

Ocena wpływu standardowej chemioterapii na wielkość populacji limfocytów T $\gamma\delta$ oraz subpopulacji aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD25⁺ i T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej chorych na niezmiernicze chłoniaki złośliwe (NHL) i szpiczaka mnogiego (MM)

Ewa Sowińska, Lidia Usnarska-Zubkiewicz, Kazimierz Kuliczkowski

Wstęp. Limfocyty T $\gamma\delta$, szczególnie T $\gamma\delta$ CD25⁺ i T $\gamma\delta$ CD69⁺, wykazują aktywność cytotolityczną przeciwko komórkom transformowanym nowotworowo.

Cel pracy. Porównanie wielkości populacji limfocytów T $\gamma\delta$ oraz subpopulacji aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD25⁺ i T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej przed i po leczeniu cytostaticznym (w momencie pierwszej kompleksowej oceny skuteczności chemioterapii) w całej grupie chorych na NHL i MM oraz w zależności od odpowiedzi leczniczej.

Materiał i metody. 53 pacjentów leczonych od 1 marca 2003 r. do 31 sierpnia 2005 r. w Klinice Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku Akademii Medycznej we Wrocławiu z rozpoznaniem: 24 osoby NHL (grupa I) i 29 osoby MM (grupa II). Limfocyty T $\gamma\delta$ krwi obwodowej zostały oznaczone z użyciem dwukolorowej cytofluorymetrii przepływowej z panelem przeciwciał monoklonalnych: anty CD45-FITC, CD14-RPE, TCR- $\gamma\delta$ -1-FITC, CD25-RPE, CD69-RPE oraz IgG1 kappa-FITC i IgG1-RPE (kontrola negatywne).

Wyniki. Zmniejszenie odsetka limfocytów T $\gamma\delta$ oraz aktywowanych T $\gamma\delta$ CD25⁺ i T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej po 3 cyklach chemioterapii w MM oraz odsetka limfocytów T $\gamma\delta$ i aktywowanych T $\gamma\delta$ CD69⁺ po 4 cyklach cytostaticznych w NHL, w porównaniu do wartości wyjściowej, może warunkować trwałą dobrą odpowiedź leczniczą. Natomiast zwiększenie odsetka aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej po 3 cyklach leczenia cytostaticznego w MM i po 4 cyklach chemioterapii w NHL, w porównaniu do odsetka przed leczeniem, będące prawdopodobnie wynikiem szybkiej odpowiedzi organizmu na intensywny rozwój nowotworu, może wskazywać na pierwotną oporność na chemioterapię lub prognozować wczesny nawrót choroby.

Wniosek. Oznaczanie odsetka limfocytów T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej przed oraz po 4 cyklach cytostaticznych w NHL i po 3 cyklach chemioterapii w MM może być przydatne w praktyce klinicznej do monitorowania przebiegu leczenia cytostaticznego.

Estimation of standard chemotherapy influence on $\gamma\delta$ T lymphocyte population and activated $\gamma\delta$ T CD25⁺ and $\gamma\delta$ T CD69⁺ lymphocyte subpopulations quantity in peripheral blood of lymphoma malignum (NHL) and multiple myeloma (MM) patients

Introduction. $\gamma\delta$ T lymphocytes, especially $\gamma\delta$ T CD25⁺ and $\gamma\delta$ T CD69⁺ subpopulations, appear to possess an intrinsic cytolytic activity against tumor cells.

Aim of study. $\gamma\delta$ T lymphocyte population and activated $\gamma\delta$ T CD25⁺ and $\gamma\delta$ T CD69⁺ lymphocyte subpopulations quantity comparison in peripheral blood before and after cytostatic treatment (at the moment of first chemotherapy efficiency estimation) in all NHL and MM patients and in each examined group according to treatment response.

Material and methods. 53 patients, treated between 1.03.2003 – 31.08.2005 in The Department of Hematology, Blood Neoplasms and Bone Marrow Transplantation of the Wrocław Medical University: 24 of NHL (I group) and 29 of MM (group II). $\gamma\delta$ T lymphocytes were estimated by double-colour flow cytometry, using monoclonal antibodies:

Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi,
Transplantacji Szpiku
Akademia Medyczna we Wrocławiu

Badania zrealizowano w ramach działalności statutowej Kliniki i częściowo w ramach grantu uczelnianego nr 906. Wyniki stanowią część rozprawy doktorskiej dr n. med. Ewy Sowińskiej, której obrona publiczna odbyła się 26 czerwca 2006 r.

anti CD45-FITC, CD14-RPE, TCR- $\gamma\delta$ -1-FITC, CD25-RPE, CD69-RPE and IgG1-kappa-FITC, IgG1-RPE as negative controls.

Results. Decreased $\gamma\delta$ T and activated $\gamma\delta$ T CD25⁺ and $\gamma\delta$ T CD69⁺ cell ratio in peripheral blood of MM pts after 3 cytostatic cycles and decreased $\gamma\delta$ T and activated $\gamma\delta$ T CD69⁺ lymphocyteratios in peripheral blood of NHL pts after 4 chemotherapy cycles, as compared to their ratios at the time of diagnosis, may indicate persistent good treatment response. Increased peripheral $\gamma\delta$ T CD69⁺ lymphocyte ratio after cytostatic therapy, probably connected with high cellular antitumor mechanisms activation in response to intensive tumor development, can indicate a primary resistance to chemotherapy or predict an early tumor relapse.

Conclusion. Measurements $\gamma\delta$ T lymphocyte ratios in peripheral blood after 3 and 4 cytostatic cycles in MM and NHL respectively, may be used for chemotherapy treatment duration monitoring.

Słowa kluczowe: limfocyty T $\gamma\delta$, krew obwodowa, standardowa chemioterapia, niezrębny chłoniak złośliwy, szpiczak mnogi

Key words: $\gamma\delta$ T lymphocytes, peripheral blood, standard chemotherapy, lymphoma malignum, multiple myeloma

Wstęp

Początek badań populacji limfocytów T $\gamma\delta$ przypadł na pierwszą połowę lat 80. XX wieku. Analizy molekularne doprowadziły do wykrycia genu kodującego łańcuch γ receptora TCR (*T cell receptor*) [1, 2]. W badaniach z użyciem przeciwciał przeciwko peptydom, syntetyzowanym według sekwencji genu γ , ujawniono istnienie transmembranowego receptora TCR $\gamma\delta$, niezbędnego do wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału i prawidłowego rozpoznawania obcych antygenów [3-5]. W końcu określono komórki, charakteryzujące się ekspresją receptora TCR $\gamma\delta$ – populację limfocytów T $\gamma\delta$ [6, 7].

Zdaniem Groh i wsp. wielkość populacji limfocytów T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej człowieka waha się od 0,5 do 16%; według Borsta i wsp. oraz Lafonta i wsp. nie przekracza 5% [8-10]. Limfocyty T $\gamma\delta$ o fenotypie TCR V γ X/V δ 1 są zdolne do cytolyzy autologicznych komórek nowotworowych, wywodzących się z tkanek miękkich (rak płuca, skóry, nerki, sutka, jajnika, wątroby, trzustki) i z komórek układu krwiotwórczego (ostra białaczka limfoblastyczna, niezrębne chłoniaki złośliwe, szpiczak mnogi), a limfocyty T $\gamma\delta$ o fenotypie TCR V γ 9/V δ 2 uczestniczą w reakcjach obronnych przed infekcjami wirusowymi, bakteryjnymi i pasożytniczymi [11-14]. Najnowsze badania pokazują jednak, że nie tylko limfocyty T $\gamma\delta$ V γ X/V δ 1, ale także T $\gamma\delta$ V γ 9/V δ 2 uczestniczą w mechanizmach przeciwnowotworowych i eliminują z organizmu komórki niektórych linii chłoniakowych [15].

Obecnie pojawia się coraz więcej doniesień o aktywności przeciwnowotworowej subpopulacji aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$, wykazujących ekspresję powierzchniowych antygenów aktywacji: antygeny CD25⁺ (późny aktywator) – T $\gamma\delta$ CD25⁺ i antygeny CD69⁺ (wczesny aktywator) – T $\gamma\delta$ CD69⁺. W badaniach *in vitro* Kjeldsen – Kragh i wsp. wykazali wzrost ekspresji antygenów aktywacji CD25 i CD69 na limfocytach T $\gamma\delta$ pod wpływem IL-2, podczas gdy Kunzmann i wsp. zaobserwowali brak wpływu egzogennych cytokin na ekspresję tych antygenów w ww. populacji limfocytów [16, 17]. Ważny jest fakt, że limfocyty T $\gamma\delta$ CD69⁺ u ludzi starszych cechują się wzmoczoną produkcją czynnika martwicy nowotworów

alfa (TNF – α) i wydają się być tzw. komórkami *first aid cells* (komórki pierwszej pomocy), zapewniającymi ochronę przed częstymi infekcjami, chorobami z autoagresji czy transformacją nowotworową [18, 19].

W dostępnym piśmiennictwie jest wiele danych o mechanizmach przeciwnowotworowej aktywności cytolytycznej limfocytów T $\gamma\delta$. Natomiast brak jest informacji, jak zmienia się wielkość populacji tych komórek w krwi obwodowej i szpiku chorych na nowotwory w zależności od skuteczności zastosowanej chemioterapii. Ostatnie badania własne wykazały wyższy odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ oraz aktywowanych T $\gamma\delta$ CD25⁺ i T $\gamma\delta$ CD69⁺ w szpiku, w porównaniu z odsetkiem tych komórek w krwi obwodowej u chorych na NHL i MM nowo zdiagnozowanych. Co więcej ujawniły fakt, że większy odsetek aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD25⁺ w szpiku w momencie rozpoznania może być nowym markerem dobrego rokowania w NHL [20].

Celem niniejszej pracy było porównanie wielkości populacji limfocytów T $\gamma\delta$ oraz subpopulacji aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD25⁺ i T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej przed i po leczeniu cytostatycznym (w momencie pierwszej kompleksowej oceny skuteczności chemioterapii) w całej grupie chorych na NHL i MM oraz w każdej z badanych grup chorych, w zależności od odpowiedzi leczniczej.

Materiał i metody

Materiał

Do badania zostało włączonych 53 pacjentów leczonych od 1 marca 2003 r. do 31 sierpnia 2005 r. w Klinice Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku Akademii Medycznej we Wrocławiu z rozpoznaniem niezrębego chłoniaka złośliwego (NHL – grupa I) i szpiczaka mnogiego (MM – grupa II). Kwalifikację do badania zakończono 30 czerwca 2005 r., a obserwację czasu przeżycia chorych na obecnym etapie badania 31 sierpnia 2005 r. Charakterystykę badanych grup chorych pokazują Tabele I i II.

Materiał do badań – krew obwodową w ilości 10 ml pobierano z żyły ramiennej do probówki na heparynę jako antykoagulant. Izolację limfocytów krwi obwodowej przeprowadzano na gradiencie Fikol – Uropolina. Po 20 minutowym odwirowaniu krwi przy 3000 obrotów/minutę, pipetką pasteurowską zbierano limfocyty z granicy faz do oddzielnej probówki. Następnie pod-

Tab. I. Charakterystyka grupy I

Charakterystyka chorych na nieziarnicze chłoniaki złośliwe (NHL)	
Liczba badanych	24
Płeć K / M	11 / 13
Wiek (lata): zakres	20 – 85 (x = 60 lat, Me = 65 lata)
Linia rozrostu nowotworowego: B / T	20 / 4
Typ histopatologiczny:	
chłoniak grudkowy	3
chłoniak rozlany z dużych komórek B	7
chłoniak prekursorowy z komórek B	3
chłoniak limfoplazmocytowy	1
chłoniak Burkitt-like	2
chłoniak B – komórkowy z małych limfocytów	1
węzłowy chłoniak strefy brzeżnej	1
obwodowy chłoniak T – komórkowy niesprecyzowany	3
nie wykonano badania histopatologicznego (rozpoznanie na podstawie mielogramu i immunofenotypowania)	3
Stadium kliniczne według Ann – Arbor: I / II / III / IV	2 / 2 / 2 / 18
Objawy systemowe: A / B	9 / 15
H – / H +	17 / 7
S – / S +	14 / 10
B – / B +	8 / 16
E – / E + (skóra	13 / 11 (4
ściana jelita	2
tarczyca + krtań	1
płuco + ślinianka przyuszna lewa + gałka oczna lewa	1
opłucna	1
nerki	1
kości)	1)
Liczba otrzymanych cykli cytotatycznych	2-7 (x = 4 cykle)
Schematy cytotatyczne:	
CHOP (liczba osób)	10
COP	3
CVP	3
CODOX-M/IVAC	2
różne cykle chemioterapii	6
Odpowiedź lecznicza: R _{NHL} / P _{NHL}	11 ^{&} / 13 [*]

* 7 osób z pierwotną opornością na chemioterapię (*non-responders*), w tym 6 – zgon powodu z choroby podstawowej, 2 z progresją choroby po RP i 4 z wznową po średnio 5 miesiącach od orzeczenia RC

& 5 chorych z remisją całkowitą (RC), 3 – z remisją częściową (RP), 3 – z stabilizacją choroby

Legenda:

A – nieobecne objawy systemowe, B – obecne objawy systemowe, H + – powiększona wątroba, H – – wątroba prawidłowej wielkości,

S + – powiększona śledziona, S – – śledziona prawidłowej wielkości, B + – nacieki szpiku, B – – bez nacieku szpiku, E + – nacieki pozalimfatyczne,

E – – bez nacieków pozalimfatycznych

K – kobieta, M – mężczyzna

x – średnia, Me – mediana

COP – Cyklofosfamid + Winkrystyna + Prednizon, CHOP – Cyklofosfamid + Doksorubicyna + Winkrystyna + Prednizon, CODOX-M

– Cyklofosfamid + Winkrystyna + Doksorubicyna + Cytarabina + Metotreksat, IVAC – Ifosfamid + Etopozyd + Cytarabina + Metotreksat, CVP

– Cyklofosfamid + Wimblastyna + Prednizon

R_{NHL} – chorzy z dobrą odpowiedzią leczniczą, P_{NHL} – pacjenci z progresją choroby

dawano je dwukrotnemu płukaniu w soli buforowanej fosforanami, bez wapnia i magnezu (PBS) (Instytut Immunologii PAN, Wrocław, Polska), wirując przez 3 minuty z prędkością 2500 obrotów/minutę w wirówce High Speed Brushless Centrifuge MPW-350 R. Usuwano nadsącz, po czym wykonywano lizę pozostałych w osadzie erytrocytów przy użyciu oryginalnego odczynnika Uti-Lyse-Erythrocyte Lysing Reagent (DAKO, USA, Capintaria), zgodnie z zaleceniami producenta i trzecie płukanie w PBS. Po usunięciu nadsączu wyizolowane limfocyty zawieszano w 0,5 ml PBS z 1% białkiem i 0,1% azydkiem sodu.

Metoda

Analiza ilościowa i jakościowa limfocytów krwi obwodowej została przeprowadzona z użyciem dwukolorowej cytofluorymetrii przepływowej z panelem przeciwciał monoklonalnych, sprzężonych z odpowiednim barwnikiem: zielonym izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) lub pomarańczową fikoerytryną (RPE) (Tab. III i IV).

Objętość zawiesiny, odpowiadającej ilości 10⁶ komórek, pobierano do każdej z czterech przygotowanych jednorazowych probówek, do których dodawano odpowiednie przeciwciała monoklonalne w ilości podanej w Tabeli III. Następnie

Tab. II. Charakterystyka grupy II

Charakterystyka chorych na szpiczaka mnogiego (MM)	
Liczba badanych (MM / CHLŁ)	29 (27 / 2)
Płeć: K / M	19 / 10
Wiek (lata): zakres	42 – 77 (x = 60 lat, Me = 62 lata)
Rodzaj białka monoklonalnego: IgG / IgA / IgM	21 / 5 / 1
Łańcuch lekkiej: kappa / lambda	21 / 8
Stadium kliniczne według Durie – Salmona: I / II / III	7 / 4 / 18
Wydolność nerek: A / B	24 / 5
Stadium kostne według Case'ego: 0 / 1 / 2 / 3 nie badano	6 / 4 / 2 / 16 1
Liczba otrzymanych cykli cytostatycznych	2-7 (x = 3 cykle)
Schematy cytostatyczne:	
VA(E)D (liczba osób)	18
MP	8
CVMBP	2
CP	1
Odpowiedź lecznicza: R _{MM} / P _{MM}	20 ^{&} / 9*

* 9 osób z pierwotną opornością na chemioterapię (*non-responders*), w tym 5 – zgon z powodu choroby podstawowej & 7 chorych z remisją całkowitą (RC), 5 – z remisją częściową (RP), 8 – z stabilizacją choroby

Legenda:

A – nerki wydolne, B – niewydolność nerek (stężenie kreatyniny w surowicy > 2 mg/dl)

K – kobieta, M – mężczyzna

x – średnia, Me – mediana

VA(E)D – Winkrystyna + Adriamycyna (Epirubicyna) + Deksametazon, MP – Melfalan + Prednizon,

CVMBP – Cyklofosfamid + Winkrystyna + Melfalan + BCNU (karmustyna) + Prednizon,

CP – Cyklofosfamid + Prednizon

R_{MM} – chorzy z dobrą odpowiedzią leczniczą, P_{MM} – pacjenci z progresją choroby

przeprowadzono inkubację w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej przez 20 minut. W tym czasie zawiesinę parokrotnie wstrząsano. Po inkubacji komórki płukano w PBS, wirując przez 3 minuty z prędkością 2500 obrotów/minutę. Usuwano nadsącz, dodawano 0,5 ml PBS z 1% białkiem i 0,1% azydkiem sodu i przeprowadzano analizę cytofluorymetryczną.

Materiał analizowano w cytofluorymetrze przepływowym PAS (Partec, Niemcy), wyposażonym w laser argonowy. Do analizy wykorzystano program Flow Max 2.4b. Wczytywano 50 000 komórek z każdej z czterech przygotowanych probówek, pochodzących od jednego pacjenta. Następnie przeprowadzano kompensację fluorescencji oraz zakładano bramkę limfocytarną, w której analizowano komórki. Bramkę tę definiowa-

Tab. III. Charakterystyka przeciwciał monoklonalnych

Ab anty	Fluorochrom	Klon	Występowanie antygenu	Firma produkująca	Ilość Ab (μL/1 test)
TCR-γ/δ-1 (Receptor TCR γδ)	FITC	11F2	Pan – Limfocytarny T γδ	Becton-Dickinson (San Diego, USA)	20
CD25 (Receptor IL-2)	RPE	ACT-1	Aktywowane limfocyty T i B	DAKO (Glostrup, Dania)	10
CD69 (AIM)	RPE	FN50	Aktywowane limfocyty T, B, aktywowane makrofagi, komórki NK, eozynofile, neutrofile, płytki krwi	DAKO (Glostrup, Dania)	10
CD45 (LCA – antygen)	FITC	T29/33	Pan – leukocytarny	Becton-Dickinson (San Diego, USA)	10
CD14	RPE	TŮK4	Monocyty, komórki Langerhansa, makrofagi	DAKO (Glostrup, Dania)	10
IgG 1 kappa <i>negative control</i>	FITC	MOPC-21	IgG	Becton-Dickinson (San Diego, USA)	20
IgG 1 <i>negative control</i>	RPE	DAK-G01	IgG	DAKO (Glostrup, Dania)	10

Tab. IV. Panel przeciwciał monoklonalnych zastosowanych w badaniu

Probówka	Ab- FITC	Ab-RPE
1	CD45	CD14
2 (kontrola)	IgG 1 kappa	IgG 1
3	TCR- γ/δ -1	CD25
4	TCR- γ/δ -1	CD69

Legenda: Ab-FITC – przeciwciało monoklonalne sprzężone z izotiocyjanianem fluoresceiny

Ab-RPE – przeciwciało monoklonalne sprzężone z fikoerytryną

no na podstawie panelu przeciwciał CD45-FITC, CD14-RPE. Wszystkie limfocyty krwi obwodowej definiowano jako komórki CD45⁺CD14⁻. Limfocyty T $\gamma\delta$ określono jako komórki TCR $\gamma\delta$ ⁺ (T $\gamma\delta$), aktywowane limfocyty T $\gamma\delta$ CD25⁺ jako TCR $\gamma\delta$ ⁺CD25⁺ oraz T $\gamma\delta$ CD69⁺ jako TCR $\gamma\delta$ ⁺CD69⁺ (Ryc. 1). Uzyskane war-

tości liczby limfocytów T $\gamma\delta$, podawane w procentach (wartości odsetkowe – %), uznano za miarę wielkości populacji i subpopulacji tych limfocytów w krwi obwodowej.

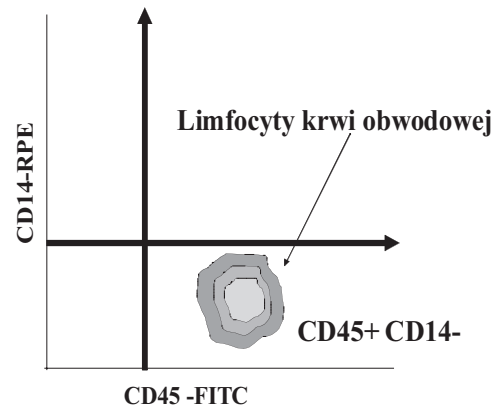
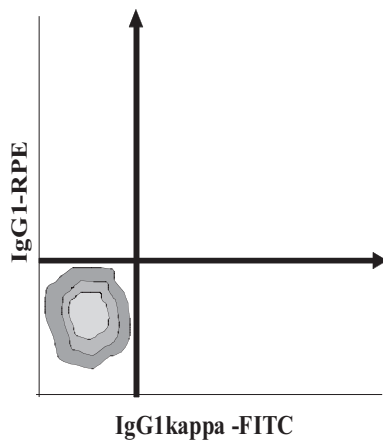
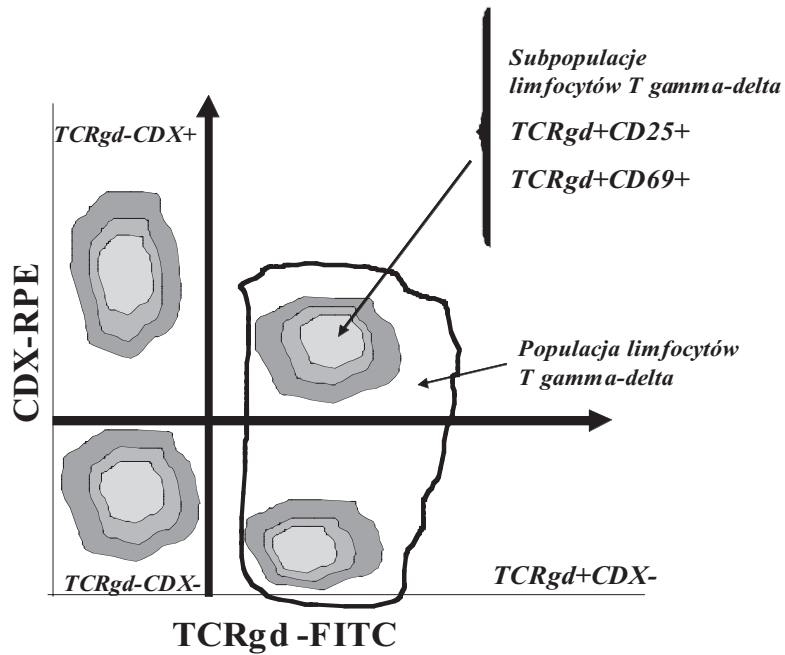
Odsetek ogółu limfocytów T $\gamma\delta$ stanowił sumę odsetków komórek TCR $\gamma\delta$ ⁺CDX⁺ oraz TCR $\gamma\delta$ ⁺CDX⁻ i był obliczany ze wzoru: % TCR $\gamma\delta$ ⁺ CDX⁺ + % TCR⁺ $\gamma\delta$ CDX⁻ = % TCR⁺ $\gamma\delta$ gdzie:

% TCR⁺ $\gamma\delta$ – odsetek ogółu limfocytów T $\gamma\delta$ (cała populacja limfocytów T $\gamma\delta$)

% TCR $\gamma\delta$ ⁺ CDX⁺ – odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ wykazujących ekspresję antygenu CDX (komórki T $\gamma\delta$ CDX⁺ – subpopulacje aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD25⁺ i T $\gamma\delta$ CD69⁺)

% TCR $\gamma\delta$ ⁺ CDX⁻ – odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ nie wykazujących ekspresji antygenu CDX (komórki T $\gamma\delta$ CDX⁻),

CDX – odpowiednio antygen CD25, CD69



Ryc.1. Oznaczanie całej populacji i subpopulacji limfocytów T $\gamma\delta$ techniką dwukolorowej cytofluorymetrii przepływowej

TCRgd-FITC – przeciwciało monoklonalne anti-TCR $\gamma\delta$, sprzężone z izotiocyjanianem fluoresceiny (I fluorescencja), CDX-RPE – przeciwciało monoklonalne anti-CD, sprzężone z fikoerytryną (II fluorescencja), CDX – odpowiednio: CD25, CD69 IgG1 kappa-FITC, IgG1-RPE (kontrola negatywne)

Oznaczenia wielkości populacji limfocytów T $\gamma\delta$ oraz subpopulacji aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD25⁺ i T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej dokonano:

- w NHL (grupa I) w momencie rozpoznania i po 4 cyklach chemioterapii (średnio po 3 miesiącach od rozpoznania) oraz
- w MM (grupa II) na początku choroby i po 3 cyklach leczenia (średnio po 4,5 miesiącach od rozpoznania).

W obu grupach chorych nie przeprowadzono analizy względem rodzaju chemioterapii, gdyż stosowano różne schematy cytostatyczne.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o program statystyczny *Statistica pl 5.1* Rozkład zmiennych badano testem Kołmogorowa-Smirnowa dla prób o małej liczebności ($N < 30$). Zakładano, że średnie wartości odsetkowe (średnie odsetki limfocytów T $\gamma\delta$) nie są jednakowe wtedy, gdy różnica między nimi jest większa niż 0,05, np.

- średni odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ z I oznaczenia = 0,04, a z II oznaczenia = 0,09 (różnica $\leq 0,05$) to znaczy, że odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ nie zmienił się (*constans*),
- średni odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ z I oznaczenia = 0,3, a z II oznaczenia = 0,09 (różnica $> 0,05$) to znaczy, że odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ zmniejszył się,
- średni odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ z I oznaczenia = 0,09, a z II oznaczenia = 0,3 (różnica $> 0,05$) to znaczy, że odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ zwiększył się.

Dla zmiennych o rozkładzie normalnym do porównania średnich arytmetycznych z dwóch prób niezależnych wykorzystano test t-Studenta. Dla zmiennych o rozkładzie innym niż normalny do porównania średnich arytmetycznych z dwóch prób zastosowano testy nieparametryczne: test U Manna-Whitney'a dla zmiennych niezależnych i test Wilcozona dla zmiennych zależnych. Za istotne statystycznie uznano wyniki na poziomie ufności $p \leq 0,05$.

Wyniki

U 24 chorych na NHL, pomimo braku istotności statystycznej, zaobserwowano trend, że odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej po 4 cyklach cytostatycznych był większy niż przed leczeniem, odsetek aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD25⁺ przed i po leczeniu nie zmienił się, a odsetek aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD69⁺ był większy niż w momencie rozpoznania (Tab. V). W pod-

grupie R_{NHL} odsetki limfocytów T $\gamma\delta$ oraz aktywowanych T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej po 4 cyklach chemioterapii były mniejsze niż przed leczeniem ($p > 0,05$). Odsetek aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD25⁺ nie zmienił się w stosunku do wartości przed leczeniem. Przeciwnie, w podgrupie P_{NHL} odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej po 4 cyklach był większy niż przed leczeniem ($p > 0,05$), odsetek aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD25⁺ nie zmienił się, podczas gdy odsetek aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD69⁺ był istotnie statystycznie ($p = 0,03$) większy, w porównaniu do wartości wyjściowej (Tab. VI).

U 29 chorych na MM odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej po 3 cyklach cytostatycznych był istotnie statystycznie mniejszy ($p = 0,006$) niż przed leczeniem. Odsetki aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD25⁺ i T $\gamma\delta$ CD69⁺ po leczeniu były mniejsze, w porównaniu z wartościami w momencie rozpoznania, ale różnice nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$) (Tab. VII). W podgrupie R_{MM} odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej po 3 cyklach chemioterapii był istotnie statystycznie mniejszy ($p = 0,005$) niż przed leczeniem. Podobnie odsetki aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD25⁺ i T $\gamma\delta$ CD69⁺ były mniejsze po leczeniu niż na początku choroby, ale różnice nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$). W podgrupie P_{MM} odsetki limfocytów T $\gamma\delta$ oraz aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD25⁺ w krwi obwodowej przed i po 3 cyklach cytostatycznych były takie same, natomiast odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ CD69⁺ zwiększył się w porównaniu do wartości wyjściowej, choć różnica nie była istotna statystycznie ($p > 0,05$) (Tab. VIII).

Omówienie

Istotnym zagadnieniem na drodze do pełnego wyjaśnienia znaczenia limfocytów T $\gamma\delta$ w chorobach nowotworowych jest ocena wpływu różnych sposobów leczenia nowotworów na wielkość populacji limfocytów T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej. W dostępnym piśmiennictwie są doniesienia, w których opisywano zarówno zmniejszenie, jak też zwiększenie odsetka tych komórek w krwi obwo-

Tab. V. Porównanie wielkości populacji limfocytów T $\gamma\delta$ oraz subpopulacji aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD25⁺ i T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej chorych na NHL przed i po leczeniu cytostatycznym

Badany parametr	N	limfocyty T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej chorych na niezziarnicze chłoniaki złośliwe przed i po leczeniu cytostatycznym										
		przed leczeniem [#]					po leczeniu [*]					
		x	SD	Min	Max	Me	x	SD	Min	Max	Me	p
% T $\gamma\delta$	24	2,37	1,80	0,40	8,00	2,05	3,00	2,28	0,60	7,60	2,10	NS
% T $\gamma\delta$ CD25 ⁺	24	0,09	0,09	0,00	0,38	0,06	0,14	0,14	0,01	0,50	0,09	NS
% T $\gamma\delta$ CD69 ⁺	24	0,60	1,06	0,05	5,15	0,26	0,74	0,78	0,14	3,34	0,36	NS

[#] – w momencie rozpoznania, ^{*} – po średnio 4 cyklach chemioterapii (w momencie pierwszej kompleksowej oceny skuteczności chemioterapii)

Legenda:

% T $\gamma\delta$ – odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej

% T $\gamma\delta$ CD25⁺ – odsetek aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD25⁺ w krwi obwodowej

% T $\gamma\delta$ CD69⁺ – odsetek aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej

Tab. VI. Wielkość populacji limfocytów T $\gamma\delta$ i aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD25⁺ i CD69⁺ w krwi obwodowej chorych na NHL przed i po leczeniu cytostatycznym oraz całkowity czas przeżycia w zależności od odpowiedzi leczniczej

Chorzy na niezziarniczego chłoniaka złośliwego świeżo rozpoznanego (N = 24)									
Podgrupa	T $\gamma\delta$ (%)		T $\gamma\delta$ CD25 ⁺ (%)		T $\gamma\delta$ CD69 ⁺ (%)		OS [#]	wartość p	
	Wartość wyjściowa	Wartość po 4 cyklu chmt ^{&}	Wartość wyjściowa	Wartość po 4 cyklu chmt ^{&}	Wartość wyjściowa	Wartość po 4 cyklu chmt ^{&}			
	1	2	3	4	5	6			
R_{NHL}									
(RC, RP, x	3,02	2,51	0,14	0,10	0,94	0,63	14,3	p _{1:2} = NS	
stabilizacja SD	2,35	1,50	0,11	0,18	1,50	0,46	6,8	p _{3:4} = NS	
N = 11 Me	2,10	1,70	0,14	0,10	0,30	0,58	14,0	p _{5:6} = NS	
(46%) zakres	0,4-8	1-4,9	0,02-0,38	0,01-0,5	0,06-5,15	0,14-1,43	2-26		
P_{NHL}									
(progresja) x	2,48	3,50	0,05	0,09	0,31	0,84	11,3	p _{1:2} = NS	
N = 13 SD	1,22	2,87	0,04	0,09	0,25	1,04	6,9	p _{3:4} = NS	
(54%) Me	2,00	2,50	0,04	0,05	0,23	0,34	9,0	p _{5:6} = 0,03	
zakres	0,9-4	0,6-7,6	0-0,15	0,01-0,31	0,05-0,87	0,17-3,34	2-22		
wartość p	NS	NS	0,007	NS	NS	NS	NS		

[#] – całkowity czas przeżycia (OS) jest podany w miesiącach

[&] – w momencie pierwszej kompleksowej oceny skuteczności chemioterapii

Legenda:

T $\gamma\delta$ – limfocyty T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej

T $\gamma\delta$ CD25⁺ – aktywowane limfocyty T $\gamma\delta$ CD25⁺ w krwi obwodowej

T $\gamma\delta$ CD69⁺ – aktywowane limfocyty T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej

chmt – chemioterapia

dowej po zastosowaniu różnych metod terapeutycznych. Akizuki i wsp. wykazali u chorych na raka wątrobowo-komórkowego (*ca hepatozellulare*), leczonych przezcewnikową chemoembolizacją gałęzi tętnicy wątrobowej, zmniejszenie liczby limfocytów T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej po 3 tygodniach od embolizacji [21]. Mentzel i wsp. badali odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej chorych na ostrą anemię aplastyczną (SAA) przed i 6 tygodni po terapii surowicą antylimfocytarną, metyldprednizolonem i cyklosporyną A. Populacja tych komórek po leczeniu stanowiła średnio 0,7% i uległa znaczącej redukcji, o 0,5% w porównaniu do wartości na początku choroby [22]. Natomiast u chorych na szpiczaka mnogiego, u których w leczeniu zmian kostnych zastosowano aminobisfosfony, Villalon i wsp. stwierdzili istotne zwiększenie

odsetka limfocytów T $\gamma\delta$ oraz aktywowanych T $\gamma\delta$ CD25⁺ i T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej, 72 godziny po dożylniej infuzji leku [23]. Podobnie Wilhelm i wsp. zaobserwowali u chorych na niezziarnicze chłoniaki złośliwe o niskim stopniu złośliwości zwiększenie liczby limfocytów T $\gamma\delta$ o fenotypie V γ 9V δ 2 w krwi obwodowej, wzrost ekspresji antygenu wczesnej aktywacji układu odpornościowego – cząsteczki CD69 wśród tych limfocytów, przyspieszoną ich proliferację i wzmoczoną aktywność cytotoxiczną przeciwko komórkom nowotworowym, po skojarzonym leczeniu pamidronianem i niskimi dawkami IL-2 [24].

Obecnie prezentowane wyniki pokazują, że u chorych na szpiczaka mnogiego odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ oraz aktywowanych T $\gamma\delta$ CD25⁺ i T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej po 3 cyklach standardowej chemioterapii był mniej

Tab. VII. Porównanie wielkości populacji limfocytów T $\gamma\delta$ oraz subpopulacji aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD25⁺ i T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej chorych na MM przed i po leczeniu cytostatycznym

Limfocyty T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej chorych na szpiczaka mnogiego przed i po leczeniu cytostatycznym												
Badany parametr	N	przed leczeniem [#]					po leczeniu [*]					p
		x	SD	Min	Max	Me	x	SD	Min	Max	Me	
% T $\gamma\delta$	29	4,35	3,73	0,40	12,2	2,80	2,98	2,89	0,30	12,00	2,05	0,006
% T $\gamma\delta$ CD25 ⁺	29	0,16	0,29	0,01	1,29	0,04	0,07	0,06	0,01	0,19	0,05	NS
% T $\gamma\delta$ CD69 ⁺	29	0,62	1,15	0,05	5,65	0,27	0,45	0,58	0,02	2,69	0,26	NS

[#] – w momencie rozpoznania

^{*} – po średnio 3 cyklach chemioterapii (w momencie pierwszej kompleksowej oceny skuteczności chemioterapii)

Legenda:

% T $\gamma\delta$ – odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej

% T $\gamma\delta$ CD25⁺ – odsetek aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD25⁺ w krwi obwodowej

% T $\gamma\delta$ CD69⁺ – odsetek aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej

Tab. VIII. Wielkości populacji limfocytów T $\gamma\delta$ i aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD25⁺ i T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej chorych na MM przed i po leczeniu cytostatycznym oraz całkowity czas przeżycia w zależności od odpowiedzi leczniczej

Chorzy na szpiczaka mnogiego świeżo rozpoznanego (N = 29)									
Podgrupa	T $\gamma\delta$ (%)		T $\gamma\delta$ CD25 ⁺ (%)		T $\gamma\delta$ CD69 ⁺ (%)		OS [#]	wartość p	
	Wartość wyjściowa	Wartość po 3 cyklu chmt ^{&}	Wartość wyjściowa	Wartość po 3 cyklu chmt ^{&}	Wartość wyjściowa	Wartość po 3 cyklu chmt ^{&}			
	1	2	3	4	5	6			
R_{MM} (RC, RP, stabilizacja) N = 20 (57%)	x	5,09	3,35	0,2	0,07	0,75	0,47	11,10	p _{1:2} = 0,005
	SD	3,92	3,13	0,33	0,05	1,29	0,57	3,70	p _{3:4} = NS
	Me	3,60	2,45	0,04	0,05	0,28	0,35	11,20	p _{5:6} = NS
	zakres	0,5-12,2	0,4 – 12	0,01-1,29	0,01-0,19	0,05-5,65	0,05-2,69	4-18,9	
P_{MM} (progresja) N = 9 (26%)	x	1,80	1,8	0,04	0,03	0,19	0,36	6,90	p _{1:2} = NS
	SD	1,32	1,3	0,03	0,03	0,13	0,65	5,29	p _{3:4} = NS
	Me	1,65	1,4	0,03	0,02	0,11	0,16	6,60	p _{5:6} = NS
	zakres	0,4-4,3	0,3-3,8	0,02-0,11	0,01-0,08	0,02-1,7	0,05-0,41	0,3-17,5	
wartość p		0,03	NS	NS	NS	NS	NS	0,02	

[#] – całkowity czas przeżycia (OS) jest podany w miesiącach

[&] – w momencie pierwszej kompleksowej oceny skuteczności chemioterapii

Legenda:

T $\gamma\delta$ – limfocyty T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej

T $\gamma\delta$ CD25⁺ – aktywowane limfocyty T $\gamma\delta$ CD25⁺ w krwi obwodowej

T $\gamma\delta$ CD69⁺ – aktywowane limfocyty T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej

chmt – chemioterapia

RC – pełna remisja, RP – częściowa remisja

szy niż w momencie rozpoznania. Natomiast u chorych na niezziarnicze chłoniaki złośliwe po 4 cyklach leczenia cytostatycznego populacja limfocytów T $\gamma\delta$ i aktywowanych T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej była większa niż na początku choroby, przy niezmiennym odsetku limfocytów T $\gamma\delta$ CD25⁺.

Najważniejszą zasadą współczesnego leczenia nowotworów jest koncepcja *total cell kill* Skippera, czyli dążenie do maksymalnego zniszczenia populacji komórek nowotworowych, aż do ostatniej komórki [25]. Jednak leki cytostatyczne nie posiadają selektywności działania tylko do komórek nowotworowych i oddziałują również na komórki zdrowe. Być może w NHL zwiększenie odsetka limfocytów T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej po chemioterapii, a w MM ich zmniejszenie, z jednej strony wynika z odmiennych mechanizmów oddziaływania cytostatyków na limfocyty T $\gamma\delta$, z drugiej zaś może wskazywać na różny „próg wrażliwości” tych komórek na działanie poszczególnych leków cytostatycznych, stosowanych w terapii NHL i MM.

W dostępnym piśmiennictwie brak jest informacji, jak zmienia się wielkość populacji limfocytów T $\gamma\delta$ krwi obwodowej chorych na nowotwory w zależności od skuteczności zastosowanej chemioterapii.

W badaniach własnych zaobserwowano, że u chorych, u których stwierdzono trwałą remisję całkowitą, remisję częściową lub stabilizację choroby, odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej po 3 cyklach leczenia cytostatycznego w MM i po 4 cyklach chemioterapii w NHL był mniejszy niż w momencie rozpoznania. Redukcji uległy także subpopulacje aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$: w MM T $\gamma\delta$ CD25⁺ i T $\gamma\delta$ CD69⁺, a w NHL T $\gamma\delta$

CD69⁺. Przeciwnie, u pacjentów, u których wystąpiła progresja choroby, po 3 cyklach leczenia cytostatycznego w MM i po 4 cyklach chemioterapii w NHL, stwierdzono wzrost odsetka aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej, w porównaniu do wartości wyjściowej. Wzrost ten może być wynikiem zwiększonej mobilizacji układu odpornościowego i wzmożonej aktywacji komórkowych mechanizmów obrony przeciwnowotworowej, w odpowiedzi na wzrastającą masę nowotworową w organizmie. Zatem w obu badanych nowotworach układu chłonnego oznaczenie odsetka limfocytów T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej może być przydatne do monitorowania przebiegu leczenia cytostatycznego. Zmniejszenie ich odsetka w krwi obwodowej po 3 cyklach leczenia w MM i po 4 cyklach w NHL, w porównaniu do wartości na początku choroby, może warunkować pozytywny i trwały efekt terapeutyczny, a zwiększenie odsetka aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej może wskazywać na pierwotną oporność na chemioterapię lub prognozować wczesny nawrót choroby.

Dogłębna analiza wpływu standardowej chemioterapii na odsetek limfocytów T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej, biorących udział w eliminacji autologicznych komórek nowotworowych, może być pomocna w opracowaniu skutecznych sposobów leczenia nowotworów, tym bardziej, że obecnie postuluje się możliwość wykorzystania aktywności cytolitycznej tych komórek w immunoterapii nowotworów [26].

Wnioski

1. Oznaczanie odsetka limfocytów T $\gamma\delta$ w krwi obwodowej przed oraz po 4 cyklach cytotatycznych w NHL i po 3 cyklach chemioterapii w MM może być przydatne w praktyce klinicznej do monitorowania przebiegu leczenia cytotatycznego.
2. Zmniejszenie odsetka limfocytów T $\gamma\delta$ oraz aktywowanych T $\gamma\delta$ CD25⁺ i T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej po 3 cyklach chemioterapii w MM oraz odsetka limfocytów T $\gamma\delta$ i aktywowanych T $\gamma\delta$ CD69⁺ po 4 cyklach cytotatycznych w NHL, w porównaniu do wartości wyjściowej, może warunkować trwałą dobrą odpowiedź leczniczą.
3. Zwiększenie odsetka aktywowanych limfocytów T $\gamma\delta$ CD69⁺ w krwi obwodowej po 3 cyklach leczenia cytotatycznego w MM i po 4 cyklach chemioterapii w NHL, w porównaniu do odsetka przed leczeniem, może wskazywać na pierwotną oporność na chemioterapię lub prognozować wczesny nawrót choroby.

Dr n. med. Ewa Sowińska

Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi,
Transplantacji Szpiku
Akademia Medyczna we Wrocławiu
ul. Pasteura 4, 50-367 Wrocław
email: esowin@hemat.am.wroc.pl or
esowin@poczta.onet.pl

Piśmiennictwo

1. Saito H, Kranz DM, Takagaki Y i wsp. Complete primary structure of heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 1984; 309: 757-62.
2. Kranz DM, Saito H, Heller M i wsp. Limited diversity of the rearranged T cell gamma (γ) gene. *Nature* 1985; 313: 2752-5.
3. Brenner MB, McLean J, Dialynas DP i wsp. Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 1986; 322: 145-9.
4. Van Neerven J, Coligan JE, Koning F. Structural comparison of alpha/beta and gamma/delta T cell receptor-CD3 complexes reveals identical subunit interactions but distinct cross-linking patterns of T cell receptor chains. *Eur J Immunol* 1990; 20: 2105-11.
5. Bartkowiak J, Błoński J. Aktywność przeciwnowotworowa limfocytów T gamma delta. *Post Hig Med Dośw* 2000; 54: 35-51.
6. Bank I, DePinho RA, Brenner MB i wsp. A functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human thymocytes. *Nature* 1986; 322: 179-81.
7. Lanier LL, Federspiel NA, Ruitenberg JJ i wsp. The T cell antigen receptor complex expressed on normal peripheral blood CD4⁺, CD8⁺ T lymphocytes. *J Exp Med* 1987; 165: 1076-94.
8. Groh V, Porcelli S, Fabbi M i wsp. Human lymphocytes bearing T cell receptor $\gamma\delta$ are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med* 1989; 169: 1277-94.
9. Borst J, Vroom TM, Bos JD i wsp. Tissue distribution and repertoire selection of human $\gamma\delta$ T cells: Comparison with the murine system. *Current Topics Microbiol Immunol* 1991; 173: 41-6.
10. Lafont V, Loisel S, Liautaud J i wsp. Specific signalling pathways triggered by IL-2 in human V gamma 9 V delta 2 T cells: an amalgamation of NK and alpha beta cell signalling. *J Immunol* 2003; 171: 5225-32.
11. Sowińska E, Zubkiewicz-Usnarska L. Limfocyty T gamma-delta w zakażeniach wirusowych i bakteryjnych. *Adv Clin Exp Med* 2004; 13, 3: 477-81.
12. Sowińska E, Zubkiewicz-Usnarska L. Aktywność przeciwnowotworowa limfocytów T gamma-delta w niezłośliwych chłoniakach złośliwych i ich transformacja nowotworowa. *Adv Clin Exp Med* 2004; 13, 3: 483-9.
13. Penninger JM, Wen T, Timms E i wsp. Spontaneous resistance to acute T-cell leukaemias in TCR γ 1.1J γ 4C γ 4 transgenic mice. *Nature* 1995; 375: 241-4.
14. Zheng B, Lam C, Huang J i wsp. Distinct Tumour Specificity and IL-7 Requirements of CD56⁻ and CD56⁺ Subsets of Human $\gamma\delta$ T Cells. *Scand J Immunol* 2001; 53: 40-8.
15. Songtao Y, Wei H, Juan C i wsp. Expansion and Immunological Study of Human Tumor Infiltrating Gamma/Delta T Lymphocytes in vitro. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 119: 31-7.
16. Kunzmann V, Bauer E, Feurle J i wsp. Stimulation of $\gamma\delta$ T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* 2000; 96: 384-92.
17. Kjeldsen-Kragh J, Quayle A J, Skalhegg BS i wsp. Selective activation of resting human gamma delta T lymphocytes by interleukin-2. *Eur J Immunol* 1993; 23: 2092-9.
18. Colonna-Romano G, Potestio M, Aquino A i wsp. Gamma/delta T lymphocytes are affected in the elderly. *Exp Gerontol* 2002; 37: 205-11.
19. Colonna-Romano G, Potestio M, Scialabba G i wsp. Early activation of gamma delta T lymphocytes in the elderly. *Mech Ageing Dev* 2000; 20, 121, 1-3: 231-8.
20. Sowińska E, Usnarska-Zubkiewicz L, Kuliczowski K. Estimation of gamma-delta-1 T cell receptor ($\gamma\delta$ -1 TCR) expression in bone marrow lymphocyte population in lymphoma malignum and multiple myeloma. *Pharmacol Report* 2007; 59, suppl.1, 261-8.
21. Akizuki S, Magara T, Tanaka T. Diminution of the number of gamma delta T lymphocytes in hepatocellular carcinoma patients treated with transcatheter arterial embolization. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 1998; 21: 108-17.
22. Mentzel U, Vogt H, Rossol R i wsp. Analysis of lymphocyte subsets in patients with aplastic anemia before and during immunosuppressive therapy. *Ann Hematol* 1993; 66: 127-9.
23. Villalon LV, Odriozola JO, Morales AM i wsp. The effects of pamidronate on gamma delta T cells in multiple myeloma and Paget's disease. *Hematol J* 2002; 6: 324-5.
24. Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S i wsp. $\gamma\delta$ T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 2003; 102: 200-6.
25. Orzechowska-Juzwenko K. Podstawy teoretyczne i ogólne zasady współczesnej chemioterapii nowotworów. W: Orzechowska-Juzwenko K (red.), *Zarys chemioterapii nowotworów narządowych i układowych*. Wyd. 2. Wrocław: Volumed; 2000, s. 1-2.
26. Kałwak K. Nowe aspekty immunoterapii adoptywnej – cytotoksyczne limfocyty T o fenotypie CD3⁺CD56⁺. *Acta Haematol Pol* 1999; 30, 3: 235-9.

Otrzymano: 11 kwietnia 2007 r.

Przyjęto do druku: 31 października 2007 r.