

Katarzyna Markiewicz¹, Krzysztof Zeman², Agata Kozar¹, Maria Gołębiowska-Wawrzyniak¹,
Wojciech Woźniak³

OCENA WYBRANYCH PARAMETRÓW ODPORNOŚCI SWOISTEJ W PRZEBIEGU LECZENIA ANTYNOWOTWOROWEGO DZIECI I MŁODZIEŻY Z MIĘSAKIEM KOŚCIOPOCHODNYM*

EVALUATION OF SELECTED PARAMETERS OF SPECIFIC IMMUNITY IN CHILDREN WITH OSTEOSARCOMA AT VARIOUS STAGES OF ANTITUMOUR TREATMENT

¹Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Matki i Dziecka

²Klinika Pediatrii i Immunologii z Pododdziałem Nefrologii I-CZMP. Klinika Pediatrii,
Kardiologii Prewencyjnej i Immunologii Wieku Rozwojowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

³Klinika Chirurgii Onkologicznej Dzieci i Młodzieży

Strzelenie

Wstęp: Typowymi komórkami odporności swoistej są limfocyty. Dzięki obecności receptorów TCR limfocyty mają możliwość swobodnego rozpoznawania antygenów. Prezentacja antygenów przez wyspecjalizowane komórki jest niezbędnym elementem funkcjonowania odporności swoistej. Prowadzi do zainicjowania odpowiedzi immunologicznej, w wyniku której powstają limfocyty pamięci oraz limfocyty efektorowe.

Jednym z głównych sposobów leczenia nowotworów kości jest chemioterapia, której celem jest zniszczenie komórek nowotworowych poprzez wprowadzenie ich w stan apoptozy. Cytostatyki niszcząc komórki nowotworowe uszkadzają również zdrowe komórki różnych narządów wewnętrznych, zwłaszcza szybko dzielące się komórki szpiku kostnego, nabłonka przewodu pokarmowego i układu limfatycznego powodując m.in. leukopenię w tym limfopenię i związane z tym zmniejszenie odporności.

Celem pracy było znalezienie odpowiedzi na pytanie, czy u dzieci z mięsakiem kościopochodnym otrzymujących chemioterapię dochodzi do zaburzeń układu odpornościowego.

Materiał i metody: Badanie przeprowadzono w grupie 44 dzieci (21 dziewcząt, 23 chłopców) w wieku od 6 do 20 lat (średnia 14,9; mediana 15,0) z rozpoznaniem w badaniu histopatologicznym mięsakiem kościopochodnym, leczonych w Klinice Chirurgii Onkologicznej Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie. Wszyscy pacjenci otrzymywali chemioterapię przedoperacyjną, mieli wykonany zabieg operacyjny i zostali poddani chemioterapii uzupełniającej. Oceniano metodą cytometrii przepływową limfocyty T i B krwi obwodowej oraz subpopulacje: CD4+, CD8+, CD3+?HLA-DR+, CD3+γδ; komórki NK i NKT w IV etapach leczenia antynowotworowego

Wyniki: Liczba limfocytów CD3+, CD4+, CD19+ (B) i NK spadała po każdym kolejnym etapie leczenia cytostatykami, największe różnice dotyczyły komórek CD19+ (mediana: I bad.: 205,0; II bad.: 62,0; IV bad.: 24,0 kom/μl; p<0,05) w pojedynczych przypadkach liczba komórek spadała nawet poniżej 10 kom/μl (przy normie 200-500 komórek/μl dla średniej wieku 15 lat).

Wnioski: 1. U dzieci i młodzieży z mięsakiem kościopochodnym leczenie przeciwnowotworowe przyczynia się do supresji układu immunologicznego, zdecydowanie obniżając liczbę i odsetek limfocytów CD3+, CD4+, CD19+ i NK. 2. Obniżenie liczby limfocytów w trakcie stosowania chemioterapii może przyczyniać się do progresji choroby nowotworowej po zakończeniu leczenia. 3. Ocena statusu immunologicznego pacjentów z osteosarcoma w różnych etapach leczenia może być pomocna w monitorowaniu efektu terapii przeciwnowotworowej, może zapobiegać powstawaniu niekorzystnych zmian klinicznych, być podstawą korekcji w doborze i dawkowaniu cytostatyków.

Słowa kluczowe: mięsak kościopochodny, dzieci, limfocyty CD3+, CD4+, CD8+, CD3+/HLA-DR+, CD19+, CD3+γδ, leczenie antynowotworowe

Abstract

Typical cells of specific immunity are lymphocytes. T cells may specifically recognize antigens using T Cell Receptors (TCRs). Antigen presentation by specialized cells is a necessary element of specific immunity. It leads to initiating an immune response. After antigen dependent activation T cells transform to memory and effector lymphocytes. Cells engaged directly in destruction of the tumour are CD8+cytotoxic T lymphocytes, CD4+ lymphocytes, $\gamma\delta$ lymphocytes, NK, NKT cells and indirectly B lymphocytes.

One of the main methods of osteosarcoma treatment in children is chemotherapy. The goal is to destroy the cancer cells by putting them in a state of apoptosis. All of the medications used as chemotherapy carry the risk of short-term and long-term problems including leukopenia, immune disorders such as immunodeficiency.

The Aim of study: *was evaluation by flow cytometry selected elements of specific cellular immunity in children with osteosarcoma at various stages of antitumour treatment.*

Materials and methods: *The study was performed on the group of 44 children with osteosarcoma, aged from 6 to 20 years (average 14.9 years; median 15.0 years). T and B lymphocytes and subpopulations: CD4+, CD8+, CD3+ γ HLA-DR+, CD3+ $\gamma\delta$; NK, NKT cells were analyzed in peripheral blood with use of flow cytometry method with monoclonal antibodies. Examinations were performed before the therapy – in diagnostic period (examination I), after the neoadjuvant chemotherapy (examination II), 10-14 days after the surgery (examination III), 5 months after the surgery (after adjuvant chemotherapy, examination IV).*

Results: *The number of T and B lymphocytes was decreasing after each stage of cytostatic therapy, with the biggest differences for CD19+ cells (medians: I examination – 205.0; II exam. – 62.0; IV exam. – 24.0 cells/mL); in single cases the number of cells decreased even under 10/mL (norm 200-500 cells/mL).*

Conclusions: *1. In children and youth with osteosarcoma antineoplastic treatment contributes to the suppression of the immune system, decreasing definitely the number and percentage of B lymphocytes, T helper lymphocytes and NK cells. 2. Decreased number of CD3+, CD4+, CD19+ and NK lymphocytes during chemotherapy may contribute to the progression of neoplastic disease in the future, after treatment. 3. Evaluation of immunologic status in patients with osteosarcoma may be helpful in monitoring of antineoplastic therapy effectiveness, may prevent the formation of unfavourable clinical changes and may be the basis for correction of the cytostatic agents' administration.*

Key words: *osteosarcoma, children, CD3+, CD4+, CD8+, CD3+/HLA-DR+, CD19+, CD3+ $\gamma\delta$, antitumour treatment*

DEV. PERIOD MED., 2014, XVIII, 2, 155-168

WSTĘP

Kontakt antygeny z układem odpornościowym wywołuje powstanie szeregu reakcji, zapoczątkowując odpowiedź typu komórkowego lub humoralnego.

W odporności swoistej z antygenem reagują limfocyty T. Dzięki obecności receptorów TCR limfocyty te mają możliwość swobodnego rozpoznawania antygenów. Interakcja określonego antygeny z receptorem pobudza limfocyt T do proliferacji w wyniku czego powstaje klon komórek mający receptory tej samej swoistości. Ulegając aktywacji limfocyty wydzielają także cytokiny, które aktywują i rekrutują inne komórki odpornościowe (m.in. granulocyty i makrofagi). Same limfocyty mogą również wywierać bezpośredni efekt cytotoksyczny.

Prezentacja antygeny jest najważniejszym elementem funkcjonowania odporności swoistej, prowadzi do zainicjowania odpowiedzi, w wyniku której powstają limfocyty pamięci oraz limfocyty efektorowe (1). Komórkami prezentującymi antygen – APC (ang. *antigen presenting cells*) mogą być m.in. komórki dendrytyczne, makrofagi i limfocyty B. Makrofagi i komórki dendrytyczne pobierają antygeny wykorzystując proces fagocytozy (2). Limfocyty B pobierają antygen w sposób swoisty za pomocą receptorów BCR (ang. B

cell receptor) obecnych na powierzchni tych komórek. Po wewnątrzkomórkowym przetworzeniu antygeny jego determinanty (krótkie peptydy) są prezentowane limfocytom T przez komórki APC w połączeniu z cząsteczkami MHC (ang. *major histocompatibility complex*) (3).

Limfocyty jako jedyne komórki mają zdolność krążenia po całym organizmie pełniąc funkcje nadzoru immunologicznego. Markerem różnicowania limfocytów T jest antygen CD3, który pozwala odróżnić je od limfocytów B. Populacja CD3 dzielona jest na subpopulację limfocytów pomocniczych CD4+(helper), Th1, Th2, Th3. Subpopulację limfocytów cytotoksycznych CD8+ oraz limfocyty T regulatorowo-supresorowe (Treg). Podział na limfocyty CD4+ i CD8+ wskazuje jedynie na zdolność rozpoznawania antygenów z cząsteczkami MHC klasy I lub klasy II bowiem wśród limfocytów CD4+ (Th) są również limfocyty zdolne do cytotoksyczności (Th1) (4). Jak wspomniano podstawową strukturą, dzięki której limfocyty T swobodnie rozpoznają antygen, jest ich receptor składający się z dwóch łańcuchów α i β (niektóre limfocyty T posiadają łańcuchy $\gamma\delta$). Dla jego prawidłowego funkcjonowania potrzebna jest struktura w skład, której wchodzi sześć łańcuchowa cząsteczka CD3. Limfocyty T, oprócz

kontaktu z kompleksem antygen – MHC, wymagają dodatkowych sygnałów kostymulujących ze strony komórek APC, a także interakcji z cytokinami obecnymi w przestrzeni międzykomórkowej. Receptorami, przez które przekazywany jest dodatkowy sygnał stymulujący są cząsteczki CD80 (B7.1) i CD86 (B7.2) na komórkach prezentujących antygen oraz CD28 i CD152 (CTLA-4) na limfocytach (5).

Badania prowadzone od wielu lat wykazały, że limfocyty T są głównym elementem swoistej odpowiedzi immunologicznej na komórki nowotworowe (6, 7). Pełnią rolę ochronną hamując rozwój guzów indukowanych wirusami onkogennymi (8, 9, 10), czynnikami kancerogennymi (11), lub promieniami ultrafioletowymi (12, 13). Okazało się, iż w wielu nowotworach istnieje korelacja pomiędzy intensywnością nacieku limfocytarnego a pomyślnym rokowaniem lub skłonnością do remisji choroby (14, 15). Swoiste limfocyty można wykryć we krwi, okolicznych węzłach chłonnych, czy w samym guzie nowotworowym (16). W wielu pracach wskazuje się na istnienie swoistych mechanizmów obronnych zaangażowanych w zwalczanie chorób rozrostowych.

Limfocyty T CD4+ (Th – helper, pomocnicze) wspomagają odpowiedź typu humoralnego i komórkowego. Dzieli się je w zależności od spektrum wydzielanych cytokin na limfocyty Th1 wytwarzające: IL-2, IL-3, IFN- γ , TNF- β , GM-CSF i Th2 syntetyzujące: IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, GM-CSF. Limfocyty syntetyzujące TGF- β to limfocyty Th3. Czy niedojrzały, spoczynkowy limfocyt Th0 rozwinie się w limfocyt Th1 czy Th2 zależy od stymulacji antygenowej i od rodzaju cytokin wydzielanych przez komórkę APC. Podział na limfocyty Th1 i Th2 jest podziałem czynnościowym wynikającym ze zdolności do syntezy cytokin. Poza profilem wydzielanych cytokin limfocyty Th1 i Th2 różnią się drogami krążenia i odpowiedzią na różne bodźce chemotaktyczne (posiadają receptory dla różnych chemokin). Populacja Th1 jest zdolna także do cytotoksyczności poprzez cząsteczkę FasL. Limfocyty CD4 biorą udział w obronie przeciwnowotworowej nie tylko poprzez rekrutację komórek odporności wrodzonej takich jak makrofagi i komórki tuczne ale też przez sekrecję IFN- γ , TNF- α oraz TRIAL (TNF – *related apoptosis-inducing ligand*) zabijających komórki nowotworowe poprzez receptory z domeną śmierci (17, 18).

Aktywacja limfocytów T zachodzi w węzle chłonnym gdy komórka APC dostarczy do niego antygen nowotworowy (19). Niektóre komórki nowotworowe mają na swojej powierzchni cząsteczki klasy MHC II, należą do nich: czerniak, nowotwory płuc, *osteosarcoma* (20). Prawie 1/3 nowotworów kości wykazuje ekspresję MHC II i jest rozpoznawalna przez swoiste limfocyty Th (21). Zdarza się, że nowotwory, które nie mają ekspresji antygenów klasy MHC II, poprzez indukcję IFN- γ zaczynają je syntetyzować (22). IFN- γ może wpływać na syntezę cząsteczek MHC klasy I na komórkach APC, co z kolei przyczynia się do zwiększonej prezentacji antygenów komórkom cytotoksycznym CD8+. Jak wspomniano limfocyty CD4+ (Th) są w stanie zabijać komórki nowotworowe poprzez bezpośredni kontakt. Zjawisko takie opisał w 1998 roku *Topalian*,

który zademonstrował obecność limfocytów Th w nacieku czerniaka (23). Interakcje między komórkami Th i komórkami nowotworowymi (TCR-peptyd-MHC II) mogą powodować zwiększoną ekspresję tzw. receptorów śmierci i indukcję apoptozy komórek nowotworowych (szlak FasL) (24). *Thomas* i *Hersey* udowodnili, że komórki CD4+ zabijają komórki czerniaka wykorzystując mechanizm indukcji apoptozy poprzez wymieniony wcześniej TRAIL (17). Limfocyty CD4+ mogą wykorzystywać rozmaite mechanizmy zabijania nowotworów także poprzez sekrecję cytokin, mobilizację limfocytów CD8+ i eozynofili także posiadających zdolność wydzielania czynników przeciwnowotworowych (25). Przez wiele lat sądzono, że głównie limfocyty CD8+ są odpowiedzialne za reakcje przeciwnowotworowe. Pogląd ten zmienił się wraz z odkryciem, że podobną rolę mogą odgrywać limfocyty T CD4+ (26, 27).

Podstawową funkcją limfocytów T CD8+ jest wywieranie efektu cytotoksycznego – niszczenie komórek zakażonych przez wirusy lub mikroorganizmy rozwijające się wewnątrzkomórkowo oraz niszczenie komórek nowotworowych – zabijanie komórek, na których obecne są własne cząsteczki MHC klasy I połączone z obcymi antygenami, bądź obce cząsteczki MHC klasy I. Limfocyty T CD8+ indukują apoptozę poprzez uwalnianie perforyny, granzymów i granzuliny lub interakcję FasL/Fas (28). Wyróżnia się wśród nich właściwe limfocyty cytotoksyczne (Tc) i limfocyty supresorowe, które określa się obecnie regulatorowymi (T CD8+CD28-). Profil wydzielanych cytokin spowodował podział tej populacji na subpopulację limfocytów Tc1 (subpopulacja syntetyzująca cytokiny podobne do limfocytów Th1 – IL-2, TNF- α , IFN- γ) i subpopulację Tc2 (IL-4, IL-5) (29).

Jak wspomniano wcześniej w wielu nowotworach obserwuje się nacieki limfocytów w miejscu, w którym powstał guz, związane jest to z sekrecją chemokin przez komórki guza. Chemokiny są ważnymi mediatorami powodującymi przyciąganie komórek układu odpornościowego do miejsca toczącego się procesu nowotworowego. Uważa się, że im większy naciek limfocytarny, tym lepsze rokowanie. Aktywność cytotoksyczna limfocytów T CD8+ stała się podstawą opracowania „szczepionek antynowotworowych” i tzw. terapii adoptywnej, w której za efekt przeciwnowotworowy odpowiedzialne są podawane dożylnie lub miejscowo limfocyty pobrane *ex vivo* z guza, namnażane i następnie podawane ponownie pacjentowi. Taka terapia może dawać odpowiedź w postaci zahamowania lub wyleczenia choroby nowotworowej nawet u 50% pacjentów (30, 31). Zrozumienie mechanizmów wpływających na regresję nowotworu jest związane z rozwojem efektywnej immunoterapii i wykorzystywaniem do tego celu limfocytów T CD8+ jako komórek efektorowych (32).

Limfocyty B uczestniczą głównie w odpowiedzi humoralnej, ich rola w odporności przeciwnowotworowej obok syntezy swoistych przeciwciał polega na syntezie cytokin: IL-5, IL-6, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, TNF- β . Synteza przeciwciał jest możliwa po uzyskaniu od limfocytu Th2 sygnału wspomagającego i pobudzającego różnicowanie w komórkę plazmatyczną. Niektóre pobudzone

limfocyty B przekształcają się w komórki pamięci i po ponownym kontakcie z antygenem produkują większą ilość przeciwciał, które z kolei po związaniu antygeny aktywują białka dopełniacza mogące doprowadzać do lizy komórki docelowej (33). Przeciwciała uczestniczą też w bezpośrednich reakcjach cytotoksycznych działając opsonizująco w stosunku do komórki nowotworowej. Wydaje się, że humoralne mechanizmy odpornościowe odgrywają rolę w początkowej fazie rozwoju nowotworu oraz w procesach ich regresji. Odpowiednia liczba limfocytów B oraz ich prawidłowe funkcjonowanie jest elementem niezbędnym w zwalczaniu nowotworu.

W organizmie, w którym dochodzi do rozwoju choroby nowotworowej, w początkowym okresie zaburzenia w systemie obronnym są niewielkie. W trakcie rozwoju choroby i zastosowanego leczenia dochodzi do uszkodzenia zarówno elementów obrony humoralnej jak i komórkowej (34). Mała liczba limfocytów B powoduje występowanie w późniejszym okresie hipoimmunoglobulinemii i zwiększa ryzyko zakażeń bakteriami ropotwórczymi.

W miarę rozwoju nowotworu jego komórki zaczynają syntetyzować czynniki wzrostowe, które indukują angiogenezę i odpowiedź zapalną (35). Czynniki te są przyczyną aktywacji otaczających guz fibroblastów, komórek mięśni gładkich i adipocytów prowadząc do sekrecji dodatkowych czynników wzrostowych i enzymów proteolitycznych (36, 37). Typowymi komórkami odporności wrodzonej, stanowiącymi tzw. pierwszą linię obrony, pojawiającymi się najszybciej w miejscu toczącego się procesu zapalnego są: makrofagi, granulocyty obojętnochłonne, komórki dendrytyczne lub komórki tuczne. Wśród nich znajdują się też komórki o funkcji pośredniej między odpornością wrodzoną, nieswoistą a nabytą, swoistą – limfocyty NKT i T $\gamma\delta$. Obok komórek NKT i limfocytów T $\gamma\delta$, komórki NK również należą do komórek reagujących najszybciej w odpowiedzi immunologicznej. Pacjenci, których komórki NK są mniej wydolne, wykazują wrażliwość na infekcje, a rozwijające się w ich organizmie nowotwory mają większą możliwość tworzenia przerzutów. Wydaje się jednak, że komórki NK pełnią w nadzorze immunologicznym rolę uzupełniającą w stosunku do limfocytów cytotoksycznych. Niszczą te komórki, których limfocyty T cytotoksyczne nie są zdolne rozpoznać i eliminować. Dzieje się tak w sytuacji gdy komórki organizmu mają osłabioną ekspresję cząsteczek MHC klasy I (38).

Powstaniu przewlekłego procesu zapalnego towarzyszy zwiększone wytwarzanie i napływ leukocytów do miejsca objętego tym procesem. Następuje ich selektywna rekrutacja polegająca na przyciąganiu tylko tych komórek, które są niezbędne do przeprowadzenia reakcji obronnej. Mechanizmem odpowiedzialnym za selektywną rekrutację leukocytów jest ekspresja cząsteczek adhezyjnych na komórkach efektorowych odpowiedzi immunologicznej i komórkach śródbłonna obwodowych naczyń krwionośnych.

OGÓLNE ZASADY LECZENIA NOWOTWORÓW KOŚCI

Jednym z głównych sposobów leczenia nowotworów kości jest chemioterapia. Jej celem jest zniszczenie

wszystkich komórek nowotworowych poprzez wprowadzenie ich w stan apoptozy. Mechanizm działania apoptotycznego polega na: uszkodzeniu DNA przez wiązanie się z grupami funkcyjnymi kwasów nukleinowych (leki alkilujące – cyklofosfamid, ifosfamid, cisplatyna, karboplatyna), uniemożliwienie syntezy związków będących prekursorami lub wchodzącymi w skład kwasów nukleinowych (antymetabolity – metotreksat, analog kwasu foliowego, fluorouracyl, analog pirymidyny) bądź hamowaniu aktywności topoisomerazy, enzymów biorących udział w syntezie DNA (antybiotyki przeciwnowotworowe – adriamycyna, etopozyt), czy zaburzającym funkcjonowanie systemu mikrotubul tworzących wrzeciono podziałowe komórki (alkaloidy barwinka – winkrystyna, winblastyna). Niektóre leki działają na komórki w fazie mitozy – M (fazospecyficzne – alkaloidy barwinka), w fazie syntezy DNA – S, (antymetabolity – metotreksat) lub niezależnie od fazy cyklu komórkowego (związki alkilujące). Chemioterapia może być wprowadzona przed zabiegiem operacyjnym (wstępna, indukcyjna, neoadjuwantowa, przedoperacyjna), po wykonaniu leczenia chirurgicznego (uzupełniająca, adjuwantowa, pooperacyjna) lub może stanowić główną metodę leczenia – tzw. chemioterapia radykalna (39). Cytostatyki niszczą komórki nowotworowe uszkadzają również zdrowe komórki różnych narządów wewnętrznych, zwłaszcza szybko dzielące się komórki szpiku kostnego, nabłonka przewodu pokarmowego i gonad powodując m.in. małopłytkowość, leukopenię w tym limfopenię i związane z tym zmniejszenie odporności. Dowiedziono, że aktywność podziałowa większości nowotworów jest mniejsza w porównaniu z aktywnością podziałową normalnych komórek szpiku, tkanki limfatycznej, nabłonka płciowego czy nabłonka przewodu pokarmowego (34). Zjawisko to decyduje o konieczności ograniczenia dawki cytostatyków, w celu osiągnięcia maksymalnego efektu leczniczego przy minimalnej toksyczności. Obecnie stosuje się tzw. leczenie skojarzone (chemioterapia wstępna, leczenie chirurgiczne, chemioterapia uzupełniająca), które w znacznym stopniu doprowadza do regresji guza, jednak często jego skutki dla zdrowia pacjenta są bardzo niekorzystne (uszkodzenia nerek i dróg moczowych, zaburzenia gospodarki wodno-elektrolitowej, uszkodzenie serca, układu nerwowego, przewodu pokarmowego, płuc, powikłania naczyniowe, uszkodzenie skóry i wiele innych). Dużym problemem są nie tylko wczesne, ale także odległe skutki terapii cytostatykami. Znaczna część odległych skutków wykazuje progresję wraz z upływem czasu, mimo, że leczenie zostało już zakończone (40).

U pacjentów młodocianych poddawanych chemioterapii wstępnej najczęściej stosuje się wysokie dawki cisplatyny (CDDP) i adriamycyny (ADM) – protokół EORTC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*) lub adriamycyny z metotreksatem (MTX) – I linia, etopozyt z ifosfamidem (IFO) – II linia w protokole SFOP (*Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique*). Chemioterapia obejmuje trzy kuracje wielolekowe, po których przeprowadza się zabieg chirurgiczny, a następnie stosuje się chemioterapię adjuwantową. W przypadku braku reakcji guza na stosowane leczenie lub wystąpienie progresji choroby zmienia się protokół leczenia lub

wykonuje wcześniejszy zabieg operacyjny. U chorych z mięsakiem kościopochodnym leczonych w Instytucie Matki i Dziecka uzyskuje się pełną remisję w około 75% przypadków przy zastosowaniu różnych programów chemioterapii i leczenia operacyjnego (41, 42).

Zasadniczym celem pracy było znalezienie odpowiedzi na pytanie czy u dzieci z mięsakiem kościopochodnym dochodzi do zaburzeń układu odpornościowego w trakcie leczenia. Zauważono, że odpowiedź na to pytanie uzyska się poprzez ocenę wybranych parametrów odporności swoistej – odpowiedzi komórkowej: limfocytów CD3+, CD4+, CD8+, CD3+/HLA-DR+, T γ δ , B oraz komórek NK i NKT.

MATERIAŁ I METODY

Grupa badana

Badania przeprowadzono w grupie 100 osób w wieku 6-20 lat zgłaszających się w latach 2005-2008 do Kliniki Chirurgii Onkologicznej Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie z podejrzeniem guza kości (grupa badana) lub na rutynowe badania kontrolne (grupa kontrolna – porównawcza). Badania laboratoryjne wykonywano po zaakceptowaniu planu badań przez Komisję Bioetyczną przy Instytucie Matki i Dziecka i po uzyskaniu świadomej zgody rodziców badanych dzieci.

Do grupy badanej zakwalifikowano 44 dzieci (21 dziewcząt, 23 chłopców) w wieku od 6 do 20 lat (średnia 14,9; mediana 15,0) z rozpoznaniem w badaniu histopatologicznym mięsakiem kościopochodnym. Kwalifikacji do badań oraz oceny stanu klinicznego pacjentów przed i w trakcie leczenia dokonywał lekarz prowadzący.

Wszyscy pacjenci o trzymywali chemioterapię przedoperacyjną, mieli wykonany zabieg operacyjny i zostali poddani chemioterapii uzupełniającej. Chemioterapia była prowadzona wg protokołu EORTC – 17 (39%) pacjentów, SFOP – 1 (2%) pacjent, COSS 96 – 5 (11%) pacjentów, EURAMOS – 21 (48%) pacjentów.

Kryteriami włączenia pacjentów było:

- rozpoznanie pierwotnego mięsaka kościopochodnego,
- lokalizacja guza w zakresie kończyn,
- przed biopsją nie stosowano chemio- lub radioterapii,
- wiek chorych w chwili rozpoznania do 20. roku życia.

Materiał

Badania laboratoryjne subpopulacji limfocytów wykonano w pełnej krwi obwodowej, badania wykonano czterokrotnie – bad. I przed leczeniem (w chwili rozpoznania); bad. II, po chemioterapii wstępnej (przed zabiegiem operacyjnym); bad. III, 10-14 dni po zabiegu operacyjnym; bad. IV, po 5-6 miesiącach od operacji (po chemioterapii uzupełniającej).

Metody

U 44 pacjentów z grupy badanej oznaczano: limfocyty T i subpopulacje CD4+, CD8+, aktywowane limfocyty T CD3+/HLA-DR+, limfocyty T γ δ , limfocyty B CD19+,

komórki NK, NKT, znakując je odpowiednimi przeciwciałami monoklonalnymi:

- antyIgG1-FITC/IgG2a-PE (kontrola) (BD Bioscience),
- anty CD45-FITC/CD14-PE (BD Bioscience),
- anty CD3-FITC/CD19-PE (BD Bioscience),
- anty CD3-FITC/CD16-PE (BD Bioscience),
- anty CD3-FITC/HLA-DR-PE (BD Bioscience),
- anty TCR γ δ -FITC/CD3-PerCP (BD Bioscience).

Inkubacja z przeciwciałami trwała 15 minut, następnie w celu usunięcia erytrocytów i utrwalenia próbek dodano 100 μ l płynu lizującego – odczynnik A – Dako Uti-Lyse Erythrocyte-Lysing Reagent (Dako Cytomation) Przygotowane próbki mierzono w cytometrze przepływowym w ciągu 24 h.

Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wykorzystano pakiet statystyczny Statistica 8 (Statsoft), przyjęto poziom istotności $p < 0,05$. Do opisu właściwości zmierzonych parametrów badanych pacjentów stosowano statystyki opisowe – wartości średnie, mediany i zakresy. Metody analizy statystycznej stosowano adekwatnie do typu zmiennych. Istotność różnic sprawdzano stosując test U Mann-Whitney'a lub Smirnowa-Kolmogorowa. Analizę wariancji przeprowadzono testem ANOVA Friedmana., test Shapiro-Wilka wykazał, że badane cechy nie mają rozkładu normalnego. Przeprowadzono test Levena w celu sprawdzenia jednorodności wariancji. Zmienne opisujące badane grupy są zmiennymi zależnymi, gdyż badanie to odbywa się na tej samej grupie pacjentów na przestrzeni czasowej czterech badań. Różnice występujące pomiędzy grupami zależnymi badano wielokrotnie testem kolejności par Wilcoxon'a z uwzględnieniem poprawki Bonferroni.

WYNIKI

Pacjentom po rozpoznaniu choroby stosowano chemioterapię zgodnie z obowiązującymi protokołami leczenia mięsaka kościopochodnego. Niezależnie od wyjściowego stadium zaawansowania klinicznego do grupy badanej zakwalifikowano pacjentów, u których uzyskano rozpoznanie OS, i u których okres od biopsji do rozpoczęcia leczenia nie przekroczył 3 tygodni. Wybrani pacjenci nie byli wcześniej leczeni cytostatykami.

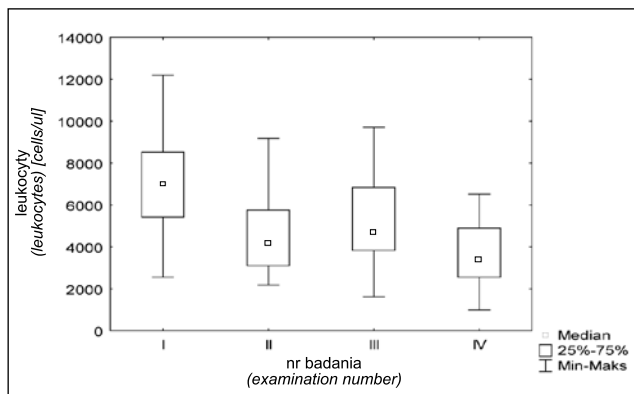
Analizując zależność całkowitej liczby krwinek białych (tab. I) w poszczególnych etapach leczenia (badanie I, II, III, IV) zaobserwowano w kolejnych badaniach obniżenie całkowitej liczby krwinek białych (mediana I badania – 6980 kom/ μ l; mediana IV badania – 3360 kom/ μ l; (tab. I, ryc.1) i ogólnej liczby limfocytów (tab. II, ryc. 2; mediana I badania – 1609 kom/ μ l; mediana IV badania – 1084 kom/ μ l). Wartości odsetkowe populacji limfocytów nie wykazywały różnic statystycznie istotnych. Liczebność grupy badanej uległa zmniejszeniu do 42 pacjentów w badaniu IV z powodu śmierci dwojga dzieci.

Liczba limfocytów CD3+ (tab. III) wahała się w kolejnych badaniach, ulegając obniżeniu po zabiegu operacyjnym – badanie III (912,0 vs 792,0 kom/ μ l) z różnicą statystycznie znamioną dla $p < 0,05$. W badaniu IV liczba limfocytów wzrosła do 887,5 kom/ μ l (ryc. 3).

Tabela I. Liczba krwinek białych krwi obwodowej dzieci z OS w momencie rozpoznania choroby (badanie I) i po zastosowaniu leczenia (badanie II, III, IV).

Table I. The number of leukocytes of peripheral blood in children with osteosarcoma (OS) at diagnosis (examination I), after neoadjuvant chemotherapy (exam. II,) 10-14 days after the surgery (exam. III), 5 months after the surgery (after adjuvant chemotherapy, exam. IV).

Liczba całkowita leukocytów (kom/ μ l) Lymphocytes total number (cells/ μ l)		
Nr badania Examination number	Mediana Median	N number of patients
I	6980,0	44
II	4150,0	44
III	4685,0	44
IV	3360,0	42
p<0,05 dla różnic w kolejnych badaniach p<0.05 for differences in subsequent examinations		I/II; I/III; I/IV



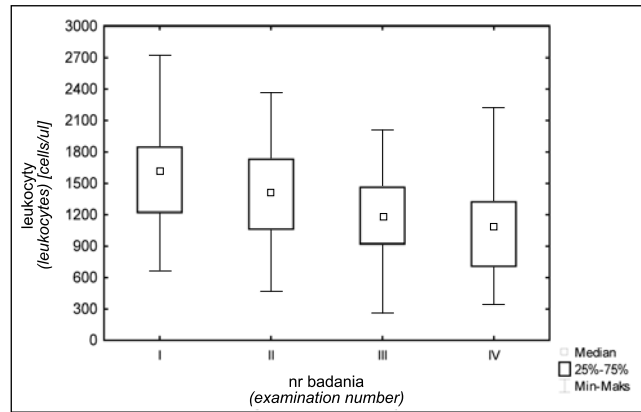
Ryc. 1. Liczba krwinek białych dzieci z OS w badaniach I, II, III i IV.

Fig. 1. The number of leukocytes (examinations I, II, III, IV).

Tabela II. Liczba limfocytów dzieci z OS w I, II, III i IV badaniu.

Table II. The number of peripheral blood lymphocytes in children with osteosarcoma (examinations I, II, III, IV).

Liczba limfocytów (kom/ μ l) Lymphocytes total number (cells/ μ l)		
Nr badania Examination number	Mediana Median	N number of patients
I	1609,0	44
II	1402,0	44
III	1169,0	44
IV	1084,0	42
p<0,05 dla różnic w kolejnych badaniach p<0.05 for differences in subsequent examinations		I/III; I/IV; II/III



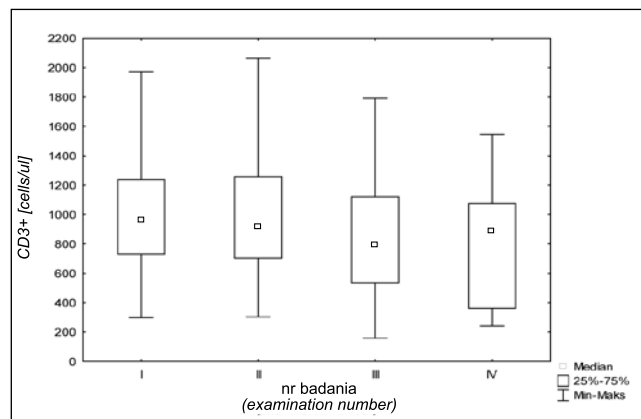
Ryc. 2. Liczba limfocytów dzieci z OS w momencie rozpoznania choroby (badanie I) i po zastosowaniu leczenia (badanie II, III, IV).

Fig. 2. The number of peripheral blood lymphocytes in children with osteosarcoma at diagnosis (examination I), after neoadjuvant chemotherapy (exam. II,) 10-14 days after the surgery (exam. III), 5 months after the surgery (after adjuvant chemotherapy, exam. IV).

Tabela III. Liczba limfocytów CD3+ dzieci z OS w I, II, III i IV badaniu.

Table III. The number of peripheral blood lymphocytes T (CD3+) in children with osteosarcoma (examinations I, II, III, IV).

Liczba komórek CD3+ (kom/ μ l) Lymphocytes CD3+ number (cells/ μ l)		
Nr badania Examination number	Mediana Median	N number of patients
I	957,0	44
II	912,0	44
III	792,0	44
IV	887,5	42
p<0,05 dla różnic w kolejnych badaniach p<0.05 for differences in subsequent examinations		II/III



Ryc. 3. Liczba limfocytów CD3+ dzieci z OS w momencie rozpoznania choroby (badanie I) i po zastosowaniu leczenia (badanie II, III, IV).

Fig. 3. The number of peripheral blood lymphocytes T (CD3+) in children with osteosarcoma at diagnosis (examination I) and after treatment (examinations II, III, IV).

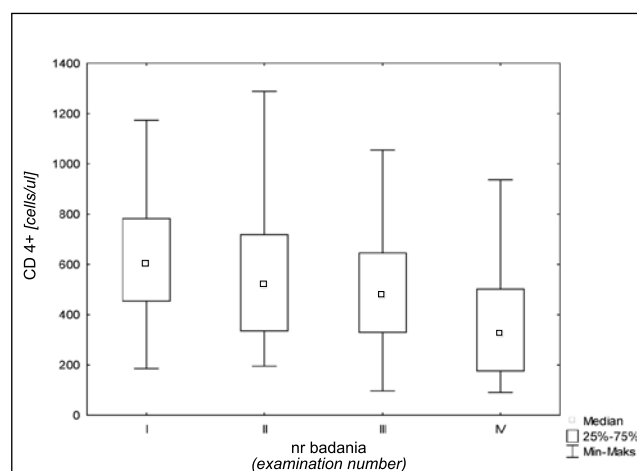
Przy porównaniu subpopulacji CD4+ (tab. IV, ryc. 4) i CD8+ (tab. V) zwraca uwagę większy spadek liczebności subpopulacji CD4+ (mediana I badania – 598 kom/μl; mediana IV badania – 322 kom/μl) lecz możemy mówić jedynie o tendencji spadkowej z ujemną korelacją (-0,34), gdyż mimo obniżania się liczby komórek nie było różnic statystycznie istotnych pomiędzy poszczególnymi badaniami. Liczebność CD8+ uległa nieznacznym wahaniom ze spadkiem w badaniu II i III, po czym wróciła prawie do wartości z badania I (tab. V). Wartości odsetkowe nie wykazały różnic statystycznie znamiennej.

Kursy chemioterapii przyczyniły się przede wszystkim do znacznego zmniejszenia liczby subpopulacji limfocytów B (tab. VI, ryc. 5). Liczba tych limfocytów wynosiła w IV badaniu (24,0 kom/μl) 11,7% wartości wyjściowych. Największy spadek wystąpił pomiędzy pierwszym i drugim

Tabela IV. Liczba limfocytów CD4+ dzieci z OS w I, II, III i IV badaniu.

Table. IV. The number of peripheral blood lymphocytes T (CD4+) in children with osteosarcoma (examinations I, II, III, IV).

Liczba komórek CD4+ (kom/μl) Lymphocytes CD4+ number (cells/μl)		
Nr badania Examination number	Mediana Median	N number of patients
I	598,0	44
II	518,0	44
III	474,5	44
IV	322,0	42
p<0,05 dla różnic w kolejnych badaniach p<0.05 for differences in subsequent examinations		-



Ryc. 4. Liczba limfocytów CD4+ dzieci z OS w momencie rozpoznania choroby (badanie I) i po zastosowaniu leczenia (badanie II, III, IV).

Fig. 4. The number of peripheral blood lymphocytes T (CD4+) in children with osteosarcoma at diagnosis (examination I) and after treatment (examinations II, III, IV).

Tabela V. Liczba limfocytów CD8+ dzieci z OS w I, II, III i IV badaniu.

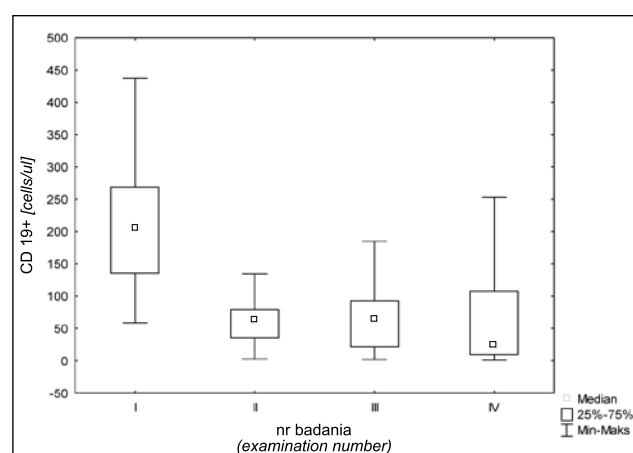
Table. V. The number of peripheral blood lymphocytes T (CD8+) in children with osteosarcoma (examinations I, II, III, IV).

Liczba całkowita komórek CD8+ (kom/μl) Lymphocytes CD8+ number (cells/μl)		
Nr badania Examination number	Mediana Median	N number of patients
I	373,0	44
II	359,0	44
III	297,0	44
IV	383,0	42
p<0,05 dla różnic w kolejnych badaniach p<0.05 for differences in subsequent examinations		-

Tabela VI. Liczba limfocytów B CD19+ dzieci z OS w I, II, III i IV badaniu.

Table. VI. The number of peripheral blood lymphocytes B (CD19+) in children with osteosarcoma (examinations I, II, III, IV).

Liczba limfocytów CD19+ (kom/μl) Lymphocytes CD19+ number (cells/μl)		
Nr badania Examination number	Mediana Median	N number of patients
I	205,0	44
II	62,0	44
III	64,0	44
IV	24,0	42
p<0,05 dla różnic w kolejnych badaniach p<0.05 for differences in subsequent examinations		I/II; I/III; I/IV



Ryc. 5. Liczba limfocytów B CD19+ dzieci z OS w momencie rozpoznania choroby (bad. I) i po zastosowaniu leczenia (bad. II, III, IV).

Fig. 5. The number of peripheral blood lymphocytes B (CD19+) in children with osteosarcoma at diagnosis (examination I) and after treatment (examinations II, III, IV).

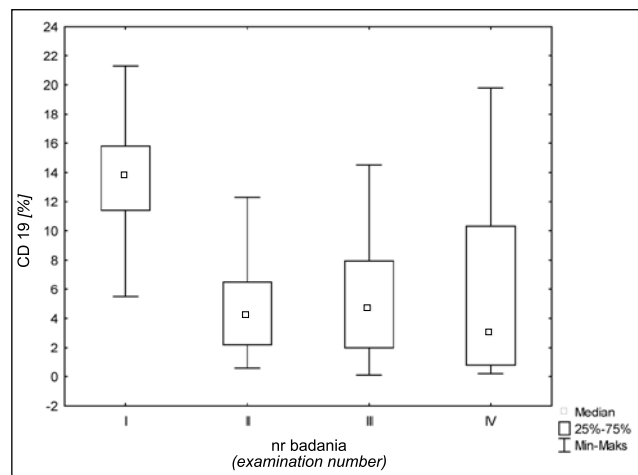
badaniem (205,0 vs 62,0 kom/μl, spadek o 70%, $p < 0,05$). Po zabiegu operacyjnym nie było różnicy w liczbie limfocytów B, kolejny spadek nastąpił po wprowadzeniu chemioterapii pooperacyjnej (IV badanie) mediana I badania – 205 kom/μl, mediana IV badania – 24 kom/μl, $p < 0,05$ (tab. VI, ryc. 5). Zaobserwowano również różnice istotne przy porównywaniu wartości procentowej limfocytów B (tab. VII, ryc. 6).

Spadkowi w kolejnych etapach leczenia ulegała również liczba komórek NK (tab. VIII). W momencie rozpoznania choroby (badanie I) mediana liczby tych komórek wynosiła 161 kom/μl, a po 5 miesiącach stosowania chemioterapii uzupełniającej (badanie IV) spadła do 92 kom/μl. Różnice statystycznie istotne wystąpiły

Tabela VII. Odsetek limfocytów B CD19+ dzieci z OS w I, II, III i IV badaniu.

Table VII. The percentage of peripheral blood lymphocytes B (CD19+) in children with osteosarcoma (examinations I, II, III, IV).

Odsetek CD19+ (kom/μl) The percentage of CD19+(cells/μl)		
Nr badania Examination number	Mediana Median	N number of patients
I	13,8	44
II	4,2	44
III	4,7	44
IV	3,0	42
p<0,05 dla różnic w kolejnych badaniach p<0.05 for differences in subsequent examinations		I/II; I/III; I/IV



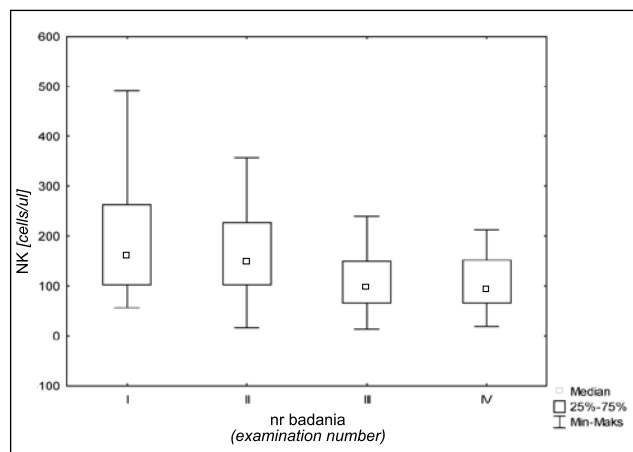
Ryc. 6. Odsetek limfocytów B CD19+ dzieci z OS w momencie rozpoznania choroby (badanie I) i po zastosowaniu leczenia (badanie II, III, IV).

Fig. 6. The percentage of peripheral blood lymphocytes B (CD19+) in children with osteosarcoma at diagnosis (examination I) and after treatment (examinations II, III, IV).

Tabela VIII. Liczba komórek NK dzieci z OS w I, II, III i IV badaniu.

Table VIII. The number of peripheral blood NK cells in children with osteosarcoma (examinations I, II, III, IV).

Liczba całkowita komórki NK (kom/μl) NK total number (cells/μl)		
Nr badania Examination number	Mediana Median	N number of patients
I	161,0	44
II	147,0	44
III	95,5	44
IV	92,0	42
p<0,05 dla różnic w kolejnych badaniach p<0.05 for differences in subsequent examinations		I/III; I/IV; II/III



Ryc. 7. Liczba komórek NK dzieci z OS w momencie rozpoznania choroby (badanie I) i po zastosowaniu leczenia (badanie II, III, IV).

Fig. 7. The number of peripheral blood NK cells in children with osteosarcoma at diagnosis (examination I) and after treatment (examinations II, III, IV).

między badaniem I i III; I i IV oraz II i III (tab. VIII, ryc. 7). Nie zaobserwowano różnic wartości odsetkowej komórek NK w poszczególnych badaniach. Liczba i odsetek komórek NKT nie wykazywały zmian w trakcie leczenia cytotatykami.

Limfocyty T $\gamma\delta$ (tab. IX, ryc. 8) wykazywały tendencję wzrostową w trakcie leczenia cytotatykami, wzrost można zauważyć pomiędzy wyjściowym badaniem i badaniem po zastosowaniu chemioterapii wstępnej (badanie II). Zależność pokazuje tabela wartości procentowych (tab. IX). Nastąpił prawie trzykrotny wzrost ($p < 0,05$) pomiędzy wartością odsetkową limfocytów T $\gamma\delta$ w badaniu I i badaniu II (0,75% vs 2,1%).

Aktywację limfocytów T CD3 określano poprzez oznaczenie liczby komórek wykazujących ekspresję cząsteczek HLA-DR.

Tabela IX. Odsetek limfocytów $T\gamma\delta$ dzieci z OS w I, II, III i IV badaniu.

Table IX. The percentage of peripheral blood lymphocytes $T\gamma\delta$ in children with osteosarcoma (examinations I, II, III, IV).

Odsetek limfocytów $T\gamma\delta$ (kom/ μ l) The percentage of $T\gamma\delta$ (cells/ μ l)		
Nr badania Examination number	Mediana Median	N number of patients
I	0,75	44
II	2,1	44
III	1,7	44
IV	2,6	42
p<0,05 dla różnic w kolejnych badaniach p<0.05 for differences in subsequent examinations		I/II

Tabela X. Odsetek limfocytów $CD3+/HLA-DR+$ dzieci z OS w momencie rozpoznania choroby (badanie I) i po zastosowaniu leczenia (badanie II, III, IV).

Table X. The percentage of peripheral blood lymphocytes $CD3+/HLA-DR+$ in children with osteosarcoma at diagnosis (examination I) and after treatment (examinations II, III, IV).

Odsetek limfocytów $CD3+/HLA-DR+$ (kom/ μ l) The percentage of $CD3+/HLA-DR+$ (cells/ μ l)		
Nr badania Examination number	Mediana Median	N number of patients
I	2,50	44
II	2,40	44
III	2,70	44
IV	5,00	42
p<0,05 dla różnic w kolejnych badaniach p<0.05 for differences in subsequent examinations		I/IV

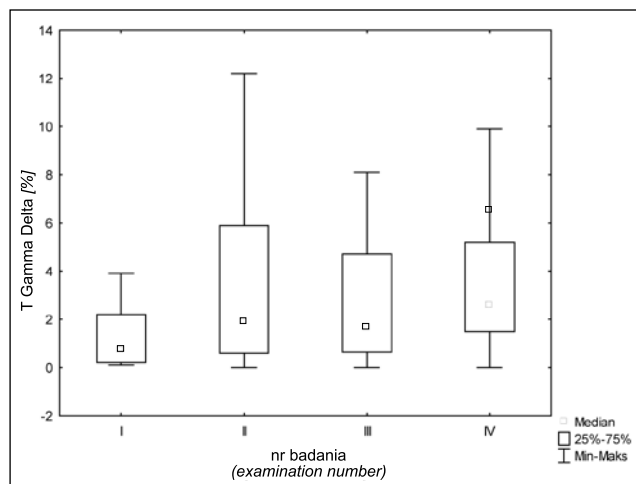
Ryc. 8. Odsetek limfocytów $T\gamma\delta$ dzieci z OS w momencie rozpoznania choroby (badanie I) i po zastosowaniu leczenia (badanie II, III, IV).

Fig. 8. The percentage of peripheral blood lymphocytes $T\gamma\delta$ in children with osteosarcoma at diagnosis (examination I) and after treatment (examinations II, III, IV).

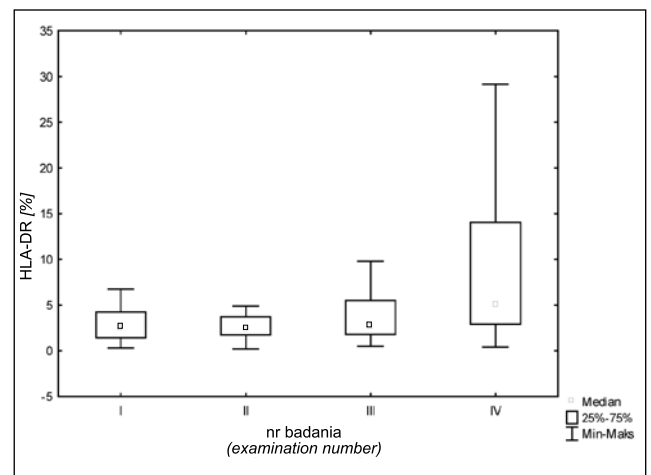
Ryc. 9. Odsetek limfocytów $CD3+/HLA-DR+$ dzieci z OS w momencie rozpoznania choroby (badanie I) i po zastosowaniu leczenia (badanie II, III, IV).

Fig. 9. The percentage of peripheral blood lymphocytes $CD3+/HLA-DR+$ in children with osteosarcoma (examinations I, II, III, IV).

Tabela X i rycina 9 pokazują zmianę składu odsetkowego aktywowanych limfocytów $CD3$ z cząsteczką $HLA-DR$ w kolejnych etapach leczenia. Limfocyty $CD3$ ulegają aktywacji dopiero w IV badaniu tj. po zastosowaniu chemioterapii pooperacyjnej. Występuje dwukrotnie wzrost odsetka limfocytów pomiędzy I a IV badaniem (2,5% vs 5,0%), współczynnik korelacji 0,27 ($p<0,05$).

DYSKUSJA

W onkologii klinicznej najczęściej do leczenia nowotworów wykorzystuje się różnego typu cytostatyki.

Metoda chemioterapii opiera się na założeniach, że zablokowanie replikacji DNA i podziałów komórkowych powstrzyma rozwój nowotworu, jednak niesie ona za sobą ryzyko powstania poważnych skutków niepożądanych. Toksyczność chemioterapii może manifestować się wcześniej, jeszcze w trakcie jej stosowania i dotyczy tkanek podlegających szybkim podziałom komórkowym. Powikłania mogą wystąpić już na etapie podawania pierwszych kuracji. Do cytostatyków stosowanych w nowotworach u dzieci, w mięsaku kościopochodnym, należą: cisplatyna, ifosfamid i cyklofosfamid powodujące uszkodzenia układu nerwowego (polineuro-

patie czuciowe, ruchowe, encefalopatie), uszkodzenie płuc (włóknienie), powikłania naczyniowe (zespoły zakrzepowo-zatorowe, zapalenia żył). Uszkodzenia skóry i utratę włosów powodują wszystkie cytostatyki stosowane w leczeniu osteosarcoma: adriamycyna, etopozyt, matotreksat, cisplatyna i ifosfamid. Cis-platyna dodatkowo uszkadza nerki, a podawanie z ifosfamidem może być przyczyną powstania wtórnych nowotworów litych. Adriamycyna działa kardiotoxycznie, matotreksat uszkadza błonę śluzową jamy ustnej i przełyku. Ifosfamid jest również odpowiedzialny za zapalnie krwiotoczne pęcherza moczowego (39). Chemioterapeutyki stosowane w leczeniu mięsaka kościopochodnego powodują także uszkodzenie szpiku kostnego, w tym komórek macierzystych chemopoezy, będących prekursorami komórek linii limfoidalnej (43). Skutki chemioterapii mogą być odczuwalne wiele miesięcy i lat po zakończeniu leczenia, wtedy też mogą pojawić się objawy uszkodzenia serca, płuc, OUN lub gonad. Jakość życia leczonych pacjentów jest gorsza z powodu przebytych zabiegów operacyjnych często okaleczających, duża część odległych skutków chemioterapii wykazuje progresję z upływem czasu (44).

U dzieci chorych na nowotwory złośliwe w tym nowotwory kości stosuje się intensywną polichemioterapię, jednak mimo jej stosowania u około połowy pacjentów dochodzi w pierwszych dwóch latach od jej zakończenia do nawrotu choroby w postaci przerzutów do płuc. Wyniki leczenia są nadal niezadowalające, często występuje oporność wobec różniących się strukturalnie i czynnościowo chemioterapeutyków. Jest ona przyczyną niewrażliwości komórek nowotworowych na cytostatyki (42). W związku z brakiem efektów leczenia coraz częściej pojawiają się głosy krytycznie oceniające niektóre schematy podawania cytostatyków. Ostatnio naukowcy coraz częściej skłaniają się do wprowadzania indywidualnego leczenia, a także badania kondycji immunologicznej pacjenta w trakcie chemioterapii (45).

W prezentowanej pracy przedstawiono obserwacje i wyniki laboratoryjnych badań immunologicznych prowadzonych przez cztery lata w grupie 44 pacjentów z chorobą nowotworową. Średnia wieku badanych pacjentów wynosiła 14,9 lat (mediana 15,0 lat). Dla zachowania zależności „nowotwór – gospodarz” badania były prowadzone *in vivo*. Biorąc pod uwagę różnice osobnicze reakcji na leczenie oraz szereg czynników wpływających na rozwój guza w jego mikrośrodowisku, analiza układu *in vitro* wydawała się nie oddawać faktycznego stanu zachodzącego w organizmie, podjęto więc próbę przeprowadzenia badań *in vivo* – w momencie rozpoznania choroby i po kolejnych etapach leczenia cytostatykami. Wśród przebadanych przez nas młodych pacjentów z takim samym stopniem agresywności nowotworu i zaawansowaniem choroby rozwinęło odmienny jej obraz i odmiennie zareagowało na leczenie (badania własne, dane nie publikowane).

Leczenie nowotworów złośliwych kości u dzieci i młodzieży jest bardzo trudne i związane z różnym przebiegiem klinicznym choroby. Zgodnie z obowiązującymi obecnie protokołami leczenie mięsaka kościopochodnego składa się z trzech etapów. Etap I polega na chemioterapii wstępnej, stosowanej w celu ograniczenia ogniska pierwotnego i eliminacji mikroprzerzutów. Podaje się doksorubicynę, cisplatynę i wysokie dawki metotreksatu, jednak uzyskiwane efekty leczenia nie są zadowalające. Etap II polega na leczeniu ogniska pierwotnego procesem nowotworowego i oparty jest na chirurgicznym usunięciu guza z marginesem niezmiennych tkanek. W przypadku guzów o dużej objętości niezbędne jest wykonanie zabiegu operacyjnego okaleczającego, polegającego na amputacji. Po zabiegu operacyjnym rozpoczyna się etap III – chemioterapię pooperacyjną (adjuwantową). Rodzaj stosowanych cytostatyków zależy od protokołu leczenia (42). Korzystne efekty leczenia mierzone wieloletnim przeżyciem uzyskuje się głównie w przypadku choroby zlokalizowanej, dzisiaj wiemy, że lepsze wyniki osiąga się indywidualizując dawki stosowanych chemioterapeutyków. Wydaje się jednak, że doboru dawki leku najlepiej byłoby dokonać uwzględniając również status immunologiczny chorego dziecka (46).

Analiza statystyczna wyników uzyskanych w niniejszej pracy stwarzała wiele trudności co związane było z bardzo odmienną reakcją każdego młodego organizmu na prowadzoną chemioterapię. Niestety, opracowania statystyczne w ogóle nie uwzględniają reakcji poszczególnego pacjenta na zastosowane leczenie i nie mówią nic o indywidualnych efektywności leczenia. W grupie ocenianej statystycznie są zarówno chorzy, którzy nie odnieśli żadnej korzyści z zastosowanej terapii, jak i tacy, którzy żyją dłużej. Często uogólnianie i uśrednianie wyników leczenia prowadzi do błędnych wniosków, musimy zdać sobie sprawę ze złudności statystyk i traktować pacjenta oraz jego chorobę w sposób indywidualny (47).

W chorobach nowotworowych rutynowo, w trakcie leczenia, podczas analizy krwi kontroluje się ogólną liczbę limfocytów, natomiast najbardziej zaangażowane w niszczenie komórek guza są limfocyty CD8+, CD4+ i komórki NK. Od chorych na nowotwory można wyizolować z krwi, węzłów chłonnych bądź samego guza swoiste limfocyty T CD8+. Jednak jak wcześniej wspomniano wyizolowane i hodowane *in vitro* nie mogą odzwierciedlać faktycznej liczby tych komórek w organizmie, ani ich funkcji efektorowych (48).

Nie wiadomo jaka powinna być rzeczywista liczba swoistych limfocytów, która mogłaby doprowadzić do pokonania nowotworu. Uczeni badający status immunologiczny chorych na raka pęcherza moczowego zauważyli, wykonując biopsję, małą liczbę naciekających miejscowo limfocytów (CD3, CD4, CD8, NK) w porównaniu do chorych, którym podawano do pęcherza pałeczki BCG. Okazuje się, że dopiero stymulacja układu immunologicznego antygenami bakterii powoduje zwiększony napływ limfocytów do miejsca rozwoju nowotworu oraz uaktywnia znajdujące się tam komórki układu immunologicznego (49). Badania przeprowadzone na modelu zwierzęcym również wykazały, że podanie myszom szczepionki w postaci rekombinowanego adenowirusa z komórkami nowotworowymi powoduje immunizację i łatwiejsze odrzucanie nowotworu a nacieczenie przez

limfocyty CD8+ powstałego guza zależy od aktywacji układu immunologicznego spowodowanego szczepieniem (50). Limfocyty izolowane z guza jak i te krążące we krwi nie są dostatecznie pobudzone aby wypełnić swoje funkcje efektorowe, a ich mniejsza liczba u chorych z nowotworem dodatkowo zmniejsza tę możliwość.

W prezentowanej pracy podjęto próbę analizy zmian liczby poszczególnych komórek układu immunologicznego oraz liczby limfocytów z markerem aktywacji w kolejnych etapach leczenia choroby nowotworowej. Liczba leukocytów i całkowita liczba limfocytów spadła w trakcie leczenia cytostatykami, jednak dopiero po dokładniejszej analizie można było określić, która z subpopulacji uległa największym zaburzeniom. Tak, jak w przypadku oceny wyjściowego statusu immunologicznego pacjentów z OS, tak i w ocenie statusu w poszczególnych etapach leczenia daje się zauważyć spadek liczebności subpopulacji limfocytów T i B. Jak wykazała w swojej pracy K. Markiewicz na obniżenie się ogólnej liczby limfocytów największy wpływ ma spadek liczby limfocytów B CD19+. Obniżeniu ulega również subpopulacja limfocytów T głównie limfocytów T CD4+, natomiast komórki CD8+ okazały się być subpopulacją bardziej odporną na zastosowaną chemioterapię (46).

Według wielu autorów obniżenie się liczby limfocytów po terapii przeciwnowotworowej powoduje spadek swoistej odporności komórkowej (limfocyty T) oraz humoralnej, za którą odpowiedzialne są limfocyty B (51). Zgodnie z opinią wielu autorów zmniejszenie liczby limfocytów T poniżej 400 kom/ μ l jest związane ze złą prognozą, zwiększa ryzyko wystąpienia zakażeń oportunistycznych, a zmniejszenie liczby limfocytów B ryzyko zakażeń bakteriami ropotwórczymi (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*) (52).

Rozkład fenotypowy limfocytów w chorobach nowotworowych jest bardzo różny i mało charakterystyczny dla typu nowotworu oraz stopnia zaawansowania choroby, w niektórych nowotworach może nawet dojść do wzrostu liczby aktywowanych limfocytów T i komórek NK (53). W 1992 roku Kaver, Pecht i wsp. pisali, że spadek we krwi obwodowej liczby komórek CD4+ wraz z odwróceniem stosunku CD4/CD8 koreluje z gorszym rokowaniem i naciekającym charakterem wzrostu raka pęcherza (54). Obniżenie liczby limfocytów powoduje także zmianę profilu cytokin w surowicy krwi. Pomiar stężenia cytokin może być więc narzędziem oceny funkcji odporności komórkowej (55, 56, 57).

W trakcie prowadzonych przez nas badań zaobserwowano, że stosowana u pacjentów z mięsakiem kościopochodnym chemioterapia nie wpływa supresyjnie na limfocyty cytotoksyczne CD8+ (Tc), ich liczba jest stabilna w ciągu całego leczenia (badanie I-IV). Analiza liczby i odsetka limfocytów T CD4+ ujawniła większą wrażliwość tych komórek na działanie cytostatyków, zauważono obniżenie liczby limfocytów CD4+ o 35-60% (46). Wyniki te potwierdzają obserwacje innych autorów odnośnie obniżenia liczby limfocytów CD4+ w chorobach nowotworowych u dorosłych pacjentów

(53, 58, 59). Niewątpliwym zaskoczeniem jest bardzo duży spadek populacji limfocytów B w czasie trwania terapii antynowotworowej. Jest to poniekąd zrozumiałe, ponieważ cytostatyki działając głównie na komórki intensywnie się dzielące uszkadzają komórki macierzyste chemopoezy i komórki dojrzewające w szpiku kostnym. Mała liczba limfocytów B we krwi obwodowej świadczy o uszkadzającym działaniu stosowanej chemioterapii i o ile populacja granulocytów jest w stanie powrócić do normy po samoistnej regeneracji szpiku, to populacja limfocytów B CD19+ pozostaje zmniejszona (46).

Chemioterapia prawdopodobnie uszkadzając komórki progenitorowe limfopoezy, blokuje powstawanie limfocytów B, natomiast limfocyty B CD19+ obecne w obwodowych narządach limfatycznych zachowują przez pewien okres zdolności do syntezy przeciwciał. Nie wiadomo jakie będzie stężenie immunoglobulin po całkowitym zakończeniu leczenia i jak będzie się kształtowało wraz z upływem czasu (badania własne, dane nie publikowane).

Częstym zjawiskiem jest nawrót choroby nowotworowej w przeciągu dwóch lat oraz ujawnienie się odległych skutków chemioterapii mimo zakończenia leczenia (40, 60). Możliwe, że wówczas dochodzi do osłabienia syntezy immunoglobulin albowiem liczba limfocytów B CD19+ uległa obniżeniu w trakcie kolejnych etapów stosowania terapii przeciwnowotworowej, a pula istniejących zginie w wyniku apoptozy po kilku tygodniach. Wyjaśnienie tego zjawiska wymaga dłuższego okresu obserwacji, należałoby także zwrócić uwagę na komórki pamięci, których liczba może okazać się niewystarczająca do zapewnienia odpowiedniej syntezy przeciwciał (46). Warto również zwrócić uwagę na funkcję limfocytów B jako komórek prezentujących antygeny, zdolnych do syntezy IL-12 będącej czynnikiem stymulującym proliferację komórek NK i pobudzającym je do wytwarzania IFN- γ (61). Obniżenie liczby limfocytów B CD19+ może mieć wpływ na spadek liczby komórek NK u pacjentów z mięsakiem kościopochodnym. W publikacjach podkreśla się rolę wspomagającą komórek NK w zwalczaniu nowotworu, niejednokrotnie wzrost liczby tych komórek związany jest z dobrą prognozą i wydłużeniem czasu przeżycia (62). Niestety wśród pacjentów z OS zaobserwowaliśmy spadek liczby komórek NK w przebiegu leczenia. Wszyscy pacjenci w badaniu przeprowadzonym po chemioterapii pooperacyjnej, niezależnie od stanu klinicznego, mieli obniżoną w stosunku do wyjściowej liczbę komórek NK (46). Komórki NK podobnie jak limfocyty B i T powstają w szpiku kostnym ze wspólnej komórki progenitorowej limfopoezy tam też dojrzewają w obecności IL-15 i IL-4. Dojrzałe komórki NK przez pewien czas krążą we krwi a następnie osiedlają się w różnych narządach, gdzie mogą proliferować (wątroba, śledziona, płuca, węzły limfatyczne) (63). Są również obecne w miejscu rozwijającego się nowotworu stanowiąc 5-27% naciekających guz limfocytów (50). Aby komórki NK mogły spełnić swoją rolę ich liczba powinna wynosić średnio 10% limfocytów krwi obwodowej (64). Zarówno sam nowotwór, jak i stosowane chemioterapeutyki działają mielo toksycznie uszkadzając komórki macierzyste, leki

które otrzymują pacjenci z OS głównie adriamycyna, cisplatyna, ifosfamid i w dużej dawce metotreksat mogą powodować zaburzenia chemopoezy przyczyniając się do spadku m.in. liczby komórek NK (43). Wprawdzie powikłania określane przez lekarzy klinicystów jako hematologiczne wystąpiły u 14 dzieci (32%), to dopiero bardziej szczegółowa analiza krwi uwzględniająca komórki układu immunologicznego, ujawniła zaburzenia u wszystkich pacjentów z OS. Obserwacja pacjentów po kolejnych kuracjach pokazała stopniowy spadek liczby komórek NK jednak na tym etapie badań nie można stwierdzić czy obniżona liczba komórek spowoduje pogorszenie stanu klinicznego dzieci z chorobą nowotworową (46).

Chemioterapia uzupełniająca prowadziła przeważnie do pogorszenia ocenianych parametrów układu immunologicznego bez względu na schemat podawania i rodzaj stosowanych cytostatyków, czy też na stan kliniczny pacjentów. Leczenie przeciwnowotworowe powodowało nieznaczny wzrost liczby limfocytów NKT, T $\gamma\delta$ i nieswoistą aktywację limfocytów T mierzoną wzrostem liczby komórek z ekspresją cząsteczki CD3+/HLA-DR (46).

Obserwacja dzieci i młodych pacjentów z osteosarcoma pokazuje, że mechanizmy obronne chorego nie są w stanie całkowicie zahamować nowotworzenia, podobnie jak nie są w stanie zapobiec rozwojowi w organizmie chorób wirusowych czy bakteryjnych. Najistotniejszą funkcją układu immunologicznego jest niedopuszczenie do progresji choroby i na tym zagadnieniu skupiamy od wielu lat najwięcej uwagi. Na obecnym etapie wiedzy jesteśmy w stanie jedynie opracowywać możliwie najskuteczniejsze sposoby leczenia, które nie byłyby tak toksyczne i nie uszkadzałyby komórek układu immunologicznego doprowadzając do jego dalszej supresji.

WNIOSKI

1. U dzieci i młodzieży z mięsakiem kościopochodnym leczenie przeciwnowotworowe przyczynia się do supresji układu immunologicznego, zdecydowanie obniżając liczbę i odsetek limfocytów CD3+, CD4+, CD19+ (B) i NK.
2. Obniżenie liczby limfocytów w trakcie stosowania chemioterapii może przyczyniać się do progresji choroby nowotworowej po zakończeniu leczenia.
3. Ocena statusu immunologicznego pacjentów z osteosarcoma w różnych etapach leczenia może być pomocna w monitorowaniu efektu terapii przeciwnowotworowej, może zapobiegać powstawaniu niekorzystnych zmian klinicznych, być podstawą korekcji wyboru i dawkowania cytostatyków.

PIŚMIENNICTWO

1. Male D., Roth D.B., Roitt I. i wsp.: Immunologia, Wydawnictwo Medyczne Urban&Partner, Wrocław, 2008, 107-147.
2. Lipscomb M.F., Masten B.J.: Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol. Rev.* 2002, 82, 97-130.
3. Mackiewicz S.: Immunologia, PZWL, Warszawa, 2000, 285-320, 417-425.
4. Butcher E.C., Williams M., Youngman R. i wsp.: Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv. Immunol.*, 1999, 72, 209-253.
5. Wang J.H., Reinherz E.L.: Structural basis of T cell recognition of peptides bound to MHC molecules. *Mol. Immunol.* 2002, 38, 1039-1048.
6. Kakoulidou M., Giscombe R., Zhao X.: Human Soluble CD80 is generated by alternative splicing and recombinant soluble CD80 binds to CD28 and CD152 influencing T-cell activation. *Scand. J. Immunol.*, 2007, 66 (5), 529-537.
7. Old L.J., Boyse E.A., Clarke D.A. i wsp.: Antigen properties of chemically-induced tumors. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1962, 101, 80-106.
8. Rouse B.T., Rollinghoff M., Warner N.L.: Anti-theta serum-induced suppression of the cellular transfer of tumour-specific immunity to a syngenic plasma cell tumour. *Nat. New Biol.*, 1972, 238, 116-117.
9. Leclerc J.C., Gomard E., Levy J.P.: Cell-mediated reaction against tumors induced by oncornaviruses. Kinetics and specificity of the immune response in murine sarkoma virus (MSV) – induced tumors and transplanted lymphomas. *Int. J. Cancer*, 1972, 10, 589-601.
10. Thevethia S.S., Blasecki J.W., Vaneck G. i wsp.: Requirement of thymus-derived theta-positive lymphocytes for rejection of DNA virus (SV40) tumors in mice. *J. Immunol.* 1974, 113, 1417-1423.
11. Abe T., Shinohara N., Tada M. i wsp.: Infiltration of Epstein-Barr virus-harboring lymphocytes occurs in a large subset of bladder cancers. *Int. J. Urol.*, 2008, 15 (5), 429-434.
12. Klein G., Sogren H.O., Klein E.: Demonstration of resistance against methylchlorantrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res.* 1960, 20, 1561-1572.
13. Krike M.L.: Antigenicity of marine skin induced by ultraviolet light. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1974, 53, 1333-1336.
14. Spellman C.W., Daynes R.A.: Ultraviolet light, tumors and suppressor T cells. *Hum. Pathol.*, 1981, 12, 299-301.
15. Clark W.H., Elder D.E., Guery D.: Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1989, 81, 1893-1904.
16. de la Cruz-Merino L., Grande-Pulido E., Albero-Tamarit A. i wsp.: Cancer and immune response: old and new evidence for future challenges. *Oncologist.*, 2008, 13 (12), 1246-1254.
17. Uppaluri R., Dunn G.P., Lewis J.S. Jr.: Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in head and neck cancers. *Cancer Immunol.*, 2008, 4, 8, 16-20.
18. Thomas W.D., Hersey P.: TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *J. Immunol.*, 1998, 161, 2195-2200.
19. Knutson K.L., Dissis M.L.: Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2005, 54, 721-728.
20. Lespagnart L., Gancberg D., Rouas D. i wsp.: Tumor-infiltrating dendritic cells in adenocarcinomas of the breast: a study of 143 neoplasms with a correlation to usual prognostic factors and to clinical outcome. *Int. J. Cancer*, 1999, 84, 309-314.

21. *Atomonte M., Fonsatti E., Visintin A. i wsp.:* Targeted therapy of solid malignancies via HLA class II antigens: a new biotherapeutic approach. *Oncogene*, 2003, 22, 6564-6569.
22. *Trieb K., Lechleitner T., Lang S. i wsp.:* Evaluation of HLA-Dr expression and T-lymphocyte infiltration in osteosarcoma. *Pathol. Res. Pract.*, 1998, 194, 679-684.
23. *Wróblewski J.M., Bixby D.L., Borowski C. i wsp.:* Characterization of human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines for expression of MHC, co-stimulatory molecules and tumor-associated antigens. *Lung Cancer*, 2001, 33, 181-194.
24. *Topalian S.L., Rivoltini L., Mancini M. i wsp.:* Melanoma specific CD4+ T lymphocytes recognize human melanoma antigens processed and presented by Epstein-Barr virus-transformed B cells. *Int. J. Cancer*, 1994, 58, 69-79.
25. *Schattner E.J., Mascarenhas J., Bishop J. i wsp.:* CD4+T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells. *Blood*, 1996, 88(4), 1375-1382.
26. *Hung K., Hayashi R., Lafond-Walker A. i wsp.:* The central role of CD4+T cells in the antitumor immune response. *J. Exp. Med.*, 1998, 188, 2357-2368.
27. *Corthay A., Skovseth D.K., Lundin K.U. i wsp.:* Primary antitumor immune response mediated by CD4+T cells. *Immunity*, 2005, 22, 371-383.
28. *Perez-Diez A., Joncker N.T., Kyungho Ch. i wsp.:* CD4 cells can be more efficient AT tumor rejection than CD8 cells. *Blood*, 2007, 109, 5346-5354.
29. *Ahmed R., Gray D.:* Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science*, 1996, 272, 54-60.
30. *Kowalski M.L. (red.):* Immunologia, MEDITON, Łódź, 2000, 1-83, 657-704.
31. *Lasek W., Jakubisiak M.:* Populacje i subpopulacje limfocytów. W: *Immunologia*. Red. Gołąb J., Jakubisiak M., Lasek W., Stokłosa T. PWN, Warszawa, 2009, 173-180.
32. *Dudley M.E., Wunderlich J.R., Robbins P.F. i wsp.:* Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumour lymphocytes. *Science*, 2002, 298, 850-854.
33. *Dudley M.E., Wunderlich J.R., Yang J.C. i wsp.:* Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 2005, 23(10), 2346-2357
34. *Rosenberg S.A.:* Progress in human immunology. *Nature*, 2001, 411: 380-384.
35. *Cariappa A., Pillai S.:* Antigen dependent B-cell development. *Curr. Opin. Immunol.*, 2002, 14, 241-245.
36. *Glińska H.:* Onkologia ogólna. Instytut Onkologii, Warszawa, 1982, 37-105, 123-187.
37. *Bergers G., Benjamin L.E.:* Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Rev. Cancer*, 2003, 3, 401-410.
38. *De Wever O., Mareel M.:* Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J. Pathol.*, 2003, 200, 429-447.
39. *Manabe Y., Toda S., Miyazaki K. i wsp.:* Mature adipocytes but not preadipocytes, promote the growth of breast carcinoma cells in collagen gel matrix culture through cancer-stromal cell interactins. *J. Pathol.*, 2003, 201, 221-228.
40. *Trinchieri G.:* Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.*, 1998, 47, 187-196.
41. *Kordek R. (red.):* Onkologia, Medical Press, Gdańsk 2003, 1-103.
42. *Zalewska-Szewczyk B., Stolarska M., Bodalski J.:* Odległe skutki leczenia przeciwnowotworowego u dzieci. *Przegląd Pediatryczny*, 1999, 29(3), 212-215.
43. *Woźniak W., Rychłowska M., Kuczabski M. i wsp.:* Ocena wskazań i możliwości leczenia tzw. oszczędzającego, mniej okaleczającego, w najczęstszych nowotworach złośliwych kości u dzieci i młodzieży. *Med. Wieku Rozw.*, 2000, 4, supl. 2, 84-93
44. *Woźniak W., Rychłowska-Pruszyńska M., Ługowska I. i wsp.:* Osteosarcoma u dzieci – wynik leczenia onkologicznego wg protokołu SFOP OS-94 i EORTC- randomizowane badania w ramach PPGGL. *Przegl. Lek.*, 2003, t. 60, supl. 5, O-20, 80.
45. *Hegyi M., Gulacsi E., Csagoly E. i wsp.:* Clinical relations of methotrexate pharmacokinetics in the treatment for pediatric osteosarcoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2012, 138(10), 1697-1702.
46. *Longhi A., Ferrari S., Tamburini A. i wsp.:* Late effects of chemotherapy and radiotherapy in osteosarcoma and Ewing sarcoma patients: the Italian Sarcoma Group Experience (1983-2006). *Cancer*, 2012, 15, 18(20), 5050-5059.
47. *Demke W.C., Suto T., Reck M.:* Target therapies for non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2010, 67(3), 257-274.
48. *Markiewicz K.:* Ocena wybranych elementów odporności komórkowej u dzieci z mięsakiem kościopochodnym. Praca doktorska, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 2009.
49. *Markiewicz K., Zeman K., Kozar A., Gołębiowska-Wawrzyniak M., Woźniak W.:* Ocena stanu immunologicznego dzieci i młodzieży z mięsakiem kościopochodnym w momencie rozpoznania choroby. *Med. Wieku Rozwoj.*, 2012, XVI, 3, 212-221.
50. *Krause M., Schmitz M., Noessner E. i wsp.:* Adoptive transfer of cytotoxic T-cells for treatment of residual disease after irradiation. *Int. J. Radiat.*, 2007, 28, 1-10.
51. *Saint F., Patard J., Groux Muscatelli B. i wsp.:* Evaluation of cellular tumor rejection mechanisms in the peritumoral bladder wall after bacillus Calmette-Guerin treatment. *Brit. J. Urol. Int.*, 2001, 88, 602-610.
52. *Kowalczyk D.:* Analiza wybranych mechanizmów efektorowych w modelu odrzucania komórek nowotworowych. Rozprawa habilitacyjna, Akademia Medyczna Poznań 2002.
53. *Kosmidis S., Baka M., Bouhoutsou D. i wsp.:* Longitudinal assessment of immunological status and rate at immune recovery following treatment in children with ALL. *Pediatr. Blood Cancer*, 2008, 50, 528-532.
54. *Zeman K., Fornalczyk-Wachowska E.:* Oraz kliniczny niedobór odporności. W: *Zaburzenia odporności u dzieci*. Red. Zeman K. PZWL, Warszawa, 2002, 67-74.
55. *Żeromski J., Dworacki G.:* Ocena immunofenotypu komórek limfoidalnych przy pomocy cytometrii przepływowej – uwagi praktyczne i zastosowanie kliniczne. *Pol. J. Immunol.*, 1996, 21, 99-106.
56. *Kaver I., Pecht M., Trainin W. i wsp.:* T lymphocytes subsets and function in the peripheral blood of patients with urological cancer. *Oncol. Switzer.*, 1992, 49, 148-156.
57. *Agarwal A., Verma S., Burra U. i wsp.:* Flow cytometric analysis Th1 and Th2 cytokines in PBMCs as a parameter of immunological dysfunction in patients of superficial transitional cell carcinoma of bladder. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2006, 55 (6), 734-743.

58. Papadavid E., Economidou J., Psarra A. i wsp.: The relevance of peripheral blood T-helper 1 and 2 cytokine pattern in the valuation of patients with mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Brit. J. Dermatol.*, 2003, 148(4), 709-718.
59. Wuertz B., Manivel J., Furcht L.: Progression and enhancement of metastatic potential after exposure of tumor cells to hemotherapeutic. *Cancer Res.*, 2001, 61, 2857-2861.
60. Byrne S., Halliday G.: High levels Fas ligand and MHC class II in the absence of CD80 or CD86 expression and decreased CD4+ T cell infiltration, enables murine skin tumours to progress. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2003, 52, 396-402.
61. Krawczyk P., Wójcik M., Chocholska S. i wsp.: Immunological system status in different stages of lung cancer. *Pol. J. Environ. Stud.*, 2005, 14, Suppl. II, 256-261.
62. Green M.D. Late effects of treatment of cancer in children and adolescents. w: *Cancer Medicine 5th Edition*, BC. Decker, 2000, Section 39. chapter 137D, 1138-1158.
63. Pinto D.R.: B cells as antigen presenting cells. *Cellular Immunity*. 2005, 238, 67-75
64. Albertson P.A., Basse P.H., Hokland M. i wsp.: NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends Immunol.*, 2003, 24(11), 603-609.
65. Gołąb J., Jakubisiak M., Lasek W. (red.) *Immunologia*, PWN, Warszawa, 2009, 55-204, 223-285, 479-796.
66. Poli A., Michel T., Theresine M. i wsp.: CD56 bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*. 2009, 126(4), 458-465.

Wkład Autorów/Authors' contributions

Według kolejności/According to the order of the Authorship

Konflikt interesu/Conflicts of interest

Autorzy pracy nie zgłaszają konfliktu interesów.
The Authors declare no conflict of interest.

Nadesłano/Received: 06.08.2013 r.

Zaakceptowano/Accepted: 08.10.2013 r.

Published online/Dostępne online

Adres do korespondencji:
Katarzyna Markiewicz
Zakład Immunologii Klinicznej
Instytut Matki i Dziecka
ul. Kasprzaka 17a, 01-211 Warszawa
e-mail: katmarkiewicz@imid.med.pl