

Ocena wybranych parametrów immunologicznych i stanu odżywienia pacjentów z dysfagią nowotworową.

Streszczenie

Wstęp: W erze nowych standardów leczenia przeciwnowotworowego i znacznego wydłużenia czasu przeżycia chorych, istnieje rosnąca potrzeba zdobycia większej wiedzy dotyczącej wpływu choroby nowotworowej i jej leczenia na jakość życia tych pacjentów, w tym stanu odżywienia. U chorych na raka przełyku i raka żołądka przebijającym objawem są zaburzenia połykania, które nieuchronnie prowadzą do niedożywienia. Dysfagia jest subiektywnym odczuciem trudności lub zaburzenia połykania. Nowotwory przełyku i wpustu żołądka powodują szybko postępującą dysfagię, początkowo na pokarmy stałe, później płynne. U chorych tych często występuje odynofagia, bóle w klatce piersiowej, jadłowstręt, niedokrwistość, postępujące niedożywienie i ubytek masy ciała.

Zgodnie z definicją European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN) niedożywienie to “stan wynikający z braku wchłaniania lub spożywania substancji żywieniowych prowadzący do zmiany składu ciała, do upośledzenia fizycznej i mentalnej funkcji organizmu, oraz wpływający niekorzystnie na wynik leczenia choroby podstawowej”.

Cel pracy: Głównym celem pracy była ocena wybranych parametrów immunologicznych i stanu odżywienia pacjentów z dysfagią nowotworową w przebiegu raka górnego odcinka przewodu pokarmowego (pp).

Pacjenci, materiał i metody: Do badania zostało włączonych 60 chorych na nowotwory górnego odcinka (pp) leczonych od sierpnia 2015 roku do października 2016 roku w Klinice Chirurgii Przewodu Pokarmowego i Chirurgii Ogólnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Obserwację czasu przeżycia chorych zakończono w dniu 31 grudnia 2017 roku. Rozpoznanie raka przełyku lub raka żołądka postawiono na podstawie badania histopatologicznego wycinka pobranego ze zmiany nowotworowej.

U wszystkich chorych przeprowadzono badania diagnostyczne zgodnie z obowiązującym standardem, w tym: badanie endoskopowe połączone z biopsją zmiany nowotworowej, tomografią komputerową klatki piersiowej lub/i jamy brzusznej.

U wszystkich chorych wykonano jednolity komplet badań w celu ustalenia stanu odżywienia i statusu immunologicznego. Ocena stanu odżywienia chorych przeprowadzono w oparciu o

skalę NRS 2002, skalę SGA, wskaźniki INI i NRI, badania antropometryczne, BMI. Przeanalizowano wybrane parametry morfologii krwi, stężenie białka całkowitego, albuminy, fibrynogenu, transferyny, cholesterolu całkowitego, trójglicerydów, stężenie wybranych elektrolitów w surowicy krwi chorych,

Jakościową i ilościową analizę limfocytów z T CD3+, CD4+, CD8+ krwi obwodowej wykonano przy użyciu trykolorowej cytometrii przepływowej i panelu przeciwciał monoklonalnych (Ab) sprzężonych z fikoerytryną (RPE) i izotiocyanem fluoresceiny (FITC) i R - fikoerytrocyjanem 5.5 (PerCP-CY5.5). Wykorzystano następujący panel przeciwciał monoklonalnych: anty CD45-FITC, anty CD14-RPE, anty CD4-RPE, anty CD8 –RPE, oraz mysie przeciwciała anty IgG1-FITC i anty IgG1-RPE (ujemna kontrola).

Stężenie IL-6, TNF alfa, VCAM1, ICAM1 w surowicy oznaczano metodą immunoenzymatyczną (ELISA), używając gotowych zestawów i postępując zgodnie z instrukcją producenta.

Stężenie IgG, IgA, IgM oceniano na podstawie immunoelektroforezy. Badanie jest oparte na elektroforezie białek surowicy na podłożu agarowym lub agarozowym z jednoczesnym nałożeniem wzdłuż ścieżki rozdziału przeciwciał przeciw wszystkim białkom surowicy.

Grupę kontrolną stanowiło 19 osób nie obciążonych chorobą nowotworową, bądź inną chorobą powodującą niedożywienie. Było to 6 kobiet i 13 mężczyzn, w wieku $x=64,5$ lat (od 38 do 81 lat). BMI osób grupy kontrolnej wynosiło $x=25,9$ (od 19,26 do 37,55).

Badania przeprowadzono w ramach Grantu dla Młodych Naukowców, Nr PBMn 195. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Wrocławiu (nr KB-399/2015). Każdy pacjent został szczegółowo poinformowany o celu i zasadach prowadzonego badania i podpisał dobrowolnie formularz świadomej zgody.

Wyniki badań: Do badania włączono 60 chorych w wieku $x=66,8$ lat $\pm 10,6$ Było to 14 kobiet w wieku $x=68,2$ lat $\pm 11,3$ i 46 mężczyzn, w wieku $x=66,3$ lat $\pm 10,4$. U 44 chorych rozpoznano raka przełyku, u 16 raka żołądka. U 23 chorych, w tym 19 z rakiem przełyku i 4 z rakiem żołądka było to świeże zachorowanie, pozostałych 37 osób: 25 z rakiem przełyku i 12 z rakiem żołądka było wcześniej leczonych. U chorych z już trwającą chorobą w leczeniu stosowano: poszerzenie + APC u 30 pacjentów (22 z rakiem przełyku i 8 z rakiem żołądka), zabieg paliatywny wykonano u 5 chorych (3-rak przełyku i 2 rak żołądka), chemioterapia

dotyczyła 22 osób (14 i 8 odpowiednio rak przełyku i żołądka), radioterapię przeżyło 15 chorych (3 rak przełyku i 2 rak żołądka).

U chorych na raka przełyku rozpoznawano raka płaskonabłonkowego (33 osoby) i raka gruczołowego (11 osób), u wszystkich pacjentów z rakiem żołądka rozpoznawano raka gruczołowego (16 osób).

Średnia masa ciała w grupie analizowanych chorych wynosiła $63,85\text{kg} \pm 15,27$ i była istotnie mniejsza ($p=0,012$) w porównaniu do średniej masy ciała osób zdrowych ($73,94\text{kg} \pm 13,9$). Również średnia wartość BMI była istotnie mniejsza w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną ($p=0,0043$) i wynosiła odpowiednio $22,28 [\text{kg}/\text{m}^2] \pm 4,54$ i $25,97 [\text{kg}/\text{m}^2] \pm 5,0$.

Analizę stanu odżywienia w badanej grupie chorych przeprowadzono w oparciu o skale: NRS 2002, SGA oraz wskaźniki NRI, INI i wykazano istotne różnice w stanie odżywienia w porównaniu z grupą kontrolną. Ocena stanu odżywienia badanych chorych, w oparciu o te wskaźniki, nie wykazała istotnych różnic stanu odżywienia w zależności od lokalizacji nowotworu, jego typu histopatologicznego. Wykazano natomiast (w skali NRS 2002), że stan odżywienia pacjentów ze świeżym rozpoznaniem w porównaniu do chorych wcześniej leczonych był istotnie lepszy, podobnie stan odżywienia pacjentów (wg INI) zakwalifikowanych do leczenia radykalnego był istotnie lepszy od stanu odżywienia pozostałych chorych.

Populacja limfocytów T CD3+, CD4+ i CD8+ we krwi obwodowej pacjentów z rakiem górnego odcinka pp nie różniła się istotnie w porównaniu do populacji tych komórek stwierdzonych u zdrowych ochotników. Na uwagę zasługuje fakt, że w grupie badanej populacja CD4+ była mniejsza, a CD8+ większa w porównaniu z grupą kontrolną, co sprawiło, że stosunek CD4/CD8 był zaburzony i był istotnie mniejszy w grupie badanej.

Populacja limfocytów T CD4+ i T CD3+ u chorych na gruczolakoraka była istotnie mniejsza w porównaniu z chorymi na raka płaskonabłonkowego. Populacja limfocytów T CD4+ i T CD3+ we krwi obwodowej pacjentów z rakiem górnego odcinka pp była istotnie większa w grupie zakwalifikowanej do leczenia radykalnego w porównaniu do populacji tych komórek znalezionych w grupie chorych zakwalifikowanych do terapii nieradykalnej. W badanej przez mnie grupie znaleziono istotne korelacje pomiędzy populacją limfocytów T CD4+ a stopniem odżywienia wg skali NRS 2002 ($p=0,007450$) i NRI ($p=0,013977$), oraz populacją limfocytów T CD3+, a stopniem odżywienia wg skali NRS 2002 ($p=0,014627$).

Średnie stężenie analizowanych cytokin w surowicy chorych na raka górnego odcinka pp było istotnie większe w porównaniu do średnich wartości dla tych cytokin znalezionych w surowicy zdrowych ochotników. Stężenie VCAM-1 w grupie chorych poddanych radykalnej resekcji było istotnie mniejsze w porównaniu do pozostałych pacjentów.

Wykazano istotną ujemną korelację pomiędzy populacją limfocytów CD4+ a stężeniem VCAM-1 w surowicy chorych na raka górnego odcinka pp.

Średnie stężenie IgG i IgA w surowicy chorych na raka przełyku było istotnie większe w porównaniu do stężenia IgG i IgA w grupie chorych na raka żołądka. Średnie stężenie IgG w surowicy chorych na raka górnego odcinka pp było istotnie większe w grupie pacjentów ze świeżym rozpoznaniem, w porównaniu do chorych wcześniej leczonych. Analizując zależność pomiędzy stężeniem immunoglobulin a stanem odżywienia, znaleziono istotne korelacje pomiędzy: IgG i stanem odżywienia w skali NRS 2002 oraz IgA i stanem odżywienia w skali SGA.

Średnie stężenie hemoglobiny, liczba erytrocytów i wartość hematokrytu u chorych na raka górnego odcinka pp były istotnie mniejsze w porównaniu do wartości w grupie osób zdrowych. Badania wykazały istotne korelacje pomiędzy stężeniem Hb a stanem odżywienia chorych ocenianym wg skali NRS 2002 oraz NRI, INI.

W badanej grupie chorych na raka górnego odcinka pp stężenie białka całkowitego, albuminy i transferryny było istotnie mniejsze w porównaniu z grupą kontrolną. Stężenie białka całkowitego w surowicy chorych na raka przełyku było istotnie większe w porównaniu z jego stężeniem u chorych na raka żołądka. Stężenie białka całkowitego, albuminy i transferryny w surowicy chorych na raka górnego odcinka pp istotnie korelowało ze stanem odżywienia ocenianym na podstawie NRS 2002, jak i SGA, NRI i INI.

Mediana czasu przeżycia dla wszystkich chorych wynosiła 13,5 miesiąca, minimum 0, maksimum 54 miesiące. Wykorzystując krzywe ROC dla wybranych wskaźników odżywienia wyliczonych w momencie włączenia do badania, określono wartości odcinające najlepiej różnicujące pacjentów w zależności od szansy przeżycia dłuższego od mediany wyliczonej w całej grupie badanej. Wykazano, że najlepszymi dyskryminatorami czasu przeżycia są liczby limfocytów: T CD3 i T CD4, z których liczba limfocytów T CD3 ma największą czułość.

Wykazano również, że zarówno NRI, jak i INI, są dobrymi dyskryminatorami przeżycia chorych na raka górnego odcinka przewodu pokarmowego.

Wnioski: **1.** U chorych na raka górnego odcinka przewodu pokarmowego, w porównaniu do osób zdrowych, występowało niedożywienie, które potwierdzono w oparciu o skale NRS 2002, SGA oraz wskaźniki NRI i INI. **2.** Stosunek limfocytów T pomocniczych do supresorowych (CD4+/CD8+) u badanych chorych był zaburzony. **3.** Populacja limfocytów T CD4+ i CD3+ korelowała ze stanem odżywienia chorych. Mniejszy odsetek limfocytów T CD4+ i T CD3+ u chorych nie kwalifikujących się do leczenia radykalnego może wiązać się z bardziej zaawansowanym stanem choroby i dłuższym czasem trwania niedożywienia. **4.** Stężenie cytokin prozapalnych (Il-6, TNF alfa) i molekuł adhezyjnych (VCAM -1, ICAM-1) w surowicy chorych było większe niż u zdrowych i korelowało ze stanem ich odżywienia. **5.** Stężenie immunoglobulin w surowicy badanych chorych było nieprawidłowe i korelowało ze stanem odżywienia. **6.** W badanej grupie, w przebiegu niedożywienia występowała nieprawidłowa morfologia krwi oraz zaburzenia białkowe, lipidowe i elektrolitowe. **7.** U chorych na raka przełyku i raka żołądka najlepszymi dyskryminatorami czasu przeżycia były liczby limfocytów: T CD3 i T CD4, z których liczba limfocytów CD3 miała największą czułość. Stan odżywienia chorych oceniony wg NRI i INI był dobrym dyskryminatorem całkowitego czasu przeżycia w tej grupie chorych. Może to wskazywać na istniejącą zależność pomiędzy stopniem niedożywienia, zaburzeniami ilościowymi limfocytów T, a czasem przeżycia chorych na raka przełyku i raka żołądka. **8.** Ocena stanu odżywienia i wybranych parametrów immunologicznych u pacjentów z dysfagią wywołaną nowotworem złośliwym przewodu pokarmowego może być ważnym elementem diagnostyki przydatnym w prognozowaniu wyników leczenia.

Assessment of selected immunological parameters and nutritional status of patients with cancer dysphagia.

Summary

Introduction: In the era of new standards in cancer therapy and a significant increase in patients' survival, there is a growing need to gain more knowledge about the impact of cancer and its treatment on the quality of life of these patients, including nutritional status. In patients with esophageal cancer and gastric cancer, the breakthrough symptom is dysphagia, which inevitably leads to malnutrition. Dysphagia is a subjective feeling of difficulty or swallowing disorder. Esophageal and gastric neoplasms cause rapidly progressing dysphagia, initially on solid, then liquid foods. These patients often have odinophagia, chest pains, anorexia, anemia, progressive malnutrition and weight loss. According to the definition of the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), malnutrition is "a condition resulting from a lack of absorption or ingestion of nutrients that leads to changes in body composition, impairment of physical and mental function of the body, and adversely affects the outcome of treating the underlying disease."

Aim of the study: The main aim of the study was to assess selected immunological parameters and nutritional status of patients with cancer dysphagia in the course of upper gastrointestinal cancer

Material and methods: 60 patients with upper gastrointestinal cancer were enrolled in the study and were treated from August 2015 to October 2016 at the Department of Gastrointestinal Surgery and General Surgery at the Medical University of Wrocław. Observation of patient survival was completed on December 31, 2017. The diagnosis of esophageal cancer or gastric cancer was based on a histopathological examination of a specimen taken from a tumor.

All patients underwent diagnostic tests in accordance with the applicable standards, including: endoscopic examination combined with tumor biopsy, computed tomography of the chest or / and abdomen.

A set of tests was performed in all patients to determine their nutritional status and immune status. The assessment of patients' nutritional status was based on the NRS 2002 scale, SGA scale, INI and NRI, anthropometric tests, and BMI. Selected parameters of blood count, total

protein, albumin, fibrinogen, transferrin, total cholesterol, triglycerides, and selected electrolytes in the blood serum of patients were analyzed,

Qualitative and quantitative analysis of peripheral blood CD3 +, CD4 +, CD8 + T lymphocytes was performed using three-color flow cytometry and a panel of monoclonal antibodies (Ab) conjugated with phycoerythrin (RPE) and fluorescein isothiocyanate (FITC) and R-phycoerythrocyte 5.5 (PerCP-CY5.5). The following panel of monoclonal antibodies was used: anti CD45-FITC, anti CD14-RPE, anti CD4-RPE, anti CD8 -RPE, and murine anti-IgG1-FITC and anti-IgG1-RPE (negative control).

Serum IL-6, TNF alpha, VCAM1, ICAM1 levels were determined by enzyme immunoassay (ELISA) using ready-made kits and following the manufacturer's instructions.

IgG, IgA, IgM concentration was assessed by immunoelectrophoresis. The study is based on agarose or agarose serum protein electrophoresis with simultaneous application along an antibody separation pathway against all serum proteins.

The control group consisted of 19 people not burdened with cancer or other disease causing malnutrition. It was 6 women and 13 men, at the age of $x = 64.5$ years (from 38 to 81 years old). The BMI of the control group was $x = 25.9$ (from 19.26 to 37.55).

The research was carried out under the Medical University of Wrocław Grant for Young Scientists, No. PBMn 195. The research was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of Wrocław (No. KB-399/2015). Each patient was informed in detail about the purpose and principles of the study and voluntarily signed the informed consent form.

Results: 60 patients aged $x = 66.8$ years ± 10.6 were enrolled. It was 14 women at the age of $x = 68.2$ years ± 11.3 and 46 men, at the age of $x = 66.3$ years ± 10.4 . In 44 patients esophageal cancer was diagnosed, in 16 stomach cancer. 23 patients, including 19 with esophageal cancer and 4 with gastric cancer, were newly diagnosed, the remaining 37 persons: 25 with esophageal cancer and 12 with gastric cancer were previously treated. In patients with ongoing disease, the treatment used: extension + APC in 30 patients (22 with esophageal cancer and 8 with gastric cancer), palliative surgery was performed in 5 patients (3 esophageal cancer and 2 stomach cancer), chemotherapy was used in 22 people (14 and 8 esophageal and gastric carcinomas, respectively), 15 patients underwent radiotherapy (3 esophageal cancer and 2 gastric cancer). Squamous cell carcinoma (33 persons) and

adenocarcinoma (11 persons) were diagnosed in patients with esophageal cancer, and adenocarcinoma (16 persons) was diagnosed in all patients with gastric cancer.

The average body weight in the group of patients analyzed was $63.85\text{kg} \pm 15.27$ and was significantly lower ($p = 0.012$) compared to the average body weight of healthy control group ($73.94\text{kg} \pm 13.9$). Also, the average BMI value was significantly lower in the study group compared to the control group ($p = 0.0043$) and was $22.28 [\text{kg} / \text{m}^2] \pm 4.54$ and $25.97 [\text{kg} / \text{m}^2]$, respectively ± 5.0 .

The analysis of nutritional status in the examined group of patients was carried out on the basis of the following scales: NRS 2002, SGA and NRI, INI indicators, and significant differences in nutritional status were found compared to the control group. The assessment of the nutritional status of the examined patients, based on these indicators, did not show significant differences in the nutritional status depending on the location of the tumor or its histopathological type. However, it was shown (on the NRS 2002 scale) that the nutritional status of patients with new diagnosis compared to previously treated patients was significantly better, similarly the nutritional status of patients (according to INI) qualified for radical treatment was significantly better than the nutritional status of other patients.

The peripheral blood population of CD3 +, CD4 + and CD8 + T cells in patients with upper gastrointestinal tract cancer did not differ significantly compared to the population of these cells found in healthy volunteers. It is worth noting that in the study group the CD4 + population was smaller and CD8 + larger than in the control group, which resulted in the CD4 / CD8 ratio being disturbed and being significantly smaller in the study group.

The population of CD 4+ T and CD3 + T cells in patients with adenocarcinoma was significantly smaller than in patients with squamous cell carcinoma. The population of CD4 + and T CD3 + T cells in the peripheral blood of patients with cancer of the upper gastrointestinal tract was significantly larger in the group qualified for radical treatment compared to the population of these cells found in the group of patients qualified for non-radical therapy. In the group I studied, significant correlations were found between the CD4 + T lymphocyte population and the NRS 2002 nutritional grade ($p = 0.007450$) and NRI ($p = 0.013977$), and the CD3 + T lymphocyte population and the NRS 2002 nutritional population ($p = 0.014627$).

The mean concentration of the analyzed cytokines in the serum of patients with upper gastrointestinal tract cancer was significantly higher compared to the mean values for these

cytokines found in the serum of healthy volunteers. VCAM-1 concentration in the group of patients undergoing radical resection was significantly lower compared to other patients.

There was a significant negative correlation between the CD4 + lymphocyte population and the concentration of VCAM-1 in the serum of patients with upper gastrointestinal tract cancer.

The mean concentration of IgG and IgA in the serum of patients with esophageal cancer was significantly higher compared to the concentration of IgG and IgA in the group of patients with gastric cancer. The mean concentration of IgG in the serum of patients with cancer of the upper gastrointestinal tract was significantly higher in the group of patients with a recent diagnosis compared to patients who had been treated before. Analyzing the relationship between immunoglobulin concentration and nutritional status, significant correlations were found between: IgG and nutritional status on the NRS 2002 scale and IgA and nutritional status on the SGA scale.

The mean hemoglobin concentration, erythrocyte count and hematocrit value in patients with upper gastrointestinal tract cancer were significantly lower than in the healthy group. Studies have shown significant correlations between Hb concentration and nutritional status of patients assessed according to the NRS 2002 and NRI, INI scales.

In the studied group of patients with upper gastrointestinal tract cancer, the concentration of total protein, albumin and transferrin was significantly lower compared to the control group. The total protein concentration in the serum of patients with esophageal cancer was significantly higher compared to its concentration in patients with gastric cancer. The concentration of total protein, albumin and transferrin in the serum of patients with upper gastrointestinal tract cancer significantly correlated with the nutritional status assessed on the basis of NRS 2002, as well as SGA, NRI and INI.

Median survival for all patients was 13.5 months, minimum 0, maximum 54 months. Using ROC curves for selected nutrition indexes calculated at the time of study entry, the cut-off values that best differentiated patients depending on the chance of survival longer than the median calculated for the entire study group were determined. It has been shown that the best are the numbers of CD3 T and CD4 T, of which the number of CD3 T cells is most sensitive. It has also been shown that both NRI and INI are good discriminators of overall survival of upper gastrointestinal cancer.

Conclusions: 1. Malnutrition was observed in patients with upper gastrointestinal cancer compared to healthy people, which was confirmed on the basis of NRS 2002, SGA scales and NRI and INI indices. 2. The ratio of helper T suppressor lymphocytes (CD4 + / CD8 +) in the examined patients was disturbed. 3. The population of CD4 + and CD3 + T cells correlated

with the nutritional status of patients. A lower percentage of CD4 + and CD3 + T cells in patients not eligible for radical treatment may be associated with a more advanced disease state and a longer duration of malnutrition. 4. The concentration of proinflammatory cytokines (Il-6, TNF alpha) and adhesion molecules (VCAM -1, ICAM-1) in the serum of patients was higher than in healthy patients and correlated with their nutritional status. 5. The serum immunoglobulin concentration in the examined patients was abnormal and correlated with the nutritional status. 6. In the studied group, abnormal blood counts, protein, lipid and electrolyte disorders occurred in the course of malnutrition. 7. In patients with esophageal cancer and gastric cancer, the best survivors discriminators were the numbers of CD3 and T CD4 lymphocytes, of which the number of CD3 lymphocytes was most sensitive. The nutritional status of patients assessed by NRI and INI was a good discriminator of overall survival in this group of patients. This may indicate an existing relationship between the level of malnutrition, quantitative T-cell abnormalities, and survival time for patients with esophageal cancer and gastric cancer. 8. Assessment of nutritional status and selected immunological parameters in patients with dysphagia caused by malignant neoplasm is an objective element of diagnostics useful in predicting treatment results.