

JADWIGA WĘCŁAWEK-TOMPOL, BLANKA RYBKA, DOROTA NOWOROLSKA-SAUREN,
RENATA RYCZAN, ALICJA CHYBICKA

Komórki dendrytyczne krwi u dzieci z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego

Blood Dendritic Cells in Children with Hematological Malignancies

Katedra i Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej AM we Wrocławiu

Streszczenie

Wprowadzenie. Komórki dendrytyczne (KD) odgrywają kluczową rolę w inicjacji i kontroli pierwotnej i wtórnej odpowiedzi immunologicznej oraz w powstawaniu zjawisk tolerancji.

Cel pracy. Ilościowa ocena populacji KD krwi u dzieci z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego w zależności od etapu leczenia i rodzaju odpowiedzi na terapię, porównanie tych wyników z wartościami stwierdzanymi u dzieci zdrowych oraz określenie związku między liczbą KD krwi a aktywacją limfocytów T.

Materiał i metody. Badaniami objęto 76 dzieci (30 dziewczynek i 46 chłopców) w wieku od 15 miesięcy do 18 lat (mediana 9 lat), leczonych w Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej AM we Wrocławiu, z powodu: ALL – 39, AML – 15, NHL – 8, HD – 10 oraz LCAL – 4 pacjentów. Grupę kontrolną stanowiło 21 zdrowych dzieci w wieku 3–18 lat (mediana 11 lat). Analizę ilościową subpopulacji limfocytów T oraz KD krwi przeprowadzono techniką cytofluorymetrii przepływowej. Populacje KD krwi definiowano na podstawie ekspresji swoistych markerów BDCA-1, BDCA-2, BDCA-3, prowadząc niezależnie od tych oznaczeń analizę populacji KD wykazujących ekspresję antygenu CD83, swoistego dla dojrzałych KD.

Wyniki. U większości pacjentów w chwili rozpoznania choroby obserwowano mniejsze wartości analizowanych populacji limfocytów T w porównaniu z dziećmi zdrowymi oraz znaczne obniżenie liczebności tych komórek podczas prowadzonego leczenia. We wszystkich grupach chorych w okresie obserwacji odnotowywano wyższy procentowy udział KD w populacji MNC w odniesieniu do grupy kontrolnej. Podwyższone wartości KD wykazywały dodatnią korelację ze wzrostem odsetka aktywowanych limfocytów T (CD3⁺CD26⁺) w ogólnej populacji limfocytów T w krążeniu.

Wnioski. Obserwowane u dzieci z chorobą nowotworową większe, w porównaniu z grupą kontrolną, wartości KD na początku leczenia świadczą o aktywacji układu odpornościowego w odpowiedzi na istniejący proces chorobowy. Utrzymywanie się podwyższonego udziału procentowego KD w populacji MNC w czasie leczenia, a także 1–2 miesiące po jego zakończeniu świadczy o utrzymującym się stanie aktywacji układu odpornościowego, co może mieć istotne znaczenie w kontroli choroby resztkowej (*Adv Clin Exp Med* 2005, 14, 4, 689–702).

Słowa kluczowe: subpopulacje limfocytów, komórki dendrytyczne krwi, dzieci, nowotwory.

Abstract

Background. Dendritic cells (DC) are important antigen-presenting cells (APC) of immune system that induce and modulate primary and secondary immune responses; they also induce central and peripheral tolerance T lymphocytes to self-antigens.

Objectives. The aim of the study was analysis of subpopulations T lymphocytes and blood DC (BDC) in patients with hematological malignancies at time of various stage of treatment in comparison with control group and designation of correlation between number of BDC and activation of T lymphocytes.

Material and Methods. The total number of 76 patients: 30 females and 46 males, aged from 15 months to 18 years (median 9 years) treated in the Department of Children Bone Marrow Transplantation, Oncology and Hematology, Medical University of Wrocław, Poland (ALL – 39, AML – 15, NHL – 8, HD – 10, LCAL – 4) were examined. The populations of lymphocytes and BDC were analyzed by flow cytometry. The subpopulations of BDC were defined on the ground of expression of specific markers for distinct blood dendritic cell populations: BDCA-1, BDCA-2, BDCA-3 and activated BDC were identified as showed the expression of activation state antigen CD83.

Results. The results of study showed: 1) decreased number of T lymphocytes at the time of diagnosis in many patients; 2) significantly decreased number of lymphocytes during chemotherapy and 1–2 months after cessation of

treatment; 3) increased level of BDC in patients in comparison to the control group of healthy children. Those yields explained positive correlation with value of activated T lymphocytes (CD3⁺CD26⁺).

Conclusions. Increased value of BDC in children with haematological malignancies, as well as in patients 1–2 months after cessation of treatment, may indicate on activation of immune system. This fact may play important role in control of residual disease (*Adv Clin Exp Med* 2005, 14, 4, 689–702).

Key words: lymphocytes subpopulations, blood dendritic cells, children, neoplasms.

Choroba nowotworowa jest stanem, w którym dochodzi do niekontrolowanej proliferacji komórek organizmu, niepodlegającej mechanizmom regulacyjnym ustroju. Mutacje genetyczne towarzyszące onkogenezie prowadzą do powstania zmian antygenowych w komórkach nowotworowych. Nabywają one możliwość ekspresji białek zmienionych lub charakteryzujących etap płodowy rozwoju organizmu, przez co mogą być rozpoznawane przez komórki immunokompetentne jako obce. Do najważniejszych mechanizmów efektorowych odpowiedzi immunologicznej przeciw komórkom nowotworowym należy zaliczyć: aktywność komórek NK, cytotoksyczność limfocytów Tc, aktywność cytokin wydzielanych przez limfocyty T oraz aktywowane makrofagi, cytotoksyczność makrofagów i neutrofilów, cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał oraz cytotoksyczność przeciwciał zależną od dopełniacza [1].

Warunkiem niezbędnym do zainicjowania odpowiedzi immunologicznej jest rozpoznanie antygeny przez komórki efektorowe. Limfocyty T wymagają zaprezentowania antygeny przez profesjonalne komórki APC (*antigen presenting cells*). Limfocyty B mogą same rozpoznawać antygen przez powierzchniowe receptory immunoglobulinowe, mogą też ulegać aktywacji w obecności cytokin wydzielanych przez limfocyty Th (IL-4, IL-5, IL-10), aktywowane limfocyty B (IL-4) oraz aktywowane komórki dendrytyczne (KD) – IL-12. Komórki NK wykazują zdolność do spontanicznego zabijania komórek docelowych, przy czym KD zwiększają aktywność cytotoksyczną komórek NK przez bezpośrednie oddziaływania oraz za pośrednictwem wydzielanych cytokin (IFN- α , IL-12, IL-15, IL-18). Kluczową rolę w inicjacji oraz kontroli pierwotnej i wtórnej odpowiedzi immunologicznej oraz w powstawaniu zjawisk tolerancji odgrywają KD, które wchodzi w interakcje z limfocytami T, B, komórkami NK, powodując ich aktywację, różnicowanie i zwiększenie funkcji efektorowych [2].

KD krwi stanowią około 1% komórek jednonajdrzastych krwi obwodowej. Są populacją zróżnicowaną pod względem fenotypowym i funkcjonalnym. We krwi, obok prekursorowych KD, mogą również występować KD migrujące do narządów chłonnych, które zostały aktywowane pod wpływem kontaktu z antygenem i czynnikami stymulującymi ich dojrzewanie.

Przeprowadzone przez Dzionka et al. [3] badania budowy antygenowej i różnic funkcjonalnych świeżo izolowanych KD, pochodzących od zdrowych dawców, doprowadziły do identyfikacji trzech nowych markerów powierzchniowych charakteryzujących KD krwi, nieobecnych na innych komórkach krwi obwodowej: BDCA-2, BDCA-3, BDCA-4. Opisany przez nich również antygen BDCA-1 odpowiadał pod względem strukturalnym cząsteczce CD1c, ponieważ dodanie przeciwciał monoklonalnych stosowanych do oznaczenia BDCA-1 blokowało reakcję CD1c z anti-CD1c. Na podstawie tych markerów zaproponowano wyróżnienie trzech subpopulacji KD krwi:

- KD BDCA-1⁺ (CD1c⁺) – KD CD11c^{bright} (silna ekspresja) CD123^{dim} (słaba ekspresja) CD19⁺ o morfologii monocytoidalnej; antygen CD1c stwierdzono także na małej subpopulacji spoczynkowych limfocytów B.

- KD BDCA-2⁺, BDCA-4⁺ – KD o morfologii plazmacytoidalnej i fenotypie CD11c⁺CD123⁺.

- KD BDCA-3⁺ – małej subpopulacji KD CD11c^{dim}CD123⁺ o morfologii monocytoidalnej.

Celem pracy była ocena subpopulacji KD krwi u dzieci z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego w zależności od etapu leczenia i rodzaju odpowiedzi na terapię, porównanie tych wyników z wartościami stwierdzanymi u dzieci zdrowych oraz określenie związku między liczbą KD krwi a aktywacją limfocytów T.

Material i metody

Analizą objęto 76 dzieci (46 chłopców i 30 dziewcząt) w wieku od 15 miesięcy do 18 lat (mediana 9 lat) leczonych w Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej AM we Wrocławiu z powodu: ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) – 39 dzieci, ostrej białaczki szpikowej (AML) – 15 pacjentów, chłoniaków niezłośliwych B-komórkowych (NHL-B) – 8 dzieci, choroby Hodgkina (HD) – 10 chorych oraz chłoniaków anaplastycznych wielkokomórkowych (LCAL) – 4 pacjentów. Badania układu odpornościowego analizowane w tej pracy dotyczą okresu leczenia prowadzonego za pomocą konwencjonalnej chemioterapii. Grupę kontrolną stanowiło 21 zdrowych dzieci (12 chłopców, 9 dziewcząt),

Tabela 1. Etapy pobierania krwi do badań, liczebność grup pacjentów na poszczególnych etapach leczenia**Table 1.** Stage of treatment at which blood samples were collect, number of patients

Rozpoznanie (Diagnosis)	Etap leczenia (Stage of treatment)						
	diagnostyka (diagnosing)	remisja/ w czasie leczenia (remission/ during therapy)	LPR (maintenance therapy)	progresja (progression)	wznowa (relapse)	2 remisja (2 nd remission)	zakończenie leczenia (end of treatment)
ALL	34	33	21	3	8 ^{*)}	2	–
AML	14	11	8	3	2 ^{**)}	1	–
HD	10	9	–	–	–	–	9
LCAL	4	2	1	1	–	–	1
NHL-B	8	7	–	–	–	–	7

^{*)} 5 pacjentów chorych na ALL zakwalifikowanych do badań na etapie rozpoznania nawrotu choroby.

^{*)} 5 ALL patients were included to study while diagnosing leukemia relapse.

^{**)} 1 dziecko chore na AML zakwalifikowane do badań na etapie rozpoznania nawrotu choroby.

^{**)} 1 AML child was included to study while diagnosing leukemia relapse.

potencjalnych dawców szpiku do przeszczepów alogenicznych, w wieku 3–18 lat (mediana 11 lat).

Do badań pobierano 1–2 ml krwi obwodowej na heparynę na różnych etapach diagnostyki i leczenia: w czasie rozpoznania, po osiągnięciu remisji hematologicznej (pacjenci chorzy na ALL i AML), w czasie badań bilansowych oceniających odpowiedź na leczenie (dzieci chore na HD, NHL-B, LCAL), przed rozpoczęciem leczenia podtrzymującego remisję (LPR), po zakończeniu terapii, a także w przypadku stwierdzenia nawrotu lub progresji choroby (tab. 1). Warunkiem pobrania materiału do badań, poza rozpoznaniem nowotworu lub jego wznowy, był dobry stan kliniczny pacjenta i wykluczenie aktywnej infekcji na podstawie badania fizykalnego oraz badań dodatkowych. Każdorazowo krew była pobierana przy okazji rutynowych badań związanych z diagnostyką lub kwalifikacją pacjenta do cyklu chemioterapii, w przypadku grupy kontrolnej – podczas badań HLA lub badań związanych z kwalifikacją do pobrania szpiku.

Ilościową ocenę KD krwi oraz aktywowanych limfocytów T o fenotypie CD3⁺CD26⁺ przeprowadzono techniką cytofluorymetrii przepływowej. W identyfikacji KD krwi wykorzystywano przeciwciała monoklonalne: anty-BDCA-1, anty-BDCA-2, anty-BDCA-3, (Milteny Biotec, Niemcy) skierowane przeciw swoistym markerom powierzchniowym definiującym trzy różne populacje tych komórek, prowadząc niezależnie od tych oznaczeń analizę aktywowanych KD krwi, definiowanych jako KD CD11c⁺CD83⁺HLA-DR⁺ i KD CD11c⁺CD83⁺HLA-DR⁺. W znakowaniu aktywowanych KD i limfocytów stosowano odpowiednio przeciwciała anty-CD83 (Pharmingen, CA), anty-

-CD11c, anty-HLA-DR oraz anty-CD3, anty-CD26 (BD, Biosciences, CA). W przypadku subpopulacji limfocytów analizowano 5–10 x 10³ komórek/próbkę, a do oznaczenia populacji KD – 50–75 x 10³ komórek/próbkę. Analizę uzyskanych wyników przeprowadzono za pomocą programu WinList for Win32, ver. 3.0 (Verity Software House, Inc., USA), stosując do oceny odsetka poszczególnych populacji limfocytów – bramkę limfocytarną, w przypadku KD – bramkę komórek jednojądrzastych (MNC). Aby porównać uzyskane wyniki oraz obliczyć wartości liczbowe poszczególnych populacji komórek, dane uzyskiwane dla danej czystości bramki (czystość i wielkość bramki ustalana na podstawie znakowania z CD14/CD45 wobec kontroli izotypowej, BD Biosciences, CA) przeliczano do wartości, które uzyskano by przy czystości bramki 100%. Liczbę bezwzględną poszczególnych populacji limfocytów i KD obliczano na podstawie morfologii krwi obwodowej, stosując rozmaz manualny jako metodę referencyjną do określenia udziału procentowego poszczególnych populacji układu białokrwinkowego.

Obliczenia statystyczne wykonano za pomocą programu StatSoft *STATISTICA* 6.0.

Wyniki

W celu przedstawienia wyników obrazujących liczebność poszczególnych populacji komórkowych posłużono się wielkością mediany, podając zakresy uzyskiwanych wartości (szczegółowe zestawienie danych przedstawiono w tabelach). Za istotne statystycznie przyjmowano wyniki, w któ-

rych współczynnik ufności wynosił: $p \leq 0,05$ dla populacji limfocytów oraz $p \leq 0,005$ dla populacji KD. Wartości bezwzględne limfocytów oraz komórek jednojądrzastych krwi przedstawiano jako liczbę komórek w 1 μl krwi (kom./ μl), a w przypadku KD krwi, biorąc pod uwagę małą liczebność populacji – w postaci liczby komórek w 1 ml krwi (kom./ml).

KD BDCA-1⁺

W grupie porównawczej odsetek KD BDCA-1⁺ w populacji MNC mieścił się w zakresie (0,130–0,331%) z medianą 0,262%, natomiast wartości liczbowe zawierały się w przedziale $(1,84–19,45) \times 10^3/\text{ml}$ z medianą $5,99 \times 10^3/\text{ml}$. U dzieci z chorobą nowotworową na początku leczenia obserwowano znaczne zróżnicowanie obu wskaźników niezależnie od rozpoznania, ale wartości median zarówno w przypadku udziału procentowego, jak i liczbowego, były wyższe w porównaniu z grupą kontrolną.

Odsetek KD BDCA-1⁺ u chorych na ALL po uzyskaniu remisji hematologicznej oraz przed rozpoczęciem LPR był podwyższony w stosunku do stanu wyjściowego, chociaż stwierdzano niższe wartości liczbowe niż na początku leczenia. U pacjentów ze wznową ALL odsetek i liczba KD BDCA-1⁺ wynosiły 0,510% i $8,81 \times 10^3/\text{ml}$, były wyższe w porównaniu z dziećmi zdrowymi. W odniesieniu do wyników chorych rozpoczynających leczenie, pacjenci z nawrotem choroby prezentowali większy procent omawianej populacji komórek w MNC (ALL-wznowa) – 0,510% vs ALL-dgn) – 0,377%; $p \leq 0,005$), ale obserwowane wartości bezwzględne były mniejsze (ALL-wznowa) – $8,81 \times 10^3/\text{ml}$ vs ALL-dgn – $9,81 \times 10^3/\text{ml}$; $p \leq 0,005$). U chorych z drugą remisją hematologiczną stwierdzano podwyższenie KD BDCA-1⁺ względem grupy kontrolnej. U pacjentów z progresją ALL odnotowywano mniejsze wartości omawianej populacji KD w odniesieniu do dzieci zdrowych (tab. 2).

U chorych na AML po osiągnięciu remisji hematologicznej i przed rozpoczęciem LPR stwierdzono wzrost odsetka KD BDCA1⁺ w populacji MNC w porównaniu ze stanem wyjściowym, natomiast wartości liczbowe stwierdzane na tych etapach leczenia były mniejsze w odniesieniu do obserwowanych w chwili rozpoznania białaczki. U dzieci z progresją AML odnotowywano też podwyższenie omawianych KD (0,900% i $6,99 \times 10^3/\text{ml}$), podobnie jak u jednego z pacjentów z nawrotem choroby (0,620% i $13,99 \times 10^3/\text{ml}$), w porównaniu z grupą kontrolną (tab. 2).

Procent KD BDCA-1⁺ wśród komórek MNC oraz ich liczba u chorych na HD, LCAL, NHL-B były większe w czasie trwania leczenia i w okresie

1–2 miesięcy od jego zakończenia w porównaniu z dziećmi zdrowymi (tab. 3).

KD BDCA-2⁺

U dzieci zdrowych odsetek KD BDCA-2⁺ wśród MNC zawierał się w przedziale 0,280–0,670% z medianą 0,450%, natomiast wartości bezwzględne mieściły się w zakresie $3,95–39,37 \times 10^3/\text{ml}$ z medianą $10,33 \times 10^3/\text{ml}$. Procent tych komórek wśród MNC we wszystkich grupach pacjentów, niezależnie od etapu leczenia, był większy w porównaniu z grupą kontrolną.

U dzieci chorych na ALL odsetek wśród MNC i liczba KD BDCA-2⁺ wynosiły odpowiednio: w chwili rozpoznania – 0,460% i $16,12 \times 10^3/\text{ml}$, po uzyskaniu remisji hematologicznej – 0,510% i $8,31 \times 10^3/\text{ml}$, na etapie LPR – 0,550% i $6,14 \times 10^3/\text{ml}$. Podwyższenie obu wskaźników w stosunku do grupy kontrolnej stwierdzano u pacjentów z nawrotem choroby, a także u chorych, którzy osiągnęli drugą remisję oraz u dzieci z progresją ALL (tab. 2).

U chorych na AML przed rozpoczęciem leczenia i po osiągnięciu remisji stwierdzono większe wartości KD BDCA-2⁺ w porównaniu z grupą kontrolną. W przypadku rozpoznania nawrotu choroby wykazano większe wartości KD w odniesieniu do dzieci zdrowych. U chorych z progresją AML obserwowano większy procent KD BDCA2⁺ względem grupy porównawczej, choć odnotowywane wartości liczbowe były mniejsze niż u dzieci zdrowych (tab. 2).

U dzieci chorych na HD i LCAL na początku leczenia i w czasie jego trwania liczba KD BDCA-2⁺ była większa w porównaniu z grupą kontrolną. U chorych na NHL-B na etapie rozpoznania nowotworu obserwowane wartości bezwzględne wykazywały duże zróżnicowanie z medianą $9,88 \times 10^3/\text{ml}$, w czasie trwania chemioterapii były wyższe od stwierdzanych u dzieci zdrowych. W grupie pacjentów, którzy zakończyli leczenie w okresie 1–2 miesięcy od ostatniego cyklu chemioterapii, większość chorych na NHL-B i LCAL miała większe wartości KD BDCA-2⁺ w odniesieniu do grupy porównawczej; tendencji takiej nie obserwowano u dzieci leczonych z powodu HD (tab. 3).

KD BDCA-3⁺

KD BDCA-3⁺ stanowiły najmniej liczną populację KD krwi zarówno w grupie pacjentów, jak i w grupie kontrolnej. U wielu badanych nie stwierdzono ich obecności. Mediana wartości liczbowych KD BDCA-3⁺ u dzieci zdrowych wynosiła $0,70 \times 10^3/\text{ml}$ z zakresem $(0–7,66) \times 10^3/\text{ml}$, odsetek w populacji MNC zawierał się w przedziale (0–0,130%) z medianą 0,030%.

U chorych na ALL, AML, HD, LCAL i NHL-B na początku leczenia stwierdzono podwyższenie odsetka i liczby KD BDCA-3⁺ w porównaniu z grupą kontrolną. Podczas leczenia we wszystkich grupach chorych wykazano większe wartości KD BDCA-3⁺ w odniesieniu do grupy dzieci zdrowych (tab. 2 i 3).

U chorych z progresją ALL i LCAL nie stwierdzono KD BDCA-3⁺ (tab. 2 i 3).

Aktywowane KD:

CD11c⁺CD83⁺HLA-DR⁺

i CD11c⁺CD83⁺HLA-DR⁺

U dzieci zdrowych odsetek KD CD11c⁺CD83⁺HLA-DR⁺ wśród MNC zawierał się w zakresie (0–0,240%) z medianą 0,080%, wartości liczbowe mieściły się w przedziale $(0–5,89) \times 10^3/\text{ml}$ z medianą $1,84 \times 10^3/\text{ml}$. Procent KD CD11c⁺CD83⁺HLA-DR⁺ wynosił (0–0,210%) z medianą 0,105%, wyniki liczbowe natomiast przyjmowały wartości $(0–12,34) \times 10^3/\text{ml}$ z medianą $2,41 \times 10^3/\text{ml}$.

W analizowanym materiale na początku leczenia odsetek KD CD11c⁺CD83⁺HLA-DR⁺ wśród MNC u pacjentów z HD był porównywalny z grupą kontrolną, u pozostałych chorych był większy w odniesieniu do dzieci zdrowych. Podobne tendencje odnotowywano w przypadku wartości bezwzględnych.

Podwyższenie odsetka oraz liczebności omawianej populacji komórek stwierdzano także u chorych z nawrotem ALL i AML przed rozpoczęciem leczenia wznowy.

We wszystkich grupach pacjentów w czasie trwania leczenia obserwowano podwyższone wyniki KD CD11c⁺CD83⁺HLA-DR⁺ w odniesieniu do dzieci zdrowych, chociaż u chorych na ALL bezpośrednio po zakończeniu leczenia indukującego remisję wartości te były niższe w porównaniu z grupą kontrolną (0,040% i $0,65 \times 10^3/\text{ml}$ vs 0,080% i $1,84 \times 10^3/\text{ml}$). U pacjentów chorych na NHL-B i LCAL, 1–2 miesiące po ostatnim cyklu chemioterapii, utrzymywały się podwyższone wartości KD CD11c⁺CD83⁺HLA-DR⁺; tendencji takiej nie odnotowano u chorych z HD (tab. 2 i 3).

Procent w MNC i wartości bezwzględne KD CD11c⁺CD83⁺HLA-DR⁺ u chorych na ALL, AML, HD i LCAL przed rozpoczęciem leczenia były większe w odniesieniu do stwierdzanych u dzieci zdrowych; zależności takiej nie wykazano, u pacjentów chorych na NHL-B. Wyższe wyniki omawianych KD obserwowano również u chorych z nawrotem ALL lub AML.

U chorych na AML, HD, LCAL i NHL-B stwierdzano podwyższenie odsetka i wartości bezwzględnych KD CD11c⁺CD83⁺HLA-DR⁺ w czasie

leczenia w porównaniu z grupą kontrolną, tendencji takiej nie odnotowano w przypadkach ALL na etapie osiągnięcia remisji hematologicznej i przed rozpoczęciem LPR. U chorych z progresją ALL lub AML wartości omawianych KD były również większe niż u dzieci zdrowych (tab. 2 i 3).

Aktywowane limfocyty T (CD3⁺CD26⁺)

U dzieci zdrowych procent limfocytów CD3⁺CD26⁺ w ogólnej populacji limfocytów krwi obwodowej wynosił (15,97–38,29%) z medianą 27,33%, wartości bezwzględne natomiast mieściły się w zakresie $(0,35–1,90) \times 10^3/\mu\text{l}$ z medianą $0,76 \times 10^3/\mu\text{l}$.

Liczebność populacji limfocytów CD3⁺CD26⁺ u chorych na HD, LCAL na początku leczenia była mniejsza w porównaniu z grupą kontrolną. U dzieci chorych na ALL, AML i NHL-B wskaźnik ten był wyższy w odniesieniu do dzieci zdrowych. Podobnie jak w przypadku całkowitej populacji limfocytów T, liczba limfocytów CD3⁺CD26⁺ u większości dzieci z chorobą nowotworową obniżała się w miarę trwania chemioterapii. Pacjenci z nawrotem ALL i AML przed rozpoczęciem leczenia wznowy mieli mniejsze wartości omawianej populacji komórek w odniesieniu do grupy kontrolnej (tab. 4 i 5).

Ekspresja antygenu CD26 na limfocytach T zależy ściśle od ich aktywacji, w związku z tym poddano analizie udział procentowy limfocytów T CD26⁺ w całkowitej populacji limfocytów T. W przypadku grupy kontrolnej odsetek ten wynosił 39,77%, podczas gdy wartości stwierdzane u dzieci z chorobą nowotworową były znacznie wyższe, np. HD-dgn. – 50,25%, LCAL-dgn. – 57,24%, NHL-B-dgn. – 58,69% (tab. 4 i 5).

KD krwi a aktywacja limfocytów T

U dzieci z chorobą nowotworową objętych badaniami w tej pracy stwierdzono występowanie podwyższonych wartości procentowych KD w populacji komórek jednojądrzastych krwi w porównaniu z grupą kontrolną. Analiza liczebności populacji limfocytów T we wszystkich grupach pacjentów wykazała znaczny spadek ich liczby pod wpływem chemioterapii, a także obserwowane u wielu chorych występowanie ich obniżonych wartości przed rozpoczęciem leczenia. Rozpatrując jednak wzajemne relacje ilościowe, dotyczące odsetka limfocytów CD3⁺CD26⁺ w ogólnej puli limfocytów T obecnych w krążeniu, stwierdzono znacznie większe wartości tego wskaźnika u dzieci z nowotworami hematologicznymi na przestrze-

Tabela 2. Populacje KD BDCA1⁺, KD BDCA2⁺, KD BDCA3⁺ u pacjentów chorych na ALL, AML
Table 2. Population of DC BDCA1⁺, KD BDCA2⁺, KD BDCA3⁺ in patients with ALL, AML

Grupa (Group)	Etap leczenia (Stage of treatment)	Mediana – zakres (Median – range)											
		MNC		KD BDCA1+ DC BDCA1+		KD BDCA2+ DC BDCA2+		KD BDCA3+ DC BDCA3+		KD CD11c*CD83*HLA-DR+ DC CD11c*CD83*HLA-DR+		KD CD11c*CD83*HLA-DR+ DC CD11c*CD83*HLA-DR+	
		× 10 ³ kom./μl (× 10 ³ cells/μl)	%	× 10 ³ kom./ml (× 10 ³ cells/ml)	%	× 10 ³ kom./ml (× 10 ³ cells/ml)	%	× 10 ³ kom./ml (× 10 ³ cells/ml)	%	× 10 ³ kom./ml (× 10 ³ cells/ml)	%	× 10 ³ kom./ml (× 10 ³ cells/ml)	%
kontrola (control)		2,29 (1,41–5,87)	0,262 (0,130–0,331)	5,99 (1,84–19,45)	0,45 (0,280–0,670)	10,33 (3,95–39,37)	0,03 (0,000–0,130)	0,7 (0–7,66)	0,08 (0,000–0,240)	1,84 (0–5,89)	0,105 (0,000–0,210)	× 10 ³ kom./ml (× 10 ³ cells/ml)	
	ALL											2,41 (0–12,34)	
	diagnostyka (diagnostics)	3,5 (0,37–9,70)	0,377 (0,069–2,499)	9,18 (0,26–12,75)	0,46 (0,131–1,314)	16,12 (4,90–38,36)	0,039 (0,00–0,260)	1,35 (0–2,52)	0,12 (0,000–0,503)	4,23 (0–11,60)	0,452 (0,000–0,881)	15,76 (0–24,03)	
	remisja (remission)	1,63 (0,54–4,29)	0,41 (0,000–0,900)	6,68 (0–16,59)	0,51 (0,131–1,667)	8,31 (2,13–27,16)	0,06 (0,000–0,724)	0,98 (0–3,11)	0,04 (0,000–0,586)	0,65 (0–6,52)	0,066 (0,000–0,276)	0,22 (0–13,87)	
	LPR (maintenance therapy)	1,12 (0,82–4,20)	0,422 (0,131–1,092)	4,71 (0,110–23,02)	0,55 (0,123–0,932)	6,14 (1,01–46,80)	0,03 (0,00–0,539)	0,83 (0–2,26)	0,221 (0,000–0,694)	1,92 (0–14,81)	0,113 (0,000–1,121)	1,85 (0–18,93)	
AML	progresja (progression)	1,24 (0,75–1,56)	0,167 (0,090–0,245)	3,16 (1,23–5,90)	0,571 (0,182–0,861)	10,75 (2,47–20,75)	0 (0,00–0,00)	0 (0–0)	0,121 (0,021–0,224)	2,27 (0,27–5,32)	0,175 (0,051–0,307)	8,85 (4,77–17,21)	
	wznowa (relapse)	1,73 (0,88–9,89)	0,51 (0,000–0,570)	8,81 (0–48,50)	0,54 (0,090–1,760)	11,05 (0,80–17,44)	0,035 (0,00–0,112)	1,18 (0–2,13)	0,206 (0,027–0,404)	10,36 (0,27–19,78)	0,601 (0,000–1,728)	10,38 (0–16,81)	
	2 remisja (2 nd remission)	1,97 (1,29–2,65)	0,602 (0,441–0,763)	10,77 (9,83–11,70)	1,355 (0,946–1,764)	22,87 (12,27–35,68)	0,19 (0,00–0,380)	2,45 (0–4,90)	0,348 (0,111–0,586)	5,24 (2,92–7,55)	0,638 (0,504–0,772)	13,48 (6,49–20,47)	
	diagnostyka (diagnostics)	3,42 (0,31–7,91)	0,5 (0,030–0,930)	17,1 (0,49–70,10)	0,616 (0,211–1,320)	20,9 (3,39–104,80)	0,1 (0,00–0,900)	3,4 (0–7,12)	0,112 (0,000–0,610)	3,8 (0–17,91)	0,41 (0,000–0,882)	10,4 (0–19,80)	
	remisja	2,03	0,61	10,03	0,78	12,82	0,119	3,12	0,211	3,45	0,532	8,71	
	LPR (remission)	1,74 (0,26–3,03)	0,65 (0,000–0,982)	5,04 (0–29,74)	0,83 (0,219–1,986)	6,44 (0,57–60,17)	0,495 (0,000–0,134)	3,84 (0–4,06)	0,634 (0,000–0,422)	4,97 (0–12,72)	0,276 (0,000–0,931)	2,14 (0–28,17)	
	(maintenance therapy)	1,36–2,10)	0,229–0,821)	1,07–11,15)	1,000–1,270)	3,57–17,24)	0,034–0,572)	0,12–7,77)	0,190–0,798)	68–10,84)	0,067–0,283)	0,24–3,83)	
	progresja (progression)	1,1 (0,95–3,75)	0,9 (0,025–0,996)	6,99 (0,23–15,37)	0,85 (0,118–1,582)	9,35 (1,12–59,30)	0,53 (0,000–0,680)	4,83 (0–25,01)	0,753 (0,000–0,902)	3,38 (0–8,25)	0,341 (0,000–0,404)	3,47 (0–5,12)	
	wznowa (relapse)	1,13 (0,07–2,26)	0,385 (0,151–0,620)	7,5 (0,10–13,99)	0,89 (0,103–1,678)	18,93 (0,07–37,85)	0,381 (0,120–0,700)	3,39 (0,08–15,79)	0,285 (0,102–0,576)	3,71 (0,20–9,62)	0,371 (0,070–0,662)	7,49 (0,05–14,94)	
	2 remisja (2 nd remission)	0,7	0,6	4,2	0,89	4,83	0,55	3,85	0,87	3,4	0,07	0,49	

Tabela 3. Populacje KD BDCA1⁺, KD BDCA2⁺, KD BDCA3⁺ u chorych na HD, LCAL i NHL-B

Grupa (Group)	Etap leczenia (Stage of treatment)	Mediana – zakres (Median – range)												
		MNC	KD BDCA1+ DC BDCA1+		KD BDCA2+ DC BDCA2+		KD BDCA3+ DC BDCA3+		KD CD11c+CD83+HLA-DR+ DC CD11c+CD83+HLA-DR+		KD CD11c+CD83+HLA-DR+ DC CD11c+CD83+HLA-DR+			
		× 10 ³ kom./μl (× 10 ³ cells/μl)	%	× 10 ³ kom./ml (× 10 ³ cells/ml)	%	× 10 ³ kom./ml (× 10 ³ cells/ml)	%	× 10 ³ kom./ml (× 10 ³ cells/ml)	%	× 10 ³ kom./ml (× 10 ³ cells/ml)	%	× 10 ³ kom./ml (× 10 ³ cells/ml)	%	
kontrola (control)		2,29 (1,41–5,87)	0,262 (0,130–0,331)	5,99 (1,84–19,45)	0,45 (0,280–0,670)	10,33 (3,95–39,37)	0,03 (0,000–0,130)	0,7 (0–7,66)	0,08 (0,000–0,240)	1,84 (0–5,89)	0,105 (0,000–0,210)	2,41 (0–12,34)		
	HD	diagnostyka (diagnostics)	1,57 (0,68–4,42)	0,31 (0,061–2,372)	6,56 (0,41–10,48)	1,144 (0,234–3,643)	16,83 (1,59–43,29)	0,131 (0,00–0,359)	1,9 (0–3,84)	0,076 (0,000–0,936)	1,81 (0–9,86)	0,241 (0,000–1,683)	3,54 (0–3,621)	
		w czasie leczenia (during therapy)	1,38 (0,51–2,47)	0,364 (0,240–0,420)	9,34 (2,17–17,77)	0,92 (0,530–0,990)	23,61 (4,79–41,88)	0,283 (0,120–0,350)	7,26 (1,08–14,81)	0,353 (0,281–0,392)	8,56 (2,53–14,57)	0,122 (0,000–0,280)	3,08 (0–11,84)	
		koniec leczenia (end of treatment)	1,11 (0,77–1,37)	0,5 (0,147–0,980)	6,8 (1,13–19,76)	0,694 (0,471–0,839)	7,73 (3,64–11,51)	0,155 (0,152–0,729)	1,73 (1,17–10,01)	0,065 (0,000–0,142)	0,8 (0–1,94)	0,316 (0,155–0,486)	3,52 (1,20–6,68)	
LCAL		1,51 (1,09–3,28)	0,43 (0,080–0,620)	8,2 (0,87–19,10)	1,084 (0,225–1,476)	20,68 (2,77–45,47)	0,035 (0,000–0,584)	0,85 (0–18,05)	0,181 (0,000–0,473)	3,46 (0–14,58)	0,585 (0,000–1,445)	11,16 (0–14,50)		
	w czasie leczenia (during therapy)	1,26 (0,68–1,89)	0,684 (0,250–0,895)	12,91 (0,94–30,44)	1,193 (0,242–1,266)	22,64 (0,90–43,09)	0,09 (0,082–0,274)	1,71 (0,30–9,23)	0,202 (0,090–0,352)	3,84 (0,34–11,97)	0,184 (0,010–0,265)	3,42 (0,04–8,89)		
		LPR	0,42	1,11	4,66	1,402	5,89	0,061	0,25	0,351	1,47	0,091	0,38	
		koniec leczenia (end of treatment)	2,24	1,232	27,55	1,484	33,15	0,102	2,29	0,276	6,18	0,174	3,89	
	progresja (progression)	1,48	0,542	7,99	1,421	21,04	0	0	0,051	0,76	0,051	0,76		
NHL		2,04 (1,18–4,98)	0,305 (0,000–1,260)	7,32 (0–22,76)	0,484 (0,243–1,402)	9,88 (0,59–28,86)	0,106 (0,000–1,046)	2,16 (0–21,60)	0,219 (0,000–0,313)	4,47 (0–15,44)	0,111 (0,000–0,82)	2,26 (0–9,06)		
	diagnostyka (diagnostics)	1,64	0,397	7,89	0,602	10,47	0,248	5,06	0,141	3,43	0,144	3,43		
		w czasie leczenia (during therapy)	(1,34–2,15)	(0,212–0,986)	(3,46–32,87)	(0,397–1,184)	(9,65–27,50)	(0,000–0,495)	(0–9,86)	(0,032–1,540)	(0,53–12,29)	(0,032–1,010)	(0,53–26,67)	
	koniec leczenia (end of treatment)	1,63 (0,75–2,86)	0,589 (0,324–1,712)	8,21 (2,43–28,99)	0,742 (0,220–0,943)	13,45 (6,97–26,45)	0,331 (0,000–1,252)	6,77 (0–10,57)	0,41 (0,241–1,230)	4,42 (4,35–19,66)	0,4 (0,140–0,823)	9,3 (7,43–18,12)		

Tabela 4. Limfocyty CD3⁺CD26⁺. Procent limfocytów CD3⁺CD26⁺ w populacji limfocytów T u chorych na ALL i AML**Table 4.** CD3⁺CD26⁺ lymphocytes. Percentage of CD3⁺CD26⁺ lymphocytes in T-lymphocytes population in patients with ALL and AML

Grupa (Group)	Etap leczenia (Stage of treatment)	Mediana – zakres (Median – range)				
		CD3 ⁺ CD26 ⁺		limfocyty CD3 ⁺ (CD3 ⁺ lymphocytes)		% CD26 ⁺ CD3 ⁺ w populacji CD3 ⁺ (% of CD26 ⁺ CD3 ⁺ in CD3 ⁺ population)
		%	× 10 ³ kom./μl × 10 ³ cells/μl	%	× 10 ³ kom./μl × 10 ³ cells/μl	
Kontrola (Control)		27,33 (15,97–38,29)	0,76 (0,35–1,90)	64,44 (49,99–73,73)	1,67 (0,84–3,36)	39,77 (34,77–51,02)
ALL	diagnostyka (diagnostics)	35,60 (8,06–52,19)	1,03 (0,06–5,93)	64,69 (21,39–84,92)	2,03 (0,17–7,14)	57,92 (15,74–76,22)
	remisja (remission)	40,41 (21,62–68,57)	0,51 (0,17–1,87)	68,69 (51,75–83,42)	0,59 (0,36–2,31)	58,89 (34,56–92,36)
	LPR (maintenance therapy)	42,48 (17,82–59,16)	0,38 (0,24–1,25)	62,20 (53,54–74,62)	0,51 (0,40–2,31)	58,29 (30,98–95,12)
	progresja (progression)	47,88 (47,12–48,63)	0,58 (0,37–0,79)	64,27 (59,13–69,40)	0,79 (0,46–1,12)	74,88 (70,07–79,68)
	wznowa (relapse)	39,53 (20,91–61,82)	0,74 (0,20–4,99)	70,95 (48,29–72,47)	1,19 (0,41–5,49)	62,69 (29,18–90,57)
	2 remisja (2 nd remission)	35,10 (26,26–43,93)	0,47 (0,44–0,51)	74,08 (73,57–74,78)	0,95 (0,69–1,21)	58,11 (57,98–58,24)
AML	diagnostyka (diagnostics)	42,55 (36,49–52,49)	1,13 (0,23–4,09)	71,05 (60,13–81,62)	1,83 (0,36–6,36)	60,68 (53,95–77,27)
	remisja (remission)	46,01 (18,90–67,15)	0,30 (0,12–1,53)	71,04 (59,31–86,08)	0,62 (0,19–2,08)	61,61 (25,33–78,01)
	LPR (maintenance therapy)	35,67 (28,61–42,73)	0,54 (0,53–0,56)	57,21 (49,04–65,39)	0,88 (0,83–0,91)	61,84 (58,34–65,34)
	progresja (progression)	36,12 (32,45–49,81)	0,38 (0,21–1,83)	60,06 (48,91–61,24)	0,65 (0,31–2,20)	66,34 (58,41–82,93)
	wznowa (relapse)	35,99 (17,06–54,92)	0,48 (0,19–0,78)	53,66 (35,17–72,14)	0,70 (0,28–1,12)	62,92 (48,51–77,34)
	2 remisja (2 nd remission)	32,31	0,32	74,52	0,44	66,34

ni całego okresu obserwacji w porównaniu z grupą kontrolną. Zależność ta wykazywała dodatnią korelację z obserwowanymi podwyższonymi wartościami różnych populacji KD, nie stwierdzono jej jedynie w przypadku populacji aktywowanych KD u dzieci chorych na ALL po zakończeniu leczenia indukującego remisję.

Wartości KD krwi u dzieci z nawrotem oraz progresją choroby nowotworowej

W przypadku pacjentów z nawrotem ALL, przed rozpoczęciem leczenia wznowy, obserwowano większy procent analizowanych populacji KD w populacji MNC krwi, w porównaniu z dzieć-

mi zdrowymi (np. KD BDCA-1⁺ ALL-wznowa) – 0,510% vs grupa kontrolna – 0,262%) oraz podwyższenie odsetka KD BDCA-1⁺, KD BDCA-2⁺ i KD z markerami aktywacji (KD CD11c⁺CD83⁺HLA-DR⁺ i KD CD11c⁺CD83⁺HLA-DR⁺), w odniesieniu do grupy pacjentów rozpoczynających leczenie ALL (np. w przypadku KD BDCA-1⁺: ALL-wznowa) – 0,510% vs ALL-dgn. – 0,377%). Wartości liczbowe poszczególnych populacji KD u dzieci z nawrotem ALL były większe w porównaniu z grupą kontrolną, w odniesieniu natomiast do stwierdzanych w grupie chorych rozpoczynających leczenie, były różne w przypadku poszczególnych pacjentów. U dwojga dzieci z nawrotem ALL rozpoznanych w 3. i 4. miesiącu od rozpoczęcia leczenia białaczki odnotowywano na przestrzeni całego okresu obserwacji wartości KD

Tabela 5. Limfocyty CD3⁺CD26⁺. Procent limfocytów CD3⁺CD26⁺ w populacji limfocytów T u chorych na HD, LCAL i NHL-B**Table 5.** CD3⁺CD26⁺ lymphocytes. Percentage of CD3⁺CD26⁺ lymphocytes in T-lymphocytes population in patients with HD, LCAL and NHL-B

Grupa (Group)	Etap leczenia (Stage of treatment)	Mediana – zakres (Median – range)				
		CD3 ⁺ CD26 ⁺		limfocyty CD3 ⁺ (CD3 ⁺ lymphocytes)		% CD26 ⁺ CD3 ⁺ w populacji CD3 ⁺ (% of CD26 ⁺ CD3 ⁺ in CD3 ⁺ population)
		%	× 10 ³ kom./μl × 10 ³ cells/μl	%	× 10 ³ kom./μl × 10 ³ cells/μl	
Kontrola (Control)		27,33 (15,97–38,29)	0,76 (0,35–1,90)	64,44 (49,99–73,73)	1,67 (0,84–3,36)	39,77 (34,77–51,02)
HD	diagnostyka (diagnostics)	35,15 (29,58–49,28)	0,38 (0,14–1,05)	68,12 (50,07–76,18)	0,55 (0,31–2,49)	50,25 (42,12–70,20)
	remisja (remission)	36,18 (25,39–42,19)	0,44 (0,26–0,98)	64,17 (59,25–69,45)	0,77 (0,98–1,62)	56,38 (43,24–69,54)
	koniec leczenia (end of treatment)	25,18 (24,25–35,19)	0,26 (0,15–0,36)	60,39 (55,98–64,14)	0,62 (0,36–0,71)	43,32 (39,26–58,27)
LCAL	diagnostyka (diagnostics)	37,91 (20,62–47,16)	0,45 (0,07–1,52)	66,43 (49,96–78,82)	0,78 (0,24–2,54)	57,24 (31,03–60,43)
	remisja (remission)	29,11 (18,45–36,95)	0,30 (0,12–0,67)	48,63 (29,03–64,99)	0,50 (0,18–1,18)	59,86 (39,18–69,83)
	LPR (maintenance therapy)	46,50	0,17	73,98	0,27	62,86
	progresja (progression)	45,91	0,65	70,82	1,01	64,83
	koniec leczenia (end of treatment)	27,18	0,30	52,37	0,57	51,90
NHL-B	diagnostyka (diagnostics)	36,43 (22,86–40,68)	0,94 (0,56–1,12)	62,09 (54,59–63,52)	1,34 (1,09–2,40)	58,69 (36,86–73,04)
	remisja (remission)	38,78 (28,49–51,97)	0,55 (0,17–0,95)	71,08 (50,68–85,63)	0,94 (0,32–1,43)	60,04 (41,47–69,89)
	koniec leczenia (end of treatment)	38,18 (36,75–42,15)	0,56 (0,25–1,23)	69,47 (65,39–77,93)	1,11 (0,17–2,41)	55,14 (53,56–56,39)

mieszczące się w dolnej części przedziałów procentowych i liczbowych dla danego etapu leczenia ALL. Obaj pacjenci zmarli przed uzyskaniem drugiej remisji hematologicznej.

Wartości bezwzględne i procentowe poszczególnych populacji KD krwi w przypadku chorych z nawrotem AML były wyższe w odniesieniu do grupy kontrolnej. Liczba KD u pacjentów z nawrotem białaczki była niższa w porównaniu ze stwierdzoną w grupie dzieci rozpoczynających leczenie AML. U pacjenta zakwalifikowanego do badań w chwili rozpoznania pierwszego rzutu choroby obserwowano mniejsze wartości KD na poszczególnych etapach obserwacji w stosunku do odnotowywanych u chorych z korzystną odpowiedzią na leczenie.

Wartości bezwzględne KD u pacjentów z progresją ALL i AML były mniejsze od stwierdzanych u tych samych chorych na etapie rozpoczęcia obserwacji białaczki. Liczba KD krwi u tych pa-

cientów podczas diagnostyki pierwszego lub drugiego rzutu choroby była mniejsza w stosunku do obserwowanej w grupach dzieci chorych na ALL i AML rozpoczynających leczenie, które korzystnie odpowiedziały na terapię.

Wartości KD u pacjentów rozpoczynających leczenie z objawami zakażenia w badaniu fizykalnym i/lub podwyższonym stężeniem CRP

U 9 pacjentów (ALL – 6 dzieci, AML – 1 chory, LCAL – 1 pacjent, NHL-B – 1 dziecko) w czasie rozpoznania choroby nowotworowej stwierdzono w badaniu fizykalnym objawy zakażenia i/lub w badaniach dodatkowych wysokie miana CRP. Wartości KD obserwowane u tych chorych

przed rozpoczęciem leczenia przeciwnowotworowego nie różniły się istotnie od wyników pozostałych dzieci w danej grupie. Warunkiem pobrania materiału do badań na etapach kontroli odpowiedzi na leczenie był dobry stan kliniczny pacjenta i wykluczenie aktywnego zakażenia na podstawie badania fizykalnego oraz badań dodatkowych (CRP, morfologia z rozmazem, badanie ogólne moczu).

Omówienie

Interakcje między nowotworem a układem immunologicznym pacjenta mają złożony charakter. Rozwój choroby nowotworowej interferuje z mechanizmami obronnymi układu odpornościowego, a prowadzone leczenie przeciwnowotworowe pogłębia immunosupresję. Występowanie ciężkich powikłań infekcyjnych u chorych z upośledzoną odpornością jest bezpośrednim zagrożeniem życia, może wpływać też na ostateczne wyniki terapii przez powodowanie przerw w realizowanym leczeniu. Należy jednak podkreślić, że układ immunologiczny dysponuje mechanizmami efektorowymi zdolnymi do eliminacji komórek nowotworowych, co próbuje się wykorzystać w immunoterapii nowotworów i co może mieć decydujące znaczenie w kontroli choroby resztkowej [4].

U dzieci chorych na ALL, AML, HD, LCAL i NHL-B objętych analizą w przeprowadzonych badaniach stwierdzono podwyższenie wartości KD krwi: KD BDCA-1⁺, KD BDCA-2⁺, KD BDCA-3⁺ przed rozpoczęciem leczenia, szczególnie duże u chorych na ALL i AML. Podobne wyniki uzyskano w zakresie populacji KD wykazujących ekspresję markerów aktywacji: KD CD11c⁺CD83⁺HLA-DR⁺ i KD CD11c⁺CD83⁺HLA-DR⁺. Podwyższenie wartości omawianych KD dotyczyło zarówno ich liczby bezwzględnej w krwi obwodowej, jak i ich udziału procentowego w populacji MNC. We wszystkich grupach pacjentów w czasie trwania leczenia odnotowywano podwyższony odsetek poszczególnych populacji KD krwi wśród MNC w porównaniu z grupą dzieci zdrowych. Na tym etapie obserwacji krew do badań była pobierana po odnowie hematologicznej w obrębie układu granulocytarnego i płytkotwórczego, umożliwiającą rozpoczęcie kolejnego cyklu chemioterapii. Wartości liczbowe KD obserwowane w tym okresie u chorych na HD, LCAL i NHL-B były większe w odniesieniu do grupy kontrolnej i tendencje te utrzymywały się 1–2 miesiące po zakończeniu leczenia przeciwnowotworowego. W przypadku AML, po uzyskaniu remisji hematologicznej, przed rozpoczęciem konsolidacji remisji, odnotowywano większe wartości bezwzględne KD w porównaniu z dziećmi zdrowymi,

ale znacznie mniejsze w stosunku do stwierdzanych w chwili rozpoznania, co należy wiązać z silnym mielosupresyjnym działaniem stosowanego leczenia. Najmniejsza liczba KD u tych chorych była obserwowana po zakończeniu leczenia konsolidującego remisję. Podobne tendencje stwierdzono u chorych na ALL, przy czym wartości liczbowe KD na etapie osiągnięcia remisji oraz przed rozpoczęciem LPR były mniejsze niż u dzieci zdrowych, zwłaszcza w przypadku populacji aktywowanych KD CD83⁺. U dzieci chorych na ALL i AML w chwili rozpoznania nawrotu choroby obserwowano znacznie większe wartości KD w porównaniu z grupą kontrolną. W odniesieniu do wyników uzyskiwanych w grupach dzieci rozpoczynających leczenie ALL lub AML KD była mniejsza, z wyjątkiem populacji aktywowanych KD CD11c⁺CD83⁺HLA-DR⁺. U chorych z progresją ALL i AML wykazano większe wartości liczbowe KD od stwierdzanych w grupie kontrolnej, ale mniejsze niż w czasie rozpoznania choroby.

Analiza liczebności populacji limfocytów T we wszystkich grupach chorych wykazała znaczny spadek ich liczby pod wpływem chemioterapii, a także obserwowane u wielu chorych występowanie ich obniżonych wartości przed rozpoczęciem leczenia. Rozpatrując jednak wzajemne relacje ilościowe dotyczące udziału limfocytów T CD26⁺ w ogólnej puli limfocytów T w krążeniu, stwierdzono znacznie większe wartości tego wskaźnika u dzieci z nowotworami hematologicznymi na różnych etapach obserwacji w porównaniu z grupą kontrolną. Zależność ta wykazywała dodatnią korelację z obserwowanymi podwyższonymi odsetkami różnych populacji KD, nie stwierdzono jej jedynie w przypadku populacji aktywowanych KD u dzieci chorych na ALL po zakończeniu leczenia indukującego remisję. Ekspresja antygenu CD26 na limfocytach T zależy ściśle od ich aktywacji [1, 5]. Znaczną aktywację limfocytów T u chorych leczonych z powodu NHL obserwowali także Mackall et al. [6].

KD odgrywają kluczową rolę w regulacji pierwotnej i wtórnej odpowiedzi immunologicznej, stąd podwyższone wartości KD krwi stwierdzane u dzieci z chorobą nowotworową mogą świadczyć o aktywacji układu odpornościowego w odpowiedzi na istniejący proces chorobowy. KD krwi są heterogenną populacją zróżnicowaną pod względem fenotypowym i funkcjonalnym. We krwi są obecne prekursorowe KD oraz KD podlegające procesowi aktywacji pod wpływem kontaktu z antygenem oraz czynnikami stymulującymi ich dojrzewanie [1]. Podwyższenie wartości KD krwi u badanych chorych na nowotwory może być zatem wyrazem wzmożonego wytwarzania tych komórek oraz zwiększonej migracji dojrzewających

KD do obwodowych narządów chłonnych. Duże wartości KD krwi u chorych na białaczkę w chwili rozpoznania choroby lub jej nawrotu lub w przypadku braku odpowiedzi na leczenie, mogą być spowodowane obecnością komórek blastycznych w krążeniu, stwierdzanych u większości tych dzieci w ww. sytuacjach klinicznych. Trzeba zaznaczyć, że wartości KD u pacjentów z progresją oraz u większości dzieci z nawrotem choroby były mniejsze od obserwowanych u chorych na etapach rozpoznania białaczki. KD krwi u tych pacjentów w czasie diagnostyki pierwszego lub drugiego rzutu choroby przyjmowały mniejsze wartości w stosunku do stwierdzanych w grupach dzieci z ALL i AML rozpoczynających leczenie, które korzystnie odpowiadały na terapię. W wielu doniesieniach wykazano zwiększoną koncentrację KD w obrębie guza nowotworowego, wskazując na istnienie związku między liczbą KD otaczających zmianę nowotworową oraz stopniem ich dojrzałości a stadium zaawansowania choroby i rokowaniem [7]. Stan immunosupresji związany z istnieniem nowotworu oraz prowadzonym leczeniem stwarza ryzyko ciężkich powikłań infekcyjnych, dlatego u pacjentów leczonych onkologicznie, niezależnie od możliwości aktywacji KD związanej z indukcją odpowiedzi przeciwnowotworowej, do aktywacji KD może dochodzić w wyniku toczącej się reakcji zapalnej. Martwica tkanek, lipopolisacharydy ścian bakteryjnych, bakteryjne DNA, TNF- α , IL-1, zewnątrzkomórkowy ATP są czynnikami silnie pobudzającymi dojrzewanie KD [2]. Wprawdzie warunkiem pobrania krwi do badań w analizowanej grupie dzieci na etapach kontrolujących przebieg choroby było wykluczenie zakażenia na podstawie badania fizykalnego oraz badań laboratoryjnych, to nie można jednak wykluczyć istnienia miejscowej reakcji zapalnej u tych chorych. U 9 pacjentów, głównie chorych na białaczkę, w czasie rozpoznania choroby nowotworowej stwierdzono w badaniu fizykalnym objawy zakażenia i/lub w badaniach dodatkowych wysokie miano CRP. Wartości KD obserwowane u tych chorych przed rozpoczęciem leczenia przeciwnowotworowego nie różniły się istotnie od wyników pozostałych dzieci w danej grupie, co może wskazywać, że choroba nowotworowa była głównym czynnikiem determinującym wysokość uzyskanych wartości KD, choć niewątpliwie aktywacja odpowiedzi przeciwzapalnej mogła wywrzeć wpływ na ostateczne wyniki populacji KD krwi.

Innym ważnym aspektem leczenia przeciwnowotworowego opartego na wysokodawkowanej chemioterapii jest stosowanie G-CSF i GM-CSF w celu skrócenia okresu neutropenii [8]. Uważa się, że GM-CSF jest cytokiną o kluczowym znaczeniu w różnicowaniu mieloidalnych KD, co zo-

stało udokumentowane w funkcjonujących procedurach uzyskiwania KD *in vitro* z komórek CD34⁺ i monocytów krwi obwodowej [9, 10]. Arpinati et al. analizując populację KD w krwi zdrowych dawców do allo-PBSCT poddanych mobilizacji z użyciem G-CSF, w dawce 10–16 $\mu\text{g/kg}$ przez 5 dni, wykazali wzrost wartości KD u badanych, zwłaszcza populacji KD CD11c⁺ [11]. Powyższe dane mogą wskazywać, że stosowanie G-CSF lub GM-CSF w leczeniu wspomagającym chorych z granulocytopenią może także pobudzać wytwarzanie KD.

U pacjentów chorych na ALL bezpośrednio po zakończeniu leczenia indukującego remisję obserwowano małe wartości liczbowe aktywowanych KD, definiowanych jako populacja wykazująca ekspresję antygenów CD83 i HLA-DR. Fakt ten może być spowodowany stosowaniem dużych dawek glikokortykosterydów w okresie indukcji remisji (Encorton 60 mg/m^2 przez 28 dni, następnie stopniowe zmniejszanie dawek przez kolejne 9 dni do odstawienia preparatu) i pobraniem krwi do badań bezpośrednio po odstawieniu tego leku. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że glikokortykosterydy hamują różnicowanie i dojrzewanie ludzkich KD generowanych z monocytów krwi obwodowej oraz komórek macierzystych układu krwiotwórczego CD34⁺, przy czym w tym drugim przypadku hamujący wpływ nie dotyczył rozwoju komórek Langerhansa [12, 13]. Piemonti et al. wykazali, że KD różniące się z monocytów krwi obwodowej pod wpływem IL-4 i GM-CSF w obecności deksametazonu (10^{-8} mol/l) mają zdolność do rozwoju charakterystycznej dendrytycznej morfologii, wykazują jednak znaczne różnice w budowie fenotypowej i właściwościach funkcjonalnych w porównaniu z KD występujących wyłącznie w środowisku wyżej wymienionych cytokin. KD, których rozwój przebiegał w obecności deksametazonu, charakteryzowała: obniżona ekspresja cząstek kostymulujących (CD40, CD86, CD58), wzrost ekspresji receptorów zaangażowanych w proces pochłaniania Ag (DEC-205, CD32), zaburzony proces dojrzewania pod wpływem TNF- α , CD40L lub LPS, przejawiający się obniżoną ekspresją CD83, CD80, CD86, podwyższona zdolność do endocytozy oraz upośledzona funkcja prezentacji Ag i wytwarzanie wielu cytokin [12]. Podobne wyniki uzyskali Rea et al. Autorzy ci wykazali, że KD poddane aktywacji drogą CD40 w obecności deksametazonu (stężenia 10^{-8} mol/l i większe) mają obniżoną zdolność do stymulacji limfocytów CD4⁺ w kierunku odpowiedzi Th1 oraz są zdolne do wzmożonej sekrecji IL-10, w odróżnieniu od KD niepoddanych działaniu tego leku, wydzielających IL-12 w takich samych warunkach aktywacji [13]. Przedstawione

dane wskazują, że wielokierunkowe, immunosupresyjne działanie glikokortykosteroidów na przebieg odpowiedzi immunologicznej może, w dużej mierze, wynikać z ich modulującego wpływu na dojrzewanie i funkcję KD.

KD krwi są bardzo małą populacją komórek jednojądrzastych krwi. Przez wiele lat metody oceniające liczebność tej populacji były oparte na ekstrapolacji wyników uzyskanych na podstawie izolacji KD z określonej objętości krwi. Otrzymane w ten sposób wyniki zależały od techniki izolacji i kryteriów przyjętych do definiowania KD [14]. Metody te, w związku ze złożonym charakterem procedur izolacji, nie mogły mieć zastosowania w rutynowym monitorowaniu liczby KD krwi. Nie można ponadto wykluczyć wpływu stosowanych technik izolacji na fenotyp i właściwości funkcjonalne KD [3, 10]. Podstawowym problemem utrudniającym rozwój badań nad KD, szczególnie nad KD krwi, był brak swoistych markerów definiujących tę populację komórek. Do niedawna KD były charakteryzowane na podstawie braku ekspresji markerów powierzchniowych swoistych dla pozostałych populacji leukocytów (Lin^-) oraz dużej ekspresji cząstek MHC klasy I i II. Dokładniejsza charakterystyka KD jest możliwa na podstawie stwierdzenia obecności antygenów występujących na dojrzałych KD: CD83 [15], CRMF-44 [14] oraz cząstek kostymulujących CD40, CD80, CD86 [16], metody te w odniesieniu do określenia liczby KD krwi wymagały jednak aktywacji tych komórek pod wpływem krótkotrwałych, 18–24 godzinnych, hodowli. Fernalley et al. badali liczbę KD krwi u zdrowych dorosłych ochotników, definiując te komórki na podstawie ekspresji CRMF-44 (metoda wymagająca co najmniej 18-godzinnej hodowli MNC) i uzyskali wyniki wynoszące 0,42% (0,15–0,70%) w populacji komórek MNC, co odpowiadało wartościom liczbowym $10 \times 10^6/\text{l}$ ($3\text{--}17 \times 10^6/\text{l}$) [14]. Metody oparte na prowadzeniu krótkotrwałych hodowli nie mogły uwzględniać faktycznego stanu aktywacji KD krwi. Szczegółowe badania świeżo izolowanych KD krwi pozwoliły na wyodrębnienie dwóch różniących się pod względem pochodzenia i funkcji populacji KD, definiowanych na podstawie różnej ekspresji antygenów CD11c i CD123. Arpinati et al., analizując liczbę poszczególnych populacji KD krwi, na podstawie identyfikacji cząstek CD11c i CD123 (IL-3R α) na KD u 22 zdrowych dawców do allo-PBSCT przed rozpoczęciem mobilizacji G-CSF, uzyskali wyniki: KD1 (CD11c $^+$) – $11 \times 10^6/\text{l}$ ($5\text{--}25 \times 10^6/\text{l}$) oraz KD2 (CD11c $^-$) – $4,9 \times 10^6/\text{l}$ ($1,9\text{--}10,8 \times 10^6/\text{l}$). Dalsza analiza świeżo izolowanych populacji KD CD11c $^+$ i KD CD11c $^-$ prowadzona przez Dzionka et al. (2000 r.) doprowadziła do scharakteryzowania nowych markerów swo-

istych dla KD krwi: BDCA-2, BDCA-3, BDCA-4, które wraz z wcześniej poznany antygenem CD1c (BDCA-1) są podstawą do wyróżnienia trzech populacji KD krwi z uwzględnieniem ich pochodzenia oraz różnej ekspresji CD11c i CD123 [3]. Zdaniem autorów obecność tych antygenów może być wykorzystana do szybkiego wykrycia, oceny ilościowej KD krwi oraz do izolacji tych komórek. W analizowanej pracy identyfikację oraz ocenę liczebności różnych populacji KD u dzieci chorych na nowotwory hematologiczne przeprowadzono na podstawie markerów BDCA-1, BDCA-2 (BDCA-4 definiuje tę samą populację KD) oraz BDCA-3, prowadząc niezależnie od tych oznaczeń analizę populacji KD wykazujących ekspresję antygeny CD83 $^+$, swoistego dla dojrzałych KD. Podjęcie przez autorów w prowadzonej dyskusji tematu dotyczącego problemu oceny ilościowej KD krwi jest spowodowane faktem, że wyniki uzyskiwane przez różnych autorów zależą przede wszystkim od przyjętej definicji KD oraz stosowanej metody i obecnie nie można mówić o istnieniu „złotego standardu” w tej kwestii. Należy także podkreślić, że jak dotychczas ocena ilościowa KD krwi u pacjentów chorych na nowotwory nie była tematem szerszych badań.

Rozwój nowotworu jest w dużej mierze wypadkową działania mechanizmów efektorowych odpowiedzi immunologicznej skierowanych przeciwko komórkom nowotworowym a zdolnością tych komórek do „wymknięcia się” spod nadzoru układu odpornościowego [17]. Ważną rolę w obrobie przeciwnowotworowej odgrywa aktywność swoistych cytotoksycznych limfocytów T skierowanych przeciw Ag związanym z nowotworem [1]. Aktywacja limfocytów Tc wymaga ich współdziałania z KD oraz limfocytami Th [18]. Nasilenie odpowiedzi immunologicznej może prowadzić do selekcji klonów komórek nowotworowych charakteryzujących się obniżoną antygenowością. Zmniejszenie ekspresji antygenów MHC uwrażliwia te komórki na cytotoksyczne działanie komórek NK, których funkcja w znacznym stopniu podlega regulacji przez KD [2, 19]. W rozwoju odpowiedzi przeciwnowotworowej ważne znaczenie odgrywa lokalne mikrośrodowisko, w którym dochodzi do komunikacji między komórkami nowotworowymi a komórkami APC i komórkami efektorowymi odpowiedzi immunologicznej. Komórki wielu nowotworów wykazują zdolność do wytwarzania cytokin, np. IL-10, IL-6, VEGF, TGF- β , rozpuszczalnych receptorów dla cytokin sIL-2R, sTNF-R, mogą wykazywać ekspresję FasL oraz uwalniać rozpuszczalną postać tej cząstki (sFasL), wpływać na rodzaj i nasilenie odpowiedzi układu odpornościowego [20]. Wiele danych wskazuje, że stan immunosupresji związany

z rozwojem nowotworu może wynikać z hamującego wpływu komórek nowotworowych na funkcję KD. Istnieją również doniesienia o upośledzonej czynności KD u pacjentów z chorobą nowotworową [21]. W badaniach *in vitro* wykazano, że linie komórkowe raka nerki wydzielające IL-6 i M-CSF hamują różnicowanie i dojrzewanie KD z komórek progenitorowych CD34⁺ oraz upośledzają prezentację antygenów przez KD [22]. Podobne, hamujące działanie na rozwój i dojrzewanie KD wykazano w przypadku VEGF [23]. IL-10 może wpływać supresyjnie na przebieg odpowiedzi immunologicznej również na skutek upośledzonego dojrzewania KD i indukcję tolerancji [24].

W przeprowadzonych badaniach u dzieci z nowotworami hematologicznymi obserwowano podwyższone wartości KD krwi w chwili rozpoznania choroby. Świadczy to o aktywacji układu odpornościowego, przeciwstawiającej się mechanizmom generowanym przez komórki nowotworowe, umożliwiającym im ucieczkę spod nadzoru immunologicznego. Wyższe wartości procentowe KD w populacji MNC u pacjentów w okresie leczenia, w porównaniu z dziećmi zdrowymi, wskazują na wzmo-

żoną produkcję/mobilizację tych komórek, mimo ogólnego hamującego wpływu prowadzonej terapii na układ odpornościowy. Badania populacji limfocytów u chorych na nowotwory wskazują, że podstawową przyczyną obniżenia potencjału immunologicznego w czasie leczenia jest ilościowy niedobór komórek efektorowych: limfocytów T, B, komórek NK, który pociąga za sobą niedostatek ich funkcji w układzie odpornościowym. Działanie immunosupresyjne leków przeciwnowotworowych, oprócz mielosupresyjnego wpływu na szpik, polega na indukcji apoptozy w dojrzałych limfocytach, może również interferować z funkcją KD [25]. Utrzymujące się podwyższone wartości procentowe KD w populacji komórek jednojądrzastych krwi u pacjentów z korzystną odpowiedzią na leczenie, biorąc pod uwagę rolę tych komórek w regulacji pierwotnej i wtórnej odpowiedzi immunologicznej, świadczą o utrzymującym się stanie aktywacji układu odpornościowego. Fakt ten może mieć istotne znaczenie w kontroli choroby resztkowej, zwłaszcza po rekonstrukcji w obrębie poszczególnych populacji limfocytów.

Piśmiennictwo

- [1] Immunologia. Red. Gołąb J, Jakóbsiak M, Lasek W. PWN, Warszawa 2002.
- [2] **Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y J, Pulendran B, Palucka K:** Immunobiology of Dendritic Cells. *Ann Rev Immunol* 2000, 18, 767–811.
- [3] **Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J:** BDCA2, BDCA3 and BDCA4: Three Markers for Distinct Subsets of Dendritic Cells in Human Peripheral Blood. *J Immunol* 2000, 165, 6037–6046.
- [4] **Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W:** Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses *in vivo* after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 2000, 96, 3102–3108.
- [5] **Ishii T, Ohnuma K, Murakami A, Takasawa N, Kobayashi S, Dang NH, Schlossman SF, Morimoto C:** CD26-mediated signaling for T cell activation occurs in lipid rafts through its association with CD45RO. *PNAS* 2001, 98, 12138–12143.
- [6] **Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Magrath IT, Shad AT, Horowitz ME, Wexler LH, Adde MA, McClure LL, Gress RE:** Lymphocyte Depletion During Treatment With Intensive Chemotherapy for Cancer. *Blood* 1994, 84, 2221–2228.
- [7] **Ishigami S, Aikou T, Natsugoe S, Hokita S, Iwashige H, Tokushige M, Sonoda S:** Prognostic value of HLA-DR expression and Dendritic cell infiltration in gastric cancer. *Oncology (Basel)*, 1998, 55, 65–69.
- [8] **Mitchell PL, Morland B, Stevens MC, Dick G, Easlea D, Meyer LC, Pinkerton CR:** Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Established Febrile Neutropenia: A Randomized Study of Pediatric Patients. *J Clin Oncol* 2003, 15, 1163–1170.
- [9] **Ardavin C, Martinez del Hoyo G, Martin P:** Origin and differentiation of Dendritic cells. *Trends in Immunology* 2001, 22, 691–700.
- [10] **Hart DNJ:** Dendritic Cells: Unique Leukocyte Populations Which Control the Primary Immune Response. *Blood* 1997, 90, 3245–3287.
- [11] **Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C:** Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood* 2000, 95, 2484–2490.
- [12] **Piemonti L, Monti P, Allavena P, Sironi M, Soldini L, Leone BE, Socci C, Di Carlo V:** Glucocorticoids Affect Human Dendritic Cell Differentiation and Maturation. *J Immunol* 1999, 162, 6473–6481.
- [13] **Rea D, van Kooten C, van Meijgaarden KE, Ottenhoff THM, Melief CJM, Offringa R:** Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. *Blood* 2000, 95, 3162–3167.
- [14] **Fearnley DB, Whyte LF, Carnoutsos SA, Cook AH, Hart DNJ:** Monitoring Human Blood Dendritic Cell Numbers in Normal Individuals and in Stem Cell Transplantation. *Blood* 1999, 93, 728–736.
- [15] **Zhou LJ, Tender TF:** Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 1995, 154, 3821–3835.

- [16] **Banchereau J, Steinman RM:** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998, 392, 245–252.
- [17] **Chouaib S, Asselin-Paturel C, Mami-Chouaib F, Caignard A, Blay JY:** The tumor-host immune conflict: Immunosuppression, resistance and destruction. *Immunol Today* 1997, 18, 493–502.
- [18] **Wang B, Norbury CC, Greenwood R, Bennink JR, Yewdell JW, Frelinger JA:** Multiple Paths for Activation of Naive CD8 T Cells: CD4-Independent Help. *J Immunol* 2001, 167, 1283–1289.
- [19] **Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G:** Reciprocal Activating Interaction between Natural Killer Cells and Dendritic Cells. *J Exp Med* 2002, 195, 327–333.
- [20] **Buggins AGS, Lea N, Gäken J, Darling D, Farzaneh F, Mufti GJ, Hirst WJR:** Effect of Costimulation and the Microenvironment on Antigen Presentation by Leukemic Cells. *Blood* 1999, 94, 3479–3490.
- [21] **Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP, Gabrilovich DI:** Clinical Significance of Defective Dendritic Cell Differentiation in Cancer. *Clin Cancer Res* 2000, 6, 1755–1766.
- [22] **Menetrier-Caux C, Thomachot MC, Alberti L, Montmain G, Blay JY:** IL-4 Prevents the Blockade of Dendritic Cell Differentiation Induced by Tumor Cells. *Cancer Res* 2001, 61, 3096–3104.
- [23] **Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, Ran S, Kravtsov V, Nadaf S, Carbone DP:** Vascular Endothelial Growth Factor Inhibits the Development of Dendritic Cells and Dramatically Affects the Differentiation of Multiple Hematopoietic Lineages *in vivo*. *Blood* 1998, 92, 4150–4166.
- [24] **Steinbrink K, Wölfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH:** Induction of tolerance by interleukin-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 1997, 159, 4772–4780.
- [25] **Stahnke K, Fulda S, Friesen C, Strauß G, Debatin K-M:** Activation of apoptosis pathways in peripheral blood lymphocytes by *in vivo* chemotherapy. *Blood* 2001, 98, 3066–30738.

Adres do korespondencji:

Jadwiga Węclawek-Tompol
Katedra i Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii
i Hematologii Dziecięcej AM
ul. Bujwida 44
50-345 Wrocław

Praca wpłynęła do Redakcji: 29.04.2004 r.

Po recenzji: 18.02.2005 r.

Zaakceptowano do druku: 25.05.2005 r.

Received: 29.04.2004

Revised: 18.02.2005

Accepted: 25.05.2005