

Beta-glukan Kanserli hastalarda

bağışıklık sistemini uyarıyor mu?

Prof. Dr. Gökhan DEMİR¹, H. O. KLEIN²,
Nil Mandel - MOLINAS³, N. TÜZÜNER⁴

1 İstanbul Bilim Üniv. Tıbbi Onkoloji BD

2 Köln Üniv. Hemato-Onkoloji Böl. - Almanya

3 İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Tıp Fak. Medikal Onkoloji Böl.

4 İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Tıp Fak. Patoloji Böl.

e-posta: ogdemir@tnn.net

Özet

Amaç: Glukanlar, mantar hücre duvarının yapısal bir komponenti olan glikoz polimerleridir. Monosit/makrofajları aktive ederek doğal bağışıklığı stimüle edebilirler. İnsanlar üzerinde yürütülen çalışmalarla beta glukan'ın immünomodülatör bir etkisi olduğu ve kanser hastalarında biyolojik terapilerin etkinliğini arttırabildiği gösterilmiştir. Bu prospektif karakterdeki klinik çalışmada, ilerlemiş meme kanseri hastalarında kısa süreli oral beta glukan tatbikinin periferik kan monositleri ve bunların aktivasyon markörlerinin ekspresyonu üzerinde gözlenen *in vivo* etkileri araştırıldı.

Yöntemler: Çalışma, 23 ilerlemiş meme kanseri hastası üzerinde gerçekleştirildi. Hastaların median yaş değeri 52 idi. Median yaş değeri 48 olan 16 sağlıklı kadın, ilk kan örneklerinin karşılaştırılmasında kontrol grubu olarak kullanıldı. Periferik kan örnekleri sıfıncı günde alındı ve hastalara oral 1-3, 1-6 beta D glukan günlük olarak verilmeye başlandı. 15. günde yeniden kan örnekleri alındı. İlk örneklerde ortalama lenfosit değeri meme kanseri görülen hastalarda anlamlı derecede düşük çıkmıştı ($1281 \pm 306/\text{mm}^3$ 'e $1930 \pm 573/\text{mm}^3$, $p=0.04$). Meme kanseri hastalarında, ortalama monosit değeri başlangıçta $326 \pm 124/\text{mm}^3$ olmasına karşın, 15.günde ($p=0.015$) $496 \pm 194/\text{mm}^3$ 'e yükselmişti. CD14 monositlerde CD95 (Apo1/Fas) ekspresyonu ilk ölçümde 48.17% iken, 15.günde 69.23%'e çıkmıştı ($p=0.002$). CD14 pozitif monositlerde CD45RA ekspresyonu ilk örneklerde 49.9% olmasına karşın, 15.günde anlamlı ölçüde artış sergileyerek 61.52% olmuştu ($p=0.001$).

Sonuç: İlerlemiş meme kanseri görülen hastalarda oral beta glukan, *in vivo* şartlarda periferik kan monositlerini stimüle ve aktive edici etkiye sahip gözükmektedir.

1. Giriş

Glukanlar, fungal ve bakteriyel hücre duvarının yapıtaşlarından birisidir(1). Bilhassa Japonya'da kanser hastaları üzerinde denenmiş ve son derece iyi tanınan biyolojik yanıt modifikatörleri olmalarına karşın, çalışmaların çoğunda klinik yanıtlar öngörülebilir bir karakter sergilememiştir(2). Beta glukanların anti-infektif ve anti-tümörojenik etkileri, fagositik aktivitelerini arttı-rarak lökositleri aktive edebilme yetenekleri ve TNF-alfa gibi inflamatuvar sitokinleri sentezleyebilmelerinden kaynaklanır(3). Bakteriyel ya da fungal ürünler immün yanıtı çoğunlukta lökositlerin üzerindeki lektin reseptörleri (mannoz reseptörü, Dektin-1), Scavenger(avcı) reseptörleri, ya da Toll-benzeri reseptörler gibi doğal immün reseptörlere bağlanarak başlatabilirler(4).

Yakın bir zamanda, Brown ve ark., Beta glukan'ın biyolojik etki amacıyla hücre yüzeyindeki Dektin-1 reseptörleri ile etkileşime girdiğini gösterdiler. Dektin-1 reseptörleri esas olarak makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler, ve bir T-lenfosit alt grubunda eksprese edilirler(5). Underhill ve çalışma arkadaşları bir makrofaj alt-grubunda Dektin-1 reseptörlerinin beta glukan tarafından aktive edilmesiyle, Syk tirozin kinaz tarafından intraselüler sinyalizasyon yolağı meydana geldiğini ortaya çıkardılar (4). Beta glukan'ın immün etkileri açısından önemli olan bir başka mekanizma ise komplement-bağımlı sitotoksikite'nin (CDC) regülasyonudur. İn vitro çalışmalar beta glukan'ın komplement reseptör tip 3 (CR3)-bağımlı fagositoz ve degranülasyon aracılığıyla önemli bir rol oynadığına işaret etmektedir. Beta glukan, dolaşımdaki lökositlerin CR3 alt-ünitesinin CD11b kısmının lektin birimine bağlanır ve bunun sonucunda reseptör, iC3b-kaplı hücrelere yanıt olarak sitotoksik degranülasyonu tetiklemeye hazır hale getirilmiş olur. Tümör hücreleri üzerindeki C3 birikiminin, esas olarak anti tümör antikörleri tarafından regüle edildiği bilinmektedir(6,7). Beta glukan'ın bu son derece ilginç etkisi; rituximab (B-cell NHL için anti CD20 MoAb), trastuzumab (Her-2 pozitif meme kanseri için anti-Her2) ve cetuximab (kolorektal kanser için anti EGFR) gibi monoklonal antikör-bazlı kanser terapilerinin klinik etkilerini yükseltmek için kullanılabilir. Modak ve ark., rituximab terapisinin etkinliğinin, CD20-pozitif lenfoma ksenogreftli farelerde oral beta glukan ile birlikte tatbik edilmesiyle arttırılabileceğini gösterdiler(8). İnsanlarda oral beta glukan uygulamalarına dair fazla klinik veri olmamasına karşın, şimdiki kadar bildirilmiş ciddi bir toksikasyon olgusu da bulunmamaktadır.

Monositler/makrofajlar doğal bağışıklığın başlıca unsurlarıdır ve doğal savunma mekanizmasının ilk aşamasını oluştururlar. Beta glukan; makrofajları, nötrofilleri, ve NK hücrelerini stimüle edebilir. Bazı verilere göre beta glukan, T-hücrelerine spesifik yanıtları; makrofaj, nötrofil, ve NK hücrelerinden IFN-gamma, IL-6, IL-8, ve IL-12 gibi sitokinleri indükleyerek stimüle edebilir (1,3). Makrofaj aktivasyonu ile ilgili bazı yüzey molekülleri tanımlanmıştır. Fas/PO-1 (CD95), apoptotik sinyalleri hücrelere taşıyarak hücre ölümü indüksiyonu aracılığıyla immün yanıtları regüle edebilen bir hücre yüzey molekülüdür. Aktive immün hücreler hem Fas hem de Fas-L ekspresyonu sergiler(9). Peritoneal makrofajlar üzerindeki Fas molekülünün çeşitli sitokinler yoluyla upregüle edildiği gösterilmiştir, ayrıca CD4-pozitif yardımcı lenfositlerin makrofajları, antijen sunumunu takiben Fas-aracılı bir yolakla öldürmesi de ilginç bir mekanizmadır (10).

İnsanlarda, naïve T hücreleri, CD45 olarak adlandırılan ve ekson yapılı bir A tarafından kodlanan bir segment taşıyan yüzey molekülünün 200-kD izoformunu eksprese ederler. Bu CD45 izoformu CD45RA olarak tanımlanmıştır. Bu molekül ayrıca monositlerde de eksprese edilir ve bir aktivasyon markörü olarak bilinir(11). CD4 lenfositler için önemli bir hücre yüzey molekülüdür ve T-lenfositlerin fonksiyonunu bir yardımcı/indükleyici olarak regüle eder. CD4'ün antijen sunumunda da görevi vardır ve ayrıca dendritik hücrelerce de eksprese edilir. CD4 moleküllerinin monositler üzerindeki rolü henüz tam aydınlatılmamıştır ancak bu molekülün GM-CSF uygulaması aracılığıyla upregülasyonu(fazlaşması), CD4'ün monosit aktivasyonunda bir fonksiyonu olabileceğine işaret eder (12,13). Bu prospektif klinik çalışmada, ilerlemiş meme kanseri görülen hastalarda kısa süreli oral beta glukan uygulamasının periferik kan monositleri ve onların yüzey markörleri üzerine *in vivo* etkilerini araştırmayı amaçladık.

2.Hastalar ve Yöntemler

Yazılı bilgi onamlarının alınmasının ardından yeni tanı konulan ya da nüks eden metastatik meme kanseri görülen 23 kadın hasta çalışmamıza dahil edildi. Tüm hastaların hastalıkları histolojik olarak doğrulandı. 15 hastada invazif duktal karsinoma, 8 hasta da ise invazif lobular karsinoma mevcuttu. 17 hastada ise östrojen reseptörü (ER) ve progesterone reseptörü (PR) pozitif tümör vardı. 5 hastada Her-2 (c Erb-B2) aruşı tespit edilmişti. 10 hastaya daha önce meme kanser cerrahisine bağlı adjuvant

tedavisi (antrasiklin-bazlı) ve meme radyo-terapisi uygulanmıştı. 7 hasta, metastaz tanısına bağlı olarak hala oral tamoxifen terapisi alıyordu. Daha önce adjuvant kemoterapisi görmüş hastalarda, ilaçsız geçen dönem 2 yıldan fazlaydı. Hastalar oral beta gluklan uygulaması süresince (2 hafta) herhangi bir kanser ilacı (kemoterapi, radyoterapi, monoklonal antikor ya da hormonal ajan) kullanmadılar. Hastaların median yaşı 52 idi (aralık: 30-68 yıl). 48 median yaşına sahip 16 sağlıklı kadın (aralık 32-60 yıl), ilk kan örneklerinin ve monosit sitometrisinin mukayesesi için kontrol grubu olarak görev yaptı.

Hastaların ve sağlıklı kontrol bireylerinin başlangıç değerleri tespit edilmek üzere periferik kan örnekleri sabah erkenden sıfıncı günde alındı. Aynı gün, meme kanseri olan hastalara *Saccharomyces cerevisiae*'dan derivate edilmiş solübl 1-3, 1-6, D-Beta gluklan, 2x10mg'lik kapsül halinde günlük olarak oral yoldan yemekten önce sabah erkenden verilmeye başlandı. 14 günlük bir tedavi sürecinin ardından 15. gün yeniden sabah erkenden kan örnekleri alındı ve analiz edildi. Belirtildiği üzere, tüm örnekler sitometrik analiz için hazırlandı. Önce kan sayımı yapıldı ve kan

örnekleri flow sitometrik analiz için hazır hale getirildi.

2.1.Flow Sitometri

100 µl tam kan örneği FACS tüplerine pipetle aktarıldı ve üzerine 10 µl monoklonal antikor ilave edildi. Örnekler 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. Ardından, fikse ve lize etmek için *TQ-Prep Workstation ve ImmunoPrep Reagent System* (Beckman-Coulter, USA) kullanıldı ve sonra ayrıca bir yıkama tatbik edilmedi. Örnekler hemen değerlendirildi. İzotipi uyan negatif kontroller ayrı protokollere göre hazırlandı ve kullanıldı.

2.2 Monositler

Monositler için test alanları (monosit-alanı), FS ve SS histogramlarında oluşturuldu. CD45/CD14 çifte boyama yöntemiyle monosit-alanının saflığı test edildi ve yalnızca meydana getirilen alandaki hücrelerin CD14 ve CD45 için %95 üzeri pozitif çifte boyama sergilemeleri halinde o alanın geçerliliği kabul edildi. Monositler üzerindeki CD4, CD45RA, CD95 (Apo1/Fas) ekspresyonu, aynı zamanda yukarıda belirtilen monosit-alanı açısından CD14 için çifte boyama uygulanan hücreler üzerinde sayıldı (CD45, CD14,

CD45RA, CD95, CD4 ve CD14 boyamalarında Dako®, Denmark antikoları ve uygun izotipte negatif kontroller kullanıldı). Sayılan hücre gruplarının yüzdeleri mutlak hücre sayıları üzerinden hesaplandı. İstatistiksel analiz için *paired t-test* kullanıldı ve $p < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

3.Sonuçlar

Sonuçlar Tablo 1'de özetlenmiştir. Kontrol grubu ile meme kanseri hastalarının başlangıçtaki lökosit, eritrosit ve trombosit mutlak sayıları arasında anlamlı bir farklılık mevcut değildi. Başlangıçtaki lenfosit sayısı meme kanseri hastalarında, kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşüktü ($1281 \pm 306 / \text{mm}^3$ 'ye karşı $1930 \pm 573 / \text{mm}^3$ $p=0.04$). Bazal flow sitometri analizinde, hastaların monositlerindeki CD95 (Fas, Apo-1) ekspresyonu ile kontrol grubununükiler arasında anlamlı bir fark gözlemlendi. CD14 pozitif hücrelerde CD95 ekspresyonu (Fas, Apo-1), başlangıçta alınan kan örnekleri açısından hasta grubunda, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde yüksekti ($48.17 \pm 17.83\%$ 'ye karşı $13.89 \pm 6.36\%$, $p=0.001$). Diğer yandan, CD14 pozitif monositlerde CD45RA ve CD4 ekspresyonu, başlangıç değerleri açısından

Tablo 1. Sağlıklı kontrollerin ve meme kanseri hastaların kan parametreleri ve flow sitometri sonuçları

Hücre tip/markör	Sağlıklı controller	P*	Meme kanseri hastalar		
			Başlangıç	15.gün	P**
WBC /mm ³	6130±1356	NS	4777±1920	4947±1701	NS
Lenfosit/mm ³	1930±573	0.4	1281±306	1173±204	NS
Trombosit/mm ³	218.000±55.000	NS	235.190±54.611	223.187±48.512	NS
Hematokrit %	38±3.7	NS	34.5±4.2	35.3±2.7	NS
Monosit/mm ³	350±158	NS	326±124	496±194	0.015
CD14/CD95 %	13.89±6.36	0.001	48.17±17.83	69.23±24.53	0.002
CD14/CD45RA %	48.2±7.3	NS	49.92±21.78	61.52±15.15	0.001
CD14/CD4 %	21.46±13.56	NS	31.09±22.96	37.17±16.28	NS

* Sağlıklı controller ve meme kanseri hastalarının başlangıç değerlerinin karşılaştırması

** Meme kanseri hastalarının başlangıçtaki ve 15. Gündeki değerlerinin karşılaştırılması

NS: Anlamlı olmayan değer

sağlıklı kontrollerle hastalar arasında anlamlı bir farklılık sergilemiyordu (Tablo 1).

Beta gluklan verilmesinin ardından 14 gün sonra hastalarda ortalama lökosit değeri anlamlı bir değişiklik sergilemedi. Ayrıca, beta gluklan uygulanması sırasında lenfosit, trombosit, ve hematokrit değerlerinde de anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (Tablo 1). Ancak, başlangıçta $326 \pm 124/\text{mm}^3$ olan ortalama monosit değeri, 15. Gün $496 \pm 194/\text{mm}^3$ 'e yükselmişti ($p=0.015$). İlâveten, monosit yüzdesi de 14 günlük bir beta gluklan terapisinin ardından %7.4'den %12'ye çıkmıştı ($p=0.003$). Başlangıçta oranı %48.17 olan CD14-pozitif monositler üzerindeki CD95(Apo1/Fas) ekspresyonu, 15.günde %69.23'e yükselmişti ($p=0.002$). Benzer şekilde, başlangıçta CD14-pozitif monositlerde %49.9 olan CD45RA ekspresyon oranı, anlamlı bir artış göstererek 15.günde %61.52'ye ulaşmıştı. Diğer yandan, CD14-pozitif monositler üzerinde CD4 ekspresyonu 15. günde biraz artış göstermiş ancak bu yükselme anlamlı bir miktarda olmamıştı. Hastalara beta gluklan tatbiki sürecinde herhangi bir yan etki kaydedilmemiştir.

4. Tartışma

Sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında ilerlemiş meme kanseri görülen hastalarımızda gözlenen düşük lenfosit değerlerinin nedeni tartışmaya açıktır. 10 hasta daha önce kemoterapi ya da radyoterapi şeklinde kanser tedavisi görmüşü ancak kemoterapi ve radyoterapinin uzun vadede ortaya çıkardığı lenfopenik etkiler tam olarak bilinmemektedir. 7 hasta çalışmaya dahil olana kadar hala tamoksifen kullanmaktaydı ancak tamoksifen'in de lenfopenik etkisi olup olmadığına dair bir bilgi mevcut değildir. Meme kanseri hastalarında görülen lenfopeni'ye, kanserin meydana getir-

diği bir immüno-supresyon'un neden olabileceği de bilinen bir fenomendir. Bu bulgu üzerinde daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızdaki ilginç sonuçlardan birisi de, kanser hastaları ile kontrol grubu arasında mutlak monosit miktarı açısından bir farklılık olmamasına karşın, stimülasyona maruz kalmamış meme kanseri hastalarının monositlerindeki anlamlı derecede yüksek CD95 (Fas/Apo-1) ekspresyonuydu (Tablo 1). Fas/APO-1 (CD95), apoptotik sinyalleri hücrelere ileterek hücre ölümünü indükte etmek suretiyle immün yanıtları regüle eden, TNF-R üst-ailesine mensup bir prototipik hücre ölümü reseptörüdür. Ancak yakın zaman önce Fas'ın selüler aktivasyon sinyallerini indükleyebileceği de gösterilmiştir. Monositler ve monositlerden köken alan makrofajların Fas reseptörüne ligasyon uygulandığında, TNF-alfa ve IL-8 gibi inflamatuvar sitokinleri yüksek oranda sentezledikleri görülmüştür. Peritoneal makrofajlara çeşitli sitokinlerin uygulanması sonrasında, bu hücreler üzerindeki Fas molekülünün ekspresyonu upregüle edilmiş yani artmıştır (9,14). Fas-pozitif monosit yüzdesinin kanser hastalarında sağlıklı gruba kıyasla daha yüksek olduğunu ve beta gluklan uygulanmasının ardından daha da arttırılabileceğini gözlemledik. CD95 ekspresyonunun yüksek başlangıç değerleri hastalığa, önceki terapilere ya da sürmekte olan tedavilere bağlı olabilir (7 hasta çalışma başlangıcında tamoksifen alıyordu). Lökositlerde CD95 ekspresyonu üzerine kanser terapilerinin uzun vadede etkileri bilinmemektedir. Kanser kendisi immün hücrelerinde stimülasyon ve proliferasyona yol açabilir ancak bu muhtemel korelasyon üzerinde daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

CD4 molekülünün monositler üzerindeki rolü henüz tanımlanmamıştır. Grubumuz daha önce, periferik kan monositlerine ait bir altgrubun CD4-pozitif olduğunu ve rekombinant GMCSF'nin deri altına uygulanmasıyla CD4 ekspresyonunun arttırılabileceğini göstermişti (13). Oral beta gluklan uygulamasının aynı zamanda monositlerdeki CD4 ekspresyonu üzerinde de stimülatif etkileri mevcuttur. CD45RA, aktive edilmiş monositlerde eksprese edilir ve periferik kan monositleri için bir aktivasyon markörü olarak değerlendirilmektedir. Kobayashi ve ark., periodontit hastalarındaki CD45RA-pozitif monositlerin hastalığın şiddeti ile korelasyon gösterdiğini bildirdi (11). Sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kanser hastalarında sıfırıncı günde CD45RA ekspresyonu açısından anlamlı bir farklılık gözlenmemesine karşın, beta gluklan verilmesi, aktivasyon markörü olan CD45RA-pozitif monosit sayısını anlamlı ölçüde arttırmıştı.

Sonuç olarak, kısa süreli oral beta gluklan tedavisi, herhangi bir yan etkiye sebep olmadan, *in vivo* şartlarda periferik kan monositlerinin proliferasyonunu ve aktivasyonunu stimüle ediyor gözükmektedir. Ancak, oral beta gluklan uygulamasının uzun vadedeki etkileri tek başına ya da kombine uygulandığı çalışmalar için daha ayrıntılı olarak incelenmelidir. Bilhassa solid tumor tedavisinde oral beta gluklan ile monoklonal antikor kombine kullanımı daha ileri klinik araştırmalara gereksinim duymaktadır.

Teşekkür

Flow sitometrik analizler için gerekli olan monoklonal antikor ve uygun izotipte negatif kontrolleri Mustafa Nevzat İlaç Sanayii A.Ş., Türkiye, tedarik etmiştir.

Kaynaklar:

1. Vetricka V.B. Glucans as immunomodulators. *JANA* 2001;3(4):31-4.
2. Wakui A, Kasai K, Konno R, Abe R, Kanamuru R, Takahashi K, et al. Randomized study of lentinan on patients with advanced gastric and colorectal cancer. *Jpn J Cancer Chemother* 1986;13:1050.
3. Xiao Z, Trincado CA, Murraugh MP. B Glucan enhancement of T cell FN-gamma response in swine. *Ver Immunol Immunopathol* 2004;102:315-20.
4. Underhill DM, Rossnagle E, Lowell CA, Simmons RM. Dectin-1 activates syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* 2005;3:1239.
5. Brown GD, Herre J, Williams DI, Willment JA, Marshall ASJ, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of B-glucans. *J Exp Med* 2003;197(9): 1119-23.
6. Yan J, Vetricka V, Xia Y, Coxon A. Beta Glucan a "specific" biologic response modifier that uses antibodies to target tumors for cytotoxic recognition by leukocyte complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *The J Immunol* 1999;163:3045-52.
7. Hong F, Hansen RD, Yan J, Allendorf DJ, Baran JT, Ostroff GR, et al. Beta glucan functions as an adjuvant for monoclonal antibody immunotherapy by recruiting tumorocidal granulocytes as killer cells. *Cancer Res* 2003;63:9023-31.
8. Modak S, Koehn G, Vickers A, O'Reilly RJ, Cheung NK. Rituximab therapy of lymphoma is enhanced by orally administered beta glucan. *Leuk Res* 2005;29:679-83.
9. Park D, Thomsen AR, Frevert CW, Pham U, Skerrett SJ, Kiener PA, et al. Fas (CD95) induces proinflammatory cytokine response by human monocytes and monocyte derived macrophages. *The J Immunol* 2003;170:6209-16.
10. Ashany D, Song X, Lacy E, Nikolic-Zugic J, Friedman SM, Elkon KB. Th1 CD4+ lymphocytes delete activated macrophages through the Fas/APO-1 antigen pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(24): 11225-9.
11. Nagasawa T, Kobayashi H, Aramaki M, Kiji M, Oda S, Izumi Y. Expression of CD14, CD16, CD45 RA on monocytes from periodontitis patients. *J Periodont Res* 2004;39(1):72-8.
12. Kedzierska K, Rainbird MA, Lopez AF, Crowe SM. Effect of GM-CSF on HIV-1 replication in monocytes/macrophages in vivo and in vitro: a review. *Ver Immunol Immunopathol* 1998;63(1-2):111-21.
13. Demir G, Klein HO, Tüzüner N. Low dose daily rh GM-CSF application activates monocytes and dendritic cells in vivo. *Leuk Res* 2003;27(12):1105-8.
14. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology updated edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p.23.

