Laboratorinė medicina.
2017, t. 19, Nr. 2(74), p. 87–92.

Ūmine mieloblastine leukemija sergančių vaikų limfocitų subpopuliacijų predikcinė reikšmė atsakui į chemoterapiją (žvalgomasis tyrimas)

Vilma Rutkauskaitė[1, 2]
Lina Ragelienė[2, 3]
Rėda Matuzevičienė[4, 5]
Katažina Sinkevič[4]
Rimantas Eidukevičius[6]
Dainius Characiejus[1, 7]

[1] *Patologijos, teismo medicinos ir farmakologijos katedra, Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas, Vilnius*
Department of Pathology, Forensic Medicine and Pharmacology, Faculty of Medicine, Vilnius University, Vilnius, Lithuania
El. paštas: vilma.rutkauskaite@gmail.com

[2] *Vaikų onkohematologijos centras, Vaikų ligoninė, Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų filialas*
Center of Pediatric Oncology and Hematology, Children's Hospital, Affiliate of Vilnius University Hospital Santariskiu klinikos, Vilnius, Lithuania

[3] *Vaikų ligų klinika, Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas, Vilnius*
Clinic of Children's Diseases, Faculty of Medicine, Vilniaus University, Vilnius, Lithuania

[4] *Laboratorinės medicinos centras, Vilniaus universiteto ligoninė Santariškių klinikos, Vilnius*
Centre of Laboratory Medicine, Vilnius University Hospital "Santariskiu Klinikos", Vilnius, Lithuania

[5] *Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedra, Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas, Vilnius*
Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Vilnius University, Vilnius, Lithuania

[6] *Matematkos ir informatikos fakultetas, Vilniaus universitetas, Vilnius*
Faculty of Mathematics and Informatics, Vilnius University, Vilnius, Lithuania

[7] *Inovatyvios medicinos centras, Vilnius*
Center for Innovative Medicine, Vilnius, Lithuania

Santrauka

Darbo tikslas. Nustatyti chemoterapijos poveikį periferinio kraujo B, NK ląstelių ir T limfocitų subpopuliacijų pokyčiams ir subpopuliacijų predikcinę reikšmę vaikams, sergantiems ūmine mieloblastine leukemija ir gydytiems Vaikų ligoninės, Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų filialo, Vaikų onkohematologijos skyriuje.

Tyrimo medžiaga ir metodai. Į tyrimą buvo įtraukti vaikai (0–18 m.), sergantys ūmine mieloblastine leukemija ir gydyti pagal Nopho – DBH 2012 protokolą ir ML DS 2006. B ($CD19^+$), NK ląstelių ($CD3^-CD56^+$) ir T limfocitų subpopuliacijų ($CD3^+CD4^+$, $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD8^+CD57^+$, $CD3^+CD8^+CD57^-$) kiekis periferiniame kraujyje buvo nustatytas prieš pradedant gydymą citostatikais ir 22-ą gydymo dieną. Tyrimai buvo atliekami tėkmės citometrijos metodu.

Rezultatai. Tyrime dalyvavo 8 vaikai (amžiaus vidurkis – 46 mėn., nuo 8 iki 133 mėn.). Prieš pradedant gydymą blogo atsako ligoniams $CD3^+CD4^+$ limfocitų kiekis buvo didesnis nei 5979 ląstelės/ l, palyginti su ligoniais, kuriems buvo gautas geras atsakas – ne daugiau kaip 4346 ląstelės/ l. $CD3^+CD8^+CD57^-$ limfocitų kiekis blogo atsako ligoniams prieš gydymą buvo daugiau nei 3711 ląstelių/ l, o ligoniams, kuriems buvo gautas geras atsakas į gydymą, šių limfocitų kiekis nesiekė 3200 ląstelių/ l. Gydymo pradžioje T reguliacinių limfocitų kiekis ligoniams, kuriems negauta atsako į gydymą, buvo daugiau kaip 148 ląstelės/ l, o ligoniams, kuriems gautas atsakas, – 45 ląstelės/ l.

Išvados. Gero ir blogo atsako ligonių B ir NK limfocitų kiekiai periferiniame kraujyje nesiskyrė. $CD3^+CD4^+$ limfocitų ir ypač $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ limfocitų kiekiai periferiniame kraujyje iki gydymo buvo smarkiai mažesni gero atsako ligoniams, palyginti su blogo atsako ligoniais. Gero atsako ligoniai prieš gydymą turėjo gerokai mažiau $CD3^+CD8^+CD57^-$ limfocitų negu blogo atsako ligoniai. Šių limfocitų smarkiai sumažėjo blogo atsako ligoniams, palyginti su gero atsako ligoniais.

Reikšminiai žodžiai: vaikai, limfocitų subpopuliacijos, ūminė mieloblastinė leukemija, chemoterapija, Treg ląstelės.

ĮVADAS

Ūminė mieloblastinė leukemija (ŪML) – piktybinė kraujo liga, kuriai būdingi specifiniai genetiniai pakitimai kamieninėse mieloidinės kilmės kaulų čiulpų ląstelėse. Dažnis – 7 atvejai 100 000 vaikų iki 15 metų amžiaus [1, 2]. Per pastaruosius tris dešimtmečius smarkiai pagerėjo gydomų vaikų išgyvenamumas, kuris siekia 60–70 %. Tai pasiekta skirstant ligos rizikos grupes, intensyvinant gydymą, gerinant palaikomąją terapiją [2–4]. Vis dėlto nepaisant intensyvios chemoterapijos liga atsinaujina apie 30 % ligonių, o 5–10 % miršta nuo komplikacijų [2].

Onkohematologinėmis ligomis sergančių žmonių išgyvenamumas priklauso nuo ligos stadijos, atsako į gydymą. Kartais turint tuos pačius molekulinius, citogenetinius tyrimų rezultatus atsakas į gydymą būna skirtingas.

Gydymo intensyvumas priklauso nuo rizikos grupės: standartinės rizikos ligoniai gydomi tik chemoterapija, didelės rizikos ligoniams pasiekus ligos remisiją atliekama alogeninė kraujodaros kamieninių ląstelių transplantacija. Rizikos grupės priklauso nuo atsako į gydymą, molekulinių žymenų ir citogenetikos [2]. Veiksniai, nulemiantys rizikos grupes, nuolat peržiūrimi, ieškoma naujų predikcinių žymenų, kurie leistų parinkti atitinkamą gydymą ir pagerintų ligonių išgyvenamumą. Bet net turint gerus prognozės rodiklius liga atsinaujina, kai kuriais atvejais išsivysto atsparumas chemoterapijai. Šiuo metu nekelia abejonių organizmo imuninės sistemos vaidmuo onkogenezės procese. Įvairių autorių duomenimis, imuninės sistemos būklė sergant onkohematologinėmis ligomis turi įtakos gydymo atsakui, išgyvenamumui. Nustatyti imunologiniai predikciniai žymenys konkrečiam ligoniui leistų parinkti optimalų gydymo būdą [5–9].

DARBO TIKSLAS

Šio darbo tikslas – nustatyti limfocitų subpopuliacijų predikcinę reikšmę gydant chemoterapija vaikus, sergančius ūmine mieloblastine leukemija (ŪML).

TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

Vaikams, sergantiems ŪML ir gydytiems Vaikų ligoninės, VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų filialo, Vaikų onkohematologijos skyriuje, limfocitų ir jų subpopuliacijų kiekis nustatytas 2013 m. spalio – 2016 m. sausio mėn. Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Laboratorinės medicinos centro Hematologijos ir bendrosios citologijos tėkmės citometrijos padalinyje. Tyrimui atlikti 2010 m. gegužės 5 d. gautas Vilniaus regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto leidimas Nr. 158200-05-186-44. Biomediciniam tyrimui atlikti vaikams iki 12 metų gauti tėvų ar globėjų rašytiniai sutikimai, vyresniems nei 12 metų gauti ir pačių vaikų rašytiniai sutikimai. Įtraukimo kriterijai: vaikai, sergantys ŪML. Neįtraukimo kriterijai: anksčiau taikytas gydymas nuo naviko (įskaitant steroidus), ligos, galinčios lemti periferinio kraujo limfocitų kiekį (įskaitant mielodisplazijos sindromą).

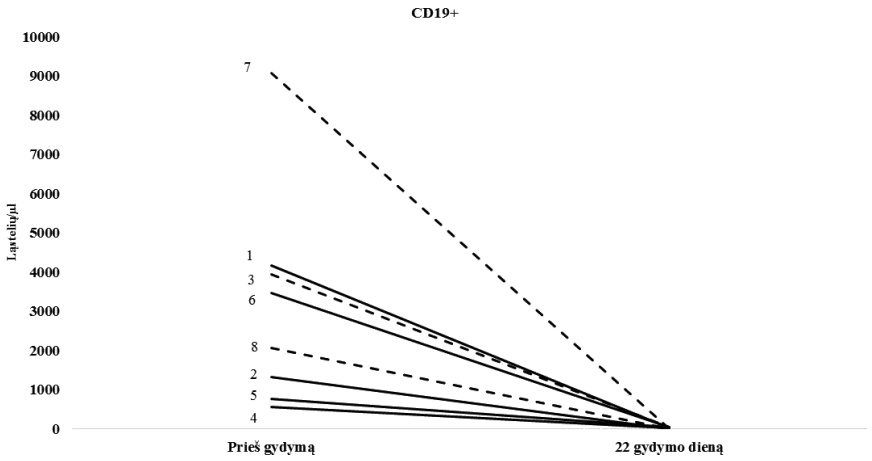
Iš viso įtraukta 8 ligoniai: 7 gydyti pagal NOPHO – DBH 2012 gydymo protokolą (0–18 metų vaikų ir paauglių, sergančių ŪML, gydymo protokolas) [10]. Šie ligoniai pirmo chemoterapijos – indukcijos bloko metu gavo citozarą (200 mg/m^2 12 val. infuzija į veną (įv) 6–12 dienomis (jei <1 m. ar kūno svoris <10 kg, skirta 6,7 mg/kg); mitoksantroną (5 mg/m^2 1 val. infuzija įv 6–10 dienomis (jei <1 m. ar kūno svoris <10 kg, skirta 0,17 mg/kg); etopozidą (150 mg/m^2 2 val. infuzija įv 1–5 dienomis (jei <1 m. ar kūno svoris <10 kg, skirta 5 mg/kg); metotreksatą (MTX) intratekaliai (dozė priklauso nuo amžiaus: <1 m. – 6 mg; nuo 1 m. iki 2 m. – 8 mg; nuo 2 m. iki 3 m. – 10 mg; 3 m. – 12 mg) 6 gydymo dieną (jei ligoniui MTX buvo suleistas diagnozuojant ligą, 6 dieną metotreksatas nebuvo suleistas intratekaliai). Vienam ligoniui buvo diagnozuota neuroleukemija (likvore buvo 5 leukocitai/mm^3 ir neabejotinai blastų). Šiam ligoniui papildomai buvo skirta intratekalinė terapija – tripletai (vaistų dozės priklauso nuo amžiaus: metotrek-

Lentelė. **Ligonių charakteristika**
Table. **Patients' characteristics**

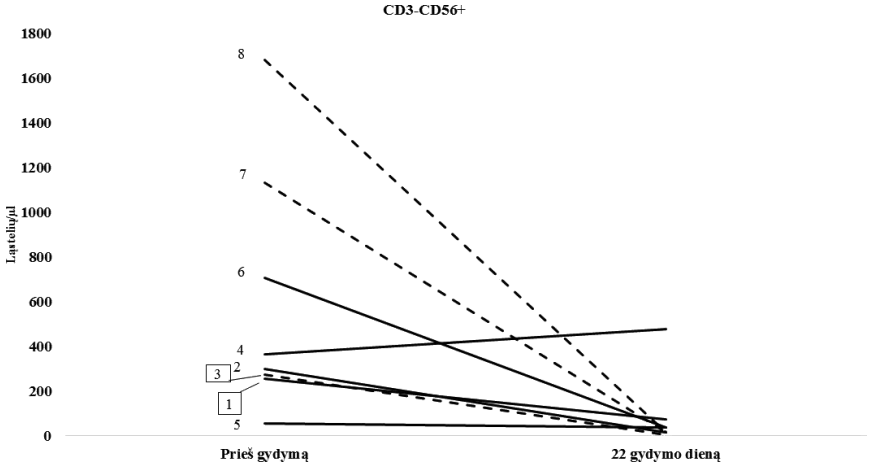
Pacientas	Lytis	Amžius (mėnesiais)	ŪML variantas*	Leukocitų skaičius (×10^9/l)/blastų (% periferiniame kraujyje)	Citogenetika	MLL (%) (22 gydymo dieną)
1	V	9	M7	23/21	Reikšmingų genetinių aberacijų nenustatyta	Neigiama
2	M	87	M5	29/40	Reikšmingų genetinių aberacijų nenustatyta	Neigiama
3	M	10	M0	40/42	Reikšmingų genetinių aberacijų nenustatyta	2,5
4	V	8	M2	8/60	1q duplikacija, 18q delecija, 21 chromosomos trisomija	Neigiama
5	V	86	;2	9/11	Reikšmingų genetinių aberacijų nenustatyta	Neigiama
6	V	15	M7	19/12	Kompleksinis genotipas	Neigiama
7	V	19	M5	140/60	Reikšmingų genetinių aberacijų nenustatyta	0,6
8	V	133	M4	21/18	5q delecija ir 12p duplikacija	15,7

Nr. 4 – pacientas, turintis Dauno sindromą, Nr. 7 – pacientui diagnozuota neuroleukemija
*ŪML FAB klasifikacija: M0 – ŪML su minimalia diferenciacija; M1 – ūminė nebrandi mielogeninė leukemija; M2 – ūminė brandi mielogeninė leukemija; M3 – ūminė promielocitinė leukemija; M4 – ūminė mielomonocitinė leukemija; M5 – ūminė monocitinė leukemija; M6 – ūminė eritroidinė leukemija; M7 – ūminė megakarioblastinė leukemija

No. 4 – patient with Down syndrome, No. 7 – patient with neuroleukemia
*AML FAB classification: M0 – undifferentiated acute myeloblastic leukemia; M1 – acute myeloblastic leukemia with minimal maturation; M2 – acute myeloblastic leukemia with maturation; M3 – acute promyelocytic leukemia; M4 – acute myelomonocytic leukemia; M5 – acute myelomonocytic leukemia; M6 – acute erythroid leukemia; M7 – acute megakaryoblastic leukemia



1 pav. **B (CD19+) limfocitų kiekis periferiniame kraujyje vaikams, sergantiems ŪML**
Šiame ir visuose kituose paveiksluose ištisinė linija – gero atsako į gydymą ligoniai, brūkšninė – blogo atsako į gydymą ligoniai.
Fig. 1. **Changes in level of B (CD19+) lymphocytes in peripheral blood of children with AML**
In this and all other figures solid line shows the patients with good response to treatment and dashed line shows the patients with poor response to treatment.



2 pav. **NK ląstelių kiekis periferiniame kraujyje vaikams, sergantiems ŪML**
Fig. 2. **Changes in level of NK cells in peripheral blood in children with AML**

satas (jau anksčiau minėtos dozės); citozaras <1 m. – 16 mg, nuo 1 m. iki 2 m. – 20 mg; nuo 2 m. iki 3 m. – 26 mg, 3 m. – 30 mg; metilprednizolonas: <1 m. – 3,2 mg, nuo 1 m. iki 2 m. – 4,8 mg, nuo 2 m. iki 3 m. – 6,4 mg, 3 m. – 8 mg), kurie buvo leidžiami du kartus per savaitę, kol smegenų skystyje išnyko blastai.

Ligonis, sergantis Dauno sindromu, buvo gydytas pagal ML DS 2006 protokolą (Dauno sindromą turinčių ligonių mieloblastinių leukemijų gydymo protokolas, 2006). Pirmos indukcijos metu gavo citozarą (100 mg/m^2 per 24 val. infuzija įv, 2 dienas); citozarą (100 mg/m^2 30 minučių infuzija įv kas 12 val. 3–8 dienomis (iš viso 12 dozių)); etopozidą (150 mg/m^2 per dieną 1 val. infuzija įv kas 24 val. 6, 7, 8 dienomis (iš viso 3 dozes)); idarubiciną (8 mg/m^2 per dieną 4 val. infuzija įv 3, 5 ir 7 dienomis); intratekaliniu būdu suleista 20 mg citozaro.

Molekuliniai žymenys: BCR/ABL (t(9:22)(q34:q11)); PML/PARA (t(15:17)(q22:q21)); AML/ETO (t(8:21)(q22:q22)); CBFB/MYH11 (inv(16)(p13;q22); DEK/NUP214 (t(6:9)(p23:q34)); FLT3ITD; NPM1 atlikti fluorescencinės *in situ* hibridizacijos (FISH) metodu.

Visiems ligoniams atsakas į gydymą buvo vertinamas pirmo chemoterapijos bloko – indukcijos, 22 gydymo dieną atliekant kaulų čiulpų (KČ) aspiracinę biopsiją. Tėkmės citometrijos metodu buvo atliekama MLL, taip pat vertinta kaulų čiulpų morfologija. Geru atsaku į gydymą laikyta, kai MLL buvo neigiama, blogu – MLL teigiama.

Limfocitų subpopuliacijų FACS analizė periferiniame kraujyje. Kraujo mėginiai buvo imami du kartus: prieš gydymą ir 22 gydymo dieną. Siekiant nustatyti limfocitų populiacijas buvo paruošti du mėgintuvėliai naudojant aštuonių spalvų žymenų derinius. Limfocitų fenotipinei analizei buvo naudojami monokloniniai antikūnai prieš ląstelių paviršiaus antigenus, konjuguotus su fluorescuojančiais dažais (*Becton Dickinson*, San Jose, USA): CD45-V500/CD4-V450/CD57-FITC/Foxp3-PE/CD25-APC/CD3-Pe-Cy7/CD8-APC-Cy7 ir CD45-V500/CD4-V450/CD57-FITC/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy5.5/CD27-APC/CD3-Pe-Cy7/ CD8-APC-Cy7. Mėginiai tirti „FACSCanto II“ (BD, San Jose, USA) tėkmės citometru, naudojant „FACS Diva v.6.1.3“ (BD, San Jose, USA) programinę įrangą.

Absoliutus leukocitų skaičius gautas atliekant bendrą kraujo tyrimą „Sysmex XT-4000i“ automatiniu hematologiniu analizatoriumi (*Sysmex Corporation*, Kobe, Japan). Periferinio kraujo tepinėlis buvo dažomas May–Griunvald–Giemsa metodu. Per mikroskopą suskaičiuota leukocitų formų procentinė išraiška. Absoliutus limfocitų skaičius (limfocitai/mm^3) buvo gautas padauginus absoliutų leukocitų skaičių ir procentinį limfocitų kiekį (gautą periferiniame tepinėlyje). Šis gautas absoliutus limfocitų kiekis buvo naudojamas apskaičiuojant absoliučius limfocitų subpopuliacijų kiekius.

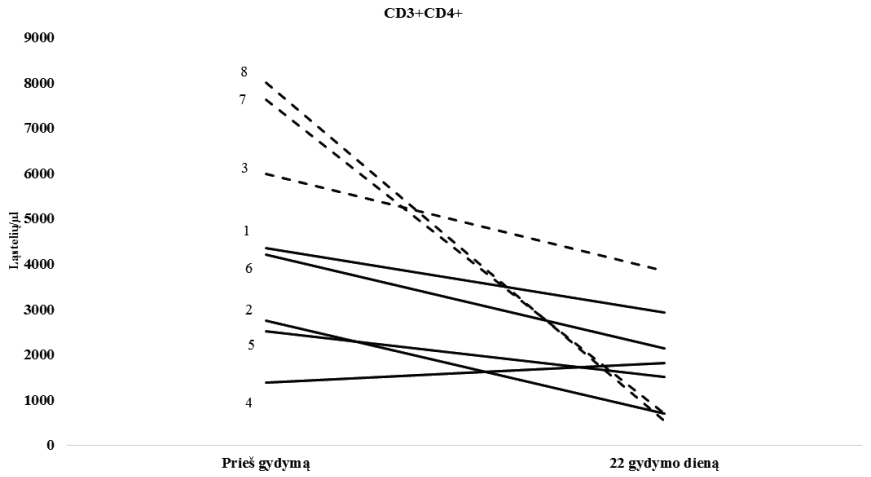
Statistinei duomenų analizei naudota „SPSS Statistics 22.0“ programa. Gero ir blogo atsako ligonių limfocitų subpopuliacijų kiekių skirtumui įvertinti naudotas Fišerio tikslusis testas. Skirtumas laikytas statistiškai reikšmingu, kai $p<0,05$.

REZULTATAI

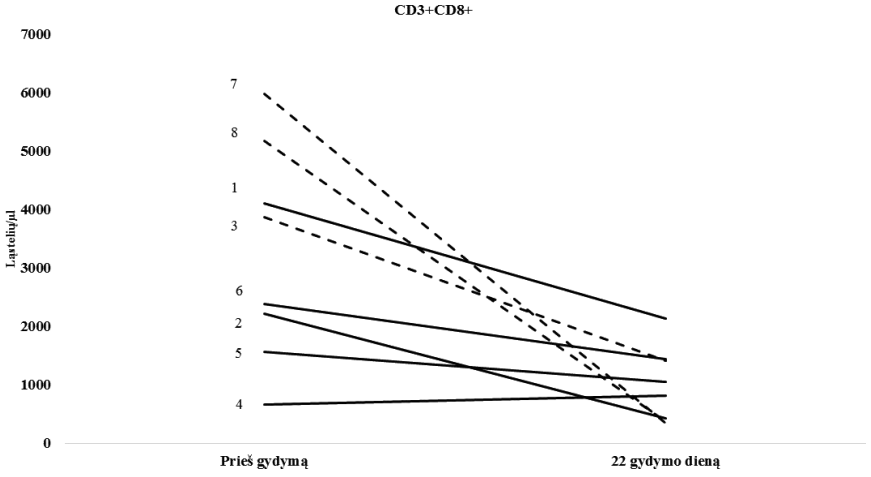
Tyrime dalyvavo 8 ligoniai: dvi mergaitės ir šeši berniukai. Amžiaus vidurkis – 46 mėnesiai (intervalas – nuo 8 iki 133 mėn.). Visiems ligoniams molekuliniai žymenys buvo neigiami ir 22-ą gydymo dieną morfologiniame kaulų čiulpų tyrime buvo <5 % blastų. Ligonių charakteristika pateikiama lentelėje.

Paveiksluose yra pateikiami limfocitų subpopuliacijų kiekiai iki gydymo ir pirmos chemoterapijos – indukcijos fazės pabaigoje.

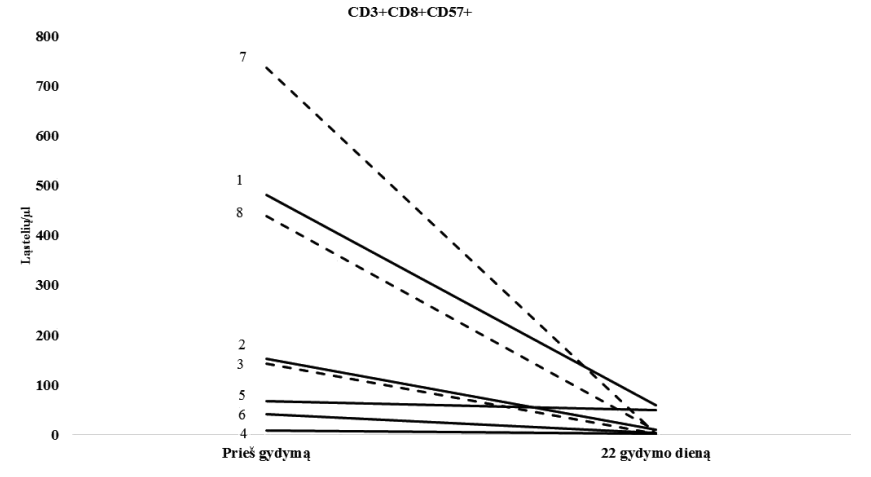
Pirmame paveiksle pavaizduoti B limfocitų kiekio pokyčiai. Gero ir blogo atsako ligoniams B limfocitų kiekis iki gydymo aiškiai nesiskyrė: gero atsako ligoniams B limfocitų kiekis svyravo nuo 568 iki 4162 ląstelių/ l, blogo atsako ligoniams šių limfocitų kiekis svyravo nuo 2069 iki 9072 ląstelių/ l. Chemoterapijos metu B limfocitų kiekis periferiniame kraujyje mažėjo ir 22 dieną šių ląstelių kiekiai neviršijo 43 ląstelių/ l (1 pav.).



3 pav. **T limfocitų (CD3+CD4+) kiekis periferiniame kraujyje vaikams, sergantiems ŪML**
Fig. 3. **Changes in level of T (CD3+CD4+) lymphocyte in peripheral blood in children with AML**



4 pav. **T limfocitų (CD3+CD8+) kiekis periferiniame kraujyje vaikams, sergantiems ŪML**
Fig. 4. **Changes in level of T (CD3+CD8+) lymphocyte in peripheral blood in children with AML**



5 pav. **CD3+CD8+CD57+ limfocitų kiekis periferiniame kraujyje vaikams, sergantiems ŪML**
Fig. 5. **Changes in level of CD3+CD8+CD57+ lymphocyte in peripheral blood in children with AML**

Septyniems ligoniams NK ląstelių reikšmės iki gydymo svyravo nuo 55 iki 1682 ląstelių/ l, bet gero ir blogo atsako ligoniams reikšmingai nesiskyrė. Po citotoksinio gydymo, 22-ą gydymo dieną, NK ląstelių kiekis periferiniame kraujyje sumažėjo (nuo 5 iki 74 ląstelių/ l). Tačiau ligonio, turinčio Dauno sindromą, NK ląstelių kiekis po gydymo citostatikais padidėjo nuo 364 iki 475 ląstelių/ l (2 pav.).

T limfocitų CD3+CD4+ subpopuliacijos reikšmių skirtumas tarp gero ir blogo atsako ligonių prieš pradedant gydymą buvo statistiškai reikšmingas. Ligoniai, kuriems pasiektas geras atsaką į gydymą, prieš gydymą turėjo mažiau CD3+CD4+ limfocitų (nuo 1370 iki 4346 ląstelių/ l) negu ligoniai, kuriems atsakas į chemoterapiją buvo blogas (nuo 5979 iki 7998 ląstelių/ l). Chemoterapija reikšmingai sumažino CD3+CD4+ limfocitų kiekį blogo atsako ligoniams (3 pav.).

CD3+CD8+ limfocitų kiekis reikšmingai skyrėsi iki gydymo gero ir blogo atsako ligoniams: gero atsako ligoniams limfocitų kiekis svyravo nuo 659 iki 4107 ląstelių/ l, o blogo atsako ligoniams – nuo 3862 iki 5982 ląstelių/ l. CD3+CD8+ limfocitų kiekio sumažėjimo pokytis blogo atsako ligoniams buvo reikšmingas, palyginti su gero atsako ligoniais (4 pav.).

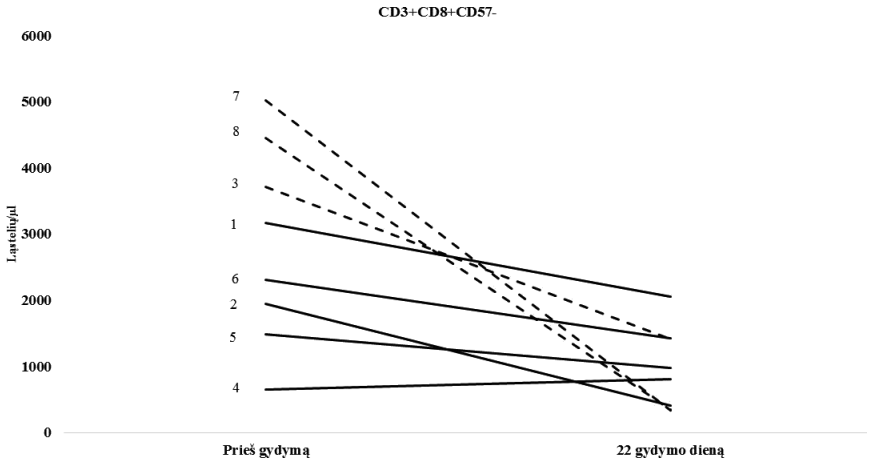
Prieš gydymą gero atsako grupėje CD3+CD8+CD57+ limfocitų subpopuliacijos kiekis svyravo nuo 8 iki 481 ląstelių/ l, blogo atsako grupėje – 142–736 ląstelių/ l. Po gydymo citostatikais šių limfocitų subpopuliacija sumažėjo abiejose ligonių grupėse. CD3+CD8+CD57+ limfocitų kiekiai 22-ą dieną tarp grupių aiškiai nesiskyrė – svyravo nuo 2 iki 60 ląstelių/ l (5 pav.).

CD3+CD8+CD57- limfocitų subpopuliacijos kiekis prieš pradedant gydymą blogo atsako ligoniams buvo reikšmingai didesni negu gero atsako ligoniams: blogo atsako ligoniams jų kiekis svyravo nuo 3711 iki 5024 ląstelių/ l, o gero atsako ligoniams – nuo 645 iki 3162 ląstelių/ l (6 pav.).

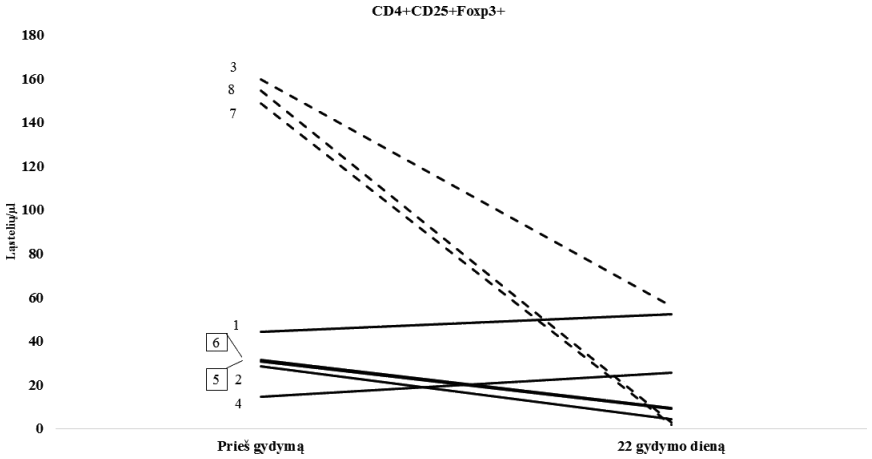
7 paveiksle matome CD4+CD25+FOXP3+ limfocitų subpopuliacijos ypač ryškų skirtumą tarp gero ir blogo atsako ligonių prieš pradedant gydymą: blogo atsako – nuo 148 iki 160 ląstelių/ l ir gero atsako – nuo 14 iki 44 ląstelių/ l. 22-ą gydymo dieną šių limfocitų kiekis sumažėjo ir šis pokytis yra reikšmingas blogo atsako ligoniams.

REZULTATŲ APTARIMAS

Šio darbo metu gauti duomenys rodo, jog prieš pradedant gydymą reikšmingai daugiau buvo CD3+CD4+ limfocitų blogo atsako ligoniams negu gero atsako. Nustatėme ypač ryškius T reguliacinių (Treg) limfocitų ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) kiekių periferiniame kraujyje skirtumus tarp gero ir



6 pav. **CD3+CD8+CD57- limfocitų kiekis periferiniame kraujyje vaikams, sergantiems ŪML**
Fig. 6. **Changes in level of CD3+CD8+CD57- lymphocyte in peripheral blood in children with AML**



7 pav. **CD4+CD25+FOXP3+ limfocitų populiacijos pokytis periferiniame kraujyje vaikams, sergantiems ŪML**
Fig. 7. **Changes in level of CD4+CD25+FOXP3+ lymphocyte in peripheral blood in children with AML**

blogo atsako į chemoterapiją ŪML sergantiems ligoniams. Gydymo metu Treg ląstelių kiekis blogo atsako ligoniams reikšmingai sumažėjo. Taigi, mūsų gauti rezultatai leidžia manyti, kad ypač svarbus yra T reguliacinių limfocitų kiekis prieš pradedant chemoterapiją. Šių ląstelių sumažėjimas chemoterapijos metu, matyt, didesnės reikšmės neturi. Įvairių autorių duomenimis, įrodytas Treg ląstelių dalyvavimas slopinant imunitetą navikui [11, 12].

CD3+CD8+CD57- limfocitų kiekis reikšmingai buvo didesnis blogo atsako į chemoterapiją ŪML sergančių ligonių grupėje. Jų kiekis labai sumažėjo blogo atsako ligoniams lyginant su gero atsako ligoniais.

Neseniai mūsų tyrėjų grupė atliko tyrimą, kuriuo siekė nustatyti chemoterapijos įtaką imunokomponentinėms ląstelėms vaikams, sergantiems ūmine limfoblastine leukemija (ŪLL). Šiame tyrime dalyvavo 25 vaikai. Visiems ligoniams chemoterapijos metu išnyko minimali liekamoji liga. Prieš pradedant gydymą T reguliacinių limfocitų kiekis šių ligonių periferiniame kraujyje buvo didesnis (nuo 0 iki 82 ląstelių/ l, vidurkis – 9 ląstelės/ l), tačiau jų kiekis nebuvo toks didelis, kaip blogo atsako ligoniams, sergantiems ŪML, kur jis siekė daugiau nei 148 ląstelių/ l [13].

Įdomu pažymėti, kad blogo atsako ligoniams, sergantiems ŪML, CD3+CD8+CD57- limfocitų kiekis buvo daug didesnis iki gydymo (3711–5024 ląstelių/ l), palyginti su gero atsako ligoniais (645–3162 ląstelių/ l). Šių limfocitų kiekis po gydymo citostatikais reikšmingai sumažėjo blogo atsako ligoniams.

Galutinių išvadų daryti negalime dėl mažo tiriamųjų skaičiaus. Tačiau preliminarūs duomenys rodo, jog labai svarbus Treg kiekis gydymo pradžioje. Jeigu mūsų gauti rezultatai pasitvirtintų atlikus daugiau tyrimų, šių limfocitų kiekį būtų galima naudoti kaip predikcinį žymenį prieš skiriant chemoterapiją ŪML sergantiems ligoniams. Šių ląstelių reikšmingai sumažėjo tiems ŪML ligoniams, kuriems negauta atsako į gydymą.

IŠVADOS

Gero ir blogo atsako ligonių B ir NK limfocitų kiekiai periferiniame kraujyje iki gydymo nesiskyrė. CD3+CD4+ limfocitų ir ypač CD4+CD25+FoxP3+ limfocitų kiekiai periferiniame kraujyje iki gydymo buvo daug mažesni gero atsako ligoniams, palyginti su blogo atsako ligoniais. Gero atsako ligoniai iki gydymo turėjo reikšmingai mažiau CD3+CD8+CD57- limfocitų, palyginti su blogo atsako ligoniais. Šių limfocitų labiau sumažėjo blogo atsako ligoniams negu gero atsako ligoniams. ◆

Gauta: 2017 03 01
Priimta spaudai: 2017 06 06

Summary

PREDICTION SIGNIFICANCE OF LYMPHOCYTE SUBSETS FOR RESPONSE TO CHEMOTHERAPY IN CHILDREN WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA

Vilma Rutkauskaitė, Lina Ragelienė, Rėda Matuzevičienė, Katažina Sinkevič, Rimantas Eidukevičius, Dainius Characiejus

Background. The objective of this study was to evaluate quantitative changes of B, NK and T lymphocyte subsets in peripheral blood and their predictive significance in children with acute myeloid leukaemia (AML) under chemotherapy in Centre for pediatric oncology and hematology, Children's Hospital, affiliate of Vilnius University Hospital "Santariškių Klinikos".

Patients and methods. Children with AML were treated according to NOPHO – DBH 2012 protocol and ML DS 2006. Levels of B lymphocytes ($CD19^+$), NK cells ($CD3^-CD56^+$) and subsets of T lymphocytes ($CD3^+CD4^+$, $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD8^+CD57^+$, $CD3^+CD8^+CD57^-$) in peripheral blood were analysed by flow cytometry before treatment and in 22nd day after treatment with cytotoxic drugs.

Results. Immunological analyses has been performed for 8 children with AML (average age – 46 months (range –

from 8 to 133 months)). In pre-treatment period the amount of CD3+CD4+ lymphocytes in children with poor response to treatment was more than 5979 cells/ L compared to children with good treatment response (less 4346 cells/ L). The amount of $CD3^+CD8^+CD57^-$ lymphocytes in children with poor response to treatment before chemotherapy was higher (3711 cells/ L) than of those with good response to treatment (less 3200 cells/ L). Prior to treatment of T-regulatory lymphocyte counts in children with poor response to treatment were higher than 148 cells/ L in comparison to those with good treatment response (less 45 cells/ L).

Conclusions. The amount of B lymphocytes and NK cells didn't differ between children with good and poor response to treatment. Levels of $CD3^+CD4^+$ and $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ lymphocytes prior to treatment were significantly lower in children with good response to treatment compared to poor response group. The amount of $CD3^+CD8^+CD57^-$ lymphocytes in pre-treatment period in children with good treatment response was lower than with poor treatment response. However, the amount of these lymphocytes has decreased significantly for children with poor response after treatment with cytotoxic drugs.

Keywords: children, lymphocyte subpopulations, acute myeloblastic leukemia, chemotherapy, T-regs.

LITERATŪRA

1. Creutzig U, Heuvel-Eibrink M, Gibson B, Dworzak MN, Adachi S, Bont E, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. Blood 2012; 120(16): 3187–205.
2. Rooij JDE, Zwaan CM, Heuvel-Eibrink M. Pediatric AML: from biology to clinical management. J Clin Med 2015; 4(1): 127–49.
3. Masetti R, Vandemini F, Zama D, Biagi C, Pession A, Locatelli F. Acute myeloid leukemia in infants: biology and treatment. Front Pediatr 2015; 3: 37.
4. Taga T, Tomizawa D, Takahashi H, Adachi S. Acute myeloid leukemia in children: Current status and future directions. Pediatrics International 2016; 58(2): 71–80.
5. Sidorovas V, Pašukonienė V, Dobrovolskienė N, Sužiedėlis K, Meškauskas R, Characiejus D. Melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo imunokomponentinių ląstelių pokyčiai. Medicinos teorija ir praktika 2009; 15(1): 35–8.
6. Characiejus D. Pasukoniene V, Jonusauskaite R, Kazlauskaite N, Aleknavicius E, Mauricas, et al. Peripheral blood CD8highCD57+ lymphocyte levels may predict outcome in melanoma patients treated with adjunvant interferon-alpha. Anticancer Res 2008; 28(2B): 1139–42.
7. Teixido C, Gonzalez-Cao M, Karachaliou N, Rosell R. Predictive factors for immunotherapy in melanoma. Ann Trans Med 2015; 3(15): 208.
8. Protti MP, De Monte L. Immune infiltrates as predictive markers of survival in pancreatic cancer patients. Front Physiol 2013; 4: 210.
9. Suzuki H, Onishi H, Morisaki T, Tanaka M, Katano M. Intratumoral FOXP3+VEGFR2+ regulatory T cells are predictive markers for recurrence and survival in patients with colorectal cancer. Clin Immunol 2013; 146: 26–33.
10. www.kion.nl
11. Whiteside TL. The role of regulatory T cells in cancer immunology. Immunotargets Ther 2015; 4: 159–71.
12. Zhang X, Kelaria S, Kerstetter J, Wang J. The functional and prognostic mplications of regulatory T cells in colorectal carcinoma. J Gastrointest Oncol 2015; 6(3): 307–13.
13. Rutkauskaitė V, Ragelienė L, Matuzevičienė R, Sinkevič K, Mauricas M, Characiejus D. Reduction in proportion of senescent CD8+ T lymphocytes during chemothreapy of children with acute lymphoblastic leukemia. Anticancer Res 2016; 36(11): 6195–9.