shia J, Berwick M: Histologic classification of tumor-infiltrating lymphocytes in primary cutaneous malignant melanoma. A study of interobserver agreement. *American Journal of Clinical Pathology*, 115(6):856-860, 2001.
45. Takanami I, Takeuchi K, Giga M: The prognostic value of natural killer cell infiltration in resected pulmonary adenocarcinoma. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 121(6):1058-1063, 2001.
46. Sarıoğlu T, Yılmaz T, Sungur A, Gürsel B: The effect of lymphocytic infiltration on clinical survival in cancer of the tongue. *European Archives of Otorhinolaryngology*, 251(6):366-369, 1994.

47. Pisani RJ, Krco CJ, Wold LE, McKean DJ: Lymphokine-activated killer (LAK) cell activity in tumor-infiltrating lymphocytes from non-small cell lung cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, 92(4):435-446, 1989.
48. Hiratsuka H, Imamura M, Ishii Y, Kohama G, Kikuchi K: Immunohistologic detection of lymphocyte subpopulations infiltrating in human oral cancer with special reference to its clinical significance. *Cancer*, 1;53(11):2456-2466, 1984.
49. Kowalczyk D, Skorupski W, Kwias Z, Nowak J: Flow cytometric analysis of tumour-infiltrating lymphocytes in patients with renal cell carcinoma. *British Journal of Urology*, 80(4):543-547, 1997.