

IRENA KOZAK<sup>1</sup>, JADWIGA DWILEWICZ-TROJACZEK<sup>2</sup>, EWA KARAKULSKA-PRYSTUPIUK<sup>2</sup>,  
ANNA GRZEGORCZYK-JAŻWIŃSKA<sup>1</sup>, MARIA A. KRÓL<sup>2</sup>, MAGDALENA FELIKSBROT<sup>2</sup>,  
BEATA BLAJER<sup>2</sup>, RENATA GÓRSKA<sup>1</sup>

## Ocena limfocytów T, ich subpopulacji i komórek NK u pacjentów z chorobą przeszczep przeciw gospodarzowi po allogenicznym przeszczepieniu macierzystych komórek krwiotwórczych

### T-Cells and NK Cells Evaluation in Patients with Graft-Versus-Host-Disease after Allogeneic Stem Cells Transplantation

<sup>1</sup> Zakład Chorób Błony Śluzowej i Przyzębia IS AM w Warszawie

<sup>2</sup> Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych AM w Warszawie

#### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Objawy choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (GVHD) wywołują alloreaktywne limfocyty T, pochodzące z przeszczepionego szpiku, które naciekają tkanki gospodarza, wywierając w nich bezpośredni efekt cytotoksyczny.

**Cel pracy.** Ocena wartości subpopulacji limfocytów T, komórek NK oraz limfocytów B we krwi obwodowej i *in situ* w błonie śluzowej jamy ustnej u chorych na ostrą i przewlekłą GVHD.

**Materiał i metody.** Badaniem objęto 25 chorych po allogenicznym przeszczepieniu macierzystych komórek krwiotwórczych hospitalizowanych w Katedrze i Klinice Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych AM w Warszawie. U wszystkich chorych przeprowadzono badanie ogólnostomatologiczne (badanie podmiotowe i przedmiotowe) w 0, +30, +90, +180 i +360 dobie po SCT, a u osób z chorobą GVHD dodatkowo w czasie występowania zmian patologicznych na błonie śluzowej jamy ustnej. Analizy fenotypu limfocytów u pacjentów dokonano metodą cytometrii przepływowej, stosując przeciwciała monoklonalne.

**Wyniki i wnioski.** Badania wykazały wzrost liczby limfocytów CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> oraz komórek pamięci (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) i dziewiczych (CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) z krwi obwodowej u osób z ostrą postacią GVHD. Zaobserwowano korelację dodatnią między tymi komórkami a ostrą postacią GVHD. Stwierdzono odwrócenie stosunku komórek CD4<sup>+</sup> do CD8<sup>+</sup>. Nie wykazano korelacji między aGVHD a komórkami NK i poziomem limfocytów B, u chorych na cGVHD obserwowano znamienne statystycznie obniżenie komórek NK. Badania własne potwierdzają doniesienia innych autorów o roli limfocytów T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>), a także komórek dziewiczych i pamięci oraz komórek NK w etiopatogenezie GVHD. Na podstawie przeprowadzonych badań wydaje się, że również komórki NK mogą odgrywać zasadniczą rolę w patogenezie przewlekłego GVHD (**Dent. Med. Probl. 2004, 41, 4, 703–709**).

**Słowa kluczowe:** choroba przeszczep przeciw gospodarzowi, limfocyty T, komórki NK, subpopulacje limfocytów.

#### Abstract

**Background.** In graft-versus-host-disease (GVHD) donor, alloreactive T cells are believed to infiltrate host tissues, act cytotoxically and thus cause clinical signs of disease.

**Objectives.** The aim of the study was to evaluate quantitatively T-cell subsets, NK cells and B-cells in the peripheral blood and *in situ* in patients with acute and chronic GVHD.

**Material and Methods.** 25 patients after allogeneic stem cell transplantation were included in the study. In all the patients, a thorough dental examination, consisting of medical history and clinical examination, was performed on days 0, +30, +90, +180 and +360 after SCT. In patients with GVHD an additional examination was performed while pathological changes were present. A lymphocyte phenotypes analysis was carried out by means of flow cytometry, using monoclonal antibodies.

**Results and Conclusions.** A significant increase in the amount of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, memory (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) and naive (CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) cells was observed in the peripheral blood of patients with acute GVHD. A positive correlation was found between these cells and the occurrence of acute GVHD. Moreover, CD4<sup>+</sup> : CD8<sup>+</sup> ratio was reversed. No correlation was observed between acute GVHD occurrence and NK cells or B-cells level. NK cells level was statistically significantly decreased in patients with cGVHD. Obtained results confirmed other reports concerning role of T cells (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>), naive and memory cells, and NK cells in GVHD etiopathogenesis. On the basis of performed survey, it may be concluded that also NK cells may play an important role in the chronic GVHD etiopathogenesis (**Dent. Med. Probl.** 2004, 41, 4, 703–709).

**Key words:** graft-versus-host disease, T cells, NK cells, lymphocyte subsets.

Przeszczepienie szpiku kostnego (BMT – *bone marrow transplantation*) lub macierzystych komórek krwiotwórczych (SCT – *haematopoietic stem cell transplantation*) jest uznaną metodą leczenia wrodzonych zaburzeń hematopoezy oraz nowotworów wrażliwych na chemioterapię i radioterapię [1]. W pierwszym roku po alloprzeszczepie występują objawy upośledzonej odporności spowodowane działaniem wysokich dawek mieloablacyjnej chemioterapii i leczeniem immunosupresyjnym. Może w tym czasie rozwinąć się również choroba przeszczep przeciw gospodarzowi (GVHD – *graft-versus-host disease*) z uszkodzeniem błony śluzowej [2–4].

Choroba GVHD powstaje w wyniku reakcji limfocytów T dawcy, obecnych w przeszczepie, na antygeny obce, występujące u biorcy, z następowym wywołaniem uszkodzenia skóry, przewodu pokarmowego i wątroby [5, 6]. Choroba ta może występować w dwóch postaciach: ostrej (aGVHD – między 10. a 100. dniem po SCT) oraz przewlekłej (cGVHD – po 100 dniach od transplantacji).

Uważa się, że w etiopatogenezie ostrej postaci GVHD biorą udział komórki cytotoksyczne (Tc) wspólnie z rozpuszczalnymi mediatorami prozapalnymi, takimi jak IL-1 i TNF- $\alpha$ . W czasie przygotowywania do transplantacji i w okresie cytopepii po przeszczepie są uwalniane IL-1 i TNF- $\alpha$ , które zwiększają ekspresję antygenów HLA i innych cząsteczek adhezyjnych na komórkach. Dojrzałe limfocyty T dawcy, rozpoznając alloantygeny gospodarza, zostają aktywowane, proliferują oraz wydzielają IL-2 i IFN- $\gamma$ . Te ostatnie aktywują resztkowe komórki jednojądrzaste i makrofagi gospodarza do sekrecji IL-1 i TNF- $\alpha$ , co prowadzi do coraz większego uszkodzenia tkanek i uwalniania cytokin. Reakcja ta opisywana jest jako „burza cytokin” [7].

W przewlekłej postaci GVHD dochodzi do zwiększonego wytwarzania TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 i IL-6, co jest przyczyną zwiększonej proliferacji fibroblastów oraz zwiększonego wydzielania kolagenu i autoprzeciwciał [8]. Obraz kliniczny przewlekłej GVHD przypomina wielonarządową chorobę autoimmunizacyjną podobną do chorób kolagenowo-naczyniowych, takich jak: postać

układowa toczenia rumieniowatego (*systemic lupus erythematosus*), twardzina układowa (*sclerodermia*), zespół Sjögrena, *dermatomyositis* [9]. W przebiegu chorób autoimmunizacyjnych obserwuje się zwykle obniżenie odsetka komórek dziewicznych (CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) na korzyść komórek pamięci CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> [9–11].

W piśmiennictwie, poza badaniami histopatologicznymi [12, 13], nie spotkano prac na temat odsetka subpopulacji limfocytów T, komórek NK oraz limfocytów B w błonie śluzowej jamy ustnej u chorych na GVHD.

Celem pracy była ocena poziomu subpopulacji limfocytów T, komórek NK oraz limfocytów B we krwi obwodowej i *in situ* w błonie śluzowej jamy ustnej u chorych na ostrą i przewlekłą chorobę przeszczep przeciw gospodarzowi w zależności od okresu po przeszczepieniu allogenicznych macierzystych komórek krwiotwórczych i stopnia zaawansowania zmian na błonie śluzowej jamy ustnej.

## Material i metody

Badaniem objęto 25 chorych, w tym 12 kobiet i 13 mężczyzn, 18–61 lat (mediana 35 lat), hospitalizowanych w Katedrze i Klinice Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych AM w Warszawie. U chorych zastosowano allogeniczne przeszczepienie szpiku kostnego lub macierzystych komórek krwiotwórczych z krwi obwodowej (21 chorych po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych od dawcy spokrewnionego i 4 chorych od dawcy niespokrewnionego) z powodu ostrej białaczki szpikowej (4 osoby), ostrej białaczki limfoblastycznej (6 osób), przewlekłej białaczki szpikowej (7 osób), szpiczaka mnogiego (5 osób) i aplazji szpiku (3 osób). Wszyscy chorzy w ramach profilaktyki GVHD stosowali leki immunosupresyjne (cyklosporynę i metotreksat, samą cyklosporynę lub mykofenolan mofetylu, kortykoidy).

U wszystkich chorych przeprowadzono badanie ogólnostomatologiczne (badanie podmiotowe i przedmiotowe) w 0, +30, +90, +180 i +360 dobie po SCT, a u chorych z chorobą GVHD dodatkowo w czasie wystąpienia zmian patologicznych na

błonie śluzowej jamy ustnej. U wszystkich osób pobranie krwi obwodowej odbyło się w tym samym dniu co badanie kliniczne. Na podstawie obrazu klinicznego, potwierdzonego badaniem histopatologicznym, u 16 osób postawiono rozpoznanie choroby GVHD (ostrej postaci GVHD u 13 osób i przewlekłej, która przeszła z ostrej choroby lub rozwinęła się *de novo*, u 12 osób).

Do oceny ciężkości zapalenia błony śluzowej zastosowano skalę toksyczności WHO: stopień 0 – bez zmian; stopień I – mało bolesne owrzodzenia, rumień, umiarkowana suchość; stopień II – bolesne owrzodzenia, rumień, obrzęk, chory może połykać; stopień III – rumień, bolesne owrzodzenia z zaburzeniem połykania lub chory wymaga dożylnego nawodnienia lub żywienia pozajelitowego; stopień IV – ciężkie owrzodzenia wymagające profilaktycznej intubacji lub powodujące aspiracyjne zapalenie płuc.

## Oznaczanie subpopulacji limfocytów krwi obwodowej

Analizy fenotypu limfocytów u pacjentów dokonano metodą cytometrii przepływową aparatem FACS Calibur (BDIS). Do określenia fenotypu limfocytów zastosowano przeciwciała monoklonalne CD3 FITC/CD4 RPE (DAKO), CD3 FITC/CD8 RPE (DAKO), CD19 RPE (DAKO), CD3 FITC/CD16+56 PE (BDIS), CD45RO FITC/CD4 RPE, CD45RO FITC/CD8 RPE, CD4 FITC/CD45RA RPE oraz CD8 FITC/CD45RA RPE (DAKO).

## Oznaczanie subpopulacji limfocytów *in situ*

U 5 osób z przewlekłą postacią GVHD dokonano oceny subpopulacji limfocytów z błony śluzowej jamy ustnej w tym samym dniu co i z krwi obwodowej. W znieczuleniu miejscowym za pomocą aparatu Mukotom MD-10 pobrano bezkrwawo wycinek nabłonka błony śluzowej policzka, o wymiarach 2 × 3 mm. Wycinek umieszczano w roztworze PBS (*phosphate-buffered saline*). Pobrany skrawek rozdrabniano manualnie w celu uzyskania limfocytów. Następnie zawieszę komórek płukano w PBS i znakowano przeciwciałami monoklonalnymi (jak opisano wyżej).

Ocenę uzyskanych wyników dokonano za pomocą analizy korelacji R-Spearmana oraz testu Fishera do porównywania odsetek.

Projekt badawczy został zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną AM w Warszawie, a zgodę uzyskano od wszystkich pacjentów.

## Wyniki

W tabeli 1 przedstawiono korelację między liczbą limfocytów T, komórek NK i limfocytów B we krwi obwodowej a wystąpieniem ostrej lub przewlekłej postaci GVHD. Zaobserwowano znamienne statystyczną dodatnią korelację między liczbą limfocytów T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> oraz komórek pamięci (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) i dziewiczych (CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) z krwi obwodowej a ostrą postacią choroby GVHD. Stwierdzono także odwrócenie stosunku komórek CD4<sup>+</sup> do CD8<sup>+</sup> (współczynnik korelacji  $R = -0,25$ ;  $p < 0,05$ ). Nie zaobserwowano podobnych korelacji u chorych z przewlekłą postacią tej choroby. Nie stwierdzono również korelacji między ostrą postacią GVHD a liczbą komórek NK i B (tab.1). U chorych z przewlekłą postacią GVHD (cGVHD) zaobserwowano tendencję do mniejszej liczby komórek NK w poszczególnych dniach. Liczba komórek NK u chorych na GVHD obniżała się stopniowo do 180. doby od przeszczepienia komórek krwiotwórczych, podczas gdy u osób bez GVHD utrzymywała się na podobnym poziomie (ryc. 1).

**Tabela 1.** Korelacja między liczbami subpopulacji limfocytów T, komórek NK i limfocytów B we krwi obwodowej a wystąpieniem choroby aGVHD lub cGVHD

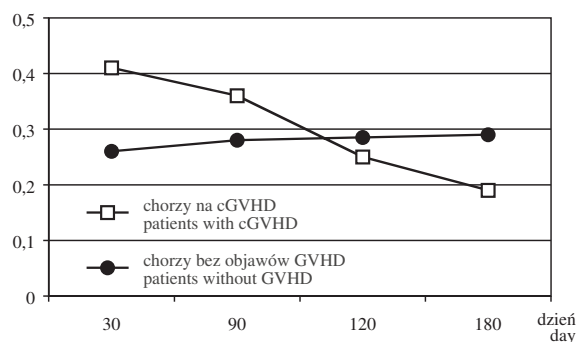
**Table 1.** Correlation between T-cell subpopulations, NK cells and B cells amounts in peripheral blood and acute or chronic GVHD

Komórki (Cells)	aGVHD			cGVHD		
	N	R	p-level	N	R	p-level
Limfocytoza (Lymphocytosis) ( $\times 10^9/l$ )	62	0,28	< 0,05	44	0,08	ns.
CD3 <sup>+</sup> ( $\times 10^9/l$ )	62	0,35	< 0,01	44	0,09	ns.
CD4 <sup>+</sup> ( $\times 10^9/l$ )	62	0,25	$\leq 0,05$	44	0,06	ns.
CD8 <sup>+</sup> ( $\times 10^9/l$ )	62	0,37	< 0,01	44	0,03	ns.
CD3-CD8 <sup>+</sup> ( $\times 10^9/l$ )	62	0,12	ns.	44	-0,24	ns.
CD3-CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> ( $\times 10^9/l$ )	57	0,09	ns.	39	-0,34	< 0,05
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> ( $\times 10^9/l$ )	58	0,26	< 0,05	39	0,09	ns.
CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> ( $\times 10^9/l$ )	57	0,48	< 0,001	39	-0,13	ns.
CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> ( $\times 10^9/l$ )	58	-0,08	ns.	39	0,02	ns.
CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> ( $\times 10^9/l$ )	58	0,28	< 0,05	39	-0,07	ns.
CD19 <sup>+</sup> ( $\times 10^9/l$ )	51	0,12	ns.	28	0,32	ns.
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	62	-0,25	< 0,05	44	-0,01	ns.

N – liczba oznaczeń u wszystkich badanych, R – współczynnik korelacji, ns. – nieznamienne statystycznie.

N – mean amount of measurements in all patients, R – correlation index, ns. – not significant.

liczba komórek NK  $\times 10^9/l$   
no. of NK cells  $\times 10^9/l$



**Ryc. 1.** Liczba komórek NK  $\times 10^9/l$  w kolejnych dniach po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych

**Fig. 1.** Number of NK cells  $\times 10^9/l$  after haematopoietic stem cell transplantation at consecutive days

W tabeli 2 przedstawiono charakterystykę 5 pacjentów z przewlekłą postacią GVHD, od których pobrano wycinek nabłonka błony śluzowej policzka, aby oznaczyć liczbę leukocytów i subpopulacji limfocytów T, komórek NK zarówno *in situ*, jak i we krwi obwodowej. Tabela 3 zawiera dane dotyczące tych komórek u osób z przewlekłą postacią choroby i różnym stopniem nasilenia zmian na błonie śluzowej jamy ustnej według skali WHO. U wszystkich chorych stwierdzono przewagę komórek cytotoksycznych ( $CD8^+$ ) nad limfocytami pomocniczymi ( $CD4^+$ ) *in situ*. Stosunek ten był  $< 1$ . U 3 osób z III stopniem według WHO stosunek ten był jeszcze niższy i wynosił  $< 0,25$ . U 4 osób stwierdzono zwiększony odsetek komórek  $CD8^+$  *in situ* w porównaniu z krwią ob-

**Tabela 2.** Charakterystyka chorych z przewlekłą postacią GVHD (cGVHD)

**Table 2.** Characteristics of patients with chronic GVHD (cGVHD)

NR chorego (Patient no)	Rozpoznanie (Diagnosis)	Wiek/płeć (Age/sex)	Zapalenie błony śluzowej jamy ustnej wg WHO u chorych na cGVHD (Mucositis in patients with cGVHD according to WHO scale)	Doba pobrania wycinka po przeszczepieniu (Day of tissue biopsy after transplantation)	Liczba leukocytów, subpopulacji limfocytów T i komórek NK we krwi obwodowej (Number of leukocytes, T cells subpopulations and NK cells in peripheral blood) ( $\times 10^9/l$ )				
					leukocyty (lymphocytes)	limfocyty (leukocytes)	$CD4^+$	$CD8^+$	NK
1	ostra białaczka szpikowa	43/K	I	1409 (46 miesięcy)	8,5	3,9	0,78	2,30	0,31
2	chłoniak płaszczka	58/M	II	169	4,7	2,3	0,32	1,59	0,32
3	ostra białaczka limfoblastyczna	23/M	III	162	6,3	1,0	0,28	0,20	0,05
4	szpiczak mnogi	36/K	III	151	5,4	1,1	0,33	0,29	0,21
5	przewlekła białaczka mielomonocytoza	51/K	III	158	6,3	1,4	0,19	0,42	–

**Tabela 3.** Odsetek subpopulacji limfocytów z krwi obwodowej i z nabłonka błony śluzowej policzka (*in situ*) u chorych z przewlekłą postacią GVHD

**Table 3.** Percentage of lymphocyte subsets in peripheral blood and buccal oral mucosa (*in situ*) in patients with chronic GVHD

Odsetek subpopulacji limfocytów z krwi obwodowej i z nabłonka błony śluzowej policzka ( <i>in situ</i> ) (Percentage of lymphocyte subpopulations in peripheral blood and buccal mucosa epithelium ( <i>in situ</i> ))	Badany wskaźnik (Assessed parameter)		Chorzy (Patients)				
			1	2	3	4	5
	z krwi obwodowej (in peripheral blood)	$CD3^+CD4^+$ $CD3^+CD8^+$ $CD3^+CD4^+CD3^+CD8^+$ $CD3^-(CD16^+CD56)^+$	20 59 <b>0.34</b> 8	14 69 <b>0.20</b> 14	28 20 <b>1.40</b> 5	30 26 <b>1.15</b> 19	14 30 <b>0.47</b> –
	z nabłonka policzka (in buccal mucosa epithelium)	$CD3^+CD4^+$ $CD3^+CD8^+$ $CD3^+CD4^+CD3^+CD8^+$ $CD3^-(CD16^+CD56)^+$	43 46 <b>0.93</b> –	25 70 <b>0.36</b> –	8 89 <b>0.09</b> 4	17 80 <b>0.21</b> 2	14 76 <b>0.18</b> –
Zapalenie błony śluzowej jamy ustnej wg skali WHO u chorych z cGVHD (Mucositis in patients with cGVHD according to WHO scale)			I	II	III	III	III



**Tabela 4.** Porównanie wystąpienia zmian na skórze oraz błonie śluzowej jamy ustnej u chorych z ostrą i przewlekłą GVHD  
**Table 4.** Comparison of occurrence of skin and oral mucosa eruptions in patients with acute and chronic GVHD

Objawy kliniczne (Clinical signs)	Grupa badanych z aGVHD (Patients with aGVHD) N = 13		Grupa badanych z cGVHD (Patients with cGVHD) N = 12		p-level test Fishera (Fisher's tests)
	liczba (no.)	%	liczba (no.)	%	
Zespół suchości (Xerodermia)	1	8	9	75	< 0,001
Łuszczenie się skóry (Skin desquamation)	10	77	10	83	ns.
Rumień plamisto-grudkowy skóry (Maculopapular erythema of the skin)	12	92	4	33	< 0,005
Przebarwienia skóry (Skin discolouration)	1	8	9	75	< 0,001
Zmiany pęcherzowe na skórze (Vesical eruptions on the skin)	5	40	1	8	ns.
Kserostomia (Xerostomia)	6	46	12	100	< 0,01
Złuszczające zapalenie warg (Desquamative cheilitis)	9	70	10	83	ns.
Zapalenie kątów warg (Angular cheilitis)	9	70	5	42	ns.
Powierzchnowe zapalenie języka (Superficial glossitis)	11	85	8	67	ns.
Rogowacenie czarne brodawek nitkowatych języka (Black hairy tongue)	2	15	2	17	ns.
Zanik brodawek nitkowatych języka (Filiform papillas atrophy)	3	23	7	58	ns.
Nadżerki i owrzodzenia (Erosions and ulcers)	8	62	4	33	ns.
Objawy rumienia wysiękowego wielopostaciowego (Erythema multiforme like signs)	3	23	3	25	ns.
Grudki liszajopodobne (Lichenoid eruptions)	0	0	4	33	< 0,05
Zaburzenia smaku (Dysgeusia)	5	39	7	58	ns.

wodową. W dwóch przypadkach z przewlekłą GVHD i III stopniem zmian na błonie śluzowej jamy ustnej zaobserwowano wielokrotnie wyższą wartość stosunku CD4<sup>+</sup> do CD8<sup>+</sup> z krwi obwodowej do wartości CD4<sup>+</sup> do CD8<sup>+</sup> w nabłonku błony śluzowej policzka. W 2 badanych przypadkach stwierdzono przewagę odsetka komórek NK (CD3<sup>+</sup>(CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) we krwi obwodowej w porównaniu do badania *in situ*. Danych tych nie oceniono statystycznie z powodu małej liczebności badanych.

W tabeli 4 przedstawiono zmiany na skórze oraz błonie śluzowej jamy ustnej u chorych z ostrą i przewlekłą postacią GVHD. Analiza wykazała istotną statystycznie różnicę między postacią ostrą i przewlekłą GVHD a wystąpieniem zespołu suchości (8% vs 75%,  $p < 0,001$ ), przebarwień skóry (8% vs 75%,  $p < 0,001$ ), objawów kserostomii (46% vs 100%,  $p < 0,01$ ) oraz zmian liszajopodobnych na błonie śluzowej jamy ustnej (0% vs 33%,  $p < 0,05$ ).

## Omówienie

Badania wielu autorów wykazały, że objawy choroby przeszczep przeciw gospodarzowi wywołują alloreaktywne limfocyty T, pochodzące z przeszczepionego szpiku, które naciekają tkanki gospodarza (skórę, przewód pokarmowy, wątrobę), wywierając w nich bezpośredni efekt cytotoksyczny [1, 5, 13]. Nie ma natomiast danych o błonie śluzowej jamy ustnej.

Przeprowadzone badania wykazały, że wzrost liczby komórek CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> w tym komórek pamięci i dziewiczych CD8<sup>+</sup> i pamięci CD4<sup>+</sup> oraz odwrócony stosunek komórek CD4<sup>+</sup> do CD8<sup>+</sup> może być związany z występowaniem ostrej postaci GVHD. Zaobserwowano korelację dodatnią między wartościami tych komórek a wystąpieniem ostrej postaci choroby. Podobne wyniki uzyskali Atkinson et al. [14] i Gratama et al. [15], co potwierdza teorię, że w etiopatogenezie ostrej postaci GVHD bardzo ważną rolę odgrywają komórki T cytotoksyczne

(Tc). Autorzy ci wykazali ponadto, że w przeciwieństwie do szybkiego spadku liczby komórek CD4<sup>+</sup>, liczba komórek CD8<sup>+</sup> jest początkowo prawidłowa, później natomiast wzrasta. Liczba komórek CD8<sup>+</sup> zwiększała się w miarę upływu czasu od SCT, ale nie udowodnili bezpośredniego związku tego stanu z wystąpieniem ostrej postaci GVHD.

W badaniach własnych nie stwierdzono korelacji między liczbą komórek NK (CD3<sup>+</sup>(CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>)) a ostrą postacią choroby. Jest to sprzeczne z wynikami badań innych autorów [12, 13], którzy sugerowali, że udział komórek Tc oraz komórek NK jest związany z bezpośrednim uszkodzeniem i wywoływaniem apoptozy komórek docelowych przez sekrecję ziaren cytoplazmatycznych, które zawierają proteiny, takie jak perforyny i białka z rodziny proteaz serynowych (granzymów). Brak korelacji między liczbą komórek NK a wystąpieniem ostrej postaci GVHD być może wynika ze zbyt małej liczebności grupy badanej. Wymaga to dalszych badań.

W przewlekłej postaci GVHD nie obserwowano zależności między komórkami CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> oraz ich stosunkiem we krwi obwodowej a chorobą. Wykazane przez Atkinsona et al. [12] zmiany we krwi obwodowej potwierdzają wyniki badań własnych *in situ* z błony śluzowej jamy ustnej, w których stwierdzono przewagę komórek cytotoksycznych CD8<sup>+</sup> nad limfocytami pomocniczymi CD4<sup>+</sup>. Stosunek ten był < 1, a u 3 osób jeszcze niższy. Na podstawie przeprowadzonych badań wydaje się, że większemu uszkodzeniu błony śluzowej jamy ustnej (III stopień według WHO) towarzyszy wzrost liczby komórek cytotoksycznych oraz niższy stosunek CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. U większości chorych (4 spośród 5) stwierdzono ponadto zwiększony odsetek komórek CD8<sup>+</sup> *in situ* w porównaniu z krwią obwodową. Wyższy odsetek komórek T CD8<sup>+</sup> *in situ* może przemawiać za bezpośrednim zaangażowaniem tej subpopulacji limfocytów w reakcje, które prowadzą do rozwoju uszkodzenia błony śluzowej. Badania *in situ* na obecność wyżej wymienionych subpopulacji limfocytów przeprowadzono po raz pierwszy.

U chorych z przewlekłą chorobą GVHD obserwowano znamienne statystycznie obniżenie liczby komórek NK. Podobne wyniki uzyskali Soiffer et al. [16]. Obniżenie liczby komórek NK u osób z przewlekłą postacią GVHD może poprzedzać wystąpienie tej choroby.

Rola komórek NK w etiopatogenezie GVHD jest przedmiotem badań wielu autorów [16, 17]. Ostatnie badania pozwalają zrozumieć nowe znaczenie tych komórek zarówno w etiopatogenezie, jak i w leczeniu GVHD. Badania na zwierzętach wykazały, że podanie komórek NK od dawcy przed przeszczepieniem może zmniejszać objawy choroby. Badania te jednak muszą być zweryfikowane

klinicznie. Jeśli podanie komórek NK ma obniżać częstość rozwoju także ostrej GVHD, to może to przeczyć ich roli w rozwoju GVHD, o czym donoszą Langley et al. [12] oraz Gilliam et al. [13].

Zmianom w układzie odpornościowym towarzyszy zapalenie błony śluzowej jamy ustnej (*mucositis*) [18]. Może występować także kserostomia oraz bolesne przełykanie (*odynophagia*). W początkowym etapie przewlekłej choroby GVHD w obrębie błony śluzowej występują plamy rumieniowe, nadżerki i owrzodzenia. Zmiany występują przeważnie na błonie śluzowej policzków i warg, a w ciężkich stanach szerzą się na zrogowaciałą błonę śluzową jamy ustnej [8, 18]. W miarę postępowania choroby w jamie ustnej pojawiają się zmiany liszajopodobne (w postaci siateczkowej i plamkowej) na błonie śluzowej policzków, warg i języka oraz rozwija się zaburzenie funkcji dużych i małych gruczołów ślinowych [9, 19, 20]. Na skutek zmniejszonej sekrecji śliny oraz zwiększonego odkładania płytki nazębnej u pacjentów powstają liczne ubytki próchnicowe [7]. Przeprowadzone badania potwierdzają obserwacje innych autorów, zwłaszcza dotyczące dysfunkcji dużych i małych gruczołów ślinowych. Wykazano bowiem statystycznie znamienne różnice występowania zespołu suchości i kserostomii między postacią ostrą i przewlekłą. W tej ostatniej znacznie częściej obserwowano zespół suchości skóry i błon śluzowych, objawy kserostomii oraz zmiany liszajopodobne na błonie śluzowej jamy ustnej. W przebiegu postaci ostrej najczęściej występowały zmiany pęcherzykowo-nadżerkowe w postaci rumienia plamkowo-grudkowego na skórze i rumienia wielopostaciowego wysiękowego w jamie ustnej. Równie często w obu grupach obserwowano złuszczone zapalenie warg, zanik brodawek nitkowatych oraz zaburzenie smaku.

Podsumowując, badania własne potwierdzają doniesienia innych autorów o roli limfocytów T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>), a także komórek dziewiczych i pamięci oraz komórek NK w etiopatogenezie GVHD [9, 14–16, 21]. Wydaje się, że również komórki NK mogą odgrywać zasadniczą rolę w etiopatogenezie przewlekłego GVHD. Zaobserwowane w materiale własnym obniżenie liczby komórek NK może poprzedzać wystąpienie przewlekłej postaci choroby. Zaobserwowane różnice w układzie odpornościowym między ostrą a przewlekłą postacią GVHD mogą wpływać na występowanie określonych zmian w obrębie skóry i błony śluzowej jamy ustnej z przewagą wykwitów rumienia plamisto-grudkowego w ostrej postaci choroby i zmian liszajopodobnych w postaci przewlekłej. Wyniki badań *in situ* mogą sugerować udział poszczególnych subpopulacji w rozwoju zmian miejscowych. Wymaga to jednak dalszych badań na większej grupie chorych.

## Piśmiennictwo

- [1] FERRARA J. L. M., DEEG H. J.: Graft-Versus-Host Disease. *N. Engl. J. Med.* 1991, 324, 667–674.
- [2] LUM L. G.: The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood* 1987, 69, 369–380.
- [3] EISEN D., ESSELL J., BROWN E. R.: Oral cavity complications of bone marrow transplantation. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 1997, 16, 265–272.
- [4] DUMONT GIRARD F., ROUX E., VAN LIER R. A., HALE G., HELD C., CHAPUIS B., STAROBINSKI M., ROOSNEK E.: Reconstitution of T-cell compartment after bone marrow transplantation: restoration of the repertoire by thymic emigrants. *Blood* 1998, 92, 4464–4471.
- [5] MICHÁLEK J., COLLONS R. H., HILL B. J., BRENCLEY J. M., DOUEK D. C.: Identification and monitoring of graft-versus-host specific T-cell clone in stem cell transplantation. *Lancet* 2003, 361, 1183–1185.
- [6] ARGIRADOU A. S., SARDELLA A., DEMAROSI F., CARRASSI A.: Gingival lesions in patient with chronic oral graft-versus-host disease: a case report. *J. Clin. Periodontol.* 2003, 30, 375–378.
- [7] ARAI S., VOGELSANG G. B.: Management of graft-versus-host disease. *Blood Rev.* 2000, 14, 190–204.
- [8] FRANÇA C. M., DOMINGUES-MARTINS M., VOLPE A., FILHO R. S. P., DE ARAÚJO N. S.: Severe oral manifestations of chronic graft-vs-host disease. *JADA* 2001, 132, 1124–1127.
- [9] BARETT A. P., BILOUS A. M.: Oral patterns of acute and chronic graft-v-host disease. *Arch. Dermatol.* 1984, 120, 1461–1465.
- [10] HEITGER A., NEU N., KERN H., PANZER-GRUMAYER E. R., GREINIX H., NACHBAUR D., NIEDERWIESER D., FINK F. M.: Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD45RA<sup>+</sup>) T-helper cell after human allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1997, 90, 850–857.
- [11] NAKAMURA S., HIROKI A., SHINOHARA M., GONDO H., OHYAMA Y., MOURI T., SASAKI M., SHIRASUNA K., HARADA M., NIHO Y.: Oral involvement in chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1996, 82, 556–563.
- [12] TABBARA I. A., ZIMMERMAN K., MORGAN C., NAHLEH Z.: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results. *Arch. Intern. Med.* 2002, 162, 1558–1571.
- [13] LANGLEY R. G. B., WALSH N., NEVILL T., THOMAS L., ROWDEN G.: Apoptosis is mode of keratinocyte death in cutaneous graft-versus-host disease. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1996, 35, 187–190.
- [14] GILLIAM A. C., WHITAKER-MENEZES D., KORNGOLD R., MURPHY G. F.: Apoptosis is the predominant form of epithelial target cell injury in acute experimental graft-versus-host disease. *J. Invest. Dermatol.* 1996, 107, 377–383.
- [15] ATKINSON K., HANSEN J. A., STORR R., GOEHLE S., GOLDSTEIN G., THOMAS E. D.: T-cell subpopulations identified by monoclonal antibodies after human marrow transplantation. I. Helper-inducer and cytotoxic suppressor subsets. *Blood* 1982, 59, 1282–1287.
- [16] GRATAMA J. W., NAIPAL A. M., OLJANS P., ZWAAN F. E., VERDONCK I. F., DE WITTE T., VOSSEN J. M., BOLHUIS R. L., DE GAST G. C., JANSEN J.: T lymphocyte repopulation and differentiation after bone marrow transplantation. Early shifts in the ratio between T4<sup>+</sup> and T8<sup>+</sup> lymphocytes correlate with the occurrence of acute graft-versus-host. *Blood* 1984, 63, 1416–1423.
- [17] SOIFFER R., GONIN R., MURRAY C., ROBERTSON M. J., COCHRAN K., CHARTIER S., CAMERON C., DALEY J., LEVINE H., NADLER L. M., RITZ J.: Prediction of graft-versus-host disease by phenotypic analysis of early immune reconstitution after CD6-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1993, 82, 2216–2223.
- [18] BARAO I., MURPHY W. J.: The immunobiology of natural killer cells and bone marrow allograft rejection. *Biol. Blood Marr. Transpl.* 2003, 9, 727–741.
- [19] SETO B. G., KIM M., WOLINSKY L., MITO R. S., CHAMPLIN R.: Oral mucositis in patients undergoing bone marrow transplantation. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1985, 60, 493–497.
- [20] DARCUK D., KNYCHALSKA-KARWAN Z., CHOMYSZYN-GAJEWSKA M.: Choroba „Przeszczep przeciw gospodarzowi” (GvHD) a jama ustna. *Por. Stomat.* 2003, 3, 28–30.
- [21] HEIMDAHL A., JOHNSON G., DANIELSSON K. H., LONNGVIST B., SUNDELIN P., RINGDEN O.: Oral condition of patients with leukemia and severe aplastic anemia. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1985, 60, 498–504.
- [22] ROUX E., HELG C., DUMONT-GIRARD F., CHAPUIS B., JEANNET M., ROOSNEK E.: Analysis of T-cell repopulation after allogeneic bone marrow transplantation: significant differences between recipient of T-cell depleted and unmanipulated grafts. *Blood* 1998, 87, 3984–3992.

## Adres do korespondencji:

Irena Kozak  
Zakład Chorób Błony Śluzowej i Przyzębia IS AM  
ul. Miodowa 18  
00-246 Warszawa  
tel./fax: +48 22 831 21 36  
e-mail: isam@polbox.com

Praca wpłynęła do Redakcji: 14.07.2004 r.  
Po recenzji: 2.08.2004 r.  
Zaakceptowano do druku: 30.08.2004 r.

Received: 14.07.2004  
Revised: 2.08.2004  
Accepted: 30.08.2004