

Stężenie IgE i limfocyty CD23+ u dzieci po zakończeniu leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej

Concentration of IgE and lymphocyte B CD23+ in children with acute lymphoblastic leukemia after cessation of chemotherapy

BOGDAN MAZUR, IGOR OLEJNIK, DANUTA SOŃTA-JAKIMCZYK, HALINA BUBAŁA

Katedra i Klinika Hematologii Dziecięcej i Chemioterapii Śląskiej Akademii Medycznej w Zabrze, ul. 3-Maja 13/15, 41-800 Zabrze

Celem pracy była ocena zmian odsetka i liczby limfocytów B CD19+ i CD23+ oraz stężenia immunoglobuliny E w surowicy krwi u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL) po zakończeniu leczenia. Badanie immunofenotypu limfocytów przeprowadzono w cytometrze przepływowym FACScan przy użyciu przeciwciał monoklonalnych. Grupę badaną stanowiło 75 dzieci z rozpoznaną ALL, leczonych według programu BMF 90 dla grupy średniego ryzyka. Wykazano, że intensywne chemioterapie dzieci z białaczką jest czynnikiem istotnie zmniejszającym liczbę limfocytów B CD19+ i CD23+ oraz stężenie immunoglobuliny E. W okresie 12 miesięcy po leczeniu dochodzi do normalizacji badanych parametrów układu immunologicznego.

Alergia Astma Immunologia, 2000, 5(3), 197-200

Słowa kluczowe: ostra białaczka limfoblastyczna, chemioterapia, limfocyty B, immunoglobulina E

The aim of study was the examination of the relative and absolute number of CD19+ and CD23+ B lymphocytes in peripheral vein blood and serum levels of immunoglobulin E in children with low risk acute lymphoblastic leukemia (ALL) diagnosis after cessation of chemotherapy. The lymphocyte immune phenotype was examined with FACScan flow cytometer using monoclonal antibodies. The examined material included 75 children with established ALL SGR diagnosis. All these children followed the BMF 90 for ALL SRG treatment protocol. The study confirmed that the intensive chemotherapy significantly decreases the absolute number of lymphocytes B CD10+ and CD23+, and level immunoglobulin E in serum. We conclude the period of 12 months after cessation of the chemotherapy is sufficient to recover the immune system function in all examined low risk ALL children.

Alergia Astma Immunologia, 2000, 5(3), 197-200

Key words: acute lymphoblastic leukemia, chemotherapy, lymphocytes B, immunoglobulin E

Choroby nowotworowe układu krwiotwórczego, w tym białaczki, oraz stosowana w ich leczeniu chemioterapia wywierają wpływ na układ odpornościowy. Zaburzenia funkcji tego układu powodują zwiększoną podatność na choroby infekcyjne, wpływają na nasilenie objawów klinicznych, a także wydłużają okres ich trwania [1,2]. Podstawą leczenia schorzeń nowotworowych są cytostatyki, znane ze swojego supresyjnego działania na układ odpornościowy. Uważa się, że odbudowa układu odpornościowego może trwać wiele lat po zakończeniu terapii [3,4]. Jednym z istotnych elementów układu odpornościowego są limfocyty B i limfocyty T oraz komórki prezentujące antygen. Wśród komórek prezentujących antygen limfocytom T główną rolę odgrywają komórki dendrytyczne, limfocyty B i makrofagi. Limfocyty B stanowią 5-15% krążących limfocytów i charakteryzują się obecnością immunoglobulin na swojej powierzchni. Po stymulacji przez antygen przekształcają się w komórki plazmatyczne lub komórki pamięci. Limfocyty B nie stanowią jednolitej grupy i na podstawie obecnych na ich po-

wierzchni cząstek oznaczonych CD (*cluster of differentiation*) wyodrębniono dotychczas kilkanaście subpopulacji [5,6,7]. Wszystkie limfocyty B mają na swojej powierzchni cząsteczkę CD19+. Za najciekawszą wśród limfocytów uważa się subpopulację mającą cząsteczkę CD5+, należącą do nadrodziny cząstek immunoglobulinopochodnych, uczestniczących głównie w odpowiedzi pierwotnej [8]. Na limfocytach B występują cząsteczki nie będące immunoglobulinopochodnymi, należy tu m.in. cząsteczka CD23+, obecna na ponad 90% limfocytów B z receptorami dla IgM i IgD. Biorą one udział w odpowiedzi humoralnej w zakresie przeciwciał IgE i aktywują limfocyty B w bardzo złożonych procesach interakcji. Fragment zewnątrzkomórkowy CD23+ wiąże się również z receptorem CR2 dla dopełniacza [9,10]. Celem pracy było prześledzenie zmian stężenia immunoglobuliny IgE w surowicy krwi oraz analiza populacji limfocytów B CD23+ w krwi obwodowej u dzieci po zakończeniu leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL).

PACJENCI I METODA

Badania przeprowadzono u dzieci, które miały rozpoznaną ostrą białaczkę limfoblastyczną (ALL) i były leczone w Klinice Hematologii Dziecięcej i Chemioterapii w Zabrze wg programu BMF-90 dla grupy średniego ryzyka (SRG). Grupę średniego ryzyka charakteryzuje wstępna liczba krwinek białych poniżej 50 000 mm³ w krwi obwodowej. Na leczenie składa się:

1. terapia wstępna (indukcja remisji, konsolidacja, wczesna intensyfikacja),
2. postępowanie zapobiegające rozwinięciu się białaczki OUN (tzw: profilaktyka OUN),
3. wielomiesięczne leczenie podtrzymujące remisję.

W trakcie badań spełnione były kryteria remisji klinicznej i hematologicznej.

Badane dzieci podzielono na 5 grup po 15 dzieci w każdej w zależności od okresu, jaki upłynął od zakończenia leczenia: grupa I oceniana była bezpośrednio po zakończeniu leczenia ALL, grupa II – 3 miesiące, grupa III – 6 miesięcy, grupa IV – 9 miesięcy, a grupa V – 12 miesięcy po zakończeniu leczenia ALL. Wiek dzieci wahał się od 5 do 16 lat (średnio 10,5). Grupę VI – kontrolną stanowiło 20 zdrowych dzieci w podobnym przedziale wieku, u których krew pobierano przed planowanym niewielkim zabiegiem operacyjnym w ramach chirurgii jednego dnia. Krew pobierano w ramach rutynowych badań laboratoryjnych w systemie Vacutainer na heparynę, w godz. 8-10 i opracowywano nie później niż w 4 godz. od pobrania. Ocenę subpopulacji limfocytów wykonano stosując standardowe techniki dla immunofluorescencyjnego znakowania krwi pełnej [11]. Pełną krew inkubowano przez 30 min. z odpowiednim przeciwciałem, a następnie przez 10 min. z płynem lizującym FACSlysis (Becton Dickinson) w celu usunięcia erytrocytów. Po dwukrotnym przepłukaniu w buforze PBS, znakowane komórki wprowadzono do cytometru przepływowego FACScan (Becton Dickinson) rejestrując 10 000 przepływających komórek. Próbkę kontrolną stanowiła zawiesina komórek z mieszaniną mysich immunoglobulin IgG1+IgG2. Celem dokładnego ustawienia parametrów wczytywanych próbek stosowano kombinację przeciwciał CD14 i CD45 pozwalających na dokładne określenie miejsca limfocytów w badanych próbkach. Analizę parametrów morfologicznych i fluorescencji badanych komórek przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego CellQuest.

Stężenie całkowite immunoglobuliny IgE w surowicy krwi oznaczono zestawem ALaSTAT firmy DPC. Wyniki poddano analizie statystycznej. Dla porównania średnich wartości mierzonych parametrów zastosowano:

- test t-Studenta dla prób niezależnych, zgodnych z rozkładem normalnym, potwierdzonym testem Kołmogorowa-Smirnowa

- testem U Manna-Whitney'a w przypadku gdy rozkład nie spełniał wymaganych kryteriów dla wykonania testu t-Studenta.

Za istotny statystycznie przyjęto poziom $p < 0,05$.

Na przeprowadzenie powyższych badań uzyskano zgodę Terenowej Komisji Badań Naukowych w Katowicach (27.01.1999).

WYNIKI

Wyniki średniej bezwzględnej liczby i odsetka poszczególnych limfocytów B podano w tabeli I. Liczba limfocytów B CD23+ wynosiła: 131,4 mm³ (+/-142,9) w grupie I i była statystycznie niższa niż w grupie dzieci zdrowych, powoli rosła w kolejnych grupach do wartości 508,5 mm³ (+/-327,6) w grupie V; w grupie VI – kontrolnej liczba limfocytów CD23+ wynosiła 420,0 (+/-350,2). Różnice między grupami II, III, IV, V i kontrolną (VI) były nieistotne statystycznie.

Liczba limfocytów B CD19+ wynosiła: 140,4 mm³ (+/- 159,5) w grupie I i była statystycznie niższa niż w grupie dzieci zdrowych, podobnie jak w grupie II, w której

Tabela I. Odsetek i liczba bezwzględna limfocytów B CD19+ i CD23+ we krwi obwodowej u dzieci, które zakończyły leczenie i w grupie dzieci zdrowych

	Limfocyty Wartość odsetkowa +/- SD	CD19+ Wartość bezwzględna +/- SD	Limfocyty Wartość odsetkowa +/- SD	CD23+ Wartość bezwzględna +/- SD
Grupa I	7,53* +/- 4,77	140,47* +/- 159,54	6,21 * +/- 4,84	131,43* +/- 142,97
Grupa II	18,32 +/- 8,66	430,24* +/- 311,76	15,50 +/- 7,02	362,42 +/- 253,69
Grupa III	19,14 +/- 7,39	470,57 +/-235,64	17,01 +/- 6,97	400,86 +/-190,42
Grupa IV	16,54 +/- 8,90	400,62 +/-260,17	18,54 +/-7,75	483,45 +/-266,06
Grupa V	20,82 +/- 6,72	573,18 +/-322,02	21,29* +/- 5,77	508,50 +/- 327,63
Grupa VI	18,20 +/- 7,28	503,70 +/- 288,43	14,60 +/- 6,7	420,00 +/- 350,00

* statystycznie istotna różnica w stosunku do grupy kontrolnej $p < 0,05$

Tabela II. Stężenie immunoglobuliny IgE w surowicy krwi u dzieci które zakończyły leczenie i w grupie dzieci zdrowych

	Grupa I	Grupa II	Grupa III	Grupa IV	Grupa V	Grupa VI
Całkowite	15,34*	18,83	18,76	19,45	19,45	19,31
IgE IU/ml	+/-6,66	+/- 6,82	+/-7,52	+/-5,65	+/- 4,61	+/- 7,49

* statystycznie istotna różnica w stosunku do grupy kontrolnej $p < 0,05$

osiągnęła wartość 430,2 (+/- 311,7). W grupach III, IV i V różnice nie były statystycznie istotne w porównaniu z grupą VI – kontrolną, dla której wartość ta wynosiła 503,7 mm³ (+/- 288,4).

Wyniki stężenia całkowitej immunoglobuliny IgE podano w tabeli II. Wynosiła ona w grupie I– 15,34 (+/-6,66) IU/ml, wartość ta była statystycznie istotnie niższa niż w grupie dzieci zdrowych. W pozostałych grupach nie stwierdzono istotnych różnic w odniesieniu do kontroli

DYSKUSJA

U chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną stwierdza się znaczne zmniejszenie liczby jednojądrzastych komórek fagocytujących, upośledzenie ich funkcji – osłabienie zdolności migracji wewnątrzkomórkowego zabijania. Następuje obniżenie liczby i zaburzenia funkcji innych komórek odpowiedzi immunologicznej: spadek liczby limfocytów i upośledzenie ich funkcji, upośledzenie reakcji opóźnionej nadwrażliwości skórnej, obniżenie aktywności komórek NK, upośledzenie zdolności produkcji interleukiny-2 i ekspresji jej receptora [12,13]. Dołączająca się w późniejszym okresie choroby hypogammaglobulinemia oraz upośledzenie pierwotnej i wtórnej odpowiedzi humoralnej prowadzi do wybitnej skłonności u tych chorych do zapadania na zakażenia bakteryjne, wirusowe i grzybicze. Upośledzenie odporności utrzymuje się u tych chorych również w okresie remisji, co tłumaczy występowanie zgonów w przebiegu zakażeń, szczególnie u dzieci po zakończeniu leczenia w pełnej remisji klinicznej choroby [1,14]. Interesujące wyniki przedstawili Komoda i wsp. [15]. Obserwowali oni znamienne obniżenie liczby limfocytów CD19+ już w momencie rozpoznania ALL. Po raz drugi oceniali ich liczbę pod koniec konsolidacji remisji, stwierdzając powrót do wartości prawidłowych; po raz trzeci wykonali badania w 2 tygodnie po zakończeniu konsolidacji wykazując znaczący spadek limfocytów B. Lovat i wsp. [16] monitorowali liczbę komórek CD19+ u dzieci

z ALL co 3 miesiące przez cały okres leczenia podtrzymującego, notując jednostajne nieznamienne obniżenie ich wartości. Według Alanco i wsp. [3] do normalizacji liczby limfocytów CD19+ dochodzi w ciągu sześciu miesięcy po zakończeniu leczenia. W naszym materiale wyniki badań były podobne, liczba limfocytów CD19+ jest bardzo obniżona zaraz po zakończeniu leczenia i osiąga wartości zbliżone do grupy dzieci zdrowych już po upływie 6 miesięcy od zakończeniu leczenia.

Subpopulacja limfocytów B z ekspresją cząsteczki CD23+ na powierzchni, która jest receptorem dla IgE o niskim powinowactwie, zmniejsza się w okresie bezpośrednio po leczeniu, spadając do wartości 131,43 w mm³ w krwi obwodowej po zakończeniu leczenia i osiąga wartości zbliżone do grupy kontrolnej już po 3 miesiącach od zakończenia leczenia. Liczba ich nadal stale rośnie osiągając w 12 miesiącu po leczeniu wartości wyższe niż w grupie dzieci zdrowych (nie są to jednak różnice statystycznie istotne). Receptory te występują także w formie rozpuszczalnej i uczestniczą w regulacji syntezy IgE [17]. Brak jest doniesień dotyczących zmian w zakresie limfocytów CD23+ u dzieci z ALL. W trakcie chemioterapii wykazywano również zmiany w stężeniu immunoglobulin w surowicy krwi, co jest oczywistą konsekwencją zmniejszenia się liczby i upośledzenia funkcji limfocytów B w tym okresie [14,18]. Stężenie immunoglobuliny IgE, obok testów skórnych, stanowi klasyczny wykładnik dla rozpoznania atopii. Na ogół przyjmuje się, że całkowite stężenie IgE w surowicy, przekraczające 100 IU/ml, świadczy o atopii [19]. W naszych badaniach nie obserwowaliśmy tak wysokich stężeń IgE; po trzech miesiącach od zakończenia leczenia jej wartości były zbliżone do poziomu stwierdanego u dzieci zdrowych.

Badania wykazały, że okres jednego roku od zakończenia chemioterapii u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną jest wystarczający dla odbudowy układu immunologicznego w zakresie badanych parametrów.

Piśmiennictwo

1. Kavanaugh DY, Carbone DP. Immunologic dysfunction in cancer. *Hematol Oncol Clin N Amer* 1996; 10: 927-951.
2. Smith S, Schiffman G, Karaycin G i wsp. Immunodeficiency in long-term survivors of acute lymphoblastic leukemia treated with Berlin-Frankfurt-Munster therapy. *J Ped* 1995; 127: 68-75.
3. Alanco S, Salmi TT, Pelliniemi TT. Recovery of blood T-cell subset after chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 1994; 11: 281-292.
4. Rytwiński K, Sońta-Jakimczyk D, Sroczyńska M i wsp. Wybrane parametry immunologiczne a zakażenia u dzieci w okresie ponad jednego roku od zakończenia leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej. *Pol Tyg Lek* 1989; 44: 320-322.
5. Durandy A, Thuillier L, Forville M i wsp. Phenotyping and functional characteristics of human newborns B lymphocytes. *J Immunol* 1990; 144: 60-65.
6. Bonila FA, Oettgen RG. Normal ranges for lymphocyte subsets in children. *J Pediatr* 1997; 130: 68-75.
7. Kędzierska A, Gieracka D, Turowski G. Limfocyty krwi obwodowej – ich aktywność receptorowa, markery układu CD, wartość diagnostyczna. *Diagn Lab* 1994; 30: 383-391.
8. Kantor AB. The development and repertoire of B-1 cell (CD5 B cells). *Immunol Today* 1992; 12: 389-391.
9. Rogala B, Rymarczyk B. Soluble CD23+ in allergic diseases. *Arch Immunol Ther Exp* 1999; 47: 251-255.
10. Brzezinska-Błaszczak E. Receptory dla immunoglobulin E (FcεR). W: Nowak JZ, Zawilska JB (red.) Receptory- struktura, charakterystyka, funkcja. PWN 1997; 316-334.
11. Huh YO, Andreeff M. Flow cytometry. Clinical and research applications in hematologic malignancies. *Hematol Oncol Clin N Amer* 1994; 8: 548-556.

12. Lowenberg B, Touw IP. Hemopoietic growth factor and their receptors in acute leukemia. *Blood* 1993; 81: 281-292.
13. Holan V, Minowada J. Interleukine-2 production by human leukemia cell lines of pre-B cell origin. *Neoplasma* 1993; 40: 3-8.
14. Abrahamsson J, Markey I, Mellander L. Immunoglobulin level and lymphocyte response to mitogenic stimulation in children with malignant during treatment and follow-up. *Acta Paediatr* 1995; 84: 177-182.
15. Komada Y, Zhang SL, Zhou YW i wsp. Cellular immunosuppression in children with acute leukemia: effect of consolidation chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 1992; 35: 271-276.
16. Lovat PE, Robinson JH, Windebank KP i wsp. Serial study of T lymphocytes in childhood leukemia during remission. *Pediatr Hematol Onkol* 1994; 10: 129-139.
17. Kupryś I, Kuna P. Regulacja syntezy immunoglobuliny E. *Post Hig Med. Dośw* 1997; 51: 651-682.
18. Alanco S, Salmi T, Pelliniemi T. Recovery of blood lymphocytes and serum immunoglobulins after treatment of solid tumors in children. *Pediatr Hematol Oncol* 1994; 11: 33-45.
19. Jarzab J. Interpretacja oznaczeń immunoglobuliny E w chorobach atopowych. W: Płusa T (red.) *Postępy w alergologii - II*. Medpress 1997; 60-64.