

DONATA URBANIAK-KUJDA<sup>1</sup>, DARIUSZ WOŁOWIEC<sup>1</sup>, BEATA TOMASZEWSKA-TOPORSKA<sup>1</sup>,  
BOŻENA JAŻWIEC<sup>1</sup>, IRENA FRYDECKA<sup>1,2</sup>, KATARZYNA KAPELKO-SŁOWIK<sup>1</sup>,  
KAZIMIERZ KULICZKOWSKI<sup>1</sup>

## Wpływ krótkoterminowych hodowli blastów ostrych białaczek na ekspresję cząsteczek kostymulujących i na zdolność indukcji prolifracji autologicznych limfocytów T

### The Influence of Short Culture of Leukemic Blasts on the Expression of Co-stimulatory Molecules and the Ability to Induce the Proliferation of Autologous T Lymphocytes

<sup>1</sup> Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku AM we Wrocławiu

<sup>2</sup> Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

#### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Aktywacja autologicznych limfocytów T-cytotoksycznych indukowana przez cząsteczki kostymulujące obecne na komórkach blastycznych odgrywa ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej na antygen białaczkowy.

**Cel pracy.** Analiza ekspresji cząsteczek kostymulujących z rodziny B7: B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) na blastach pacjentów chorych na ostrą białaczkę oraz możliwość indukowania tej ekspresji w krótkotrwałych hodowlach. Oceniano również zdolność blastów białaczkowych po hodowli do indukcji proliferacji autologicznych limfocytów T.

**Materiał i metody.** Badania ekspresji cząsteczek kostymulujących oraz krótkoterminowe hodowle przeprowadzono na grupie 40 chorych na ostrą białaczkę. Ekspresję badano za pomocą przeciwciał monoklonalnych anti-CD80 i anti-CD86. Izolację limfocytów T przeprowadzono u 13 pacjentów i w tej grupie badano zdolność blastów po hodowli do indukcji proliferacji autologicznych limfocytów T w mieszanych hodowlach limfocytów i blastów. Blasty napromieniano dawką antymitotyczną 32 Gy. Prolifrację oceniano za pomocą inkorporacji tymidyny. Metodą ELISA badano również stężenie INF- $\gamma$  oraz IL-4 w nadsączach z hodowli limfocytów i blastów.

**Wyniki.** Ekspresja CD86 na blastach wynosiła od 0–93,7% i była istotnie statystycznie wyższa u pacjentów z ostrymi białaczkami szpikowymi podtypu M4 i M5 ( $p = 0,0001$ ). Ekspresja CD80 na blastach była niewykrywalna lub nie większa niż 10%. Krótkotrwałe hodowle w medium oraz w obecności daunorubicyny powodowały istotnie większy wzrost ekspresji CD80 na blastach typu M4 i M5 w stosunku do innych typów białaczek. Ekspresja CD86 po hodowli była w tej grupie wysoka, podobnie jak przed hodowlą. W 13 mieszanych hodowlach limfocytarnych efektywną stymulację (indeks stymulacji  $\geq 2$ ) obserwowano w 6 przypadkach. Wydzielanie INF- $\gamma$  powyżej poziomu hodowli niestymulowanych obserwowano w 7 przypadkach, wyższe stężenia tej cytokiny stwierdzono u pacjentów, u których wykazano wzrost ekspresji CD80 na blastach po hodowli ( $p = 0,07$ ). Nie wykryto obecności IL-4 w żadnym nadsączu.

**Wnioski.** Obserwacje potwierdzają zdolność komórek blastycznych do różnicowania w kierunku komórki profesjonalnie prezentującej antygen. Blasty po hodowli mogą stymulować proliferację autologicznych limfocytów T, a tym samym generować przeciwbiałaczkową odpowiedź immunologiczną (*Adv Clin Exp Med* 2004, 13, 4, 567–573).

**Słowa kluczowe:** cząsteczki kostymulujące, ostre białaczki, limfocyty T.

#### Abstract

**Background.** Activation of autologous cytotoxic T lymphocytes induced by co-stimulatory molecules present on blast cells plays an important role in immunological response to leukemic antigen.

**Objectives.** The aim of the study was to assess the expression of co-stimulatory molecules belonging to B-7 fami-

ly: B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on blast cells of patients with acute leukemia, and the possibility of the induction of this expression during short-term culture. The capability of the cultured leukemic blasts to stimulate the proliferation of autologous T lymphocytes was also analyzed.

**Material and Methods.** The flow cytometry analysis of the co-stimulatory molecules expression with monoclonal antibodies CD80 and CD86, and short-term cultures were performed on leukemic blasts of 40 adult patients with acute leukemia. Blast cells of 13 patients were tested for their capability to stimulate the proliferation, as assessed by  $^3\text{H}$ -T incorporation, of autologous T lymphocytes. To avoid the surestimation of the  $^3\text{H}$ -T uptake due to the proliferation of blasts themselves, blasts used for mixed lymphocyte cultures were previously irradiated by X-rays (32 Gy). IFN- $\gamma$  and IL-4 concentration in supernatants of mixed lymphocyte cultures was tested by ELISA method.

**Results.** CD86 expression on blast cells was variable and was detected on 0 to 93.7% of cells tested. The percentage of CD86-positive cells was significantly higher in patients with acute myeloid leukemia M4 and M5 as compared with other acute leukemia FAB subtypes ( $p = 0.0001$ ). The expression of CD80 was absent or detectable on less than 10% of cells tested. The authors observed an increase of CD80 expression on blasts after short term culture with and without daunorubicin, and this increase was higher on M4 and M5 blasts than on blasts of other leukemia subtypes. In this group CD86 expression after culture was high, similar to before culture. In six out of 13 mixed lymphocyte cultures the stimulation of the proliferative activity of the lymphocytes was observed (stimulation index  $\times 2$ ). IFN- $\alpha$  concentration higher than in non-stimulated cultures was stated in seven out of 13 mixed lymphocyte cultures, and was higher (on the limit of statistical significance) in the patients in whom CD80 expression on blast cells was induced after culture. IL-4 was detectable in the supernatant of no culture.

**Conclusions.** Presented observations confirm the ability of leukemic blast cell to differentiate towards the professional antigen-presenting cells. Those cells are able to stimulate the proliferation of autologous T lymphocytes and thus to drive antileukemic immunological response (*Adv Clin Exp Med* 2004, 13, 4, 567–573).

**Key words:** co-stimulatory molecules, acute leukemia, T lymphocytes.

Skuteczność chemioterapii ostrych białaczek zależy nie tylko od działania cytotoksycznego leków przeciwnowotworowych, ale także od odpowiedzi własnego układu odpornościowego na antygeny obecne na komórkach blastycznych. Aktywacja autologicznych limfocytów T wymaga prezentacji antygenu receptorom TCR (T-cell receptor) oraz interakcji tzw. cząsteczek kostymulujących, obecnych na profesjonalnych komórkach prezentujących antygen (APC – antigen presenting cells) z ich receptorami na powierzchni limfocytów T. Do najważniejszych cząsteczek kostymulujących należą białka należące do tzw. rodziny B7: B7-1 (CD80) oraz B7-2 (CD86) [1, 2]. Ich interakcja z ligandem CD28 obecnym na powierzchni limfocytów T prowadzi do proliferacji i odporności na apoptozę, połączenie natomiast z cząsteczką CTLA-4 (CD152) hamuje podział komórek T [3, 4]. Dla biologii ostrych białaczek i wyniku ich leczenia wydaje się istotna obecność cząsteczek kostymulujących, szczególnie CD86, na powierzchni komórek blastycznych. Najwyższa ekspresja CD86 występuje na komórkach ostrych białaczek szpikowych z komponentą monocytową (M4 i M5) [5]. O podobieństwie tych blastów do APC, nie tylko pod względem morfologicznym, ale i czynnościowym, świadczą obserwacje dokonane w warunkach *in vitro* i na modelach zwierzęcych, pokazujące że indukcja CD80 i CD86 na komórkach białaczkowych zwiększa ich rozpoznawanie i eliminację przez autologiczne limfocyty T [6, 7]. Mimo danych wskazujących na udział cząsteczek kostymulujących CD86, obecnych na blastach

w autologicznej odpowiedzi przeciwbiałaczkowej, znaczenie *in vivo* ich ekspresji dla wyniku leczenia choroby nie jest jasne. Nie został też jednoznacznie ustalony wpływ tych cząsteczek na aktywność podziałową autologicznych limfocytów T oraz wytwarzanie przez nie cytokin mających znaczenie w odpowiedzi przeciwnowotworowej. Nie wiadomo wreszcie, czy leki cytostatyczne wpływają na zdolność komórek blastycznych do nabycia cech profesjonalnych APC [8, 9].

Celem przedstawionych badań była ocena ekspresji CD80 i CD86 na komórkach blastycznych pacjentów z dopiero co rozpoznaną ostrą białaczką, ich zachowanie pod wpływem krótkotrwałej hodowli z dodatkiem leku przeciwnowotworowego (doksorubicyny) oraz wpływ tych blastów na aktywność podziału autologicznych limfocytów T. Zbadano również zależność między zdolnością stymulacji limfocytów T przez autologiczne komórki blastyczne pacjentów chorych na ostrą białaczkę a wynikiem leczenia indukującego remisję [10, 11].

## Materiał i metody

### Pacjenci

Badania przeprowadzono w grupie 40 pacjentów z rozpoznanymi ostrymi białaczkami. Pacjenci byli leczeni według standardowych protokołów PALG. Zestawienie danych dotyczących pacjentów przedstawiono w tabeli 1.

**Tabela 1.** Dane kliniczne pacjentów z ostrymi białaczkami szpikowymi (AML) i limfoblastycznymi (ALL)**Table 1.** Clinical data of patients with acute myelogenous leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL)

Rozpoznanie (Diagnosis)	Liczba pacjentów (Patients number)
AML; podtyp – FAB	33
M0	1
M1	4
M2	13
M3	3
M4	9
M5	3
ALL	7
Odpowiedź na leczenie (Response to treatment)	
Remisja całkowita (Complete remission)	18
Brak remisji (No remission)	15
Ocena niemożliwa (Not applicable)	7
Płeć (Gender)	
Kobiety (Female)	16
Mężczyźni (Male)	24
Wiek (Age)	
≤ 60 lat (years)	25
> 60 lat (years)	15

## Komórki

Materiałem badawczym były szpikowe komórki jednojądrzaste otrzymane przez wirowanie na gradiencie o gęstości 1,077 g/ml (Gradisol L, Polfa). Blasty stanowiły 44–98,5% populacji. W trzynastu przypadkach, gdy pozwalała na to liczba uzyskanych komórek, z populacji szpikowych komórek jednojądrzastych izolowano limfocyty T. Używano metody immunomagnetycznej i zestawów do izolacji komórek CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> (DynaL, Oslo, Norwegia). Czystość uzyskanej populacji limfocytów była nie mniejsza niż 95%.

## Hodowle komórkowe

Komórki jednojądrzaste szpiku hodowano przez 24 godziny w stężeniu  $5 \times 10^5$ /ml w RPMI1640 z dodatkiem 10% surowicy płodowej cielęcej i 100 µg/ml gentamycyny oraz w obecności lub bez 0.04 µM daunorubicyny [10, 13]. Po 24 godzinach komórki płukano przez wirowanie i sprawdzano żywotność w obecności błękitu trypanu.

Hodowane blasty, zarówno w obecności daunorubicyny, jak i bez niej naświetlano (32 Gy)

i w stężeniu  $5 \times 10^4$ /jamkę używano jako stymulatorów w mieszanych hodowlach z limfocytami T ( $1 \times 10^5$ /jamkę). Hodowle prowadzono przez 5 dni w okrągłodennych płytkach 96-dołkowych w objętości całkowitej 200 µl w RPMI1640 z 10% surowicą płodową cielęcą i gentamycyną. Wszystkie hodowle wykonywano w triplicacie. Osiemnaście godzin przed zakończeniem hodowli do jamek dodawano po 1 µCi [<sup>3</sup>H]-tymidyny i po zebraniu ich na filtry szklane oceniano jej wbudowywanie do komórek za pomocą spektrofotometru scyntylacyjnego. Indeks stymulacji (SI) liczono dla każdego eksperymentu według formuły [12]:

$$SI = \frac{cpm_{(limfocyt\ T + blasty)}}{cpm_{(limfocyt\ T)}}$$

## Wydzielanie cytokin w mieszanych hodowlach

Nadsącza z mieszanych hodowli blastów z limfocytami T gromadzono i przechowywano w temperaturze –70°C do chwili oznaczenia stężenia interferonu γ (IFN-γ) i interleukiny 4 (IL-4) metodą ELISA (Diaclon, Besanson, Francja) i według instrukcji producenta.

## Analiza cytofluorometryczna

Ekspresję cząsteczek kostymulujących CD80 i CD86 na blastach badano używając przeciwciał anty-CD80 i anty-CD86 skoniugowanych z fikoerytryną (CD80-PE, CD86-PE, Pharmingen); marker blastów (CD34, CD13, CD33 lub CD19 skoniugowane z fluoresceiną, DAKO) dobierano na podstawie najwyższej jego ekspresji w rutynowym immunofenotypowaniu panelem przeciwciał. Wybarwione komórki analizowano w cytometrze przepływowym PAS (Partec) wyposażonym w program FloMax 2.4b. W każdym przypadku wykonywano odpowiednie kontrole izotypowe (mysie IgG<sub>1</sub> FITC lub PE, IgG<sub>2a</sub>PE). Wynik wyrażano jako odsetek komórek CD80 i CD86 dodatnich w populacji blastów. Analiza cytofluorometryczna była wykonywana zarówno dla komórek świeżo wyizolowanych, jak i po 24 godzinach hodowli.

## Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano testem U Manna-Whitneya dla danych niepowiązanych i test kolejności par Wilcozona dla danych powiązanych oraz test korelacji Spearmana. Jako poziom istotności statystycznej przyjęto  $p = 0,05$ .

## Wyniki

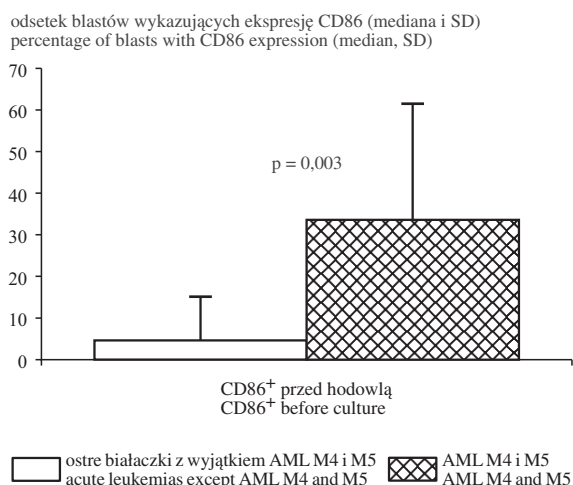
### Ekspresja cząsteczek kostymulujących na blastach ostrych białaczek

Ekspresję cząsteczek kostymulujących CD80 i CD86 oznaczono na blastach szpiku kostnego pobranego w chwili rozpoznania od 40 chorych na ostrą białaczkę. Ekspresja CD86 była stwierdzana w zakresie 0–93,7% analizowanych komórek (mediana 11,30; SD 21,83). Odsetek komórek CD86-dodatnich był istotnie wyższy u pacjentów chorych na ostrą białaczkę szpikową z komponentą monocytową (M4 i M5 według FAB) niż u pacjentów z innymi typami białaczek szpikowych oraz białaczką limfoblastyczną ( $p = 0,003$ ). Ekspresja CD80 natomiast była niewykrywalna lub nie większa niż 10% (ryc. 1).

### Wpływ 24-godzinnej hodowli blastów na ekspresję cząsteczek kostymulujących

Po ukończeniu hodowli bez dodatku daunorubicyny obserwowano istotny statystycznie wzrost ekspresji CD80 na blastach u pacjentów z podtypem M4 i M5 ostrej białaczki szpikowej, większy niż u pacjentów z innymi podtypami ostrych białaczek ( $p = 0,003$ ). Ekspresja CD86 w tej grupie była po hodowli wysoka (podobnie jak wyjściowo).

Po 24-godzinnej hodowli w obecności daunorubicyny, podobnie jak w hodowli z medium, obserwowano istotny statystycznie wzrost ekspresji CD80 większy w przypadku białaczek M4 i M5 niż u pacjentów z innymi typami ostrych białaczek ( $p = 0,0004$ ). Nie wykazano natomiast istotnej róż-



**Ryc. 1.** Ekspresja CD86 na blastach w zależności od typu ostrej białaczki

**Fig. 1.** CD86 expression on blasts in different acute leukemia subtypes

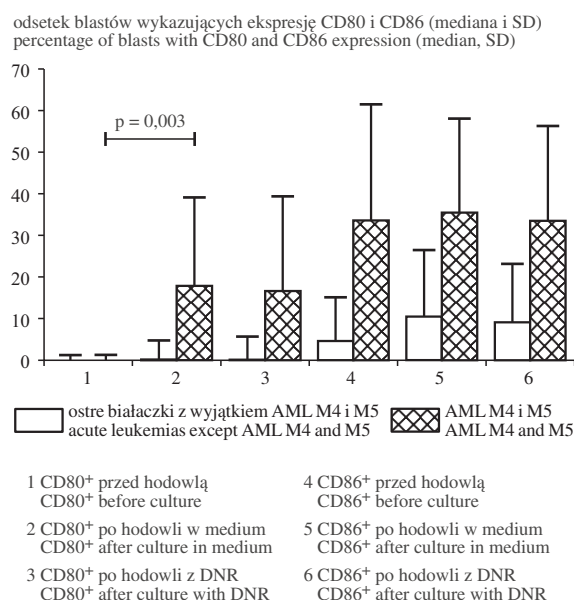
nicy w średnim odsetku komórek CD80 i CD86 między hodowlami bez daunorubicyny i w jej obecności (ryc. 2).

### Wpływ komórek jednojądrzastych szpiku na aktywność podziału autologicznych limfocytów T

U 13 pacjentów zbadano wpływ blastów szpiku po 24-godzinnej hodowli w medium bez dodatku cytostatyku i w jego obecności na aktywność podziału autologicznych limfocytów T ocenianą za pomocą inkorporacji tymidyny <sup>3</sup>H-Thd. Przyjęto, że stymulacja aktywności podziału była skuteczna, gdy indeks stymulacji był  $\geq 2$ . Taki wpływ blastów na podział limfocytów T stwierdzono u 6 pacjentów, u pozostałych natomiast stymulacja była nieskuteczna. Nie wykazano różnicy między aktywnością mitogenną blastów hodowanych w medium oraz w obecności daunorubicyny. Nie uwidoczniło się również zależności między ekspresją badanych cząsteczek kostymulujących a potencjałem mitogennym blastów ani też zależności między skutecznością stymulacji limfocytów przez autologiczne blasty w warunkach *in vitro* a wynikiem leczenia indukującego remisję.

### Wydzielanie cytokin przez limfocyty T stymulowane za pomocą autologicznych blastów

Wydzielanie IFN- $\alpha$  przez limfocyty T, uwi-  
docznione stężeniem tej cytokiny w nadsączu mie-



**Ryc. 2.** Wpływ hodowli blastów na ekspresję CD80 i CD86 w zależności od typu ostrej białaczki

**Fig. 2.** Blasts culture impact on CD80 and CD86 expression in different acute leukemia subtypes



szanej hodowli limfocytów i blastów powyżej poziomu w hodowli niestymulowanych limfocytów, wykazano u 7 spośród 13 pacjentów. Stężenie to było podobne w nadsączach hodowli w samym medium i w obecności daunorubicyny (średnio odpowiednio: 352,7 i 118,2). Wydzielanie było wyższe, na granicy istotności statystycznej, u pacjentów, u których obserwowano indukcję ekspresji cząsteczki CD80 w wyniku 24-godzinnej hodowli blastów ( $p = 0,07$ ).

W nadsączu mieszanej hodowli limfocytów i blastów u żadnego z pacjentów nie wykazano obecności IL-4 powyżej wartości w hodowlach kontrolnych.

## Omówienie

Do najistotniejszych, choć słabo poznanych procesów biologicznych determinujących skuteczność leczenia ostrych białaczek, jest wydolność własnej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom blastycznym. Wykazano w badaniach *in vitro* i *in vivo* na modelach zwierzęcych, że ekspresja tzw. cząsteczek kostymulujących (CD80 i CD86) na komórkach białaczkowych, związana z ich przynależnością do linii monocytowej, zwiększa rozpoznawanie ich przez autologiczne limfocyty T, a tym samym pobudza własną odporność przeciwnowotworową [1, 6, 10]. Nie jest jednak poznane znaczenie tego procesu dla skuteczności leczenia indukującego remisję, nie wiadomo też, czy na zdolność autologicznych limfocytów T do rozpoznawania antygenów komórek blastycznych mają wpływ cytostatyki stosowane w tym leczeniu i wykazujące też działanie immunomodulujące. Dlatego też celem niniejszych badań była ocena ekspresji cząsteczek kostymulujących CD80 i CD86 na blastach pacjentów chorych na ostre białaczki, modyfikacja ich ekspresji pod wpływem krótkoterminowej hodowli w medium i w obecności daunorubicyny oraz ich zdolność do stymulacji aktywności podziału autologicznych limfocytów T. Zgodnie z obserwacjami cytowanymi w piśmiennictwie [5, 8, 10, 14] i z wcześniej opublikowanymi badaniami własnymi [15], na blastach prawie wszystkich pacjentów wykazano obecność cząsteczki CD86, była natomiast ekspresja CD80 nieobecna lub wykrywalna jedynie na niewielkiej frakcji komórek [8]. Zgodnie z oczekiwaniami, odsetek komórek CD86-dodatnich był wyższy w białaczkach mielomonocytowych i monocytowych [6, 10]. Po 24-godzinnej hodowli blastów zarówno w środowisku daunorubicyny, jak i bez jej obecności wykazano zwiększenie ekspresji CD80 w przypadku białaczek z komponentą monocytarną, co zgodnie

z utrwalonym w piśmiennictwie poglądem [6, 10], może świadczyć o zdolności różnicowania się monoblastów w kierunku profesjonalnych APC.

Blasty około połowy zbadanych chorych wykazywały aktywność mitogenną wobec autologicznych limfocytów T, co uwidoczniło się za pomocą indeksu stymulacji obliczanego na podstawie inkorporacji *ex vivo* tymidyny  $^3\text{H-T}$  [5, 12]. Świadczyć o tym może też zwiększone, również u około połowy pacjentów, wytwarzanie IFN- $\gamma$  przez limfocyty T, uwidocznione stężeniem tej cytokiny w nadsączu mieszanej hodowli limfocytów i blastów powyżej poziomu w hodowli niestymulowanych limfocytów, co jest uważane za wskaźnik stymulacji subpopulacji limfocytów Th1 [16, 17]. Nie zaobserwowano związku między ekspresją cząsteczek kostymulujących na blastach przed lub po hodowli a ich aktywnością mitogenną wobec limfocytów wyrażoną indeksem stymulacji. Należy tu jednak zauważyć, że indeks stymulacji oparty na inkorporacji  $^3\text{H-T}$  informuje jedynie w sposób ilościowy o wielkości frakcji komórkowej aktualnie replikującej DNA, stanowiącej na ogół zaledwie kilka procent całej populacji blastów białaczkowych [18], podczas gdy synteza cytokin i innych (poza DNA) metabolitów dokonuje się w fazie G1, znacznie dłuższej niż faza S oceniana inkorporacją  $^3\text{H-T}$ . Dlatego też na uwagę zasługuje większe, na granicy istotności statystycznej, wydzielanie IFN- $\gamma$  przez limfocyty T stymulowane przez blasty wykazujące zdolność do uzyskiwania pod wpływem hodowli immunofenotypowych cech APC; zwiększenie ekspresji CD80 w stosunku do blastów nienabywających tego antygeny. Może to wskazywać, że różnicowanie się blastów do komórek wykazujących te cechy łączy się z nabywaniem przez nich zdolności stymulacji limfocytów T do wydzielania cytokin, mediatorów reakcji cytotoksycznej (IFN- $\gamma$ , IL-4). Nie wykazano, co prawda, związku między nabywaniem przez hodowane blasty cech APC a wynikiem leczenia indukującego remisję, może to jednak być związane z tym, że zaobserwowana w wyniku hodowli ewolucja immunofenotypowa blastów nie zachodzi w warunkach *in vivo*. Nie można też wykluczyć, że przeszkodą w uwidocznieniu takiego związku jest mała liczebność badanej grupy. Nie wykazano też wpływu daunorubicyny na zdolność nabywania przez blasty immunofenotypowych cech APC ani też na ich aktywność mitogenną wobec autologicznych limfocytów T. Daunorubicyna, antymitotyk nieswoisty fazowo, wykazuje wielostronne działanie na docelowe komórki, a szczególnie zmienia konformację łańcucha DNA wbudowując się między jego nici, hamuje aktywność topoisomeras i pobudza tworzenie wolnych rodników, co prowadzi do śmierci komórek nowotwo-

rowych w wyniku apoptozy [13]. Poczynione przez autorów obserwacje wskazują, że to genotoksyczne działanie daunorubicyny prawdopodobnie nie upośledza zdolności blastów do różnicowania się w kierunku APC ani ich funkcji jako potencjalnego stymulatora własnej przeciwbiałaczkowej odpowiedzi immunologicznej. Stosowanie tego cytostatyku w leczeniu ostrych białaczek nie upośledzałoby więc postulowanego udziału własnej, indukowanej przez blasty za pośrednictwem obecnych na ich powierzchni cząsteczek kostymulujących, odpowiedzi przeciwbiałaczkowej realizowanej przez limfocyty T.

Uzyskane wyniki potwierdzają zdolność komórek blastycznych ostrych białaczek szpikowych

do różnicowania się w kierunku komórek APC [6, 8, 11]. Sugerują ponadto, choć wymaga to potwierdzenia z użyciem czulszych niż inkorporacja  $^3\text{H}$ -T metod oceny stymulacji limfocytów i na większym materiale komórkowym, że nabyte w wyniku uzyskanego *in vitro* dojrzewania cząsteczki kostymulujące, są pełnowartościowe funkcjonalnie w zakresie aktywacji limfocytów T. Nasze obserwacje wskazują wreszcie, że użycie antracyklin w leczeniu ostrych białaczek nie upośledza autologicznej odpowiedzi przeciwbiałaczkowej angażującej własne limfocyty T i cząsteczki kostymulujące obecne na blastach szczególnie wywodzących się z linii monocytowej.

## Piśmiennictwo

- [1] Buggins AGS, Lea N, Gaken 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.
- [2] Chambers CA, Allison JP: Costimulatory regulation of T cell function. *Curr Opin Cell Biol* 1999, 11, 203–210.
- [3] Boćko D, Kosmaczewska A, Ciszak L, Teodorowska R, Frydecka I: CD28 Costimulatory Molecule – Expression, Structure and Function. *Arch Immunol Ther Exp* 2002, 50, 169–177.
- [4] Kosmaczewska A, Ciszak L, Boćko D, Frydecka I: Expression and Functional Significance of CTLA-4, a Negative Regulator of T Cell Activation. *Arch Immunol Ther Exp* 2001, 49, 39–46.
- [5] Bruserud O: Acute myelogenous leukemia blasts as accessory cells during T lymphocyte activation: possible implications for future therapeutic strategies. *Leukemia* 1999, 13, 1175–1187.
- [6] Charbonnier A, Gaugler B, Sainty D, Lafage-Pochitaloff M, Olive D: Human acute myeloblastic leukemia cells differentiate *in vitro* into mature dendritic cells and induce the differentiation of cytotoxic T cells against autologous leukemias. *Eur J Immunol* 1999, 29, 2567–2578.
- [7] Harrison B D, Adams J A, Briggs M, Brereton M L, Liu Yin J A: Stimulation of autologous proliferative and cytotoxic T-cell responses by “leukemic dendritic celle” derived from cells in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001, 97, 2764–2771.
- [8] Hicks Ch, Keoshkerian E, Gaudry L, Lindeman R: CD80 (B7-1) expression on human acute myeloid leukemic cells cultured with GM-CSF, IL-3 and IL-6. *Cancer Immunol Immunother* 2001, 50, 173–180.
- [9] Narita M, Takahashi M, Liu A, Nikkuni K, Furukawa T, Toba K, Koyama S, Takai K, Sanada M, Aizawa Y: Leukemia blast-induced T-cell anergy demonstrated by leukemia-derived dendritic cells in acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 2001, 29, 709–719.
- [10] Brouwer RE, Zwinderman KH, Kluin-Nelemans HC, van Luxemburg-Heijs SAP, Willemze R, Falkenburg JHF: Expression and induction of costimulatory and adhesion molecules on acute myeloid leukemic cells: Implications for adoptive immunotherapy. *Exp Hematol* 2000, 28, 161–168.
- [11] Brouwer RE, Hoorn M, Kluin-Nelemans HC, Zelderen-Bhola S, Willemze R, Falkenburg JHF: The generation of dendritic-like cells with increased allostimulatory function from acute myeloid leukemia cells of various FAB subclasses. *Hum Immunol* 2000, 61, 565–574.
- [12] Cardoso AA, Seamon MJ, Afonso SH M, Ghia P, Boussiotis VA, Freeman GJ, Gribben JG, Sallan SE, Nadler LM: *Ex vivo* generation of human anti-pre-B leukemia-specific autologous cytolytic T cells. *Blood* 1997, 90, 549–561.
- [13] Knaust E, Porwit-MacDonald A, Gruber A, Xu D, Peterson C: Heterogeneity of isolated mononuclear cells from patients with acute myeloid leukemia affects cellular accumulation and efflux of daunorubicin. *Haematologica* 2000, 85, 124–132.
- [14] Whiteway A, Corbett T, Anderson R, Macdonald I, Prentice G H: Expression of co-stimulatory molecules on acute myeloid leukaemia blasts may effect duration of first remission. *Br J Haematol* 2003, 120, 442–451.
- [15] Tomaszewska-Toporska B, Urbaniak-Kujda D, Wołowiec D, Jaźwiec B, Kapelko-Słowik K, Mędraś E, Frydecka I, Kuliczowski K: Ekspresja cząstek kostymulujących na komórkach blastycznych szpiku w ostrych białaczkach. *Acta Haematol Pol* 2003, 34, 201–209.
- [16] Matulonis U, Dosiou Ch, Freeman G, Lamont C, Mauch P, Nadler Lee M, Griffin James D: B7-1 is superior to B7-2 costimulation in the induction and maintenance of T cell-mediated antileukemia immunity. *J Immunol* 1996, 156, 1126–1131.
- [17] Levine B L, Bernstein W B, Connors M, Craighead N, Lindsten T, Thompson C B, June C H: Effect of CD28 costimulation on long-term proliferation of CD4+ T cell in the absence of exogenous feeder cells. *J Immunol* 1997, 159, 5921–5930.
- [18] Wołowiec D, Ffrench M, Tigaud J-D, Treille-Ritouet D, Archimbaud E, Bryon P-A: DNA, RNA and protein content in adult acute myeloid leukemia: effects of cytostatic drugs *in vivo*. *Leukemia* 1988, 2, 534–539.

**Adres do korespondencji:**

Donata Urbaniak-Kujda  
Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku AM  
Wybrzeże L. Pasteura 4  
50-637 Wrocław

Praca wpłynęła do Redakcji: 10.02.2004 r.

Po recenzji: 23.03.2004 r.

Zaakceptowano do druku: 23.03.2004 r.

Received: 10.02.2004

Revised: 23.03.2004

Accepted: 23.03.2004