

Adjuvan kemoterapi alan erken evre meme kanserli hastalarda lenfosit alt tiplerinin flow sitometrik analizi

Analysis of lymphocyte subtypes by flow cytometry after adjuvant chemotherapy for early-stage breast cancer

Gökmen N M¹ Gökmen E²

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Alerji ve Klinik İmmünoloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Onkoloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

Özet

Amaç: Adjuvan kemoterapiler erken evre meme kanserinde nüks riskini azaltırken doğal immüniteyi etkileyerek ciddi morbiditeye yol açarlar; ancak kazanılmış immünite üzerindeki etkileri daha az bilinmektedir. Bu çalışmada, erken evre meme kanseri nedeniyle kemoterapi alan hastalarda hücresel immünitenin yenilenmesini akım sitometrisiyle değerlendirmeyi amaçladık.

Yöntem ve Gereç: Çalışmaya 42 hasta katıldı. Kemoterapi öncesi ve sonrası 3., 6., ve 12. aylarda periferik kan örnekleri toplandı. Anti-CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 ve CD56 monoklonal antikoları kullanılarak T-lenfosit, B-lenfosit ve Naturel Killer (NK) hücre sayıları saptandı.

Bulgular: CD19 B lenfositler kemoterapi sonrası 3. ayda bazal değerlere göre belirgin olarak azalmış iken 6. ayda çoğu hastada bazal değerlere ulaştığı görüldü. CD4 T hücreler 3. ve 6. aylarda bazal değerlere göre belirgin azalmış idi; 12. ayda çoğu hastada normal değerlere yaklaştı. CD8 T hücre sayıları 3. ayda bazal değerlere göre belirgin azalmış idi. Altıncı ve 12. aylarda ise ortalama normal değerlere göre farklı değildi. NK hücre sayıları 3. ve 6. aylarda bazal değerlere göre belirgin olarak azdı. 12. ayda ise normale göre düşük olmakla birlikte aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Sonuç: Kemoterapi, 12 ay sonrasına kadar hücresel immün sistem üzerindeki baskılayıcı etkilerini sürdürmektedir. İmmün sistem baskılanmasının enfeksiyöz hastalıkların sıklığında ve kanser nüks riskinde oluşturabileceği muhtemel artış yeterli istatistiki güce sahip çalışmalarda araştırılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, kemoterapi, immün sistem, lenfosit fenotiplemesi.

Summary

Aim: Adjuvant chemotherapy decreases the risk of relapse in early breast cancer. Impairment of innate immunity with chemotherapy is associated with significant morbidity; however the effect of chemotherapy on adaptive immunity is not fully known. In this study, we aimed at determining the recovery of cellular immunity by flow cytometry in patients receiving adjuvant chemotherapy for early-stage breast cancer

Material and Methods: Forty-two patients were studied. Peripheral blood samples were collected before and at 3, 6 and 12 months after chemotherapy. Anti-CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 and CD56 monoclonal antibodies were used to determine T-, B- and NK- cell subsets.

Yazışma Adresi: Nihal Mete GÖKMEN

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı,
İZMİR

Makalenin Geliş Tarihi: 28.07.2009 Kabul Tarihi:11.10.2009

Results: While CD19+ B cell numbers at 3 months after chemotherapy were significantly lower than baseline, they returned to normal at 6 months in most patients. CD4+ T cell numbers were significantly lower than baseline at 3 and 6 months postchemotherapy. T cells recovered in most patients by 12 months. CD8+ T cells were low at 3 months; however, they were not significantly different than baseline at 6 and 12 months postchemotherapy. NK cell numbers were significantly lower than baseline at 3 and 6 months. At 12 months, they were numerically lower than baseline, although the difference was not statistically significant.

Conclusion: Recovery of the cellular immune system is delayed up to 12 months postchemotherapy. Potential implications of delayed immune recovery on infectious diseases and risk of relapse should be investigated in studies with adequate statistical power.

Key Words: Breast cancer, chemotherapy, immune system, lymphocyte phenotyping.

Giriş

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir.(1) Adjuvan çok ajanlı kemoterapiler erken evre meme kanserinde hastalığın nüks riskini azaltarak bir çok kadın için tam şifa şansı sunar.(2) Son yıllarda modern kemoterapi şemalarının geliştirilmesiyle kemoterapinin başarı şansı artmış görünmektedir. Günümüzde çoğu meme kanserli hasta antrasiklin ve taksan grubu kemoterapötik ajanları içeren şemaları almaktadır.(3) Bazı yüksek riskli hasta gruplarında kemoterapi ajanlarının kombinasyonlar halinde granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) eşliğinde uygulanması veya konvansiyonel 3 haftada bir uygulama yerine 2 haftada bir doz yoğun uygulamalar bu başarıyı getiren faktörler olarak görünmektedir.(4) Antrasiklin ve taksan içeren modern şemaların meme kanseri nüks riski üzerindeki olumlu etkisi yaygın kabul görmekle birlikte bu tedavilerin bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri tam olarak bilinmemektedir.

Kemoterapilerin bağışıklık sisteminin tüm komponentlerini etkilediği bilinmektedir. (5-10) Doğal immünitenin baskılanması ciddi bir morbidite nedeni olarak bilinmektedir.(9,11) Gastrointestinal mukozit ve nötropeni akut dönemde enfeksiyonlara neden olabilmekte, nötropenik ateş nedeniyle hastaneye yatış ve intravenöz antibiyotik tedavisi gerekmekte ve hatta bazen enfeksiyon komplikasyonlarına bağlı ölümler görülebilmektedir. Kemoterapinin kazanılmış immünite üzerindeki etkileri ise daha az bilinmektedir. Kazanılmış immüniteyi oluşturan T ve B lenfositlerin, nötrofillerin aksine, kemoterapiden sonra daha geç normale döndüğü bilinmektedir (11-17). Bu baskılanmanın, modern kemoterapi şemaları sonrası ne denli geçiktiği ve bu gecikmenin ne gibi sonuçları olduğu tam bilinmemektedir.

Biz bu çalışmada, erken evre meme kanseri nedeniyle antrasiklin ve taksan bazlı kombinasyon kemoterapileri

alan hastalarda hümorale ve sellüler immünitenin yenilenmesini akım sitometrisi yöntemini kullanarak değerlendirilmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Örneklerin toplanması: Bu çalışmaya Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Bilim Dalına erken evre meme kanseri tanısıyla adjuvan kemoterapi için başvuran, antrasiklin ve/veya taksan (paklitaksel veya dosetaksel) içeren çok ajanlı kemoterapi alan ve gönüllü olur veren 42 hasta dahil edildi. Hastalardan kemoterapi öncesi ve kemoterapi sonrası 3.,6., ve 12. aylarda periferik kan örnekleri toplandı. Hastalar kemoterapi sonrası 1 yıla kadar her 3 ayda bir klinik olarak takip edildi; enfeksiyöz komplikasyonlar değerlendirildi.

Akım sitometrisi: Lenfosit alt tipleri, hastalardan alınan venöz kan örneklerinde FACS (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) kullanılarak akım sitometrisi yöntemiyle değerlendirildi. Florokrom ile işaretlenmiş monoklonal antikolar kombinasyonlar halinde kullanılarak T-lenfosit, B-lenfosit ve NK hücre sayıları saptandı. Anti-CD3 FITC T lenfositleri, anti-CD19 PE B lenfositleri, anti-CD4 FITC T helper (yardımcı) lenfositleri, anti-CD8 PE sitotoksik T lenfositleri, CD16/56 PE natural killer (doğal öldürücü) lenfositleri değerlendirmede kullanıldı (Becton Dickinson). Her bir analiz tüpüne 10 µlt monoklonal antikor konuldu, üzerine 100 µlt kan örneği ilave edildi. Ardından 15 dakika oda ısısında ve karanlıkta inkübe edildi. 2000 µlt eritrosit lize eden solüsyon eklendikten sonra 10 dakika oda ısısında inkübe edildi. Santrifüj aşamasının ardından üstte kalan sıvı kısım atıldı ve altta kalan hücreden zengin bölüm 250 µlt hücre yıkama solüsyonu (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) ile analiz edildi. Her bir analizde 10 000 hücre değerlendirildi. Sonuçlar % değer olarak ve hastanın o gün yapılan hemogramı eşliğinde kantitatif sayı olarak verildi.

İstatistiksel analizler: İstatistiksel analiz için SPSS 15.0 programı kullanıldı. Bazal ve kemoterapi sonrası lenfosit hücre sayılarının karşılaştırılması için wilcoxon signed rank testi kullanıldı. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi..

Bulgular

Erken evre meme kanserinde adjuvan kemoterapi: Çalışmaya katılan 42 kadın hastanın özellikleri Tablo-1'de özetlenmiştir. Hastaların ortalama yaşı 49 (sınır 29-66) idi. TNM sınıflamasına göre 6 hasta (%14) evre I, 18 hasta (%43) evre II ve bir diğer 18 hasta da (%43) evre III meme kanseri tanısı almıştı. Hastaların tümü adjuvan kemoterapi aldı. Hastaların 15'ine (%35.7) TAC (50 mg/m² doksorubisin, 75 mg/m² dosetaksel, 500 mg/m² siklofosfamid her 3 haftada bir 6 kür), 12'sine (%28.5) FEC (100 mg/m² epirubisin, 500 mg/m² 5-Flourourasil, 500 mg/m² siklofosfamid her 3 haftada bir 6 kür), 11'ine (%26.2) doz yoğun AC-T (60 mg/m² doksorubisin, 600 mg/m² siklofosfamid her 2 haftada bir 4 kür + paklitaksel 175 mg/m² her 2 haftada bir 4 kür) ve 4'üne (%9.5) AC veya TC kombinasyon kemoterapileri (AC = 60 mg/m² doksorubisin, 600 mg/m² siklofosfamid her 3 haftada bir 4 kür; TC = 75 mg/m² dosetaksel, 600 mg/m² siklofosfamid her 3 haftada bir 4 kür) uygulandı.

Tablo-1. Hasta Özellikleri.

(n=42)	n (%)
Evre (TNM sınıflaması)	
I	6 (14.2)
II	18 (42.8)
III	18 (42.8)
Adjuvan tedavi	
Kemoterapi	10 (23.8)
Kemoterapi+radyoterapi	32 (76.2)
Hormonal tedavi	30 (71.4)
Adjuvan kemoterapi	
TAC	15 (35.7)
FEC	12 (28.5)
	11 (26.2)
	4 (9.5)
AC-T	
AC/TC	

AC-T = 60 mg/m² doksorubisin, 600 mg/m² siklofosfamid her 2 haftada bir 4 kür + paklitaksel 175 mg/m² her 2 haftada bir 4 kür, TAC = 50 mg/m² doksorubisin, 75 mg/m² dosetaksel, 500 mg/m² siklofosfamid her 3 haftada bir 6 kür; FEC = 100 mg/m² epirubisin, 500 mg/m² 5-Flourourasil, 500 mg/m² siklofosfamid her 3 haftada bir 6 kür; AC = 60 mg/m² doksorubisin, 600 mg/m² siklofosfamid her 3 haftada bir 4 kür; TC = 75 mg/m² dosetaksel, 600 mg/m² siklofosfamid her 3 haftada bir 4 kür.

Çalışmaya katılan 10 hasta (%23.8) sadece kemoterapi alırken 32 hasta (%76.2) kemoterapi ve adjuvan radyoterapi aldı. Hormon reseptörleri pozitif 30 (%71.4) hastada, ayrıca, adjuvan hormonoterapi uygulandı.

Erken evre meme kanserinde adjuvan kemoterapi sonrası kantitatif immün yenilenme: Erken evre meme kanseri nedeniyle adjuvan kemoterapi alan hastalarda CD19, CD3, CD4, CD8 ve CD16/56 NK hücre sayıları kemoterapi öncesi ve kemoterapi sonrası 3, 6 ve 12. aylarda flow sitometri ile belirlendi (Tablo-2). CD19 B lenfositler sayısal olarak 3. ayda bazal değerlere göre belirgin olarak azalmış idi [CD19 bazal ortalama 164/mm³ (81-300/mm³), 3. ayda ortalama 36/mm³ (0-213/mm³), p<0.0001]. CD19 B lenfositlerin 6. ayda çoğu hastada bazal değerlere ulaştığı görüldü [6. ayda ortalama değer 127/mm³ (20-354/mm³), bazal ile karşılaştırıldığında p=0.08; 3. ay ile 6. ay karşılaştırmasında p=0.001]. CD19 B lenfositlerin 12. aydaki ortalama değeri ise 231/mm³ (70-292/mm³) idi. Bazı hastalarda CD19 B lenfositlerin 12. ayda bazal değerlerin üzerine çıktığı görüldü.

Tablo-2. Kemoterapi sonrası kantitatif lenfosit yenilenmesi.

	Bazal	3. ay	6. ay	12. ay
CD19	164 (81-300)	36* (0-213)	127 (20-354)	231 (70-292)
CD4	749 (349-1093)	464* (143-914)	568* (317-910)	523 (306-1090)
CD8	596 (376-1026)	365* (105-1050)	563 (228-1040)	403 (240-753)
CD4/CD8	1.2 (0.6-2.4)	1.1 (0.4-2.5)	1* (0.4-2.2)	1* (0.8-1.5)
NK	280 (67-1013)	129* (8-665)	157* (60-468)	148 (60-436)

*p<0.05, hücre sayılarının bazal değerlere göre istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığını göstermektedir (wilcoxon signed rank test). Hücre sayıları ml'de absolut median değer olarak (minimum-maksimum) verilmiştir.

CD4 T hücre sayıları 3. ve 6. aylarda bazal değerlere göre belirgin azalmış iken 12. ayda çoğu hastada normal değerlere yaklaştı [bazal ortalama CD4 T lenfosit sayısı 749/mm³ (349-1093/mm³); 3. ayda ortalama 464/mm³ (143-914/mm³); 6. ayda ortalama 568/mm³ (317-910/mm³); 12. ayda ortalama 523/mm³ (306-1090/mm³); bazal ile 3. ay karşılaştırması p=0.002, bazal ile 6. ay karşılaştırması p=0.002, bazal ile 12. ay karşılaştırması p=0.062].

CD8 T hücre sayıları 3. ayda bazal değerlere göre belirgin azalmış idi. Altıncı ve 12. aylarda ise ortalama CD8 değerleri normal değerlere göre farklı değildi [bazal ortalama CD8 T lenfosit sayısı 596/mm³ (376-1026/mm³); 3. ayda ortalama 365/mm³ (105-1050/mm³); 6. ayda ortalama 563/mm³ (228-1040/mm³); 12. ayda ortalama 403/mm³ (240-753/mm³); bazal ile 3. ay karşılaştırması p=0.03, bazal ile 6. ay karşılaştırması p=0.49, bazal ile 12. ay karşılaştırması p=0.48].

CD4/CD8 oranı 3. ayda bazale göre belirgin değişiklik göstermez iken 6. ve 12. aylarda oranda azalma görüldü [bazal ortalama CD4/CD8 oranı 1.2 (0.6-2.4); 3. ayda ortalama CD4/CD8 oranı 1.1 (0.4-2.5); 6. ayda ortalama CD4/CD8 oranı 1.00 (0.4-2.2); 12. ayda ortalama CD4/CD8 oranı 1.0 (0.8-1.5); bazal ile 3. ay karşılaştırması p=0.5, bazal ile 6. ay karşılaştırması p=0.016, bazal ile 12. ay karşılaştırması p=0.05].

CD 16/56 NK hücre sayıları 3. ve 6. aylarda bazal değerlere göre belirgin olarak azdı. Takipte 12. ayda NK hücre sayıları rakamsal olarak normal bazal değerlere göre düşük olmakla birlikte aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bazal ortalama NK hücre sayısı 280/mm³ (67-1013/mm³) iken 3. ayda 129/mm³ (8-665/mm³), 6. ayda 156 (60-468/mm³) ve 12. ayda 148 (60-436/mm³) idi (bazal ile 3. ay karşılaştırması p<0.001, bazal ile 6. ay karşılaştırması p=0.002, bazal ile 12. ay karşılaştırması p=0.27)..

Tartışma

Bu çalışmada, erken evre meme kanseri nedeniyle adjuvan antrasiklin veya taksan içeren yeni jenerasyon kombinasyon kemoterapileri alan kadın hastalarda kemoterapi sonrası ilk 6 ayda hücrel immün sistem komponentlerinde belirgin bir baskılanma olduğunu saptadık. CD 19 B lenfositler ve CD8 T süpresör hücreler 6. ayda sayısal olarak normale dönerken CD4 T hücrelerin ve NK hücrelerin bazal değerlere ulaşmasının 12. aya kadar uzadığı görüldü. Kemoterapi sonrası bağışıklık sistemini değerlendiren diğer çalışmalarda da kemoterapi sonrası B ve T hücre kompartmanlarında kalitatif ve kantitatif defektlerin olduğu gösterilmiştir (11, 18, 19). Tedavi sonrası CD4 T hücrelerin CD8'lere göre daha geç normale dönmesi diğer çalışmalarda gösterilenlerle benzerdir (11, 18, 20). Bizim çalışmamızda NK hücre sayıları 12. ayda bazal değerlere yaklaşırken diğer çalışmalarda kantitatif yenilenmenin daha hızlı olduğu, ancak fonksiyonel NK defektlerinin uzun sürdüğü görülmüştür (9, 11, 21, 22). Kemoterapi sonrasında kantitatif defektler yanısıra kalitatif fonksiyon bozukluklar olduğu da bilinmektedir.

Lenfosit proliferatif yanıtlarının ve IL-2 üretiminin hastalarda 12. aya kadar normale dönmeyebildiği bilinmektedir (11, 23).

Bizim çalışmamız dahil hücrel immün sistemin yenilenmesini araştıran tüm çalışmalara bakıldığında kemoterapinin immün sistem üzerindeki etkilerinin kemoterapinin bitiminden sonra 1 yıla kadar devam ettiği görülmektedir. İmmün sistemin baskılanmasının hasta için ne gibi sonuçları olabileceği tam bilinmemektedir. Enfeksiyöz hastalıkların sıklığının ve kanser nüks riskinin yeterli istatistiksel güce sahip çalışmalarda araştırılması gerekir. Yapılan çalışmalar, immün sistemin yenilenmesinde yaşanan gecikme ile nüks riski ve sağ kalım arasında bir ilişki olabileceği göstermektedir (23, 24). Türkiye'den Bozcuk ve arkadaşlarının da gösterdiği gibi kemoterapi sonrası IL-2 seviyelerinin düşük, IL-6 seviyelerinin ise yüksek olması kötü prognozun göstergesi olabilir (25, 26).

Kemoterapi sonrası enfeksiyonlara karşı doğal defans mekanizmaların hemen hepsinde patolojilerin geliştiği görülmektedir. Bu patolojiler daha çok yüksek doz kemoterapi uygulamaları sonrasında araştırılmıştır. Kemoterapi sonrası cilt ile gastrointestinal ve ürogenital sistem mukozalarından oluşan anatomik bariyerde hasar meydana gelmektedir. Bu hasar özellikle yüksek doz kemoterapi ile daha şiddetli olmaktadır. Bu hasar çoğu kez 2-3 hafta içerisinde normale dönmektedir. Benzer şekilde nötrofil sayı ve fonksiyonlarında görülen hasar da haftalar içerisinde normale dönmektedir. Ancak, bağışıklık sisteminin 3. kompartmanı olan adaptif immünitenin normale dönmesi çok daha uzun süre alabilmektedir (5-8, 27, 28). Bu gecikme, allojenik kök hücre transplantasyonu sonrası 2 yıla kadar uzayabilmektedir. Bu gecikme sonucu CMV, VZV, adeno virüsleri gibi viral enfeksiyonlarda, aspergillüs ve kandida gibi mantar enfeksiyonlarında ve özellikle kapsüllü bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonlarda artış görülmektedir (10, 29)

Günümüzde meme kanseri adjuvan tedavisinde kullanılan farklı kemoterapi şemaları arasında bağışıklık sisteminin baskılanması açısından bir fark olup olmadığı bilinmemektedir. Bu çalışmada hastalar antrasiklin ve taksan grubu ajanlar içeren farklı kemoterapi şemaları almıştır. Bu şemalar arasındaki olası bir fark ancak daha fazla sayıda hasta içeren çalışmalarda mümkün olabilir.

Erken evre meme kanserli hastalarda adjuvan kemoterapi sonrası bağışıklık sisteminin yenilenmesinde yaşanan gecikmenin ne gibi sonuçları olduğu da tam olarak bilinmemektedir. Bizim çalışmamızda kemoterapi sonrası ciddi bir enfeksiyöz komplikasyona rastlanılmadı. Ancak, bağışıklık sistemi daha geç

normale dönen hastalarda özellikle viral enfeksiyonların iyileşmesini etkileyebilecek potansiyel faktörler neler daha sık olup olmadığı, gecikmiş immün iyileşmenin olduğu yeterli güce sahip çalışmalarda araştırılmalıdır. yaşam kalitesi üzerine etkileri ve bağışıklık sisteminin

Bu çalışma 104S283 nolu *B lenfosit Homeostaz ve Repertuar Yenilenme Mekanizmalarının Belirlenmesi ve Modülasyonu* isimli proje kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Cancer facts and figures 2009. American Cancer Society. www.cancer.org (accessed on march 2010)
2. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (EBCTCG). Lancet 2005; 365:1687–1717.
3. Levine MN, Whelan T. Adjuvant Chemotherapy for Breast Cancer -- 30 Years Later. NEJM 2006; 355:1920-1922.
4. Citron ML, Berry DA, Cirincione C, et al: Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: First report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. J Clin Oncol 2003; 21:1431–1439.
5. Gardner RV. Long term hematopoietic damage after chemotherapy and cytokine. Frontiers in Bioscience 1999;4:47-57.
6. van der Most RG, Currie A, Robinson BW, Lake RA. Cranking the immunologic engine with chemotherapy: Using context to drive tumor antigen cross-presentation towards useful antitumor immunity. Cancer Research 2006;66(2):601-604.
7. Guillaume T, Rubinstein DB, Symann M. Immune reconstitution and immunotherapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation. Blood 1998;92:1471.
8. Atkinson K. Reconstruction of the haemopoietic and immune systems after marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1990;5:209.
9. Beitsch P, Lotzova E, Hortobagyi G, & Pollock R. Natural immunity in breast cancer patients during neoadjuvant chemotherapy and after surgery. Surgical Oncology 1994, 3(4):211-219.
10. Bowden RA. Infections in blood and bone marrow transplant patients: Allogeneic and autologous transplantation. Glauser MP, Pizzo PA, ed. Management of Infections in Immunocompromised Patients. 2000; 189-218.
11. Kang DH, Weaver MT, Park NJ, et al. Significant impairment in immune recovery after cancer treatment. Nurs Res 2009;58(2):105-14.
12. Martinez C, Urbano-Ispizua A, Rozman C, et al. Immune reconstitution following allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation: comparison of recipients of positive CD34+ selected grafts with recipients of unmanipulated grafts. Exp Hematol 1999;27(3):561.
13. Moretta A, Maccario R, Fagioli F, et al. Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. Exp Hem 2001;29:371.
14. Mustafa MM, Buchanan GR, Winick NJ, et al: Immune recovery in children with malignancy after cessation of chemotherapy. J Pediatr Hematol Oncol 1998; 20:451.
15. Nachbaur D, Kropshofer G, Heitger A, et al. Phenotypic and functional lymphocyte recovery after CD34+-enriched versus non-T cell-depleted autologous peripheral blood stem cell transplantation. J Hematother Stem Cell Res 2000;9(5):727.
16. Ottinger HD, Beelen DW, Scheulen B, Schafer UW, et al. Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. Blood 1996;88:2775.
17. Pedrazzini A, Freedman AS, Anderson J, et al. Anti B cell monoclonal antibody purged autologous bone marrow transplantation for B cell non-Hodgkin's lymphoma: Phenotypic reconstitution and B cell function. Blood 1989; 74:2203.
18. Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, et al. Effects of concurrent cisplatin administration during radiotherapy vs. radiotherapy alone on the immune function of patients with cancer of the uterine cervix. International Journal of Radiation Oncology, Biology, and Physics 2000;48(4):997-1006.
19. Steele, TA. Chemotherapy-induced immunosuppression and reconstitution of immune function. Leukemia Research 2002;26(4): 411-414.
20. Belka C, Ottinger H, Kreuzfelder E, Weinmann M, et al. Impact of localized radiotherapy on blood immune cells counts and function in humans. Radiotherapy and Oncology 1999;50(2):199-204.
21. Sewell HF, Halbert CF, Robins RA, et al. Chemotherapy-induced differential changes in lymphocyte subsets and natural-killer-cell function in patients with advanced breast cancer. International Journal of Cancer 1993;55(5):735-738.
22. Solomayer EF, Feuerer M, Bai L, et al. Influence of adjuvant hormone therapy and chemotherapy on the immune system analysed in the bone marrow of patients with breast cancer. Clinical Cancer Research 2003;9(1):174-180.

23. Wiltshcke C, Krainer M, Budinsky AC, et al. Reduced mitogenic stimulation of peripheral blood mononuclear cells as a prognostic parameter for the course of breast cancer: A prospective longitudinal study. *British Journal of Cancer* 1995;71(6):1292-1296.
24. Arduino S, Tessarolo M, Bellino R, et al. Reduced IL-2 level concentration in patients with breast cancer as a possible risk factor for relapse. *European Journal of Gynaecological Oncology* 1996; 17(6):535-537.
25. Bachelot T, Ray-Coquard I, Menetrier-Caux C, et al. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. *British Journal of Cancer* 2003;88(11):1721-1726.
26. Bozcuk H, Uslu G, Samur M, et al. Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6, and fasting serum insulin correlate with clinical outcome in metastatic breast cancer patients treated with chemotherapy. *Cytokine* 2004;27:58-6.
27. Lum LG: The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood* 1987;69:369.
28. Gokmen E, Raaphorst FM, Boldt DH, and J.M. Teale. Immunoglobulin heavy chain third complementarity determining regions (H CDR3s) post-stem cell transplantation do not resemble the developing human fetal H CDR3s in size distribution and immunoglobulin gene utilization. *Blood* 1998;92:2802.
29. Sullivan KM, Agura E, Anasetti C, et al. Chronic graft vs. host disease and other late complications of bone marrow transplantation. *Semin Hematol* 1991; 28:250.