

©Borgis

Olga Michoń¹, Agata Szela^{1,2}, Łukasz Sędek¹, Joanna Balsa¹, Maria Szczepańska³, Aleksander Matyl¹, Piotr Adamczyk³, Renata Tomaszewska¹, Alicja Sonsala¹, Bogdan Mazur⁴, *Tomasz Szczepański¹

Subpopulacje limfocytów B u dzieci po zakończeniu leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej

B lymphocyte subpopulations in children after treatment of acute lymphoblastic leukemia

¹Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Dziecięcej, Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Szczepański

²Oddział Pediatryczny, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Najświętszej Maryi Panny w Częstochowie
Kierownik Oddziału: lek. med. Edward Madyś

³Katedra i Klinika Pediatrii, Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Katarzyna Ziara

⁴Katedra Mikrobiologii i Immunologii, Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
P.o. Kierownika Katedry: dr hab. med. Zenona Czuba, prof. nadzw. SUM

Słowa kluczowe

limfocyty B, ostra białaczka limfoblastyczna, subpopulacje limfocytów B, dzieci

Keywords

B lymphocytes, acute lymphoblastic leukemia, B-cell subpopulations, children

Konflikt interesów Conflict of interest

Brak konfliktu interesów
None

Adres/address:

*Tomasz Szczepański
Katedra i Klinika Pediatrii,
Hematologii i Onkologii Dziecięcej SUM
ul. 3 Maja 13/15, 41-800 Zabrze
tel./fax +48 (32) 273-60-75
szczep57@poczta.onet.pl

Streszczenie

Wstęp. Wskutek intensywnej chemioterapii stosowanej w ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL) dochodzi do zaburzeń układu odpornościowego. Regeneracja po terapii rozpoczyna się już 3-6 miesięcy po zakończeniu leczenia.

Cel pracy. Celem pracy była ocena wartości bezwzględnych i procentowych subpopulacji limfocytów B u dzieci po leczeniu ALL w zależności od czasu od zakończenia terapii i w porównaniu z populacją dzieci zdrowych.

Materiał i metody. Badaną grupę chorych stanowiło 37 pacjentów po zakończeniu leczenia ALL (21 chłopców i 16 dziewczynek). Grupa kontrolna składała się z 41 zdrowych dzieci (25 chłopców i 16 dziewczynek). Analizy subpopulacji limfocytów B dokonano za pomocą odpowiednio dobranych 6-kolorowych kombinacji specyficznych przeciwciał monoklonalnych w cytometrze przepływowym BD FACSCanto.

Wyniki. Zarówno wartości bezwzględne, jak i procentowe większości subpopulacji limfocytów B za wyjątkiem subpopulacji z antygenem CD10+ (folikularne limfocyty B) oraz subpopulacji IgM+IgD+ wykazywały znamienne statystycznie niższe wartości u dzieci po zakończeniu leczenia ALL w porównaniu z grupą dzieci zdrowych. Liczba limfocytów B i ich odsetek w grupie dzieci < 3 lat od zakończenia leczenia ALL były znamienne statystycznie wyższe w porównaniu do grupy pacjentów > 3 lat od zakończenia leczenia. Różnice te nie były znamienne dla większości subpopulacji limfocytów B.

Wnioski. Wyniki przedstawionych badań wskazują na największą odnowę układu immunologicznego w krótkim czasie po zakończeniu leczenia ALL. Całkowita liczba limfocytów B i ich poszczególnych subpopulacji w grupie badanej były znamienne niższe w porównaniu z grupą dzieci zdrowych, choć w większości wartości te kształtowały się w okolicy dolnej granicy normy. Potwierdza to wpływ choroby podstawowej i toksyczności stosowanych leków na układ odpornościowy.

S u m m a r y

Introduction. Intensive chemotherapy of acute lymphoblastic leukemia (ALL) is associated with immunodeficiency. Immune recovery begins 3-6 months after treatment completion.

Aim. The study aimed at evaluation of absolute and relative counts of B lymphocytes and B-cell subsets in children after treatment of ALL with regard to time from chemotherapy completion and compared with the group of healthy children.

Material and methods. The study group consisted of 37 patients cured from ALL (21 boys and 16 girls). The control group consisted of 41 age-matched healthy children (25 boys and 16 girls). The detailed analysis of B lymphocyte subpopulations was performed using several suitable 6-color combinations of monoclonal antibodies using BD FACSCanto flow cytometer.

Results. Both relative and absolute numbers of most B-cell subsets (except for CD10+ follicular B-cells and IgM+ IgD+ B-cell subset) were significantly lower in children post ALL treatment as compared to healthy counterparts. The total B-cell numbers and percentages were significantly higher in children that finished the treatment < 3 years as compared to those who were > 3 years from treatment completion. This difference was not statistically significant for most B-cell subsets.

Conclusions. The study reflects recovery of immune system after ALL treatment, which was the most intense shortly after chemotherapy completion. Although the total B-cell numbers and most B-cell subset counts were within normal range, they were significantly lower in children post ALL treatment as compared to healthy controls. The study confirms the long-term influence of ALL and anti-leukemic chemotherapy on the immune status.

WSTĘP

Układ odpornościowy człowieka nadzoruje przebieg procesów immunologicznych oraz zapewnia homeostazę ustroju (1). Odporność swoistą organizmu stanowi odporność humoralna i komórkowa. Za główną składową odpowiedzi humoralnej uznaje się limfocyty B, mające zadanie rozpoznawania antygenów i produkcji swoistych przeciwciał. Znaczną rolę w produkcji przeciwciał odgrywa wieloetapowy proces dojrzewania limfocytów B rozpoczynający się w szpiku kostnym, a kontynuowany w ośrodkach rozmnażania obwodowych narządów limfatycznych, takich jak śledziona i węzły chłonne. Znajduje to odzwierciedlenie zarówno w składzie odsetkowym, jak i liczbie bezwzględnej limfocytów B w zależności od wieku dziecka (2-4). Poszczególne subpopulacje limfocytów B na różnych szczeblach rozwoju wykrywane są we krwi obwodowej, oznaczając ekspresję szeregu antygenów powierzchniowych metodą cytometrii przepływową (5, 6).

Na zmiany zachodzące w układzie immunologicznym mają istotny wpływ m.in. czynniki chorobotwórcze: infekcyjne (bakteryjne, wirusowe), choroby autoimmunizacyjne i nowotworowe.

Najczęstszą chorobą nowotworową wieku dziecięcego jest ostra białaczka limfoblastyczna (ang. *acute lymphoblastic leukemia* – ALL). Obecnie dzięki intensywnej, wielolekowej chemioterapii, ściśle dopasowanej do agresywności choroby, osiągnięto powyżej 80% całkowitych wyleczeń. Niemniej jednak wskutek zastosowanego wieloetapowego leczenia choroby podstawowej oraz występujących poważnych powikłań dochodzi do zaburzeń układu odpornościowego zarówno odpowiedzi T-, jak i B-komórkowej (7-12). Immunosupresyjny wpływ chemioterapii obserwuje się nie tylko w fazie intensywnej, ale także w trakcie leczenia podtrzymującego remisję. Zdaniem wielu autorów regeneracja układu immunologicznego po zakończeniu leczenia ALL rozpoczyna się dość szybko, nawet w ciągu 3-6 miesięcy, jednak opublikowano niewiele doniesień dotyczących tempa długotrwałej odbudowy poszczególnych subpopulacji limfocytów, zwłaszcza limfocytów B (13-15).

CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było oszacowanie wartości bezwzględnych subpopulacji limfocytów B oraz ich

wartości odsetkowych u dzieci po zakończeniu leczenia ALL w zależności od czasokresu od zakończenia leczenia oraz ich porównanie z wynikami w populacji dzieci zdrowych, przy wykorzystaniu 6-kolorowej cytometrii przepływowej.

MATERIAŁ I METODY

Badaną grupę chorych stanowiło 37 pacjentów po zakończeniu leczenia ALL (21 chłopców i 16 dziewczynek, średnia wieku: 12,2 roku). Grupa kontrolna składała się z 41 zdrowych dzieci (25 chłopców i 16 dziewczynek, średnia wieku: 12,5 roku) (16). Analizę subpopulacji limfocytów B przeprowadzono przy pomocy cytometru przepływowego BD FACSCanto, wykorzystując program komputerowy DIVA (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Analizowaną populację dzieci chorych podzielono na dwie grupy w zależności od czasu od zakończenia leczenia (I grupa: czas od zakończenia leczenia < 3 lat, II grupa: czas od zakończenia leczenia > 3 lat). W I grupie znajdowało się 18 dzieci (średnia wieku 9,8 roku), a w II grupie 16 dzieci (średnia wieku 14,5 roku). Pacjenci byli leczeni obowiązkowymi w ośrodkach Polskiej Pediatricznej Grupy ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków na przestrzeni lat kolejnymi protokołami chemioterapii BFM'90 dla SRG i MRG, Nowy York, ALL-IC BFM 2002 dla grup SRG, IRG i HRG. Żaden z pacjentów nie był poddawany procedurze przeszczepienia hematopoetycznych komórek macierzystych.

Badanym materiałem była krew obwodowa w/w pacjentów (2 ml), pobierana na antykoagulant (niefrakcjonowana heparyna) i analizowana w czasie do 4 godzin od momentu pobrania. Kryterium wyłączającym pacjentów z badania była ostra infekcja u dziecka w dniu pobrania krwi do badań. Poszczególne subpopulacje limfocytów B określano zestawem siedmiu kombinacji przeciwciał monoklonalnych, zgodnie ze standardowym protokołem barwienia (16). Przykładowy obraz cytometryczny subpopulacji limfocytów B przedstawia rycina 1.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego (zgoda KNW-6501-16/08).

W analizie statystycznej, właściwe porównanie wartości bezwzględnych i procentowych poszczególnych subpopulacji limfocytów w grupach badanej i kontro-

Inej dokonano za pomocą testu U Manna-Whitneya, natomiast w celu określenia determinującego, istotnego statystycznie parametru (wiek w momencie badania czy czas od zakończenia leczenia) w grupie dzieci chorych użyto testu ANCOVA. Za poziom znamienności statystycznej przyjęto $p < 0,05$.

WYNIKI

Wartości bezwzględne oraz odsetkowe limfocytów B i ich poszczególnych subpopulacji u dzieci po zakończeniu leczenia ALL oraz w grupie kontrolnej dzieci zdrowych zostały przedstawione w tabelach 1-4.

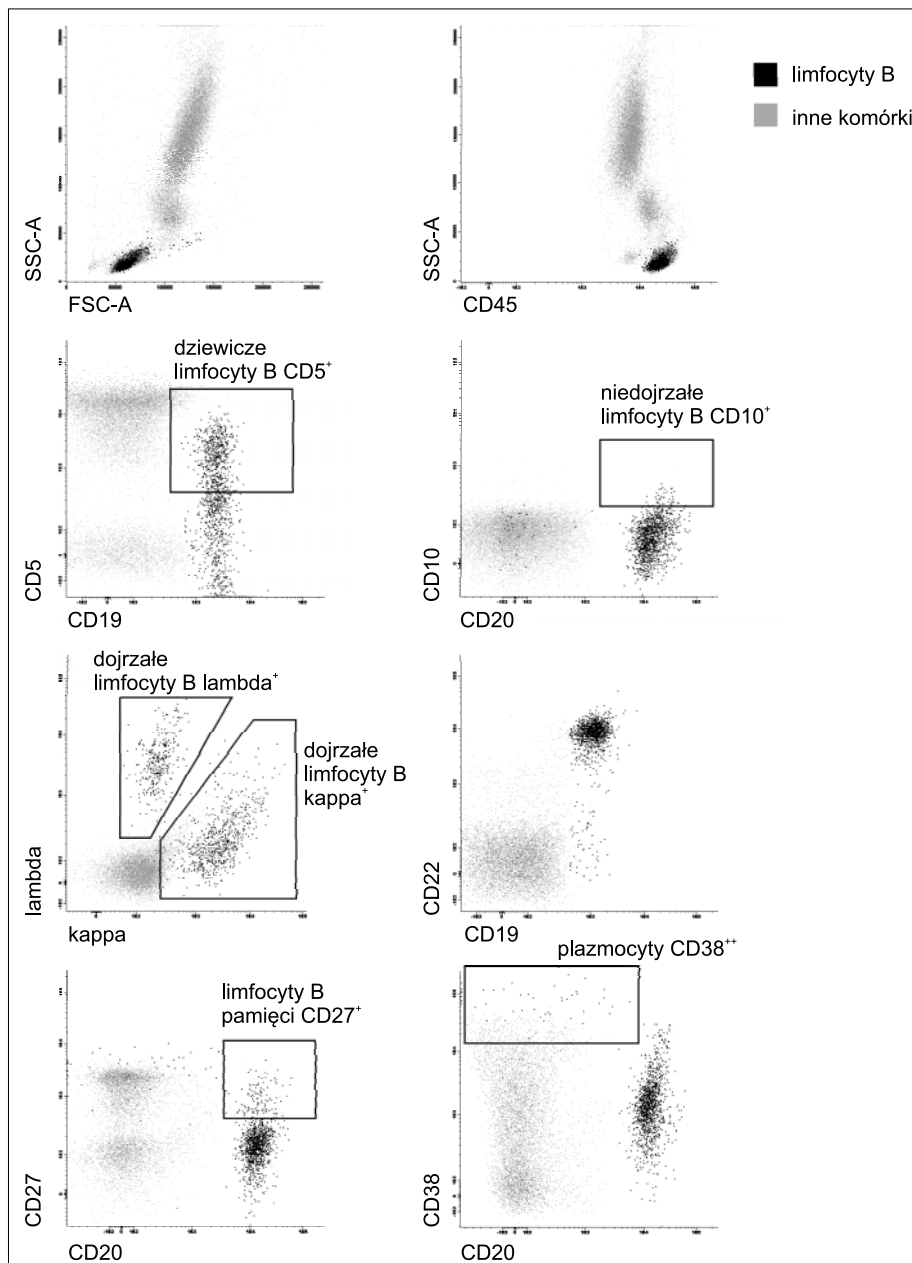
Zarówno wartości bezwzględne, jak i procentowe większości subpopulacji limfocytów B (za wyjątkiem subpopulacji z antygenem CD10+ (folikularne limfocyty B) oraz subpopulacji IgM+IgD+ z powierzchniowymi immunoglobulinami wykazywały znamienne

statystycznie niższe wartości u dzieci po zakończeniu leczenia ALL w porównaniu z grupą dzieci zdrowych (tab. 1, 2).

Liczba limfocytów B i ich odsetek w grupie dzieci < 3 lat od zakończenia leczenia ALL były znamienne statystycznie wyższe w porównaniu do grupy pacjentów > 3 lat od zakończenia leczenia. Różnice te nie były znamienne dla większości subpopulacji limfocytów B (tab. 3, 4).

Zmienność liczbowa poszczególnych subpopulacji limfocytów B jest największa w pierwszych miesiącach po zakończeniu leczenia ALL. W grupie dzieci po zakończeniu leczenia ALL, badając korelacje z wiekiem, istotność statystyczną uzyskano dla subpopulacji CD5+ i CD38+.

Na podstawie analizy statystycznej ANCOVA wykazano, iż prawdziwie determinującym parametrem



Ryc. 1. Wybrane subpopulacje limfocytów B – obrazy z badania cytometrycznego

Tab. 1. Liczba limfocytów B i wybranych subpopulacji limfocytów B we krwi obwodowej u dzieci po zakończeniu leczenia ALL w porównaniu do dzieci zdrowych

Analizowane subpopulacje limfocytów B	Grupa dzieci po zakończeniu leczenia [G/l]	Grupa kontrolna – dzieci zdrowe [G/l]	p
Leukocyty	5,9 ± 1,57	8,03 ± 3,25	< 0,001
Limfocyty	2,70 ± 0,85	2,92 ± 1,97	0,87
Limfocyty B	0,20 ± 0,13	0,49 ± 0,45	< 0,001
Limfocyty B CD5+	0,17 ± 0,11	0,38 ± 0,36	< 0,001
Limfocyty B CD10+	0,0009 ± 0,002	0,002 ± 0,008	0,27
Limfocyty B CD22+	0,18 ± 0,13	0,45 ± 0,52	< 0,001
Limfocyty B CD20+	0,18 ± 0,11	0,44 ± 0,40	< 0,001
Limfocyty B CD38+	0,21 ± 0,17	0,43 ± 0,42	< 0,001
Limfocyty B CD21+	0,17 ± 0,10	0,41 ± 0,42	< 0,001
Limfocyty B CD81+	0,18 ± 0,11	0,46 ± 0,44	< 0,001
Limfocyty B CD40+	0,18 ± 0,11	0,45 ± 0,44	< 0,001
Limfocyty B CD81+CD40+	0,18 ± 0,11	0,44 ± 0,43	< 0,001
Limfocyty B CD21+CD81+	0,17 ± 0,10	0,41 ± 0,42	< 0,001
Limfocyty B CD21+CD40+	0,17 ± 0,11	0,42 ± 0,42	< 0,001
Limfocyty B CCR7+	0,001 ± 0,002	0,019 ± 0,09	< 0,001
Limfocyty B kappa+	0,10 ± 0,07	0,24 ± 0,24	< 0,001
Limfocyty B lambda+	0,06 ± 0,05	0,15 ± 0,17	< 0,001
Limfocyty B IgM+	0,14 ± 0,13	0,28 ± 0,25	< 0,001
Limfocyty B IgM+IgD+	0,14 ± 0,12	0,18 ± 0,12	0,16
Limfocyty B IgG+	0,02 ± 0,02	0,05 ± 0,04	< 0,001
Limfocyty B IgA+	0,06 ± 0,08	0,19 ± 0,15	< 0,001
Limfocyty B CD27+	0,0006 ± 0,0008	0,07 ± 0,07	< 0,001
Komórki plazmatyczne CD27+ CD20-/ DIM CD38+	0,002 ± 0,003	0,009 ± 0,01	< 0,001
Dojrzałe limfocyty B – komórki pamięci CD27+ CD20+/DIM CD38-	0,02 ± 0,01	0,06 ± 0,06	< 0,001

Wartości liczbowe przedstawiono w postaci średniej ± odchylenie standardowe.

p – prawdopodobieństwo w teście U Manna-Whitneya

Tab. 2. Odsetek limfocytów B i wybranych subpopulacji limfocytów B we krwi obwodowej u dzieci po zakończeniu leczenia ALL w porównaniu do dzieci zdrowych

Analizowane subpopulacje limfocytów B	Grupa dzieci po zakończeniu leczenia [%]	Grupa kontrolna – dzieci zdrowe [%]	p
Limfocyty	45,85 ± 11,09	36,08 ± 9,91	< 0,001
Limfocyty B	7,10 ± 3,52	15,86 ± 5,50	< 0,001
Limfocyty B CD5+	6,19 ± 3,45	12,62 ± 4,86	< 0,001
Limfocyty B CD10+	0,03 ± 0,06	0,04 ± 0,17	0,16
Limfocyty B CD22+	6,39 ± 3,73	14,29 ± 5,98	< 0,001
Limfocyty B CD20+	6,67 ± 3,40	14,60 ± 5,20	< 0,001
Limfocyty B CD38+	7,33 ± 4,67	14,58 ± 6,71	< 0,001
Limfocyty B CD21+	6,28 ± 3,30	13,38 ± 5,59	< 0,001
Limfocyty B CD81+	6,78 ± 3,43	14,97 ± 5,50	< 0,001
Limfocyty B CD40+	6,64 ± 3,47	14,64 ± 5,39	< 0,001
Limfocyty B CD81+CD40+	6,59 ± 3,46	14,28 ± 5,33	< 0,001
Limfocyty B CD21+CD81+	6,23 ± 3,30	13,38 ± 5,13	< 0,001
Limfocyty B CD21+CD40+	6,20 ± 3,37	13,57 ± 5,19	< 0,001
Limfocyty B CCR7+	0,04 ± 0,06	0,64 ± 2,77	< 0,001
Limfocyty B kappa+	3,60 ± 2,32	7,75 ± 3,50	< 0,001
Limfocyty B lambda+	2,34 ± 1,59	4,91 ± 2,39	< 0,001
Limfocyty B IgM+	5,23 ± 3,94	9,45 ± 5,29	< 0,001
Limfocyty B IgM+IgD+	5,05 ± 3,86	6,33 ± 4,20	0,18
Limfocyty B IgG+	0,91 ± 0,61	2,08 ± 1,00	< 0,001
Limfocyty B IgA+	2,43 ± 2,65	6,79 ± 4,90	< 0,001
Limfocyty B CD27+	1,06 ± 0,83	2,42 ± 1,37	< 0,001
Komórki plazmatyczne CD27+ CD20-/ DIM CD38+	0,07 ± 0,11	0,39 ± 0,73	< 0,001
Dojrzałe limfocyty B – komórki pamięci CD27+ CD20+/DIM CD38-	0,70 ± 0,49	2,07 ± 1,65	< 0,001

Wartości procentowe przedstawiono w postaci średniej ± odchylenie standardowe.

p – prawdopodobieństwo w teście U Manna-Whitneya

Tab. 3. Liczba limfocytów B i wybranych subpopulacji limfocytów B we krwi obwodowej u dzieci po zakończeniu leczenia ALL w zależności od czasu od zakończenia leczenia

Analizowane subpopulacje limfocytów B	Grupa dzieci < 3 lat od zakończenia leczenia [G/l]	Grupa dzieci > 3 lat od zakończenia leczenia [G/l]	P
Leukocyty	5,73 ± 1,77	6,28 ± 1,48	0,26
Limfocyty	2,81 ± 0,93	2,60 ± 0,84	0,40
Limfocyty B	0,24 ± 0,14	0,14 ± 0,08	0,02
Limfocyty B CD5+	0,22 ± 0,11	0,11 ± 0,08	< 0,01
Limfocyty B CD10+	0,001 ± 0,002	0,0005 ± 0,001	0,05
Limfocyty B CD22+	0,22 ± 0,14	0,12 ± 0,07	0,02
Limfocyty B CD20+	0,23 ± 0,12	0,12 ± 0,07	< 0,01
Limfocyty B CD38+	0,28 ± 0,19	0,13 ± 0,10	0,01
Limfocyty B CD21+	0,20 ± 0,11	0,13 ± 0,08	0,10
Limfocyty B CD81+	0,21 ± 0,11	0,14 ± 0,08	0,08
Limfocyty B CD40+	0,21 ± 0,11	0,13 ± 0,08	0,06
Limfocyty B CD81+CD40+	0,21 ± 0,11	0,13 ± 0,08	0,06
Limfocyty B CD21+CD81+	0,20 ± 0,11	0,13 ± 0,08	0,08
Limfocyty B CD21+CD40+	0,20 ± 0,11	0,12 ± 0,08	0,06
Limfocyty B CCR7+	0,001 ± 0,002	0,001 ± 0,002	0,44
Limfocyty B kappa+	0,13 ± 0,08	0,06 ± 0,04	< 0,01
Limfocyty B lambda+	0,08 ± 0,06	0,04 ± 0,03	0,035
Limfocyty B IgM+	0,18 ± 0,15	0,09 ± 0,06	0,08
Limfocyty B IgM+IgD+	0,18 ± 0,15	0,09 ± 0,05	0,09
Limfocyty B IgG+	0,03 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,08
Limfocyty B IgA+	0,08 ± 0,11	0,04 ± 0,03	0,08
Limfocyty B CD27+	0,007 ± 0,001	0,0005 ± 0,0004	0,73
Komórki plazmatyczne CD27+ CD20-/ DIM CD38+	0,003 ± 0,004	0,0009 ± 0,002	0,07
Dojrzałe limfocyty B – komórki pamięci CD27+ CD20+/DIM CD38-	0,02 ± 0,02	0,019 ± 0,01	0,74

Wartości liczbowe przedstawiono w postaci średniej ± odchylenie standardowe.

p – prawdopodobieństwo w teście U Manna-Whitneya

Tab. 4. Odsetek limfocytów B i wybranych subpopulacji limfocytów B we krwi obwodowej u dzieci po zakończeniu leczenia ALL w zależności od czasu od zakończenia leczenia

Analizowane subpopulacje limfocytów B	Grupa dzieci < 3 lat od zakończenia leczenia [%]	Grupa dzieci > 3 lat od zakończenia leczenia [%]	P
Limfocyty	49,67 ± 12,14	41,65 ± 8,70	0,08
Limfocyty B	8,32 ± 3,45	5,41 ± 2,53	0,01
Limfocyty B CD5+	7,55 ± 3,18	4,21 ± 2,64	< 0,01
Limfocyty B CD10+	0,04 ± 0,08	0,02 ± 0,04	0,01
Limfocyty B CD22+	7,73 ± 3,71	4,68 ± 2,63	0,01
Limfocyty B CD20+	7,97 ± 3,05	4,72 ± 2,55	< 0,01
Limfocyty B CD38+	9,26 ± 4,75	4,75 ± 3,15	< 0,01
Limfocyty B CD21+	6,99 ± 3,30	4,96 ± 2,49	0,04
Limfocyty B CD81+	7,58 ± 3,36	5,37 ± 2,69	0,03
Limfocyty B CD40+	7,45 ± 3,37	5,20 ± 2,77	0,03
Limfocyty B CD81+CD40+	7,41 ± 3,37	5,15 ± 2,77	0,03
Limfocyty B CD21+CD81+	6,94 ± 3,32	4,92 ± 2,50	0,05
Limfocyty B CD21+CD40+	6,95 ± 3,31	4,82 ± 2,62	0,05
Limfocyty B CCR7+	0,03 ± 0,06	0,05 ± 0,07	0,29
Limfocyty B kappa+	4,53 ± 2,12	2,40 ± 1,72	< 0,01
Limfocyty B lambda+	2,83 ± 1,75	1,68 ± 1,06	0,04
Limfocyty B IgM+	6,48 ± 4,54	3,69 ± 2,08	0,07
Limfocyty B IgM+IgD+	6,22 ± 4,45	3,58 ± 2,00	0,08
Limfocyty B IgG+	1,17 ± 0,73	0,68 ± 0,36	0,08
Limfocyty B IgA+	3,12 ± 3,53	1,58 ± 0,98	0,08
Limfocyty B CD27+	1,10 ± 1,04	1,06 ± 0,61	0,84
Komórki plazmatyczne CD27+ CD20-/ DIM CD38+	0,10 ± 0,13	0,03 ± 0,06	0,22
Dojrzałe limfocyty B – komórki pamięci CD27+ CD20+/DIM CD38-	0,69 ± 0,62	0,73 ± 0,33	0,31

Wartości procentowe przedstawiono w postaci średniej ± odchylenie standardowe.

p – prawdopodobieństwo w teście U Manna-Whitneya

dla populacji limfocytów B oraz niektórych subpopulacji (CD5+, CD20+, CD22+, CD38+, Ig kappa+) wyrażonych w wartościach odsetkowych jest czas od zakończenia leczenia ALL.

DYSKUSJA

Proces dojrzewania układu immunologicznego związany z rozwojem i wiekiem dziecka determinuje wiele zmian zachodzących w populacji limfocytów B. Proces ten rozpoczyna się w szpiku kostnym i jest kontynuowany w obwodowych ośrodkach krwiotwórczych, a następnie krwi obwodowej. Poprzez kontakt układu immunologicznego z obcymi antygenami dochodzi do powolnego różnicowania się dziewiczych limfocytów B w dojrzałe komórki pamięci (2). Komórki B krążące we krwi obwodowej mogą być podzielone na kilka podgrup: dziewicze limfocyty B IgD+CD27-, limfocyty B pamięci, wśród których wyróżniamy dwie zasadnicze grupy: limfocyty IgD+CD27+, syntezujące głównie IgM (komórki przed przełączeniem klas immunoglobulin) oraz limfocyty IgD-CD27+, które syntetyzują IgG, IgE lub IgA (komórki po przełączeniu klas immunoglobulin), a także podwójnie negatywne IgD-CD27- limfocyty B (17).

W trakcie życia osobniczego liczba limfocytów B podlega ciągłym zmianom. U zdrowych dzieci wkrótce po urodzeniu wzrasta liczba limfocytów B, osiągając maksimum w 6.-12. miesiącu, następnie spada, by uzyskać stabilny poziom pod koniec okresu dojrzewania. Dziewicze komórki B stanowią największą podgrupę obwodowych limfocytów B przez całe dzieciństwo, natomiast wszystkie subpopulacje komórek B pamięci zwiększają się w pierwszych latach życia (18).

W pracy de Vries z 1999 roku przedstawiono zmienność liczbowa subpopulacji limfocytów B w pierwszym roku życia (3). Uzyskane wyniki porównano z grupą zdrowych dorosłych. Zaobserwowano wyższą liczbę limfocytów CD1c+, CD5+, CD38+ u dzieci w pierwszych miesiącach życia w porównaniu z grupą dorosłych. Powyższe markery uznano za możliwe markery nieodróżnicowanych limfocytów B.

Wielolekowa chemioterapia stosowana w leczeniu ALL wiąże się z supresją układu immunologicznego nie tylko w czasie intensywnej chemioterapii, ale także podczas leczenia podtrzymującego remisję. Jednak regeneracja układu immunologicznego rozpoczyna się dość szybko, nawet w ciągu 3-6 miesięcy po zakończeniu leczenia ALL.

Van Tilburg i wsp. przedstawili tempo regeneracji układu immunologicznego u 31 dzieci po leczeniu nowotworów szpiku kostnego (ALL, AML) oraz chłoniaków nieziarniczych i choroby Hodgkina (19). Wykazali szybką odnowę dziewiczych limfocytów B u dzieci po zakończeniu chemioterapii. Podobne wartości bezwzględne subpopulacji komórek CD5+ uzyskali van Gent i wsp. (18) w grupie dzieci zdrowych. Ponadto van Tilburg i wsp. przedstawili znacznie wolniejszą odnowę limfocytów B pamięci po zakończeniu chemioterapii, jednakże nie znaleziono dowodów na utratę ich funkcji. W dużej mierze za ten niepełny odzysk od-

powiedzialne były limfocyty B pamięci CD27+/IgG+, których pełną odnowę zaobserwowano dopiero 2,5 do 3 lat po zakończeniu leczenia. Wykazali również wysoką liczbę plazmatycznych oraz immunoglobulin w surowicy krwi u dzieci po zakończeniu leczenia.

Z kolei Wiegering i wsp. (13) przedstawili tempo odbudowy układu immunologicznego w grupie 48 dzieci leczonych z powodu ALL, zakwalifikowanych do grupy standardowego lub pośredniego ryzyka zgodnie z Protokołami ALL-BFM. Wykazali, iż liczba limfocytów B, a w szczególności dziewiczych limfocytów B, była znacząco niższa zarówno w trakcie leczenia, jak i po jego zakończeniu. Wciąż trwającą odnowę populacji limfocytów B obserwowano nawet 5 lat po zakończonej terapii.

Rekonstrukcję immunologiczną u dzieci po leczeniu ALL badali również Ek i wsp. (20). W swojej analizie wykazali wpływ intensywności chemioterapii na tempo odbudowy immunologicznej. W miesiąc po zakończeniu leczenia obserwowano niską całkowitą liczbę limfocytów B, ich prawidłową wartość osiągnięto w 6. miesiącu po zakończeniu leczenia. Subpopulacje limfocytów B ulegały zmianie z relatywnie wyższą liczbą limfocytów CD5+ (komórki B-1) zarówno w 1., jak i 6. miesiącu po zakończeniu leczenia, natomiast ilość limfocytów CD5- (komórki B-2) była niska zarówno po 1, jak i 6 miesiącach od zakończenia chemioterapii.

Wyniki przedstawionych badań wskazują na największą odnowę układu immunologicznego w krótkim czasie po zakończeniu leczenia ALL. Całkowita liczba limfocytów B i ich poszczególnych subpopulacji w grupie badanej były znamienne niższe w porównaniu z grupą dzieci zdrowych, choć w większości wartości te kształtowały się w okolicy dolnej granicy normy. Chociaż średni wiek pacjentów w grupie > 3 lat od zakończenia leczenia (14,5 roku) był znamienne wyższy w porównaniu do grupy < 3 lat od zakończenia leczenia (9,8 roku), nie powinno to jednak wpłynąć na zmiany w obrębie limfocytów B, jako że u dzieci zdrowych nie obserwuje się wpływu wieku na wartości poszczególnych subpopulacji limfocytów B (16). Zmienność liczbowa poszczególnych subpopulacji limfocytów B była największa w pierwszych miesiącach po zakończeniu chemioterapii. Potwierdza to wpływ choroby podstawowej i toksyczności stosowanych leków na opisywane zmiany w układzie odpornościowym.

WNIOSKI

1. Do największej odnowy układu immunologicznego u pacjentów po leczeniu ALL dochodzi w krótkim czasie po zakończeniu chemioterapii.
2. Całkowita liczba limfocytów B i ich poszczególnych subpopulacji u pacjentów po leczeniu ALL są znamienne niższe w porównaniu z grupą dzieci zdrowych, choć wartości te w większości kształtują się w okolicy dolnej granicy normy dla wieku.
3. Zarówno ALL, jak i toksyczności stosowanych protokołów leczenia mają długotrwały wpływ na układ odpornościowy.

PIŚMIENNICTWO

1. Bernatowska E, Chmielnik M, Czerwionka-Szaflarska M et al.: *Pediatrics*. Tomy 1-2. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2013.
2. Piątośa B, Wojska-Kuśnierz B, Pac M et al.: B Cell Subsets in Healthy Children: Reference Values for Evaluation of B Cell Maturation Process in Peripheral Blood. *Cytometry Part B* 2010; 78B: 372-381.
3. De Vries E: Immunophenotyping of lymphocytes in healthy and immunodeficient children. Erasmus University Rotterdam 1999.
4. Commans-Bitter WM, de Groot R, Van de Beemd R et al.: Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 1997; 130: 388-393.
5. Szczepański T, van de Velden VHJ, van Dongen JJM: Flow-cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 775-796.
6. Wood B: 9-Color and 10-Color Flow Cytometry in the Clinical Laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 680-690.
7. Kosmidis S, Baka M, Bouhoutsou D et al.: Longitudinal Assessment of Immunological Status and Rate of Immune Recovery Following Treatment in Children With ALL. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 50: 528-532.
8. Smith S, Schiffman G, Karayalcin G et al.: Immunodeficiency in long term survivors of acute lymphoblastic leukemia treated with Berlin-Francfurt-Munster therapy. *J Pediatr* 1995; 127: 68-75.
9. Layward L, Levinski R, Butler M: Long-term abnormalities in T and B lymphocyte function in children following treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 1981; 49: 251-258.
10. Eyrich M, Wiegeling V, Lim A et al.: Immune function in children under chemotherapy for standard risk acute lymphoblastic leukemia – a prospective study of 20 pediatric patient. *British Journal of Haematology* 2009; 147(3): 360-370.
11. El-Chennawi FA, Al-Tonbary YA, Mossad YM, Ahmed MA: Immune reconstitution during maintenance therapy in children with acute lymphoblastic leukemia, relation to co-existing infection. *Hematology* 2008; 13: 203-209.
12. Van Tilburg CM, van der Velden VH, Sanders EA et al.: Reduced versus intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: impact on lymphocyte compartment composition. *Leuk Res* 2011; 35: 484-491.
13. Wiegeling V, Frank J, Freudenberg S et al.: Impaired B-cell reconstitution in children after chemotherapy for standard or medium risk acute precursor B-lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2014; 55: 870-875.
14. Alanko S, Pelliniemi T-T, Salami TT: Recovery of blood B- lymphocytes and serum immunoglobulins after chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 1992; 69: 1481-1486.
15. Pietras W, Chaber R, Pela H et al.: The recovery of immune system parameters in children following lymphoblastic leukemia therapy – preliminary report. *Adv Clin Exp Med* 2014; 23: 97-102.
16. Szczepańska M, Balsa J, Sędek Ł et al.: Subpopulacje limfocytów B we krwi obwodowej u dzieci zdrowych. *Pediatrics Polska* 2013; 88: 500-507.
17. Warnatz K, Schlesier M: Flow cytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry B Clin Cytom* 2008; 74B: 261-271.
18. Van Gent R, van Tilburg CM, Nibbelke EE et al.: Refined characterization and reference values of pediatric T-and B-cell compartments. *Clinical Immunology* 2009; 133: 95-107.
19. Van Tilburg CM, van Gent R, Bierings MB et al.: Immune reconstitution in children following chemotherapy for hematological malignancies: along-term follow-up. *British Journal of Haematology* 2011; 152: 201-210.
20. Ek T, Mellander L, Andersson B, Abrahamsson J: Immune Reconstitution After Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Is Most Severely Affected in the High Risk Group. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 44: 461-468.

otrzymano/received: 06.07.2016
zaakceptowano/accepted: 27.07.2016