

© Borgis

# Wstępna ocena ekspresji antygenu CD34 na komórkach macierzystych krwi obwodowej w przebiegu leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci

**\*Iwona Reszczyńska<sup>1</sup>, Maciej Zieliński<sup>2</sup>, Maciej Niedźwiecki<sup>1</sup>,  
Elżbieta Adamkiewicz-Drożyńska<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii, Gdański Uniwersytet Medyczny  
Kierownik jednostki naukowej: dr hab. med. Elżbieta Adamkiewicz-Drożyńska

<sup>2</sup>Zakład Immunologii Klinicznej i Transplantologii, Katedra Immunologii, Gdański Uniwersytet Medyczny  
Kierownik Zakładu: dr n. med. Grażyna Moszkowska

---

PRELIMINARY TO ASSESS THE EXPRESSION OF CD34 ANTIGEN ON STEM CELLS IN PERIPHERAL BLOOD OF CHILDREN TREATED OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

---

## Summary

**Introduction.** The CD34 antigen is an early marker of bone marrow regeneration in the course of chemotherapy of acute leukemias. The CD34 antigen is the marker of young, multipotent hematopoietic stem cells. In bone marrow, the CD34+ cells constitute a small pool of cells, approximately 1-4%. In peripheral blood, they are present in amount of about 0.01-0.9%. The research was based on determination of the CD34 antigen on stem cells in peripheral blood of patients aged 1-18 years diagnosed with hematological cancers.

**Material and methods.** 28 patients (9 girls and 19 boys) have been included in the research, all treated in the Department of Pediatrics, Hematology, Oncology and Endocrinology Medical University of Gdansk. In 24 patients, acute lymphoblastic leukemia (ALL) was diagnosed, and in 4 children the recurrence of ALL was diagnosed. In the group of ALL patients, 20 children were diagnosed with ALL-B, 3 children with ALL-T and 1 child with ALL-B/T. In 4 children, a recurrence of ALL-B was diagnosed. Blood tests were conducted during the treatment in every period of aplasia, starting on the day, when aplasia was diagnosed, every 3-4 days, till the values of peripheral blood cells increased to the following granulocytes > 500/mm<sup>3</sup>.

**Results.** In 1/3 patients correlation was observed between percentage the CD34+ cells and the level granulocytes in peripheral blood of patients with ALL.

**Conclusions.** Preliminary result in 1/3 patients demonstrated increase percentage CD34+ cells in peripheral blood is precede of increase level of granulocytes in blood.

---

Key words: antigen CD34, stem cells, acute lymphoblastic leukemia, children

---

## WSTĘP

Współczesne leczenie ostrych białaczek z zastosowaniem chemio- i radioterapii jest leczeniem agresywnym i wiąże się z wieloma działaniami niepożądanymi. Najczęściej występującym powikłaniem u chorych z ALL i AML jest mielosupresja. Jest to związane z wyczerpywaniem się puli prawidłowych komórek i brakiem

produkcji nowych przez pozostający w aplazji szpik kostny. Aplazja szpiku kostnego zazwyczaj jest zjawiskiem odwracalnym, a czas jej trwania zależy nie tylko od typu zastosowanego leczenia, ale od indywidualnej reakcji chorego na leczenie, rodzaju choroby nowotworowej, stopnia zaawansowania choroby nowotworowej, a także od indywidualnej zdolności do regeneracji

szpiku kostnego. Uszkodzenie szpiku kostnego przez chemioterapię ujawnia się klinicznie jako pancytopenia krwi obwodowej. Pancytopenia może mieć różny stopień nasilenia. Stwierdzenie głębokiej niedokrwistości lub małopłytkowości (IV stopień wg skali toksyczności WHO) wymaga przetoczenia masy erytrocytarnej lub płytkowej. Obniżenie liczby granulocytów  $< 0,5$  G/l we krwi obwodowej nazywane agranulocytozą, jest głównym czynnikiem sprzyjającym rozwojowi ciężkich, zagrażających życiu infekcji, zwłaszcza gdy stan ten wydłuża się w czasie. Szczególnie ciężkich powikłań infekcyjnych można się spodziewać przy obniżeniu liczby neutrocytów  $< 0,2$  G/l. Ważne dla określenia stopnia ryzyka rozwoju infekcji jest przewidywanie czasu odnowy hematopoetycznej. Przerwy czasowe między kolejnymi blokami chemioterapii pozwalają zazwyczaj na stopniową regenerację szpiku kostnego. Najczęściej regenerację funkcji hematopoetycznej szpiku monitoruje się poprzez ocenę wartości elementów morfotycznych krwi w badaniach morfologii krwi obwodowej, a jedynie w wybranych punktach czasowych w przebiegu prowadzonego leczenia dokonuje się również oceny szpiku kostnego (1-4).

Wczesnym markerem odnowy szpiku kostnego jest antygen CD34. Antygen ten występuje na powierzchni hematopoetycznych komórek i jest markerem młodych, wielopotencjalnych komórek macierzystych hematopoezy zdolnych do odtworzenia długoterminowej hematopoezy wieloliniowej. Jego obecność stwierdza się także na komórkach znajdujących się na różnych etapach różnicowania w poszczególnych liniach komórkowych układu krwiotwórczego. Antygen CD34 należy do rodziny glikoprotein, której ciężar cząsteczkowy wynosi 110 kD. Ekspresja tego antygenu na powierzchni komórek szpiku kostnego obniża się wraz z procesem różnicowania hematopoetycznego komórki. W szpiku kostnym zdrowych osób stwierdza się jego ekspresję w 1-3% komórek, podczas gdy we krwi obwodowej ekspresję antygenu CD34 wykazuje mniej niż 1% (0,02-0,16%) komórek krwi krążącej (5-10).

Hematopoetyczne komórki macierzyste posiadają zdolność do samoodnowy oraz stopniowego różnicowania drogą proliferacji poprzez komórki progenitorowe, do dojrzałych elementów morfologicznych w poszczególnych liniach komórkowych układu krwiotwórczego.

Morfologicznie komórki macierzyste są trudne do odróżnienia od małej wielkości, prawidłowych limfocytów. Powszechnie akceptowaną metodą oceny hematopoetycznych komórek progenitorowych i macierzystych jest obecnie oznaczanie komórek CD34+ za pomocą cytometrii przepływową. Dodatkowym kryterium określającym komórki macierzyste jest brak ekspresji innych antygenów obecnych na komórkach ukierunkowanych (m.in.: CD7, CD19, CD13, CD71) (1, 6, 8, 10-17).

Oznaczanie komórek macierzystych we krwi obwodowej, z możliwością powtarzania badania i ich monitorowania, pozwala pośrednio wnioskować o roz-

pornąjącej się wczesnej odnowie komórek szpiku kostnego.

## MATERIAŁ I METODY

Pacjenci w liczbie 28, w wieku 1-18 lat leczeni w Klinice Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, z powodu rozpoznania ostrej białaczki limfoblastycznej zostali podzieleni na 2 grupy. Do I grupy zakwalifikowano dzieci w momencie rozpoznania ostrej białaczki limfoblastycznej wywodzącej się zarówno z linii limfocytów B, jak i T (ALL – *acute lymphoblastic leukemia*). Do II grupy włączono dzieci ze wznową ostrej białaczki limfoblastycznej (tab. 1).

W celu oznaczenia ekspresji antygenu CD34 na komórkach macierzystych, u wszystkich pacjentów była pobierana krew żylna na antykoagulant EDTA. Oznaczenia wykonywano za pomocą cytometrii przepływowej (Beckman Coulter FC500). Ekspresję antygenu CD34 badano, stosując zestaw Stem-Kit™, przy użyciu kombinacji dwóch mysich przeciwciał monoklonalnych CD45-FITC/CD34-PE, z których każde sprzężone jest z fluorochromem, specyficznych dla różnych komórkowych antygenów powierzchniowych.

Metodą cytometrii przepływowej oznaczono procentowy udział, a także bezwzględną liczbę populacji komórek ekspresyjujących CD45+ CD34+ w próbkach krwi obwodowej. Wykluczenie martwych komórek CD34+ HPC przy zliczaniu zostało osiągnięte dzięki zastosowaniu barwnika żywotności 7-AAD Viability Dye.

Oznaczenia ekspresji antygenu CD34 na komórkach macierzystych były przeprowadzane u dzieci z rozpoznaniem lub wznową ostrej białaczki limfoblastycznej w czasie prowadzonego leczenia, każdorazowo w momencie spadku granulocytów we krwi obwodowej poniżej wartości 0,5 G/l co 3 dni, aż do uzyskania wzrostu liczby granulocytów  $> 0,5$  G/l.

## CEL PRACY

Celem pracy była ocena ekspresji antygenu CD34 jako markera wczesnej odnowy szpikowej u dzieci z rozpoznaniem ostrej białaczki limfoblastycznej.

Statystyczną analizę uzyskanych wyników wykonano za pomocą komputerowego programu Statistica 8.0.

## WYNIKI

Pierwszą grupę pacjentów stanowiło 24 chorych, u których rozpoznano ostrą białaczkę limfoblastyczną.

Tabela 1. Charakterystyka pacjentów.

Grupa	Rozpoznanie	Liczba pacjentów
I	ALL – nowe rozpoznanie, w tym:	24, w tym:
	ALL-B	20
	ALL-T	3
	ALL-B/T	1
II	ALL-B – wznowa	4

Średni odsetek komórek posiadających ekspresję antygenu CD34 we krwi obwodowej w grupie I wynosił 0,081(%). W grupie II, do której należało 4 pacjentów ze wznową ostrej białaczki limfoblastycznej odsetek komórek CD34+ wynosił 0,29(%). Średnia wartość odsetka komórek CD34+ na komórkach macierzystych we krwi obwodowej, oznaczanych w momencie obniżenia liczby granulocytów poniżej 0,5 G/l u dzieci z grupy I mieścił się w granicach referencyjnych przyjętych dla osób zdrowych (wartość referencyjna: 0,02--0,16 (%)) oznaczanych tą metodą i wynosił 0,081%. W porównaniu do przedstawionych wartości, średnia ekspresja antygenu CD34 na komórkach macierzystych we krwi obwodowej w momencie granulocytopenii była wyższa w grupie II, u pacjentów ze wznową ostrej białaczki limfoblastycznej

i wynosiła 0,29%, przekraczając wartości referencyjne. Powyższe wyniki zostały przedstawione w tab. 2.

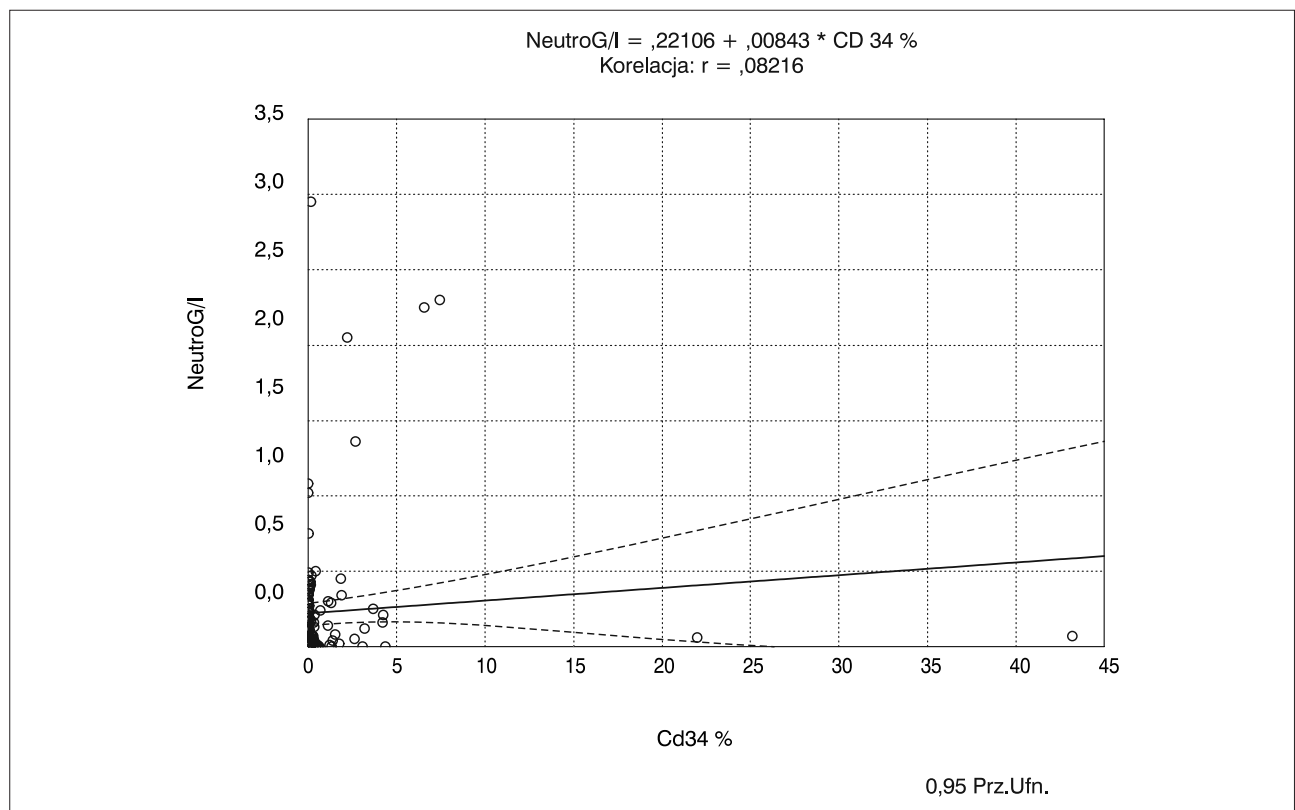
Nie wykazano żadnej zależności statystycznej (korelacja rang Spearmana) pomiędzy ekspresją antygenu CD34 na komórkach macierzystych a liczbą neutrocytów (G/l) we krwi obwodowej (ryc. 1)

Aby sprawdzić, czy wzrost poziomu neutrocytów krwi poprzedzony był wzrostem odsetka komórek CD34+, policzono wartości przyrostów pomiędzy kolejnymi obserwacjami dla obu zmiennych i zbadano korelację między zmianą odsetka CD34 (%) i pojawiającą się przy następnym pomiarze zmianą liczby neutrocytów (G/l) (ryc. 2).

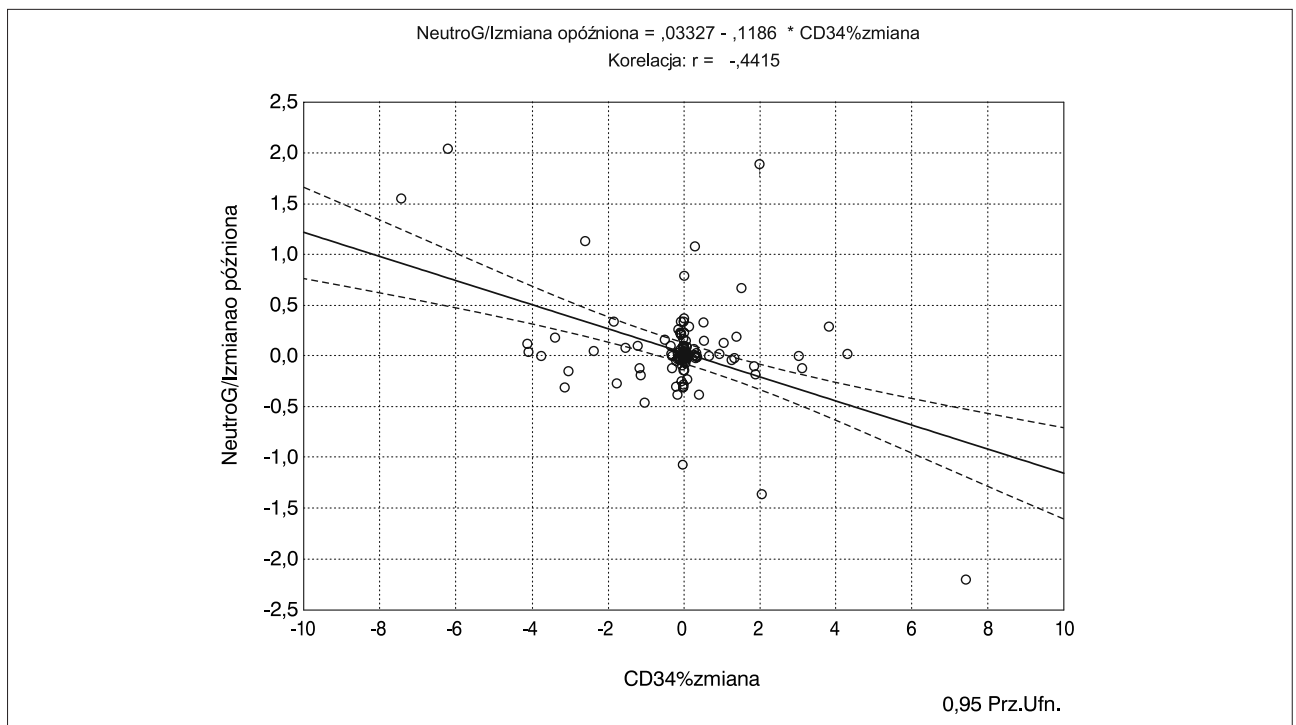
Żadnej zależności nie stwierdzono między przyrostami obserwowanymi w kolejnych punktach czasowych

Tabela 2. Ekspresja antygenu CD34 na komórkach macierzystych we krwi obwodowej.

Grupa	Rozpoznanie	Ekspresja antygenu CD 34 x (%)	
		W poszczególnych grupach ALL	U wszystkich grup ALL
I	ALL – nowe rozpoznanie, w tym: ALL-B ALL-T ALL-B/T	0,114	0,081
		0,074	
		0,055	
II	ALL-B – wznowa	0,29	



Ryc. 1. Zależność ekspresji antygenu CD34 na komórkach macierzystych od poziomu neutrocytów (G/l) we krwi obwodowej.



Ryc. 2. Wyniki połączone: przyrosty pomiędzy kolejnymi obserwacjami dla obu zmiennych oraz korelacja ekspresji antygenu CD34 na komórkach krwi obwodowej od wartości neutrocytów (G/l) we krwi obwodowej.

oznaczeń odsetka komórek CD34+ od wartości liczby neutrocytów we krwi obwodowej.

Pomimo tego, iż przyrosty pomiędzy kolejnymi obserwacjami dla ekspresji antygenu CD34 na komórkach macierzystych we krwi obwodowej oraz korelacja między zmienną CD34% i pojawiającym się przy następnym pomiarze wzrostem neutrocytów (G/l) nie są statystycznie istotne, u części chorych zaobserwowano wyraźnie zwiększony odsetek komórek CD34+ we krwi obwodowej, który od 2 do 4 dni poprzedzał wzrost poziomu neutrocytów we krwi. Powyższą zmianę zaobserwowano u 9 pacjentów, w tym u 8 pacjentów z nowo rozpoznaną ostrą białaczką limfoblastyczną, a także u 1 dziecka z rozpoznaniem wznowy ALL (tab. 3).

Wzrost poziomu neutrocytów we krwi obwodowej, poprzedzony wyraźnym wzrostem odsetka komórek CD34+, utrzymywał się i osiągał wartość powyżej 0,5 (G/l), a w kolejnych dniach liczba tych komórek mieściła się w granicach wartości referencyjnych odpowiednich dla wieku pacjenta.

Porównano wyniki ekspresji antygenu CD34 na komórkach macierzystych u przedstawionych powyżej pacjentów, gdzie średnia wartość ekspresji wyniosła 0,70% dla pacjentów z nowo rozpoznaną ostrą białaczką limfoblastyczną oraz 0,337% dla pacjenta ze wznową ALL. W porównaniu z wartością referencyjną u osób zdrowych (0,02-0,16 (%)) stwierdzono istotny wzrost odsetka tych komórek we krwi obwodowej. Ta obserwacja dotyczyła 9 z 28 (ok. 30%) pacjentów badanych.

Tabela 3. Odsetek komórek CD34 poprzedzający wzrost poziomu neutrocytów we krwi obwodowej.

Rozpoznanie	Przykład	CD34 (%)	Neutrocyty (G/l)	Dni
ALL – nowe rozpoznanie	1	0,540	0,47	3
	2	1,309	0,41	2
	3	0,290	0,45	2
	4	0,160	0,33	4
	5	0,400	0,30	3
	6	1,340	0,49	3
	7	1,139	0,39	4
	8	0,425	0,30	3
ALL – wznowa	9	0,337	0,31	3

#### DYSKUSJA

Komórki macierzyste charakteryzują się zdolnością do samoodnowy oraz różnicowania do wielu typów komórek, w tym hematopoetycznych komórek macierzystych (HSC). Markerem tych komórek jest antygen CD34, którego ekspresja obniża się wraz z różnicowaniem hematopoetycznym.

Prawidłowa rekonstrukcja hematopoetyczna (tzw. regeneracja szpiku) po zastosowanej chemioterapii zapew-

nia źródło komórek macierzystych (komórek CD34+) początkowo w szpiku kostnym, a następnie we krwi obwodowej. Zdolność do odnowy zależy od wielu czynników, w tym od: indywidualnych zdolności do regeneracji każdego pacjenta, przebytej wcześniej chemioterapii i farmakoterapii, typu schorzenia onkologicznego, zaawansowania choroby rozrostowej układu krwiotwórczego, współistniejących infekcji, np. CMV.

W przeprowadzonych badaniach, w których antygen CD34 oznaczony był u pacjentów z rozpoznaniem ALL w momencie spadku granulocytów poniżej  $< 0,5$  G/l, nie wykazano zależności pomiędzy ekspresją antygenu CD34 na komórkach macierzystych a poziomem neutrocytów we krwi obwodowej. Natomiast w uzyskanych wynikach badań u 9 z 28 pacjentów zauważono, iż wzrost poziomu granulocytów we krwi obwodowej poprzedzony był znacznym wzrostem odsetka komórek CD34+. Te wstępne obserwacje zachęcają do dalszych badań większej grupy pacjentów i analizy wyników z uwzględnieniem czynników klinicznych, które mogły wpływać na szybkość odnowy hematopoetycznej szpiku oraz rodzaju stosowanej terapii.

#### WNIOSKI

Stwierdzono wyższą ekspresję antygenu CD34 w okresie poprzedzającym odnowę szpiku kostnego u pacjentów w czasie leczenia wznowy ostrej białaczki limfoblastycznej w porównaniu z ekspresją tego antygenu u dzieci w okresie leczenia nowo rozpoznanej ALL. U analizowanych 1/3 pacjentów zaobserwowano wzrost ekspresji antygenu CD34 na komórkach macierzystych krwi obwodowej, który poprzedzał o 2-4 doby wzrost liczby granulocytów we krwi obwodowej. Mała liczba pacjentów uniemożliwia jednoznaczną interpretację otrzymanych wyników badań, dlatego wyniki wymagają potwierdzenia badaniami większej grupy chorych. □

#### Piśmiennictwo

- Balana-Nowak A, Zdziłowska E: Cytometria przepływowa w diagnostyce immunofenotypowej ostrej białaczki. *Post Biol Komórki* 2008; 35(24): 65-102.
- Chybicka A, Sawicz-Birkowska K: Onkologia i hematologia dziecięca. Wyd. Lekarskie PZWL, W-wa 2008.
- Gibson BE, Wheatley K, Hann IM et al.: Treatment strategy and long term results in pediatric patients treated in consecutive UK AML. *Leukemia* 2005; 12:1230-2138.
- Kowalczyk J: Ostra białaczka limfoblastyczna. [W:] Chybicka A, Sawicz-Birkowska K (red.): Onkologia i Hematologia Dziecięca. Wyd. PZWL 2008; 205-219.
- Antosz H: Antygen CD34 i komórki CD34 pozytywne. *Post Biol Komórki* 2004; 31(2): 285-298.
- Balana-Nowak A, Zdziłowska E, Szostek M, Skotnicki AB: Ocena materiału przeszczepowego w oparciu o immunofenotyp hemopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych oraz ich zdolności klonogenne w hodowli in vitro. *Przegl Lek* 1999; 56(1).
- Cioch M, Gromek T, Dmoszyńska A: Znaczenie powierzchniowych markerów krwiotwórczych komórek macierzystych w przeszczepianiu szpiku. *Acta Haematol Pol* 2006; 37(1): 177-182.
- Tarach JS: Hematopoetyczne komórki macierzyste szpiku kostnego i antygen CD34. *Acta Haematol Pol* 1999; 30(3).
- Tomaszewska A: Komórki CD34+ – charakterystyka, czynność i zastosowanie w terapii. *Adv Clin Exp Med* 1998; 7, 2, 213-219.
- Żydowicz G, Mazur B: Immunofenotyp komórek w prawidłowej hematopoezie. *Post Biol Komórki* 2008; 34(24): 35-44.
- Banaś A: Stem cell – perspectives and dangers. *Prz Med Uniw Rzesz* 2010; 8(2): 117-127.
- Gajkowska A, Oldak T, Jastrzevska M et al.: Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells in leukapheresis product and bone marrow for clinical transplantation: a comparison of three methods. *Folia Histochem Cytobiol* 2006; 44(1): 53-60.
- Kawiak J: Komórki macierzyste organizmu dorosłego w biologii i medycynie. *Post Biol Komórki* 2009; 36(25): 99-110.
- Kozłowska-Skrzypczak M, Komarnicki M: Hematopoetyczne komórki macierzyste i krwiotworzenie. *Diagn. Lab* 2008; 44(2): 231-239.
- Matuszewski R, Sovalat H: Taxonomical classification of hematopoietic CD34+cell subsets from diverse origin. *Logical, statistical and computer methods in medicine*. Białystok 2010; 25-33.
- Piątkowska M, Styczyński J, Dębski R et al.: Komórki hematopoetyczne w szpiku i we krwi obwodowej u chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną, guzy lite oraz u dzieci zdrowych. *Pediatr Pol* 2007; 82(7): 507-512.
- Pituch-Noworolska A: Komórki macierzyste szpiku kostnego. *Acta Haematol Pol* 1995; 26(1).

nadesłano: 29.06.2011

zaakceptowano do druku: 18.07.2011

Adres do korespondencji:

\*Iwona Reszczyńska

ul. Dębinki 7, 80-952 Gdańsk

tel.: (58) 349-28-80

e-mail: ireszczyńska@gumed.edu.pl