

# İn-Vivo NK Hücre İnhibisyonunun Deneysel Kolon Karsinom Hücreleri Üzerine Etkisi

## THE EFFECT OF IN-VIVO NK CELL INHIBITION ON EXPERIMENTAL COLON ADENOCARCINOMA

Dr.Serdar YOL\*, Dr.Sinan YOL\*\*, Dr.Yoshio GUNJI\*\*\*

(\*) Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi ABD, KONYA

(\*\*) Haseki Hastanesi, II. Cerrahi Kliniği, İSTANBUL

(\*\*\*) Chiba Üniversitesi Tıp Fakültesi, II.Cerrahi Kliniği, Chiba, JAPONYA

### ÖZET

**Amaç:** Kanser hücrelerini öldürmekle görevli natural killer (NK) hücrelerinin in-vivo şartlarda primer tümör büyümesi ve karaciğer metastazına etkilerini incelemek.

**Durum Değerlendirmesi:** Konakçı immün savunma sistemi tümör hücrelerinin primer büyümesi ve yayılmasını önlemede önemli rol oynamaktadır. Bu sistemin bir parçası olan NK hücreleri ile ilgili in-vivo çalışmalar sınırlıdır.

**Yöntem:** Balb/c farelerinde daha önce oluşturulmuş kolon adenokanser (C-26) hücreleri in-vitro kültür ortamında hazırlanarak normal Balb/c farelerinin mide duvarına inoküle edildi. Hayvanlar iki gruba ayrıldı. Kontrol grubuna (n=12) serum fizyolojik, çalışma grubuna (n=12) NK hücrelerini spesifik olarak inhibe eden anti-asialo GM-1 antiserumu toplam 6 kez intraperitoneal olarak verildi. Tümör inokülasyonundan 21 gün sonra hayvanlar sakrifiye edilerek tümörün inokülasyon yerindeki hacim ve ağırlığı ile karaciğer metastazlarının sayısı ve ıslak karaciğer ağırlıkları değerlendirildi.

**Çıkarımlar:** Inokülasyon yerindeki ortalama tümör hacmi çalışma grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu ( $p=0.0022$ ). Tümörün inokülasyon yerindeki ortalama ağırlığı, ıslak karaciğer ağırlığı ve karaciğerde metastaz görülme oranı çalışma grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek saptanmasına rağmen istatistik fark anlamlı değildi ( $p>0.05$ ).

**Sonuç:** Organizmanın tümör hücrelerine karşı savunmada rol oynayan NK hücrelerinin in-vivo inhibisyonu hem primer tümör büyümesi hem de metastaz oluşumunu artırmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** NK hücresi, anti-asialo GM-1, primer tümör büyümesi, karaciğer metastazı

### SUMMARY

The host immune defense system plays an important role in preventing the spread of tumor cells in the body. In the present study, we evaluated the effect of natural killer (NK) cell activity in a mouse model of hepatic metastasis. One million colon cancer (C-26) cells were prepared in 0.05 ml of phosphate-buffered saline (PBS) and inoculated into the stomach wall (distal corpus) of Balb/c mice. The animals were divided into two groups. While control group animals received saline solution, the study group animals received anti-asialo GM-1 antiserum (1/10 dilution, 0.2 ml, 10 mg/ml) 24 h before the inoculation and the injections were repeated every 4 days throughout the experiment. All mice were sacrificed 21 days after tumor inoculation. Number of liver metastasis, wet liver weight, size and the weight of the tumor at injection site were evaluated. The tumor reached a bigger size ( $p=0.0022$ ) and the number of metastatic nodules in the liver were much more ( $p=0.06$ ) in the study group, compared with control. This study described that, depletion of mouse NK cell activity with anti-asialo

GM-1 antiserum increased both primary tumor growth and metastatic liver colonies.

**Keywords:** NK cell, anti-asialo GM-1, primary tumor growth, liver metastasis

Vücut savunma sistemleri tümör hücrelerine karşı koymada oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Bunda en büyük pay büyük granüllü lenfositlerden olan natural killer (NK) hücrelerine ve sitotoksik T lenfositlere aittir. Vücutta kanser hücresi ortaya çıktığında bu hücrelerin ortadan kaldırılmasında NK hücreleri primer rol oynamaktadır (1). NK hücreleri kanser hücrelerini normal hücrelerden direkt olarak ayırtedebilmekte ve birkaç saat içinde bu hücreleri öldürebilmektedir (1). NK hücrelerinin bu etkisi in-vitro çalışmalarda ortaya konmuştur ancak in-vivo etki ile ilgili çalışmalar sınırlıdır.

Farelerin NK hücreleri asialo GM-1 denilen yüzey gangliozidine sahiptirler (2), ve bu marker sayesinde NK hücreleri ayırt edilebilirler. Biz bu çalışmada NK hücrelerine spesifik olarak bağlanarak onu inhibe eden bir monoklonal antikoru farelere uyguladık ve tümör transplanasyonu yaptığımız farelerde bu uygulamanın primertümör büyümesi ve karaciğer metastazına olan etkilerini inceledik.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada 24 adet 6-8 haftalık "specific pathogen free" Balb/c faresi kullanıldı. Farelerin ortalama ağırlığı 20 gram idi. Tokyo Hücre Bankası'ndan temin edilen indiferansiye kolon adenokarsinom (C-26) hücreleri kullanıldı. Bu tümör daha önce Corbett ve ark.'ları (3) tarafından Balb/c farelerine N-nitroso-N-metil üreten verilerek oluşturulmuştu.

Bu tümör hücrelerinin % 5 FCS'li (fetal calf serum) RPMI-1640 vasatında, 37°C'da % 5 CO<sub>2</sub> ortamında in-vitro seri kültürleri hazırlandı. Trypan mavisi ayırma testi ile tümör hücreleri sayılarak son konsantrasyonu 10<sup>6</sup>/0.05 ml olacak şekilde ayarlandı.

Farelere nembotal anestezisi (1.25 mg/25 gr, i.p.) altında median laparotomi yapılarak mide korpus distalinde anterior yüzden 2-3 mm açıldı ve 30-G iğne ile mide lümen tarafından girilerek daha önce hazırlanmış tümör hücreleri submukozaya implante edildi. Mide ve karın duvarı ayrı ayrı 6/0 Maxon (Davis-Geck, Inc.) ile kapatıldı.

Fareler 2 gruba ayrıldı. Çalışma grubuna (I.grup) (n=12) NK hücrelerini spesifik olarak

inhibe eden ve tavşanlardan elde edilen bir monoklonal antikor olan anti-asialo GM-1 antiserumu (Wako, Osaka, Japan) 1/10'lük dilüsyondan 0.2 ml olacak şekilde intraperitoneal olarak tümör inokülasyonundan 1 gün önce ve inokülasyondan sonra her 4 günde bir tekrarlanarak verildi. Kontrol grubuna (II.grup) (n=12) aynı doz ve sürede i.p. olarak serum fizyolojik (%9 NaCl) uygulandı.

Tümör inokülasyonundan 21 gün sonra tüm fareler sakrifiye edilerek iki grup aşağıdaki parametreler yönünden karşılaştırıldı;

- mide duvarındaki primer tümör hacmi (mm<sup>3</sup>)
- tümör dokusu etraf dokudan ayrılarak tartılan tümör ağırlığı (mg)
- karaciğerde makrometastaz oluşum sıklığı (%)
- ıslak karaciğer ağırlığı (mg)

Her iki grupta hacim ve ağırlıkların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi, karaciğer metastazlarının karşılaştırılmasında Fisher Kesin Ki Kare Analizi kullanıldı, p < 0.05 anlamlı kabul edildi.

## SONUÇLAR

Çalışma ve kontrol gruplarında elde edilen sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir. Ortalama tümör büyüklüğü anti-asialo GM 1 antikorlu verilen çalışma grubunda 6201 ± 1681 mm<sup>3</sup> iken kontrol grubunda 4258 ± 1525 mm<sup>3</sup> olarak saptandı, aradaki fark istatistiki olarak anlamlı idi (U = 19.0, p = 0.0022). Primer tümör ağırlığı I.grupta 3558 ± 877 mg, II.grupta 3203 ± 1332 mg idi. Primer tümör ağırlığı çalışma grubunda daha fazla olmasına rağmen aradaki fark istatistiki anlamlılığa sahip değildi (U = 60.0, p = 0.48).

Karaciğerde metastaz oluşum sıklığı çalışma grubunda % 91.6 (11/12 fare), kontrol grubunda % 50 (6/12 fare) olmasına rağmen aradaki fark istatistiki anlamlılığa sahip değildi (one tail p = 0.03, two tail p = 0.06). Ortalama ıslak karaciğer ağırlıkları karşılaştırıldığında I.grupta 1621 ± 289 mg, II.grupta 1464 ± 197 mg olup çalışma grubunda daha yüksek idi. Ancak aradaki fark istatistiki anlamlılığa sahip değildi (U = 49.0, p = 0.18).

## TARTIŞMA

Tümör hücrelerine karşı koymada organizmanın ilk kademe savunma sistemini oluşturan NK hücreleri 12-15 $\mu$ m çapında büyük granüler lenfositlerdir ve insanların periferik kanındaki lenfoid hücrelerin % 5'ini oluştururlar (5,6). Başlıca görevi tümör hücreleri veya virusla enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasıdır. NK hücreleri bu fonksiyonu nonspesifik olarak yapar ve daha önceden spesifik bir antijenik stimülasyona ihtiyaç göstermez. Yok edilecek hücreyi tanıma mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, NK hücreleri hedef hücrelere bağlanmakta ve membran parçalayıcı proteaz ve fosfolipaz enzimlerini salgılamaktadır. Salgılanan bu letal proteinler hedef hücrenin sitoplazmik membranında perforin denilen delikler açmakta ve hücrenin ölümüne sebep olmaktadır (5).

Rolf Keissling ve ark.'ları 1975 yılında ilk kez doğal sitotoksitesiyi tanımlayarak bunda rol oynayan hücrelere NK hücreleri adını verdiler (7). Bunu izleyen yıllarda NK hücrelerinin fonksiyonlarını ortaya koymak amacıyla çeşitli in-vitro ve in-vivo çalışmalar yapılmış ve son birkaç yıldır sınırlı sayıda klinik çalışma ile konu incelenmeye devam etmektedir.

Metastaz, cerrahinin en önemli problemlerinden biridir. Bu çalışmada, primer tümör büyümesi ve metastaz oluşumuna karşı koymada organizmanın savunma sisteminde önemli bir role sahip olan NK hücre fonksiyonunu daha önce geliştirdiğimiz fare modelinde (4) inceledik. Tavşanlardan elde edilen ve NK hücrelerini spesifik olarak inhibe eden bir monoklonal antikor (anti-asialo GM 1) farelere verildiğinde hem primer tümör büyümesi hem de karaciğer metastaz oluşumunda belirgin bir artış saptadık. Yano ve ark.'ları (8) kullandıkları bir başka fare modelinde, kuyruk veninden iki farklı kanser

hücrelerini (human SCLL H69/VP ve squamöz hücreli karsinom RERF-LC-A1) ayrı ayrı enjekte ettiklerinde metastazın oluşmadığını, ancak hayvanlara anti-asialo GM 1 antikorunu verdiklerinde metastaz gözlemlendiğini bildirdiler. Benzer bir çalışmada (9), ratların ileokolik veninden ACL-15 kanser hücreleri enjekte edildiğinde seyrek karaciğer metastazları görülürken tedaviye anti-asialo GM 1 antikorunu ilave edildiğinde karaciğer metastaz sayısında artış ve farelerin yaşam süresinde bir kısalma saptandı. Aksine, tedaviye anti-asialo GM 1 yerine NK hücre aktivitesini artıran OK432 ilave edildiğinde karaciğer metastaz sayısında azalma ve yaşam süresinde artma meydana geldiği bildirilmiştir.

Apte ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada (10), Balb/c nude farelerine anti-asialo GM 1 antikorunu verildiğinde NK hücreleri inhibe edilip primer tümör büyümesinde progresif bir artış gözlemlendiği rapor edilmiştir. Gresser ve ark.'ları da (11) yaptıkları çalışmada farelere "Friend erythroleukemia" hücrelerini vermeden önce NK hücre aktivitesini inhibe eden 3 farklı yöntemi (anti-asialo GM 1 Ab, silica ve radyoterapi) ayrı ayrı uyguladılar ve bu yöntemlerin hepsinde hayvanların yaşam sürelerinin kısalacağını bildirdiler. Bizim çalışmamızda ve benzeri çalışmalarda NK hücrelerinin tümöre karşı savunmadaki rolü ortaya konmuştur. Bu bilgilerin ışığında, NK hücre aktivitesinin artırılmasının tümör ile mücadelede önemli bir tedavi yöntemi haline gelebileceği düşünülebilir.

NK hücre aktivitesini artıran bazı maddelerle yapılan çalışmalarda ise hem tümör büyümesi hem de metastazların azaltılabildiği rapor edilmiştir. Bu amaçla kullanılan maddeler, interlökin-2 (12), interlökin-10 (13), interlökin-18 (14), bropirimine (15), Phyllanthus emblica (16), polyadenylic-polyuridylic acid (17), loxoribine (18), linomide (19) v.s.'dir. NK hücre aktivitesini artırmaya yönelik bu tedavi yaklaşımı

**TABLO 1: İKİ GRUBUN ÇALIŞMA PARAMETRELERİ YÖNÜNDE KARŞILAŞTIRILMASI (Ort  $\pm$  SD)**

	Tümör Hacmi (mm <sup>3</sup> )	Tümör Ağırlığı (mg)	Karaciğer Metastaz Sıklığı (n=12)	Islak Karaciğer Ağırlığı (mg)
Çalışma Gr.	6201 $\pm$ 1681	3558 $\pm$ 877	11/12	1621 $\pm$ 289
Kontrol Gr.	4258 $\pm$ 1525	3203 $\pm$ 1322	%12	1464 $\pm$ 197
p*	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05

\* istatistiki anlamlılık

mının gelecekte tümör büyümesi ve metastazların önlenmesinde önemli bir yere sahip olabileceği kanısındayız.

Klinik çalışmalarda da, hasta yaşam süresi açısından NK hücre aktivitesinin korunması veya artırılması gerektiği vurgulanmıştır. Beitsch ve ark'ları (20) meme kanserli hastalara uygulanan cerrahi ve neoadjuvan kemoterapinin NK hücre fonksiyonlarına etkisini incelediler ve tek başına cerrahinin veya neoadjuvan kemoterapinin NK hücrelerden oluşan doğal immün sistemi bozduğunu ve bunun ise metastaz riskini artırabileceğini bildirdiler. Vigano ve ark'ları (21), 60 metastatik böbrek tümürlü hastada (renal cell carcinoma) düşük doz interlökin-2'yi kullandılar ve bu uygulamanın NK hücre sayısını artırarak yüksek oranda tümör regresyonu sağladığını bildirdiler. Böbrek kanserlerinin tedavisinde Sella ve ark'ları (22) interferon-alfa ve 5-florourasil tedavisine NK hücre aktivasyonu yapan interlökin-2' nin ilave edilmesi ile daha iyi sonuç aldıklarını belirttiler.

Geldhof ve ark'ları (23) yaptıkları bir çalışmada lenfoma hücrelerini NK'ya duyarlı ve NK'ya dirençli diye sınıflandırdılar ve NK hücrelerine dirençli tümörlerin daha çok metastaz yapma yeteneğinde olduğunu saptadılar. Diğer bir çalışmada (24) ise, özofagus kanserli hastalarda plazma NK hücre sayısının tümör rekürrensi ve metastaz açısından prognostik öneme sahip olduğu vurgulanmıştır.

Sonuç olarak, bizim çalışmamızda ve diğer çalışmalarda da ortaya konduğu gibi NK hücreleri hem primer tümör büyümesi hem de metastazın önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Gelecekte NK hücre aktivitesini artıran ajanların kullanımı kanser tedavisinin vazgeçilmez bir parçası haline gelebilir.

## KAYNAKLAR

1. Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR: The immune response: Specific host resistance. In: *Microbiology concepts and applications*. 1993, McGraw-Hill, Inc. 520-521.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS: Effector mechanisms of T-cell mediated immune reactions. In: *Cellular and molecular immunology*. 2nd Ed. 1994, W.B.Saunders Comp., 271-277.
3. Corbett TH, Griswold DP, Roberts BJ, et al: Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. *Cancer Res* 1975; 35: 2434-2439.
4. Yol S, Gunji Y, Ochiai T, et al: Establishment of liver metastasis model by stomach implantation of Colon-26 tumor cells. *Biotherapy* 1994; 8(3): 485-486.
5. Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR: Host-parasite interactions: Nonspecific host resistance. In: *Microbiology concepts and applications*. 1993. McGraw-Hill Inc., 485-487.
6. Rook G.: Cell mediated immune reactions. In: *Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology 4th ed.*, 1996. Mosby, 9.5-9.6.
7. Greenberg AH: The origins of the NK cell, or a Canadian in King Ivan's court. *Clin Invest Med* 1994; 17(6): 626-631.
8. Yano S, Nishioka Y, Izumi K, et al.: Novel metastasis model of human lung cancer in SCID mice depleted of NK cells. *Int J Cancer* 1996; 67(2): 211-217.
9. Sugimoto F, Tsukada K, Hatakeyama K, et al.: OK432 inhibits experimental hepatic metastasis of colon adenocarcinoma ACL-15 in F344 rats. *Surg Today* 1994; 24(8): 694-700.
10. Apte RS, Meyhew E, Niederkorn JY: Local inhibition of natural killer cell activity promotes the progressive growth of intraocular tumors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38(6): 1277-1282.
11. Cresser I, Kaido T, Maury C, et al: Interaction of IFN-alpha/beta with host cells essential to the early inhibition of Frienderythro leukemia viceral metastases in mice. *Int J Cancer* 1994; 57(4): 604-611.
12. Helfand SC, Soergel SA, Modiano JF, et al: Induction of lymphokine-activated killer (LAK) activity in canine lymphocytes with low dose human recombinant interleukin-2 in vitro. *Cancer Biother* 1994; 9(3): 237-244.
13. Kundu W, Fulton AM: Interleukin-10 inhibits tumor metastasis, downregulates MHC class I, and enhances NK lysis. *Cell-Immunol* 1997; 180(1): 55-61.
14. Micallef MJ, Tanimoto T, Kohno K, et al: Interleukin-18 induces the sequential activation of natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes to protect syngeneic mice from transplantation with Meth A sarcoma. *Cancer Res* 1997; 57(20): 4557-4563.
15. Fujioka T, Ishikura K, Hasegawa M, et al: Antitumor effects of oral administration of an interferon-inducing pyrimidinone, Bropirimine, on murine renal-cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995; 36(1): 7-12.
16. Suresh K, Vasudevan DM: Augmentation of murine natural killer cell and antibody dependent cellular cytotoxicity activities by *Phyllanthus emblica*, a new immunomodulator. *J Ethnopharmacol* 1994; 44(1): 55-60.
17. Khan AL, Richardson S, Drew J, et al: Polyadenylic-polycridylic acid enhances the natural cell-

- mediated cytotoxicity in patients with breast cancer undergoing mastectomy. *Surgery* 1995; 118(3): 531-538.
18. Pope BL, Sigindere J, Chourmouzis E, et al: 7-Allyl-8-oxoguanosine (loxoribine) inhibits the metastasis of B16 melanoma cells and has adjuvant activity in mice immunized with a B16 tumor vaccine. *Cancer-Immunol-Immunother* 1994; 38(2): 83-91.
  19. Vukanovic J, Isaacs JT. Linomide inhibits angiogenesis, growth, metastasis and macrophage infiltration within rat prostatic cancers. *Cancer Res* 1995; 55(7): 1499-1504.
  20. Beitsch P, Lotzova E, Hortobagyi G, Pollock R: Natural immunity in breast cancer patients during neoadjuvant chemotherapy and after surgery. *Surg Oncol* 1994; 3(4): 211-219.
  21. Vigano MC, Lissoni P, Barni S, et al: Lymphocyte levels before treatment with subcutaneous interleukin-2 and during maintenance treatment in relation to the clinical efficacy in metastatic renal carcinoma. *Arch Ital Urol Androl* 1995; 67(2): 143-147.
  22. Sella A, Kilbourn RC, Gray I, et al: Phase I study of interleukin-2 combined with interferon-alpha and 5-flourouracil in patients with metastatic renal cell cancer. *Cancer Biother* 1994; 9(2): 103-111.
  23. Geldhoff AB, Raes C, Baklus M, et al: Expression of B7-1 by highly metastatic mouse T lymphomas induces optimal natural killer cell mediated cytotoxicity. *Cancer Res* 1995; 55(13): 2730-2733.
  24. Zhou JH, Jiang YC. Pre-and postoperative NK cell number and plasma levels of TNF and PGE2 in patients with esophageal carcinoma and their clinical significance. *Chung-Hua-Chung-Liu-Tsa-Chih* 1994; 16(2): 132-136 (Abstract).

---

**YAZIŞMA ADRESİ:**

Dr.Serdar YOL  
Mehmet Akif Mh.Mihri Vefa Sk.  
Hayat Sitesi E-1 Blok K:4, D:7,  
42200, KONYA