

Akademia Medyczna w Gdańsku

Małgorzata Jarosz

**Ocena wybranych czynników odporności nieswoistej  
u dzieci z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarnicznym  
po zakończeniu intensywnego leczenia  
przeciwnowotworowego**

Rozprawa doktorska

**Promotor: Prof. dr hab. Jolanta Myśliwska**

Zakład Immunologii

Katedra Histologii i Immunologii Akademii Medycznej w Gdańsku

Praca finansowana ze środków MNiSW - nr grantu 2 P05E 024 28

oraz ze środków AMG w ramach Badań Własnych - nr W-959

Gdańsk 2008

## SPIS TREŚCI

<b>WYKAZ SKRÓTÓW UŻYWANYCH W PRACY.....</b>	<b>4</b>
<b>1. WSTĘP.....</b>	<b>7</b>
1.1. CHARAKTERYSTYKA OSTREJ BIAŁACZKI U DZIECI .....	7
1.1.1. Etiopatogeneza i diagnostyka ostrej białaczki.....	7
1.1.2. Leczenie ostrej białaczki limfoblastycznej.....	10
1.1.3. Leczenie ostrej białaczki szpikowej.....	12
1.2. CHŁONIAK NIEZIARNICZY U DZIECI.....	14
1.2.1. Cechy kliniczne i diagnostyka NHL.....	14
1.2.2. Leczenie NHL u dzieci.....	18
1.3. ZABURZENIA IMMUNOLOGICZNE U CHORYCH Z OSTRĄ BIAŁACZKĄ I CHŁONIAKIEM NIEZIARNICZYM W MOMENCIE ROZPOZNANIA .....	20
1.3.1. Zaburzenia immunologiczne w ostrej białaczkce .....	20
1.3.2. Zaburzenia immunologiczne w chłoniaku nieziarnicznym .....	22
1.4. WPŁYW LEKÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH NA UKŁAD IMMUNOLOGICZNY.....	24
1.5. ODNOWA UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO PO ZAKOŃCZONYM LECZENIU PRZECIWNOWOTWOROWYM .....	27
1.6. ROLA UKŁADU ODPORNOŚCI NIESWOISTEJ W OGRANICZANIU INFЕКCJI U PACJENTÓW PO ZAKOŃCZENIU INTENSYWNEGO LECZENIA PRZECIWNOWOTWOROWEGO.....	28
1.6.1. Komórki NK.....	30
1.6.1.1. Komórki NK CD94 <sup>+</sup> (CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD94 <sup>+</sup> ).....	31
1.6.2. Komórki żerne – neutrofile i monocyty.....	32
1.6.3. Niespecyficznie supresorowe limfocyty T - CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>high</sup> CD57 <sup>+</sup> .....	33
<b>2. CELE PRACY .....</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERIAŁ I METODY .....</b>	<b>36</b>
3.1. BADANA POPULACJA .....	36
3.2. MATERIAŁY .....	41
3.2.1. Odczynniki.....	41
3.2.2. Bufory i roztwory .....	42
3.2.3. Materiały jednorazowego użytku.....	42
3.2.4. Przeciwciała monoklonalne .....	43
3.2.5. Podłoża hodowlane .....	43
3.2.6. Linie komórkowe.....	44
3.2.7. Aparatura .....	44
3.2.8. Programy komputerowe.....	44
3.3. METODYKA BADAŃ .....	45

3.3.1. Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) .....	45
3.3.2. Izolacja limfocytów krwi obwodowej (PBL) .....	45
3.3.3. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej komórek NK .....	46
3.3.4. Oznaczanie aktywności fagocytarnej komórek żernych .....	47
3.3.5. Oznaczenia cytometryczne – analiza ekspresji antygenów powierzchniowych .....	49
3.4. METODY STATYSTYCZNE .....	50
<b>4. WYNIKI .....</b>	<b>51</b>
4.1. WPŁYW INTENSYWNEGO LECZENIA PRZECIWNOWOTWOROWEGO NA PARAMETRY MORFOLOGII KRWI OBWODOWEJ .....	51
4.1.1. Wpływ wieku na rozmaz układu białokrwinkowego .....	54
4.1.2. Badanie wpływu przynależności do grupy ryzyka na skład ilościowy układu białokrwinkowego po zakończeniu leczenia u pacjentów z ALL .....	56
4.1.3. Wpływ radioterapii ośrodkowego układu nerwowego na skład ilościowy układu białokrwinkowego u dzieci z ostrą białaczką .....	58
PODSUMOWANIE .....	59
4.2. KOMÓRKI UKŁADU BIAŁOKRWINKOWEGO W OKRESIE 2 LAT PO ZAKOŃCZENIU LECZENIA PRZECIWNOWOTWOROWEGO .....	60
4.2.1. Komórki układu białokrwinkowego u pacjentów z ostrą białaczką po zakończeniu intensywnego leczenia .....	60
4.2.2. Komórki układu białokrwinkowego u pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym po zakończeniu intensywnego leczenia .....	66
PODSUMOWANIE .....	70
4.3. STATUS KOMÓREK NK PO ZAKOŃCZENIU INTENSYWNEGO LECZENIA W OSTRYCH BIAŁACZKACH I NHL U DZIECI .....	71
4.3.1. Wpływ intensywnego leczenia przeciwnowotworowego na status komórek NK .....	71
4.3.2. Wpływ przynależności do grupy ryzyka u dzieci z ALL oraz radioterapii OUN na status komórek NK .....	74
PODSUMOWANIE .....	77
4.4. ZMIANY STATUSU KOMÓREK NK W OKRESIE 2 LAT PO ZAKOŃCZENIU LECZENIA PRZECIWNOWOTWOROWEGO .....	78
4.4.1. Zmiany aktywności cytotoksycznej komórek NK u dzieci chorych w okresie po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego .....	78
4.4.2. Zmiany odsetka i bezwzględnej liczby komórek $CD3^+CD16^+CD56^+$ u pacjentów z ostrą białaczką i NHL po zakończeniu intensywnego leczenia .....	81
4.4.3. Zmiany odsetka i bezwzględnej liczby komórek $CD3^+CD16^+CD56^+CD94^+$ u pacjentów z ostrą białaczką i NHL po zakończeniu intensywnego leczenia .....	85
PODSUMOWANIE .....	89
4.5. STATUS KOMÓREK $CD3^+CD8^{HIGH}CD57^+$ U DZIECI Z OSTRĄ BIAŁACZKĄ I CHŁONIAKIEM NIEZIARNICZYM PO ZAKOŃCZENIU INTENSYWNEGO LECZENIA .....	90
4.5.1. Status komórek $CD3^+CD8^{high}CD57^+$ u dzieci z ostrą białaczką w kontekście rodzaju stosowanego leczenia intensywnego .....	92

PODSUMOWANIE .....	94
4.6. ZMIANY STATUSU KOMÓREK CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>HIGH</sup> CD57 <sup>+</sup> W OKRESIE 2 LAT PO ZAKOŃCZENIU INTENSYWNEGO LECZENIA PRZECIWNOWOTWOROWEGO.....	94
PODSUMOWANIE .....	98
4.7. AKTYWNOŚĆ FAGOCYTARNA KOMÓREK ŻERNYCH KRWI OBWODOWEJ PO ZAKOŃCZENIU INTENSYWNEJ CHEMIOTERAPII W OSTRYCH BIAŁACZKACH I NHL U DZIECI .....	98
4.7.1. Wpływ rodzaju stosowanego leczenia na aktywność fagocytarną komórek żernych krwi obwodowej.....	99
PODSUMOWANIE .....	101
4.8. ZMIANY AKTYWNOŚCI FAGOCYTARNEJ KOMÓREK ŻERNYCH KRWI OBWODOWEJ W OKRESIE 2 LAT OD ZAKOŃCZENIA INTENSYWNEJ TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ .....	102
4.8.1. Aktywność fagocytarna granulocytów obojętnochłonnych w okresie 2 lat od zakończenia intensywnej terapii przeciwnowotworowej.....	102
4.8.2. Aktywność fagocytarna monocytów w okresie 2 lat od zakończenia intensywnej terapii przeciwnowotworowej.....	106
PODSUMOWANIE .....	110
4.9. ZAPADALNOŚĆ NA INFЕКCJE W OKRESIE 2 LAT PO ZAKOŃCZENIU INTENSYWNEGO LECZENIA OSTREJ BIAŁACZKI I NHL U DZIECI .....	111
4.9.1. Związek zapadalności na infekcje z badanymi parametrami odporności nieswoistej u dzieci z ostrą białaczką w okresie 2 lat po zakończeniu intensywnej terapii .....	115
PODSUMOWANIE .....	120
<b>5. DYSKUSJA.....</b>	<b>121</b>
5.1. WPŁYW INTENSYWNEGO LECZENIA PRZECIWNOWOTWOROWEGO NA PARAMETRY ODPOWIEDZI NIESWOISTEJ .....	126
5.1.1. Rola komórek NK w monitorowaniu progresji i wznowy procesu nowotworowego w ostrej białaczce i chłoniaku nieziarnicznym.....	133
5.2. REGENERACJA UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO W CZASIE LECZENIA PODTRZYMUJĄCEGO REMISJĘ I PO JEGO ZAKOŃCZENIU .....	135
5.3. ZABURZENIA ODPOWIEDZI NIESWOISTEJ A ZAPADALNOŚĆ NA INFЕКCJE PO ZAKOŃCZENIU INTENSYWNEGO LECZENIA PRZECIWNOWOTWOROWEGO.....	140
<b>6. WNIOSKI .....</b>	<b>144</b>
<b>7. STRESZCZENIE PRACY.....</b>	<b>145</b>
<b>8. PIŚMIENNICTWO .....</b>	<b>150</b>
<b>ZAŁĄCZNIKI.....</b>	<b>174</b>

**WYKAZ SKRÓTÓW UŻYWANYCH W PRACY**

6-MP	- 6-merkaptopuryna
6-TG	- 6-tioguanina
ALL	- (ang. <i>acute lymphoblastic leukemia</i> ) ostra białaczka limfoblastyczna
AML	- (ang. <i>acute myeloid leukemia</i> ) ostra białaczka mieloblastyczna (szpikowa)
APL	- (ang. <i>acute promyelocytic leukemia</i> ) ostra białaczka promielocytowa
Ara-C	- cytarabina, arabinozyd cytozyny
ATRA	- (ang. <i>all-transretinoid acid</i> ) kwas transretinowy
BFM	- Berlin-Frankfurt-Münster
CD	- (ang. <i>cluster of differentiation</i> ) antygeny różnicowania
CMV	- wirus cytomegalii
CRP	- (ang. <i>C-reactive protein</i> ) białko C-reaktywne
DC	- (ang. <i>dendritic cells</i> ) komórki dendrytyczne
FAB	- (ang. <i>French-American-British</i> ) klasyfikacja francusko-amerykańsko-brytyjska
FCS	- (ang. <i>fetal calf serum</i> ) płodowa surowica cielęca
FSS	- (ang. <i>forward scatter</i> ) rozproszenie czołowe światła lasera
G-CSF	- (ang. <i>granulocyte colony-stimulating factor</i> ) czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów
Gy	- Gray - jednostka dawki pochłoniętej promieniowania
HD	- (ang. <i>Hodgkin disease</i> ) ziarnica złośliwa
HIV	- (ang. <i>human immunodeficiency virus</i> ) ludzki wirus niedoboru odporności
HLA	- (ang. <i>human leukocyte antigens</i> ) antygeny ludzkich leukocytów
HR	- (ang. <i>high risk</i> ) wysokie ryzyko
ICAM	- (ang. <i>intercellular adhesion molecule</i> ) cząsteczka adhezji międzykomórkowej
IFN	- interferon
Ig	- immunoglobulina
IgA	- immunoglobulina klasy A
IgG	- immunoglobulina klasy G
IgM	- immunoglobulina klasy M

IL	- interleukina
IL-2R	- receptor interleukiny-2
IR	- (ang. <i>intermediate risk</i> ) pośrednie ryzyko
IT	- (ang. <i>intrathecal</i> ) dooponowy, dokanałowy
ITAM	- (ang. <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i> ) aktywujące motywy immunoreceptorowe oparte na tyrozynie
ITIM	- (ang. <i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs</i> ) hamujące motywy immunoreceptorowe oparte na tyrozynie
KIRs	- (ang. <i>killer cell immunoglobulin-like receptors</i> ) receptory komórek NK z nadrodziny cząsteczek immunoglobulinopodobnych
LAK	- (ang. <i>lymphokine activated killer</i> ) komórka cytotoksyczna aktywowana limfokiną
LDH	- (ang. <i>lactate acid dehydrogenase</i> ) dehydrogenaza mleczanowa
LGL	- (ang. <i>large granular lymphocytes</i> ) duże ziarniste limfocyty
LMB	- (ang. <i>lymphoma malignancy B</i> ) chłoniak złośliwy z komórek B
mDC	- (ang. <i>myeloid dendritic cells</i> ) szpikowa subpopulacja komórek dendrytycznych
MHC	- (ang. <i>major histocompatibility complex</i> ) główny układ zgodności tkankowej
MIP-1	- (ang. <i>macrophage inflammatory protein-1</i> ) białko zapalne makrofagów
MTX	- metotreksat
NHL	- (ang. <i>non-Hodgkin lymphoma</i> ) chłoniak nieziarniczny
NK	- (ang. <i>natural killer</i> ) naturalna komórka cytotoksyczna, komórka NK
NKRs	- (ang. <i>natural killer receptors</i> ) – receptory komórek NK
OUN	- ośrodkowy układ nerwowy
PBL	- (ang. <i>peripheral blood lymphocytes</i> ) limfocyty krwi obwodowej
PBMC	- (ang. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> ) jednojądrzaste komórki krwi obwodowej
PBS	- buforowany roztwór soli fizjologicznej
pDC	- (ang. <i>plasmacytoid dendritic cells</i> ) subpopulacja komórek dendrytycznych przypominających plazmocyty
PHA	- (ang. <i>phytohaemagglutinin</i> ) fitohemaglutynina
PPGLBiCh	- Polska Pediatria Grupa ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków

- PWM - (ang. *pokeweed mitogen*) mitogen szkarłatki
- RANTES - (ang. *regulated on activation normal T cells expressed and secreted*) – regulowany przez aktywację; ekspresja i wydzielanie przez prawidłowe limfocyty T
- R.E.A.L - (ang. *Revised European-American Lymphoma classification*) poprawiona europejsko-amerykańska klasyfikacja chłoniaków
- rIL-2 - rekombinowana interleukina-2
- RT - radioterapia
- SR - (ang. *standard risk*) standardowe ryzyko
- SS - (ang. *side scatter*) rozproszenie boczne światła lasera
- TdT - (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase*) końcowa transferaza deoksynukleotydowa
- TGF - (ang. *transforming growth factor*) transformujący czynnik wzrostu
- TNF - (ang. *tumor necrosis factor*) czynnik martwicy nowotworów
- WHO - (ang. *World Health Organization*) Światowa Organizacja Zdrowia

## 1. WSTĘP

Białaczki należą do najczęstszych nowotworów wieku rozwojowego, stanowiąc około 30% wszystkich nowotworów u dzieci poniżej 15. roku życia [1,2]. Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL; ang. *acute lymphoblastic leukemia*) występuje około 5 razy częściej niż ostra białaczka szpikowa (AML; ang. *acute myeloid leukemia*) i stanowi około  $\frac{3}{4}$  spośród wszystkich rozpoznań białaczki u dzieci [2]. Trzecie miejsce (po białaczkach i guzach mózgu) z częstością około 5-6% zajmują chłoniaki nieziarnicze (NHL; ang. *non-Hodgkin lymphoma*) [1,3,4].

Choć nadal nowotwory stanowią przyczynę 10% zgonów dzieci powyżej 1. roku życia [5], znacznie poprawił się współczynnik przeżycia tych chorych, który wynosi obecnie 80%, w porównaniu z mniej niż 20% w roku 1970 [5]. W ostatnich latach dokonał się również olbrzymi postęp w leczeniu białaczek i chłoniaków u dzieci, dzięki któremu całkowity współczynnik wyleczalności dziecięcej ALL wynosi obecnie około 75-80% [6], NHL - 75% [3], a AML nadal tylko 40-50% [6,7].

### 1.1. Charakterystyka ostrej białaczki u dzieci

#### 1.1.1. Etiopatogeneza i diagnostyka ostrej białaczki

U podstaw rozwoju ostrej białaczki znajduje się transformacja i ekspansja klonalna pojedynczej komórki progenitorowej w szpiku kostnym lub grasicy [8,9]. W ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL) komórki białaczkowe przypominają prekursorzy linii limfoidalnej, zaś w ostrej białaczce szpikowej (AML) wykazują cechy charakterystyczne dla jednej z nie-limfoidalnych linii komórkowych szpiku kostnego [8]. Zdecydowanie rzadziej komórki białaczkowe mogą wykazywać ko-ekspresję obu fenotypów klonów białaczkowych (ostra białaczka bifenotypowa) [8,10].



Do objawów klinicznych zarówno ostrej białaczki limfoblastycznej, jak i szpikowej u dzieci należy bladość skóry i błon śluzowych (wynikające z istniejącej niedokrwistości), objawy skazy krwotocznej, gorączka, osłabienie. W ALL częściej niż w AML występuje też powiększenie wątroby i śledziony, bolesność kości i stawów oraz symetryczne powiększenie węzłów chłonnych, w tym śródpiersiowych („guz śródpiersia” - ogólnie dość rzadki objaw). Sporadycznie w ALL obserwuje się nacieczenia ślinianek, gruczołów łzowych, jąder, nerek, ośrodkowego układu nerwowego (OUN) czy skóry, zaś w AML - szczególnie w typach M4 i M5 (Tabela 1.1.1.2) - charakterystyczne jest tworzenie zlokalizowanych nacieków w OUN, przestrzeniach nadtwardówkowych, przestrzeni pozagałkowej, kościach żuchwy i szczęki oraz skórze [9,11].

Ostateczne rozpoznanie w ostrej białaczce ustala się na podstawie badania szpiku kostnego [9]: w ALL - gdy więcej niż 25% komórek szpiku stanowią limfoblasty [11], w AML - gdy w szpiku jest więcej niż 30% mieloblastów [9]. Klasyfikacja francusko-amerykańsko-brytyjska (FAB), oparta na morfologii komórek białaczkowych, dzieli ALL na 3 podtypy: L1 (najczęstszy, ok. 85%, z najlepszym rokowaniem), L2 (14%) oraz L3 (1-2%, z najgorszym rokowaniem) [11].

Postępem w diagnostyce jest immunofenotypowanie, które opiera się na zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych specyficznych dla markerów powierzchniowych i cytoplazmatycznych poszczególnych linii komórkowych z uwzględnieniem etapów ich dojrzewania. Umożliwia ono klasyfikację białaczek do odpowiednich podtypów [8,12,13] i następnie wdrożenie odpowiedniego, specyficznego leczenia [11]. Takie typowanie w przypadku ALL wyróżnia białaczkę B-komórkową i T-komórkową oraz podtypy: proB-ALL (progenitor B ALL), B-cALL (B-common ALL), preB-ALL i B-ALL oraz preT-ALL i T-ALL [8] (Tabela 1.1.1.1).

**Tabela 1.1.1.1.** Klasyfikacja ostrych białaczek limfoblastycznych (ALL) w oparciu o immunofenotypowanie (za Russell N. H. i wsp., 1997) [8].

Typ białaczki	Marker powierzchniowy	Marker cytoplazmatyczny	Jądro komórkowe
<b>ALL B-komórkowa</b>			
proB-ALL	CD19	CD22	TdT
common ALL	CD19/CD10	CD22	TdT
preB-ALL	CD19	$\mu$	TdT
B-ALL	CD19/CD22 immunoglobuliny	..	..
<b>ALL T-komórkowa</b>			
preT-ALL	CD7	CD3	TdT
T-ALL	CD7/CD2	CD3	TdT

*TdT – końcowa transferaza deoksynukleotydoma;  $\mu$  - łańcuch ciężki  $\mu$  immunoglobuliny*

Podział na podtypy w ostrej białaczce szpikowej (AML) opiera się przede wszystkim na ocenie morfologicznych i cytochemicznych właściwości komórek białaczkowych jako kryteriach szeroko stosowanej klasyfikacji FAB (klasyfikacji French-American-British = francusko-amerykańsko-brytyjskiej) [14-17] (Tabela 1.1.1.2).

**Tabela 1.1.1.2.** Klasyfikacja FAB ostrych białaczek mieloblastycznych (AML) (za van der Reijden H. J. i wsp., 1983 i Catovsky D. i wsp., 1992) [15,17].

Klasyfikacja FAB - typ białaczki	Kryteria rozpoznania
<b>M0</b>	ostra białaczka mieloblastyczna, z komórkami o bardzo niskim stopniu zróżnicowania, lecz posiadającymi antygeny linii mieloidalnej
<b>M1</b>	ostra białaczka mieloblastyczna, bez cech dojrzewania
<b>M2</b>	ostra białaczka mieloblastyczna, z cechami dojrzewania
<b>M3</b>	ostra białaczka promielocytowa
<b>M4</b>	ostra białaczka mielomonocytowa
<b>M5a</b>	ostra białaczka monocytowa, słabo zróżnicowana
<b>M5b</b>	ostra białaczka monocytowa, dobrze zróżnicowana
<b>M6</b>	erytroleukemia
<b>M7</b>	ostra białaczka megakarioblastyczna

*FAB – klasyfikacja francusko-amerykańsko-brytyjska*

Obok podtypu białaczki wartość prognostyczną w tych chorobach mają: wiek i płeć pacjenta, wartości leukocytozy w momencie rozpoznania, nieprawidłowości cytogenetyczne oraz odpowiedź na leczenie indukcyjne [7,8,18]. Na podstawie istniejących czynników ryzyka pacjenci z ALL przydzielani są do odpowiednich grup ryzyka. Większość stosowanych obecnie protokołów leczniczych kwalifikuje pacjentów do dwóch lub trzech grup ryzyka, tj. odpowiednio standardowego (*standard risk* – SR) i wysokiego (*high risk* – HR) albo SR, HR i pośredniego ryzyka (*intermediate risk* – IR) [9,19,20]. Kwalifikacja do grup ryzyka w AML (grupy SR i HR) odbywa się na podstawie typu białaczki wg klasyfikacji FAB i wstępnej odpowiedzi na stosowane leczenie indukcyjne [6,7].

### 1.1.2. Leczenie ostrej białaczki limfoblastycznej

Wszystkie protokoły terapeutyczne stosowane obecnie w ALL składają się z czterech faz: indukcji remisji, wczesnej konsolidacji i późnej intensyfikacji remisji, postępowania zapobiegającego rozwojowi białaczki ośrodkowego układu nerwowego oraz leczenia podtrzymującego remisję. Polska Pediatria Grupa ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków (PPGLBiCh) rekomenduje obecnie program leczenia ALL IC BFM 2002 (załączniki 2 i 8) [9,21]. Kryteria kwalifikacji do poszczególnych grup ryzyka w ostrej białaczce limfoblastycznej na podstawie wczesnej odpowiedzi na leczenie przedstawia Tabela 1.1.2.1.

Część pacjentów, u których w momencie rozpoznania stwierdza się hiperleukocytozę (całkowita liczba krwinek białych  $\geq 100 \times 10^9/L$ ) [22], przed rozpoczęciem właściwego protokołu leczniczego wymaga terapii cytoredukcyjnej, która polega na intensywnym dożylnym nawadnianiu i podaży oksydazy moczanowej lub allopurinolu wraz z dwuwęglanami celem alkalizacji moczu [23,24].

Leczenie indukujące remisję, podobne dla wszystkich chorych, polega na podawaniu prednizonu, winkrystyny, L-asparaginazy, daunorubicyny i metotreksatu podoponowo (MTX IT), a następnie cyklofosfamidu, cytarabiny (Ara-C), 6-merkaptopuryny i kolejnych dawek MTX IT [9,21]. Po pierwszej fazie tego protokołu terapeutycznego ocenia się odpowiedź na leczenie, czyli remisję. Pacjenci z grup niższego ryzyka, którzy nie odpowiadają na leczenie indukcyjne, zostają zakwalifikowani do grupy HR. W leczeniu tej grupy chorych stosuje się bardziej intensywną chemioterapię, a niektórych pacjentów kwalifikuje się do allogenicznego przeszczepu szpiku kostnego [9,20]. Sumaryczne dawki leków stosowane w poszczególnych grupach ryzyka w ALL przedstawione są w załączniku 8.

U pacjentów najwyższego ryzyka i u chorych z pierwotnie jawną białaczką OUN, powyżej 1. roku życia, stosuje się napromienianie czaszki w dawkach odpowiednio profilaktycznych i leczniczych oraz dodatkowe dawki leków podawanych podoponowo [9,20,21].

Ostra białaczka limfoblastyczna jest nowotworem, który wymaga długotrwałego stosowania leczenia [9,20]. Całkowity czas terapii od rozpoczęcia indukcji do zakończenia leczenia podtrzymującego w programie ALL IC BFM 2002 wynosi 24 miesiące dla wszystkich chorych. Czas intensywnego leczenia różni się w zależności od grupy stratyfikacyjnej i wpływa na długość leczenia podtrzymującego, które trwa od 57 do 74 tygodni. W leczeniu podtrzymującym remisję stosowana jest 6-merkaptopuryna (6-MP), podawana codziennie ( $50\text{mg}/\text{m}^2$ ), z metotreksatem (MTX) w dawkach cotygodniowych ( $20\text{mg}/\text{m}^2$ ) [9,21].

**Tabela 1.1.2.1.** Stratyfikacja dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL).

	<b>Grupa standardowego ryzyka (SR)</b>	<b>Grupa pośredniego ryzyka (IR)</b>	<b>Grupa wysokiego ryzyka (HR)*</b>
dzień 0	wiek $\geq 1$ i $< 6$ lat i wstępna leukocytoza (WBC) $< 20000/\mu\text{l}$	wiek $< 1$ i $\geq 6$ lat i/lub WBC $> 20000/\mu\text{l}$	t(9;22) [BCR/ABL] t(4;11) [MLL/AF4]
dzień 8	blasty $< 1000/\mu\text{l}$	blasty $< 1000/\mu\text{l}$	blasty $\geq 1000/\mu\text{l}$ (oporność na prednizon)
dzień 15	szpik M1/M2	szpik M1/M2 szpik M3 w grupie SR	szpik M1/M2/M3 szpik M3 w grupie IR
dzień 33	szpik M1	szpik M1	pacjenci z grup SR i IR nieodpowiadający na leczenie (szpik M2/M3)

*SR (standard risk) – niskie ryzyko; IR (intermediate risk) – pośrednie ryzyko; HR (high risk) – wysokie ryzyko*

**szpik M1  $< 5\%$  blastów; szpik M2 5-25% blastów; szpik M3  $> 25\%$  blastów**

*\*przynajmniej 1 kryterium musi być spełnione*

### 1.1.3. Leczenie ostrej białaczki szpikowej

Wyniki leczenia dziecięcej ostrej białaczki szpikowej są nadal niezadowalające, co związane jest głównie z nawrotem choroby, lecz także w dużej mierze z toksycznością stosowanego leczenia: powikłaniami w postaci krwawień, infekcji i uszkodzeń mięśnia sercowego [9,18,25,26].

Programy lecznicze AML opierają się na intensywnej wielolekowej chemioterapii i odpowiednio dobranym leczeniu wspomagającym [7,9]. Obecnie, dzięki strategiom terapeutycznym właściwie dobranym do grup ryzyka, przewiduje się dalszą poprawę rokowania u pacjentów z AML [7,27]. W Polsce leczenie AML oparte jest na protokołach BFM – dla grupy standardowego i wysokiego ryzyka [9]. Stratyfikację dzieci z ostrą białaczką szpikową ujętą w programie leczenia (Załącznik 3) przedstawiono w Tabeli 1.1.3.1.

**Tabela 1.1.3.1.** Stratyfikacja dzieci z ostrą białaczką nieлимfoblastyczną (ANLL).

	<b>Grupa standardowego ryzyka (SR)</b>	<b>Grupa wysokiego ryzyka (HR)</b>
dzień 0	wg FAB każdy typ AML poza M5	wg FAB każde M5
dzień 15	blasty w szpiku $\leq 5\%$	blasty w szpiku $> 5\%$
dzień 22-29	brak odnowy blastycznej w szpiku kostnym	odnowa blastyczna w szpiku kostnym
<i>SR (standard risk) – niskie ryzyko; HR (high risk) – wysokie ryzyko</i>		

U części pacjentów, u których istnieją ściśle określone wskazania ze względu na wysoki stopień zaawansowania choroby, leczenie rozpoczyna się chemoterapią cytoredukcyjną arabinozydem cytozyny (Ara-C) i 6-tioguaniną (6-TG). Bezpośrednio po fazie cytoredukcji wdraża się leczenie indukujące remisję (jednakowe dla obu grup ryzyka) zawierające arabinozyd cytozyny (Ara-C), idarubicynę, etopozyd i Ara-C dokanałowo (Ara-C IT) [9,28].

W ostrej białaczce szpikowej, podobnie jak w limfoblastycznej, dalsze etapy leczenia różnią się dla poszczególnych grup ryzyka – w leczeniu grupy HR stosuje się bardziej intensywne leczenie, kwalifikując niektórych pacjentów do allo- lub autologicznego przeszczepu szpiku kostnego po zakończeniu bloków konsolidujących [7,9].

U wszystkich dzieci z AML stosuje się profilaktykę zmian w OUN w postaci dokanałowej podaży cytarabiny (Ara-C), a u pacjentów powyżej 1. roku życia, po zakończeniu intensyfikacji, profilaktycznie napromienia się czaszkę [9,28]. Leczenie klinicznie jawnej białaczki OUN przeprowadza się za pomocą trójlekowej terapii dokanałowej (Ara-C, MTX, hydrokortyzon) i leczniczych dawek napromieniania czaszki [28].

W ostrej białaczce promielocytowej (APL, M3 wg klasyfikacji FAB), począwszy od leczenia indukcyjnego, stosuje się kwas transretinowy (ang. *all-transretinoid acid*; ATRA) [29]. Działanie tego leku polega na indukcji różnicowania blastów w dojrzałe granulocyty (usuwane następnie

przez histiocyty szpiku kostnego) [30], a dołączenie go do stosowanych obecnie programów terapeutycznych przyczyniło się do uzyskania 80-90% całkowitej remisji u chorych z APL [29,31].

Leczenie podtrzymujące remisję w programie ANLL-98 trwa do 2 lat od początku leczenia w grupie SR i dokładnie 12 miesięcy w grupie HR. We wszystkich podtypach AML polega ono na podawaniu 6-tioguaniny doustnie (40mg/m<sup>2</sup>) codziennie i arabinozydu cytozyny podskórną (40mg/m<sup>2</sup>) w cyklach 4-dniowych co 4 tygodnie [9,28].

## 1.2. Chłoniak nieziarniczny u dzieci

### 1.2.1. Cechy kliniczne i diagnostyka NHL

Nieziarnicze chłoniaki złośliwe (NHL) stanowią bardzo niejednorodną grupę nowotworów złośliwych wywodzących się z układu chłonnego, z komórek limfoidalnych linii B i T o różnym stopniu zróżnicowania [32]. Klasyfikacja NHL opiera się na badaniu histologicznym, immunologicznym i cytochemicznym.

Od 1998 roku obowiązuje uaktualniona wersja klasyfikacji R.E.A.L (Revised European-American Lymphoma classification) [33] w postaci klasyfikacji WHO (klasyfikacja Światowej Organizacji Zdrowia), która dzieli nowotwory limfoidalne pod względem morfologii i linii komórkowej, z której się wywodzą, na 3 główne kategorie: nowotwory B-komórkowe, T/NK-komórkowe oraz ziarnicę złośliwą (chorobę Hodgkina) [34].

U dzieci występuje 5 spośród 23 typów NHL ujętych w klasyfikacji R.E.A.L. Wszystkie one należą do chłoniaków o wysokim stopniu złośliwości [35] (Tabela 1.2.1.1).

W wieku rozwojowym dominuje nieziarniczy chłoniak B-komórkowy (około 50%); natomiast NHL T-komórkowy i anaplastyczny wielkokomórkowy stanowią odpowiednio 35 i 15% [35].

**Tabela 1.2.1.1.** Podział chłoniaków nieziarniczych u dzieci według uaktualnionej klasyfikacji R.E.A.L. / klasyfikacji WHO (za Harris N. L. i wsp., 2000 oraz Bogusławska-Jaworska J. i Kowalczyk J.R., 2006) [34,35].

<b>Chłoniaki nieziarnicze B-komórkowe</b>
<i>NHL z prekursorów komórek B</i>
Prekursorowy B-komórkowy limfoblastyczny chłoniak/białaczką (LBL/B-ALL)
<i>NHL dojrzałe(obwodowe) B-komórkowe</i>
Chłoniak Burkitt'a
Chłoniak B-komórkowy „Burkitt like”
<b>Chłoniaki nieziarnicze T/NK-komórkowe</b>
<i>NHL z prekursorów komórek T</i>
Prekursorowy T-komórkowy limfoblastyczny chłoniak/białaczką (LBL/T-ALL)
<i>NHL dojrzałe(obwodowe) T- i NK-komórkowe</i>
Chłoniak anaplastyczny wielkokomórkowy K1 (CD30+)

Pacjenci z chłoniakiem nieziarniczym prezentują często początkowo niewiele objawów. Kliniczny obraz choroby zależy od pierwotnego umiejscowienia i stopnia zaawansowania NHL, a także koreluje z typem komórek, z których jest zbudowany [35]. Najczęstsze objawy kliniczne przedstawiono w Tabeli 1.2.1.2 za Bogusławska-Jaworska J. i Kowalczyk J. R. [35].



**Tabela 1.2.1.2.** Najczęstsze objawy chłoniaków nieziarnicznych u dzieci (na podstawie Bogusławska-Jaworska J. i Kowalczyk J. R., 2006) [35].

Typ NHL	Objawy kliniczne
<b>B-NHL</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• szybko rosnący guz jamy brzusznej (niedrożność przewodu pokarmowego, płyn w jamie brzusznej, bóle brzucha, wymioty, krwawienia)</li> <li>• guz kości w obrębie gardła lub szczęki</li> <li>• zajęcie szpiku kostnego (zespół leukemia/lymphoma)</li> <li>• zespół ostrej lizy guza</li> </ul>
<b>T-NHL</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ guz śródpiersia (kaszel, ból w klatce piersiowej, duszność)</li> <li>▪ wysięk w opłucnej i osierdziu</li> <li>▪ zespół żyły głównej górnej</li> </ul>
<b>NHL wielkokomórkowy</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ rzadkie umiejscowienie pozawęzłowe (mózg, skóra, kości, płuca, tkanki miękkie twarzy)</li> <li>◆ guz śródpiersia</li> <li>◆ guz przewodu pokarmowego</li> </ul>

Ważnym czynnikiem prognostycznym, który jest podstawą klasyfikacji klinicznej NHL według Murphy'ego, jest pierwotna lokalizacja guza i wielkość jego masy (Tabela 1.2.1.3) [36]. Ten system klasyfikacji wyodrębnia grupy chorych w I i II stadium (korzystne rokowniczo) oraz w III i IV stadium (z lokalizacjami niekorzystnymi rokowniczo). Istotnym czynnikiem rokowniczym w chłoniakach nieziarnicznych u dzieci jest również wstępna aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w surowicy krwi, która koreluje ściśle z wielkością masy guza pierwotnego [35].

**Tabela 1.2.1.3.** Klasyfikacja kliniczna chłoniaków nieziarnicznych u dzieci według Murphy'ego [36].

Stadium kliniczne	Kryteria klasyfikacji
I	Pojedyncza grupa węzłowa (z wyłączeniem śródpiersia i jamy brzusznej) lub pojedynczy guz pozawęzłowy.
II	Dwie lub więcej grup węzłowych po tej samej stronie przepony. Pojedynczy guz pozawęzłowy z zajęciem regionalnych węzłów chłonnych. Dwa guzy pozawęzłowe po tej samej stronie przepony z jednoczesnym zajęciem lub bez zajęcia regionalnych węzłów chłonnych. Jeden pierwotny guz przewodu pokarmowego, zwykle w okolicy krzyżowo-biodrowej, z zajęciem (lub bez) węzłów kręzkowych.
III	Dwie lub więcej grup węzłowych po obu stronach przepony. Dwa pojedyncze guzy pozawęzłowe po obu stronach przepony. Wszystkie pierwotne guzy w klatce piersiowej (śródpiersie, opłucna, grasica). Wszystkie okołordzeniowe lub nadoponowe guzy. Rozprzestrzenione guzy pierwotne jamy brzusznej (które nie mogą być usunięte chirurgicznie).
IV	Wszystkie guzy węzłowe i pozawęzłowe przebiegające z równoczesnym zajęciem szpiku kostnego i/lub ośrodkowego układu nerwowego.

Chłoniaki nieziarniczne wywodzące się z komórek B, jak i T-komórkowe, w których komórki chłoniakowe zajmują powyżej 25% ogółu elementów szpiku kostnego (stadium IV wg klasyfikacji Murphy'ego), traktowane są jako białaczki [37]. Zespół ten, określany jako „leukemia/lymphoma”, występuje z częstością 2-5% wszystkich białaczek i powinien być leczony schematem dla NHL [35,38]. Z zajęciem szpiku kostnego współistnieje często wstępne zajęcie ośrodkowego układu nerwowego (stadium IV wg klasyfikacji Murphy'ego) [35].

Strategia leczenia NHL u dzieci opiera się na wielolekowej chemioterapii dobranej do postaci histopatologicznej, immunofenotypowej, stopnia zaawansowania klinicznego i grupy ryzyka [32].

Stratyfikację dzieci z NHL B-komórkowym przedstawia Tabela 1.2.1.4.

**Tabela 1.2.1.4.** Stratyfikacja dzieci z chłoniakiem nieziarnicznym.

<b>Grupa ryzyka</b>	<b>Kryteria klasyfikacji</b>
<b>grupa A</b> (niskiego ryzyka)	całkowicie zresekowane stadium I całkowicie zresekowane stadium II o lokalizacji brzusznej
<b>grupa B</b> (pośredniego ryzyka)	pozostałe (niecałkowicie zresekowane stadium I i II; stadium II o lokalizacji innej niż brzuszna; stadium III; stadium IV <25% blastów w szpiku kostnym)
<b>grupa C</b> (wysokiego ryzyka)	stadium IV $\geq$ 25% blastów w szpiku kostnym i/lub zajęcie OUN

### 1.2.2. Leczenie NHL u dzieci

Leczenie chłoniaków nieziarnicznych u dzieci, podobnie jak innych nowotworów, ulega modyfikacjom na przestrzeni lat na podstawie obserwacji dotyczących skuteczności leczenia i związanych z nim powikłań. W ciągu ostatnich 20 lat nastąpił znaczny postęp w leczeniu NHL dzięki intensyfikacji stosowanej chemioterapii [32].

Chemioterapia stosowana w NHL składa się z leków skutecznych również w ostrych białaczkach limfoblastycznych [35]. Obecnie w leczeniu stosuje się schematy terapeutyczne różne dla B- i T-komórkowego NHL, a w obrębie tych programów dzieli się pacjentów pod względem stopnia zaawansowania choroby. Wśród pacjentów z T-NHL wyróżnia się grupę SR, obejmującą stadium I i II zaawansowania choroby oraz grupę HR – dla stadium III i IV [39,40]. Dzieci z B-NHL podlegają stratyfikacji na podstawie zakresu resekcji guza, stadium zaawansowania, pierwotnej lokalizacji oraz wyjściowej aktywności LDH w surowicy krwi [41,42].

W Polsce w latach 1993-2003 w chłoniakach nieziarnicznych B-komórkowych u dzieci i młodzieży stosowano program B-NHL 93 opracowany przez PPGLBiCh na podstawie LMB-89, a od 2003 wprowadzono B-NHL BFM 04 [32,41,42]. Większość protokołów stosowanych obecnie dla B-NHL (również te wymienione powyżej) opiera się na podawaniu cyklofosfamidu, ifosfamidu, metotreksatu w wysokich dawkach, cytarabiny,

winkrystyny, doksorubicyny, etopozydu, prednizonu i deksametazonu. Leki te podawane są w różnych kombinacjach i najczęściej w krótkich, kilkudniowych cyklach [35,41,42]. Leczenie jest tym intensywniejsze, im wyższy jest stopień ryzyka. Stopnie te określane są jako: A (całkowicie zresekowane stadium I i brzuszna lokalizacja stadium II), B (wszystkie poza A i C) oraz C (stadium IV, zajęcie szpiku i OUN lub zajęcie szpiku  $\geq 25\%$ ) (Tabela 1.2.1.4) [44].

W leczeniu chłoniaków B-komórkowych stosuje się też profilaktykę lub leczenie zajęcia OUN za pomocą trójlekowej terapii dokanałowej (Ara-C, MTX, prednizolon/hydrokortyzon) i nie stosuje się leczenia podtrzymującego remisję [41,42].

Programy lecznicze dla dziecięcych NHL T-komórkowych również uległy zmianie: w latach 1993-2003 obowiązywał w Polsce – opracowany przez PPGLBiCh na podstawie NHL-BFM 90 – schemat NB-NHL 93, a od 2003 wprowadzono EURO LB 02 [32,39,40,43]. Programy lecznicze dla T-NHL zasadniczo są podobne do protokołów terapeutycznych stosowanych w ALL [35,38] – składają się z leczenia indukującego remisję, konsolidacji, reindukcji (dla grupy HR – stadia III i IV) oraz leczenia podtrzymującego remisję. W profilaktyce zajęcia OUN stosuje się MTX IT, a u pacjentów z zajęciem centralnego układu nerwowego – dodatkowe dawki MTX IT oraz napromienianie czaszki [35,38-40]. Pacjenci z T-NHL, będący w programie EURO LB 02, podlegają randomizacji i w zależności od jej wyniku leczenie podtrzymujące trwa u nich do końca 18. lub 24. miesiąca od początku chemioterapii i polega na podawaniu 6-merkaptopuryny (6-MP) w dawce dobowej  $50\text{mg}/\text{m}^2$  oraz  $20\text{mg}/\text{m}^2$  metotreksatu (MTX) raz w tygodniu [40].

### **1.3. Zaburzenia immunologiczne u chorych z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarnicznym w momencie rozpoznania**

W białaczkach i chłoniakach już w momencie ustalania rozpoznania obserwowane są zmiany w układzie immunologicznym w postaci zaburzeń dojrzewania, różnicowania i aktywacji poszczególnych jego składowych. Związane jest to z rozwojem nowotworu w układach krwiotwórczym i limforetikularnym [45]. Każdy z nowotworów cechuje przewaga zaburzeń określonego typu odporności, jednak – ze względu na wzajemne powiązanie działania różnych typów odpowiedzi immunologicznej – upośledzenie funkcjonowania jednego z nich zaburza działanie drugiego.

#### **1.3.1. Zaburzenia immunologiczne w ostrej białaczce**

Zaburzenia immunologiczne w ostrych białaczkach limfoblastycznych i mieloblastycznych są podobne [45]. Wskutek zajęcia szpiku kostnego przez komórki nowotworowe dochodzi do zmniejszenia prawidłowej przestrzeni i stłumienia funkcji tego narządu, w związku z czym we krwi obwodowej obserwuje się znaczne zmniejszenie liczby komórek układu immunologicznego, czyli granulocyto- i limfopenię.

Hitzig W. H. i wsp., prowadząc badania u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną, obserwowali obniżoną całkowitą liczbę zarówno limfocytów B, jak i T [46]. Natomiast Panoskaltis N. i wsp. zaobserwowali tendencję do niższych wartości bezwzględnej liczby limfocytów T CD8<sup>-</sup> oraz komórek NK oraz wyższych wartości komórek T CD8<sup>+</sup> we krwi pacjentów z AML w porównaniu z wartościami obserwowanymi w grupie kontrolnej [47].

Wielu autorów obserwowało również istniejące przy rozpoznaniu zaburzenia czynności granulocytów – upośledzenie zdolności migracji oraz wewnątrzkomórkowego zabijania sfagocytowanych mikroorganizmów [48-50], które wracały do normy po osiągnięciu remisji [48]. Z kolei Powell B.L. i współpracownicy, na podstawie badań prowadzonych

u pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki przed rozpoczęciem chemioterapii, wyodrębnili subpopulacje granulocytów o prawidłowej i zwiększonej zdolności niszczenia drobnoustrojów za pomocą mechanizmów tlenowych [51]. Według Bassøe C-F. u pacjentów z ostrą białaczką szpikową rozwinął się mechanizm kompensacji obniżonej ogólnej zdolności żernej leukocytów zapewniany przez liczne niedojrzałe i dojrzałe leukocyty białaczkowe [52]. Fagocytoza przez te komórki była zależna od udziału dopełniacza i odpowiednich receptorów na komórkach białaczkowych. Dzięki temu granulocyty i monocyty izolowane od tych pacjentów miały zdolność żerną zbliżoną do obserwowanej w grupie kontrolnej [52].

Obok obniżenia liczby limfocytów i ich subpopulacji u pacjentów z ostrą białaczką występują też zaburzenia funkcji tych komórek obserwowane przez badaczy w postaci znacznie obniżonej odpowiedzi proliferacyjnej na stosowaną *in vitro* fitohemaglutyninę (PHA) [46,53], obecności inhibitorów proliferacji w surowicy badanych pacjentów czy bezpośredniego uszkodzenia limfocytów [53]. Van den Hove L. E. i wsp. wykazali natomiast ogólną aktywację komórek CD3<sup>+</sup> w chwili rozpoznania [54].

Poszukując przyczyn osłabienia odpowiedzi immunologicznej „przeciwbiałaczkowej”, Maecker B. i współpracownicy badali obecność komórek dendrytycznych (DC) we krwi obwodowej dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną i wykazali obniżoną liczbę ich subpopulacji przypominającej plazmocyty (pDC) w stosunku do subpopulacji szpikowej (mDC) [55].

U pacjentów z białaczkami prowadzonych jest również wiele prac badawczych dotyczących równowagi cytokinowej układu Th1/Th2 zarówno w momencie rozpoznania, w trakcie leczenia, jak i po zakończeniu chemioterapii. Zarówno Zhang X-L. i wsp. [56], jak i Łuczyński W. i wsp. [57] obserwowali przewagę subpopulacji Th2, w postaci wzrostu odsetka limfocytów CD4<sup>+</sup> z koekspresją receptora interleukiny 4 (IL-4) w momencie

rozpoznania ALL u dzieci, a Zhang X-L. i wsp. dodatkowo również obniżenie odsetka limfocytów z koekspresją receptora interferonu (IFN)- $\gamma$  i IL-2 [56].

Panoskaltsis N. i wsp. wykazali natomiast, iż leukocyty pacjentów z AML produkują spontanicznie cytokiny (w przeciwieństwie do leukocytów grupy kontrolnej). Obserwowali oni większą niż u osób zdrowych produkcję IL-10, IL-12 i IFN- $\gamma$  przez prawidłowe limfocyty T oraz zdecydowaną przewagę produkcji IFN- $\gamma$  przez blasty [47]. Buggins A.G. i współpracownicy wykazali, iż nadsącz komórek AML, nie zawierający żadnych znanych czynników immunosupresyjnych, hamuje aktywację komórek Th1 i wytwarzanie cytokin Th1 [58]. Zaś prace Chen Y. i wsp. wskazują na małe stężenie TGF- $\beta$  (ang. *transforming growth factor- $\beta$* ) w surowicy pacjentów z białaczką [59], białka uznanego za cytokinę o właściwościach immunosupresyjnych [60].

Najmniej nasilone zmiany w momencie rozpoznania ostrej białaczki wydają się dotyczyć odpowiedzi humoralnej – poziom immunoglobulin jest tylko nieznacznie obniżony, a zdolność do pierwotnej i wtórnej odpowiedzi immunologicznej – zachowana [46].

### **1.3.2. Zaburzenia immunologiczne w chłoniaku nieziarniczym**

Obserwowane przez badaczy zaburzenia immunologiczne, istniejące w momencie rozpoznania chłoniaka nieziarniczego, zależą często od postaci, typu histologicznego i stopnia zaawansowania choroby [61-64].

W postaci rozsianej NHL obserwowano obniżoną całkowitą liczbę limfocytów [61,62] oraz populacji limfocytów T [61], podczas gdy u pacjentów z postacią węzłową chłoniaka zarówno bezwzględna liczba limfocytów, jak i liczba komórek B i T była porównywalna z wartościami w grupie kontrolnej [61,62]. Caldera L. H. i współpracownicy nie stwierdzili zaburzeń ilościowych populacji limfocytów (komórek CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>

i CD56<sup>+</sup>) we krwi obwodowej i szpikowej u pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym w porównaniu z osobami zdrowymi [65].

Różnice między postacią rozsianą i węzłową NHL były obserwowane również w zakresie odporności komórkowej, mierzonej testem opóźnionej nadwrażliwości skórnej na stosowane antygeny – bardziej upośledzoną reakcję („anergię skórną”) prezentowały osoby z postacią rozsianą NHL [61-63]. Pacjenci ci wykazali się też obniżoną reaktywnością limfocytów na stosowane mitogeny (fitohemaglutyninę – PHA i mitogen szkarłatki – PWM) [61].

Część autorów obserwowała hipogammaglobulinemię u pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym – obniżony poziom IgG i IgA u osób z postacią węzłową oraz obniżony poziom IgA w postaci rozsianej NHL [61,62]. Advani S. H. i współpracownicy wykazali natomiast podwyższony poziom IgG przy współistniejących prawidłowych wartościach IgA i IgM, niezależnie od typu histologicznego i stopnia zaawansowania choroby [63]. Odmienne obserwacje poczynili Watanabe S. i wsp., opisując hipergammaglobulinemię poliklonalną u pacjentów z chłoniakiem T-komórkowym [66].

W chłoniaku nieziarnicznym obniżona jest też aktywność cytotoksyczna komórek NK [64,65,67]. Caldera L. H. i współpracownicy obserwowali to zjawisko zarówno we krwi obwodowej, jak i w szpiku kostnym [65]. Natomiast zespół Konjević G. udowodnił, iż obniżona aktywność komórek NK jest zależna od klinicznego stopnia zaawansowania choroby i typu histologicznego NHL – im bardziej zaawansowana choroba i bardziej złośliwy typ chłoniaka, tym niższa aktywność komórek NK, a także wyższa skłonność tych komórek do spontanicznego uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (LDH) [64]. Tursz T. i wsp. w badaniach przeprowadzonych u 37 pacjentów z NHL również obserwowali obniżoną aktywność komórek NK, nie wykazując jednak istotnych różnic między grupami chorych z różnym stopniem zaawansowania choroby [67].



Mimo upośledzonej aktywności komórek NK, skuteczna była ich stymulacja za pomocą rekombinowanej interleukiny-2 (rIL-2): we krwi obwodowej pacjentów z NHL porównywalnie do osób z grupy kontrolnej, natomiast w szpiku kostnym zdecydowanie bardziej u osób chorych, co może świadczyć o większej liczbie prekursorów komórek NK niż ich dojrzałych postaci w szpiku kostnym osób z NHL [65].

Spośród zmian w układzie immunologicznym w chłoniaku nieziarniczym stwierdzano także wysokie stężenie rozpuszczalnego receptora interleukiny-2 (IL-2R) [68] i rozpuszczalnej formy cząsteczki adhezyjnej ICAM-1 [69] w surowicy osób chorych oraz wykazano, że ich stężenie w surowicy ma wartość prognostyczną i koreluje z przebiegiem choroby [68,69].

#### **1.4. Wpływ leków przeciwnowotworowych na układ immunologiczny**

Intensywna chemio- i radioterapia, będące podstawą współczesnej terapii chłoniaków nieziarniczych i ostrych białaczek, czasem również w połączeniu z megachemioterapią i przeszczepem szpiku kostnego, znacznie przyczyniły się do poprawy rokowania w tych chorobach. Jednak konsekwencją tak agresywnego, skojarzonego leczenia jest jednocześnie występowanie licznych powikłań zarówno ostrych, będących bezpośrednim efektem działania leków, jak i odległych. Jednym z głównych i stałych objawów ubocznych terapii przeciwnowotworowej u dzieci jest mielosupresja [70] i związane z nią upośledzenie działania układu immunologicznego, które było obserwowane już w latach siedemdziesiątych XX wieku u pacjentów wyleczonych z ostrej białaczki limfoblastycznej [71].

Cytostatyki uszkadzają aktywnie dzielące się komórki ukierunkowane liniowo i prekursorowe, w różnych okresach cyklu komórkowego [72], oraz w znacznie mniejszym stopniu komórki macierzyste, a oszczędzają zwykle komórki dojrzałe [70]. Działanie to zależy od struktury chemicznej

związku, wielkości dawki i sposobu podawania leku [72,73]. Antymetabolity uszkadzają przede wszystkim komórki proliferujące i dojrzewające, a leki alkilujące – komórki macierzyste w fazie spoczynkowej cyklu komórkowego (G<sub>0</sub>) i w mniejszym stopniu komórki proliferujące [73].

Wczesnym efektem działania toksycznego większości cytostatyków na szpik kostny jest uszkodzenie komórek charakteryzujących się krótkim okresem przeżycia, czyli limfopenia, granulocytopenia i małopłytkowość [73]. Neutropenia, czyli liczba granulocytów obojętnochłonnych poniżej 1500/mm<sup>3</sup> [74], zależy od zastosowanej dawki i rodzaju cytostatyku. Najniższą liczbę granulocytów (ang. *nadir*) obserwuje się średnio po około 8-10 dniach po zastosowanym leku, a odtworzenie tych komórek następuje po kolejnych 3-4 tygodniach [70].

Mechanizm działania, ogólny efekt mielosupresyjny cytostatyków stosowanych w ostrych białaczkach i NHL u dzieci oraz ich wpływ na układ białokrwinkowy przedstawiono w Tabeli 1.4.1.

**Tabela 1.4.1.** Środki stosowane w terapii ostrych białaczek i chłoniaków nieziarniczych: mechanizm działania i mielotoksyczność (na podstawie Madej G., 1994, Madej G. i wsp., 1999, McKenna S. 1996, Danysz A. i wsp., 1998) [11,75-77].

	Mechanizm działania	Mielo-supresja	Leukopenia z nadirem	
			po (dni):	czas trwania (dni):
<b>Leki alkilujące</b>				
cyklofosfamid	uszkodzenie struktury DNA	++	8-14	7-14
ifosfamid	w wyniku alkilacji	+	7-10	?
<b>Antymetabolity</b>				
metotreksat	inhibitor reduktazy dihydrofolianowej	++	7	?
6-merkaptopuryna	inhibitory aminotransferazy	++	?	?
6-tioguanina	fosforybozylpiro-fosforanowej	++	10-14	?
cytarabina	inhibitor polimerazy DNA	++	5-7	14-21

	Mechanizm działania	Mielo-supresja	Leukopenia z nadirem	
			po (dni):	czas trwania (dni):
<b>Antybiotyki antracyklinowe</b>				
daunorubicyna	rozszczepienie podwójnego łańcucha DNA	++	7-14	14-21
doksorubicyna	z udziałem topoizomerazy II	++	10-14	21
idarubicyna		++	?	?
<b>Alkaloidy roślinne</b>				
winblastyna	inhibitory tworzenia wrzeciona mitotycznego	+++	?	?
winkrystyna		+/-	?	?
windezyna		+++	4-10	?
etopozyd		++	7-14	20
<b>Enzymy</b>				
L-asparaginaza	opóźnienie przejścia komórek z fazy G <sub>1</sub> do fazy S	+/-	-	-
<b>Hormony</b>				
prednizon	limfocytoliza, opóźnienie przejścia komórek z fazy G <sub>1</sub> do fazy S	_*	_*	_*
deksametazon		_*	_*	_*
<b>Pochodne witamin</b>				
kwas retinowy	aktywacja procesu różnicowania niedojrzałych komórek	_**	_**	_**
<b>Promieniowanie gamma</b>				
	cytotoksyczność indukowana rodnikami tlenu	++	7-14	14-21
+/- - b. rzadko; + - rzadko; ++ - często; +++ - b. często; * - leukocytoza; ** - b. znaczna leukocytoza; ? - brak danych				

Wszystkie cytostatyki i kortykosteroidy stosowane w leczeniu ostrych białaczek i chłoniaków nieziarnicznych wykazują różnego stopnia działanie immunosupresyjne. Stosowane w wielolekowych programach terapeutycznych powodują zaburzenia dotyczące całego systemu: obniżenie liczby komórek i/lub zaburzenie funkcji limfocytów, granulocytów, monocytów-makrofagów i innych składowych układu immunologicznego obserwowane już w trakcie leczenia przeciwnowotworowego [78-93].

Programy terapeutyczne wzbogacone o radioterapię indukują silny efekt mielosupresyjny, czego konsekwencją jest głęboka i dłużej trwająca immunosupresja. Energia jonizująca uszkadza zarówno komórki dzielące się, jak i pozostające w spoczynku, upośledza zarówno odpowiedź komórkową, jak i humoralną [72].

Niektórzy autorzy [72,73], opisując niekorzystny wpływ chemioterapii na szpik kostny i składowe układu immunologicznego, podkreślają możliwość wpływu powtarzanych małych dawek cytostatyków (zwłaszcza z grupy antymetabolitów) na utrzymywanie się i potęgowanie obserwowanych zaburzeń po kolejnych dawkach tych leków. Poza okresem leczenia intensywnego może to dotyczyć leczenia podtrzymującego remisję, w czasie którego leki – w małych dawkach – podawane są w sposób ciągły (6-MP, 6-TG) lub cyklicznie (MTX, Ara-C), co może wywierać dłuższy i silniejszy wpływ immunosupresyjny w porównaniu z terapią przerywaną w czasie leczenia intensywnego [72].

### **1.5. Odnowa układu immunologicznego po zakończonym leczeniu przeciwnowotworowym**

Po zakończeniu intensywnej terapii przeciwnowotworowej i w trakcie leczenia podtrzymującego remisję dzieci z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarnicznym przebywają w domu, chodzą do szkoły, a więc narażone są na kontakt z pospolitymi czynnikami infekcyjnymi, które u osób bez zaburzeń odporności wywołują jedynie skąpoobjawowe lub bezobjawowe infekcje, a u tych dzieci mogą prowadzić do rozwoju zakażeń o cięższym przebiegu.

Dotychczasowe badania wskazują, że stan supresji immunologicznej może utrzymywać się osobniczo różnie długo po zakończeniu terapii przeciwnowotworowej. Zdaniem wielu autorów regeneracja układu odpornościowego następuje w ciągu 6-12 miesięcy od zakończenia leczenia przeciwnowotworowego [87,92-94], aczkolwiek niektórzy badacze wykazali

obniżony stosunek limfocytów CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> do 3 lat po leczeniu [95] czy zaburzoną funkcję komórek NK u pacjentów z ALL do 2-3 lat po terapii [78,96]. U niektórych spośród badanych dzieci z ostrą białaczką i NHL stwierdzono obniżoną liczbę limfocytów B nawet po 10 latach od zakończenia leczenia przeciwnowotworowego [90], a u opisanych w innej pracy pacjentów z ALL – utrzymujące się ponad 11 lat zaburzenia wytwarzania i funkcji interleukiny 2 oraz ekspresji jej receptora [97]. Ponadto Mazur i wsp. po 12 miesiącach od całkowitego zakończenia terapii przeciwnowotworowej u dzieci z ALL wykazali utrzymującą się niską liczbę komórek CD4<sup>+</sup> zarówno subpopulacji CD45RA<sup>+</sup>, jak i CD45RO<sup>+</sup>, co może świadczyć o nieznacznie obniżonym potencjale regeneracyjnym układu immunologicznego u tych pacjentów [93].

Większość autorów, podejmujących badania w grupach dzieci z różnymi schorzeniami nowotworowymi, jest zgodna, iż u chorych z ostrą białaczką supresja układu immunologicznego jest głębsza i utrzymuje się dłużej niż u pacjentów z guzami litymi [78,92,96]. Jednakże jak dotąd nie zdefiniowano jednoznacznie zjawisk immunologicznych ważkich dla przedłużającego się okresu obniżenia sprawności funkcji układu immunologicznego po zakończonej terapii przeciwnowotworowej.

#### **1.6. Rola układu odporności nieswoistej w ograniczaniu infekcji u pacjentów po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego**

Jak podano wcześniej, leczenie immunosupresyjne, w tym również przeciwnowotworowe, prowadzi do zaburzeń odporności humoralnej i komórkowej. Zakres tych specyficznych odpowiedzi zależy przede wszystkim od aktywności układu odporności nieswoistej, który jest modulatorem odpowiedzi swoistej [98]. Układ ten pełni rolę w zapewnieniu gotowości obronnej organizmu, zanim dojdzie do inwazji drobnoustrojów, również w postaci bariery skórnej i błon śluzowych. Do jego zadań należy też

zapobieganie rozprzestrzenianiu się zakażenia, szczególnie w jego wczesnym okresie (0-5. dzień). W wielu przypadkach prawidłowa aktywność mechanizmów nieswoistych jest tak skuteczna, że nie dochodzi w ogóle do zaangażowania limfocytów T i B [99]. Upośledzenie działania tych mechanizmów w wyniku leczenia przeciwnowotworowego może mieć istotny wpływ na rodzaj i przebieg infekcji u pacjentów w okresie po zakończeniu terapii, zwłaszcza iż dodatkowym czynnikiem sprzyjającym infekcjom u pacjentów poddanych chemioterapii jest uszkodzenie naturalnych barier ochronnych organizmu, czyli skóry i błon śluzowych, które stanowią główną drogę penetracji czynników zakaźnych. Spowodowane jest to stosowaniem cytostatyków (złuszczające działanie na komórki nabłonka przewodu pokarmowego i układu oddechowego), częstą antybiotykoterapią (wyjałowienie przewodu pokarmowego), a także licznymi zabiegami wykonywanymi u tych chorych w trakcie leczenia (stałe wkłucia dożylnie, częste iniekcje, sondy, cewniki).

Jakkolwiek tematowi zaburzeń odporności swoistej poświęcono wiele prac, nadal niewiele jest wiadomo na temat zaburzeń i rekonstrukcji układu odporności nieswoistej po leczeniu przeciwnowotworowym.

Trzonem odpowiedzi nieswoistej są komórki, z których najważniejsze to komórki NK (ang. *natural killer*) i komórki żerne (zwłaszcza granulocyty obojętnochłonne i monocyty/makrofagi). Nieswoistym działaniem charakteryzują się również niespecyficznie supresorowe i cytotoksyczne limfocyty T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup>.

### 1.6.1. Komórki NK

Komórki NK morfologicznie charakteryzowane są jako duże ziarniste limfocyty (LGL; ang. *large granular lymphocytes*), fenotypowo jako komórki CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+/-</sup>, które stanowią średnio 5-10% limfocytów krwi obwodowej [100]. Komórki te biorą udział we wczesnej odpowiedzi immunologicznej przeciwko różnym patologicznym mikroorganizmom [101], a ich główna funkcja jest związana ze zdolnością do spontanicznego niszczenia komórek zainfekowanych wirusem i transformowanych nowotworowo [98-102], w sposób niespecyficzny, bez wcześniejszej immunizacji [100,103] i niezależny od ekspresji MHC na komórkach docelowych [104]. Głównym i najefektywniejszym mechanizmem lizy komórek docelowych przez komórki NK jest cytotoksyczność zależna od perforyn zawartych w ziarnistościach [104]. Ich funkcją jest również wydzielanie różnych cytokin i chemokin: głównie interferonu- $\gamma$ , ale także TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-5, IL-13, MIP-1 i RANTES (CCL5) [104-107].

Efekt cytotoksyczny komórek NK w mechanizmie bezpośrednim regulowany jest przez dwa rodzaje sygnałów: aktywujących i hamujących, przekazywanych przez odpowiednie receptory (NKR; ang. *natural killer receptors*) znajdujące się na ich powierzchni [108]. Wśród nich wyróżnia się receptory z nadrodziny cząsteczek immunoglobulinopodobnych (KIR; ang. *killer cell immunoglobulin-like receptors*) [108-110] oraz receptory lektynowe (heterodimer CD94/NKG2) [108,109,111,112]. Każdy z typów receptorów posiada formy hamujące i aktywujące. Receptory hamujące charakteryzują się obecnością jednej lub więcej cytoplazmatycznej sekwencji ITIM (ang. *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*), zaś receptory aktywujące związane są z sekwencją ITAM (ang. *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) [108].

### 1.6.1.1. Komórki NK CD94<sup>+</sup> (CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>)

Cząsteczka CD94, glikoproteina należąca do nadrodziny lektyn, jest opisywana na większości komórek NK i części subpopulacji limfocytów T (głównie T $\gamma\delta$ ) [113,114]. Na niewielu komórkach NK cząsteczka ta występuje samodzielnie [109], wiadomo jednak również, że ze względu na brak domeny cytoplazmatycznej, zdolność do przekazania sygnału zyskuje dopiero po utworzeniu kompleksu z inną cząsteczką z nadrodziny lektyn - NKG2 [115-117] i z tego wiązania (w zależności od izoformy NKG2) wynika różnorodność jej funkcji [111,112,116,118,119]. Kompleksy cząsteczki CD94 z NKG2A (dominujący receptor komórek NK CD94<sup>+</sup>) [109] hamują aktywność cytotoksyczną komórek NK, a kompleksy z NKG2C i NKG2E pełnią funkcję aktywującą [111,120,121]. Utrzymanie odpowiedniego poziomu kompleksów CD94/NKG2A na powierzchni komórek NK, podobnie jak innych receptorów hamujących, jest wymagane do supresji stałej stymulacji tych komórek przez powiązania receptorów aktywujących [122,123], co pozwala na regulację odpowiedzi immunologicznej [117].

Dotychczas nie ma w literaturze światowej doniesień dotyczących ewentualnej supresji układu komórek NK, osłabienia ich funkcji cytotoksycznej i zwiększenia zapadalności na infekcje w przypadku zwiększonej liczby komórek NK CD94<sup>+</sup>/NKG2A<sup>+</sup>. Brak jest też w piśmiennictwie danych dotyczących ekspresji receptorów hamujących na komórkach NK po leczeniu przeciwnowotworowym u dzieci i jej ewentualnej korelacji z częstością i przebiegiem zakażeń po zakończeniu leczenia.

Wiadomo natomiast, że agresywna chemioterapia upośledza aktywność komórek NK znacznie bardziej i na dłużej niż wynikałoby to z obserwowanej liczby tych komórek we krwi obwodowej, która szybciej wraca do wartości prawidłowych [78,87,96,124,125]. Również stosowanie energii jonizującej w leczeniu białaczek i chłoniaków nieziarnicznych wywiera



działanie immunosupresyjne [72], choć według Yamada S. może nawet wywoływać efekt odwrotny w stosunku do komórek NK – zwiększać ich aktywność [126].

Jakkolwiek wiele jest prac dotyczących zwiększonej podatności na nawracające infekcje wirusowe i bakteryjne chorych z wrodzonym defektem komórek NK [127,128] czy też z upośledzoną ich funkcją u noworodków, zwłaszcza urodzonych przedwcześnie [129] lub osób w wieku podeszłym [130], brak jest w literaturze światowej korelacji wyników badań stanu komórek NK z przebiegiem klinicznym zakażeń po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego.

### **1.6.2. Komórki żerne – neutrofile i monocyty**

Zdolność fagocytarna komórek żernych krwi obwodowej, głównie granulocytów obojętnochłonnych i monocytów, odgrywa ważną rolę w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej. Wiąże się ona z pochłanianiem i wewnątrzkomórkowym zabijaniem różnych patogenów, zwłaszcza bakterii i grzybów, a także usuwaniem komórek uszkodzonych, starzejących się i apoptotycznych, a nawet pozostałości innych nieczynnych cząstek, jak lateksu czy tłuszczu [131]. Fagocyty uczestniczą również w rozwoju reakcji zapalnej, aktywowane wydzielają cytokiny, a także wzmagają aktywność przeciwnowotworową układu immunologicznego [131,132].

Prawidłowa funkcja fagocytów wspierana jest przez różnorodne czynniki surowicze, do których należą immunoglobuliny, cytokiny, składowe dopełniacza (C3) oraz białka ostrej fazy – między innymi białko C-reaktywne (CRP) [131-135]. Niszczenie wchłoniętego patogenu wymaga degranulacji wewnątrzkomórkowej i uruchomienia mechanizmów tlenowych, zależnych od aktywnych związków tlenu, i mechanizmów pozatlenowych [131,136].

Upośledzenie fagocytarnej funkcji komórek żernych znacząco wpływa na obronę i walkę organizmu z zakażeniami. Niektórzy badacze

obserwowali upośledzoną zdolność pochłaniania bakterii przez neutrofile jeszcze przed rozpoczęciem leczenia ostrej białaczki [137], inni – zaburzenia zdolności fagocytarnej dotyczące głównie monocytów i w niewielkim stopniu granulocytów obojętnochłonnych w ostrej fazie choroby [138]. Większość autorów opisuje natomiast wyraźny, negatywny wpływ chemioterapii na liczbę komórek żernych, a także na ich zdolność do pochłaniania i wewnątrzkomórkowego zabijania drobnoustrojów [72,80,81,138-141]. Dodatkowo zaburzenia te pogłębiane są przez stosowanie radioterapii w protokołach leczniczych [72,138,142].

Problem zwiększonej podatności na ciężkie, skąpoobjawowe i trudno poddające się leczeniu infekcje u pacjentów z ciężką neutropenią, czyli liczbą granulocytów obojętnochłonnych obniżoną poniżej  $0,5 \times 10^9/L$ , jest powszechnie znany [81,139,140,143]. Nie ma natomiast wielu prac dotyczących upośledzenia funkcji komórek żernych po zakończonym leczeniu przeciwnowotworowym i jednoznacznych obserwacji ich powrotu do stanu prawidłowego wraz z korelacją stopnia tych zaburzeń z zapadalnością na infekcje u pacjentów w okresie remisji.

### 1.6.3. Niespecyficznie supresorowe limfocyty T - $CD3^+CD8^{high}CD57^+$

Limfocyty T cytotoksyczne, o fenotypie  $CD3^+CD8^+$ , biorą udział w dalszych etapach odpowiedzi immunologicznej – odpowiedzi nabytej. Charakteryzują się zdolnością do niszczenia komórek zainfekowanych wirusem w reakcji cytotoksycznej oraz regulacją odpowiedzi immunologicznej poprzez wydzielanie cytokin. Badania nad fenotypem limfocytów T  $CD8^+$  ujawniły istnienie populacji charakteryzującej się wysoką ekspresją cząsteczki CD8 i obecnością cząsteczki CD57 ( $CD3^+CD8^{high}CD57^+$ ) [144]. Komórki te wykazują niespecyficzne właściwości cytotoksyczne i immunosupresyjne [144-146], wywierają hamujący wpływ na procesy cytotoksyczne i proliferację komórek T, a także proliferację i różnicowanie komórek NK i LAK (ang. *lymphokine activated killer*) [146]. Komórki

CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> wydają się mieć również supresyjny wpływ na limfocyty B [147]. Wykazano ich zwiększoną liczbę w stanach chorobowych przebiegających z immunosupresją: w przetrwałej i nawracającej infekcji wirusem cytomegalii (CMV) [144,148] czy w infekcji wirusem HIV (ang. *human immunodeficiency virus*) [149,150], a także u pacjentów z chorobą nowotworową: rakiem nerki [151], czerniakiem [152], szpiczakiem mnogim [153] oraz po przeszczepach narządów: nerek [154], serca [155] i szpiku kostnego [146,150,156]. Można przypuszczać, że obserwowane w tych stanach obniżenie odpowiedzi immunologicznej może być zależne od zwiększonej liczby i aktywności limfocytów CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup>.

Zasadne więc wydaje się również podjęcie badań tej populacji komórek u pacjentów z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarniczym po zakończonym leczeniu przeciwnowotworowym, gdy istnieje stan immunosupresji. Dotychczas nie opisywano w literaturze polskiej ani światowej wyników takich badań u podobnych pacjentów.

## 2. CELE PRACY

1. Określenie rodzaju zaburzeń immunologicznych z zakresu odporności nieswoistej po zakończeniu agresywnego leczenia przeciwnowotworowego u dzieci z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarnicznym.
2. Obserwacja powrotu badanych parametrów do stanu prawidłowego w okresie leczenia podtrzymującego remisję i po jego zakończeniu.
3. Wykazanie czy stan supresji w zakresie odporności nieswoistej wpływa na częstość i rodzaj zakażeń u badanych dzieci po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego.

### 3. MATERIAŁ I METODY

#### 3.1. Badana populacja

Do badań zakwalifikowano wstępnie 36 dzieci w wieku od 3 do 16 lat (średnia wieku 8,33 lat) z ostrą białaczką (limfoblastyczną - ALL i szpikową - AML) oraz chłoniakiem nieziarniczym (NHL) leczonych w Klinice Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii Akademii Medycznej w Gdańsku (kierownik: prof. dr hab. Anna Balcerska) (Tabela 3.1.1).

**Tabela 3.1.1.** Liczebność pacjentów w analizowanej grupie podzielonej pod względem rozpoznania i płci.

	ALL	AML	NHL	Σ
Chłopcy	14	0	5	19
Dziewczynki	11	3	3	17
Σ	25	3	8	<b>36</b>

Do badań kwalifikowano pacjentów pozostających w remisji choroby podstawowej w momencie zakończenia intensywnej terapii przeciwnowotworowej. Materiał do badań pobierano od dzieci podczas wizyt kontrolnych co 3 miesiące, począwszy od dnia przypadającego po 2 tygodniach od zakończenia leczenia intensywnego, a u pacjentów otrzymujących leczenie podtrzymujące remisję - od pierwszego dnia terapii. Spośród wszystkich pacjentów, zakwalifikowanych wstępnie do badań, wykluczono następnie troje dzieci ze względu na stwierdzenie u nich aktywnego procesu nowotworowego w okresie pierwszych 3 miesięcy po włączeniu do projektu (pacjenci nr 5, 17 i 24 z Tabeli 3.1.3). Wyników badań pochodzących od tych pacjentów nie uwzględniano w dalszej analizie.

Materiał do badań stanowiła krew żylna obwodowa pobierana do próbek z heparyną (do oznaczeń cytometrycznych, Phagotestu® i badania aktywności komórek NK) - 8 ml.

Większość pacjentów miała założone cewniki do żył centralnych (katetery) i przez nie pobierano krew do badań, pozostali pacjenci wymagali nakłucia żyły obwodowej (przy okazji rutynowych badań kontrolnych).

Schemat przebiegu przeprowadzonych badań oraz liczebność pacjentów w poszczególnych jego fazach przedstawiono w Tabeli 3.1.2.

**Tabela 3.1.2.** Liczebność pacjentów z analizowanej grupy w poszczególnych fazach badania.

Rozpoznanie	Badanie wstępne*	Ponowne pobranie krwi po:						
		3 mies.	6 mies.	9 mies.	12 mies.	15 mies.	18 mies.	24 mies.
ALL	23	22	20	17	11	10	8	3
AML	3	3	3	2	2	2	1	1
NHL	7	7	7	6	4	4	1	1
<b>wszyscy</b>	33	32	30	25	17	16	10	5

\* z wyłączeniem pacjentów zdyskwalifikowanych z projektu  
 ALL – ostra białaczka limfoblastyczna, AML – ostra białaczka szpikowa, NHL – chłoniak nieziarniczny

Jak wynika z powyższej tabeli, liczebność pacjentów w poszczególnych etapach badania była różna, co miało związek z krótszym okresem obserwacji u pacjentów stopniowo dołączanych do projektu, rezygnacją z dalszego udziału w badaniach w trakcie jego trwania w przypadku kilku pacjentów, z przerwami w obserwacjach z powodu niezgłoszenia się na badania w wyznaczonym wcześniej terminie, jak również – w przypadku jednej pacjentki z AML – wyłączeniem z projektu ze względu na decyzję o przeprowadzeniu autologicznego przeszczepu szpiku kostnego po 8 miesiącach obserwacji.

Grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych dzieci, w tym 9 (60%) dziewczynek, w wieku od 3 do 16 lat (średnia wieku 9,67 lat) bez objawów zaburzeń immunologicznych i bez cech klinicznych ostrej lub przewlekłej infekcji w dniu badania. Podstawą oceny ich stanu zdrowia był wywiad lekarski i badanie fizykalne.

Wszyscy pacjenci i ich opiekunowie prawni (rodzice) zostali poinformowani o celach i przebiegu badań oraz wyrazili pisemną zgodę na udział w projekcie (rodzice oraz dzieci powyżej 16. roku życia). Projekt badania został zaakceptowany przez Niezależną Komisję Bioetyczną do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku.

Dane kliniczne zbierane były przed włączeniem chorego do projektu w dwóch etapach: podczas wywiadu lekarskiego opartego na specjalnie do tego celu przygotowanej ankiecie (Załącznik 1) oraz na podstawie historii chorób prowadzonych w czasie hospitalizacji pacjentów w Klinice Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii AMG. Zbierano dane dotyczące rozpoznania, programu terapeutycznego i czasu trwania zastosowanego leczenia przeciwnowotworowego, powikłań infekcyjnych oraz istotnych incydentów neutropenii, wymagającej podaży czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF; ang. *granulocyte colony-stimulating factor*), powodujących istotne przerwy w terapii, a także dane oceniające status immunologiczny chorych przed rozpoznaniem choroby nowotworowej: rodzaj, częstość i przebieg zachorowań infekcyjnych, rodzaje stosowanych szczepień ochronnych, występowanie alergii oraz wywiad rodzinny ukierunkowany na zaburzenia immunologiczne. Charakterystykę kliniczną dzieci z grupy badanej z uwzględnieniem okresu follow-up po zakończeniu projektu przedstawiono w Tabeli 3.1.3.

Wywiad lekarski przeprowadzany każdorazowo przed pobraniem krwi do badań ukierunkowany był w szczególności na zachorowania infekcyjne (rodzaj, przebieg, wyniki badań laboratoryjnych) oraz rodzaj stosowanej terapii w okresie między badaniami.

**Tabela 3.1.3.** Charakterystyka kliniczna dzieci z grupy badanej wraz z follow-up (stan na dzień 1.07.2008<sup>g</sup>).

Lp	Pacjent	Rozpoznanie	Schemat leczenia	Grupa ryzyka	RT OUN (dawka w Gy)	Przyczyna niepowodzenia terapii	Czas po zakończeniu LP (mies.) <sup>g</sup>
1	C.D.*	ALL	ALL IC BFM 2002	SR-1	-	-	37
2	N.M.*	NHL-Tcell	NB-NHL 93	HR	-	-	50
3	B.J.*	ALL	ALL IC BFM 2002	SR-2	-	-	34
4	B.A.*	ALL	ALL IC BFM 2002	IR-1	-	-	35
5	P.J.†	ALL	ALL IC BFM 2002	IR-1	-	Mięsak Ewinga	-
6	L.M.*	AML-M3	ANLL-98	SR	24	-	22
7	L.N.*	NHL-Bcell	B-NHL 93	SR	-	-	44
8	K.A.*	NHL-Bcell	B-NHL 93	SR	-	-	42
9	K.M.*	ALL	ALL IC BFM 2002	IR-1	-	-	25
10	O.E.*	AML-M2	ANLL-98	SR	18	-	- **
11	D.A.*	ALL	ALL IC BFM 2002	SR-1	-	-	23
12	K.M.*	ALL	ALL IC BFM 2002	IR-1	-	-	43
13	U.K.*	ALL	ALL IC BFM 2002	HR-2B	12	-	26
14	L.W.*	AML-M3	ANLL-98	SR	18	-	15
15	K.T.*	ALL	ALL IC BFM 2002	IR-2	-	-	23
16	G.W.*	ALL	ALL IC BFM 2002	HR-2B	12	wznowa	-
17	S.K.†	NHL-Bcell/HD	B-NHL BFM 04	HR	-	wznowa/ progresja?	-
18	N.W.*	ALL	ALL IC BFM 2002	IR-1	-	-	22
19	C.A.*	ALL	ALL IC BFM 2002	HR-2B	-	-	22
20	O.A.*	ALL	ALL IC BFM 2002	SR-1	-	-	45
21	K.K.#	ALL	ALL IC BFM 2002	SR-1	-	wznowa	-
22	K.G.*	NHL-Bcell	B-NHL 93	SR	-	-	47
23	S.B.*	ALL	ALL IC BFM 2002	SR-1	-	-	27
24	B.W.†	ALL	ALL IC BFM 2002	IR-1	-	AML-M0	-
25	Ś.B.†	NHL-Bcell	B-NHL BFM 04	HR	-	wznowa	-
26	B.K.*	NHL-Bcell	B-NHL BFM 04	SR	-	-	30
27	A.I.*	ALL	ALL IC BFM 2002	SR-1	-	-	13



Lp	Pacjent	Rozpoznanie	Schemat leczenia	Grupa ryzyka	RT OUN (dawka w Gy)	Przyczyna niepowodzenia terapii	Czas po zakończeniu LP (mies.) <sup>&amp;</sup>
28	Ł.A.*	ALL	ALL IC BFM 2002	SR-1	-	-	17
29	M.K.*	ALL	ALL IC BFM 2002	SR-2	-	-	17
30	C.W. #	ALL	ALL IC BFM 2002	IR-1	-	wznowa	-
31	K.B. †	ALL	ALL IC BFM 2002	IR-1	-	wznowa	-
32	M.J.*	ALL	ALL IC BFM 2002	SR-1	18	-	11
33	M.M.*	ALL	ALL IC BFM 2002	IR-2	-	-	15
34	S.R.*	ALL	ALL IC BFM 2002	IR-2	-	-	3
35	L.M. †	NHL-Tcell	EURO LB 02	SR	-	zgon w przebiegu ospy wietrznej w trakcie LP	-
36	M.K.*	ALL	ALL IC BFM 2002	IR-1	18	-	w trakcie

\* - pacjenci pozostający pod opieką Poradni Hematologicznej Dziecięcej przy Samodzielnym Publicznym Szpitalu Klinicznym Nr1 w Gdańsku;

#- pacjenci w trakcie leczenia wznowy choroby podstawowej w Klinice Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii AMG lub w ośrodkach zagranicznych;

† - pacjenci zmarli

\*\* - pacjentka poddana autologicznemu przeszczepowi szpiku kostnego 8 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia

ALL – ostra białaczka limfoblastyczna (B-komórkowa); AML-M0, AML-M2, AML-M3 – ostra białaczka szpikowa (klasyfikacja FAB w Tabeli 1.1.1.2); NHL-Tcell/Bcell – chłoniak nieziarniczny T-/B-komórkowy; HD – ziarnica złośliwa

RT OUN – radioterapia ośrodkowego układu nerwowego; HR (high risk) – grupa wysokiego ryzyka; SR (standard risk) – grupa niskiego ryzyka; IR (intermediate risk) – grupa pośredniego ryzyka

& - stan na dzień 1.07.2008

W leczeniu pacjentów stosowano różne schematy terapeutyczne w zależności od rozpoznania oraz wieku dziecka i stopnia zaawansowania klinicznego choroby.

Wszystkie dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną były leczone według programu ALL IC BFM 2002 (Załącznik 2), w tym 12 z nich zakwalifikowano do grupy standardowego ryzyka (SR), 10 – do grupy pośredniego ryzyka (IR), a troje otrzymało terapię dla grupy wysokiego ryzyka (HR). Pacjentki z ostrą białaczką szpikową otrzymały chemioterapię według protokołu ANLL-98 (Załącznik 3), dwie z nich, z ostrą białaczką promielocytową (APL, AML-M3), przyjmowały dodatkowo kwas

transretinowy w schemacie leczenia intensywnego i podtrzymującego remisję. Kryteria kwalifikacji do poszczególnych grup ryzyka w ostrej białaczce limfoblastycznej na podstawie wczesnej odpowiedzi na leczenie przedstawiono w Tabeli 1.1.2.1 w Rozdziale 1.1.2. Stratyfikację dzieci z ostrą białaczką szpikową ujęto w programie leczenia (Załącznik 3) i przedstawiono w Tabeli 1.1.3.1.

Większe zróżnicowanie stosowanej terapii było wśród pacjentów z chłoniakiem nieziarniczym: troje pacjentów z NHL B-komórkowym leczono według programu B-NHL 93 (grupa B) i troje – B-NHL BFM 04 (grupy R2 i R3 oraz grupa dla chłoniaków B-komórkowych o lokalizacji pierwotnie śródpiersiowej [med-B-NHL]). Spośród pacjentów z NHL T-komórkowym jeden był leczony protokołem NB-NHL 93, a drugi – EURO LB 02. Stratyfikację dzieci z NHL B-komórkowym przedstawiono w Rozdziale 1.2.1. w Tabeli 1.2.1.4.

## **3.2. Materiały**

### **3.2.1. Odczynniki**

2-merkaptoetanol (2-ME) (POH, Warszawa)

alkohol etylowy absolutny (POCh, Polska)

plądowa surowica cielęca (FCS) (Gibco BRL, USA)

EDTA (Sigma, USA)

Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia, Szwecja)

L-glutamina (POH, Warszawa)

penicylina (Polpharma, Starogard Gdański)

pirogonian sodowy (POH, Warszawa)

RPMI 1640 (BioMed, Polska)

streptomycyna (Polpharma, Starogard Gdański)

Uropolina (POCh, Polska)

TRITON X- 100 (Sigma, Niemcy)

woda redestylowana wolna od nukleaz (Promega Corp., USA)

### 3.2.2. Bufory i roztwory

Bufor PBS bez  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  do barwień cytometrycznych

NaCl	8,59g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1,25g
$\text{NaN}_3$	0,98g
EDTA (dwusodowy)	3,7g
Woda redestylowana	1000ml

Ustalić pH 7,4, autoklawować, przechowywać w 4°C w ciemności

Mieszanina Ficoll/Uropolina, gęstość 1,007g/cm<sup>3</sup>

24 części 9% w/v Ficoll
10 części 33,9% w/v Uropolina

Roztwory do lizowania i utrwalania pełnej krwi do barwień cytometrycznych antygenów powierzchniowych:

Roztwór A - lizujący (600µl/50µl krwi)

Kwas mrówkowy	0,6ml
Woda destylowana	do 500ml

Roztwór B - stabilizujący błony komórkowe leukocytów (240µl/50µl krwi)

Węglan sodu	1,5g
Chlorek sodu	3,63g
Siarczan sodu	7,83g
Woda destylowana	250ml

Roztwór C - utrwalający komórki (100µl/50µl krwi)

Paraformaldehyd	1g
Woda destylowana	100ml

### 3.2.3. Materiały jednorazowego użytku

Butelki do hodowli komórkowych (NUNC, Dania)

Końcówki do pipet (Medlab, Polska)

Pipety jednorazowe typu balonik (pasterowskie) (Sigma, USA)

Płytki 24-dołkowe (NUNC, Dania; Medlab, Polska)  
Płytki 96-dołkowe okrągłodenne (NUNC, Dania; Medlab, Polska)  
Płytki 96-dołkowe płaskodenne (NUNC, Dania; Medlab, Polska)  
Probówki do cytometru (Medlab, Polska; Falcon, USA)  
Probówki typu Eppendorf 1,5ml (Medlab, Polska)  
Szalki do hodowli (Petriego) (NUNC, Dania)

#### **3.2.4. Przeciwciała monoklonalne**

CD3 ECD, klon HIT3a, mysie IgG<sub>2a</sub>, κ (Beckman Coulter, USA)  
CD8 PE, klon RPA-T8, mysie IgG<sub>1</sub>, κ (BD Pharmingen, USA)  
CD16 PE, klon 3G8, mysie IgG<sub>1</sub>, κ (BD Pharmingen, USA)  
CD56 PE-Cy5, klon B159, mysie IgG<sub>1</sub>, κ (BD Pharmingen, USA)  
CD57 FITC, klon NK-1, mysie IgM, κ (BD Pharmingen, USA)  
CD94 FITC, klon HP-3D9, mysie IgG<sub>1</sub>, κ (BD Pharmingen, USA)  
Kontrola izotopowa FITC, klon MOPC-21, mysie IgG<sub>1</sub>, κ (BD Pharmingen, USA)  
Kontrola izotopowa PE, klon MOPC-21, mysie IgG<sub>1</sub>, κ (BD Pharmingen, USA)  
Kontrola izotopowa PE-Cy5, klon MOPC-21, mysie IgG<sub>1</sub>, κ (BD Pharmingen, USA)  
Kontrola izotopowa ECD, klon 679,1Mc7, mysie IgG<sub>1</sub> (Immunotech, Beckman Coulter, Francja)

#### **3.2.5. Podłoża hodowlane**

Podłoże do hodowli PBMC:

RPMI 1640 z 5% FCS, L-glutaminą, pirogronianem sodowym

Podłoże do hodowli komórek linii K562:

RPMI 1640 z 3% FCS, 20μM 2-merkaptetanolu (2-ME), L-glutaminą, pirogronianem sodowym, penicyliną, streptomycyną

### 3.2.6. Linie komórkowe

K562 – linia ciągła komórek ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław)

### 3.2.7. Aparatura

aparat do pomiaru absorbancji Labsystem Multiscan MCC/340

cytometr przepływowy Epics XL (Coulter, USA)

cytometr przepływowy LSR II (BD, USA)

inkubator z regulowanym przepływem CO<sub>2</sub> (Heraeus, Niemcy)

komora laminarna (Heraeus, Niemcy)

łaźnia wodna (GFL, Niemcy)

mieszadło magnetyczne (IKA, Niemcy)

mikroskop świetlny Studer

pH-metr uniwersalny  $\Phi$  32 (Becman, USA)

pipety (Medlab, Polska; Buch&Holm, Niemcy) o zakresach: 0,5-10  $\mu$ l;  
2-20  $\mu$ l; 10-100  $\mu$ l; 50-200  $\mu$ l; 100-1000  $\mu$ l

urządzenie do lizy i utrwalania komórek Qprep Epics Immunology  
Workstation (Coulter, USA)

votrex (IKA, Niemcy)

waga elektroniczna (Rad-Wag, Polska)

wirówka 3K15 (Sigma, USA)

wytrząsarka (VEB MLW typ S411, Niemcy)

zamrażarka -80°C Polar 550H (AS Biomedica, Włochy)

### 3.2.8. Programy komputerowe

BD Cytometric Bead Array Software (BD, USA) – analiza danych CBA

FacsDiva (BD, USA) – system zarządzający cytometrem przepływowym  
LSR II (BD, USA)

STATISTICA wersja 7.1 (StatSoft Inc., USA) – analiza statystyczna wyników

System II 3.0 (Coulter, USA) – system zarządzający cytometrem przepływowym Epics XL (Coulter, USA)

WinMDI 2.8 – analiza wyników badań cytometrycznych, program stworzony przez Josepha Trottera, dostępny pod adresem: <http://facs.scripps.edu/software.html>

### 3.3. Metodyka badań

#### 3.3.1. Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC)

Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC; ang. *peripheral blood mononuclear cells*) uzyskiwano drogą wirowania pełnej krwi obwodowej w gradiencie stężeń mieszaniny Ficollu i Uropoliny o gęstości 1,077 g/ml. Krew obwodową pobraną do sterylnych probówek z heparyną sodową (8 ml) rozcieńczano w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) w stosunku 1:1 i nawarstwiano na mieszaninę Ficollu i Uropoliny. Probówki wirowano przez 15 minut przy prędkości 2500 obrotów/min., a następnie za pomocą pipety pasterowskiej delikatnie ściągano interfazę zawierającą obłoczek jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC). Uzyskane komórki dwukrotnie płukano w PBS, a następnie zawieszano w pożywce RPMI 1640 z dodatkiem 5% płodowej surowicy cielęcej (FCS).

#### 3.3.2. Izolacja limfocytów krwi obwodowej (PBL)

W celu wyizolowania limfocytów krwi obwodowej (PBL; ang. *peripheral blood lymphocytes*) PBMC zawieszono w pożywce RPMI 1640 z dodatkiem 5% FCS inkubowano na plastikowej szalce Petriego przez 30 minut w temperaturze 37°C z ciągłym przepływem 5% CO<sub>2</sub>. Po inkubacji zbierano komórki nieprzylegające do plastiku (PBL) i wykonywano test aktywności cytotoksycznej komórek NK.

### 3.3.3. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej komórek NK

Aktywność cytotoksyczną komórek NK oznaczano za pomocą zestawu Cytotoxicity Detection Kit (LDH)<sup>®</sup> (Roche, Niemcy) z użyciem komórek białaczkowych linii K562 jako komórek docelowych.

Na 96-dołkowej okrągłodennej płytce zakładano następujące próby:

1/ próby spontaniczne - zawierające  $2 \times 10^5$  komórek K562 zawieszonych w 200  $\mu$ l RPMI 1640 - próby założone w 3 powtórzeniach;

2/ próby maksymalne - zawierające  $2 \times 10^5$  komórek K562 zawieszonych w 100  $\mu$ l RPMI 1640 z dodatkiem 100  $\mu$ l TRITONu X-100 - próby założone w 3 powtórzeniach;

3/ próby badane - zawierające  $2 \times 10^4$  komórek NK i  $2 \times 10^5$  komórek K562 zawieszonych w 200  $\mu$ l RPMI 1640 - próby założone w 6 powtórzeniach dla każdego pacjenta.

Przygotowane w taki sposób testy inkubowano przez 4 godziny w temperaturze 37°C z ciągłym przepływem 5% CO<sub>2</sub>. Po inkubacji próby wirowano przez 10 minut przy prędkości 1200 obrotów/min., a następnie z każdego dołka delikatnie zbierano po 100  $\mu$ l nadsącza i przenoszono do dołków 96-dołkowej płytki płaskodennej. Do każdego dołka, zgodnie z instrukcją zestawu Cytotoxicity Detection Kit, dodawano po 100  $\mu$ l mieszaniny reaktywnej (Reaction mixture), a następnie próby inkubowano do 30 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Absorbancję prób mierzono przy długości fali 492 nm w aparacie Labsystem Multiscan MCC/340.

Do obliczenia procentu cytotoksyczności stosowano następujący wzór:

$$\% \text{ cytotoksyczności} = \frac{\text{Ex} - \text{Sp}}{\text{MR} - \text{Sp}} \times 100$$

gdzie: Ex - absorbancja próby badanej (Experimental)  
Sp - absorbancja próby spontanicznej (Spontaneous Release)  
MR - absorbancja próby maksymalnej (Maximum Release)

### 3.3.4. Oznaczanie aktywności fagocytarnej komórek żernych

Aktywność fagocytarną komórek żernych krwi obwodowej oznaczano za pomocą zestawu Phagotest® (ORPEGEN Pharma, Niemcy). Test pozwala na ilościowe określenie fagocytozy leukocytów i monocytów w pełnej krwi pobranej na heparynę poprzez pomiar stopnia pochłonięcia oznakowanych fluorochromem (FITC) bakterii *Escherichia coli*. Test pozwala na oznaczenie zdolności fagocytozy zarówno całej populacji komórek fagocytujących, jak i oznaczenie ich aktywności jednostkowej poprzez pomiar liczby pochłoniętych bakterii na jedną komórkę.

#### Wykonanie testu:

Heparynizowana krew pełna przed wykonaniem testu została schłodzona do temperatury 0°C, a następnie dokładnie wymieszana. Do 2 probówek cytometrycznych dodano po 100 µl schłodzonej krwi, a następnie próbki poddano inkubacji w temperaturze lodu przez 10 minut. Po inkubacji do każdej z próbek dodano po 20 µl ochłodzonej do temperatury 0°C i wymieszanej zawiesiny bakterii *E. coli*. Wszystkie próbki zostały ponownie wymieszane. Próbkę kontrolną (kontrola negatywna) pozostawiono w lodzie, a próbkę badaną inkubowano przez 10 minut w łaźni wodnej o temperaturze 37°C. Dokładnie po 10 minutach inkubacji próbkę badaną przeniesiono do lodu i do każdej z próbek dodano po 100 µl uprzednio schłodzonego roztworu hamującego reakcję (QUENCHING SOLUTION), po czym próbki ponownie wymieszano. Po 2 minutach do każdej próbki dodano po 3 ml roztworu płuczającego (WASHING SOLUTION), wymieszano i wirowano przez 5 minut z prędkością 250xg w temperaturze 4°C. Następnie oddzielono supernatant od pozostałej na dnie probówek zawiesiny komórkowej. Czynność płukania i wirowania powtórzono. Po oddzieleniu supernatantu do każdej z probówek dodano po 2 ml roztworu lizującego (LYSING SOLUTION) o temperaturze pokojowej, próbki wymieszano i poddano 20-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Po zakończeniu inkubacji próbki wirowano



przez 5 minut z prędkością 250xg w temperaturze 4°C, a następnie, po usunięciu supernatantu, płukano przy użyciu 3ml roztworu płuczającego (WASHING SOLUTION) i ponownie wirowano. Po oddzieleniu supernatantu do osadu krwinek dodano po 200 µl roztworu barwiącego DNA (DNA STAINING SOLUTION) w celu wybarwienia badanych komórek. Próbkę inkubowano przez 10 minut w temperaturze lodu bez dostępu światła. Po zakończeniu inkubacji badane próbki analizowano w cytometrze przepływowym.

Analiza cytometryczna:

Komórki wprowadzono do cytometru przepływowego COULTER® EPICS® XL, rejestrując 30.000 leukocytów na próbkę. Bramkę ustawiono w postaci histogramu, który zawierał zależność zdarzeń (events), czyli liczby komórek, od parametru FL2 mierzonego przez odpowiedni detektor.

Na podstawie cytogramu FSS/SS ustawiono bramkę granulocytarną i monocytarną [FSS, ang. *forward scatter*; rozproszenie czołowe (odbicie) światła lasera odpowiadające wielkości komórki; SS, ang. *side scatter*; rozproszenie boczne (ugięcie) światła lasera odpowiadające ziarnistości komórki].

Oprócz parametrów opisujących rozproszenie światła określono również intensywność fluorescencji w celu przedstawienia odsetka komórek fagocytujących i liczby pochłoniętych przez nie bakterii. W tym celu ustawiono bramki, na których uwidoczniono liniową zależność parametru SS od logarytmicznej zależności parametru FL1, stanowiące o intensywności fluorescencji – marker dla FL1 (ustawiony w pozycji określającej mniej niż 1% pozytywnych zdarzeń w próbce kontrolnej) wskazywał odsetek fagocytujących komórek w próbce badanej, natomiast średnia fluorescencja korelowała z liczbą bakterii sfagocytowaną przez pojedynczą komórkę żerną.

Wyniki analizowano następnie przy użyciu programu WinMDI 2.8.

### 3.3.5. Oznaczenia cytometryczne - analiza ekspresji antygenów powierzchniowych

Oznaczenia cytometryczne antygenów zewnątrzkomórkowych wykonano przy użyciu cytometru przepływowego Epics XL (Coulter), Barwienie wykonywano w ciągu godziny od pobrania krwi. Do próbek cytometrycznych rozdzielano po 50 µl pełnej krwi, następnie do każdej z nich dodawano po 100 µl rozcieńczeń odpowiednich przeciwciał zawieszonych w PBS z 1% FCS przygotowanych tuż przed barwieniem. Próbkę inkubowano przez 30 minut w ciemności w temperaturze 4°C, delikatnie wstrząsając. Po inkubacji w próbkach lizowano erytrocyty i utrwalano komórki za pomocą roztworów A, B i C [Rozdział 3.2.2.] przy użyciu urządzenia do lizy i utrwalania komórek Qprep Epics Immunology Workstation (Coulter, USA). Tak przygotowane próbki analizowano w cytometrze przepływowym Epics XL (Coulter, USA), a uzyskane wyniki analizowano za pomocą programu WinMDI 2.8.

W celu określenia specyficzności wiązania przeciwciał monoklonalnych użytych do barwień antygenów powierzchniowych stosowano kontrole izotopowe połączone z takimi samymi barwnikami. Korekcję nakładających się widm fluorescencji barwników uzyskano, przeprowadzając przed rozpoczęciem analiz kompensację nakładających się widm, stosując odpowiednie pojedyncze i podwójne barwienia (swoiste przeciwciało z jednym fluorochromem i kontrola izotopowa z innym).

Regiony do analizy wybierano na podstawie obrazu FSS [ang. *forward scatter*; rozproszenie czołowe (odbicie) światła lasera odpowiadające wielkości komórki] i SS [ang. *side scatter*; rozproszenie boczne (ugięcie) światła lasera odpowiadające ziarnistości komórki]. Bramkowano populację limfocytów, a kolejne bramkowania subpopulacji wykonywano na podstawie analizy fluorescencji odpowiednich fluorochromów związanych z zastosowanymi przeciwciałami.

[Dokładne bramkowania poszczególnych subpopulacji komórek przedstawiono w Rozdziale Wyniki przy odpowiednich analizach.]

### 3.4. Metody statystyczne

Analiza statystyczna danych została przeprowadzona za pomocą programu STATISTICA v. 7.1 (Statsoft, Inc.). Zgodność rozkładu zmiennych ilościowych z rozkładem normalnym badano testem W Shapiro-Wilka. Ze względu na to, iż zmierzone zmienne nie spełniały założenia normalności rozkładu, w testowaniu hipotez statystycznych posłużono się testami nieparametrycznymi. Analizując cechy ilościowe, do porównania dwóch prób zmiennych niezależnych stosowano test U Manna-Whitneya, zaś do porównania dwóch prób zmiennych zależnych (zmiennych z powtarzalnymi pomiarami) – test kolejności par Wilcoxon. Ocenę korelacji między dwoma zmiennymi ilościowymi przeprowadzono testem R Spearmana.

## 4. WYNIKI

### 4.1. Wpływ intensywnego leczenia przeciwnowotworowego na parametry morfologii krwi obwodowej

Ocenę stopnia mielo- i immunosupresji po zakończeniu intensywnej chemioterapii oszacowano na podstawie porównania parametrów morfologii krwi obwodowej badanych pacjentów 2 tygodnie po ostatniej dawce cytostatyku z wartościami obserwowanymi u dzieci z grupy kontrolnej.

Ze względu na podobieństwo między pacjentami z ALL i AML oraz różnice między pacjentami z ostrą białaczką i NHL, wynikające z punktu wyjścia choroby nowotworowej (układ krwiotwórczy/układ chłonny), w analizach zastosowano podział badanych dzieci na 2 grupy: grupę pacjentów z ostrą białaczką (ALL i AML) oraz grupę z chłoniakiem nieziarnicznym (NHL).

Wyniki analizy parametrów morfologii krwi obwodowej pacjentów przedstawia Tabela 4.1.1.

Porównanie obu grup dzieci chorych z grupą kontrolną wykazało, iż dzieci chore nie różniły się istotnie statystycznie wiekiem od dzieci zdrowych. Także udział dzieci w wieku powyżej i poniżej 7. roku życia był nieznamienne w analizowanych grupach.

Intensywne leczenie przeciwnowotworowe trwało znamienne dłużej w grupie pacjentów z ostrą białaczką w porównaniu do grupy dzieci z NHL ( $p=0,006$ ).

**Tabela 4.1.1.** Porównanie parametrów morfologii krwi obwodowej dzieci z ostrą białaczką i z chłoniakiem nieziarnicznym 2 tygodnie po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego z wartościami dzieci zdrowych.

	<b>Grupa kontrolna n=15</b>	<b>Pacjenci z ostrą białaczką n=26</b>	<b>p</b>	<b>Pacjenci z NHL n=7</b>	<b>p</b>
Wiek (lata)	10 (3-16)	5 (4-10)	0,15	12 (8-13,5)	0,57
Dzieci powyżej 7. roku życia (n,%)	9 (60%)	11 (42,3%)	0,61	6 (87,5%)	0,25
Długość leczenia intensywnego (miesiące)	-	8,0 (7-11)	-	3,5 (3-7)	-
Hemoglobina (g/dl)	12,6 (11,5-13,7)	10,4 (10,1-11,4)	<b>0,000003</b>	11,1 (10,4-11,8)	<b>0,002</b>
Hematokryt (%)	36,7 (35,2-41,2)	31,7 (29,7-33,8)	<b>0,000034</b>	33,9 (31,4-35,3)	<b>0,004</b>
Krwinki czerwone (T/l)	4,5 (4,4-4,9)	3,4 (3,2-3,6)	<b>0,000002</b>	3,9 (3,6-4,3)	<b>0,002</b>
Płytki krwi (G/l)	284,45 (268,5-306,9)	276,0 (208,0-345,7)	0,90	264,9 (187,7-315,5)	0,66
Krwinki białe (kom/μl)	6500 (5650-6820)	3670 (2400-4600)	<b>0,000007</b>	4130 (2500-6710)	0,062
Neutrocyty (kom/μl)	2900 (1718-3510)	1180 (910-1787)	<b>0,004</b>	2402 (1490-4898)	0,78
Neutrocyty (%)*	42 (34-53)	38,5 (27-45)	0,68	60 (52-66)	<b>0,011</b>
Limfocyty (kom/μl)	3061 (2080-3590)	1451 (836-2040)	<b>0,000005</b>	939 (785-1340)	<b>0,001</b>
Limfocyty (%)*	48 (39-56)	43,5 (36-52)	0,29	22 (16-31)	<b>0,002</b>
Monocyty (kom/μl)	460 (292-510)	525 (348-730)	0,26	553 (410-557)	0,25
Monocyty (%)*	7 (6-8)	15 (13-20)	<b>0,000005</b>	12 (10-13)	<b>0,010</b>
Eozynofile (kom/μl)	135 (86-252)	32 (23-60)	<b>0,000001</b>	134 (30-201)	0,48
Eozynofile (%)*	2 (1-4)	1 (1-2)	<b>0,002</b>	3 (1-4)	0,89
Bazofile (kom/μl)	0 (0-40)	10 (0-36)	0,97	10 (0-34)	0,75
Bazofile (%)*	0 (0-1)	1 (0-1)	0,61	1 (0-1)	0,51

\*odsetek komórek wśród krwinek białych; NHL- chłoniak nieziarniczny

Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya.

Porównanie dzieci z obu grup badanych z grupą kontrolną ujawniło stan mielosupresji utrzymujący się po dwóch tygodniach od zakończenia intensywnego leczenia przeciwnowotworowego w postaci znamienne niższych wartości hemoglobiny, hematokrytu i liczby krwinek czerwonych w stosunku do wartości dzieci zdrowych (Tabela 4.1.1).

Ponadto pacjenci z ostrą białaczką mieli istotnie statystycznie niższą bezwzględną liczbę leukocytów, a wśród nich limfocytów, granulocytów obojętnochłonnych i kwasochłonnych w porównaniu do dzieci z grupy kontrolnej. Dzieci z chłoniakiem nieziarnicznym miały natomiast tendencję do niższych wartości leukocytów ( $p=0,062$ ), zaś istotnie obniżone jedynie bezwzględną liczbę i odsetek limfocytów (odpowiednio  $p=0,001$  i  $p=0,002$ ). Odsetek neutrofilii był u tych dzieci znamienne wyższy niż w grupie kontrolnej.

Zaobserwowano również, iż pacjenci z obu badanych grup po zakończeniu intensywnego leczenia mieli znacznie podwyższony odsetek monocytów w porównaniu do dzieci zdrowych.

Co ciekawe, mimo zaburzeń ilościowych w układzie czerwono- i białokrwinkowym, obserwowanych po zakończonym leczeniu przeciwnowotworowym, małopłytkowość stwierdzono tylko u pięciu pacjentów: u czworga dzieci z ostrą białaczką - małopłytkowość nieznacznego stopnia ( $PLT >100000/\mu l$ ) i głęboką trombocytopenię u jednego pacjenta z T-NHL ( $PLT =25900/\mu l$ ). U pozostałych dzieci liczba płytek krwi była w zakresie wartości prawidłowych.

#### 4.1.1. Wpływ wieku na rozmaz układu białokrwinkowego

Wraz z rozwojem we krwi dziecka zachodzą zmiany we wzajemnej proporcji liczby i odsetka neutrofilii i limfocytów – u dzieci młodszych w rozmazie białokrwinkowym przeważają limfocyty, a w wieku późniejszym – granulocyty obojętnochłonne. Granica wieku, w którym następuje „skrzyżowanie” tych wartości nie jest stała, ale przyjmuje się, że przypada około 6-7. roku życia [157].

Dane z Tabeli 4.1.1.1 wskazują, iż dzieci z grupy kontrolnej powyżej 7. roku życia mają przewagę granulocytów obojętnochłonnych, a dzieci młodsze – limfocytów.

**Tabela 4.1.1.1.** Porównanie składu odsetkowego i ilościowego komórek układu białokrwinkowego krwi obwodowej w grupie badanej bezpośrednio po zakończeniu intensywnego leczenia i w grupie kontrolnej w zależności od wieku.

	Grupa kontrolna		p
	< 7 r.ż.	> 7 r.ż.	
Liczba dzieci (n)	6	9	-
Krwinki białe (kom/ $\mu$ l)	6625 (5370-6980)	6300 (5650-6820)	0,67
Neutrocyty (kom/ $\mu$ l)	2289 (1553-2900)	3510 (1950-3800)	<b>0,045</b>
Neutrocyty (%)*	33 (23-42)	53 (41-61)	<b>0,018</b>
Limfocyty (kom/ $\mu$ l)	3590 (3315-4455)	2080 (1863-2850)	<b>0,010</b>
Limfocyty (%)*	57 (51-66)	39 (34-46)	<b>0,005</b>

\* odsetek krwinek białych

Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya.

Dlatego kolejnym krokiem było przeprowadzenie analizy składu odsetkowego krwinek białych krwi obwodowej dzieci chorych po zakończonym leczeniu przeciwnowotworowym, podzielonych na podgrupy poniżej i powyżej 7. roku życia i porównanie tych wartości z wartościami w analogicznych podgrupach dzieci zdrowych. Wśród dzieci z chłoniakiem nieziarniczym był tylko jeden pacjent w wieku poniżej 7. roku życia, w związku z czym w grupie tej przeprowadzono tylko porównanie

dzieci powyżej 7. roku życia (87,5% pacjentów tej grupy – Tabela 4.1.1) z dziećmi zdrowymi w podobnym wieku.

Ze względu na znaczne obniżenie całkowitej bezwzględnej liczby leukocytów u dzieci chorych, za najistotniejsze w tej analizie uznano dane dotyczące składu odsetkowego limfocytów i neutrocytów wśród krwinek białych, a nie ich bezwzględną liczbę. Wyniki analiz przedstawiono w Tabeli 4.1.1.2.

**Tabela 4.1.1.2.** Porównanie składu odsetkowego i ilościowego granulocytów obojętnochłonnych i limfocytów krwi obwodowej dzieci zdrowych i dzieci z ostrą białaczką (A) oraz dzieci z NHL (B) 2 tygodnie po zakończeniu intensywnego leczenia w zależności od wieku.

A	Dzieci < 7 r.ż.			Dzieci > 7 r.ż.		
	Grupa kontrolna	Pacjenci z ostrą białaczką	p	Grupa kontrolna	Pacjenci z ostrą białaczką	p
Liczba dzieci (n)	6	16	-	9	10	-
Krwinki białe (kom/ $\mu$ l)	6625 (5370-6980)	3720 (2445-4590)	<b>0,0009</b>	6300 (5650-6820)	3510 (2090-4940)	<b>0,008</b>
Neutrocyty (kom/ $\mu$ l)	2289 (1553-2900)	1092 (838-1434)	0,065	3510 (1950-3800)	1328 (910-1790)	<b>0,004</b>
Neutrocyty (%)*	33 (23-42)	31 (26-44)	0,79	53 (41-61)	41 (33-47)	0,18
Limfocyty (kom/ $\mu$ l)	3590 (3315-4455)	1477 (973-2241)	<b>0,0004</b>	2080 (1863-2850)	887 (761-2040)	0,051
Limfocyty (%)*	57 (51-66)	47 (39-56)	<b>0,046</b>	39 (34-46)	39 (34-45)	0,81
B	Dzieci > 7 r.ż.					
	Grupa kontrolna	Pacjenci z NHL	p			
Liczba dzieci (n)	9	6	-			
Krwinki białe (kom/ $\mu$ l)	6300 (5650-6820)	3775 (2500-6710)	0,19			
Neutrocyty (kom/ $\mu$ l)	3510 (1950-3800)	2228 (1490-4898)	0,56			
Neutrocyty (%)*	53 (41-61)	62 (53-66)	0,10			
Limfocyty (kom/ $\mu$ l)	2080 (1863-2850)	884 (785-1060)	<b>0,015</b>			
Limfocyty (%)*	39 (34-46)	21 (16-31)	<b>0,022</b>			

\*odsetek krwinek białych; NHL- chłoniak niezłośliwy  
*Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya.*

Podział pacjentów z ostrą białaczką na podgrupy wiekowe wykazał istnienie przewagi odsetkowej limfocytów nad neutrocytami u dzieci



młodszych, jednakże różnica ta nie była tak wyraźna, jak w przypadku dzieci zdrowych ze względu na znamienne obniżenie odsetka limfocytów u dzieci z ostrą białaczką. **U starszych dzieci z tej grupy nie wykazano różnic odsetkowych między limfocytami i neutrocytami.** Natomiast u dzieci z NHL ujawniono przewagę odsetka granulocytów obojętnochłonnych w rozmazie leukocytów krwi obwodowej, charakterystyczną dla dzieci starszych i dorosłych. Jednocześnie u pacjentów z NHL wykazano limfopenię zarówno w zakresie bezwzględnej liczby, jak i odsetka tych komórek w porównaniu do dzieci zdrowych w podobnym wieku.

*Brak jednoznacznego występowania różnic odsetkowych rozmazu białokrwinkowego u badanych dzieci w zależności od wieku może wynikać z nierównomiernej odbudowy tego układu po zastosowanym leczeniu. W związku z tą obserwacją odstąpiono od oceny zależności parametrów immunologicznych od wieku w dalszych analizach.*

#### **4.1.2. Badanie wpływu przynależności do grupy ryzyka na skład ilościowy układu białokrwinkowego po zakończeniu leczenia u pacjentów z ALL**

Jak przedstawiono we Wstępie (Rozdziały 1.1.2, 1.1.3 i 1.2.2), w ostrej białaczce i chłoniaku nieziarniczym leczenie dobierane jest odpowiednio do grupy ryzyka, ze względu na występowanie u pacjentów w momencie rozpoznania różnych czynników ryzyka i różnic w stopniu zaawansowania choroby, a także zróżnicowanej odpowiedzi na leczenie indukujące remisję. Chemioterapia w tak dobranych grupach różni się częstotliwością podawania i wielkością dawek stosowanych cytostatyków oraz długością czasu trwania terapii i w związku z tym może mieć również odmienny wpływ na układ immunologiczny pacjentów.

Analizę wpływu przynależności do grupy ryzyka na skład ilościowy układu białokrwinkowego po zakończeniu intensywnego leczenia przeprowadzono u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną ze względu

na większą liczebność całej grupy i poszczególnych grup ryzyka w porównaniu do grup pacjentów z AML i NHL. Porównania wyników w grupach ryzyka pośredniego (IR) i wysokiego (HR) w stosunku do wartości z grupy niskiego ryzyka (SR) wykonano testem U Manna-Whitneya. Wyniki tej analizy przedstawiono w Tabeli 4.1.2.1.

**Tabela 4.1.2.1.** Porównanie składu odsetkowego i ilościowego komórek układu białokrwinkowego krwi obwodowej u pacjentów z ALL po zakończeniu intensywnego leczenia w kontekście grupy ryzyka.

	SR	IR	p <sup>^</sup>	HR	p <sup>^</sup>
Liczba pacjentów (n)	10	10	-	3	-
Wiek (lata)	4,25 (3,5-5)	9,5 (4,5-11,5)	<b>0,015</b>	4,5 (3-6)	0,92
Długość leczenia intensywnego (miesiące)	7,5 (7-9,5)	9,25 (7,5-11)	0,24	11,25 (11-11,5)	0,13
Krwinki białe (kom/ $\mu$ l)	4540 (2320-5070)	3585 (2400-4600)	0,72	3850 (3810-3890)	0,84
Neutrocyty (kom/ $\mu$ l)	1114 (759-1790)	1102 (910-1432)	0,83	2395 (1550-3240)	0,11
Neutrocyty (%)*	33 (26-45)	31 (27-41)	0,94	62 (41-83)	0,16
Limfocyty (kom/ $\mu$ l)	1501 (900-2611)	1810 (870-2470)	0,88	915 (380-1450)	0,23
Limfocyty (%)*	46 (38-54)	48 (40-55)	0,83	24 (10-38)	0,09
Monocyty (kom/ $\mu$ l)	590 (334-1510)	580 (480-760)	0,83	460 (190-730)	0,69
Monocyty (%)*	14 (12-28)	17 (14-20)	0,94	12 (5-19)	0,42

\*odsetek krwinek białych; ^porównanie grupy IR i HR z grupą SR  
 SR- grupa niskiego ryzyka; IR- grupa pośredniego ryzyka; HR- grupa wysokiego ryzyka;  
 Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya.

Jak pokazano w powyższej tabeli, u pacjentów z ALL należących do różnych grup ryzyka nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w bezwzględnej liczbie i odsetku komórek układu białokrwinkowego krwi obwodowej.

#### 4.1.3. Wpływ radioterapii ośrodkowego układu nerwowego na skład ilościowy układu białokrwinkowego u dzieci z ostrą białaczką

Ze względu na możliwy wpływ radioterapii na parametry układu immunologicznego przeprowadzono analizę wpływu takiego leczenia na skład ilościowy układu białokrwinkowego krwi obwodowej 7 pacjentów z ostrą białaczką poddanych napromienianiu czaszki w porównaniu do pozostałych dzieci z tej grupy. Radioterapii ośrodkowego układu nerwowego poddano trzy pacjentki z ostrą białaczką szpikową (100% dzieci z AML) i czworo dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (17% pacjentów z ALL). Dawki sumaryczne stosowanego promieniowania wynosiły 12, 18 lub 24 Gy, u 4 pacjentów była to radioterapia profilaktyczna, u 3 dzieci – lecznicza.

Wyniki przeprowadzonej analizy przedstawiono w Tabeli 4.1.3.1.

**Tabela 4.1.3.1.** Porównanie składu odsetkowego i ilościowego komórek układu białokrwinkowego krwi obwodowej chorych z ostrą białaczką po zakończonej radioterapii OUN – grupa RT(+) z pozostałymi pacjentami tej grupy – grupa RT(-).

	Grupa RT(+)	Grupa RT(-)	p
Liczba pacjentów (n,%)	7 (27%)	19 (73%)	-
Wiek (lata)	9,25 (5,0-15,0)	4,5 (4,0-9,0)	0,14
Krwinki białe (kom/ $\mu$ l)	2580 (2090-3870)	3710 (2490-4940)	0,17
Neutrocyty (kom/ $\mu$ l)	1135 (910-2980)	1224 (759-1787)	0,43
Neutrocyty (%)*	47 (41-77)	33 (26-41)	<b>0,002</b>
Limfocyty (kom/ $\mu$ l)	836 (380-903)	1892 (1045-2500)	<b>0,007</b>
Limfocyty (%)*	36 (10-40)	47 (40-55)	<b>0,009</b>
Monocyty (kom/ $\mu$ l)	355 (190-503)	629 (476-988)	<b>0,046</b>
Monocyty (%)*	14 (8-19)	15 (13-27)	0,16

\* odsetek krwinek białych

Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya.

U dzieci, u których przeprowadzono radioterapię OUN, zaobserwowano znamienne niższą bezwzględną liczbę i odsetek limfocytów oraz niższą bezwzględną liczbę monocytów i wyższy odsetek neutrocytów aniżeli u pacjentów z ostrą białaczką nie poddanych napromienianiu czaszki.

## PODSUMOWANIE

Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano istotnie dłuższy czas trwania leczenia intensywnego u dzieci z ostrą białaczką w porównaniu do chorych z chłoniakiem nieziarnicznym.

Badanie parametrów morfologii krwi obwodowej bezpośrednio po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego ujawniło stan mielosupresji w postaci niedokrwistości i leukopenii z bezwzględną limfopenią i neutropenią oraz wysokim odsetkiem monocytów w grupie dzieci z ostrą białaczką. U pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym, obok niedokrwistości, po chemioterapii występowała jedynie tendencja do niższych wartości bezwzględnej liczby krwinek białych ze znamiennej limfopenią i wysokim odsetkiem monocytów. Ciekawą obserwacją było, iż stan supresji, poza kilkoma przypadkami, nie dotyczył układu płytkotwórczego.

Wykazano ponadto, iż u dzieci po zakończeniu intensywnej chemioterapii nie występują stałe i jednoznaczne, zależne od wieku różnice w rozmazie układu białokrwinkowego, obserwowane u dzieci zdrowych.

Porównanie pacjentów z ostrą białaczką w kontekście stosowanej dodatkowo, lub nie, radioterapii ośrodkowego układu nerwowego wykazało istnienie znamiennej niższych wartości bezwzględnej liczby limfocytów i monocytów u pacjentów poddanych takiemu leczeniu.

Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu przynależności do grup ryzyka w ALL na powstanie różnic w składzie ilościowym i odsetkowym układu białokrwinkowego krwi obwodowej.

## 4.2. Komórki układu białokrwinkowego w okresie 2 lat po zakończeniu leczenia przeciwnowotworowego

Spośród komórek układu białokrwinkowego do analizy włączono wartości bezwzględnej liczby leukocytów, granulocytów obojętnochłonnych, limfocytów i monocytów oraz ich skład odsetkowy w rozmazie układu białokrwinkowego w badanych punktach czasowych oraz w porównaniu z wartościami stwierdzanymi w grupie kontrolnej.

Pierwszym punktem czasowym dla wszystkich chorych był dzień następujący po 2 tygodniach od zakończenia intensywnego leczenia, czyli po okresie regeneracyjnym, w którym pacjenci nie otrzymywali żadnego leczenia immunosupresyjnego. Między badaniami w poszczególnych punktach czasowych analizy przeprowadzono testem Wilcoxon, a porównania z grupą kontrolną – testem U Manna-Whitneya.

### 4.2.1. Komórki układu białokrwinkowego u pacjentów z ostrą białaczką po zakończeniu intensywnego leczenia

Od pacjentów z ostrą białaczką krew obwodową pobierano co 3 miesiące w ciągu pierwszych 18 miesięcy, a następnie po dwóch latach od zakończenia intensywnego leczenia przeciwnowotworowego.

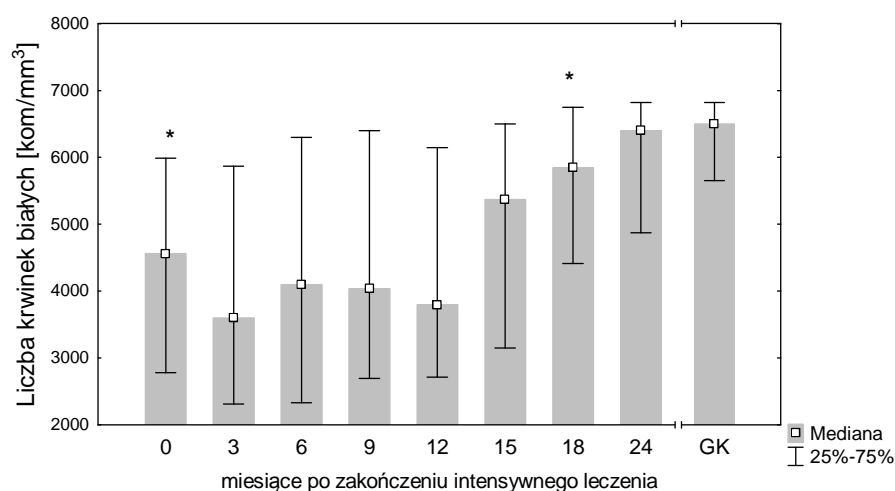
**Tabela 4.2.1.1.** Liczebność pacjentów z ostrą białaczką w poszczególnych fazach badania.

	Badanie wstępne	Ponowne pobranie krwi po:						
		3 mies.	6 mies.	9 mies.	12 mies.	15 mies.	18 mies.	24 mies.
Liczba pacjentów [n]	26	25	23	19	13	12	9	4

Przez pierwszych 15 miesięcy obserwacji wszyscy pacjenci z tej grupy otrzymywali leczenie podtrzymujące remisję. Badanie po 18 miesiącach obserwacji u 7 spośród 9 badanych dzieci (78%) zostało wykonane średnio po 2,5 miesiąca od całkowitego zakończenia leczenia

przeciwnowotworowego, po 2 latach czas bez chemioterapii wynosił średnio 9,33 miesiąca i dotyczył 3 na 4 badanych pacjentów (75%).

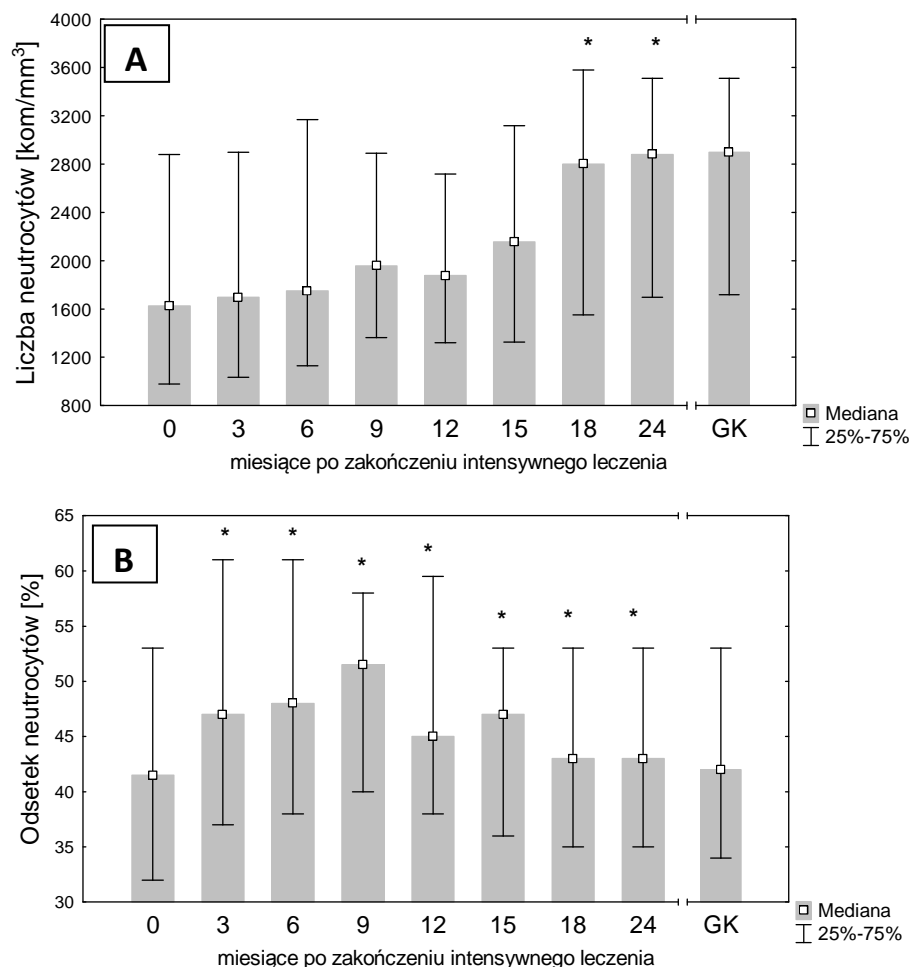
Wyniki analizy ilościowej komórek układu białokrwinkowego w badanych punktach czasowych u dzieci z ostrą białaczką oraz w grupie kontrolnej przedstawiają kolejno wykresy 4.2.1.1, 4.2.1.2, 4.2.1.3 i 4.2.1.4. Na wykresach pokazano różnice istotne statystycznie w stosunku do badania wstępnego i/lub po 3 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia.



**Rysunek 4.2.1.1.** Bezwzględna liczba leukocytów krwi obwodowej u dzieci z ostrą białaczką w okresie 2 lat po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego oraz u dzieci z grupy kontrolnej (GK). Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. \*  $p < 0,05$  w stosunku do badania po 3 miesiącach.

Całkowita liczba leukocytów u dzieci z ostrą białaczką obniżyła się istotnie statystycznie po pierwszych 3 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia ( $p=0,026$ ), utrzymując się następnie na dość stabilnym poziomie przez kolejnych 9 miesięcy obserwacji ( $p > 0,05$ ). Istotny wzrost wartości bezwzględnej liczby krwinek białych, w stosunku do badania po 3 miesiącach, nastąpił po 18 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia ( $p=0,017$ ). Ponadto zaobserwowano również, iż przez pierwszych 15 miesięcy obserwacji, gdy wszystkie dzieci otrzymywały leczenie podtrzymujące remisję, wartości bezwzględnej liczby leukocytów były istotnie statystycznie niższe niż w grupie kontrolnej. Różnica wartości po 18 miesiącach w porównaniu z grupą kontrolną była na granicy istotności

statystycznej ( $p=0,050$ ), a po 2 latach nie stwierdzano znamienych różnic między grupą z ostrą białaczką a grupą kontrolną ( $p=0,42$ ).



**Rysunek 4.2.1.2.** Bezwzględna liczba (A) i odsetek (B) neutrocytów krwi obwodowej u dzieci z ostrą białaczką w okresie 2 lat po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego oraz u dzieci z grupy kontrolnej (GK). Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. \*  $p<0,05$  w stosunku do badania wstępnego.

Bezwzględna liczba neutrocytów (Rysunek 4.2.1.2.A) we krwi obwodowej pacjentów z ostrą białaczką nie różniła się istotnie w poszczególnych punktach czasowych przez 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia ( $p>0,05$ ). Istotny jej wzrost w stosunku do wartości początkowych nastąpił po 18 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia ( $p=0,035$ ) i utrzymał się na podobnym poziomie ( $p=0,10$ ) po 24 miesiącach. W porównaniu z grupą kontrolną liczba neutrocytów

u dzieci z ostrą białaczką była istotnie statystycznie niższa przez 12 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia, po 15 miesiącach, mimo nadal niższych wartości, różnica nie była już istotna statystycznie ( $p=0,077$ ), a począwszy od 18. miesiąca obserwacji bezwzględna liczba granulocytów obojętnochłonnych osiągnęła wartości zbliżone do stwierdzanych w grupie dzieci zdrowych ( $p=0,77$  po 18 i  $p=0,82$  po 24 miesiącach).

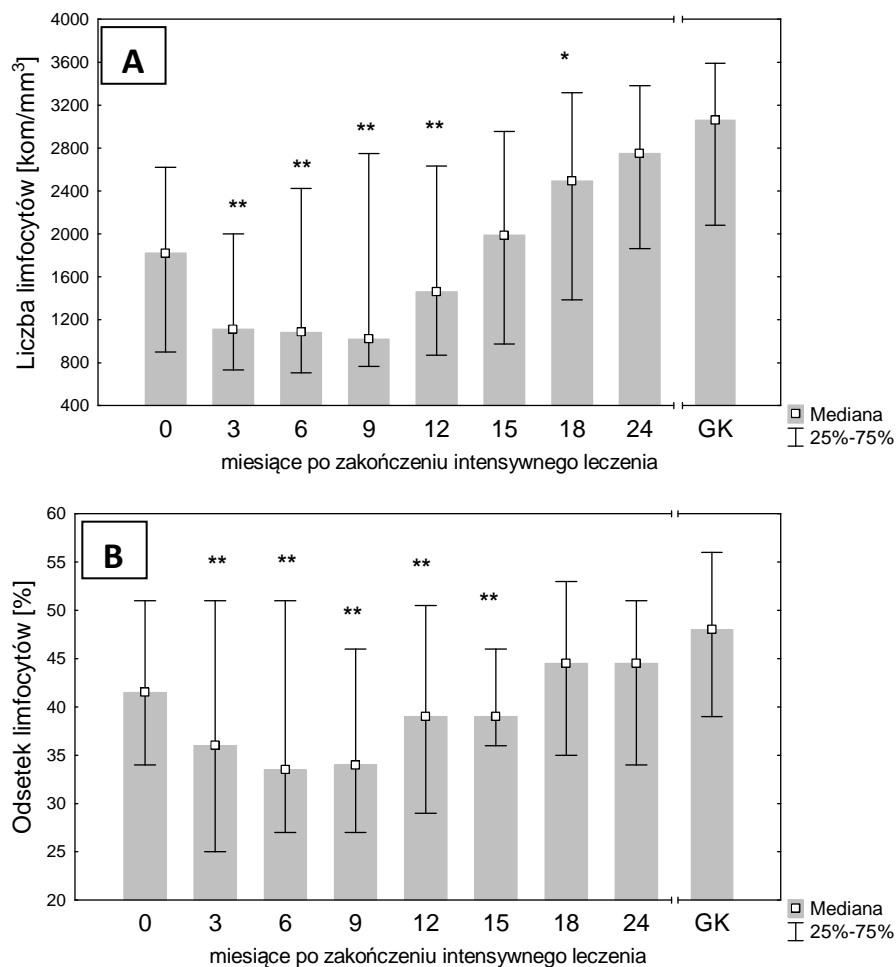
Mimo, iż w kolejnych badaniach, począwszy od 3. do 24. miesiąca obserwacji, odsetek neutrocytów wśród krwinek białych był istotnie statystycznie wyższy niż w badaniu bezpośrednio po zakończeniu intensywnego leczenia, jego wartości we wszystkich punktach czasowych były porównywalne z wartościami dzieci zdrowych ( $p>0,05$ ) (Rysunek 4.2.1.2.B).

Analiza ilościowa limfocytów (Rysunek 4.2.1.3) wykazała, iż bezwzględna liczba limfocytów krwi obwodowej dzieci z ostrą białaczką, podobnie jak całkowita liczba leukocytów, obniżyła się istotnie po pierwszych 3 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia ( $p=0,000065$ ), a następnie utrzymywała się na stabilnie niskim poziomie ( $p>0,05$ ), wykazując po 15 miesiącach obserwacji tendencję do wyższych wartości ( $p=0,061$ ) i istotny statystycznie wzrost po 18 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia ( $p=0,017$ ) w stosunku do badania po 3 miesiącach. W porównaniu z grupą kontrolną bezwzględna liczba limfocytów u dzieci z ostrą białaczką była istotnie niższa przez 18 miesięcy obserwacji ( $p<0,05$ ), a po 2 latach od zakończenia intensywnego leczenia różnice między grupami nie były już znamienne ( $p=0,070$ ).

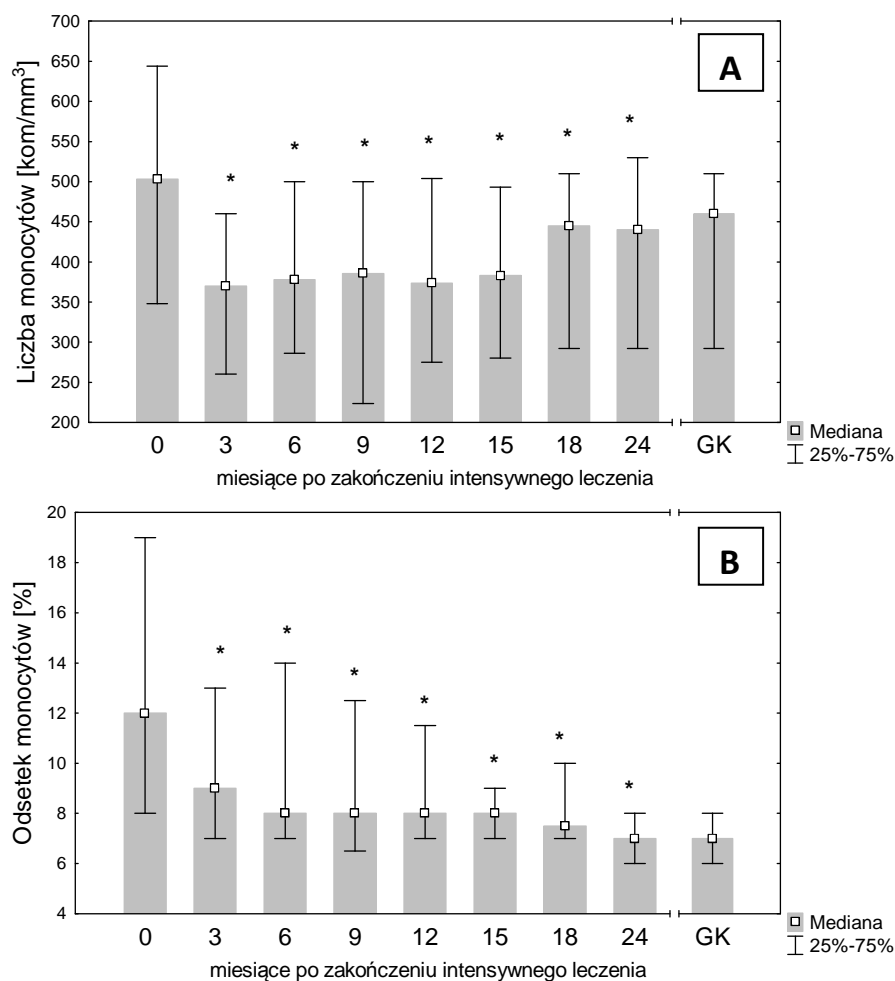
Odsetek limfocytów wśród krwinek białych krwi obwodowej pacjentów z ostrą białaczką (Rysunek 4.2.1.3.B) również obniżył się istotnie statystycznie po 3 miesiącach obserwacji ( $p=0,029$ ) i pozostawał na stabilnie niskim poziomie do 15. miesiąca po zakończeniu intensywnego leczenia. W trzech kolejnych badaniach – między 3. a 9. miesiącem obserwacji – odsetek



limfocytów u pacjentów z ostrą białaczką był znacząco niższy niż w grupie kontrolnej.



**Rysunek 4.2.1.3.** Bezwzględna liczba (A) i odsetek (B) limfocytów krwi obwodowej u dzieci z ostrą białaczką w okresie 2 lat po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego oraz u dzieci z grupy kontrolnej (GK). Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. \*\*  $p < 0,05$  w stosunku do badania wstępnego; \*  $p < 0,05$  w stosunku do badania po 3 miesiącach.



**Rysunek 4.2.1.4.** Bezwzględna liczba (A) i odsetek (B) monocytów wśród krwinek białych krwi obwodowej u dzieci z ostrą białaczką w okresie 2 lat po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego oraz u dzieci z grupy kontrolnej (GK). Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. \*  $p < 0,05$  w stosunku do badania wstępnego.

Bezwzględna liczba monocytów u dzieci z ostrą białaczką po 3 miesiącach obserwacji obniżyła się istotnie statystycznie i pozostawała na stabilnie niższym poziomie w stosunku do badania wstępnego, jednakże w czasie całego okresu obserwacji była porównywalna do wartości stwierdzanych w grupie kontrolnej ( $p > 0,05$ ) (Rysunek 4.2.1.4.A).

Zaś odsetek tych komórek (Rysunek 4.2.1.4.B), mimo znamiennego obniżenia po 3 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia i utrzymywania się niskiego poziomu do zakończenia obserwacji ( $p < 0,05$  w stosunku do badania wstępnego), dopiero w 24. miesiącu osiągnął wartości zbliżone do obserwowanych u dzieci zdrowych ( $p = 0,95$ ).

#### 4.2.2. Komórki układu białokrwinkowego u pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym po zakończeniu intensywnego leczenia

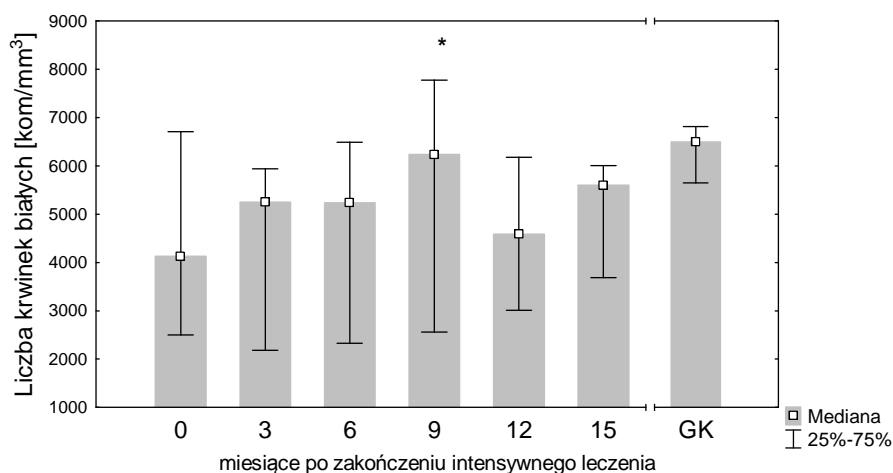
Obserwacja pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym trwała 15 miesięcy, krew obwodową do badań pobierano co 3 miesiące, podobnie jak od pacjentów z ostrą białaczką.

**Tabela 4.2.2.1.** Liczebność pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym w poszczególnych fazach badania.

	Badanie wstępne	Ponowne pobranie krwi po:				
		3 mies.	6 mies.	9 mies.	12 mies.	15 mies.
Liczba pacjentów [n]	7	7	7	6	4	4

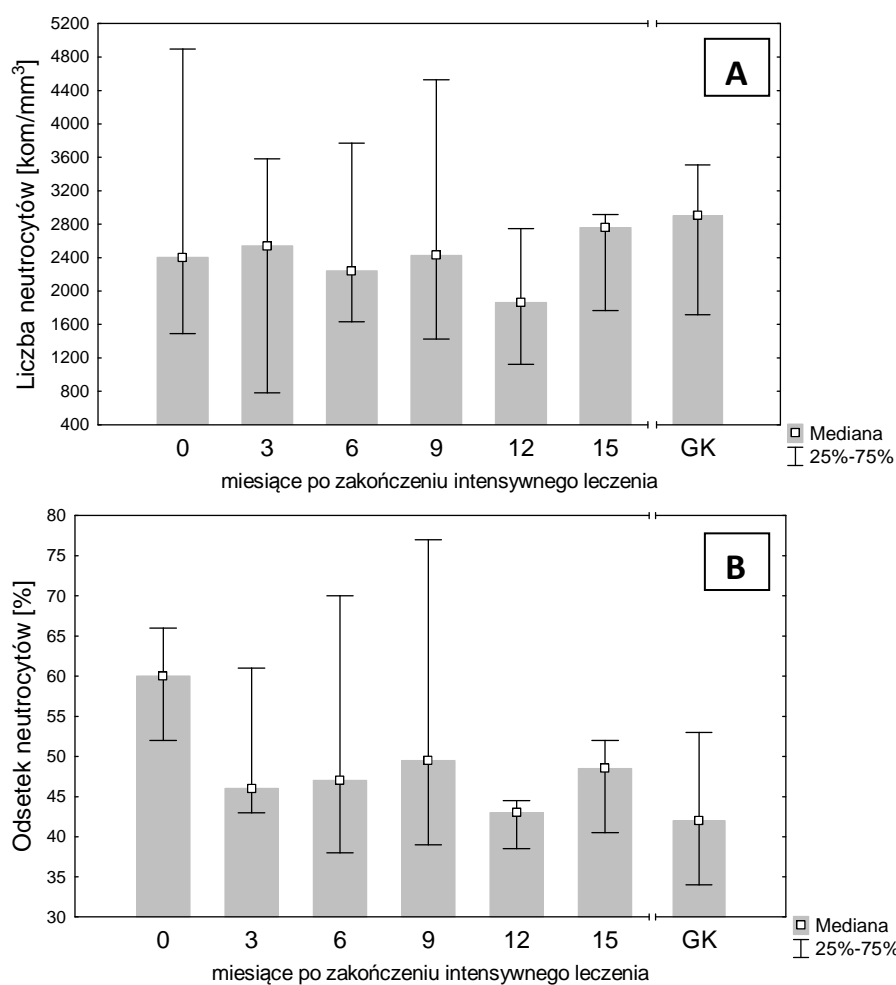
W grupie chorych z chłoniakiem nieziarnicznym tylko dwóch pacjentów z T-NHL otrzymywało leczenie podtrzymujące remisję w okresie prowadzonych obserwacji – u jednego chłopca zakończono badania po 6 miesiącach, a u drugiego po 9 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia.

Wyniki analizy ilościowej komórek układu białokrwinkowego w badanych punktach czasowych u dzieci z NHL oraz w grupie kontrolnej przedstawiają kolejno wykresy 4.2.2.1, 4.2.2.2, 4.2.2.3 i 4.2.2.4. Na wykresach pokazano różnice istotne statystycznie w stosunku do badania wstępnego i/lub po 3 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia.



**Rysunek 4.2.2.1.** Bezwzględna liczba leukocytów krwi obwodowej u dzieci z NHL w okresie 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego oraz u dzieci z grupy kontrolnej (GK). Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. \*  $p < 0,05$  w stosunku do badania wstępnego.

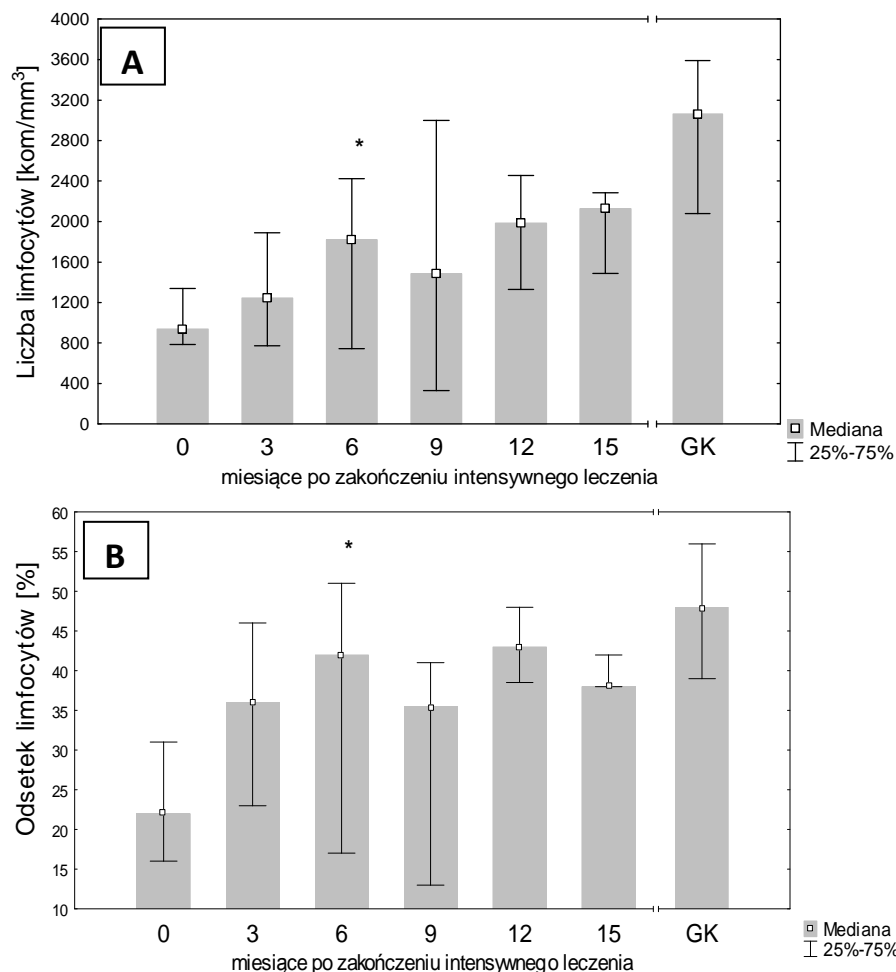
U dzieci z chłoniakiem nieziarniczym w badaniu wstępnym zaobserwowano jedynie tendencję do niższej wartości całkowitej liczby leukocytów ( $p=0,062$  w stosunku do grupy kontrolnej), a po 9 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia znamienne wzrost liczby tych komórek ( $p=0,046$ ) (Rysunek 4.2.2.1). W porównaniu z wartościami stwierdzanymi u dzieci zdrowych obserwowane różnice nie były istotne statystycznie przez cały okres obserwacji.



**Rysunek 4.2.2.2.** Bezwzględna liczba (A) i odsetek (B) neutrocytów krwi obwodowej u dzieci z chłoniakiem nieziarniczym w okresie 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego oraz u dzieci z grupy kontrolnej (GK). Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem.

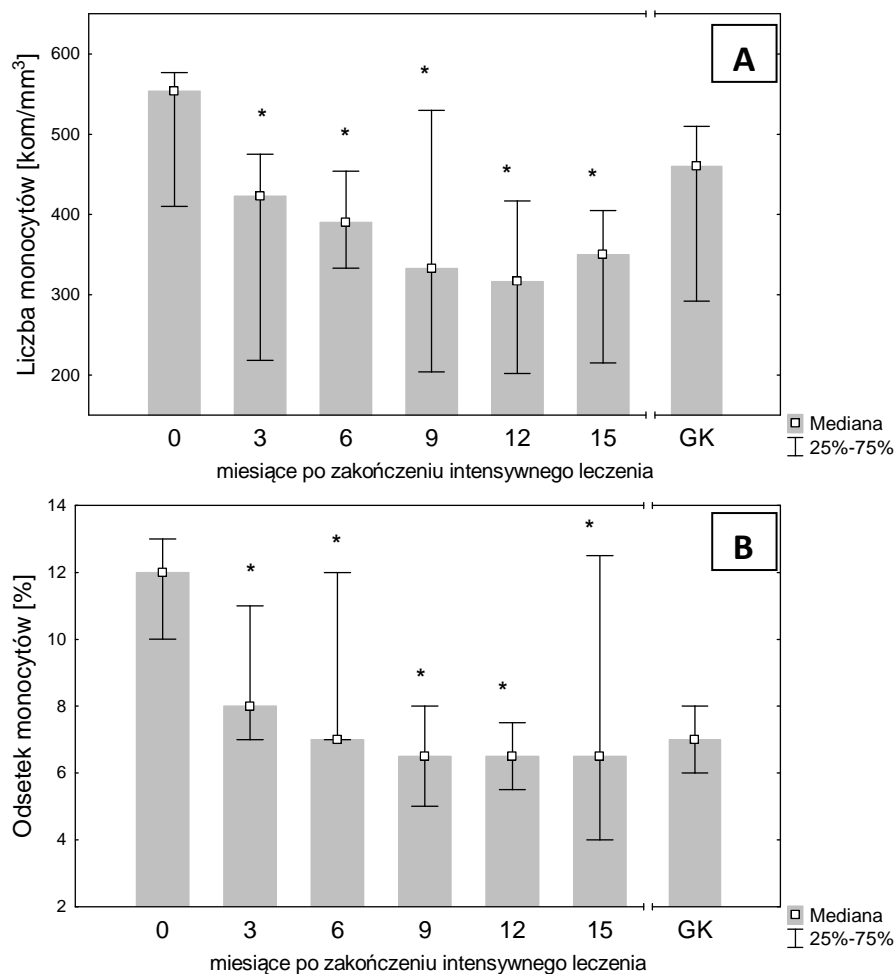
Całkowita liczba granulocytów obojętnochłonnych krwi obwodowej (Rysunek 4.2.2.2.A) nie różniła się istotnie statystycznie między kolejnymi badaniami u dzieci z chłoniakiem nieziarniczym ( $p>0,05$ ), nie wykazano

również znamiennej różnicy w porównaniu z grupą kontrolną ( $p > 0,05$ ). Jedynie odsetek neutrocytów w badaniu wstępnym pacjentów z NHL był istotnie statystycznie wyższy ( $p = 0,011$ ) niż u dzieci zdrowych.



**Rysunek 4.2.2.3.** Bezwzględna liczba (A) i odsetek (B) limfocytów krwi obwodowej u dzieci z chłoniakiem nieziarniczym w okresie 15 miesięcy po zakończeniu intensywnej terapii przeciwnowotworowej oraz u dzieci z grupy kontrolnej (GK). Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwantylem. \*  $p < 0,05$  w stosunku do GK.

Zarówno bezwzględna liczba, jak i odsetek limfocytów krwi obwodowej u dzieci z chłoniakiem nieziarniczym były istotnie statystycznie niższe niż u dzieci zdrowych w dwóch pierwszych badaniach – wstępnym i po 3 miesiącach od zakończenia leczenia (odpowiednio  $p = 0,0010$  i  $p = 0,0017$  w badaniu wstępnym oraz  $p = 0,0029$  i  $p = 0,047$  w badaniu po 3 miesiącach). W 6. miesiącu obserwacji wartości te istotnie wzrosły w stosunku do badania wstępnego (w obu przypadkach  $p = 0,046$ ), dalsze różnice nie były już istotne statystycznie.



**Rysunek 4.2.2.4.** Bezwzględna liczba (A) i odsetek (B) monocytów wśród krwinek białych krwi obwodowej u dzieci z chłoniakiem nieziarnicznym w okresie 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego oraz u dzieci z grupy kontrolnej (GK). Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. \*  $p < 0,05$  w stosunku do badania wstępnego.

Jak pokazano na Rysunku 4.2.2.4, zarówno bezwzględna liczba, jak i odsetek monocytów krwi obwodowej u dzieci z NHL obniżyły się istotnie statystycznie po 3 miesiącach obserwacji w stosunku do badania wstępnego (odpowiednio  $p = 0,027$  i  $p = 0,043$ ). W porównaniu z grupą dzieci zdrowych dzieci z chłoniakiem nieziarnicznym miały istotnie statystycznie wyższy odsetek monocytów ( $p = 0,010$ ) tylko bezpośrednio po zakończeniu intensywnego leczenia, w kolejnych badaniach (a w przypadku bezwzględnej liczby tych komórek – już od badania wstępnego) – wartości te były porównywalne z grupą kontrolną ( $p > 0,05$ ).

## PODSUMOWANIE

Stan immunosupresji, w postaci obniżonej liczby krwinek białych, granulocytów obojętnochłonnych i limfocytów w porównaniu do wartości u dzieci zdrowych, utrzymywał się u dzieci z ostrą białaczką odpowiednio przez okres 15, 12 i 18 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego, przy czym po 3 miesiącach liczba krwinek białych, odsetek i całkowita liczba limfocytów obniżyły się istotnie w stosunku do badań wstępnych. Odwrotną tendencję obserwowano w odniesieniu do odsetka monocytów wśród leukocytów krwi obwodowej pacjentów z ostrą białaczką, gdzie przez 18 miesięcy obserwacji, mimo znamienego spadku po 3 miesiącach wraz ze spadkiem bezwzględnej liczby tych komórek, jego wartości pozostawały na poziomie istotnie wyższym niż obserwowany w grupie kontrolnej.

W przypadku dzieci z chłoniakiem nieziarnicznym, oprócz początkowej względnej i bezwzględnej limfopenii, utrzymującej się do 3. miesiąca obserwacji, wartości bezwzględnej liczby krwinek białych, neutrocytów i monocytów już bezpośrednio po zakończeniu intensywnego leczenia nie różniły się istotnie statystycznie od wartości stwierdzanych u dzieci zdrowych i status ten utrzymał się do zakończenia obserwacji. Natomiast odsetek monocytów oraz neutrocytów wśród krwinek białych krwi obwodowej tych pacjentów były podwyższone tylko w badaniu początkowym, a następnie obniżyły się do wartości obserwowanych w grupie kontrolnej.

### **4.3. Status komórek NK po zakończeniu intensywnego leczenia w ostrych białaczkach i NHL u dzieci**

Komórki NK stanowią pierwszą linię obrony w zakażeniach wirusowych, biorą udział w odpowiedzi przeciwnowotworowej oraz w rozwoju odpowiedzi wtórnej przeciwko różnym drobnoustrojom chorobotwórczym. Leczenie przeciwnowotworowe, jak wspomniano we wstępie, może w znacznym stopniu zaburzać działanie tych komórek, co z kolei może przenosić się na wrażliwość organizmu na infekcje i na ich przebieg również po zakończeniu takiego leczenia.

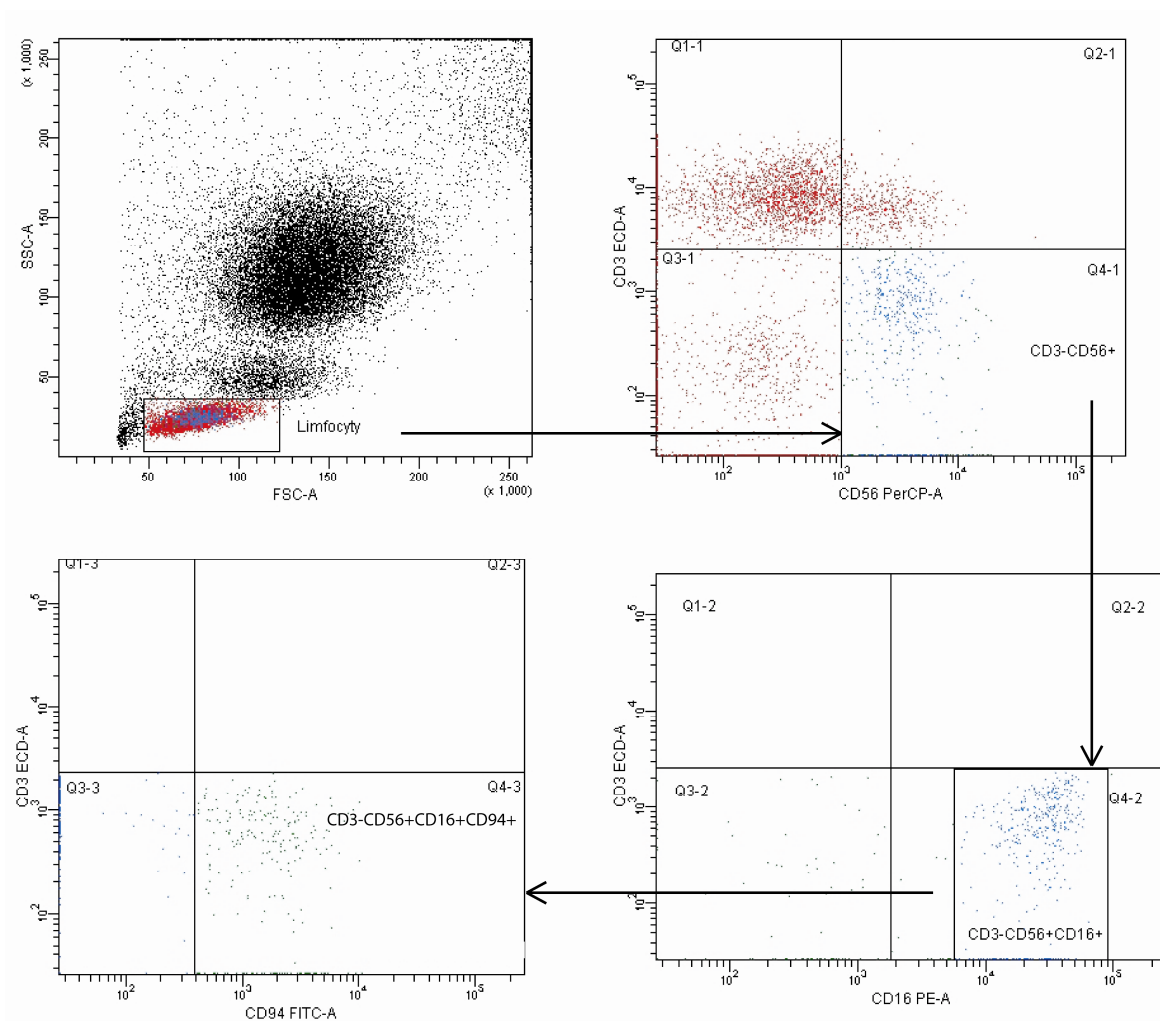
#### **4.3.1. Wpływ intensywnego leczenia przeciwnowotworowego na status komórek NK**

Ocenie poddano aktywność cytotoksyczną komórek NK oraz odsetek tych komórek (jako komórek o fenotypie  $CD3-CD16^+CD56^+$ ) i komórek  $CD3-CD16^+CD56^+CD94^+$  wśród limfocytów krwi obwodowej.

Odsetek komórek  $CD3-CD16^+CD56^+$  i  $CD3-CD16^+CD56^+CD94^+$  badano metodami cytometrii przepływowej, a następnie, na podstawie wyników badania morfologii krwi obwodowej, obliczano ich bezwzględną liczbę.

Schemat bramkowania komórek NK przedstawiono na Rysunku 4.3.1.1.





**Rysunek 4.3.1.1.** Przykład sposobu analizy danych uzyskanych w cytometrze przepływowym – bramkowania komórek NK: ustalanie regionów (bramek) zawierających kolejno: limfocyty, komórki  $CD3^-CD56^+$  (Q4-1), komórki  $CD3^-CD56^+CD16^+$  (Q4-2) i komórki  $CD3^-CD56^+CD16^+CD94^+$  (Q4-3).

Pierwsze badanie, oceniające bezpośredni wpływ leczenia przeciwnowotworowego na status komórek NK, wykonano u każdego pacjenta 2 tygodnie po zakończeniu intensywnej terapii. Wyniki przeprowadzonej analizy przedstawia Tabela 4.3.1.1.

**Tabela 4.3.1.1.** Status komórek NK u dzieci z ostrą białaczką i z chłoniakiem nieziarnicznym 2 tygodnie po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego w porównaniu z wartościami dzieci zdrowych.

	Grupa kontrolna (GK) n=15	Pacjenci z ostrą białaczką n=26	p	Pacjenci z NHL n=7	p
Aktywność cytotoksyczna komórek NK (%)	14,5 (10-18,55)	16,86 (8,5-24,22)	0,25	20,52 (16,25-22,96)	0,084
Komórki CD3-CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> (%)*	6 (3-12)	2,7 (0,6-3,6)	<b>0,008</b>	6 (3,6-9,0)	0,93
Komórki CD3-CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> (kom/ $\mu$ l)	193 (62-323)	26 (2-45)	<b>0,0001</b>	80 (14-95)	0,065
Komórki CD3-CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD94 <sup>+</sup> (%)*	1,1 (0,3-2,4)	1 (0,1-1,4)	0,39	2,1 (0,3-7,3)	0,44
Komórki CD3-CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD94 <sup>+</sup> (kom/ $\mu$ l)	25 (8-80)	12 (0-15)	<b>0,016</b>	45 (4-78)	0,97

\* odsetek komórek wśród limfocytów; NHL- chłoniak nieziarniczny  
Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya.

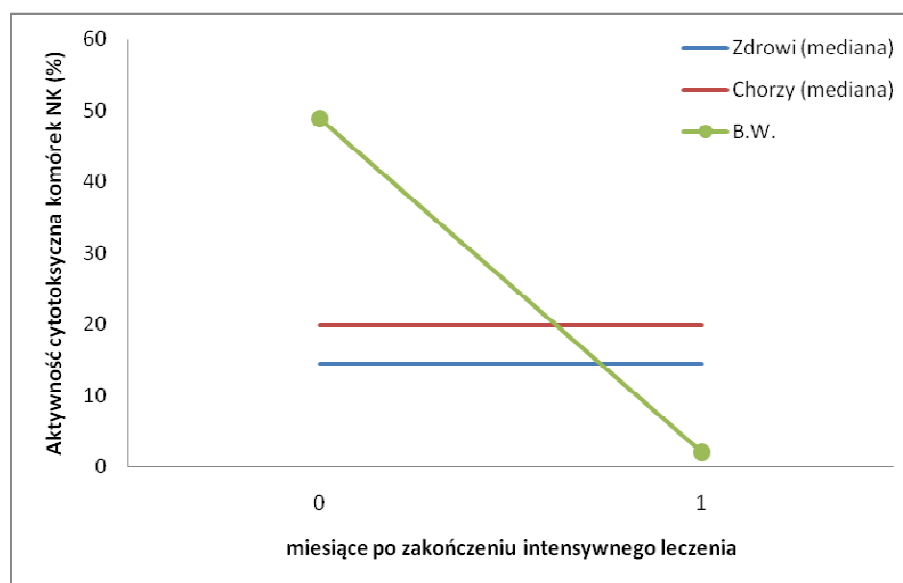
Na podstawie analizy przedstawionej w powyższej tabeli wykazano, iż aktywność komórek NK u pacjentów z ostrą białaczką po zakończeniu intensywnego leczenia nie różniła się istotnie statystycznie od wartości stwierdzanych u dzieci zdrowych. Jednakże u pacjentów z tej grupy stwierdzono istotne obniżenie zarówno odsetka, jak i bezwzględnej liczby tych komórek (CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) oraz bezwzględnej liczby komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> w porównaniu do wartości grupy kontrolnej.

Natomiast dzieci z chłoniakiem nieziarnicznym po zakończeniu intensywnego leczenia wykazywały tendencję do wyższej aktywności komórek NK przy tendencji do niższej bezwzględnej liczby komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> w porównaniu do dzieci zdrowych.

Ciekawą obserwacją stanowiła również analiza statusu komórek NK u 3 pacjentów wykluczonych następnie z projektu badawczego z powodu rozwoju nowotworu w pierwszych 3 miesiącach obserwacji (Tabela 3.1.3) – dzieci te miały znacznie podwyższoną aktywność komórek NK w stosunku do dzieci zdrowych oraz pozostałych dzieci chorych (mediana 52,53%; [46,19-58,88]); mediana odsetka komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (11,8%) i komórek

CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> (6,4%) była również wyższa niż u dzieci zdrowych i pozostałych dzieci chorych.

U jednego z tych pacjentów (B.W.) wykonano dodatkowe badanie aktywności cytotoksycznej komórek NK w momencie stawiania diagnozy dotyczącej wtórnego procesu nowotworowego - wynosiła ona wówczas tylko 2% (Rysunek 4.3.1.2).



**Rysunek 4.3.1.2.** Zmiany aktywności cytotoksycznej komórek NK u pacjenta B.W., u którego rozpoznano wtórny proces nowotworowy w porównaniu z medianą tych wartości u grupy badanej bezpośrednio po zakończeniu intensywnej terapii i u dzieci zdrowych.

#### 4.3.2. Wpływ przynależności do grupy ryzyka u dzieci z ALL oraz radioterapii OUN na status komórek NK

W dalszych badaniach przeprowadzono analizę odsetka i bezwzględnej liczby komórek o fenotypie CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> oraz CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> oraz aktywności cytotoksycznej komórek NK, uwzględniając wpływ rodzaju leczenia (chemioterapia vs. chemioterapia z radioterapią) w grupie z ostrą białaczką oraz wpływ jego długości i intensywności, na podstawie kwalifikacji pacjentów z ALL do poszczególnych grup ryzyka.

Wyniki analizy wpływu przynależności do grupy ryzyka na status komórek NK po zakończeniu intensywnego leczenia przedstawiono w Tabeli 4.3.2.1. Porównania wyników w grupach ryzyka pośredniego (IR) i wysokiego (HR) w stosunku do wartości z grupy niskiego ryzyka (SR) wykonano testem U Manna-Whitneya.

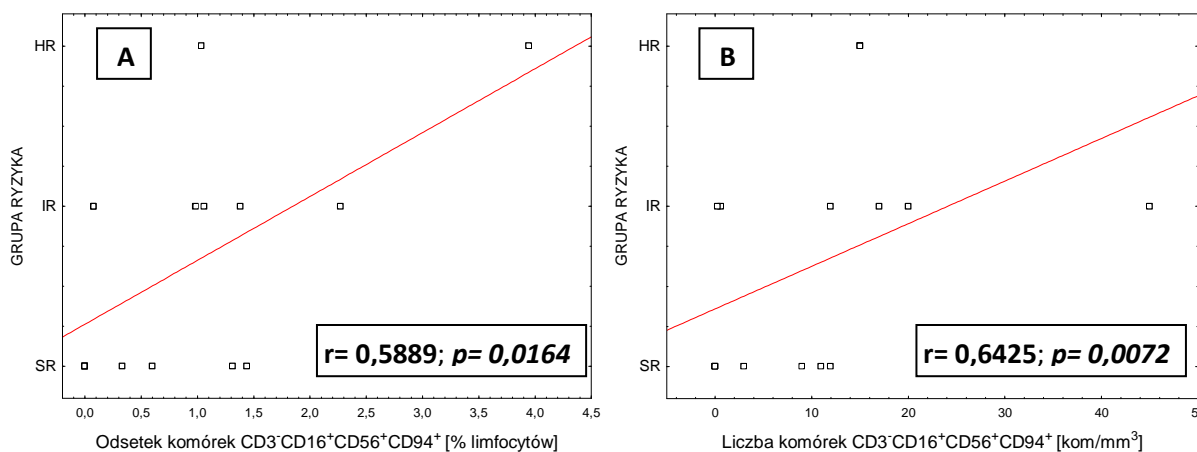
**Tabela 4.3.2.1.** Porównanie statusu komórek NK u dzieci z ALL bezpośrednio po zakończeniu intensywnego leczenia w kontekście grupy ryzyka.

	SR	IR	p <sup>^</sup>	HR	p <sup>^</sup>
Liczba pacjentów (n)	10	10	-	3	-
Aktywność cytotoksyczna komórek NK (%)	17,23 (3,0-26,0)	8,59 (6,8-10,93)	<b>0,044</b>	27,77 (24,22-31,32)	0,48
Komórki CD3-CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> (%)*	2 (0-4)	3 (1-4)	0,52	5 (3-7)	0,39
Komórki CD3-CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> (kom/ $\mu$ l)	23 (0-45)	26 (9-68)	0,19	34 (26-41)	0,48
Komórki CD3-CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD94 <sup>+</sup> (%)*	0,45 (0-1,4)	1 (0,1-1,3)	0,52	2,45 (1-3,9)	0,19
Komórki CD3-CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD94 <sup>+</sup> (kom/ $\mu$ l)	0 (0-9)	15 (1-20)	0,093	15 (15-15)	0,11

\* odsetek komórek wśród limfocytów; ^porównanie grupy IR i HR z grupą SR  
 SR- grupa niskiego ryzyka; IR- grupa pośredniego ryzyka; HR- grupa wysokiego ryzyka;  
 Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya.

Jak przedstawiono w powyższej tabeli, dzieci z grupy IR miały mniejszą aktywność komórek NK po zakończeniu intensywnego leczenia niż dzieci z grupy SR ( $p=0,044$ ). Natomiast pacjenci z grupy HR wykazywali najwyższą aktywność tych komórek, a różnica wartości w tej grupie porównaniu z dziećmi z grupy IR była istotna statystycznie ( $p=0,020$ ).

Na podstawie przeprowadzonej analizy nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ilościowych komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> i CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> między poszczególnymi grupami ryzyka (Tabela 4.3.2.1.). Jednakże przeprowadziwszy badanie korelacji statusu komórek NK i przynależności do grup ryzyka pacjentów z ALL, wykazano, iż u chorych należących do grup wyższego ryzyka występowały wyższa bezwzględna liczba i odsetek komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> (Rysunek 4.3.2.1).



**Rysunek 4.3.2.1.** Korelacja odsetka (A) i bezwzględnej liczby komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> u pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną w stosunku do grupy ryzyka. SR – grupa niskiego ryzyka, IR – grupa pośredniego ryzyka; HR – grupa wysokiego ryzyka. Analizy przeprowadzono testem korelacji R Spearmana.

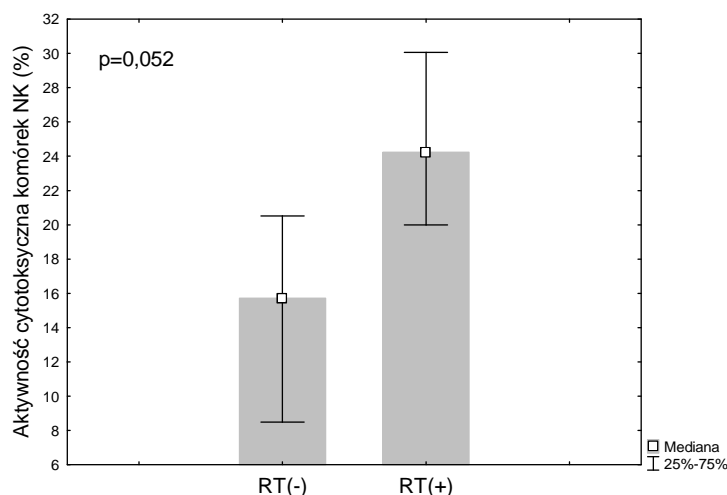
Analiza tych samych wartości określających status komórek NK – z uwzględnieniem podziału chorych z ostrą białaczką na grupę chorych, u których zastosowano radioterapię ośrodkowego układu nerwowego i grupę bez takiego leczenia – nie ujawniła istotnych statystycznie różnic między tymi grupami (Tabela 4.3.2.2). Zauważono jednakże, iż pacjenci poddani radioterapii OUN wykazywali wyraźną tendencję do wyższej aktywności cytotoksycznej komórek NK ( $p=0,052$ ), co przedstawiono na Rysunku 4.3.2.2.

**Tabela 4.3.2.2.** Porównanie statusu komórek NK u dzieci z ostrą białaczką po radioterapii OUN - RT(+) i dzieci, u których nie przeprowadzono takiego leczenia - RT(-).

	Grupa RT(+)	Grupa RT(-)	p
Liczba pacjentów (n,%)	7 (27%)	19 (73%)	-
Aktywność cytotoksyczna komórek NK (%)	24,22 (20,0-30,05)	15,71 (8,5-20,52)	0,052
Komórki CD3-CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> (%)*	3 (1-4)	3 (1-6)	0,72
Komórki CD3-CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> (kom/ $\mu$ l)	25 (8-30)	45 (9-77)	0,20
Komórki CD3-CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD94 <sup>+</sup> (%)*	1,3 (0,3-1,4)	0,8 (0,1-1,3)	0,35
Komórki CD3-CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD94 <sup>+</sup> (kom/ $\mu$ l)	12 (3-15)	9 (0-45)	0,85

\* odsetek komórek wśród limfocytów

Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya.



**Rysunek 4.3.2.2.** Porównanie aktywności cytotoksycznej komórek NK u pacjentów z ostrą białaczką, u których zastosowano radioterapię OUN [Grupa RT(+)] i grupą dzieci, u których nie stosowano takiego leczenia [Grupa RT(-)]. Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem.

## PODSUMOWANIE

Bezpośrednio po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego zaobserwowano istotnie obniżony odsetek i liczbę komórek  $CD3^+CD16^+CD56^+$  oraz odsetek komórek  $CD3^+CD16^+CD56^+CD94^+$  u pacjentów z ostrą białaczką. Dzieci z NHL miały jedynie tendencję do niższych wartości liczby komórek  $CD3^+CD16^+CD56^+$  w porównaniu do dzieci zdrowych.

Zarówno u pacjentów z ostrą białaczką poddanych radioterapii ośrodkowego układu nerwowego, jak i u pacjentów z chłoniakiem niezajrzyniczym stwierdzano tendencję do wyższej aktywności cytotoksycznej komórek NK. Najwyższą aktywność tych komórek wśród pacjentów z ALL obserwowano u dzieci z grupy wysokiego ryzyka, najmniejszą – u dzieci z grupy IR. Dzieci z grup wyższego ryzyka miały również większą liczbę i odsetek komórek  $CD3^+CD16^+CD56^+CD94^+$ . Ponadto nie stwierdzano istotnego wpływu zróżnicowania leczenia na status komórek NK.

#### 4.4. Zmiany statusu komórek NK w okresie 2 lat po zakończeniu leczenia przeciwnowotworowego

Po przeprowadzeniu badań wstępnych prowadzono dalszą obserwację statusu komórek NK w grupach pacjentów. U dzieci z ostrą białaczką krew do badań pobierano co 3 miesiące przez okres 18 miesięcy, a następnie po 2 latach od badania początkowego, a u dzieci z NHL badania prowadzono co 3 miesiące przez okres 15 miesięcy.

**Tabela 4.4.1.** Liczebność pacjentów z ostrą białaczką i NHL w poszczególnych fazach badania.

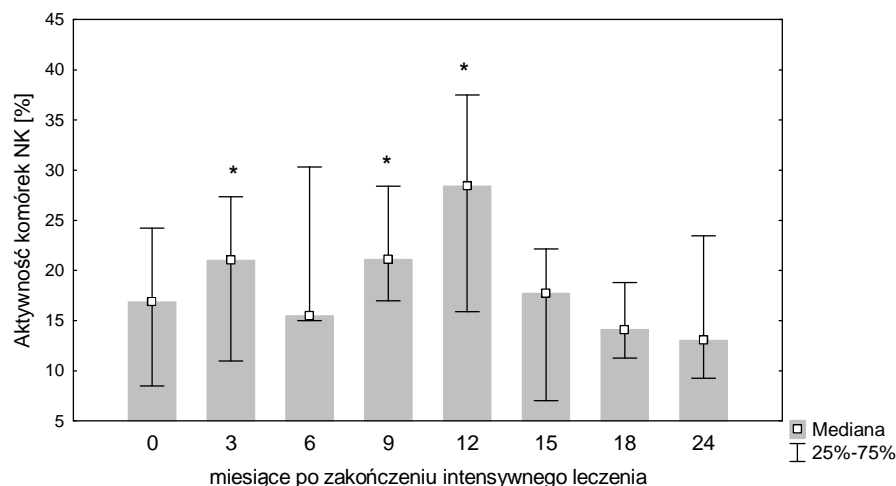
Liczba pacjentów [n]	Badanie wstępne	Ponowne pobranie krwi po:						
		3 mies.	6 mies.	9 mies.	12 mies.	15 mies.	18 mies.	24 mies.
<b>ostra białaczka</b>	26	25	23	19	13	12	9	4
<b>NHL</b>	7	7	7	6	4	4	-	-

Między badaniami w poszczególnych punktach czasowych analizy przeprowadzono testem Wilcozona, a porównania z grupą kontrolną – testem U Manna-Whitneya.

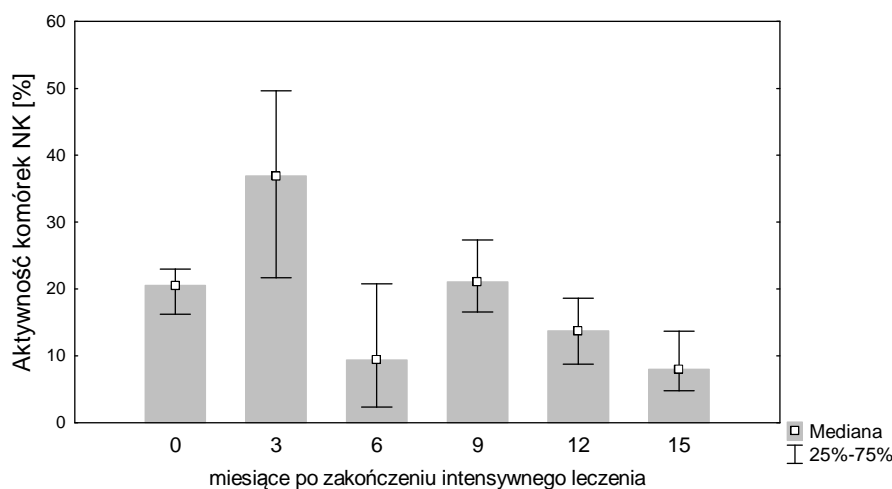
##### 4.4.1. Zmiany aktywności cytotoksycznej komórek NK u dzieci chorych w okresie po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego

Ocenę aktywności cytotoksycznej komórek NK u dzieci z ostrą białaczką i NHL przeprowadzono za pomocą testu uwalniania dehydrogenazy mleczanowej z komórek białaczkowych linii K562 *in vitro*. Na Rysunku 4.4.1.1 przedstawiono zmiany aktywności cytotoksycznej komórek NK u dzieci z ostrą białaczką w okresie 2 lat po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego, zaś na Rysunku 4.4.1.2 – u pacjentów z NHL w okresie 15-miesięcznej obserwacji. Na wykresach pokazano różnice istotne statystycznie w stosunku do badania wstępnego. W Tabeli 4.4.1.1. przedstawiono porównanie aktywności komórek NK

u pacjentów z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarnicznym w poszczególnych etapach projektu z wartościami obserwowanymi u dzieci zdrowych.



**Rysunek 4.4.1.1.** Aktywność cytotoksyczna komórek NK u dzieci z ostrą białaczką w okresie 2 lat po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego. Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. \*-  $p < 0,05$  w stosunku do badania wstępnego.



**Rysunek 4.4.1.2.** Aktywność cytotoksyczna komórek NK u dzieci z chłoniakiem nieziarnicznym w okresie 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego. Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem.

Jak pokazano na Rysunku 4.4.1.1, u pacjentów z ostrą białaczką aktywność komórek NK wzrosła znacząco po 3, a następnie po 9 i 12 miesiącach w stosunku do badania bezpośrednio po zakończeniu intensywnego leczenia (odpowiednio  $p=0,049$ ,  $p=0,041$  i  $p=0,028$ ). U dzieci z NHL (Rysunek 4.4.1.2) wzrost aktywności komórek NK, obserwowany w 3. miesiącu po zakończonym leczeniu, nie był istotny statystycznie



w stosunku do badania wstępnego ( $p=0,010$ ), jakkolwiek aktywność komórek NK tylko w tym punkcie czasowym była znamienne wyższa niż w grupie kontrolnej ( $p=0,017$ ) (Tabela 4.4.1.1).

Porównując wyniki dzieci z ostrą białaczką w poszczególnych punktach czasowych z grupą kontrolną (Tabela 4.4.1.1) stwierdzono, iż po 3 miesiącach od zakończenia leczenia aktywność komórek NK u dzieci chorych wykazywała tendencję do wyższych wartości ( $p=0,065$ ), a po 9 i 12 miesiącach była znamienne wyższa niż w grupie kontrolnej (odpowiednio  $p=0,041$  i  $p=0,042$ ). Począwszy od 15 miesiąca obserwacji, aktywność komórek NK u dzieci z ostrą białaczką nie różniła się istotnie od wartości u dzieci zdrowych.

**Tabela 4.4.1.1.** Porównanie aktywności cytotoksycznej komórek NK u dzieci z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarniczym odpowiednio w okresie 24 i 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego z wynikami uzyskanymi od grupy kontrolnej.

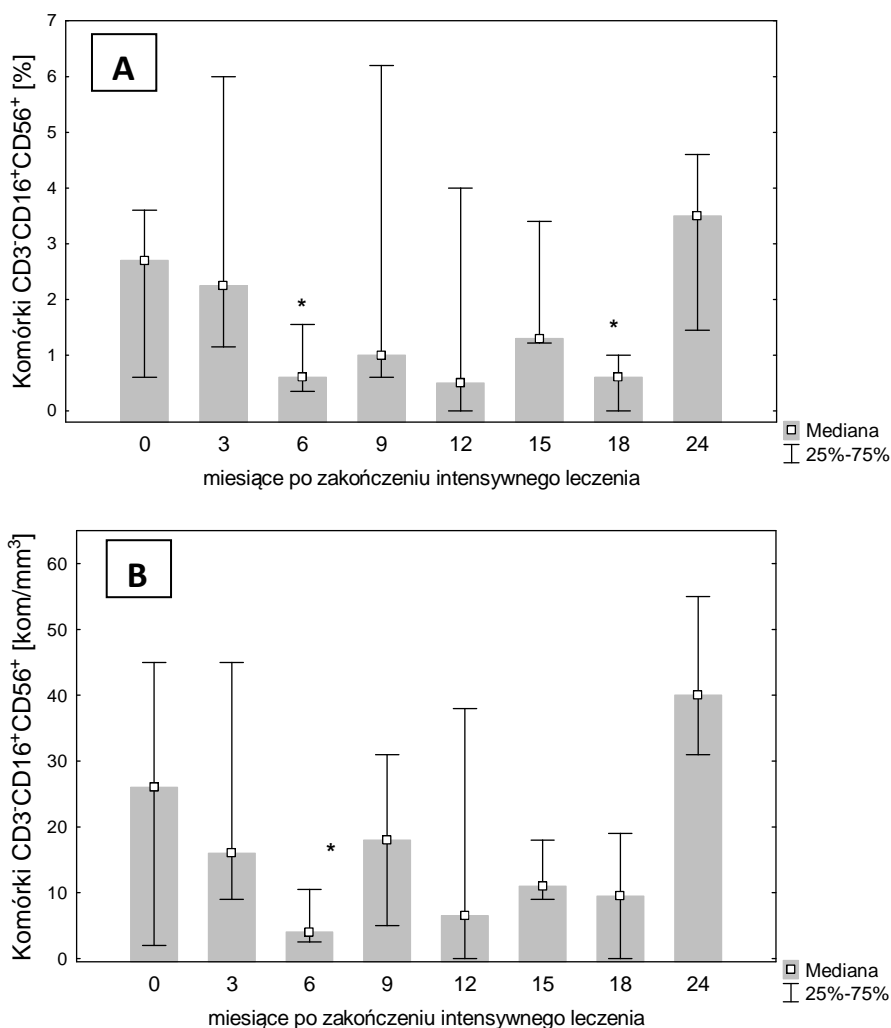
Czas po zakończeniu intensywnego leczenia	Grupa kontrolna	Pacjenci z ostrą białaczką	p	Pacjenci z NHL	p
Badanie wstępne		16,86 (8,5-24,22)	0,35	20,52 (16,25-22,96)	0,084
3 miesiące		21,0 (10,98-27,35)	0,065	36,89 (21,68-49,63)	<b>0,017</b>
6 miesięcy		15,5 (14,99-30,3)	0,087	9,14 (2,34-20,5)	0,57
9 miesięcy	14,5 (10-18,55)	21,1 (17,0-28,4)	<b>0,041</b>	21,05 (15,5-27,32)	0,051
12 miesięcy		28,41 (15,89-37,51)	<b>0,042</b>	13,72 (8,76-18,62)	0,94
15 miesięcy		17,73 (7,03-22,14)	0,66	8,00 (4,8-13,68)	0,12
18 miesięcy		14,1 (11,28-18,8)	0,73	-	-
24 miesiące		13,04 (9,24-23,46)	0,82	-	-

*Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya.*

#### **4.4.2. Zmiany odsetka i bezwzględnej liczby komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> u pacjentów z ostrą białaczką i NHL po zakończeniu intensywnego leczenia**

Odsetek komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> i CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> wśród limfocytów oceniano za pomocą cytometrii przepływowej w punktach czasowych opisanych na początku Rozdziału 4.4. Uzyskane wyniki odsetka i bezwzględnej liczby komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> u dzieci z ostrą białaczką przedstawiono na Rysunku 4.4.2.1, a u dzieci z chłoniakiem nieziarnicznym – na Rysunku 4.4.2.2.

Na wykresach uwzględniono różnice istotne statystycznie w stosunku do badania wstępnego i/lub po 3 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia. Porównanie wyników uzyskanych w poszczególnych etapach projektu w obu grupach dzieci chorych z grupą kontrolną przedstawiono w Tabeli 4.4.2.1 i 4.4.2.2.



**Rysunek 4.4.2.1.** Odsetek (A) i bezwzględna liczba (B) komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> u dzieci z ostrą białaczką w okresie 2 lat po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego. Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. \*-  $p < 0,05$  w stosunku do badania wstępnego.

Jak przedstawiono na powyższym rysunku, u dzieci z ostrą białaczką po 6 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia zarówno odsetek ( $p=0,016$ ), jak i bezwzględna liczba ( $p=0,018$ ) komórek o fenotypie CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> obniżyły się istotnie statystycznie; również w 18. miesiącu obserwacji odsetek tych komórek wśród limfocytów był znamienne niższy niż w badaniu bezpośrednio po zakończeniu intensywnego leczenia ( $p=0,011$ ). Wzrost odsetka i bezwzględnej liczby komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> obserwowany po 2 latach od zakończenia leczenia nie był istotny statystycznie.

Ciekawą obserwacją u pacjentów z ostrą białaczką stanowiło również stwierdzenie co 6 miesięcy znamienne obniżonego odsetka komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> w porównaniu z dziećmi z grupy kontrolnej, począwszy od badania początkowego do 18. miesiąca obserwacji (Tabela 4.4.2.1). Należy również dodać, iż w całym tym okresie bezwzględna liczba komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> u dzieci z ostrą białaczką była istotnie statystycznie niższa niż u dzieci zdrowych (Tabela 4.4.2.2). Po 24 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia zarówno odsetek, jak i bezwzględna liczba komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> nie różniły się istotnie statystycznie od wartości stwierdzanych w grupie kontrolnej, choć bezwzględna liczba tych komórek po 2 latach od zakończenia intensywnego leczenia, czyli średnio po 9,66 miesiącach od zakończenia chemioterapii podtrzymującej, nadal wykazywała tendencję do niższych wartości ( $p=0,059$ ).

**Tabela 4.4.2.1.** Porównanie odsetka komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> u dzieci z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarniczym w okresie odpowiednio 24 i 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego z wynikami uzyskanymi od grupy kontrolnej.

Czas po zakończeniu intensywnego leczenia	Grupa kontrolna	Pacjenci z ostrą białaczką	p	Pacjenci z NHL	p
Badanie wstępne		2,7 (0,6-3,6)	<b>0,010</b>	5,9 (3,6-9,0)	0,93
3 miesiące		2,25 (1,15-6,0)	0,11	3,2 (1,2-3,5)	0,10
6 miesięcy		0,6 (0,35-1,55)	<b>0,0002</b>	6,0 (2,9-7,6)	0,82
9 miesięcy	5,8 (3,0-11,6)	1,0 (0,6-6,2)	0,19	6,2 (4,6-6,6)	0,73
12 miesięcy		0,5 (0,0-4,0)	<b>0,015</b>	4,3 (3,0-8,5)	0,82
15 miesięcy		1,3 (1,22-3,4)	0,084	3,3 (1,1-6,1)	0,54
18 miesięcy		0,6 (0,0-1,0)	<b>0,011</b>	-	-
24 miesiące		3,5 (1,45-4,6)	0,38	-	-

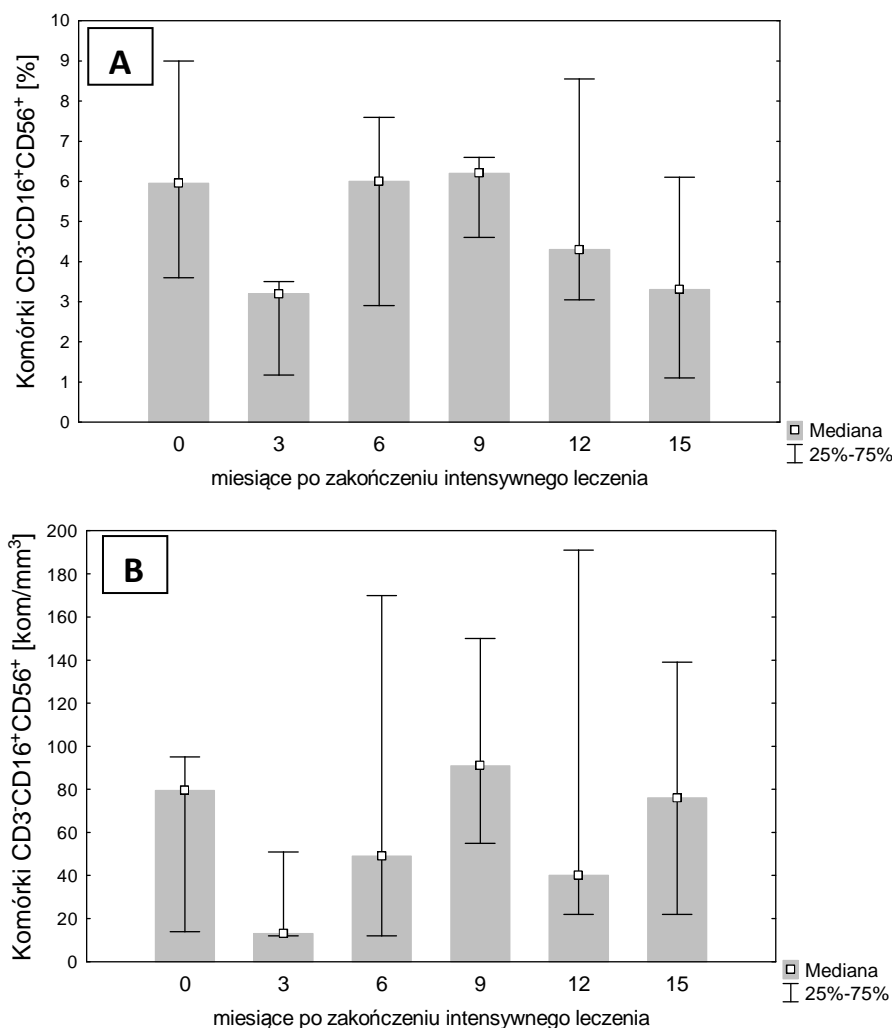
Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya

**Tabela 4.4.2.2.** Porównanie bezwzględnej liczby komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> u dzieci z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarnicznym w okresie odpowiednio 24 i 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego z wynikami uzyskanymi od grupy kontrolnej.

Czas po zakończeniu intensywnego leczenia	Grupa kontrolna	Pacjenci z ostrą białaczką	p	Pacjenci z NHL	p
Badanie wstępne		26 (2-45)	<b>0,0002</b>	80 (14-95)	0,065
3 miesiące		16 (9-45)	<b>0,001</b>	13 (12-51)	<b>0,015</b>
6 miesięcy		4 (2-11)	<b>0,00002</b>	49 (12-170)	0,11
9 miesięcy	193 (62-323)	18 (5-31)	<b>0,002</b>	91 (55-150)	0,38
12 miesięcy		7 (0-38)	<b>0,0005</b>	40 (22-191)	0,19
15 miesięcy		11 (9-18)	<b>0,007</b>	76 (22-139)	0,20
18 miesięcy		10 (0-19)	<b>0,003</b>	-	-
24 miesiące		40 (31-55)	0,059	-	-

*Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartyłem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya*

U pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian odsetka i bezwzględnej liczby komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> w stosunku do badań początkowych w czasie 15-miesięcznej obserwacji (Rysunek 4.4.2.2). Wartości te nie różniły się również znamienne od obserwowanych w grupie kontrolnej, poza jednorazowym istotnym obniżeniem bezwzględnej liczby komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> w stosunku do wartości dzieci zdrowych po 3 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia (p=0,015) (Tabela 4.4.2.2).

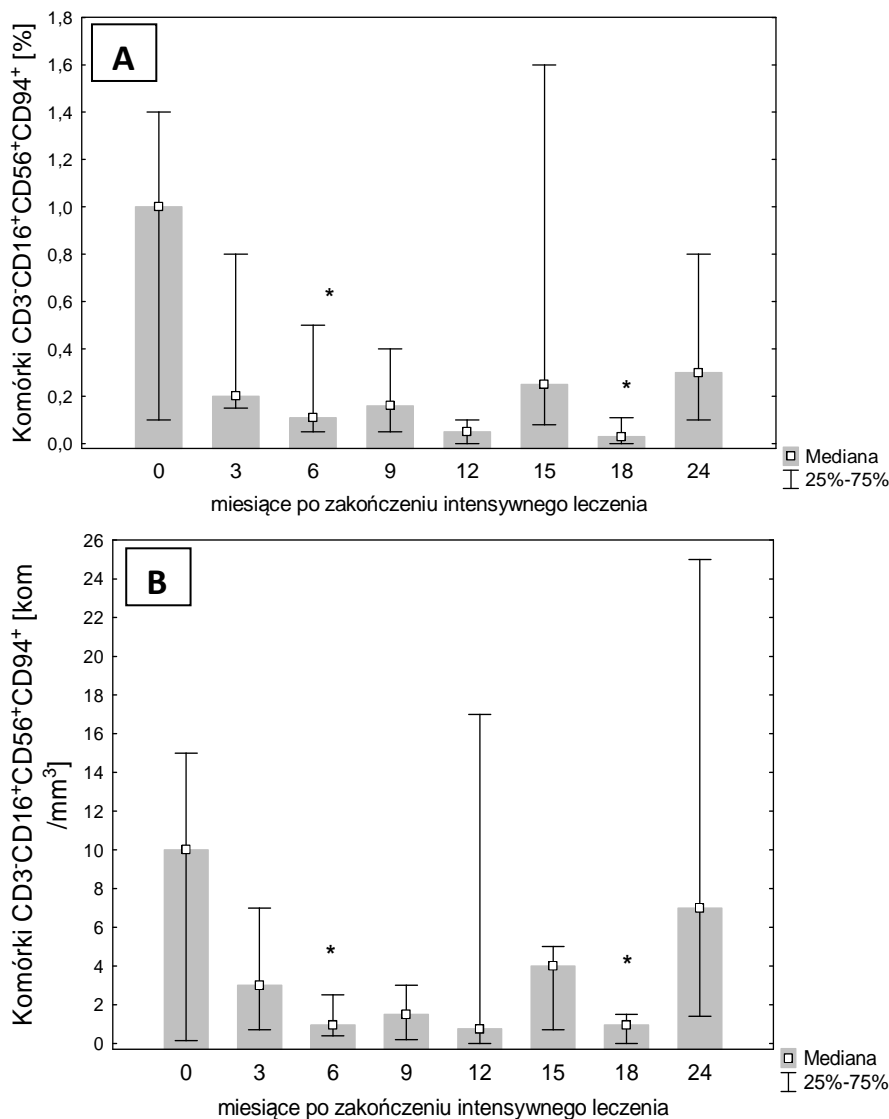


**Rysunek 4.4.2.2.** Odsetek (A) i bezwzględna liczba (B) komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> u dzieci z chłoniakiem niezłośliwym w okresie 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego oraz u dzieci z grupy kontrolnej (GK). Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem.

#### 4.4.3. Zmiany odsetka i bezwzględnej liczby komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> u pacjentów z ostrą białaczką i NHL po zakończeniu intensywnego leczenia

Kolejnym etapem badań była ocena zmian ilościowych komórek o fenotypie CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> u pacjentów w okresie obserwacji po zakończonym intensywnym leczeniu przeciwnowotworowym. Odsetek tych komórek wśród limfocytów krwi obwodowej oceniano za pomocą cytometrii przepływowej, a wartości bezwzględnej liczby tych komórek obliczono na podstawie bezwzględnej liczby limfocytów krwi obwodowej.

Wyniki obserwacji prowadzonych przez 24 miesiące u pacjentów z ostrą białaczką i przez 15 miesięcy u dzieci z NHL przedstawiono poniżej.



**Rysunek 4.4.3.1.** Odsetek (A) i bezwzględna liczba (B) komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> u dzieci z ostrą białaczką w okresie 2 lat po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego. Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. \*- p<0,05 w stosunku do badania wstępnego.

U dzieci z ostrą białaczką odsetek komórek o fenotypie CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> tylko w dwóch pierwszych badaniach nie różnił się istotnie statystycznie od wartości w grupie kontrolnej (Tabela 4.4.3.1). Począwszy od 6. miesiąca obserwacji, gdy obniżył się również znamienne w stosunku do badania wstępnego (p=0,016) (Rysunek 4.4.3.1.A), pozostawał

na istotnie statystycznie niższym poziomie niż stwierdzany w grupie kontrolnej aż do zakończenia badań ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4.4.3.1).

Bezwzględna liczba komórek CD3<sup>+</sup>D16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> była znamienne niższa u dzieci z ostrą białaczką niż u dzieci zdrowych od zakończenia intensywnego leczenia, z wyjątkiem badania po 24 miesiącach ( $p = 0,23$ ) (Tabela 4.4.3.2). Po 6 miesiącach obserwacji, podobnie jak w przypadku odsetka tych komórek, stwierdzono istotne statystycznie obniżenie ich bezwzględnej liczby w stosunku do badania wstępnego ( $p = 0,016$ ) (Rysunek 4.4.3.1.B).

**Tabela 4.4.3.1.** Porównanie odsetka komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> wśród limfocytów u dzieci z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarniczym w okresie odpowiednio 24 i 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego z wynikami uzyskanymi od grupy kontrolnej.

Czas po zakończeniu intensywnego leczenia	Grupa kontrolna	Pacjenci z ostrą białaczką	p	Pacjenci z NHL	p
Badanie wstępne		1,0 (0,1-1,4)	0,42	2,1 (0,3-7,3)	0,44
3 miesiące		0,2 (0,15-0,8)	0,15	0,45 (0,08-0,83)	0,12
6 miesięcy		0,11 (0,05-0,5)	<b>0,023</b>	0,9 (0,13-1,9)	0,61
9 miesięcy	1,1 (0,3-2,4)	0,16 (0,05-0,4)	<b>0,037</b>	0,8 (0,4-1,2)	0,79
12 miesięcy		0,05 (0,0-0,1)	<b>0,033</b>	0,85 (0,12-4,5)	0,94
15 miesięcy		0,25 (0,08-1,6)	<b>0,001</b>	0,4 (0,15-2,0)	0,55
18 miesięcy		0,03 (0,0-0,11)	<b>0,0006</b>	-	-
24 miesiące		0,3 (0,1-0,8)	<b>0,008</b>	-	-

*Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya.*

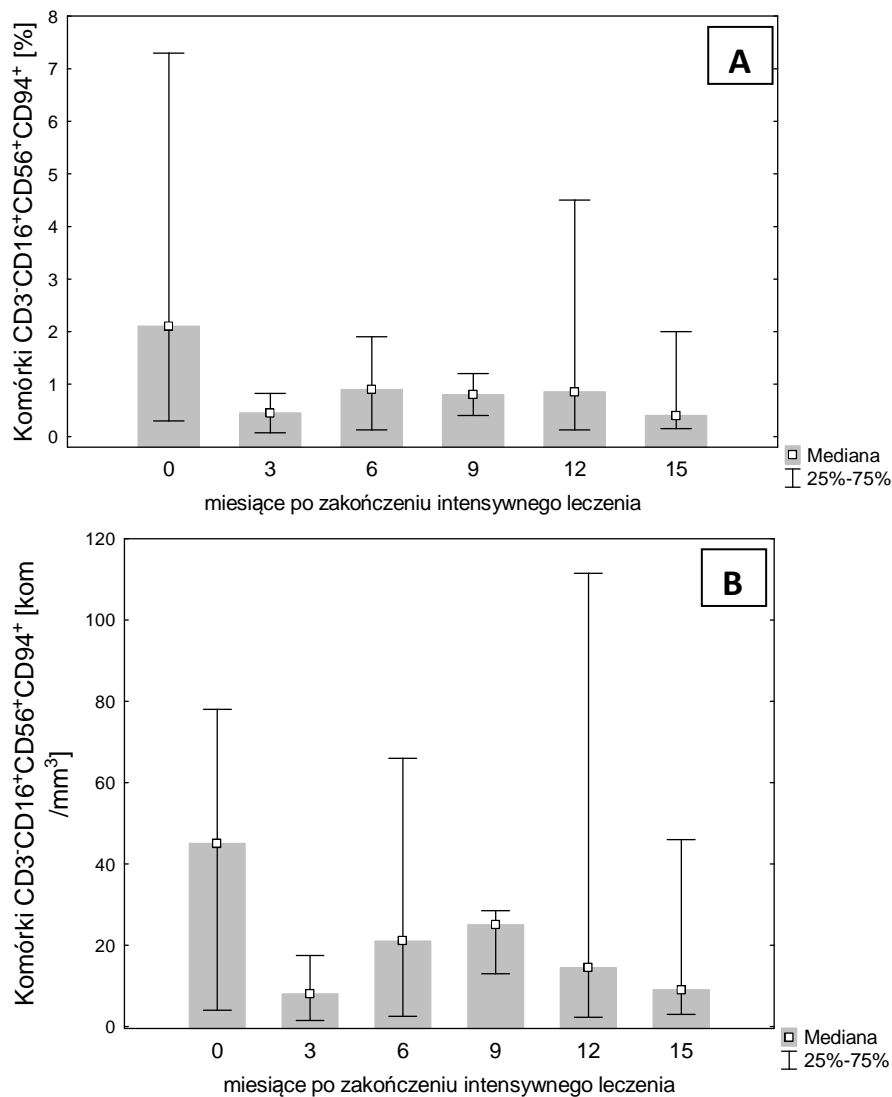


**Tabela 4.4.3.2.** Porównanie bezwzględnej liczby komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> u dzieci z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarnicznym w okresie odpowiednio 24 i 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego z wynikami uzyskanymi od grupy kontrolnej.

Czas po zakończeniu intensywnego leczenia	Grupa kontrolna	Pacjenci z ostrą białaczką	p	Pacjenci z NHL	p
Badanie wstępne		12 (0,5-15)	<b>0,027</b>	45 (4-78)	0,97
3 miesiące		3 (0,5-7)	<b>0,009</b>	8 (1,5-17,5)	0,11
6 miesięcy		1 (0,5-2,5)	<b>0,001</b>	21 (2,5-66)	0,67
9 miesięcy	25 (8-80)	1,5 (0-3)	<b>0,003</b>	25 (13-28,5)	0,73
12 miesięcy		1 (0-17)	<b>0,01</b>	4 (0,5-25)	0,52
15 miesięcy		4 (1-5)	<b>0,027</b>	9 (3-46)	0,49
18 miesięcy		1 (0-1,5)	<b>0,006</b>	-	-
24 miesiące		7 (1,5-25)	0,23	-	-

*Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya.*

U dzieci z chłoniakiem nieziarnicznym, mimo obniżenia się zarówno odsetka, jak i bezwzględnej liczby komórek CD3<sup>+</sup>D16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>, po 3 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia przeciwnowotworowego, nie wykazano istotnych statystycznie różnic tych wartości w poszczególnych punktach czasowych (Rysunek 4.4.3.2) ani w porównaniu z grupą kontrolną (Tabela 4.4.3.1 i 4.4.3.2).



**Rysunek 4.4.3.1.** Odsetek (A) i bezwzględna liczba (B) komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> u dzieci z chłoniakiem nieziarniczym w okresie 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego oraz u dzieci z grupy kontrolnej (GK). Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem.

## PODSUMOWANIE

Podsumowując, u dzieci z ostrą białaczką obserwowano znacznie bardziej dynamiczne zmiany statusu komórek NK, dotyczące wszystkich badanych parametrów, aniżeli u dzieci z chłoniakiem nieziarniczym.

W tej grupie chorych obserwowano istotny wzrost aktywności komórek NK po 3 miesiącach oraz znamienne spadek ich odsetka i bezwzględnej liczby po 6 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia, a także znamienne obniżenie odsetka i bezwzględnej liczby komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> w tym punkcie

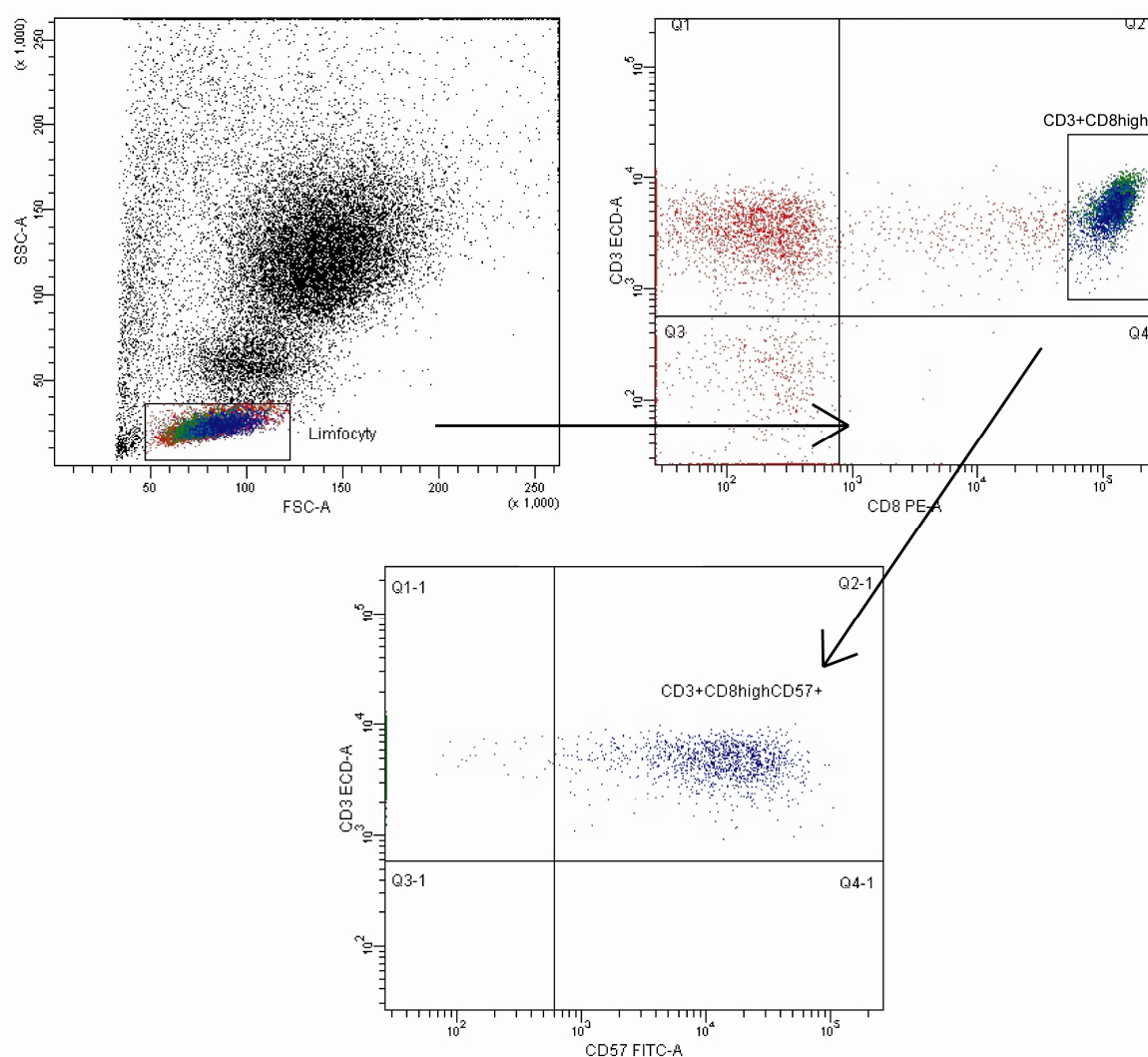
czasowym. Co ciekawe, aktywność komórek NK wzrosła dwukrotnie znamienne w porównaniu do dzieci zdrowych – w 9. i 12. miesiącu obserwacji, a odsetek komórek  $CD3^+CD16^+CD56^+$  obniżał się istotnie statystycznie cyklicznie co 6 miesięcy od zakończenia intensywnego leczenia istotnie w porównaniu do wartości u dzieci u zdrowych. Bezwzględna liczba komórek  $CD3^+CD16^+CD56^+$  i  $CD3^+CD16^+CD56^+CD94^+$  utrzymywała się na znamienne niższym poziomie niż u dzieci zdrowych przez 18 miesięcy obserwacji, zaś odsetek komórek  $CD3^+CD16^+CD56^+CD94^+$  był niższy do 2 lat po zakończeniu intensywnego leczenia, począwszy od 6. miesiąca badań.

U dzieci z chłoniakiem niezłośliwym zmiany statusu komórek NK między poszczególnymi punktami czasowymi nie były istotne statystycznie, a badane wartości porównywalne z grupą kontrolną w czasie 15-miesięcznej obserwacji. Wyjątkiem od tego był znamienne wzrost aktywności cytotoksycznej komórek NK i jednoczesne obniżenie bezwzględnej liczby komórek  $CD3^+CD16^+CD56^+$  po 3 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia w porównaniu do wartości dzieci zdrowych.

#### **4.5. Status komórek $CD3^+CD8^{\text{high}}CD57^+$ u dzieci z ostrą białaczką i chłoniakiem niezłośliwym po zakończeniu intensywnego leczenia**

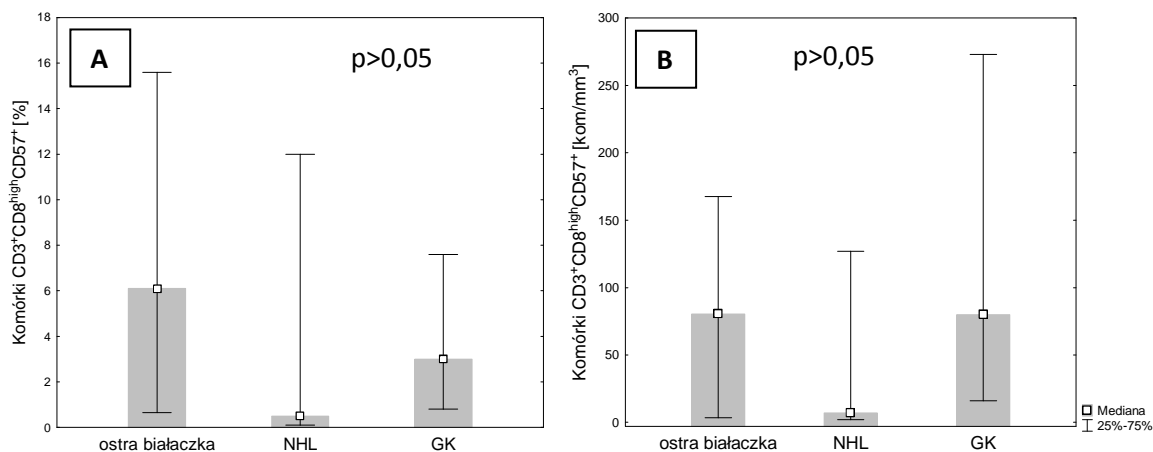
Dotychczas przeprowadzone analizy wskazują na istnienie stanu supresji układu białokrwinkowego wraz z zaburzeniem liczby i funkcji komórek NK bezpośrednio po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego, dlatego kolejnym etapem badań była analiza ilościowa limfocytów T o fenotypie  $CD3^+CD8^{\text{high}}CD57^+$ , które stanowią populację komórek związanych z immunosupresją [144].

Odsetek tych komórek wśród limfocytów krwi obwodowej badanych pacjentów został określony metodą cytometrii przepływowej, gdzie zastosowano podwójne bramkowanie przedstawione na Rysunku 4.5.1. Bezwzględną liczbę tych komórek obliczono na podstawie bezwzględnej liczby limfocytów krwi obwodowej.



**Rysunek 4.5.1.** Przykład sposobu analizy danych uzyskanych w cytometrze przepływowym – bramkowania komórek  $CD3^+CD8^{high}CD57^+$ : ustalanie regionów (bramek) zawierających kolejno: limfocyty, komórki  $CD3^+CD8^+$  z wysoką ekspresją cząsteczki CD8, czyli  $CD3^+CD8^{high}$  (Q2) i komórki  $CD3^+CD8^{high}CD57^+$  (Q2-1).

Wstępnej analizie ilościowej komórek  $CD3^+CD8^{high}CD57^+$  dokonano u dzieci podzielonych pod względem choroby podstawowej na dwie grupy: z ostrą białaczką (n=26) i z chłoniakiem nieziarnicznym (n=7). Wyniki uzyskane w grupach badanych porównano z grupą kontrolną (n=15), co przedstawia Rysunek 4.5.2.



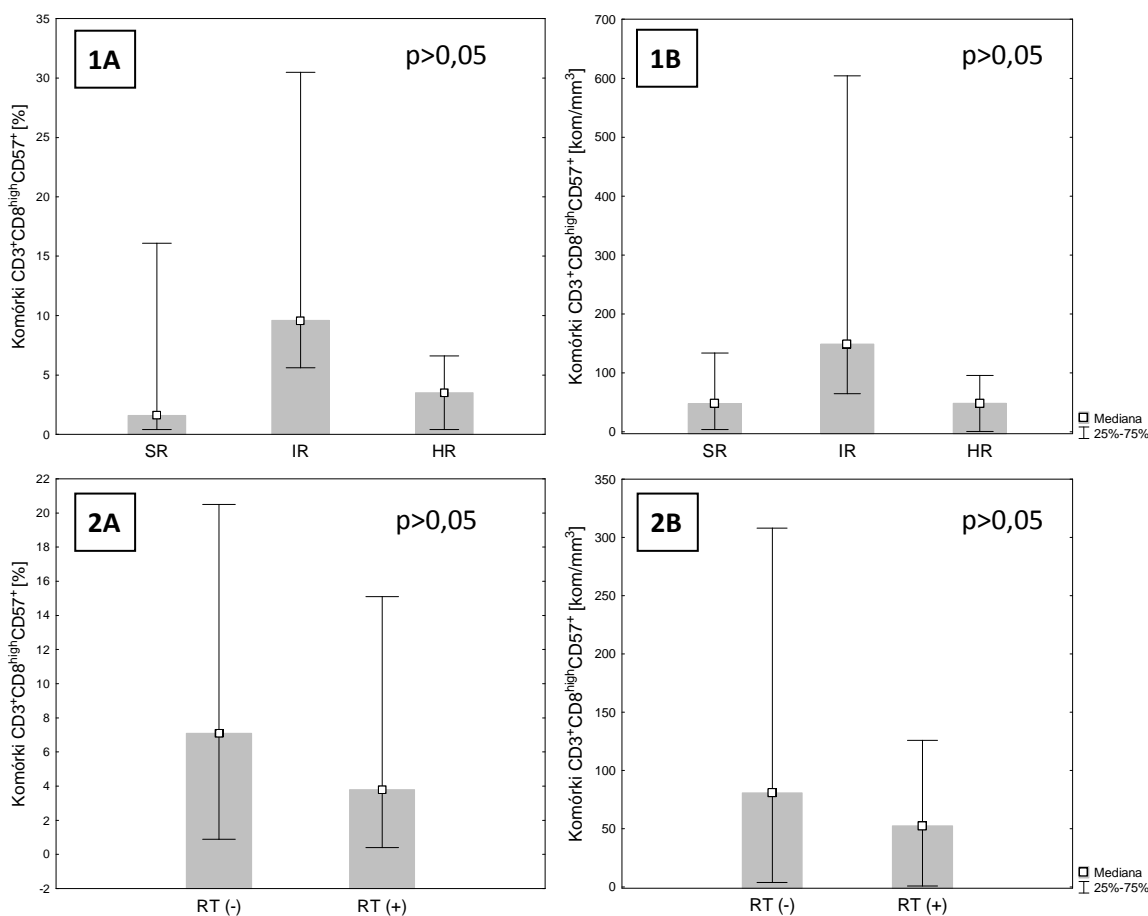
**Rysunek 4.5.2.** Porównanie odsetka (A) oraz bezwzględnej liczby komórek CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> (B) u dzieci z grupy z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarniczym (NHL) z wynikami uzyskanymi od grupy kontrolnej (GK). Analizy wykonano testem U Manna-Whitneya. Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem.

Przeprowadzone analizy nie ujawniły istotnych statystycznie różnic odsetka i liczby komórek CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> ani między dziećmi zdrowymi i dziećmi z grup badanych po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego, ani pomiędzy dziećmi z ostrą białaczką i pacjentami z NHL. We wszystkich trzech badanych grupach stwierdzono szeroki zakres wyników odsetka i bezwzględnej liczby tych komórek.

#### 4.5.1. Status komórek CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> u dzieci z ostrą białaczką w kontekście rodzaju stosowanego leczenia intensywnego

Przeprowadzono również analizę ilościową immunosupresyjnych limfocytów T o fenotypie CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> w kontekście stosowanego leczenia intensywnego, zróżnicowanego dla poszczególnych grup ryzyka w ostrej białaczce limfoblastycznej, a także z uwzględnieniem stosowania napromieniania czaszki w grupie dzieci z ostrą białaczką.

Wyniki analiz przedstawia Rysunek 4.5.1.1.



**Rysunek 4.5.1.1.** Porównanie odsetka (1A i 2A) oraz bezwzględnej liczby (1B i 2B) komórek CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup>: (1) u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną podzielonych pod względem grupy ryzyka [SR- grupa niskiego ryzyka; IR- grupa pośredniego ryzyka; HR- grupa wysokiego ryzyka] oraz (2) u dzieci z ostrą białaczką, u których stosowano lub nie napromienianie ośrodkowego układu nerwowego [odpowiednio RT(-) i RT(+)]. Analizy wykonano testem U Manna-Whitneya. Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem.

Mimo obserwowanych różnic składu ilościowego komórek CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> u dzieci z ALL z różnych grup ryzyka, gdzie najwyższa mediana zarówno odsetka, jak i bezwzględnej liczby tych komórek występowała u dzieci z grupy pośredniego ryzyka (IR), nie stwierdzono między tymi wynikami istotności statystycznej.

Stwierdzano również nieistotnie statystycznie niższy odsetek i bezwzględną liczbę komórek CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> u pacjentów z ostrą białaczką, u których zastosowano radioterapię OUN w połączeniu z chemioterapią (odpowiednio p=0,55 i p=0,38).

## PODSUMOWANIE

Liczba i odsetek immunosupresyjnych limfocytów T o fenotypie CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> nie różniła się znacząco między dziećmi z grup badanych bezpośrednio po zakończeniu intensywnego leczenia i dziećmi zdrowymi. Nie stwierdzono również istotnego wpływu zróżnicowania stosowanego leczenia na skład ilościowy tych komórek.

### 4.6. Zmiany statusu komórek CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> w okresie 2 lat po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego

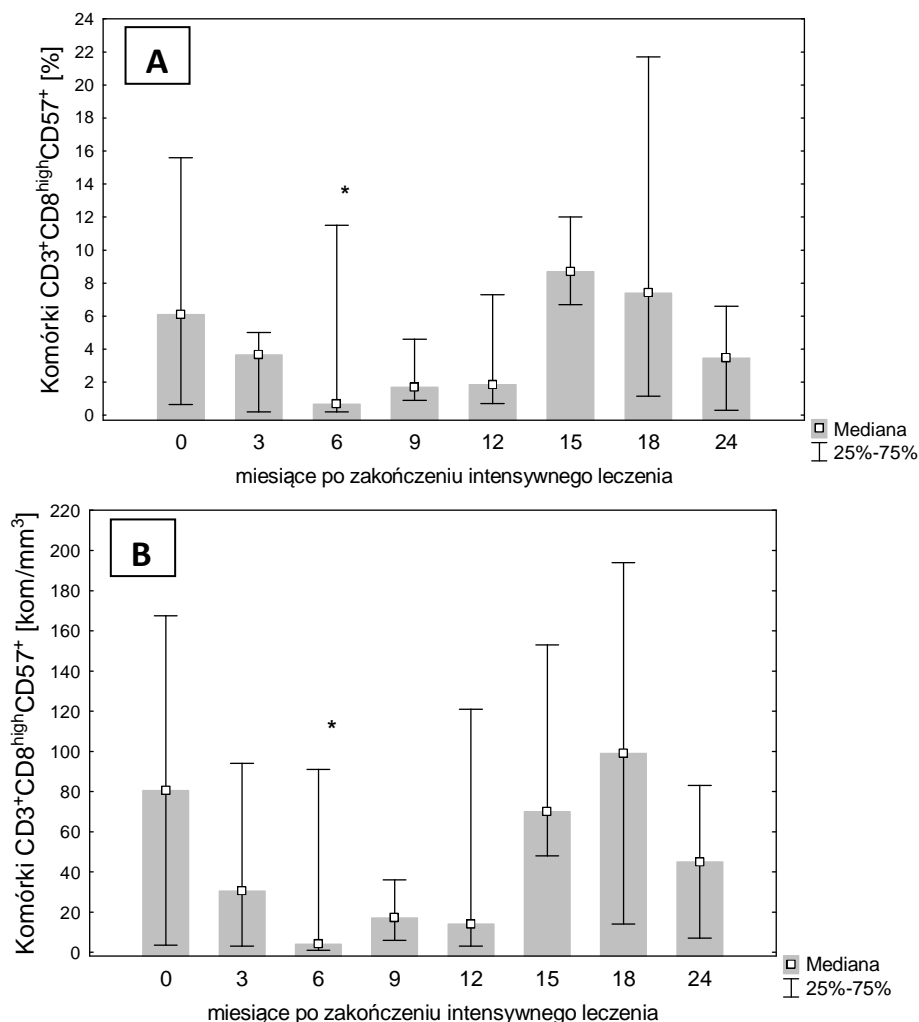
Kolejnym etapem badań była ocena zmian ilościowych komórek o fenotypie CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> u pacjentów w okresie obserwacji po zakończonym intensywnym leczeniu przeciwnowotworowym. Odsetek tych komórek wśród limfocytów krwi obwodowej oceniano za pomocą cytometrii przepływowej, a wartości bezwzględnej ich liczby obliczano na podstawie wartości bezwzględnej liczby limfocytów. U dzieci z ostrą białaczką krew do badania pobierano co 3 miesiące przez okres 18 miesięcy, a następnie po 2 latach od badania początkowego, a u dzieci z NHL badania prowadzono co 3 miesiące przez okres 15 miesięcy.

**Tabela 4.6.1.** Liczebność pacjentów z ostrą białaczką i NHL w poszczególnych fazach badania.

Liczba pacjentów [n]	Badanie wstępne	Ponowne pobranie krwi po:						
		3 mies.	6 mies.	9 mies.	12 mies.	15 mies.	18 mies.	24 mies.
<b>ostra białaczka</b>	26	25	23	19	13	12	9	4
<b>NHL</b>	7	7	7	6	4	4	-	-

Między badaniami w poszczególnych punktach czasowych analizy przeprowadzono testem Wilcoxon, a porównania z grupą kontrolną – testem U Manna-Whitneya.

Wyniki obserwacji statusu komórek  $CD3^+CD8^{high}CD57^+$  u dzieci po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego przedstawiono poniżej. Na wykresach uwzględniono różnice istotne statystycznie w stosunku do badania wstępnego.



**Rysunek 4.6.1.** Odsetek (A) i bezwzględna liczba (B) komórek  $CD3^+CD8^{high}CD57^+$  u dzieci z ostrą białaczką w okresie 2 lat po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego. Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwantylem. \*-  $p < 0,05$  w stosunku do badania wstępnego.

U dzieci z ostrą białaczką odsetek i bezwzględna liczba komórek o fenotypie  $CD3^+CD8^{high}CD57^+$  obniżyły się znamienne po 6 miesiącach od zakończenia leczenia intensywnego (odpowiednio  $p=0,027$  i  $p=0,021$  w stosunku do badania wstępnego) (Rysunek 4.6.1). Zaobserwowano również znamienne wzrost odsetka tych komórek w 15. miesiącu obserwacji w stosunku do badania poprzedzającego ( $p=0,043$ ) [nie zaznaczone



na wykresie]. Porównanie wyników dzieci z ostrą białaczką z wartościami w grupie kontrolnej wykazało, iż z wyjątkiem jednorazowo znamiennej niższej liczby komórek  $CD3^+CD8^{high}CD57^+$  u dzieci z ostrą białaczką w 6. miesiącu obserwacji, pozostałe wartości odsetka i liczby tych komórek były porównywalne z wartościami dzieci zdrowych (Tabela 4.6.2 i 4.6.3).

**Tabela 4.6.2.** Porównanie odsetka komórek  $CD3^+CD8^{high}CD57^+$  u dzieci z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarniczym w okresie odpowiednio 24 i 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego z wynikami uzyskanymi od grupy kontrolnej.

Czas po zakończeniu intensywnego leczenia	Grupa kontrolna	Pacjenci z ostrą białaczką	p	Pacjenci z NHL	p
Badanie wstępne		6,1 (0,65-15,6)	0,33	0,5 (0,1-12,0)	0,73
3 miesiące		3,7 (0,2-5,0)	0,89	2,9 (0,9-6,8)	0,92
6 miesięcy		0,7 (0,2-11,5)	0,47	5,1 (4,6-12,3)	0,23
9 miesięcy	3 (0,8-7,6)	1,7 (0,9-4,6)	0,81	3,4 (0,1-14,9)	0,73
12 miesięcy		1,8 (0,7-7,3)	0,57	0,8 (0,5-3,6)	0,33
15 miesięcy		8,7 (6,7-12,0)	0,068	0,5 (0,3-4,2)	0,31
18 miesięcy		7,4 (1,2-21,7)	0,30	-	-
24 miesiące		3,45 (0,3-6,6)	0,97	-	-

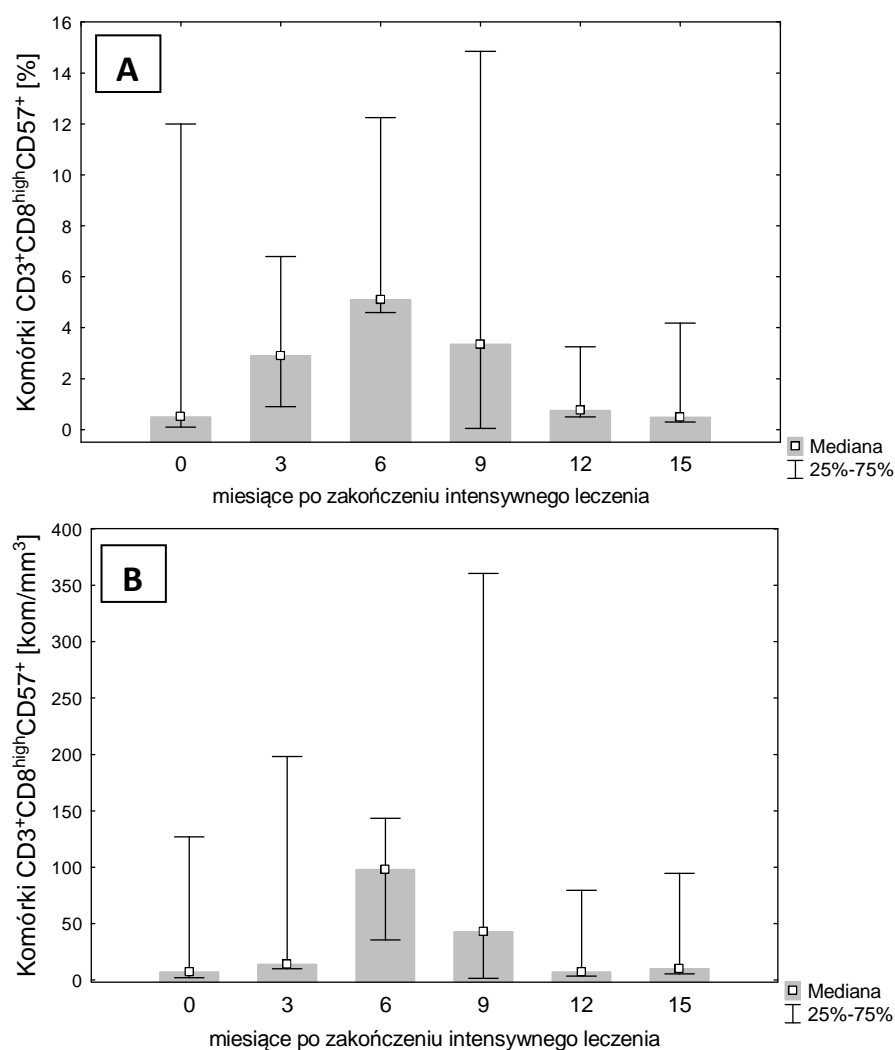
*Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya.*

**Tabela 4.6.3.** Porównanie bezwzględnej liczby komórek  $CD3^+CD8^{high}CD57^+$  u dzieci z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarniczym w okresie odpowiednio 24 i 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego z wynikami uzyskanymi od grupy kontrolnej.

Czas po zakończeniu intensywnego leczenia	Grupa kontrolna	Pacjenci z ostrą białaczką	p	Pacjenci z NHL	p
Badanie wstępne		80,5 (3,5-167,5)	0,59	7 (2-127)	0,22
3 miesiące		30,5 (3-94)	0,27	14 (10-198)	0,37
6 miesięcy		4 (1-91)	<b>0,013</b>	98 (35,5-143)	0,91
9 miesięcy	80 (16-273)	17 (6-36)	0,11	43 (1,5-360,5)	0,65
12 miesięcy		14 (3-121)	0,10	7 (3,5-79,5)	0,12
15 miesięcy		70 (48-153)	0,88	10 (5,5-94,5)	0,19
18 miesięcy		99 (14-194)	0,88	-	-
24 miesiące		45 (7-83)	0,064	-	-

*Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya.*

U dzieci z chłoniakiem nieziarniczym nie wykazano istotnych statystycznie różnic odsetka i bezwzględnej liczby komórek CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> w poszczególnych punktach czasowych w ciągu 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego (Rysunek 4.6.2) ani przy porównaniu tych wartości z grupą kontrolną (Tabela 4.6.2 i 4.6.3).



**Rysunek 4.6.2.** Odsetek (A) i bezwzględna liczba (B) komórek CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> u dzieci z chłoniakiem nieziarniczym w okresie 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego. Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem.

## PODSUMOWANIE

U pacjentów z ostrą białaczką odsetek i bezwzględna liczba limfocytów T o fenotypie  $CD3^+CD8^{high}CD57^+$  wiązanych z immunosupresją obniżyły się po 6 miesiącach, a po 15 miesiącach ich odsetek znamienne wzrósł. Mimo to, tylko w jednym punkcie czasowym – po 6 miesiącach obserwacji – odsetek komórek  $CD3^+CD8^{high}CD57^+$  był niższy niż stwierdzany u dzieci zdrowych.

Wahania liczby i odsetka komórek  $CD3^+CD8^{high}CD57^+$  obserwowane u pacjentów z NHL w okresie 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia nie były istotne statystycznie.

### **4.7. Aktywność fagocytarna komórek żernych krwi obwodowej po zakończeniu intensywniej chemioterapii w ostrych białaczkach i NHL u dzieci**

Kolejnym etapem badań była ocena aktywności żernej fagocytów krwi obwodowej: granulocytów obojętnochłonnych i monocytów u pacjentów bezpośrednio po zakończeniu intensywnego leczenia, a następnie w okresie 2 lat obserwacji. Ocenę prowadzono z zastosowaniem zestawu Phagotest®, który pozwala na oznaczenie zdolności fagocytozy, czyli stopnia pochłonięcia bakterii *Escherichia coli*, zarówno całej populacji komórek fagocytujących (ogólna aktywność fagocytarna), jak i oznaczenie ich aktywności jednostkowej poprzez pomiar liczby pochłoniętych bakterii na jedną komórkę (jednostkowa aktywność fagocytarna).

Badanie wstępne, oceniające bezpośredni wpływ zakończonej intensywniej terapii przeciwnowotworowej na aktywność fagocytarną komórek żernych krwi obwodowej, przeprowadzono 2 tygodnie po jej zakończeniu. Wyniki analizy i porównania grup badanych z grupą kontrolną przedstawiono w Tabeli 4.7.1.

**Tabela 4.7.1.** Aktywność fagocytarna ogólna i jednostkowa komórek żernych krwi obwodowej u dzieci z ostrą białaczką i z chłoniakiem nieziarnicznym 2 tygodnie po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego w porównaniu z wartościami dzieci zdrowych.

	Grupa kontrolna (GK) n=15	Pacjenci z ostrą białaczką n=26	p	Pacjenci z NHL n=7	p
Ogólna aktywność fagocytarna neutrocytów(%)*	87,0 (81,5-88,5)	83,69 (62,05-87,9)	0,23	88,5 (73,1-89,1)	0,78
Jednostkowa aktywność fagocytarna neutrocytów(**)	446,77 (276,93-503,77)	367,31 (299,33-421,36)	0,43	378,19 (226,74-439,19)	0,38
Ogólna aktywność fagocytarna monocytów(%)*	21,4 (3,24-27,6)	25,4 (13,93-38,22)	0,25	23,59 (4,5-47,7)	0,63
Jednostkowa aktywność fagocytarna monocytów(**)	252,31 (194,07-378,43)	279,5 (215,11-366,29)	0,89	157,3 (100,64-371,5)	0,15

\* określa odsetek komórek, które pochłonęły badane bakterie

\*\* intensywność fluorescencji – określa liczbę bakterii pochłoniętych przez 1 komórkę żerną

*Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya.*

Jak przedstawiono w powyższej Tabeli, zarówno u pacjentów z ostrą białaczką, jak i u dzieci z chłoniakiem nieziarnicznym już po zakończeniu intensywnej terapii przeciwnowotworowej aktywność fagocytarna komórek żernych była porównywalna z grupą dzieci zdrowych.

#### 4.7.1. Wpływ rodzaju stosowanego leczenia na aktywność fagocytarną komórek żernych krwi obwodowej

Kolejnym krokiem było przeprowadzenie analizy aktywności żernej neutrocytów i monocytów krwi obwodowej w kontekście stosowanego leczenia, dzieląc pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną pod względem przynależności do grup ryzyka oraz grupę pacjentów z ostrą białaczką – pod względem stosowania lub nie radioterapii ośrodkowego układu nerwowego.

Wyniki analizy wpływu przynależności do grupy ryzyka na aktywność fagocytarną komórek żernych krwi obwodowej po zakończeniu intensywnego leczenia przedstawiono w Tabeli 4.7.1.1, a wpływu radioterapii OUN na badane parametry – w Tabeli 4.7.1.2.

Porównania wyników w grupach ryzyka pośredniego (IR) i wysokiego (HR) w stosunku do wartości z grupy niskiego ryzyka (SR) oraz w grupie poddanej radioterapii OUN w stosunku do wartości w grupie nie poddanej takiemu leczeniu - wykonano testem U Manna-Whitneya.

**Tabela 4.7.1.1.** Porównanie aktywności żernej neutrocytów i monocytów u dzieci z ALL bezpośrednio po zakończeniu intensywnego leczenia w kontekście grupy ryzyka.

	SR	IR	p <sup>^</sup>	HR	p <sup>^</sup>
Liczba pacjentów (n)	10	10	-	3	-
Ogólna aktywność fagocytarna neutrocytów(%)*	60,3 (54,4-87,8)	81,2 (63,8-91,1)	0,36	80,04 (75,21-84,88)	0,69
Jednostkowa aktywność fagocytarna neutrocytów(**)	405,76 (348,39-380,72)	394,78 (290,21-435,52)	0,58	326,53 (286,69-366,38)	0,44
Ogólna aktywność fagocytarna monocytów(%)*	22,8 (2,0-38,34)	30,2 (23,6-52,3)	0,31	15,13 (4,86-25,4)	0,98
Jednostkowa aktywność fagocytarna monocytów(**)	329,31 (233,13-399,79)	243,06 (214,12-278,04)	0,58	152,64 (24,32-280,96)	0,24

\* określa odsetek komórek, które pochłonięły badane bakterie

\*\* intensywność fluorescencji – określa liczbę bakterii pochłoniętych przez 1 komórkę żerną

<sup>^</sup>porównanie grupy IR i HR z grupą SR

SR- grupa niskiego ryzyka; IR- grupa pośredniego ryzyka; HR- grupa wysokiego ryzyka

Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya.

**Tabela 4.7.1.2.** Porównanie aktywności żernej neutrocytów i monocytów u dzieci z ostrą białaczką po radioterapii OUN - RT(+) i dzieci, u których nie przeprowadzono takiego leczenia - RT(-).

	Grupa RT(+)	Grupa RT(-)	p
Liczba pacjentów (n,%)	7 (27%)	19 (73%)	-
Ogólna aktywność fagocytna neutrocytów(%)*	84,88 (75,21-87,8)	79,9 (60,3-89,89)	0,71
Jednostkowa aktywność fagocytna neutrocytów(**)	366,38 (286,69-380,72)	382,36 (348,39-435,52)	0,31
Ogólna aktywność fagocytna monocytów(%)*	25,4 (4,86-35,65)	36,1 (23,6-49,5)	0,34
Jednostkowa aktywność fagocytna monocytów(**)	280,96 (216,1-285,53)	278,04 (214,12-399,79)	0,87

\* określa odsetek komórek, które pochłonęły badane bakterie

\*\* intensywność fluorescencji – określa liczbę bakterii pochłoniętych przez 1 komórkę żerną

*Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya*

Analiza aktywności fagocytarnej pacjentów po zakończonym intensywnym leczeniu przeciwnowotworowym w kontekście rodzaju stosowanego leczenia nie wykazała istotnych statystycznie różnic między poszczególnymi wyodrębnionymi grupami chorych, zarówno wśród pacjentów z ALL, jak i w całej grupie dzieci z ostrą białaczką.

## PODSUMOWANIE

Aktywność fagocytna granulocytów obojętnochłonnych i monocytów u pacjentów z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarnicznym już po zakończeniu intensywnego leczenia była porównywalna z wartościami w grupie dzieci zdrowych. Nie stwierdzono również istotnego wpływu zróżnicowania stosowanego leczenia na aktywność żerną tych komórek.

#### 4.8. Zmiany aktywności fagocytarnej komórek żernych krwi obwodowej w okresie 2 lat od zakończenia intensywnej terapii przeciwnowotworowej

Po przeprowadzeniu badań wstępnych prowadzono dalszą obserwację aktywności fagocytarnej komórek żernych krwi obwodowej w badanych grupach pacjentów. U dzieci z ostrą białaczką krew do badań pobierano co 3 miesiące przez okres 18 miesięcy, a następnie po 2 latach od badania początkowego, a u dzieci z NHL badania prowadzono co 3 miesiące przez okres 15 miesięcy.

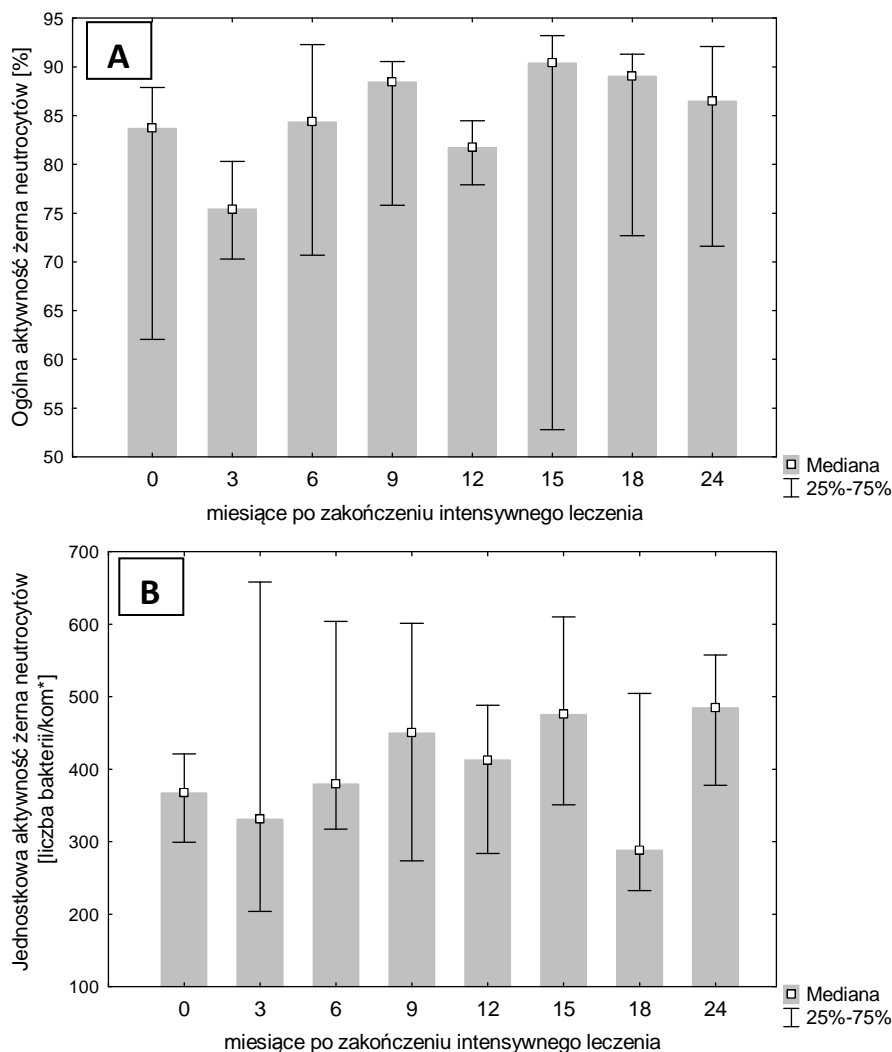
**Tabela 4.8.1.** Liczebność pacjentów z ostrą białaczką i NHL w poszczególnych fazach badania.

Liczba pacjentów [n]	Badanie wstępne	Ponowne pobranie krwi po:						
		3 mies.	6 mies.	9 mies.	12 mies.	15 mies.	18 mies.	24 mies.
<b>ostra białaczka</b>	26	25	23	19	13	12	9	4
<b>NHL</b>	7	7	7	6	4	4	-	-

Między badaniami w poszczególnych punktach czasowych analizy przeprowadzono testem Wilcoxon, a porównania z grupą kontrolną – testem U Manna-Whitneya.

##### 4.8.1. Aktywność fagocytarna granulocytów obojętnochłonnych w okresie 2 lat od zakończenia intensywnej terapii przeciwnowotworowej

Wyniki obserwacji aktywności żernej neutrocytów u dzieci z ostrą białaczką przedstawiono na Rysunku 4.8.1.1, a u dzieci z chłoniakiem nieziarnicznym – na Rysunku 4.8.1.2. Porównania badanych parametrów z wartościami grupy kontrolnej przedstawiają Tabele 4.8.1.1 i 4.8.1.2.



**Rysunek 4.8.1.1.** Ogólna (A) i jednostkowa (B) aktywność fagocytarna granulocytów obojętnochłonnych u dzieci z ostrą białaczką w okresie 24 miesiący po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego. Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem.

Jak wspomniano wcześniej, u dzieci z ostrą białaczką już po zakończeniu intensywnego leczenia aktywność fagocytarna neutrocytów była porównywalna z wartościami u dzieci zdrowych, nie stwierdzono również istotnych statystycznie odchyień tych wartości między badaniem wstępnym a badaniami w kolejnych punktach czasowych (Rysunek 4.8.1.1). Ponadto zarówno ogólna, jak i jednostkowa aktywność granulocytów obojętnochłonnych u dzieci z ostrą białaczką nie różniła się znacząco od wartości u dzieci zdrowych przez cały okres prowadzonych obserwacji (Tabela 4.8.1.1).

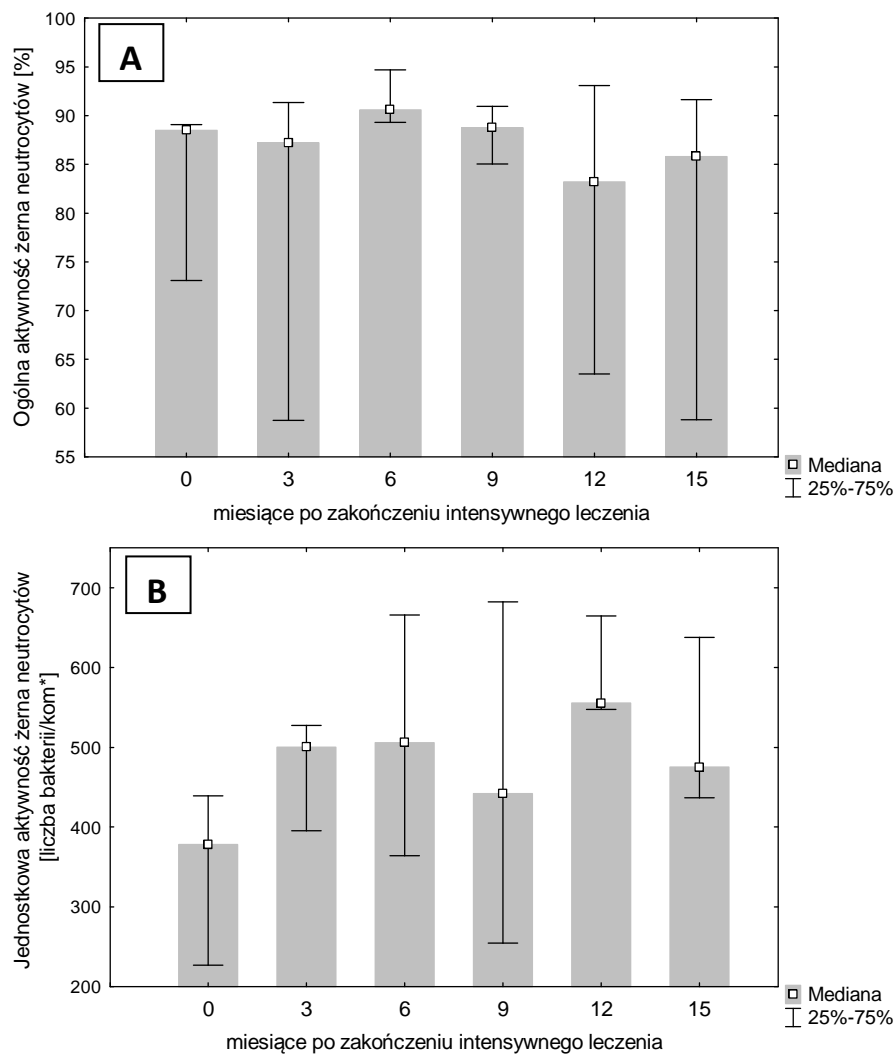


**Tabela 4.8.1.1.** Porównanie aktywności fagocytarnej granulocytów obojętnochłonnych u dzieci z ostrą białaczką w okresie 24 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego z wynikami uzyskanymi od grupy kontrolnej.

Czas po zakończeniu intensywnego leczenia	Ogólna aktywność fagocytarna neutrocytów			Jednostkowa aktywność fagocytarna neutrocytów		
	Grupa kontrolna	Dzieci z ostrą białaczką	p	Grupa kontrolna	Dzieci z ostrą białaczką	p
Badanie wstępne		83,69 (62,05-87,9)	0,36		367,31 (299,33-421,36)	0,42
3 miesiące		75,4 (70,3-80,3)	0,052		331,22 (203,64-658,25)	0,65
6 miesięcy		84,35 (70,7-92,3)	0,89		379,55 (317,37-604,17)	0,69
9 miesięcy	87,0 (81,5-88,5)	88,46 (75,8-90,55)	0,69	446,77 (276,93-503,77)	449,99 (273,47-601,41)	0,79
12 miesięcy		81,73 (77,9-84,5)	0,57		412,71 (283,99-488,15)	0,97
15 miesięcy		90,4 (52,8-93,2)	0,69		475,65 (350,76-610,11)	0,37
18 miesięcy		89,05 (72,7-91,3)	0,48		287,95 (232,68-504,74)	0,48
24 miesiące		86,49 (71,6-92,1)	0,72		484,83 (377,73-557,65)	0,42

*Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya.*

Podobnie jak u dzieci z ostrą białaczką, w grupie dzieci z chłoniakiem nieziarniczym również nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian aktywności żernej neutrocytów między badaniem wstępnym a badaniami w kolejnych punktach czasowych (Rysunek 4.8.1.2), a ogólna i jednostkowa aktywność tych komórek była porównywalna z wartościami dzieci zdrowych od badania wstępnego przez cały okres prowadzonych obserwacji (Tabela 4.8.1.2).



**Rysunek 4.8.1.2.** Ogólna (A) i jednostkowa (B) aktywność fagocytarna granulocytów obojętnochłonnych u dzieci z chłoniakiem niezróżnicowanym w okresie 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego. Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem.

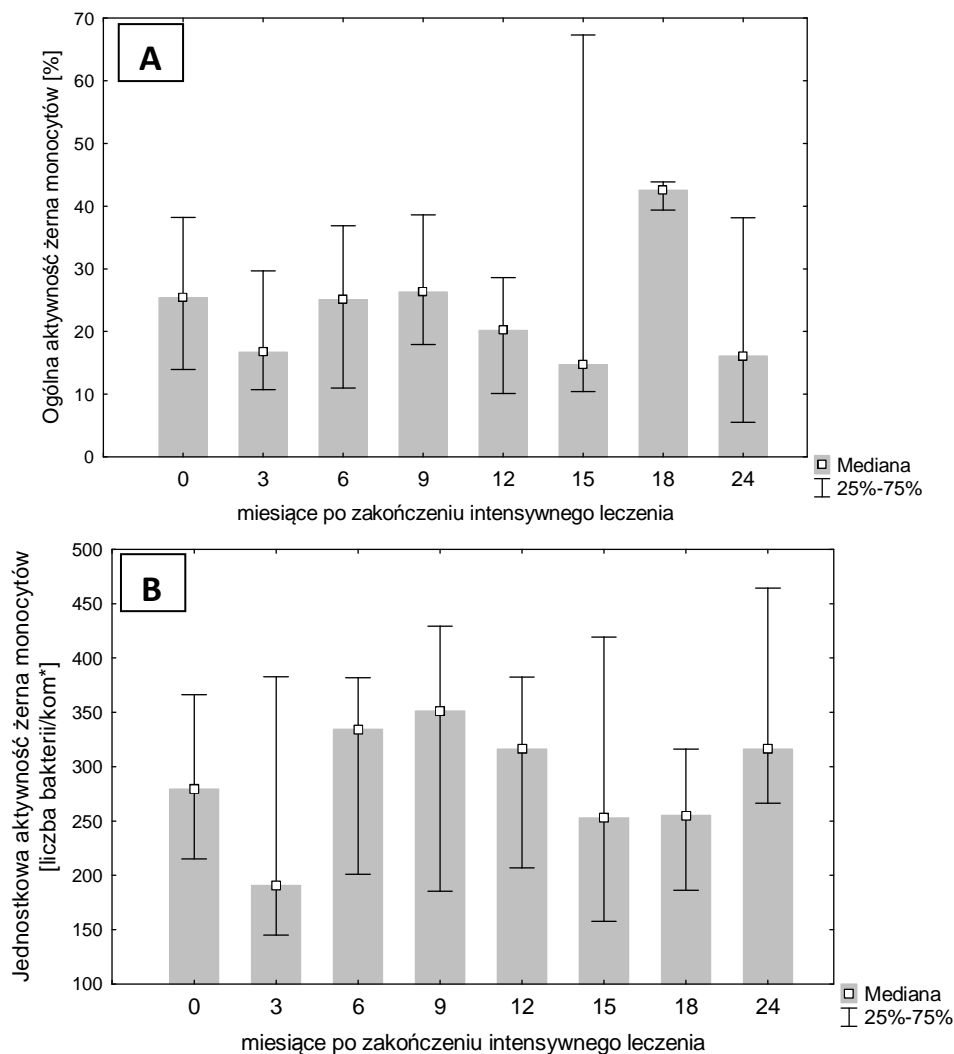
**Tabela 4.8.1.2.** Porównanie aktywności fagocytarnej granulocytów obojętnochłonnych u dzieci z chłoniakiem nieziarniczym w okresie 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego z wynikami uzyskanymi od grupy kontrolnej.

Czas po zakończeniu intensywnego leczenia	Ogólna aktywność fagocytarna neutrocytów			Jednostkowa aktywność fagocytarna neutrocytów		
	Grupa kontrolna	Dzieci z NHL	p	Grupa kontrolna	Dzieci z NHL	p
Badanie wstępne		88,5 (73,1-89,1)	0,78		378,19 (226,74-439,19)	0,38
3 miesiące		87,2 (58,75-91,35)	0,82		500,24 (395,59-527,42)	0,36
6 miesięcy	87,0 (81,5-88,5)	90,6 (89,3-94,7)	0,09	446,77 (276,93-503,77)	505,99 (364,18-666,1)	0,31
9 miesięcy		88,75 (85,05-90,95)	0,61		441,85 (254,47-682,46)	0,73
12 miesięcy		83,2 (63,5-93,1)	0,78		555,5 (547,61-664,96)	0,051
15 miesięcy		85,8 (58,8-91,64)	0,73		475,3 (436,65-637,97)	0,38

*Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya.*

#### 4.8.2. Aktywność fagocytarna monocytów w okresie 2 lat od zakończenia intensywnej terapii przeciwnowotworowej

Jednocześnie z oceną aktywności żernej granulocytów obojętnochłonnych przeprowadzano badanie aktywności fagocytarnej monocytów. Wyniki tych obserwacji u dzieci z ostrą białaczką przedstawiono na Rysunku 4.8.2.1, a u dzieci z chłoniakiem nieziarniczym – na Rysunku 4.8.2.2. Porównania badanych parametrów z wartościami grupy kontrolnej przedstawiają Tabele 4.8.2.1 i 4.8.2.2.



**Rysunek 4.8.2.1.** Ogólna (A) i jednostkowa (B) aktywność fagocytarna monocytów u dzieci z ostrą białaczką w okresie 24 miesiący po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego. Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem.

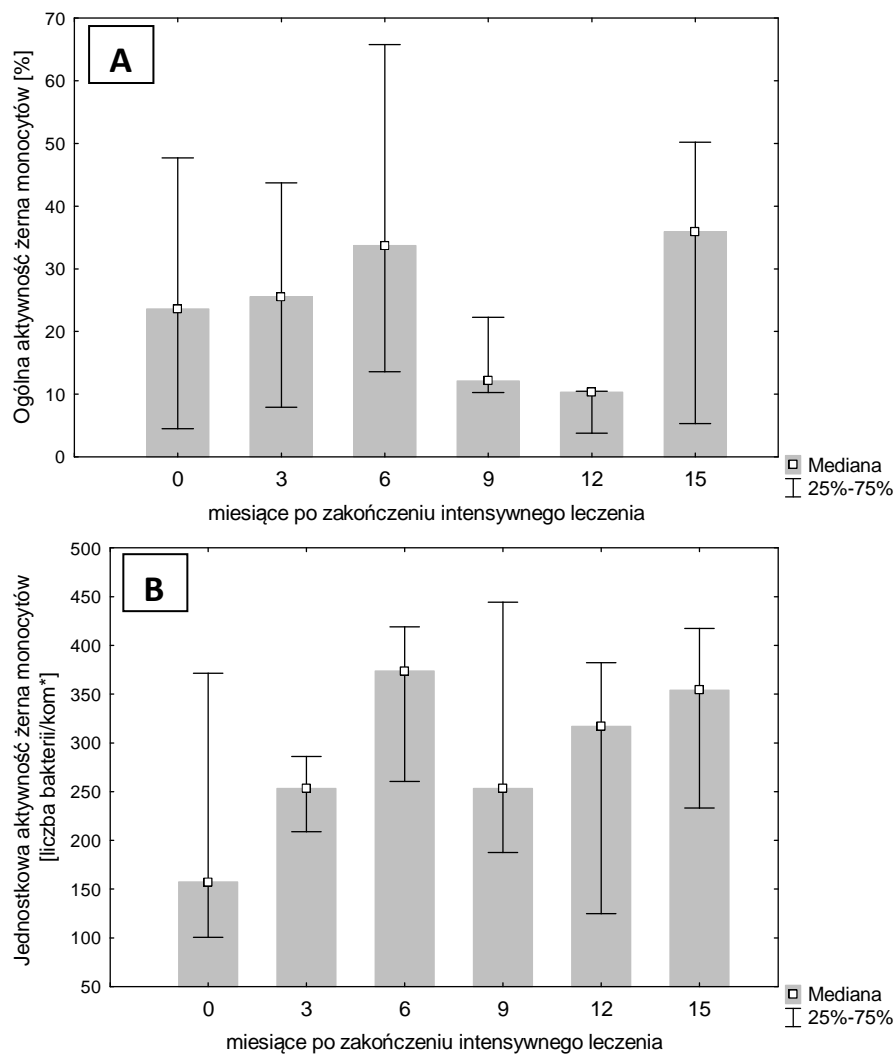
U dzieci z ostrą białaczką nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian aktywności żernej monocytów w kolejnych badaniach w ciągu 2 lat po zakończeniu intensywnego leczenia (Rysunek 4.8.2.1), a ogólna i jednostkowa aktywność fagocytarna tych komórek była od początku prowadzonych obserwacji porównywalna z wartościami grupy kontrolnej, z wyjątkiem badania po 18 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia, gdy stwierdzono jednorazowo znamienne wyższą ogólną aktywność żerną monocytów u dzieci z ostrą białaczką (Tabela 4.8.2.1).

**Tabela 4.8.2.1.** Porównanie aktywności fagocytarnej monocytów u dzieci z ostrą białaczką w okresie 24 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego z wynikami uzyskanymi od grupy kontrolnej.

Czas po zakończeniu intensywnego leczenia	Ogólna aktywność fagocytarna monocytów			Jednostkowa aktywność fagocytarna monocytów		
	Grupa kontrolna	Dzieci z ostrą białaczką	p	Grupa kontrolna	Dzieci z ostrą białaczką	p
Badanie wstępne		25,4 (13,93-38,22)	0,14		279,5 (215,11-366,29)	0,93
3 miesiące		16,7 (10,7-29,7)	0,95		190,67 (145,0-382,75)	0,29
6 miesięcy		25,09 (11,0-36,85)	0,24		334,42 (201,0-381,91)	0,92
9 miesięcy		26,3 (17,93-38,63)	0,27		351,06 (185,36-429,25)	0,89
12 miesięcy	21,4 (3,24-27,6)	20,2 (10,1-28,6)	0,83	252,31 (194,07-378,43)	316,24 (206,88-382,41)	0,83
15 miesięcy		14,7 (10,4-67,3)	0,59		252,98 (157,61-419,38)	0,97
18 miesięcy		42,53 (39,4-43,9)	<b>0,015</b>		255,02 (186,16-316,21)	0,64
24 miesiące		16,07 (5,49-38,17)	0,76		316,21 (266,42-464,4)	0,61

*Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya*

W grupie dzieci z chłoniakiem nieziarnicznym, mimo stwierdzanych różnic w zarówno ogólnej, jak i jednostkowej aktywności żernej monocytów między poszczególnymi punktami czasowymi obserwacji (Rysunek 4.8.2.2), zmiany nie były istotne statystycznie. Również porównanie wyników z całego okresu obserwacji u tych pacjentów z wartościami stwierdzanymi u dzieci zdrowych nie ujawniło znamienych różnic między tymi grupami (Tabela 4.8.2.2).



**Rysunek 4.8.2.2.** Ogólna (A) i jednostkowa (B) aktywność fagocytarna granulocytów obojętnochłonnych u dzieci z chłoniakiem niezróżnicowanym w okresie 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego. Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem.

**Tabela 4.8.2.2.** Porównanie aktywności fagocytarnej monocytów u dzieci z chłoniakiem nieziarniczym w okresie 15 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego z wynikami uzyskanymi od grupy kontrolnej.

Czas po zakończeniu intensywnego leczenia	Ogólna aktywność fagocytarna monocytów			Jednostkowa aktywność fagocytarna monocytów		
	Grupa kontrolna	Dzieci z NHL	p	Grupa kontrolna	Dzieci z NHL	p
Badanie wstępne		23,59 (4,5-47,7)	0,63		157,3 (100,64-371,5)	0,15
3 miesiące		25,55 (7,9-43,7)	0,49		253,31 (208,71-286,03)	0,65
6 miesięcy		33,7 (13,6-65,8)	0,20		373,65 (260,53-419,02)	0,31
9 miesięcy	21,4 (3,24-27,6)	12,1 (10,26-22,3)	0,65	252,31 (194,07-378,43)	253,16 (187,76-444,26)	0,90
12 miesięcy		10,3 (3,79-10,5)	0,31		316,96 (124,79-382,41)	0,73
15 miesięcy		35,9 (5,3-50,2)	0,25		354,12 (233,21-417,33)	0,63

*Dane przedstawione jako mediana i rozstęp między dolnym i górnym kwartylem. Analizy przeprowadzono testem U Manna-Whitneya*

## PODSUMOWANIE

Aktywność fagocytarna granulocytów obojętnochłonnych i monocytów u pacjentów z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarniczym, począwszy od badania wstępnego po zakończeniu intensywnego leczenia, poprzez okres odpowiednio 24- i 15-miesięcznej obserwacji była porównywalna z wartościami w grupie dzieci zdrowych. Nie stwierdzono również istotnych statystycznie wahań tych parametrów między poszczególnymi punktami czasowymi prowadzonych obserwacji.

#### 4.9. Zapadalność na infekcje w okresie 2 lat po zakończeniu intensywnego leczenia ostrej białaczki i NHL u dzieci

Kolejnym etapem badań była analiza zapadalności na infekcje pacjentów z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarnicznym po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego i korelacja z wynikami badań laboratoryjnych.

Infekcje u badanych pacjentów skategoryzowano jako:

- 1/ infekcje o lekkim przebiegu, bezgorączkowe, o etiologii prawdopodobnie wirusowej, określane jako przeziębienia, leczone objawowo;
- 2/ infekcje średniociężkie, z objawami gorączki, o etiologii prawdopodobnie bakteryjnej lub potwierdzone mikrobiologicznie zakażenia bakteryjne, wymagające antybiotykoterapii, leczone ambulatoryjnie;
- 3/ infekcje o ciężkim przebiegu (zapalenia płuc, posocznice), potwierdzone mikrobiologicznie, wymagające szerokospektralnej antybiotykoterapii podawanej dożylnie i leczenia skojarzonego w warunkach szpitalnych;
- 4/ grzybicze zapalenie jamy ustnej.

Analizę zapadalności na infekcje i ich przebiegu u pacjentów z ostrą białaczką przeprowadzono uwzględniając okres 24-miesięcznej obserwacji, a u pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym – okres 12 miesięcy. Ze względu na to, iż liczebność pacjentów w obu grupach zmniejszała się w kolejnych etapach badań, do określenia zapadalności na infekcje w określonych przedziałach czasowych (obejmujących 6 i 12 miesięcy) przyjęto współczynnik „osobomiesiący” (obliczenia współczynników dla poszczególnych grup w pierwszym i drugim roku obserwacji przedstawiają poniższe wzory). Uwzględnienie współczynnika  $n^*$  (liczba pacjentów w 1 miesiącu obserwacji w danym przedziale czasowym) pozwoliło następnie na określenie liczby infekcji u 1 pacjenta w ciągu 1 miesiąca obserwacji.



$$n_i = \frac{\text{liczba infekcji w ciągu } x \text{ miesięcy}}{x}$$

$$A \quad n^* = \frac{(n_1 + n_2 + n_3 + n_4) * 3}{12}$$

$$B \quad n^* = \frac{[(n_5 + n_6) * 3] + (n_7 * 6)}{12}$$

- gdzie:
- $n_i$  – liczba infekcji w 1 miesiącu
  - $n^*$  – liczba pacjentów w 1 miesiącu obserwacji (A – w pierwszym roku; B – w drugim roku po zakończeniu intensywnego leczenia)
  - $n_1, n_2, n_3, n_4$  – liczba pacjentów w kolejnych etapach badań w pierwszym roku obserwacji (odpowiednio po 3, 6, 9 i 12 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia)
  - $n_5, n_6, n_7$  – liczba pacjentów w kolejnych etapach badań w drugim roku obserwacji (odpowiednio po 15, 18 i 24 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia)

Wyniki przeprowadzonych analiz przedstawiono w Tabeli 4.9.1 i 4.9.2.

**Tabela 4.9.1.** Zapadalność na infekcje pacjentów z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarniczym w pierwszym i drugim roku po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego.

		Czas po zakończeniu intensywnej terapii:			
		I półrocze	II półrocze	I rok ŁĄCZNIE	II rok
Pacjenci z ostrą białaczką	n*	24	16	20	7
	infekcje o lekkim przebiegu	13	17	30	7
	infekcje średniociężkie	21	21	42	1
	infekcje o ciężkim przebiegu	8	4	12	0
	grzybicze zapalenie jamy ustnej	3	3	6	0
	ŁĄCZNIE	37	41	78	8
Pacjenci z NHL	n*	7	5	6	-
	infekcje o lekkim przebiegu	3	4	7	-
	infekcje średniociężkie	2	1	3	-
	infekcje o ciężkim przebiegu	1	0	1	-
	grzybicze zapalenie jamy ustnej	2	0	2	-
	ŁĄCZNIE	7	5	12	-

*n\** - liczba pacjentów w 1 miesiącu obserwacji w danym przedziale czasowym;  
*NHL* - chłoniak nieziarniczy

**Tabela 4.9.2.** Zapadalność na infekcje w pierwszym i drugim roku po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego w przeliczeniu na 1 pacjenta z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarniczym.

		Czas po zakończeniu intensywnej terapii:			
		I półrocze	II półrocze	I rok ŁĄCZNIE	II rok
Pacjenci z ostrą białaczką	n*	24	16	20	7
	infekcje o lekkim przebiegu	0,54	1,06	1,5	1
	infekcje średniociężkie	0,875	1,31	2,1	0,14
	infekcje o ciężkim przebiegu	0,33	0,25	0,6	0
	grzybicze zapalenie jamy ustnej	0,125	0,19	0,3	0
	Infekcje/1 pacjenta ŁĄCZNIE	1,54	2,56	3,9	1,1
	Infekcje/1pacjenta/ 1miesiąc	0,25	0,42	0,325	0,09
Pacjenci z NHL	n*	7	5	6	-
	infekcje o lekkim przebiegu	0,43	0,8	1,16	-
	infekcje średniociężkie	0,28	0,2	0,5	-
	infekcje o ciężkim przebiegu	0,14	0	0,16	-
	grzybicze zapalenie jamy ustnej	0,28	0	0,33	-
	Infekcje/1 pacjenta ŁĄCZNIE	1,0	1,0	2,0	-
	Infekcje/1pacjenta/ 1miesiąc	0,16	0,16	0,16	-

*n\** - liczba pacjentów w 1 miesiącu obserwacji w danym przedziale czasowym;

*NHL* - chłoniak nieziarniczy

Jak pokazano w Tabeli 4.9.2, u pacjentów z ostrą białaczką stwierdzono zwiększenie zapadalności na infekcje w drugim półroczu po zakończeniu intensywnego leczenia w przeliczeniu na jednego pacjenta, przy czym w tym okresie dominowały infekcje o średniociężkim przebiegu (przynajmniej jedno zachorowanie u jednego pacjenta w ciągu 6 miesięcy)

i dwukrotnie wzrosła zapadalność na infekcje o lekkim przebiegu w tej grupie dzieci. Zaś częstość zachorowań na infekcje o ciężkim przebiegu oraz grzybicze zapalenia jamy ustnej zmniejszyła się w drugim półroczu obserwacji, a w drugim roku od zakończenia leczenia intensywnego nie zaobserwowano ich występowania. W drugim roku obserwacji prawie czterokrotnie zmniejszyła się również ogólna zapadalność na infekcje u pacjentów z ostrą białaczką i występowały głównie infekcje o lekkim przebiegu (jedno zachorowanie u jednego pacjenta w ciągu roku) (Tabela 4.9.2).

U dzieci z chłoniakiem nieziarniczym przez okres 12 miesięcy stwierdzono niewielką ogólną zapadalność na infekcje – niewiele ponad jedną infekcję o lekkim przebiegu na jednego pacjenta (Tabela 4.9.2), trzykrotnie w ciągu roku wystąpiły w tej grupie infekcje o średniociężkim przebiegu i tylko jedno zachorowanie wymagające leczenia w warunkach szpitalnych w pierwszym półroczu po zakończeniu intensywnego leczenia (Tabela 4.9.1).

W porównaniu do pierwszego półrocza, w drugim półroczu obserwacji stwierdzono dwukrotny wzrost zapadalności na infekcje o lekkim przebiegu w przeliczeniu na jednego pacjenta, porównywalną częstość infekcji o średniociężkim przebiegu oraz brak infekcji o ciężkim przebiegu i zapaleń jamy ustnej o etiologii grzybiczej (Tabela 4.9.2).

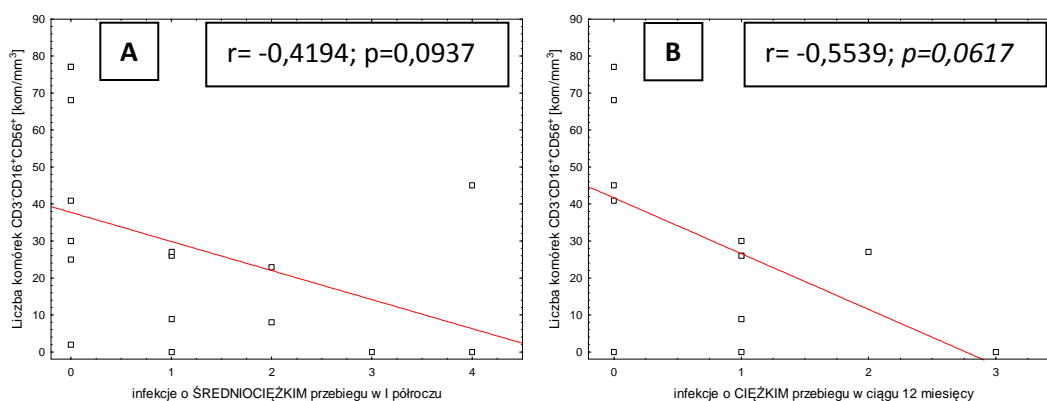
#### **4.9.1. Związek zapadalności na infekcje z badanymi parametrami odporności nieswoistej u dzieci z ostrą białaczką w okresie 2 lat po zakończeniu intensywnego leczenia**

Kolejnym krokiem było sprawdzenie czy istnieje związek między zapadalnością na infekcje a zmianami ilościowymi i czynnościowymi parametrów immunologicznych obserwowanymi u dzieci po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego. Analizę tę przeprowadzono w grupie dzieci z ostrą białaczką ze względu na większą liczebność tej grupy i większą dynamikę obserwowanych zmian dotyczących zapadalności

na infekcje. Ocenę korelacji między badanymi parametrami immunologicznymi a częstością infekcji przeprowadzono testem R Spearmana.

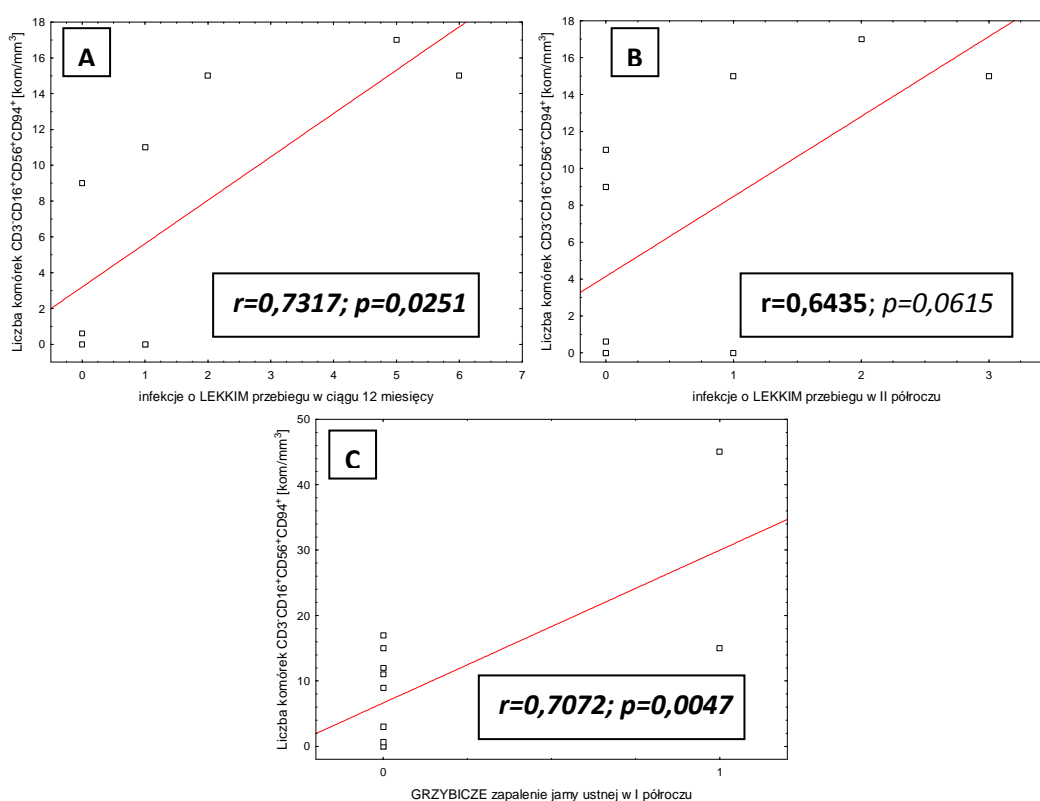
Pierwszym krokiem analizy było sprawdzenie korelacji badanych parametrów immunologicznych ocenionych w badaniu wstępnym z liczbą infekcji u pacjentów z ostrą białaczką w przedziałach czasowych pierwszego roku obserwacji (w I i II półroczu).

Wykazano, że im **mniejszą** liczbę komórek CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> stwierdzano w badaniu wstępnym, tym **więcej** infekcji o średniociężkim przebiegu występowało u pacjentów w I półroczu obserwacji (Rysunek 4.9.1.1.A), a w ciągu pierwszego roku po zakończeniu intensywnego leczenia – **więcej** infekcji o ciężkim przebiegu, wymagających leczenia szpitalnego (Rysunek 4.9.1.1.B).



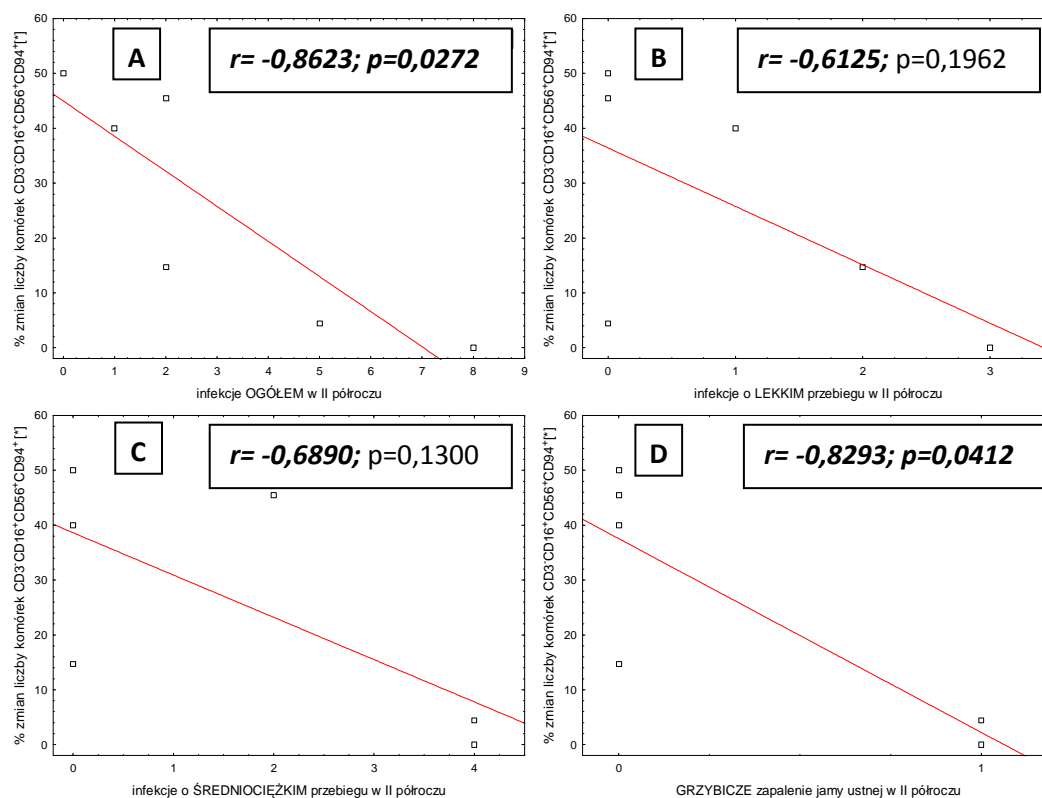
**Rysunek 4.9.1.1.** Korelacje między liczbą komórek CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> w badaniu wstępnym a liczbą infekcji o średniociężkim przebiegu w pierwszym półroczu po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego (A) oraz liczbą infekcji o ciężkim przebiegu w ciągu 12 miesięcy obserwacji (B).

Wykazano również istotny statystycznie związek między liczbą komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> w badaniu wstępnym a liczbą infekcji o lekkim przebiegu w pierwszym roku po zakończeniu intensywnego leczenia – im **mniejsza** była liczba tych komórek u badanych pacjentów, tym **mniej** takich infekcji zanotowano zarówno w II półroczu, jak i w ciągu całego pierwszego roku obserwacji (Rysunek 4.9.1.2.A i B); stwierdzono również **mniej** zapaleń jamy ustnej o etiologii grzybiczej w I półroczu po zakończeniu intensywnego leczenia (Rysunek 4.9.1.2.C).

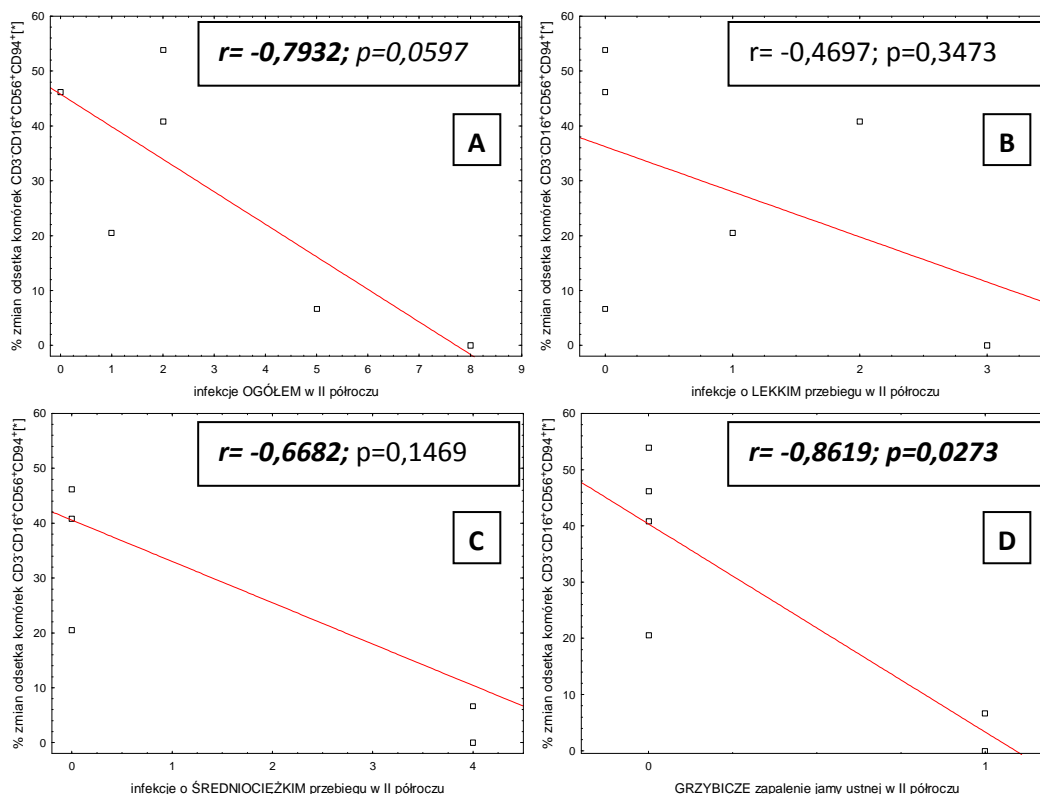


**Rysunek 4.9.1.2.** Korelacje między liczbą komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> w badaniu wstępnym a liczbą infekcji o lekkim przebiegu w ciągu 12 miesięcy (A) i w drugim półroczu obserwacji (B) oraz liczbą grzybiczych zapaleń jamy ustnej w pierwszym półroczu po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego.

Kolejnym krokiem było sprawdzenie czy obserwowane zmiany liczby i odsetka komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>-</sup> miały wpływ na częstość infekcji u dzieci z ostrą białaczką. Zmiany tych wartości przedstawiono w postaci procenta, o jaki obniżyły się po 6 miesiącach w porównaniu do badania wstępnego. Wyniki analiz przedstawiono na Rysunkach 4.9.1.3 i 4.9.1.4.



**Rysunek 4.9.1.3.** Korelacje między liczbą infekcji w drugim półroczu po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego a procentem, o jaki obniżyła się liczba komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> po 6 miesiącach od badania wstępnego [\*]. Na wykresie A – liczba infekcji ogółem; B – liczba infekcji o lekkim przebiegu; C – liczba infekcji o średniociężkim przebiegu; D – liczba grzybiczych zapaleń jamy ustnej.



**Rysunek 4.9.1.4.** Korelacje między liczbą infekcji w drugim półroczu po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego a procentem, o jaki obniżył się odsetek komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> po 6 miesiącach od badania wstępnego [\*]. Na wykresie A – liczba infekcji ogółem; B – liczba infekcji o lekkim przebiegu; C – liczba infekcji o średniociężkim przebiegu; D – liczba grzybiczych zapaleń jamy ustnej.

Na powyższych rysunkach wykazano, że im **bardziej obniżyły się** liczba i odsetek komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> po 6 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia w stosunku do wartości z badania wstępnego, tym **mniej** infekcji zaobserwowano u dzieci z ostrą białaczką w kolejnym półroczu obserwacji. Taką zależność wykazano również, analizując rodzaj infekcji w tym okresie – zwłaszcza w odniesieniu do zachorowań na grzybicze zapalenie jamy ustnej, gdzie zbadane ujemne korelacje były istotne statystycznie.



## PODSUMOWANIE

Obserwując badane dzieci po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego, stwierdzono, iż u pacjentów z ostrą białaczką – w porównaniu do pacjentów z NHL – występowała kilkakrotnie wyższa zapadalność na infekcje, zwłaszcza o średniociężkim i ciężkim przebiegu w pierwszym roku obserwacji. U dzieci z ostrą białaczką, po początkowym zwiększeniu liczby infekcji w drugim półroczu po zakończeniu intensywnego leczenia, wystąpił znaczny spadek zachorowań w drugim roku obserwacji. U dzieci z NHL zapadalność na infekcje zmniejszyła się już w drugim półroczu po zakończeniu leczenia przeciwnowotworowego.

Badanie związku zaburzeń odporności nieswoistej z zapadalnością na infekcje u dzieci z ostrą białaczką wykazało, iż mniejsza liczba komórek NK ( $CD3^+CD16^+CD56^+$ ) w badaniu wstępnym sprzyjała występowaniu u pacjentów infekcji o średniociężkim i ciężkim przebiegu, a większa liczba komórek  $CD3^+CD16^+CD56^+CD94^+$  korelowała z większą zapadalnością na infekcje o lekkim przebiegu i grzybicze zapalenia jamy ustnej, przy czym obniżanie się liczby tych komórek miało również związek ze zmniejszeniem zapadalności na infekcje w pierwszym roku obserwacji.

## 5. DYSKUSJA

Prezentowana praca porusza kwestię występowania zaburzeń odporności nieswoistej u dzieci, będących konsekwencją stosowanego leczenia przeciwnowotworowego. Obserwacje obejmowały jednocześnie pacjentów z nowotworami układu krwiotwórczego i limforetikularnego: z ostrą białaczką (zarówno limfoblastyczną, jak i szpikową) oraz z chłoniakiem nieziarnicznym. Leczenie przeciwnowotworowe stosowane u tych chorych różni się terapeutycznymi schematami podawania leków, czasem trwania i intensywnością terapii, jednakże podobieństwo rodzaju i sumarycznych dawek stosowanych w tych chorobach cytostatyków (Załączniki 8 i 9), działających mielo- i immunosupresyjnie, skłoniło do poszukiwania zaburzeń immunologicznych jednocześnie w obu tych grupach pacjentów.

Badanie wstępne obejmowało ocenę morfologii krwi obwodowej oraz parametrów odpowiedzi nieswoistej po dwóch tygodniach od zakończenia intensywnej terapii, czyli po przerwie regeneracyjnej. W dalszych etapach obserwowano zmiany tych wartości w odstępach 3-miesięcznych w okresie 2 lat u dzieci z ostrą białaczką i w okresie 15 miesięcy u pacjentów z NHL.

W badaniu wstępnym wykazano, iż u dzieci z ostrą białaczką, u których okres leczenia intensywnego był istotnie dłuższy niż w grupie z chłoniakiem nieziarnicznym, stan supresji dotyczył układu czerwono- i białokrwinkowego oraz w kilku przypadkach płytkotwórczego. Dzieci z ostrą białaczką miały zaburzenia w postaci leukopenii z bezwzględną limfopenią i neutropenią, podczas gdy u pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym, obok niedokrwistości, stwierdzano jedynie tendencję do niższych wartości bezwzględnej liczby leukocytów ze znamioną limfopenią. Po zakończeniu intensywnej terapii w obu badanych grupach wykazano także wysoki odsetek monocytów. Natomiast badanie wpływu rodzaju stosowanego leczenia na parametry morfologii krwi obwodowej u pacjentów z ostrą białaczką

wykazało istotnie niższe wartości bezwzględnej liczby limfocytów i monocytów u pacjentów poddanych radioterapii centralnego układu nerwowego. Zróżnicowanie chemioterapii pod względem grup ryzyka nie wykazało istotnego wpływu na badane parametry układu białokrwinkowego.

Ponadto po zastosowanym leczeniu przeciwnowotworowym u analizowanych pacjentów nie występowały zależne od wieku różnice odsetkowe układu białokrwinkowego, charakterystyczne dla dzieci zdrowych.

Analizy badań prowadzonych co 3 miesiące wykazały, iż stan supresji układu białokrwinkowego utrzymywał się znacznie dłużej w grupie dzieci z ostrą białaczką w porównaniu do pacjentów z chłoniakiem nieziarniczym. Dzieci te miały leuko-, neutro- i limfopenię odpowiednio przez okres 15, 12 i 18 miesięcy, przy czym do 15. miesiąca wszystkie otrzymywały chemioterapię doustną w ramach leczenia podtrzymującego remisję. U pacjentów z NHL limfopenia była obserwowana tylko do 3. miesiąca po zakończeniu intensywnego leczenia. Ciekawe było również to, iż u dzieci z ostrą białaczką całkowita liczba krwinek białych oraz odsetek i całkowita liczba limfocytów obniżyły się istotnie po 3 miesiącach w stosunku do badania wstępnego. Odwrotną tendencję zaobserwowano w stosunku do monocytów badanych dzieci – w grupie z ostrą białaczką podwyższony odsetek tych komórek utrzymywał się przez 18 miesięcy obserwacji, natomiast w grupie z NHL – wyższe wartości w stosunku do grupy kontrolnej obserwowano tylko w badaniu wstępnym.

Poza analizą zmian ilościowych układu białokrwinkowego przeanalizowano również status poszczególnych komórek układu odpowiedzi nieswoistej. W badaniu bezpośrednio po zakończeniu intensywnego leczenia zaobserwowano istotnie obniżony odsetek i bezwzględną liczbę komórek NK oraz odsetek komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> wśród limfocytów krwi obwodowej u pacjentów

z ostrą białaczką, a także tendencję do niższych wartości liczby komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> u dzieci z NHL. Aktywność cytotoksyczna komórek NK była porównywalna do grupy kontrolnej w obu badanych grupach już po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego. Analiza wpływu zróżnicowania stosowanego leczenia na status komórek NK ujawniła różnice w aktywności tych komórek u pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną w zależności od grupy ryzyka - najwyższą aktywność zaobserwowano u pacjentów z grupy wysokiego ryzyka (HR), najniższą - u dzieci z grupy ryzyka pośredniego (IR). U pacjentów z grup wyższego ryzyka wykazano również wyższe wartości bezwzględnej liczby i odsetka komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>. Natomiast chorzy po radioterapii OUN wykazywali tendencję do wyższej aktywności cytotoksycznej komórek NK w porównaniu do pacjentów nie poddanych takiemu leczeniu.

Dodatkowo przeprowadzona analiza statusu komórek NK u 3 pacjentów, u których w czasie prowadzenia obserwacji rozwinął się aktywny proces nowotworowy, ujawniła, iż dzieci te, co najmniej miesiąc przed postawieniem diagnozy, miały znacznie podwyższoną aktywność komórek NK, a także wyższe odsetki komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> i CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> w stosunku do dzieci zdrowych oraz pozostałych dzieci z badanych grup. U jednego pacjenta, u którego wykonano dodatkowe badanie w dniu postawienia rozpoznania dotyczącego wtórnego procesu nowotworowego, stwierdzono z kolei skrajnie niską aktywność komórek NK.

Dalsze obserwacje statusu komórek NK wykazały bardziej dynamiczne zmiany u pacjentów z ostrą białaczką aniżeli u chorych z NHL. U dzieci z tej grupy zaobserwowano trzykrotny znamieny wzrost aktywności cytotoksycznej komórek NK w stosunku do badania wstępnego - w 3., 9. i 12. miesiącu po zakończeniu intensywnego leczenia, przy czym wartości te były istotnie wyższe od stwierdzanych w grupie kontrolnej w 9. i 12. miesiącu obserwacji. Po 6 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia (i badania wstępnego) obniżyły się odsetek i bezwzględna liczba

zarówno komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, jak i komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>, a bezwzględna liczba tych populacji komórek utrzymywała się na niższym poziomie przez 18 miesięcy obserwacji, podczas gdy odsetek komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> był niższy niż w grupie kontrolnej aż do 2 lat od zakończenia intensywnego leczenia. Co ciekawe – u pacjentów z ostrą białaczką obniżanie odsetka komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> w stosunku do wartości dzieci zdrowych obserwowano cyklicznie co 6 miesięcy.

Jedyną zmienną zmianą statusu komórek NK u pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym w okresie 15-miesięcznej obserwacji był wzrost aktywności cytotoksycznej tych komórek wraz z jednoczasowym obniżeniem ich bezwzględnej liczby po 3 miesiącach od zakończenia leczenia.

Kolejną populacją komórek ocenianą u dzieci po zakończonym leczeniu przeciwnowotworowym były limfocyty T o fenotypie CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup>, których niespecyficznie hamujące działanie na komórki NK, LAK oraz limfocyty T i B, opisywane jest w licznych stanach chorobowych przebiegających z immunosupresją. W obu badanych grupach pacjentów zarówno odsetek, jak i bezwzględna liczba komórek CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> po zakończeniu intensywnej terapii nie różniły się istotnie od wartości stwierdzanych w grupie kontrolnej, a także nie stwierdzono istotnego wpływu radioterapii ani zróżnicowania leczenia w różnych grupach ryzyka w ALL na skład ilościowy tych komórek.

Analizy prowadzone co 3 miesiące wykazały znamienne obniżenie odsetka i bezwzględnej liczby komórek CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> po 6 miesiącach oraz wzrost ich odsetka po 15 miesiącach od badania wstępnego u dzieci z ostrą białaczką. Jednakże tylko w 6. miesiącu od zakończenia intensywnego leczenia wartości odsetka tych komórek różniły się istotnie (były niższe) od wartości w grupie kontrolnej.

U pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym nie obserwowano istotnych zmian ilościowych komórek CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> w trakcie prowadzonych obserwacji,

wartości ich odsetka i bezwzględnej liczby były porównywalne z wartościami dzieci zdrowych.

W pracy oceniano również aktywność fagocytarną komórek żernych krwi obwodowej – granulocytów obojętnochłonnych i monocytów, nie stwierdzając zaburzeń ich funkcji ani istotnego wpływu rodzaju stosowanej terapii już bezpośrednio po zakończeniu intensywnego leczenia zarówno u pacjentów z ostrą białaczką, jak i chłoniakiem nieziarnicznym. Prawidłowa funkcja żerna tych komórek w obu badanych grupach pacjentów – porównywalna z grupą kontrolną – była obserwowana przez cały okres trwania projektu, bez istotnych wahań między poszczególnymi punktami czasowymi prowadzonych obserwacji.

Ostatnim celem niniejszej pracy było wykazanie czy obserwowane zaburzenia i zmiany statusu układu odpowiedzi nieswoistej wpływają na częstość i rodzaj infekcji u badanych pacjentów po zakończeniu intensywnego leczenia. Przeanalizowanie występowania infekcji o różnym przebiegu, w tym również infekcji ciężkich, zagrażających życiu, wymagających leczenia szpitalnego wykazało, iż w pierwszym roku po zakończeniu intensywnego leczenia zapadalność na infekcje była kilkakrotnie wyższa u dzieci z ostrą białaczką niż u pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym. Różnica ta dotyczyła zwłaszcza występowania zakażeń o średniociężkim i ciężkim przebiegu. Dzieci z ostrą białaczką zapadały na infekcje znacznie częściej w pierwszym półroczu obserwacji niż w drugim, a liczba zachorowań w tej grupie chorych zmniejszyła się znacząco dopiero w drugim roku po zakończeniu intensywnego leczenia. Natomiast u dzieci z chłoniakiem nieziarnicznym zapadalność na infekcje zmniejszyła się już w drugim półroczu po zakończeniu terapii przeciwnowotworowej.

Badanie związku zaburzeń odporności nieswoistej z zapadalnością na infekcje, przeprowadzone w grupie pacjentów z ostrą białaczką, wykazało,

iż mniejsza bezwzględna liczba komórek NK (CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) sprzyjała występowaniu u tych dzieci większej liczby infekcji o średnio ciężkim i ciężkim przebiegu, a większa bezwzględna liczba komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> korelowała z większą zapadalnością na infekcje o lekkim przebiegu (o etiologii prawdopodobnie wirusowej) i grzybicze zapalenia jamy ustnej. Zaobserwowano również, iż obniżanie się liczby komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> po 6 miesiącach od badania wstępnego miało też związek ze zmniejszeniem zapadalności na infekcje u pacjentów z ostrą białaczką w pierwszym roku obserwacji.

Jak wynika z uzyskanych w niniejszej pracy wyników, bezpośrednio po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego występują zaburzenia liczby i funkcji komórek układu odporności nieswoistej, dotyczące głównie komórek NK, bardziej nasilone u pacjentów z ostrą białaczką niż u dzieci z chłoniakiem nieziarniczym. Odbudowa tego układu następuje nierównomiernie, u dzieci z ostrą białaczką wolniej niż u chorych z NHL, a stan supresji układu komórek NK koreluje z częstością i przebiegiem infekcji u badanych pacjentów, zwłaszcza w okresie pierwszego roku po zakończeniu intensywnej terapii przeciwnowotworowej.

### **5.1. Wpływ intensywnego leczenia przeciwnowotworowego na parametry odpowiedzi nieswoistej**

Większość prac prezentowanych przez badaczy dotyczy wyłącznie lub przede wszystkim zaburzeń odpowiedzi swoistej po zakończonym leczeniu przeciwnowotworowym i wskazuje na uszkodzenie odporności komórkowej: obniżenie liczby i upośledzenie funkcji limfocytów T [79,84,86,87,90,93,96] oraz humoralnej: zaburzenia dotyczące limfocytów B [79,83,84,86,87,90,92-94], obniżone poziomy immunoglobulin w surowicy, głównie IgG i IgM [79,83,84,86,87,90,92,94,96] czy niewystarczającą odpowiedź poszczepienną [85-87,91].

Dane literaturowe wskazujące, iż po agresywnej chemioterapii, bez względu na rodzaj nowotworu, występuje obniżenie całkowitej liczby krwinek białych, a wśród nich zwłaszcza limfocytów i granulocytów obojętnochłonnych [83,86-88,94,139] są zgodne jedynie z wynikami uzyskanymi w analizowanej grupie pacjentów z ostrą białaczką. Mimo, iż w pracy Bow E. J. również obserwowano taki wpływ leczenia mielosupresyjnego na komórki układu białokrwinkowego pacjentów z chłoniakami i nowotworami litymi [139], u dzieci z NHL przedstawionych w niniejszej pracy stwierdzono tylko nieznacznie obniżoną liczbę leukocytów i limfopenię. Może to wskazywać na nieopisywaną dotąd u takich pacjentów mniejszą wrażliwość szpiku kostnego, nie zajętego pierwotnie procesem nowotworowym, na leczenie mielosupresyjne oraz na jego większą zdolność regeneracyjną po skończonej chemioterapii.

Obok opisywanej w wielu pracach neutropenii [139,140,143], badacze podnoszą również temat zaburzonej funkcji chemotaktycznej i fagocytarnej tych komórek jako podstawowej przyczyny rozwoju ciężkich infekcji u pacjentów otrzymujących leczenie przeciwnowotworowe [50,80,81,142]. Pisarek J. w badaniach u dzieci z ALL po zakończeniu intensywnego leczenia obserwowała obniżoną zdolność fagocytarną neutrofilii w stosunku do bakterii *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* oraz grzybów *Candida albicans* [50]. Najniższe wartości aktywności żernej tych komórek były stwierdzane zwłaszcza po radioterapii OUN [50], podobnie jak opisano w innych pracach [142]. Z kolei Hofmann W-K. i wsp. obserwowali częściową poprawę aktywności fagocytarnej granulocytów obojętnochłonnych u dorosłych pacjentów z ALL i AML po chemioterapii w porównaniu do wartości obserwowanych u pacjentów nieleczonych, nie stwierdzając różnic między grupami z różnym typem białaczki. Wartości te po zakończeniu intensywnego leczenia były jednak nadal niższe niż w grupie kontrolnej [80].

Wyniki uzyskane u dzieci z ostrą białaczką, przedstawione w niniejszej pracy, są korzystniejsze niż u podobnych pacjentów opisanych



we wspomnianych pracach, gdyż mimo występującej neutropenii, nie stwierdzano u tych chorych, podobnie jak w grupie dzieci z NHL, zaburzeń funkcji fagocytarnej granulocytów obojętnochłonnych już po zakończeniu leczenia przeciwnowotworowego. Nie wykazano również wpływu zróżnicowania stosowanej terapii na te wartości. Może to wynikać ze wzrastającej obecnie roli profilaktyki neutropenii w protokołach intensywnej chemioterapii za pomocą czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF, ang. *granulocyte colony-stimulating factor*). Cytokina ta, obecnie rutynowo stosowana w leczeniu neutropenii indukowanej chemioterapią [21,28,39-42,158,159], skraca istotnie czas jej trwania [158-161], a także wpływa na poprawę funkcji żernych granulocytów obojętnochłonnych [162,163]. Utrzymywanie się upośledzonej funkcji tych komórek u pacjentów opisanych we wspomnianych pracach [50,80,81,142] było prawdopodobnie związane z niestosowaniem jeszcze wówczas rutynowo G-CSF w schematach terapeutycznych ostrych białaczek i innych nowotworów, podczas gdy wszyscy pacjenci analizowani w prezentowanej pracy otrzymywali w czasie intensywnej terapii filgrastim (G-CSF), co mogło pozytywnie wpłynąć na poprawę funkcji fagocytarnej granulocytów obojętnochłonnych, obserwowaną po zakończonym leczeniu przeciwnowotworowym i niewykluczone, że także w czasie jego trwania.

Przeprowadzone w niniejszej pracy porównanie ilościowe wszystkich komórek układu białokrwinkowego między grupami ryzyka w ALL nie wykazało istotnych różnic, co znalazło również potwierdzenie w literaturze [87,164,165]. Porównując grupę dzieci z ALL z grupy ryzyka standardowego i wysokiego, Łuczyński i wsp. nie zaobserwowali różnic w wartościach liczby leukocytów oraz w procentowej zawartości limfocytów i ich subpopulacji między tymi grupami [164]. Podobnie Ek T. i wsp. [87] oraz Kosmidis S. i wsp. [165], którzy przeprowadzili porównanie całkowitej liczby limfocytów u dzieci z ALL podzielonych pod względem grupy ryzyka, nie wykazali wpływu tak zróżnicowanego leczenia na badane wartości.

Kosmidis S. i wsp. nie zaobserwowali ponadto istotnego wpływu radioterapii profilaktycznej centralnego układu nerwowego u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną na liczbę i funkcję limfocytów krwi obwodowej, nieznamienność wyników tłumacząc zbyt małą grupą badanych pacjentów [165].

W przedstawianej pracy stwierdzono natomiast istotne obniżenie liczby i odsetka limfocytów oraz liczby monocytów po zastosowanej radioterapii OUN u pacjentów z ostrą białaczką, co potwierdzają prace innych autorów, opisujące supresyjny wpływ energii jonizującej na komórki układu immunologicznego [72,166,167]. Edgren J. i Weber T. H. opisali to zjawisko na podstawie badań prowadzonych *in vitro* [166], a Lacoste-Collin L. i wsp. oceniali wpływ wielkości dawki oraz częstotliwości stosowania energii jonizującej na komórki pochodzące od myszy z chłoniakiem B-komórkowym poddanych radioterapii [167].

Podobne, jak obserwowane w niniejszej pracy, zwiększenie odsetka monocytów w obu grupach pacjentów po zakończonym leczeniu przeciwnowotworowym, było opisywane przez Komada Y. i wsp. [89] u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną oraz przez Muszyńska-Roslan K. i wsp. [90] u pacjentów z ALL i NHL, a zwiększenie bezwzględnej liczby tych komórek u dzieci z ALL przez Pietras W. [125]. Komada Y. i wsp. wykazali ponadto zwiększoną produkcję TNF- $\alpha$  przez monocyty, sugerując, iż zwiększenie działania zależy od większej liczby tych komórek [89].

Pacjenci badani w niniejszej pracy mieli ocenianą jedynie funkcję fagocytarną monocytów, która, mimo ich wyższego odsetka, była porównywalna z grupą dzieci zdrowych. Mogło to również być związane z efektem stosowania u tych chorych filgrastimu (G-CSF) w czasie intensywnego leczenia, podobnie jak w przypadku opisanej wcześniej funkcji żernej neutrocytów. W literaturze wykazano bowiem wpływ tego leku na ogólną mobilizację komórek macierzystych hematopoezy CD34<sup>+</sup> między innymi u chorych otrzymujących megachemioterapię lub po przeszczepach

szpiku kostnego [157,168-170]. Ponadto zwiększenie liczby monocytów we krwi obwodowej było opisywane również u chorych z ostrą białaczką szpikową, którzy otrzymywali G-CSF z powodu neutropenii po zakończeniu chemioterapii [171,172].

Ciekawe wyniki przedstawili również Takamatsu Y. i wsp., którzy stwierdzili wyższą produkcję cytokin IL-6, G-CSF i IL-1 $\beta$  *in vitro* w hodowlach monocytów pobranych od pacjentów ze schorzeniami hematologicznymi po zakończeniu intensywnej chemioterapii w porównaniu z hodowlami monocytów pochodzących od osób zdrowych, sugerując aktywne zaangażowanie tych komórek, jak również limfocytów T, w indukcję hematopoezy po mielosupresji wywołanej chemioterapią [173].

Opisane przez innych autorów oraz przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań dotyczących monocytów przemawiają za ich znaczącą rolą w odbudowę różnych układów komórek szpiku kostnego u pacjentów, u których stosowano leczenie mielosupresyjne z powodu ostrej białaczki i chłoniaka nieziarniczego.

Niewielu badaczy, oceniających wpływ leczenia immunosupresyjnego na komórki układu białokrwinkowego u dzieci, uwzględniła zmiany składu odsetkowego limfocytów i granulocytów obojętnochłonnych następujące w wieku rozwojowym. Ek T. i wsp. odstąpili od badania wpływu wieku na badane parametry ze względu na podobny rozkład wieku w grupie pacjentów z ostrą białaczką oraz w grupie kontrolnej [87]. Natomiast Kosmidis S. i wsp., porównując dzieci z ALL podzielone na grupy powyżej i poniżej 7. roku życia, wykazali jedynie różnice dotyczące niektórych subpopulacji limfocytów (CD19<sup>+</sup>, CD3DR<sup>+</sup>, CD34RO<sup>+</sup> i CD16<sup>+</sup>) [165]. W niniejszej pracy zaobserwowano z kolei, iż u analizowanych pacjentów nie występowały zależne od wieku różnice odsetkowe układu białokrwinkowego po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego, co może świadczyć o nierównomiernej, osobniczo

niezależnej od wieku odbudowie układu białokrwinkowego po zastosowanej terapii.

Co ciekawe, u zdecydowanej większości spośród badanych dzieci stwierdzono prawidłową liczbę płytek krwi już 2 tygodnie po zakończeniu intensywnego leczenia, podczas gdy w literaturze opisuje się zwykle występowanie małopłytkowości u pacjentów po chemioterapii [174-176], które wynika ze szczególnie toksycznego działania cytostatyków na komórki z krótkim okresem przeżycia [73]. U analizowanych pacjentów następowała dość szybka regeneracja układu płytkotwórczego, związana prawdopodobnie z szybszym wyrzutem ze szpiku kostnego najmłodszych krążących form płytek krwi, zawierających jeszcze duże ilości mRNA (ang. *reticulated platelets*) [177]. Zjawisko to jest obecnie przedmiotem wielu badań [175-181], a obserwowano je między innymi u pacjentów z AML już średnio 20 dni po rozpoczęciu chemioterapii indukcyjnej [178].

Dane literaturowe dotyczące statusu komórek NK po zakończonym leczeniu przeciwnowotworowym nie są jednoznaczne. W większości wcześniejszych prac [78,82,87,89,124,182], podobnie jak u dzieci z ostrą białaczką opisanych w przedstawianej pracy, wykazano obniżoną liczbę i/lub odsetek komórek NK u pacjentów z ALL, którzy zakończyli intensywną terapię. Z kolei inni autorzy, zarówno we wcześniejszych pracach [125,183], jak i w badaniach najnowszych [92,93,165], nie obserwowali zaburzeń ilościowych komórek NK już bezpośrednio po zakończeniu intensywnej terapii u dzieci z ALL.

Jeszcze bardziej zróżnicowane u różnych badaczy są obserwacje zaburzeń ilościowych komórek NK u pacjentów z guzami litymi po leczeniu przeciwnowotworowym. W analizowanej grupie dzieci z chłoniakiem nieziarnicznym stwierdzono tendencję do niższych wartości liczby komórek NK, aczkolwiek porównywalnych z grupą dzieci zdrowych już bezpośrednio po zakończonym leczeniu. Podobnie prawidłową liczbę tych komórek po chemioterapii obserwowali Alanko S. i wsp. u 11 pacjentów z różnymi

guzami litymi (w tym u dwóch z NHL) [78]. Mustafa M. M. i wsp., porównując pacjentów z ALL, ziarnicą złośliwą (HD) i niehematopoetycznymi guzami litymi, stwierdzili, iż obniżona liczba komórek NK po skończonej chemioterapii występowała u większego odsetka dzieci z HD niż u dzieci z ALL, a w najmniejszym stopniu dotyczyła pacjentów z guzami litymi [182]. Odmienne obserwacje zaprezentował z kolei zespół Kantar M. i wsp. – badacze ci oceniali liczbę komórek NK w momencie zakończenia chemioterapii u 22 pacjentów z guzami litymi (w tym u pięciorga dzieci z NHL), stwierdzając znamienne wyższe wartości liczby tych komórek w porównaniu do grupy kontrolnej oraz dzieci z ALL [92].

W literaturze przedstawiono również niejednolite dane dotyczące aktywności cytotoksycznej komórek NK po zakończonej chemioterapii. Reittie J. E. i wsp. stwierdzili obniżoną aktywność tych komórek w stosunku do komórek K562 po 4-6 tygodniach od zakończenia chemioterapii u pacjentów z ostrą białaczką szpikową [183], a Gado J. i wsp. wykazali obniżoną aktywność komórek NK u większości badanych dzieci z ALL oraz u części pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym i innymi guzami litymi [184].

Natomiast w niniejszej pracy zaobserwowano, iż aktywność komórek NK w obu badanych grupach była porównywalna z wynikami w grupie dzieci zdrowych już po zakończonym leczeniu przeciwnowotworowym. Wykazano jednak różnice tych wartości w grupach podzielonych pod względem intensywności leczenia. Najwyższą aktywność cytotoksyczną komórek NK stwierdzono u pacjentów z ALL z grupy wysokiego ryzyka, a także u pacjentów z ostrą białaczką, u których przeprowadzono radioterapię OUN. Może to wskazywać na nadmierną stymulację funkcji tych komórek wywołaną bardziej agresywnym leczeniem, co znalazło również potwierdzenie we wcześniejszych badaniach Yamada S., gdzie wykazano zwiększenie aktywności komórek NK u dzieci z ALL po radioterapii [126].

Obserwowane w niniejszej pracy obniżenie odsetka komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> u pacjentów z ostrą białaczką po intensywnej terapii przeciwnowotworowej (w porównaniu z grupą kontrolną) oraz wykazanie dodatniej korelacji odsetka i liczby tych komórek z intensywnością leczenia określoną przynależnością do grupy ryzyka w ALL są **unikatowe** ze względu na dotychczasowy brak danych w piśmiennictwie dotyczących tej populacji komórek u podobnych chorych. Fakt występowania u pacjentów z grup wyższego ryzyka większego odsetka i liczby tych komórek może być związany z redystrybucją do krwi komórek o właściwościach potencjalnie hamujących aktywność cytotoksyczną komórek NK [117,122,123], która, jak wspomniano, była nadmiernie pobudzona u pacjentów z ALL leczonych bardziej agresywną terapią.

Mimo stanu supresji obserwowanego u analizowanych pacjentów po zakończonym leczeniu przeciwnowotworowym, nie stwierdzono u nich zwiększonego odsetka i liczby komórek CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> o właściwościach niespecyficznym immunosupresyjnym. Zwiększona liczba tych komórek była już wcześniej obserwowana w stanach przebiegających z supresją układu immunologicznego [144,146,148-156], jednakże nie ma dotychczas danych literaturowych dotyczących ich statusu po stosowaniu chemioterapii czy radioterapii. Na podstawie wyników uzyskanych w prezentowanej pracy można przypuszczać, iż stan supresji istniejący po leczeniu przeciwnowotworowym nie jest związany ze zwiększoną liczbą komórek CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup>.

### **5.1.1. Rola komórek NK w monitorowaniu progresji i wznowy procesu nowotworowego w ostrej białaczce i chłoniaku nieziarnicznym**

Niezwykle ciekawą, przypadkową obserwację stanowiły badania statusu komórek NK u 3 pacjentów z rozwijającym się subklinicznie procesem nowotworowym. Znacznie podwyższona aktywność komórek NK oraz wyższe odsetki komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>

i CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>, początkowo traktowane jako prawdopodobny błąd laboratoryjny, okazały się wczesnymi markerami rozwijającego się wtórnego nowotworu (mięsaka Ewinga i ostrej białaczki szpikowej) u dwojga pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną oraz progresji choroby podstawowej u pacjenta z chłoniakiem nieziarnicznym.

W literaturze wykazano, iż w momencie rozpoznania nowotworu, podobnie jak u opisanego w prezentowanej pracy pacjenta B.W., aktywność komórek NK jest obniżona [64,65,67,185-187]. Tajima F. i wsp. opisali to zjawisko również u dorosłych pacjentów ze wznową ostrej białaczki [188], a w pracy Konjević G. i wsp. zaobserwowano ponadto, iż stopień obniżenia funkcji cytotoksycznej tych komórek zależy od klinicznego stopnia zaawansowania choroby [64]. Odmienne wyniki badań zaprezentował w swojej pracy zespół Alvarado C. S. i wsp. – wykazali oni bardzo dużą aktywność cytotoksyczną komórek NK w stosunku do komórek K562 w momencie rozpoznania złośliwych nowotworów litych u dzieci, tym wyższą, im wyższy był stopień zaawansowania klinicznego choroby [189].

Ze względu na zdolność komórek NK do niszczenia komórek transformowanych nowotworowo [99-102,190] ich niska aktywność cytotoksyczna wiązana jest z osobniczą predyspozycją do rozwoju nowotworu [185-187,191,192], a przez niektórych autorów uznawana także za czynnik prognostyczny wczesnej wznowy procesu nowotworowego [186,188,193].

W związku z odmiennymi obserwacjami u różnych autorów zasadne wydaje się pytanie postawione w pracy Pross H. F. i Lotzová E. [170]: „Czy niska aktywność komórek NK w guzach litych i białaczkach sprzyja powstawaniu, czy jest wynikiem choroby nowotworowej?” Również obserwacje w niniejszej pracy mogą sugerować, że nie zawsze jest tak, iż to niska wyjściowa aktywność komórek NK sprzyja powstawaniu nowotworów (jak w przypadku niektórych pierwotnych zespołów niedoborów odporności [191,192]), tylko może ona być wynikiem ich niekontrolowanego rozwoju i konsekwencją wyczerpania potencjału onkolitycznego komórek NK,

następującego po fazie jego nadmiernego pobudzenia. Zjawisko to jest skutkiem działania niezwykle złożonych mechanizmów prowadzących do ucieczki nowotworu przed kontrolą immunologiczną [194]. Mogą to potwierdzać również wyniki wspomnianych wcześniej badań zespołu Konjević G. i wsp., wskazujące na to, iż aktywność cytotoksyczna komórek NK znacząco maleje wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania rozwijającego się nowotworu [64]. Według niektórych autorów może to być związane między innymi z wysokim poziomem TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-10 w surowicy [195] czy też podwyższonym poziomem rozpuszczalnych receptorów dla cytokin modulujących funkcje komórek NK [196], co w efekcie zaburza ich aktywność cytotoksyczną [196,197].

W związku z takimi obserwacjami przydatne wydaje się więc monitorowanie statusu komórek NK, a zwłaszcza ich aktywności cytotoksycznej, u pacjentów pozostających w remisji choroby podstawowej, celem wczesnego wykrycia subklinicznego rozwoju procesu nowotworowego, podobnie jak proponował to zespół Mori T. [193].

## **5.2. Regeneracja układu immunologicznego w czasie leczenia podtrzymującego remisję i po jego zakończeniu**

Badania zajmujące się oceną układu immunologicznego u dzieci wyleczonych z choroby nowotworowej, a zwłaszcza z ostrej białaczki, prowadzone są w poszukiwaniu możliwości zapobiegania odległym i przetrwałym powikłaniom leczenia przeciwnowotworowego, do których należy między innymi większa podatność na zakażenia u tych pacjentów. Dotychczasowe badania nie wskazują jednoznacznie, jak długo może trwać stan regeneracji układu odpornościowego u pacjentów, którzy zakończyli terapię przeciwnowotworową, choć zdaniem wielu autorów normalizacja większości parametrów następuje w ciągu 6-12 miesięcy [87,92-94].



Zgodnie z danymi literaturowymi [72,92,96] w przedstawianej pracy wykazano, iż u dzieci z ostrą białaczką stan supresji układu białokrwinkowego utrzymywał się dłużej niż u pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym. U analizowanych pacjentów z ostrą białaczką obserwowano też więcej zaburzeń immunologicznych niż u chorych z NHL – odwrotnie niż u Mustafa M. M. i wsp. [182], a podobnie jak w pracach zespołów Alanko S. [78,94], gdzie porównywano grupy z ALL i innymi nowotworami.

Należy tu zaznaczyć, iż leukopenia obserwowana w trakcie leczenia podtrzymującego remisję u pacjentów z ostrą białaczką i chłoniakiem T-komórkowym, wynikała z założeń terapii w tych grupach chorych, które wymagają utrzymywania wartości liczby krwinek białych w zakresie 2000-3000 kom/ $\mu$ l [21,28,39,40]. Dlatego też leukopenię u analizowanych pacjentów z ostrą białaczką obserwowano przez okres 15 miesięcy, gdy wszyscy chorzy z tej grupy otrzymywali leczenie podtrzymujące remisję. Po tym okresie nastąpiła normalizacja liczby krwinek białych, gdy większość spośród badanych dzieci całkowicie zakończyła leczenie przeciwnowotworowe. Po kolejnych sześciu miesiącach (od całkowitego zakończenia leczenia) stwierdzono wzrost bezwzględnej liczby limfocytów u dzieci z ostrą białaczką, podobnie jak u pacjentów z NHL, u których normalizację liczby tych komórek obserwowano od 6. miesiąca po zakończeniu terapii.

Obserwowane u analizowanych dzieci obniżenie wartości liczby krwinek białych i limfocytów w trakcie leczenia podtrzymującego remisję było również opisane w pracy Łuczyńskiego W. i wsp., dotyczącej monitorowania stanu immunologicznego pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną [83]. Natomiast w badaniach Mazura B. i wsp. prawidłową liczbę limfocytów wykazano już po 4 miesiącach od zakończenia intensywnej terapii u dzieci z ALL [93]. Z kolei inni badacze obserwowali dłuższy okres powrotu do normy liczby leukocytów i limfocytów u podobnych, jak prezentowani pacjenci, u niektórych z nich trwający nawet powyżej 1 roku od całkowitego

zakończenia leczenia przeciwnowotworowego [94,198]. Badania te dotyczyły jednak chorych leczonych po koniec lat 80., gdy stosowano inne schematy terapeutyczne niż obecnie.

Nieco szybszy powrót do wartości prawidłowych obserwowano w stosunku do liczby granulocytów obojętnochłonnych: u dzieci z chłoniakiem nieziarniczym już od zakończenia intensywnego leczenia przeciwnowotworowego, a u pacjentów z ostrą białaczką po 12 miesiącach obserwacji, czyli jeszcze w trakcie trwania leczenia podtrzymującego remisję. Jest to zgodne z doniesieniami w literaturze, które wskazują, iż czas trwania neutropenii jest często dłuższy u pacjentów leczonych bardziej mieloablacyjną terapią z powodu białaczki czy przed przeszczepem szpiku kostnego w porównaniu z chorymi leczonymi z powodu chłoniaków lub nowotworów litych [139]. Hofmann W-K. i wsp. [80] w badaniach nad funkcją neutrofilii u osób z ostrą białaczką wykazali tylko częściową jej normalizację po leczeniu indukującym remisję u pacjentów z ALL i AML, wskazując jednakże powrót do wartości prawidłowych ich zdolności fagocytarnych po tym leczeniu, podobnie jak obserwowany w grupie pacjentów analizowanych w niniejszej pracy. Badanie zdolności fagocytarnej komórek żernych krwi obwodowej, które wykazało szybką jej normalizację, nie obrazuje wprawdzie całkowitej funkcji tych komórek, jednakże wyraźnie wskazuje na ich duży potencjał regeneracyjny, niezależny od utrzymujących się zaburzeń ilościowych w grupie pacjentów z ostrą białaczką.

Ciekawe również, iż podwyższony odsetek monocytów u dzieci z ostrą białaczką był obserwowany aż przez 18 miesięcy, czyli jeszcze po zakończeniu leczenia podtrzymującego, podczas gdy u pacjentów z chłoniakiem nieziarniczym jego wartości powróciły do normy już po 3 miesiącach od zakończenia leczenia. Podwyższony odsetek tych komórek utrzymujący się znamienne powyżej jednego roku od całkowitego zakończenia leczenia obserwowano już wcześniej u pacjentów z ALL i NHL [90]. Jak wspomniano, może to być związane z prawdopodobnym udziałem

monocytów w odbudowie szpiku kostnego po terapii mielosupresyjnej, manifestującym się, obok wyższej produkcji odpowiednich cytokin, wyraźnie zwiększonym ich odsetkiem wśród leukocytów krwi obwodowej [173].

Dotychczasowe dane literaturowe nie określają też jednoznacznie, jak długo trwa regeneracja układu komórek NK po leczeniu przeciwnowotworowym – w większości prac normalizacja liczby tych komórek obserwowana była bezpośrednio [92,93,125,165,183], a najpóźniej do 6. miesiąca po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego [78,87,124]. Jednak niektórzy badacze obniżenie liczby komórek NK u pacjentów z ALL obserwowali w okresie całego leczenia podtrzymującego remisję [83,182], a w prezentowanej pracy przez 18 miesięcy, czyli nawet po jego zakończeniu. Większość autorów jest natomiast zgodna, iż znacznie dłużej u podobnych pacjentów utrzymuje się obniżenie odsetka komórek NK. W niniejszej pracy w grupie pacjentów z ostrą białaczką – przez 18 miesięcy po zakończeniu intensywnego leczenia, w badaniach zespołu Muszyńskiej-Roslan K. i wsp. u pojedynczych pacjentów nawet powyżej 1 roku od całkowitego zakończenia terapii przeciwnowotworowej [90], a według Ohnishi K. i wsp. u chorych z ostrą białaczką szpikową nawet po 10 latach od zakończenia chemioterapii [79].

Obserwowane w analizowanej grupie chorych z ostrą białaczką wahania odsetka komórek NK cyklicznie co 6 miesięcy znalazły odzwierciedlenie w pracach innych autorów [82,165], w których również opisano zaskakujące zmiany ilościowe tej populacji komórek. Kosmidis S. i wsp. zaobserwowali obniżenie się prawidłowego wcześniej odsetka komórek NK po 12 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia i utrzymywanie się go na takim poziomie do 18. miesiąca obserwacji u pacjentów z ALL [165]. Natomiast Mazur B. i wsp. stwierdzili wzrost liczby tych komórek po 12 miesiącach zarówno w stosunku do wartości dzieci zdrowych, jak i do badania początkowego [82].

Ciekawą obserwacją w niniejszej pracy, bez odniesień literaturowych, było stwierdzenie niskiego odsetka i liczby komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> odpowiednio przez 24 i 18 miesięcy w stosunku do wartości u dzieci zdrowych. Nieznana jest rola tych komórek w utrzymywaniu się stanu immunosupresji, lecz pozostawanie ich wartości na niższym poziomie może mieć raczej korzystny wpływ na ogólny stan regeneracji układu immunologicznego i jego reaktywność w stosunku do zagrażających infekcji.

Jak wspomniano wcześniej, aktywność cytotoksyczna komórek NK u pacjentów opisywanych w niniejszej pracy już po zakończeniu intensywnego leczenia znajdowała się w zakresie wartości prawidłowych, a w badaniach innych autorów u większości chorych ulegała szybkiej normalizacji [78,184]. Natomiast obserwowane kilkakrotnie u analizowanych pacjentów zwiększenie aktywności komórek NK w trakcie trwania leczenia podtrzymującego remisję, nie obserwowane dotychczas u innych badaczy, może wskazywać na rekompensowanie nadmierną aktywacją obniżonej liczby tych komórek.

U pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym zaobserwowano nieznaczne zmiany statusu komórek NK po zakończonym leczeniu przeciwnowotworowym – jednorazowe obniżenie się ich liczby po 3 miesiącach obserwacji wraz ze wzrostem aktywności cytotoksycznej. Ma to prawdopodobnie znikome znaczenie ze względu na pozostawanie tych wartości w zakresie wartości prawidłowych w pozostałym okresie, podobnie jak u innych pacjentów z nowotworami litymi opisanymi we wcześniejszych pracach [78,92,182].

Na podstawie przeprowadzonych długofalowych obserwacji liczby i odsetka komórek CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> oraz niespecyficznym wahań tych wartości nie można jednoznacznie wykazać, iż te komórki odgrywają jakąkolwiek rolę w supresji układu immunologicznego u pacjentów z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarnicznym po zakończeniu leczenia przeciwnowotworowego.

### 5.3. Zaburzenia odpowiedzi nieswoistej a zapadalność na infekcje po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego

Jak wspomniano wcześniej w oparciu o dane literaturowe i wykazano na podstawie prezentowanych wyników badań, w wyniku leczenia przeciwnowotworowego dochodzi do znacznego osłabienia funkcji układu immunologicznego. Stan immunosupresji, którego kliniczną manifestacją jest zwiększone ryzyko rozwoju poważnych, zagrażającym życiu infekcji [83,139], najwyraźniej obserwowany jest w czasie agresywnej chemioterapii, a odsetek zgonów spowodowanych ciężkimi powikłaniami infekcyjnymi podczas leczenia przeciwnowotworowego, zgodnie z danymi WHO, sięga aż 6% [199]. Dlatego w programach leczniczych ostrych białaczek i chłoniaków nieziarnicznych u dzieci stosuje się profilaktykę zakażeń *Pneumocystis jiroveci* preparatem ko-trimoksazol (trimetoprim-sulfametoksazol), zarówno w fazie intensywnej chemioterapii, jak i w czasie leczenia podtrzymującego remisję [21,28,39-42]. Po zakończeniu leczenia przeciwnowotworowego profilaktyka taka nie jest już rutynowo stosowana.

W prezentowanej pracy zapadalność na infekcje w pierwszym roku po zakończeniu intensywnego leczenia różniła się znacznie między pacjentami z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarnicznym. Miało to najprawdopodobniej związek z tym, iż dzieci z ostrą białaczką otrzymywały w tym czasie leczenie podtrzymujące remisję. Jednak ciekawą obserwację stanowiło stwierdzenie znaczącego wzrostu liczby infekcji u tych pacjentów w drugim półroczu obserwacji, czego nie potwierdzają badania innych autorów u podobnych chorych [94,124,125]. W pracach tych ogólna zapadalność na infekcje u dzieci z ALL była podobna w obu półroczach po zakończeniu intensywnego leczenia, choć w grupie badanej przez zespół Alanko S. i wsp. występowała co najmniej trzykrotnie wyższa liczba infekcji u pojedynczego pacjenta niż w badaniach innych autorów oraz w niniejszej pracy [94]. W badaniach tego zespołu wykazano także znaczący wzrost liczby infekcji wymagających antybiotykoterapii w drugim półroczu po zakończeniu

leczenia przeciwnowotworowego, co wiązano z wypisaniem pacjentów ze szpitala i zakończeniem profilaktyki ko-trimoksazolem [94]. W niniejszej pracy natomiast pacjenci od początku leczenia podtrzymującego przebywali w domach i przez cały jego okres otrzymywali profilaktykę infekcji, a większą zapadalność na infekcje stwierdzono u nich w związku z niższą liczbą komórek NK, która miała głównie wpływ na występowanie infekcji o średniociężkim i ciężkim przebiegu.

Taki wpływ obniżonej liczby komórek NK na rozwój infekcji u analizowanych pacjentów mogą potwierdzać prace innych autorów. Orange J. S. podaje liczne przykłady pierwotnych zaburzeń odporności z niedoborem lub brakiem komórek NK, także izolowanym, w obrazie których dominują ciężkie infekcje, głównie herpeswirusowe, ale też o innej etiologii [200], zaś inni badacze wskazują na znaczącą rolę zaburzeń komórek NK w nawracających infekcjach u dzieci [201,202]. Opisywano także niezależny wpływ zaburzeń dotyczących aktywności komórek NK na rozwój infekcji o ciężkim przebiegu u ludzi starych [130] oraz noworodków [129]. Przedstawiony przez Etzioni A. i wsp. przypadek 2-letniej dziewczynki z niepomyślnym przebiegiem zakażenia wirusem ospy wietrznej i półpaśca w przypadku selektywnego braku komórek NK [203] może potwierdzać niezwykle istotną rolę tych komórek w kontrolowaniu infekcji herpeswirusowych.

W analizowanej grupie dzieci z ostrą białaczką zaobserwowano odwrotny wpływ statusu komórek  $CD3^+CD16^+CD56^+CD94^+$  niż ogólnej populacji komórek NK na zachorowalność na infekcje. Wyższa liczba tych komórek sprzyjała większej częstości infekcji o lekkim przebiegu i grzybiczym zapaleniom jamy ustnej, a obniżanie się ich liczby było związane ze zmniejszeniem ogólnej zapadalności na infekcje w tej grupie pacjentów. Obserwacja ta, nie opisana dotąd w literaturze, może sugerować supresyjny wpływ komórek NK  $CD94^+$  na inne składowe układu immunologicznego zaangażowane w odpowiedź przeciwwakaźną, który maleje w miarę obniżania

się ich liczby we krwi obwodowej. Działanie hamujące subpopulacji komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> w stosunku do komórek NK może również potwierdzać fakt dominowania u tych pacjentów infekcji o lekkim przebiegu i etiologii prawdopodobnie wirusowej, w zwalczanie których komórki NK są szczególnie zaangażowane [98-103].

Większość badaczy opisuje powszechnie znany związek neutropenii z rozwojem ciężkich powikłań infekcyjnych, zwłaszcza o etiologii bakteryjnej lub grzybiczej [81,139,141,143], ale również wirusowej [140,141] u pacjentów poddanych chemioterapii z powodu białaczki, chłoniaka lub nowotworów litych. Inni autorzy podkreślają, iż większe znaczenie dla rozwoju infekcji u takich chorych ma upośledzenie funkcji chemotaktycznych i fagocytarnych granulocytów obojętnochłonnych [80,81] i monocytów [138], które koreluje nie tylko z częstością powikłań infekcyjnych, ale również z liczbą zgonów z powodu zakażeń [138]. U opisanych w niniejszej pracy pacjentów z ostrą białaczką na podstawie przeprowadzonych analiz nie stwierdzono, opisanego w literaturze, wpływu zaburzeń dotyczących neutrofilii na zapadalność na infekcje po zakończonej chemioterapii.

*Przedstawione wyniki badań własnych oraz innych autorów dowodzą istnienia zaburzeń w zakresie odporności nieswoistej po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego, czego skutkiem jest większa skłonność do infekcji u tych pacjentów. Jednakże, jak pokazano, u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną i szpikową zaburzenia odpowiedzi nieswoistej są bardziej nasilone i występuje większa zapadalność na infekcje wraz z wolniejszą regeneracją układu immunologicznego po zakończonej terapii przeciwnowotworowej w porównaniu do dzieci z chłoniakiem nieziarnicznym. Wskazuje to na konieczność intensywnego monitorowania stanu układu odporności, zwłaszcza u pacjentów z ostrą białaczką w trakcie leczenia podtrzymującego remisję oraz po jego zakończeniu pod kątem występowania poważnych infekcji ze szczególnym uwzględnieniem chorych z upośledzoną liczbą i/lub funkcją komórek NK.*

*Wyniki uzyskane w niniejszej pracy sugerują również przydatność monitorowania aktywności cytotoksycznej komórek NK w celu wczesnego wykrywania wznowy procesu nowotworowego u pacjentów pozostających w udokumentowanej remisji choroby podstawowej.*



## 6. WNIOSKI

1. Bezpośrednio po zakończeniu agresywnego leczenia przeciwnowotworowego u dzieci występują zaburzenia odporności nieswoistej, które manifestują się obniżoną liczbą komórek układu białokrwinkowego, w tym również obniżoną liczbą komórek NK i zaburzeniem ich funkcji cytotoksycznej. Odchylenia te są znacznie bardziej nasilone u pacjentów z ostrą białaczką niż u dzieci z chłoniakiem nieziarnicznym i dotyczą zwłaszcza tych chorych, którzy otrzymali bardziej agresywną terapię.
2. Obserwowane nieprawidłowości u dzieci z ostrą białaczką utrzymują się w okresie leczenia podtrzymującego remisję, a ich normalizacja następuje stopniowo po jego zakończeniu. U pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym, nie poddanych leczeniu podtrzymującemu, występuje szybsza regeneracja układu odporności nieswoistej.
3. U dzieci z ostrą białaczką po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego występuje większa zapadalność na infekcje w porównaniu z pacjentami z chłoniakiem nieziarnicznym. U chorych z ostrą białaczką wykazuje ona związek z obniżoną liczbą komórek NK i podwyższoną liczbą komórek NK CD94<sup>+</sup>.

## 7. STRESZCZENIE PRACY

Liczne prace publikowane od drugiej połowy ubiegłego wieku poruszają tematykę zaburzeń immunologicznych występujących po leczeniu przeciwnowotworowym. Wraz ze zmieniającymi się schematami terapeutycznymi i wzrostem agresywności stosowanego leczenia znacznie poprawiło się rokowanie w białaczkach i chłoniakach nieziarniczych u dzieci, ale jednocześnie stale rośnie liczba powikłań ostrych i odległych, z którymi związana jest również większa podatność na infekcje zagrażające życiu.

Celem niniejszej pracy było określenie rodzaju zaburzeń immunologicznych z zakresu odporności nieswoistej po zakończeniu agresywnego leczenia przeciwnowotworowego u dzieci z ostrą białaczką i chłoniakiem nieziarniczym, a następnie obserwacja tempa powrotu badanych parametrów do stanu prawidłowego oraz wykazanie czy stan supresji koreluje z częstością i rodzajem zakażeń u dzieci w tym okresie.

Badanie wstępne obejmowało ocenę morfologii krwi obwodowej, wraz z rozmazem układu białokrwinkowego oraz parametrów odpowiedzi nieswoistej: liczby i funkcji cytotoksycznej komórek NK (CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) oraz liczby ich subpopulacji o fenotypie CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>, liczby komórek CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> oraz liczby i funkcji fagocytarnej komórek żernych krwi obwodowej. Wykazano wówczas, iż u dzieci z ostrą białaczką, u których okres leczenia intensywnego był istotnie dłuższy niż u pacjentów z chłoniakiem nieziarniczym, stan supresji dotyczył układu czerwono- i białokrwinkowego oraz w kilku przypadkach płytkotwórczego. Dzieci z tej grupy miały niedokrwistość i zaburzenia w postaci leukopenii z bezwzględną limfo- i neutropenią, podczas gdy u pacjentów z chłoniakiem nieziarniczym, obok niedokrwistości, stwierdzano jedynie tendencję do niższych wartości liczby leukocytów ze znamioną limfopenią. Po zakończeniu intensywnej terapii w obu badanych grupach stwierdzano także wysoki odsetek

monocytów. W grupie pacjentów z ostrą białaczką poddanych radioterapii centralnego układu nerwowego wykazano istotnie niższe wartości bezwzględnej liczby limfocytów i monocytów w porównaniu do chorych, którzy nie otrzymali takiego leczenia.

U pacjentów z ostrą białaczką stwierdzono ponadto istotnie obniżony odsetek i bezwzględną liczbę komórek NK oraz odsetek subpopulacji komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>, a u dzieci z NHL tylko tendencję do niższych wartości liczby komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>. Aktywność cytotoksyczna komórek NK była natomiast porównywalna do grupy kontrolnej w obu grupach badanych już po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego, choć u chorych z ostrą białaczką limfoblastyczną występowały różnice w aktywności komórek NK w zależności od grupy ryzyka – najwyższą aktywność zaobserwowano u pacjentów z grupy wysokiego ryzyka (HR), najniższą – u dzieci z grupy ryzyka pośredniego (IR). U pacjentów z grup wyższego ryzyka stwierdzono też wyższe wartości bezwzględnej liczby i odsetka komórek CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>, a chorzy po radioterapii OUN wykazywali tendencję do wyższej aktywności cytotoksycznej komórek NK w porównaniu do pacjentów nie poddanych takiemu leczeniu.

Badania dotyczące limfocytów T o fenotypie CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> wykazały, iż zarówno u dzieci z ostrą białaczką, jak i z chłoniakiem nieziarnicznym odsetek i bezwzględna liczba tych komórek po zakończeniu intensywnej terapii nie różniły się istotnie od wartości w grupie kontrolnej. Nie stwierdzono też istotnego wpływu radioterapii ani zróżnicowania leczenia w różnych grupach ryzyka na ich skład ilościowy.

Podobnie oceniając aktywność fagocytarną komórek żernych krwi obwodowej – granulocytów obojętnochłonnych i monocytów – nie zaobserwowano zaburzeń ich funkcji ani istotnego wpływu rodzaju stosowanej terapii już bezpośrednio po zakończeniu intensywnego leczenia w obu badanych grupach chorych.

Analizy badań prowadzonych co 3 miesiące wykazały, iż stan supresji układu białokrwinkowego utrzymywał się znacznie dłużej w grupie dzieci z ostrą białaczką niż u pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym. Dzieci te miały leuko-, neutro- i limfopenię odpowiednio przez okres 15, 12 i 18 miesięcy, przy czym do 15. miesiąca wszystkie otrzymywały leczenie podtrzymujące remisję. Dodatkowo zaobserwowano u tych chorych istotne obniżenie się całkowitej liczby krwinek białych oraz odsetka i całkowitej liczby limfocytów po 3 miesiącach w stosunku do badania wstępnego, a podwyższony odsetek monocytów utrzymywał się u nich przez 18 miesięcy obserwacji. U pacjentów z NHL limfopenia była obserwowana tylko do 3. miesiąca po zakończeniu intensywnego leczenia.

Również zmiany statusu komórek NK były bardziej dynamiczne u pacjentów z ostrą białaczką aniżeli u chorych z NHL. U dzieci z tej grupy zaobserwowano trzykrotny znamieny wzrost aktywności cytotoksycznej komórek NK w stosunku do badania wstępnego, w tym dwukrotnie podwyższony w porównaniu z wartościami w grupie kontrolnej. Po 6 miesiącach od zakończenia intensywnego leczenia obniżyły się odsetek i bezwzględna liczba zarówno komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, jak i komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>. Bezwzględna liczba obu tych populacji komórek utrzymywała się następnie na niższym poziomie przez 18 miesięcy obserwacji, podczas gdy odsetek komórek NK CD94<sup>+</sup> był niższy niż w grupie kontrolnej aż do 2 lat od zakończenia intensywnego leczenia.

Jedyną znamieną zmianą statusu komórek NK w grupie pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym był wzrost ich aktywności cytotoksycznej wraz z jednoczesnym obniżeniem bezwzględnej liczby tych komórek po 3 miesiącach od zakończenia leczenia.

U dzieci z ostrą białaczką wykazano też znamienne obniżenie odsetka i bezwzględnej liczby komórek CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> po 6 miesiącach, a następnie wzrost ich odsetka po 15 miesiącach od badania wstępnego. Natomiast u pacjentów z chłoniakiem nieziarnicznym nie stwierdzano

istotnych zmian ilościowych komórek  $CD3^+CD8^{high}CD57^+$  w trakcie prowadzonych obserwacji, a badane wartości były porównywalne z grupą dzieci zdrowych.

W obu badanych grupach przez cały okres trwania projektu obserwowano również prawidłową funkcję żerną granulocytów obojętnochłonnych i monocytów.

Analiza statusu komórek NK przeprowadzona dodatkowo u pacjentów, u których w czasie prowadzenia obserwacji rozwinął się aktywny proces nowotworowy, ujawniła, iż dzieci te miały znacznie podwyższoną aktywność cytotoksyczną komórek NK, a także wyższe odsetki komórek  $CD3-CD16^+CD56^+$  i  $CD3-CD16^+CD56^+CD94^+$  co najmniej miesiąc przed rozpoznaniem w porównaniu do wartości stwierdzanych u dzieci zdrowych oraz u pozostałych dzieci z badanych grup. U jednego pacjenta, u którego wykonano też badanie w dniu postawienia diagnozy dotyczącej wtórnego procesu nowotworowego, stwierdzono skrajnie niską aktywność komórek NK.

Ostatnim celem pracy było wykazanie czy obserwowane zaburzenia i zmiany statusu układu odpowiedzi nieswoistej wpływają na częstość i rodzaj infekcji u badanych pacjentów po zakończeniu intensywnego leczenia.

Jak wynika z prowadzonych obserwacji, w pierwszym roku po zakończeniu intensywnego leczenia zapadalność na infekcje była kilkakrotnie wyższa u dzieci z ostrą białaczką niż u pacjentów z chłoniakiem nieziarniczym, a różnica dotyczyła zwłaszcza występowania zakażeń o średniociężkim i ciężkim przebiegu. Dzieci z ostrą białaczką zapadały na infekcje znacznie częściej w drugim półroczu obserwacji niż w pierwszym, a liczba zachorowań zmniejszyła się u nich znacząco dopiero w drugim roku po zakończeniu intensywnej terapii. Natomiast u dzieci z chłoniakiem nieziarniczym obserwowano zmniejszenie się zapadalności na infekcje już w drugim półroczu po zakończeniu leczenia przeciwnowotworowego.

Badanie związku zaburzeń odporności nieswoistej z zapadalnością na infekcje, przeprowadzone w grupie pacjentów z ostrą białaczką, wykazało, iż mniejsza bezwzględna liczba komórek NK (CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) sprzyjała występowaniu większej liczby infekcji o średniociężkim i ciężkim przebiegu, a większa bezwzględna liczba komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> korelowała z większą zapadalnością na infekcje o lekkim przebiegu (o etiologii prawdopodobnie wirusowej) i grzybicze zapalenia jamy ustnej. Zaobserwowano również, iż obniżanie się liczby komórek CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> po 6 miesiącach od badania wstępnego miało związek ze zmniejszeniem zapadalności na infekcje u pacjentów z ostrą białaczką w pierwszym roku obserwacji.

Jak wynika z uzyskanych w niniejszej pracy wyników, bezpośrednio po zakończeniu intensywnego leczenia przeciwnowotworowego występują zaburzenia liczby i funkcji komórek układu odporności nieswoistej, dotyczące głównie komórek NK, bardziej nasilone u pacjentów z ostrą białaczką niż u dzieci z chłoniakiem nieziarniczym. Odbudowa tego układu następuje nierównomiernie, u dzieci z ostrą białaczką wolniej niż u chorych z NHL, a stan supresji układu komórek NK koreluje z częstością i przebiegiem infekcji u pacjentów, zwłaszcza w okresie pierwszego roku po zakończeniu intensywnej terapii przeciwnowotworowej.

Uzyskane rezultaty sugerują konieczność podejmowania intensywnego monitorowania stanu układu odporności w trakcie leczenia podtrzymującego remisję i po jego zakończeniu u pacjentów z ostrą białaczką (zwłaszcza u chorych z upośledzoną liczbą i/lub funkcją komórek NK), szczególnie pod kątem występowania poważnych infekcji. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują też na przydatność monitorowania aktywności cytotoksycznej komórek NK w celu wczesnego wykrycia wznowy procesu nowotworowego u pacjentów pozostających w udokumentowanej remisji choroby podstawowej.

## 8. PIŚMIENNICTWO

1. Linet Martha S., Ries Lynn A. G., Smith Malcolm A., Tarone Robert E., Devesa Susan S. "Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States" *J Natl Cancer Inst* 1999, 91(12): 1051-1058
2. Gurney James G., Severson Richard K., Davis Scott, Robison Leslie L. "Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type". *Cancer* 1995, 75(8): 2186-2195
3. Samuelsson Bengt O., Ridell Börje, Röckert Liselotte, Gustafsson Göran, Márky Ildikó "Non-Hodgkin lymphoma in children: a 20-year population-based epidemiologic study in western Sweden" *J Pediatr Hematol Oncol.* 1999, 21(2): 103-110
4. Márky Ildikó, Schmiegelow K, Perkkiö M, Jónsson OG, Storm-Mathiesen I, Gustafsson Göran, Kreuger A, Langmark F "Childhood non-Hodgkin lymphoma in the five Nordic countries, A five-year population-based study from the Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology" *J Pediatr Hematol Oncol.* 1999, 17(2): 163-166
5. Landis Sarah H., Murray Taylor, Bolden Sherry, Wingo Phyllis A. "Cancer Statistics, 1999" *CA Cancer J Clin* 1999, 49: 8-31
6. Pui Ching-Hon, Sandlund John T., Pei Deqing, Rivera Gaston K., Howard Scott C., Ribeiro Raul C., Rubnitz Jeffrey E., Razzouk Bassem I., Hudson Melissa M., Cheng Cheng, Raimondi Susana C., Behm Frederick G., Downing James R., Relling Mary V., Evans William E. "Results of therapy for acute lymphoblastic leukemia in black and white children" *JAMA* 2003, 290: 2001-2007
7. Ravindranath Yaddanapudi "Recent advances in pediatric acute lymphoblastic leukemia and myeloid leukemia" *Curr Opin Oncol.* 2003, 15(1): 23-35
8. Russel N. H. "Biology of acute leukaemia" *Lancet* 1997, 349, 118-122

9. Bogusławska-Jaworska Janina, Kowalczyk Jerzy R. „Ostre białaczki u dzieci” w: „Onkologia kliniczna. T.II” red.: Krzakowski Maciej, Wydawnictwo Medyczne Borgis, 2006: 1423-1449
10. Pui Ching-Hon, Raimondi Susana C., Head David R., Schell Michael J., Rivera Gaston K., Mirro Joseph Jr, Crist William M., Behm Frederick G. “Characterization of childhood acute leukemia with multiple myeloid and lymphoid markers at diagnosis and at relapse” *Blood* 1991, 78(5): 1327-1337
11. McKenna Susan, Baehner Robert L. “Diagnosis and treatment of childhood acute lymphocytic leukemia” in: “Neoplastic diseases of the blood” Third Edition, red.: Wiernik Peter H., Canellos George P., Dutcher Janice P., Kyle Robert A., Churchill Livingstone Inc. 1996: 271-319
12. Mazur Bogdan, Szczepański Tomasz, Wąsik Maria, Pituch-Noworolska Anna „Problemy diagnostyki fenotypowej ostrych białaczek u dzieci” *Wiad Lek.* 1998, 51 supl. 4: 134-139
13. Pituch-Noworolska Anna „Trudności diagnostyki immunofenotypowej ostrych białaczek i chłoniaków nieziarnicznych u dzieci” *Przegl Lek.* 2003, 60 supl. 5: 5-8
14. Bennett John M., Catavosky Daniel, Daniel Marie-Théresè, Flandrin Georges, Galton David A. G., Gralnick Harvey R., Sultan Claire “Proposals for the classification of acute leukemias French-American British (FAB) Co-operative group” *Br J Haematol.* 1976, 33, 451-460
15. Van der Reijden Hendrik J., van Rhenen Dick J., Lansdorp Peter M., van't Veer Mars B., Langenhuisen Mart M.A.C., Engelfriet C. Paul, von dem Borne Albert E.G. Kr. “A comparison of surface marker analysis and FAB classification in acute myeloid leukemia” *Blood* 1983, 61: 443-448
16. Neame Peter B., Soamboonsrup Praniti, Browman George P., Meyer Ralph M., Benger Ann, Wilson W. Edwin C., Walker Irwin R., Saeed Niloufer, McBride John A. “Classifying acute leukemia by immunophenotyping: a combined FAB-immunologic classification of AML” *Blood* 1986, 68(6): 1355-1362
17. Catovsky Daniel, Matutes Estella “ The classification of acute leukaemia” *Leukemia* 1992, 6 supl. 2: 1-6



18. Rubnitz Jeffrey E., Lensing Shelly, Zhou Yinmei, Sandlund John, Razzouk Bassem I., Ribeiro Raul C., Pui Ching-Hon "Death during induction therapy and first remission of acute leukemia in childhood" *Cancer* 2004, 101: 1677-1684
19. Derwich Katarzyna, Kaczmarek-Kanold Małgorzata, Wachowiak Jacek, Balcerska Anna, Balwierz Walentyna, Chbicka Alicja, Kowalczyk Jerzy R., Matysiak Michał, Sońta-Jakimczyk Danuta, Wysocki Mariusz, Chełmecka-Hanuszewicz Lidia i in. "Wyniki leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej grupy standardowego ryzyka u dzieci wg zmodyfikowanego programu ALL BFM 90 w materiale Polskiej Pediatrycznej Grupy ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków" *Przegl Lek.* 2004, 61 supl. 2: 49-52
20. Pui Ching-Hon, Schrappe Martin, Ribeiro Raul C., Niemeyer Charlotte M. "Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia" *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004: 118-145
21. ALL IC BFM 2002 - Program leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci
22. Eguiguren Jose M., Schell Michael J., Crist William M., Kunkel Keith, Rivera Gaston K. "Complications and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia with hyperleukocytosis" *Blood* 1992, 79: 871-875
23. Basade M., Dhar A.K., Kulkarni S.S., Sastry P.S., Yadav R.P., Parikh B.S., Pai S.K., Nair C.N., Kurkure P.A., Advani S.H. "Rapid cytoreduction in childhood leukemic hyperleukocytosis by conservative therapy" *Med Pediatr Oncol.* 1995, 25(3): 204-207
24. Lowe Eric J., Pui Ching-Hon, Hancock Michael L., Geiger Terrence L., Khan Raja B., Sandlund John T. "Early complications in children with acute lymphoblastic leukemia presenting with hyperleukocytosis" *Pediatr Blood Cancer* 2005, 45(1): 10-15
25. Riley Lynne C., Hann Ian M., Wheatley Keith, Stevens R F. "Treatment-related deaths during induction and first remission of acute myeloid leukaemia in children treated on the Tenth Medical research Council Acute Myeloid Leukemia Trial (MRC AML10)" *The MRC Childhood Leukaemia Working Party. Br J Haematology* 1999, 106: 436-444

26. Lehrnbecher T., Varwig D., Kaiser J., Reinhardt D., Klingebiel T., Creuzig U. "Infectious complications in pediatric acute leukemia: analysis of the prospective multi-institutional clinical trial AML-BFM 93" *Leukemia* 2004, 18: 72-77
27. Razzouk Bassem I., Estey Elihu, Pounds Stanley, Lensing Shelly, Pierce Sherry, Brandt Mark, Rubnitz Jeffrey E., Ribeiro Raul C., Rytting Michael, Pui Ching-Hon, Kantarjian Hagop, Jeha Sima „Impact of age on outcome of pediatric acute myeloid leukemia" *Cancer* 2006, 106 (11): 2495-2502
28. ANLL-98 – Program leczenia dzieci z ostrą białaczką nieлимfoblastyczną
29. Tallman Martin S., Nabhan Chadi, Feusner James H., Rowe Jacob M. "Acute promyelocytic leukemia: evolving therapeutic strategies" *Blood* 1992, 99: 759-767
30. Kumakura Shunichi, Ishikura Hiroto, Tsumura Hiroto, Kobayashi Shotai "Phagocytosis of terminally differentiated acute promyelocytic leukemia cells by marrow histiocytes during treatment with all-trans retinoid acid" *Leukemia Lymphoma* 2003, 44 (12): 2147-2150
31. Powell Bayard L. "Acute progranulocytic leukemia" *Curr Op Oncology* 2001, 13: 8-13
32. Wróbel Grażyna, Kazanowska Bernarda, Chybicka Alicja, Jeleń Michał, Małydk Jadwiga, Sowińska Ewa, Balcerska Anna, Balwierz Walentyna, Bubała Halina, Kołakowska-Mrozowska Beatrycze, Kołtan Andrzej, Korzon Maria i in. „Postęp w leczeniu nieziarniczych chłoniaków złośliwych (NHL) u dzieci. Raport Polskiej Pediatricznej Grupy ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków u Dzieci (PPGLBC)" *Przegl Lek.* 2004, 61 supl. 2: 45-48
33. Harris Nancy Lee, Jaffe Elaine S., Stein Harald, Banks Peter M., Chan John K.C., Cleary Michael L., Delsol Georges, De Wolf-Peters Christine, Falini Brunangelo, Gatter Kevin C., Grogan Thomas M. et al. "A Revised European-American Classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group" *Blood* 1994, 84 (5): 1361-1392

34. Harris Nancy Lee, Jaffe Elaine S., Diebold Jacques, Flandrin Georges, Muller-Hermelink Hans-Konrad, Vardiman James "Lymphoma classification - from controversy to consensus: The R.E.A.L. and WHO Classification of lymphoid neoplasms" *Ann Oncol.* 2000, 11(suppl. 1): s3-s10
35. Bogusławska-Jaworska Janina, Kowalczyk Jerzy R. „Nieziarnicze chłoniaki u dzieci” w: „Onkologia kliniczna. T.II” red.: Krzakowski Maciej, Wydawnictwo Medyczne Borgis, 2006: 1473-1488
36. Murphy Sharon B. „Classification, staging and end results of treatment of childhood non-Hodgkin lymphomas: dissimilarities from lymphomas in adults” *Semin Oncol.* 1980, 7 (3): 332-339
37. Reiter Alfred, Schrappe Martin, Ludwig Wolf-Dieter, Lampert Fritz, Harbott Jochen, Henze Günter, Niemeyer Charlotte M., Gadner Helmut, Müller-Weihrich Stefan, Ritter Jörg, Odenwald Edelgard, Riehm Hansjörg "Favorable Outcome of B-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood: a report of three consecutive studies of the BFM Group" *Blood* 1992, 80 (10): 2471-2478
38. Uytterbroeck Anne, Suciú Stefan, Laureys Geneviève, Robert Alain, Pacquement Hélène, Ferster Alina, Marguerite Geneviève, Mazingue Françoise, Renard Marleen, Lutz Patrick, Rialland Xavier, Mechinaud Françoise, Cavé Hélène, Baila Liliana, Bertrand Yves, on behalf of the Children's Leukaemia Group (CLG) of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) "Treatment of childhood T-cell lymphoblastic lymphoma according to the strategy for acute lymphoblastic leukaemia, without radiotherapy: Long term results of the EORTC CLG 58881 trial" *Eur J Cancer* 2008, 44: 840-846
39. Bogusławska-Jaworska Janina, Kazanowska Bernarda, Strzelczyk Robert Protokół leczenia NB-NHL 93 - opracowany na podstawie NHL-BFM-90. Polska Grupa Pediatryczna ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków Złośliwych
40. EURO-LB 02 - Treatment Protocol for Lymphoblastic Lymphoma of the European Inter-group Co-operation on Childhood Non-Hodgkin-Lymphoma (EICNHL)

41. Bogusławska-Jaworska Janina, Kazanowska Bernarda, Dyrda T. Protokół leczenia B-NHL 93 – opracowany na podstawie LMB-89. Polska Grupa Pediatryczna ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków Złośliwych
42. B-NHL BFM 04 – Wieloośrodkowa próba kliniczna oceny wyników leczenia dzieci i młodzieży z dojrzałym B-komórkowym chłoniakiem nieziarnicznym lub B-ALL
43. Wróbel Grażyna, Bogusławska-Jaworska Janina, Kazanowska Bernarda, Armata Jerzy, Bubala Halina, Dłużniewska Agnieszka, KołECKI Paweł, Kowalczyk Jerzy, Rokicka-Milewska R, Sońta-Jakimczyk Danuta, Sopyło Barbara, Stefaniak Jolanta, Stefańska Katarzyna, Matysiak Michał, Stańczak Elżbieta „Analiza niepowodzeń leczenia dzieci z chłoniakiem nieziarnicznym nonB (nonB-NHL). Raport Polskiej Pediatrycznej Grupy ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków u Dzieci (PPGLBC)” *Wiad Lek.* 1998, 51 supl. 4: 18-24
44. Patte Catherine, Auperin Anne, Gerrard Mary, Michon Jean, Pinkerton Ross, Sposto Richard, Weston Claire, Raphael Martine, Perkins Sherrie L., McCarthy Keith, Cairo Mitchell S. “Results of the randomized international FAB/LMB96 trial for intermediate risk B-cell non-Hodgkin lymphoma in children and adolescents: it is possible to reduce treatment for the early responding patients” *Blood* 2007, 109: 2773-2780
45. Frydecka Irena “Zaburzenia funkcji układu odpornościowego u chorych na schorzenia nowotworowe układu krwiotwórczego i limforetikularnego” *Acta Haematol Pol.* 1997, 28 supl. 2: 40-49
46. Hitzig W. H., Plüss J., Joller P., Pilgrim U., Tacier-Eugster Heidi, Jakob Mayã “Studies of the immune status of children with acute lymphocytic leukaemia. I. Early phase before and after first remission” *Clin Exp Immunol.* 1976, 26: 403-413
47. Panoskaltzis N, Reid CDL, Knight SC „Quantification and cytokine production of circulating lymphoid and myeloid cells in acute myelogenous leukemia” *Leukemia* 2003, 17: 716-730
48. Rosner Fred, Valmont Ignatius, Kozinn Philip J., Caroline Leona “Leukocyte function in patients with leukemia” *Cancer* 1970, 25: 835-842
49. Glasser Lewis “Phagocytosis in acute leukemia” *Cancer* 1980, 45: 1365-1369

50. Pisarek Jolanta „Ocena funkcji granulocytów i monocytów w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci” Praca doktorska, Wrocław 1983
51. Powell Bayard L., Olbrantz Patricia, Bicket Daphne, Bass David A. “Altered oxidative product formation in neutrophils of patients recovering from therapy for acute leukemia” *Blood* 1986, 67(6): 1624-1630
52. Bassøe Carl-Fredrik “Flow cytometric quantification of phagocytosis in acute myeloid leukemia” *Acta Haematol.* 1999, 102: 163-171
53. Nash K.A., Mohammed G., Nandapalan N., Kernahan J., Scott R., Craft A.W., Toms G.L. “T cell function in children with acute lymphoblastic leukaemia” *Br J Haematol.* 1993, 83: 419-427
54. van den Hove Ludwig E., Vandenberghe Peter, van Gool Stefaan W., Ceuppens Jan L., Demuyneck Hilde, Verhoef Gregor E.G., Boogaerts Mark A. “Peripheral blood lymphocyte subset shifts in patients with untreated hematological tumors: evidence for systemic activation of the T cell compartment” *Leukemia Res.* 1998, 22 (2): 175-184
55. Maecker B, Mougiakakos D, Zimmermann M, Behrens M, Hollander S, Schrauder A, Schrappe M, Welte K, Klein C “Dendritic cell deficiencies in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients” *Leukemia* 2006 , 20: 645-649
56. Zhang Xiao-Li, Komada Yoshihiro, Chipeta James, Li Qing-Sheng, Inaba Hiroto, Azuma Eiichi, Yamamoto Hatsumi, Sakurai Minoru “Intracellular cytokine profile of T cells from children with acute lymphoblastic leukemia” *Cancer Immunol Immunother* 2000, 49: 165-172
57. Łuczyński Włodzimierz, Stasiak-Barmuta Anna, Krawczuk-Rybak Maryna, Malinowska Iwona, Matysiak Michał, Mitura-Lesiuk Małgorzata, Kowalczyk Jerzy, Jeromin Agnieszka “Równowaga limfocytów Th1/Th2 w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci” *Przegl. Lek.* 2004, 61 (9): 919-923
58. Buggins Andrea G.S., Milojkovic Dragana, Arno Matthew J., Lea Nicholas C., Mufti Ghulam J., Thomas N. Shaun B., Hirst William J.R. “Microenvironment produced by acute myeloid leukemia cells prevents T cells activation and proliferation by inhibition of NF-κB, c-Myc, and pRb pathways” *J Immunol.* 2001, 167: 6021-6030

59. Chen Y., Lu L., Wang L. "Study on gene expression of TGF beta 1 and its receptor in leukemia cells and the serum TGF beta 1 level in the patients with acute leukemia" *Zhonghua Xue Ye Za Zhi* 1998, 19: 576-580
60. Łuczyński Włodzimierz, Krawczuk-Rybak Maryna „Mechanizmy immunosupresji w białaczkach - wybrane aspekty” *Postepy Hig Med. Dosw.* 2005, 59: 28-33
61. Anderson Thomas C., Jones Stephen E., Soehnlen Barbara J., Moon Thomas E., Griffith Kathy, Stanley Patricia "Immunocompetence and malignant lymphoma: immunologic status before therapy" *Cancer* 1981, 48: 2702-2709
62. Jones Stephen E., Griffith Katherine, Dombrowski Patricia, Gaines John A. "Immunodeficiency in patients with non-Hodgkin lymphomas" *Blood* 1977, 49 (3): 335-344
63. Advani S.H., Dinshaw K.A., Nair C.N., Gopal R., Talwalkar G.V., Iyyer Y.S., Bhatia H.M., Desai P.B. "Immune dysfunction in non-Hodgkin's lymphoma" *Cancer* 1980, 45: 2843-2848
64. Konjević Gordana, Jurišić Vladimir, Banićević Božidar, Spuzić Ivan "The difference in NK-cell activity between patients with non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease" *Br J Haematol.* 1999, 104: 144-151
65. Caldera L.H., Leon-Ponte M., Acquatella G., Bianco N.E., Blanca I. "Bone marrow and peripheral blood natural killer cell activity in lymphomas. Its response to IL-2" *Clin. Exp. Immunol.* 1992, 88: 143-148
66. Watanabe Shaw, Shimosato Yukio, Shimoyama Masanori, Minato Keisuke, Suzuki Minoru, Abe Mitsunobu, Nagatani Tetsuo "Adult T cell lymphoma with hypergammaglobulinemia" *Cancer* 1980, 46: 2472-2483
67. Tursz Thomas, Dokhelar Marie-Christine, Lipinski Marc, Amiel Jean-Louis "Low natural killer cell activity in patients with malignant lymphoma" *Cancer* 1982, 50: 2333-2335
68. Pui Ching-Hon, Ip Stephen H., Kung Patrick, Dodge Richard K., Berard Costan W., Crist William M., Murphy Sharon B. "High serum interleukin-2 receptor levels are related to advanced disease and a poor outcome in childhood non-Hodgkin 's lymphoma" *Blood* 1987, 70(3): 624-629

69. Christiansen I., Gidlof C., Kälkner K. M., Hagberg H., Bennmarker H., Tötterman T. "Elevated serum levels of soluble ICAM-1 in non-Hodkin's lymphomas correlate with tumour burden, disease activity and other prognostic markers" *Br J Haematol.* 1996, 92(3): 639-646
70. Podolak-Dawidziak Maria "Hematologiczne aspekty toksyczności cytostatyków" w: „Chemioterapia onkologiczna dorosłych i dzieci” red.: Madej Grzegorz, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 1999, 68-73
71. Borella Luis, Webster Robert G. "The immunosuppressive effects of long-term combination chemotherapy in children with acute leukemia in remission" *Cancer Res.* 1971, 31: 420-426
72. Wójcik Dorota, Pietras Wojciech „Zaburzenia immunologiczne u dzieci chorujących na ostrą białaczkę limfoblastyczną” *Post. Med. Klin. Dośw.* 1997, 6(2): 239-245
73. Kuratowska Zofia „Niekorzystny wpływ cytostatyków na prawidłowe tkanki. Szpik kostny” w: „Chemioterapia onkologiczna dorosłych i dzieci” red.: Madej Grzegorz, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 1994, 45-48
74. Boxer Lawrence A. „Zaburzenia układu leukocytnego. Neutropenia” w: „Podręcznik pediatrii” Nelsona, red. Behrman Richard E., Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 1996, 1434-1437
75. Madej Grzegorz „Komórkowe podstawy chemioterapii” w: „Chemioterapia onkologiczna dorosłych i dzieci” red. Madej Grzegorz, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 1994, 14-20
76. Madej Grzegorz, Paluchowska Beata, Łaszczyńska Violetta, Wiechno Paweł, Piłatowicz Arkadiusz „Przegląd leków stosowanych w chorobach nowotworowych” w: „Chemioterapia onkologiczna dorosłych i dzieci” red. Madej Grzegorz, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 1999, 116-217
77. Danysz Andrzej, Danysz Wojciech, Polak Wojciech, Żerkowski Artur „Chemioterapia nowotworów” w: „Kompendium farmakologii i farmakoterapii” red. Danysz Andrzej, Wyd. VOLUMED, Wrocław 1998, 157-195

78. Alanko Soile, Salmi Toivo T., Pelliniemi Tarja-Terttu „Recovery of natural killer cells after chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia and solid tumors” *Med Ped Oncol* 1995, 24: 373-378
79. Ohnishi K, Yamanishi H, Naito K, Utsumi M, Yokomaku S, Hirabayashi N, Ohno R “Reconstitution of peripheral blood lymphocyte subsets in the long-term disease-free survivors of patients with acute myeloblastic leukemia” *Leukemia* 1998, 12: 52-58
80. Hofmann Wolf-Karsten, Stauch Martina, Höffken Klaus “Impaired granulocytic function in patients with acute leukaemia: only partial normalization after successful remission-inducing treatment” *J Cancer Res Clin Oncol* 1998, 124: 113-116
81. Hübel K., Hegener K., Schnell R., Mansmann G., Oberhäuser F., Staib P., Diehl V., Engert A. “Suppressed neutrophil function as a risk factor for severe infection after cytotoxic chemotherapy in patients with acute nonlymphocytic leukemia” *Ann Hematol* 1999, 78: 73-77
82. Mazur Bogdan, Olejnik Igor, Wylezol Iwona, Sonta-Jakimczyk Danuta, Szczepanski Tomasz, Karpe Jacek „Assessment of chosen parameters of the immune system in children with acute lymphoblastic leukemia” *Pediatr Hematol Oncol.* 2003, 20: 303-308
83. Łuczyński Włodzimierz, Stasiak-Barmuta Anna, Krawczuk-Rybak Maryna, Żak Janusz „Monitorowanie stanu układu immunologicznego dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną w czasie leczenia podtrzymującego remisję, z uwzględnieniem współistniejących infekcji” *Wiad Lek.* 2004, 57(7-8): 337-342
84. Luczynski Wlodzimierz, Stasiak-Barmuta Anna, Krawczuk-Rybak Maryna „Immunologic monitoring of maintenance therapy for acute lymphoblastic leukaemia in children - preliminary report” *Pediatr Blood Cancer* 2004, 42: 416-420
85. Smith Steven, Schiffman Gerald, Karayalcin Gungor, Bonagura Vincent „Immunodeficiency in long-term survivors of acute lymphoblastic leukemia treated with Berlin-Frankfurt-Münster therapy” *J Pediatr* 1995, 127: 68-75



86. Caver TE, Slobod KS, Flynn PM, Behm FG, Hudson MM, Turner EV, Webster RG, Boyett JM, Tassie TL, Pui CH, Hurwitz JL „Profound abnormalities of the B/T ratio during chemotherapy for pediatric acute lymphoblastic leukemia” *Leukemia* 1998, 12: 619-622
87. Ek Torben, Mellander Lotta, Andersson Bengt, Abrahamsson Jonas „Immune reconstitution after childhood acute lymphoblastic leukemia is most severely affected in the high risk group” *Pediatr Blood Cancer* 2005, 44: 461-468
88. Wendelbo Øystein, Nesthus Ingerid, Sjo Malvin, Paulsen Kristin, Ernst Peter, Bruserud Øystein “Functional characterization of T lymphocytes derived from patients with acute myelogenous leukemia and chemotherapy-induced leucopenia” *Cancer Immunol Immunother* 2004, 53: 740-747
89. Komada Yoshihiro, Zhang Shao-Li, Zhou Yan-Wen, Hanada Motoi, Shibata Takeo, Azuma Eiichi, Sakurai Minoru „Cellular immunosuppression in children with acute lymphoblastic leukemia: effect of consolidation chemotherapy” *Cancer Immunol Immunother.* 1992, 35(4): 271-276
90. Muszyńska-Roslan Katarzyna, Łuczyński Włodzimierz, Krawczuk-Rybak Maryna, Żak Janusz, Stasiak-Barmuta Anna “Odbudowa układu immunologicznego u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną i chłoniakiem nieziarnicznym po zakończeniu leczenia intensywnego i podtrzymującego” *Pediatr Pol* 2001, 76: 597-604
91. Nilsson Anna, Milito Angelo de, Engström Pär, Nordin Margareta, Narita Mitsuo, Grillner Lena, Chiodi Francesca, Björk Olle „Current chemotherapy protocols for childhood acute lymphoblastic leukemia induce loss of humoral immunity to viral vaccination antigens” *Pediatrics* 2002, 109(6): e91
92. Kantar Mehmet, Çetingül Nazan, Savaş Kansoy, Kütükçüler Necil, Aksu Güzide „Immune deficiencies following cancer treatment in children” *J Trop Pediatr.* 2003, 49(5): 286-290
93. Mazur Bogdan, Szczepański Tomasz, Karpe Jacek, Sońta-Jakimczyk Danuta, Bubala Halina, Torbus Magdalena „Decreased numbers of CD4+ T lymphocytes in peripheral blood after treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia” *Leukemia Res* 2006, 30: 33-36

94. Alanko Soile, Pelliniemi Tarja-Terttu, Salmi Toivo T. „Recovery of blood B-lymphocytes and serum immunoglobulins after chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia” *Cancer* 1992, 69: 1481-1486
95. Katz Jacob, Walter Barbara N., Bennetts Geni A., Cairo Mitchell S. „Abnormal cellular and humoral immunity in childhood acute leukemia in long-term remission” *West J Med.* 1987, 146: 179-187
96. Gadó J., Schlick B., Báránz O., Németh J., Müller J., Csóka M., Constantin T., Vonnák E., Böcskei R., Hauser P., Kovács G „The function of the immune system after the treatment of pediatric malignant diseases” *Orv Hetil.* 2006, 147(36): 1731-1738 [abstract]
97. Borzy Michael S., Ridgway Derry „Prolonged defects of interleukin-2 production, responsiveness, and receptor expression in patients with acute lymphoblastic leukemia” *Blood* 1989, 76 (6): 1608-1614
98. Wu Jianzhong, Lanier Lewis L. „Natural killer cells and cancer” *Adv Cancer Res.* 2003, 90: 127-156
99. French Anthony R., Yokoyama Wayne M. „Natural killer cells and viral infections” *Curr Opin Immunol* 2003, 15: 45-51
100. Trincheri Giorgio „Biology of natural killer cells” *Adv Immunol* 1989, 47: 187-375
101. Bancroft Gregory J. „The role of natural killer cells in innate resistance to infection” *Curr Opin Immunol* 1993, 5: 503-510
102. Herberman Ronald B., Oratldo John R. „Natural killer cells – their role in defence against disease” *Science* 1981, 214: 24-30
103. Nunn Martha E., Herberman Ronald B., Holden Howard T. „Natural cell-mediated cytotoxicity in mice against non-lymphoid tumor cells and some normal cells” *Int J Cancer* 1977, 20(3): 381-387
104. Orange Jordan S., Ballas Zuhair K. „Natural killer cells in human health and disease” *Clin Immunol* 2006, 118: 1-10
105. Biron Christine A., Su Helen C., Orange Jordan S. „Function and regulation of natural killer (NK) cells during viral infections: characterization of responses *in vivo*” *Methods* 1996, 9: 379-393

106. Dorner Brigitte G., Smith Hamish R.C., French Anthony R., Kim Sungjin, Poursine-Laurent Jennifer, Beckman Diana, Pingel Jeanette T., Kroczek Richard A., Yokoyama Wayne M. „Coordinate expression of cytokines and chemokines by NK cells during murine cytomegalovirus infection” *J Immunol* 2004, 172: 3119-3131
107. Robertson Michael J. „Role of chemokines in the biology of natural killer cells” *J Leukocyte Biol* 2002, 71: 173-183
108. Held Werner, Coudert Jérôme D., Zimmer Jacques „The NK cell receptor repertoire: formation, adaptation and exploitation” *Curr Opin Immunol* 2003, 15: 233-237
109. Miller Jeffrey S., McCullar Valarie „Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2” *Blood* 2001, 98: 705-713
110. Zambello Renato, Falco Michela, Chiesa Mariella Della, Trentin Livio, Carollo Davide, Castriconi Roberta, Cannas Giovanna, Carlomagno Simona, Cabrelle Anna, Lamy Thierry, Agostini Carlo, Moretta Alessandro, Semenzato Gianpietro, Vitale Massimo „Expression and function of KIR and natural cytotoxicity receptors in NK-type lymphoproliferative diseases of granular lymphocytes” *Blood* 2003, 102: 1797-1805
111. Houchins Jeffrey P., Lanier Lewis L., Niemi Eréne, Phillips Joseph H., Ryan James C. „Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C” *J Immunol* 1997, 158: 3603-3606
112. Yabe Toshio, McSherry Cynthia, Bach Fritz H., Fisch Paul, Schall R P., Sondel Paul M., Houchins Jeffrey P. „A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins” *Immunogenetics* 1993, 37(6): 455-60
113. Aramburu José, Balboa María A., Izquierdo Manuel, Lòpez-Botet Miguel „A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor- $\gamma\delta^+$  T lymphocytes. I. Inhibition of the IL-2-dependent proliferation by anti-Kp43 monoclonal antibody” *J Immunol* 1990, 144: 3238-3247

114. Aramburu José, Balboa María A., Ramírez Ana, Silva Augusto, Acevedo Agustín, Sánchez-Madrid Francisco, de Landázuri Manuel O., López-Botet Miguel „A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and  $\gamma/\delta$  TCR<sup>+</sup> T lymphocytes. II. Modulation of natural killer cytotoxicity by anti-Kp43 monoclonal antibody” *J Immunol* 1991, 147: 714-721
115. Chang C., Rodríguez A., Carretero M., López-Botet M., Phillips J.H., Lanier L.L. „Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily” *Eur J Immunol* 1995, 25(9): 2433-2437
116. Sobanov Yuri, Glienke Jens, Brostjan Christine, Lehrach Hans, Francis Fiona, Hofer Erhard „Linkage of the NKG2 and CD94 receptor genes to D12S77 in the human natural killer gene complex” *Immunogenetics* 1998, 49: 99-105
117. Posch Phillip E., Borrego Francisco, Brooks Andrew G., Coligan John E. „HLA-E is the ligand for the natural killer cell CD94/NKG2 receptors” *J Biomed Sci* 1998, 5: 321-331
118. Lazetic Sasha, Chang Chiwen, Houchins Jeffrey P., Lanier Lewis L., Phillips Joseph H. „Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits” *J Immunol* 1996, 157: 4741-4745
119. Braud Veronique M., Allan David S.J., O’Callaghan Christopher A., Söderström Kalle, D’Andrea Annalisa, Ogg Graham S., Lazetic Sasha, Young Neil T., Bell John I., Phillips Joseph H. „HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C” *Nature* 1998, 391: 795-799
120. Middleton Derek, Curran Martin, Maxwell Lynne „Natural killer cells and their receptors” *Transpl Immunol* 2002, 10: 147-164
121. Masilamani Madhan, Narayanan Sriram, Prieto Martha, Borrego Francisco, Coligan John E. „Uncommon endocytic and trafficking pathway of the natural killer cell CD94/NKG2A inhibitory receptor” *Traffic* 2008, 9:1019-1034
122. Moretta Alessandro, Bottino Cristina, Mingari Maria Cristina, Biassoni Roberto, Moretta Lorenzo „What is a natural killer cell?” *Nat Immunol* 2002, 3: 6-8

123. Borrego Francisco, Kabat Juraj, Sanni Tolib B., Coligan John E. „NK cell CD94/NKG2A inhibitory receptors are internalized and recycle independently of inhibitory signaling processes” *J Immunol* 2002, 169: 6102-6111
124. Wójcik Dorota „Ocena stanu układu immunologicznego u dzieci po zakończeniu leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej” Praca doktorska, Wrocław 1995
125. Pietras Wojciech „Ocena stanu układu immunologicznego dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną po zakończeniu leczenia” Praca doktorska, Wrocław 1990
126. Yamada S. „Effect of radiotherapy on natural killer activity in childhood acute lymphoblastic leukemia and lymphoma” *Leukemia and Lymphoma* 1991, 4: 343-349
127. Fleisher Gary, Starr Stuart, Koven Norman, Kamiya Hitoshi, Douglas Steven D., Henle Werner „A non-x-linked syndrome with susceptibility to severe Epstein-Barr virus infections” *J Pediatr* 1982, 100(5): 727-730
128. Biron C.A., Byron K.S., Sullivan J.L. „Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells” *N Engl J Med* 1989, 320: 1731-1735
129. Georgeson George D., Szóny Barnabás J., Streitman Károly, Kovács Attila, Kovács László, László Aranka „Natural killer cell cytotoxicity is deficient in newborns with sepsis and recurrent infections” *Eur J Pediatr* 2001, 160: 478-482
130. Ogata K., An E., Shioi Y., Nakamura K., Luo S., Yokose N., Minami S., Dan K. „Association between natural killer cell activity and infection in immunologically normal elderly people” *Clin Exp Immunol* 2001, 124: 392-397
131. Djaldetti Meir, Salman Hertzfel, Bergman Michael, Djaldetti Rita, Bessler Hanna „Phagocytosis - the mighty weapon of the silent warriors” *Microsc Res Tech.* 2002, 57: 421-431
132. Panasiuk Anatol, Wysocka Jolanta, Maciorkowska Elżbieta, Panasiuk Bożena, Prokopowicz Danuta, Żak Janusz, Radomski Karol „Phagocytic and oxidative burst activity of neutrophils in the end stage of liver cirrhosis” *World J Gastroenterol* 2005, 11(48): 7661-7665

133. Steerman RL, Snyderman R, Leikin SL, Colten HR „Intrinsic defect of the polymorphonuclear leucocyte resulting in impaired chemotaxis and phagocytosis” *Clin Exp Immunol.* 1971, 9: 939-946
134. Stossel Thomas P. „Evaluation of opsonic and leukocyte function with spectrophotometric test in patients with infection and with phagocytic disorders” *Blood* 1973, 42: 121-130
135. Radkowski Marek, Olszewska Dominika „Odporność przeciwwzakaźna. Fagocytoza” w: „Immunologia” red.: Gołąb Jakub, Jakóbisiak Marek, Lasek Witold, Wydawnictwo Naukowe PWN 2002, 338-339
136. Jakóbisiak Marek, Gołąb Jakub „Mechanizmy zabijania drobnoustrojów przez komórki żerne” w: „Immunologia” red.: Gołąb Jakub, Jakóbisiak Marek, Lasek Witold, Wydawnictwo Naukowe PWN 2002, 147-154
137. Humbert James R., Hutter John J., Thoren Christine H., DeArme Patricia A. „Decreased neutrophil bactericidal activity in acute leukemia of childhood” *Cancer* 1976, 37: 2194-2200
138. Pisarek Jolanta „Ocena funkcji granulocytów i monocytów w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci” Praca doktorska, Wrocław 1983
139. Bow Eric J. „Infection risk and cancer chemotherapy: the impact of the chemotherapeutic regimen in patients with lymphoma and solid tissue malignancies” *JAC* 1998, 41 (supp. D): 1-5
140. Wood M.J. „Viral infections in neutropenia - current problems and chemotherapeutic control” *JAC* 1998, 41 (supp. D): 81-93
141. Offidani M., Corvatta L., Malerba L., Marconi M., Leoni P. „Infectious complications in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): experience at one single center” *Leukemia and Lymphoma* 2004, 45(8): 1617-1621
142. Baehner RL, Neiburger RG, Johnson DE, Murrmann SM. „Transient bactericidal defect of peripheral blood phagocytes from children with acute lymphoblastic leukemia receiving craniospinal irradiation” *N Engl J Med.* 1973, 289 (23): 1209-1213
143. Oppenheim Beryl A. „The changing pattern of infection in neutropenic patients” *JAC* 1998, 41 (supp. D): 7-11

144. Wang E. C. Y., Taylor-Wiedeman J., Perera P., Fisher J., Borysewicz L. K. „Subsets of CD8<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup> cells in normal, healthy individuals: correlations with human cytomegalovirus (HCMV) carrier status, phenotypic and functional analyses” *Clin Exp Immunol* 1993, 94: 297-305
145. Yamashita N., Nguyen L., Fahey J. L., Clement L. T. „Phenotypic properties and cytotoxic functions of human CD8<sup>+</sup> cells expressing the CD57 antigen” *Nat Immunol* 1993, 12 (2): 79-91
146. Autran Brigitte, Leblond Véronique, Sadat-Sowti Béhazine, Lefranc Evelyne, Got Pierre, Sutton Laurent, Binet Jacques-Louis, Debré Patrice „A soluble factor released by CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> lymphocytes from bone marrow transplanted patients inhibits cell-mediated cytotoxicity” *Blood* 1991, 77 (10): 2237-2241
147. Gratama J.W., Langelaar R.A., Oosterveer M.A.P., Van der Linden J.A., Den Ouden-Noordermeer A., Naipal A.I.M.H., Visser J.W.M., De Gast G.C., Tanke H.J. „Phenotypic study of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocyte subset in relation to cytomegalovirus carrier status and its correlate with pokeweed mitogen-induced B lymphocyte differentiation” *Clin Exp Immunol*. 1989, 77: 245-251
148. Wang Eddie C.Y., Moss Paul A.H., Frodsham Penny, Lehner Paul J., Bell John I., Borysewicz Leszek K. „CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> T lymphocytes in normal, healthy individuals are oligoclonal and respond to human cytomegalovirus” *J Immunol* 1995, 155: 5046-5056
149. Sadat-Sowti Béhazine, Parrot Antoine, Quint Laurent, Mayaud Charles, Debré Patrice, Autran Brigitte „Alveolar CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> lymphocytes in human immunodeficiency virus infection produce an inhibitor of cytotoxic functions” *Am J Respir Crit Care Med*. 1994, 149 (4 Pt 1): 972-980
150. Sadat-Sowti Béhazine, Debré Patrice, Mollet Lucille, Quint Laurent, Hadida Fabienne, Leblond Véronique, Bismuth Georges, Autran Brigitte „An inhibitor of cytotoxic functions produced by CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> T lymphocytes from patients suffering from AIDS and immunosuppressed bone marrow recipients” *Eur J Immunol* 1994, 24 (11): 2882-2888

151. Characiejus Dainius, Pasukoniene Vita, Kazlauskaite Nijole, Valuckas Konstantinas P, Petraitis Tadas, Mauricas Mykolas, Den Otter Willem „Predictive value of CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> lymphocyte subset in interferon therapy of patients with renal cell carcinoma” *Anticancer Res.* 2002, 22 (6B): 3679-3683
152. Characiejus Dainius, Pasukoniene Vita, Jonusauskaite R, Azlauskaite N, Aleknavicius Eduardas, Mauricas Mykolas, Den Otter Willem „Peripheral blood CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> lymphocyte levels may predict outcome in melanoma patients treated with adjuvant interferon-alfa” *Anticancer Res.* 2008, 28 (2B): 1139-1142
153. Frassanito M.A., Silvestris F., Cafforio P., Dammacco F. „CD8<sup>+</sup>/CD57<sup>+</sup> cells and apoptosis suppress T-cell functions in multiple myeloma” *Br J Haematol* 1998, 100: 469-477
154. Fregona Iva, Guttman Ronald D., Jean Rachel „HNK-1+ (Leu-7) and other lymphocyte subsets in long-term survivors with renal allotransplants” *Transplantation* 1985, 39(1): 25-29
155. Maher Patricia, O`Toole Carol M., Wreghitt T. G., Spiegelhalter D. J., English T. A. H. „Cytomegalovirus infection in cardiac transplant recipients associated with chronic T cell subset ratio inversion with expansion of a Leu-7<sup>+</sup> TS-C<sup>+</sup> subset” *Clin Exp Immunol* 1985, 65 (3): 515-524
156. LeRoy Eric, Calvo Charles-Félix, Divine Marine, Gourdin Marie-Françoise, Baujean F., Ben Aribia M. H., Mishal Zohar, Vernant Jean-Paul, Farcet Jean-Pierre, Senik Anna „Persistence of T8<sup>+</sup>/HNK-1<sup>+</sup> suppressor lymphocytes in the blood of long-term surviving patients after allogeneic bone marrow transplantation” *J Immunol* 1986, 137 (7): 2180-2189
157. Boxer Laurence A. „Zmiany liczby granulocytów obojętnochłonnych (neutrofilów)” w: *“Podręcznik pediatrii”* red.: Behrman Richard E., Kliegman Robert M., Nelson Waldo E., Vaughan III Victor C., Sieniawska Maria, Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 1996, 1433-1442
158. Dale David C. „Colony-stimulating factors for the management of neutropenia in cancer patients” *Drugs* 2002, 62 (suppl. 1): 1-15



159. Panopoulos Athanasia D., Watowich Stephanie S. „Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and ‘emergency’ hematopoiesis” *Cytokine* 2008, 42: 277-288
160. Morstyn G., Souza L. M., Keech J., Sheridan W., Campbell L., Alton N. K., Green M., Metcalf D., Fox R. „Effect of granulocyte colony stimulating factor on neutropenia induced by cytotoxic chemotherapy” *Lancet* 1988, 331 (8587): 667-672
161. Bacigalupo A. „The clinical benefits of recombinant human granulocyte colony stimulating factor in the treatment of cancer patients” *Eur J Cancer* 1994, 30A suppl. 3: S26-29
162. Weiss M., Gross-Weege W., Schneider M., Neidhardt H., Liebert S., Mirow N., Wernet P. „Enhancement of neutrophil function by *in vivo* filgrastim treatment for prophylaxis of sepsis in surgical intensive care patients” *J Crit Care* 1995, 10 (1): 21-26
163. Schäfer H., Hübel K., Bohlen H., Mansmann G., Hegener K., Richarz B., Oberhäuser F., Wassmer G., Hölscher A. H., Pichlmaier H., Diehl V., Engert A. „Perioperative treatment with Filgrastim stimulates granulocyte function and reduces infectious complications after esophagectomy” *Ann Hematol* 2000, 79: 143-151
164. Łuczyński Włodzimierz, Stasiak-Barmuta Anna, Krawczuk-Rybak Maryna, Kasprzycka Edwina, Żak Janusz, Nowakowska Martyna „Czy odpowiedź komórkowa nie ulega uszkodzeniu po indukcji remisji w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci?” *Pol Merk Lek* 2004, 16 (91): 17-21
165. Kosmidis Sofia, Baka Margarita, Bouhoutsou Despina, Doganis Dimitrios, Kallegri Constantina, Douladiris Nikolaos, Pourtsidis Apostolos, Varvoutsi Maria, Saxoni-Papageorgiou Fotini, Vasilatou-Kosmidis Helen „Longitudinal assessment of immunological status and rate of immune recovery following treatment in children with ALL” *Pediatr Blood Cancer* 2008, 50: 528-532
166. Edgren J., Weber T. H. „Radiation sensitivity of lymphocytes from human blood and from the thoracic duct” *Acta Radiol Ther Phys Biol* 1976, 15 (2): 177-182 [abstract]

167. Lacoste-Collin L., Jozan S., Cances-Lauwers V., Pipy B., Gasset G., Caratero C., Courtade-Saïdi M. „Effect of Continuous Irradiation with a Very Low Dose of Gamma Rays on Life Span and the Immune System in SJL Mice Prone to B-Cell Lymphoma” *Radiat. Res.* 2007, 168, 725-732
168. Weaver C. H., Zhen B., Schwartzberg L., Walker C., Upton S., Buckner C.D. „A randomized trial of mobilization of peripheral blood stem cells with cyclophosphamide, etoposide and granulocyte colony-stimulating factor with or without cisplatin in patients with malignant lymphoma receiving high-dose chemotherapy” *Am J Clin Oncol.* 1998, 21 (4): 408-412
169. Moskowitz Craig H., Glassman Jill R., Wuest David, Maslak Peter, Reich Lilian, Gucciardo Anthony, Coady-Lyons Nancy, Zelenetz Andrew D., Nimer Stephen D. „Factors affecting mobilization of peripheral blood progenitor cells in patients with lymphoma” *Clin Cancer Res* 1998, 4: 311-316
170. Demetri G. D. „The emergence of peripheral blood progenitor cells to support intensive chemotherapy for patients with breast cancer” *Pharmacotherapy* 1996, 16 (3 Pt 2): 94S-100S
171. Liu C.Z., Persad R., Inghirami G., Sen F., Amorosi E., Goldenberg A., Ibrahim S. „Transient atypical monocytosis mimic acute myelomonocytic leukemia in post-chemotherapy patients receiving G-CSF: report of two cases” *Clin Lab Haem.* 2004, 26: 359-362
172. Ranaghan L., Drake M., Humphreys M.W., Morris T.C.M. „Leukemoid monocytosis in M4-AML following chemotherapy and G-CSF” *Clin Lab Haem* 1998, 20: 49-51
173. Takamatsu Yasushi, Akashi Koichi, Harada Mine, Teshima Takanori, Inaba Shoichi, Shimoda Kazuya, Eto Tetsuya, Shibuya Tsunefumi, Okamura Seiichi, Niho Yoshiyuki „Cytokine production by peripheral blood monocytes and T cells during haemopoietic recovery after intensive chemotherapy” *Br J Haematol.* 1993, 83(1): 21-27
174. Cairo Mitchell S. „Dose reduction and delays: limitations of myelosuppressive chemotherapy” *Oncology (Williston Park)* 2000, 14 (9 suppl 8): 21-31

175. Briggs C., Hart D., Kunka S., Oguni S., Machin S. J. „Immature platelet fraction measurement: a future guide to platelet transfusion requirement after haematopoietic stem cell transplantation” *Transfusion Med.* 2006, 16: 101-109
176. Saigo Katsuyasu, Sakota Yasuyuki, Masuda Yukako, Matsunaga Kyoko, Takenokuchi Mariko, Nishimura Kunihiro, Sugimoto Takeshi, Sakurai Kosuke, Hashimoto Makoto, Yanai Tomoko, Hayakawa Akira, Takeshima Yasuhiro, Nomura Tsutomu, Kubota Yoshitsugu, Kumagai Shunichi „Automatic detection of immature platelets for decision making regarding platelet transfusion indications for pediatric patients” *Transfus Apher Sci.* 2008, 38: 127-132
177. Dale George L., Friese Paul, Hynes Laurie A., Burstein Samuel A. „Demonstration that thiazole-orange-positive platelets in the dog are less than 24 hours old” *Blood* 1995, 85 (7): 1822-1825
178. Stohlawetz P., Stiegler G., Knöbl P., Höcker P., Panzer S. „The rise of reticulated platelets after intensive chemotherapy for AML reduces the need for platelet transfusions” *Ann Hematol.* 1999, 78: 271-273
179. Elting Linda S., Cantor Scott B., Martin Charles G., Hamblin Lois, Kurtin Danna, Rivera Edgardo, Vadhan-Raj Saroj, Benjamin Robert S. „Cost of chemotherapy-induced thrombocytopenia among patients with lymphoma or solid tumors” *Cancer* 2003, 97: 1541-1550
180. Chaoui Driss, Chakroun Tahar, Robert Françoise, Rio Bernard, Belhocine Ramdane, Legrand Ollivier, Salanoubat Celia, Lecrubier Chantal, Casadevall Nicole, Marie Jean-Pierre, Elalamy Ismail „Reticulated platelets: a reliable measure to reduce prophylactic platelet transfusions after intensive chemotherapy” *Transfusion* 2005, 45: 766-772
181. Wang Chao, Smith Brian R., Adult Kenneth A., Rinder Henry M. „Reticulated platelets predict platelet count recovery following chemotherapy” *Transfusion* 2002, 42: 368-374
182. Mustafa Mahmoud M., Buchanan George R., Winick Naomi J., McCracken George H., Tkaczewski Isabelle, Lipscomb Mary, Ansari Qasim, Agopian Melkon S. „Immune recovery in children with malignancy after cessation of chemotherapy” *J Pediatr Hematol Oncol* 1998, 20 (5): 451-457

183. Reittie Joyce E., Gottlieb David, Heslop Helen E., Leger Olivier, Drexler Hans G., Hazlehurst Geoffrey, Hoffbrand A. Victor, Prentice H. Grant, Brenner Malcolm K. „Endogenously generated activated killer cells circulate after autologous allogeneic marrow transplantation but not after chemotherapy” *Blood* 1983, 73: 1351-1358
184. Gadó J., Schlick B., Bárány O., Németh J., Müller J., Csóka M., Constantin T., Vonnák E., Böcskei R., Hauser P., Kovács G. „The function of the immune system after the treatment of pediatric malignant diseases” *Orv Hetil.* 2006, 147 (36): 1731-1738 [abstrakt]
185. Pross Hugh F., Lotzová Eva „Role of natural killer cells in cancer” *Nat Immun.* 1993, 12(4-5): 279-292
186. Taketomi Akinobu, Shimada Mitsuo, Shirabe Ken, Kajiyama Kiyoshi, Gion Tomonobu, Sugimachi Keizo „Natural killer cell activity in patients with hepatocellular carcinoma: a new prognostic indicator after hepatectomy” *Cancer* 1998, 83: 58-63
187. Chuang Wan-Long, Liu Hong-Wen, Chang Wen-Yu „Natural killer cell activity in patients with hepatocellular carcinoma relative to early development and tumor invasion” *Cancer* 1998, 83: 58-63
188. Tajima Fumihiko, Kawatani Takahiko, Endo Akira, Kawasaki Hiroko „Natural killer cell activity and cytokine production as prognostic factors in adult acute leukemia” *Leukemia* 1996, 10 (3): 478-482
189. Alvarado Carlos S., Findley Harry W., Chan Wing C., Hnath Robert S., Abdel-Mageed Aly, Pais Ray C., Kutner Michael H., Ragab Abdelsalam H. „Natural killer cells in children with malignant solid tumors. Effect of recombinant interferon- $\alpha$  and interleukin-2 on natural killer cell function against tumor cell lines” *Cancer* 1989, 63: 83-89
190. Lotzová Eva „Role of human circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in cancer defense and treatment” *Nat Immun Cell Growth Regul.* 1990, 9(4): 253-264
191. Filipovich A. H., Mathur A., Kamat D., Shapiro R. S. „Primary immunodeficiencies: genetic risk factors for lymphoma” *Cancer Res.* 1992, 52 (suppl.): 5465s-5467s
192. Fenton Robert G., Longo Dan L. „Genetic instability and tumor cell variation: implications for immunotherapy” *J Nat Cancer Inst.* 1995, 87 (4): 241-243

193. Mori T., Yabuhara A., Nakayama J., Kitahara M., Washizawa K., Kasai S., Komiyama A. „Frequently relapsing minimal change nephrotic syndrome with natural killer cell deficiency prior to the overt relapse of Hodgkin's disease” *Pediatr Nephrol.* 1995, 9(5): 619-620
194. Pettit S. J., Seymour K., O'Flaherty E., Kirby J. A. „Immune selection in neoplasia: towards a microevolutionary model of cancer development” *Br J Cancer* 2000, 82 (12): 1900-1906
195. Macia J., Gomez X., Esquerda A., Perez B., Callao V., Marzo C. “Value of the determination of TNF-alpha in the plasma of patients with non-Hodgkins lymphoma” *Leuk Lymphoma* 1996, 20 (5-6): 481-486
196. Dummer R., Posseckert G., Nestle F., Witzgall R., Burger M., Becker J. C., Schäfer E., Wiede J., Sebald W., Burg G. „Soluble interleukin-2 receptors inhibit interleukin-2-dependent proliferation and cytotoxicity: explanation for diminished natural killer cell activity in cutaneous T-cell lymphomas in vivo?” *J Invest Dermatol.* 1992, 98 (1): 50-54
197. Ross Mary E., Caligiuri Michael A. „Cytokine-induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response” *Blood* 1997, 89 (3): 910-918
198. Rytwiński Krzysztof, Sońta-Jakimczyk Danuta, Sroczyńska Maria, Wójcik Zofia, Dzielicki Józef „Wybrane parametry immunologiczne a zakażenia u dzieci w okresie ponad jednego roku od zakończenia leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej” *Pol Tyg Lek.* 1989, 44 (14): 320-322
199. WHO – Statistical annexes of the World Health Report, 2002; z: <http://www.who.int/en/>
200. Orange Jordan S. „Human natural killer deficiencies and susceptibility to infection” *Microbes Infect.* 2002, 4: 1545-1558
201. Rossi M. E., Marranci S., De Marco A., Lega L., Minutello M. A., Azzari C., Resti M., Vierucci A. „Reduced natural killer function in children with recurrent respiratory tract infections” *Pediatr Med Chir.* 1993, 15 (1): 1-4 [abstrakt]

202. De Vries Esther, Koene Harry R., Vossen Jaak M., Gratama Jan-Willem, Von dem Borne Albert E. G. Kr., Waaijer Jacqueline L. M., Haraldsson Asgeir, De Haas Masja, Van Tol Maarten J. D. „Identification of an unusual Fcγ receptor IIIa (CD16) on natural killer cells in a patient with recurrent infections” *Blood* 1996, 88 (8): 3022-3027
203. Etzioni Amos, Eidenschenk Celine, Katz Rina, Beck Rafeal, Casanova Jean Laurent, Pollack Shimon „Fatal varicella associated with selective natural killer cell defficiency” *J Pediatr* 2005, 146: 423-425

## **ZAŁĄCZNIK 1**

### **ANKIETA PODSTAWOWA**

#### ***Dane ogólne***

1. Nazwisko i imię.....
2. Data urodzenia.....
3. Rozpoznanie.....
4. Data rozpoznania.....
5. Wiek w momencie rozpoznania.....
6. Schemat leczenia.....
7. Data rozpoczęcia leczenia podtrzymującego.....
8. Data zakończenia leczenia podtrzymującego.....
9. Data zakończenia obserwacji.....
10. Poważne powikłania infekcyjne podczas leczenia intensywnego (powodujące przerwy w terapii)  
.....  
.....  
.....
11. Stosowanie G-CSF podczas trwania leczenia intensywnego  
.....  
.....  
.....
12. Dyskwalifikacja z projektu z powodu.....

**Dane z wywiadu**

Data.....

Infekcje przed zachorowaniem (rodzaj, częstość, gorączka, limfadenopatia, antybiotyki – jak często, przebieg infekcji, czy pomiędzy infekcjami zdrowy):

Rodzaj infekcji.....

Zakażenia górnych dróg oddechowych	
Zapalenia uszu	
Zapalenia oskrzeli i/lub płuc	
Biegunki	
Zapalenia jamy ustnej	
Zmiany skórne	
Alergie	
Inne	

Antybiotykoterapie.....,

.....

Wywiad infekcyjny z okresu bezpośrednio poprzedzającego rozpoznanie

.....

.....

Wywiad rodzinny (dotyczący infekcji)

.....

.....

Szczepienia.....

.....



**Badanie przedmiotowe**

Data.....

Wzrost..... Masa ciała.....

Stan ogólny.....

Ciśnienie tętnicze.....

Skóra: zabarwienie .....

elastyczność.....

wykwity patologiczne.....

Węzły chłonne: .....

Nos: drożność..... wydzielina.....

Jama ustna: śluzówki.....

zęby..... gardło.....

Płuca: osłuchowo..... opukowo.....

Serce: akcja serca..... tony.....

Jama brzuszna: napięcie powłok.....

opory patologiczne..... perystaltyka.....

śledziona..... wątroba.....

Narządy moczowo-płciowe.....

Obj.oponowe..... Obj.neurologiczne.....

Inne.....

**Wstępne badania laboratoryjne**

Data .....

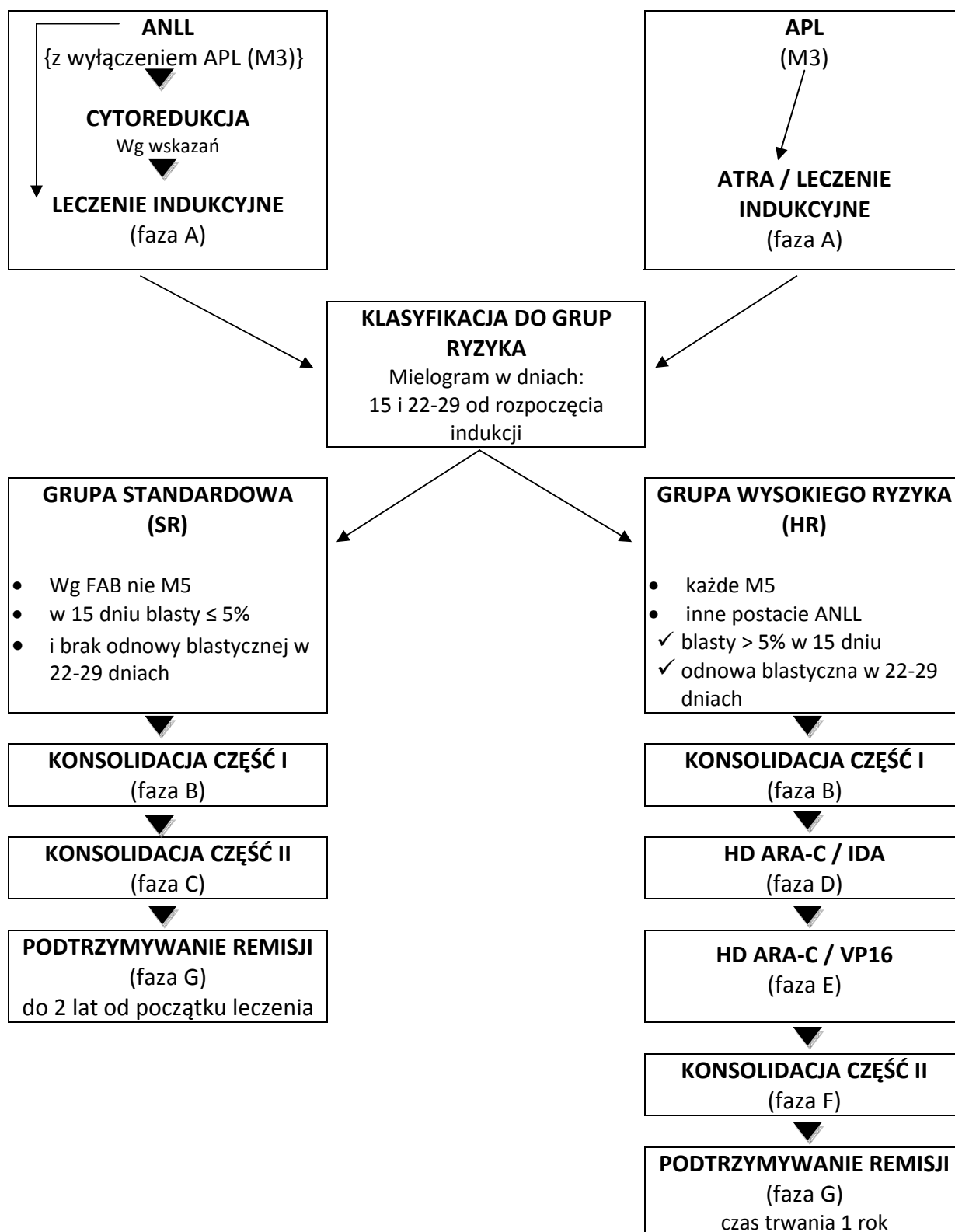
<b>Morfologia</b>		<b>CRP</b>	
Hg	g%		
Hct	%	<b>Komórki NK</b>	
RBC	$\times 10^6$	liczba bezwzgl.	
MCV	fl	liczba względna	
MCH	pg	aktywność cytotoksyczna	
MCHC	g/dl	Kom. NK CD94+	
PLT	$\times 10^3$		
WBC	$\times 10^3$	<b>Phagotest</b>	
granulocyty	%	granulocyty	
limfocyty	%	monocyty	
monocyty	%		
kwasoctł.	%	<b>Komórki CD8high</b>	
zasadoctł.	%	liczba bezwzgl.	
blasty	%	liczba względna	



## ZAŁĄCZNIK 3

## PROGRAM LECZENIA DZIECI Z OSTRĄ BIAŁACZKĄ NIELIMFOBLASTYCZNĄ (ANLL)

## ANLL-98



W przypadku braku zgody na leczenie IDA stosuje się daunorubicynę

## ZAŁĄCZNIK 4

### PROTOKÓŁ B-NHL BFM 04 dla pacjentów z dojrzałym B-NHL lub B-ALL

#### Standardowe leczenie

R1	A <sup>4</sup>	B <sup>4</sup>					
R2	V	A <sup>4</sup>	B <sup>4</sup>	A <sup>4</sup>	B <sup>4</sup>		
R3	V	AA <sup>24</sup>	BB <sup>24</sup>	CC	AA <sup>24</sup>	BB <sup>24</sup>	
R4	V	AA <sup>24</sup>	BB <sup>24</sup>	CC	AA <sup>24</sup>	BB <sup>24</sup>	CC

#### Zmodyfikowany plan leczenia pacjentów z pierwotnym śródpiersiowym B-NHL

LDH < 500 U/L MTX 1g/m <sup>2</sup> przez 24h	V	A <sup>24</sup>	B <sup>24</sup>	A <sup>24</sup>	B <sup>24</sup>	A <sup>24</sup>	B <sup>24</sup>	
LDH > 500 U/L MTX 5g/m <sup>2</sup> przez 24h	V	AA <sup>24</sup>	BB <sup>24</sup>	CC	AA <sup>24</sup>	BB <sup>24</sup>	CC	BB <sup>24</sup>

#### Zmodyfikowany plan leczenia pacjentów z pierwotnym zajęciem OUN

i.th. trójca	V	AAZ1	BBZ1	CC	AAZ2	BBZ2	CC
	↑↑	↑↑↑↑	↑↑↑	↑	↑↑	↑↑	↑

## ZAŁĄCZNIK 5

## Protokół leczenia B-NHL 93 – opracowany na podstawie LMB-89

dla grupy B (pośredniego ryzyka)

CYKL	LEK	DAWKA	DZIEŃ						
			1	2	3	4	5	6	7
<b>COP</b>	Prednizon	60 mg/m <sup>2</sup>	x	x	x	x	x	x	x
	Cyklofosfamid	300 mg/m <sup>2</sup>	x						
	Winkrystyna*	1,0 mg/m <sup>2</sup>	x						
	MTX IT	8-15 mg/m <sup>2</sup>	x						
	Hydrokortyzon IT	8-15 mg/m <sup>2</sup>	x						
<b>COPADM1</b>	Prednizon	60 mg/m <sup>2</sup>	x	x	x	x	x	x	x
	Winkrystyna*	2,0 mg/m <sup>2</sup>	x						
	HD MTX	3000 mg/m <sup>2</sup> w 3-godz. infuzji (+Leucovorin**)	x						
	MTX IT	8-15 mg/m <sup>2</sup>		x				x	
	Hydrokortyzon IT	8-15 mg/m <sup>2</sup>		x				x	
	Cyklofosfamid	250 mg/m <sup>2</sup> co 12h		xx	xx	xx			
	Doxorubicyna	60 mg/m <sup>2</sup>		x					
<b>COPADM2</b>	Prednizon	60 mg/m <sup>2</sup>	x	x	x	x	x	x	x
	Winkrystyna*	2,0 mg/m <sup>2</sup>	x						
	HD MTX	3000 mg/m <sup>2</sup> w 3-godz. infuzji (+Leucovorin**)	x						
	MTX IT	8-15 mg/m <sup>2</sup>		x				x	
	Hydrokortyzon IT	8-15 mg/m <sup>2</sup>		x				x	
	Cyklofosfamid	500 mg/m <sup>2</sup> co 12h		xx	xx	xx			
	Doxorubicyna	60 mg/m <sup>2</sup>		x					
<b>CYM</b> (dwukrotnie)	HD MTX	3000 mg/m <sup>2</sup> w 3-godz. infuzji (+Leucovorin**)	x						
	MTX IT	8-15 mg/m <sup>2</sup>		x					
	Cytarabina	100 mg/m <sup>2</sup> /24h w ciągłej infuzji		x	x	x	x	x	
	Cytarabina IT	15-30 mg/m <sup>2</sup>						x	
	Hydrokortyzon IT	8-15 mg/m <sup>2</sup>		x				x	
<b>M1</b>	Prednizon	60 mg/m <sup>2</sup>	x	x	x	x	x	x	x
	Winkrystyna*	2,0 mg/m <sup>2</sup>	x						
	HD MTX	3000 mg/m <sup>2</sup> w 3-godz. infuzji (+Leucovorin**)	x						
	MTX IT	8-15 mg/m <sup>2</sup>		x					
	Hydrokortyzon IT	8-15 mg/m <sup>2</sup>		x					
	Cyklofosfamid	250 mg/m <sup>2</sup> co 12h		xx	xx				
	Doxorubicyna	60 mg/m <sup>2</sup>		x					

MTX – metoterksat; IT – podaż dokanałowa (dawki zależne od wieku); HD (high dose) – wysoka dawka

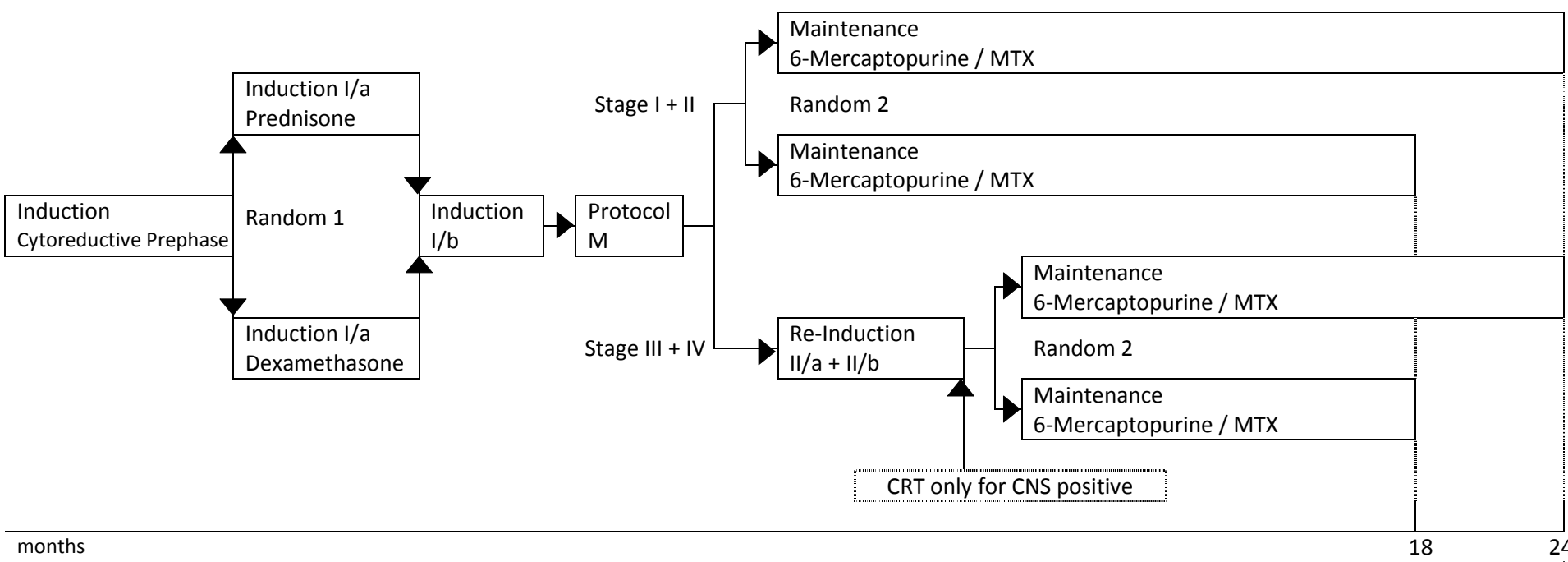
\* - max. dawka 2mg; \*\* - 30 mg/m<sup>2</sup> w 42h, 15 mg/m<sup>2</sup> w 48 i 52h od początku infuzji HD MTX



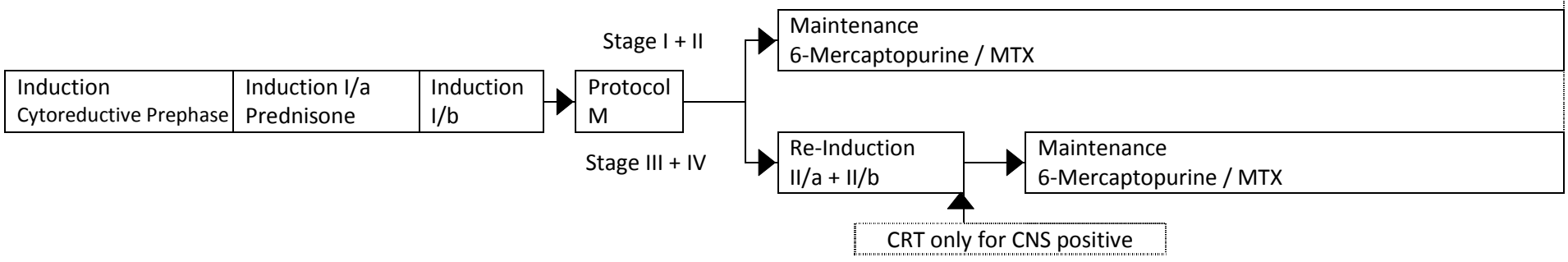
# ZAŁĄCZNIK 6

## Treatment Plan EURO-LB 02 for T-Cell Lymphoblastic Lymphoma

182



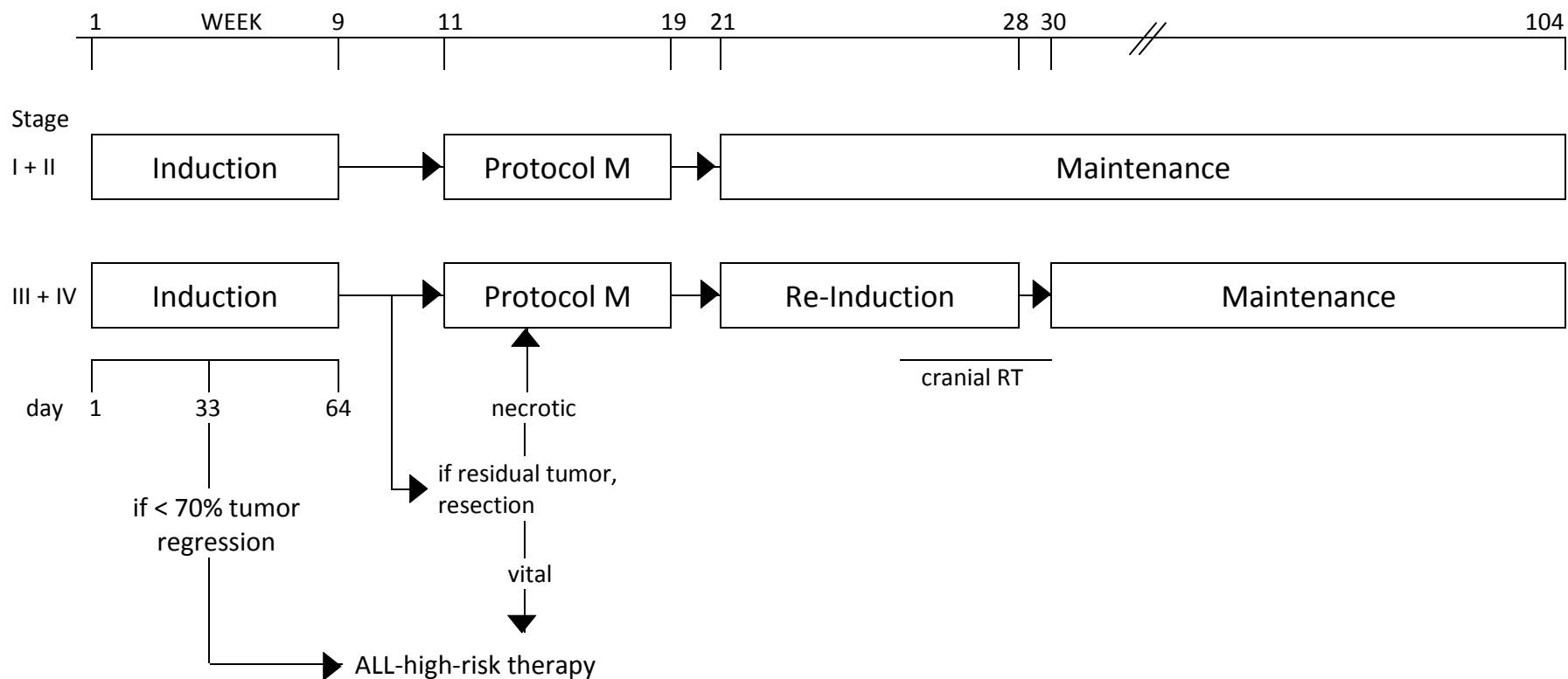
## Treatment Plan EURO-LB 02 for non T-Cell Lymphoblastic Lymphoma





## ZAŁĄCZNIK 7

### Protokół leczenia B-NHL 93 – opracowany na podstawie NHL-BFM-90



## ZAŁĄCZNIK 8

Sumaryczne dawki leków stosowanych w protokołach intensywnej terapii przeciwnowotworowej pacjentów z ostrą białaczką\*

	ALL – ALLIC 2002					AML – ANLL-98
	SR1	SR2	IR1	IR2	HR2B	SR
prednizon (p.o.) mg/m <sup>2</sup>	1727,5-1937,5					-
prednizolon (p.o.) mg/m <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	1120
prednizolon (i.t.) mg *	-	-	-	-	36/48/60	-
deksametazon (p.o.) mg/m <sup>2</sup>	236,25	332,50	236,25	498,75	836,25	-
L-asparaginaza (i.v.) U/m <sup>2</sup>	80000	120000	80000	160000	380000	-
doksorubicyna (i.v.) mg/m <sup>2</sup>	120			180	-	-
daunorubicyna (i.v.) mg/m <sup>2</sup>	60		120		180	-
idarubicyna (i.v.) mg/m <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	84
winkrystyna (i.v.) mg/m <sup>2</sup>	12			15	24	6
windezyna (i.v.) mg/m <sup>2</sup>	-	-	-	-	12	-
etopozyd (i.v.) mg/m <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	450
cyklofosfamid (i.v.) mg/m <sup>2</sup>	3000			3500	7000	1000
ifosfamid (i.v.) mg/m <sup>2</sup>	-	-	-	-	8000	-
metotreksat (i.v.) mg/m <sup>2</sup>	8000				15000	-
metotreksat (p.o.) mg/m <sup>2</sup>	-	200	-	160	-	-
metotreksat (i.t.) mg *	88/110/132	104/130/156	88/110/132	120/150/180	88/110/132	18/36/48/60/72
6-merkaptopuryna (p.o.) mg/m <sup>2</sup>	3080	6580	3080	5880	1680	-
6-tioguanina (p.o.) mg/m <sup>2</sup>	840	1680	840	2520	-	3360
cytarabina (i.v.) mg/m <sup>2</sup>	1800	2400	1800	3000	17800	3700
cytarabina (i.t.) mg *	-	-	-	-	120/156/180	-
kwask retinowy (p.o.) mg/m <sup>2</sup>						360 <sup>#</sup>

\* uwzględniono wyłącznie protokoły lecznicze stosowane u pacjentów z badanej grupy

## ZAŁĄCZNIK 9

Sumaryczne dawki leków stosowanych w protokołach intensywnej terapii przeciwnowotworowej pacjentów z chłoniakiem nieziarniczym (NHL)\*

	B-NHL				T-NHL	
	B-NHL BFM 04			B-NHL 93 (B-NHL LMB-89)	NB-NHL 93 (NB-NHL BFM 90)	T-NHL – EURO-LB 02
	R2	R3	med-B-NHL	grupa B	HR	
prednizon (p.o.) mg/m <sup>2</sup>	-	-	-	1200	1825	1825
prednizolon (i.t.) mg *	50	100	70	-	-	-
HYDROKORTYZON (I.T.) mg*	-	-	-	135	-	-
deksametazon (p.o.) mg/m <sup>2</sup>	240	290	340	-	235	235
L-asparaginaza (i.v.) U/m <sup>2</sup>	-	-	-	-	120000	120000
doksorubicyna (i.v.) mg/m <sup>2</sup>	100		150	180	-	120
daunorubicyna (i.v.) mg/m <sup>2</sup>	-	-	-	-	280	120
winkrystyna (i.v.) mg/m <sup>2</sup>	6	6	9	9	12	12
windezyna (i.v.) mg/m <sup>2</sup>	-	3	-	-	-	-
etopozyd (i.v.) mg/m <sup>2</sup>	400	900	600	-	-	-
cyklofosamid (i.v.) mg/m <sup>2</sup>	2400		3400	10300	3000	2000
ifosfamid (i.v.) mg/m <sup>2</sup>	8000		12000	-	-	-
metotreksat (i.v.) mg/m <sup>2</sup>	4000	20000	6000	12000	20000	20000
metotreksat (p.o.) mg/m <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-
metotreksat (i.t.) mg *	60	120	84	120	120	120
6-merkaptopuryna (p.o.) mg/m <sup>2</sup>	-	-	-	-	3080	3080
6-tioguanina (p.o.) mg/m <sup>2</sup>	-	-	-	-	840	840
cytarabina (i.v.) mg/m <sup>2</sup>	1200	13200	1800	500	1800	1800
cytarabina (i.t.) mg *	150	300	210	240	-	-

\* uwzględniono wyłącznie protokoły lecznicze stosowane u pacjentów z badanej grupy