

## 10 STRESZCZENIE

Nowotwory dziecięce, mimo że należą do chorób rzadkich, są jedną z głównych przyczyn śmiertelności wśród dzieci i młodzieży. Do najczęściej rozpoznawanych nowotworów u dzieci należą białaczki, nowotwory centralnego układu nerwowego oraz chłoniaki. W ciągu minionych 30 lat obserwowano znaczącą poprawę przeżycia pacjentów pediatrycznych leczonych z powodu chorób nowotworowych. Jest to efekt wielu czynników m.in. lepszej wiedzy na temat biologii nowotworów, możliwości wykonywania dokładniejszej diagnostyki (badania radiologiczne, molekularne), postępów w chemioterapii, chirurgii, radioterapii oraz opiece wspomagającej. Dzieci leczone z powodu nowotworu mają zwiększone ryzyko wystąpienia stanów zagrażających życiu związanych zarówno z samą chorobą jak i leczeniem onkologicznym. Dostępne dane szacują, że za śmiertelność wśród pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki limfoblastycznej w ponad 60% odpowiadają powikłania związane z leczeniem, a w 30% zakażenia. Wśród powikłań infekcyjnych o najgorszym rokowaniu główną przyczyną są zakażenia bakteryjne (68%), rzadziej zakażenia grzybicze czy wirusowe.

Za główny czynnik ryzyka zakażenia uważa się neutropenię definiowaną jako bezwzględną liczbę neutrofilii (ANC, ang. absolute neutrophil count) poniżej 500 komórek/mm<sup>3</sup> lub ANC poniżej 1000 komórek/mm<sup>3</sup>, gdy przewiduje się spadek do poniżej 500 komórek/mm<sup>3</sup> w ciągu 48 godzin. Ryzyko infekcji jest szczególnie wysokie gdy okres trwania neutropenii jest dłuższy niż 7 - 10 dni oraz gdy bezwzględna liczba neutrofilii ANC wynosi < 100 komórek/mm<sup>3</sup>. Szacuje się, że około 30 - 50% dzieci leczonych chemioterapią z powodu nowotworu rozwinię co najmniej jeden epizod neutropenii. Wśród innych czynników ryzyka zakażenia znaczenie ma również rodzaj choroby nowotworowej. Pacjenci leczeni z powodu nowotworów hematologicznych są bardziej narażeni na zakażenia w porównaniu do pacjentów z guzami litymi. Jest to spowodowane samym zajęciem szpiku kostnego przez chorobę, jak i stosowanie intensywniejszej chemioterapii. Stosowanie centralnych permanentnych cewników naczyniowych (CVC, ang. central venous catheter) oraz uszkodzenie bariery śluzówkowej przewodu pokarmowego (ang. mucosal barrier injury, MBI) tzw. mucositis, także pełnią istotną rolę w rozwoju potencjalnej infekcji.

W okresie neutropenii u ok. 50% pacjentów objawy infekcji mogą nie występować lub symptomy infekcji mogą być miernie nasilone, co sprawia często problemy diagnostyczne. Gorączka może być objawem zakażenia, ale może wynikać także z przyczyn nieinfekcyjnych, jak przetoczenia preparatów krwiopochodnych, obecności aktywnej choroby nowotworowej, zespołu lizy guza oraz chemioterapii. Gorączka neutropeniczna (FN ang. febrile neutropenia) może być pierwszym i jedynym objawem w przypadku ciężkiej infekcji ogólnoustrojowej. Najpoważniejszymi stanami w tej grupie pacjentów są zakażenia krwi oraz posocznice, a śmiertelność oceniana jest na poziomie 0,2 - 3%.

Aktualnie nie ma jednoznacznych kryteriów kwalifikujących pacjenta do wysokiego ryzyka ciężkiej infekcji m.in. bakteriemii, sepsy. Jednak w praktyce klinicznej bierze się pod uwagę czynniki takie jak: rozpoznanie białaczki, rodzaj chemioterapii indukcyjnej, neutropenia trwająca ponad 7 dni, temperatura ciała powyżej 39 °C, obecność dreszczy lub hipotensji, implantacja cewnika naczyniowego czy podwyższone wskaźniki laboratoryjne stanu zapalnego.

Wdrożenie rutynowej hospitalizacji i zastosowanie empirycznej szerokowidmowej antybiotykoterapii w okresie gorączki neutropenicznej w ciągu ostatnich kilku dekad znacząco wpłynęło na zmniejszenie śmiertelności wśród pacjentów leczonych onkologicznie (z 30% do ok. 1%) i jest obecnie standardem postępowania. Przed włączeniem antybiotykoterapii empirycznej w przypadku gorączki neutropenicznej pobiera się materiał do badań mikrobiologicznych (posiew krwi, gardła, moczu, kału oraz innych miejsc podejrzanych o infekcję). Jednak długi okres oczekiwania (nawet kilka dni) na wynik, ogranicza przydatność tej metody w pierwszym okresie infekcji.

Obecnie powszechnie stosowanymi markerami zakażenia są białko C-reaktywne (CRP, ang. C-reactive protein) oraz prokalcytonina (PCT ang. procalcitonin). CRP jest białkiem osocza wytwarzanym głównie w hepatocytach w odpowiedzi na podwyższony poziom cytokin zapalnych. W przypadku urazu tkanki lub w przebiegu infekcji może narastać w ciągu 48 godzin od zadziałania czynnika. CRP ze względu na niską specyficzność ma ograniczoną przydatność w ocenie przyczyn gorączki. PCT jest peptydem składającym się z 116 aminokwasów, o masie cząsteczkowej 14 kDa. Jest wytwarzana przez komórki C tarczycy jako prekursor hormonu kalcytoniny i w stanie

zdrowia jest obecna w krwioobiegu w niewielkich stężeniach. Może być wytwarzana przez komórki parenchymalne m.in. komórki wątroby, mięśni, tkanki tłuszczowej, płuc, nerek, jelit w wyniku stanów zapalnych, infekcji, oparzeń czy uszkodzenia tkanek. Wzrasta w ciągu 3 - 4 godzin od zadziałania czynnika infekcyjnego do osiągnięcia plateau po 8 - 24 godzinach. PCT jest pomocna w diagnostyce głównie infekcji bakteryjnych u pacjentów hematologicznych w okresie neutropenii, szczególnie zakażeń krwi bakteriami Gram-ujemnymi.

Aktualnie, wobec ograniczeń przytoczonych powyżej dostępnych metod diagnostycznych, nieustannie poszukuje się nowych markerów infekcji, szczególnie w grupie pacjentów onkologicznych. Coraz większe zainteresowanie wzbudzają chemokiny. Dostępne piśmiennictwo wskazuje na szeroki zakres prac badawczych nad chemokinami w ciągu ostatnich kilku dekad. Chemokiny (cytokiny chemotaktyczne) są grupą białek o małej masie cząsteczkowej między 8 a 15 kDa, które mają wpływ na chemotaksję różnorodnych komórek układu immunologicznego kontrolując ich ukierunkowany ruch. Komórki układu odpornościowego migrują z krwi do miejsc objętych zakażeniem zgodnie z określonym profilem stężeń chemokin.

Tematem niniejszej pracy są ligandy receptora CXCR3. Receptor ten posiada trzy prozapalne ligandy: chemokinę CXCL9 (ang. monokine induced by interferon gamma, MIG), chemokinę CXCL10 (ang. Interferon-gamma-inducible 10 kDa protein, IP-10) oraz chemokinę CXCL11 (ang. interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant, I-TAC). Chemokiny MIG, IP-10 oraz I-TAC są indukowane głównie przez interferon gamma (INF- $\gamma$ , ang. interferon gamma). Produkowane są przez różne typy komórek m.in. limfocyty T, komórki NK, komórki dendrytyczne, eozynofile, makrofagi. Wytwarzane są również przez komórki spoza układu immunologicznego, takie jak komórki śródbłonna, komórki pęcherzykowe tarczycy, fibroblasty, niektóre komórki wątroby oraz komórki raka jelita grubego, raka piersi, nerki, płuc. Odpowiadają za chemotaksję m.in. aktywowanych limfocytów T oraz komórek NK do miejsc infekcji, odgrywając istotną rolę w procesach zapalnych takich jak zakażenia, choroby autozapalne i autoimmunologiczne, a także w chorobach nowotworowych.

Stwierdzono udział ligandów receptora CXCR3 w licznych jednostkach chorobowych m.in. w cukrzycy, twardzinie układowej, zapaleniu wątroby, chorobie

Alzaimera, malarii, AIDS oraz chorobach nowotworach. Najlepiej poznaną chemokina jest IP-10. Dotychczasowe badania wykazują zwiększone stężenie chemokiny IP-10 u dzieci w zakażeniach takich jak sepsa, ropnie skóry i zapalenie płuc. Dotychczas nie przeprowadzono badań oceniających stężenia chemokin receptora CXCR3 w infekcjach u pacjentów pediatrycznych w gorączce neutropenicznej w okresie leczenia onkologicznego.

#### Cele pracy

1. Analiza czynników epidemiologicznych oraz przebiegu klinicznego zakażeń u pacjentów onkologicznych w okresie neutropenii.
2. Ocena przydatności standardowych markerów infekcji w przebiegu zakażeń u pacjentów leczonych z powodu chorób nowotworowych.
3. Ocena stężenia chemokin receptora CXCR3 (MIG, IP-10, I-TAC) w przebiegu zakażeń u pacjentów leczonych z powodu chorób nowotworowych.
4. Ocena przydatności stężeń chemokin receptora CXCR3 (MIG, IP-10, I-TAC) jako wczesnych markerów zakażenia w okresie neutropenii.

#### Materiał i metody

Badaniem zostało objętych 62 pacjentów leczonych w Klinice Pediatrii, Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, z powodu choroby nowotworowej, w tym 25 dziewczynek i 37 chłopców w wieku od 0,9 do 18,6 lat.

Podstawowa profilaktyka zakażeń obejmowała: trimetoprim-sulfametoksazol w profilaktyce zapalenia płuc wywołanego przez *Pneumocystis jirovecii*, u wszystkich pacjentów w trakcie leczenia immunosupresyjnego oraz doustny posakonazol lub dożylną amfoterycynę B, w profilaktyce inwazyjnych zakażeń grzybiczych u pacjentów w trakcie leczenia indukcyjnego ostrej białaczki.

Przedmiotem badania były epizody infekcyjne obserwowane podczas intensywnego leczenia onkologicznego. Kwalifikacja epizodu infekcyjnego do badania następowała w przypadku spełnienia dwóch poniższych kryteriów:

1. gorączka - definiowana jako pojedynczy pomiar temperatury ciała  $\geq 38,3$  °C, lub temperatura ciała  $\geq 38$  °C przez okres 1 godziny,
2. neutropenia - definiowana jako bezwzględna liczba neutrofilów (ANC)  $< 500$

komórek/mm<sup>3</sup> lub ANC < 1000 komórek/mm<sup>3</sup>, gdy przewiduje się spadek do < 500 komórek/mm w ciągu 48 godzin.

Grupę kontrolną stanowiło 46 pacjentów, w tym 25 dziewczynek i 21 chłopców w wieku od 0,6 do 17,5 lat hospitalizowanych w Uniwersyteckim Centrum Pediatrii im. M. Konopnickiej Centralnego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi bez klinicznych i laboratoryjnych cech infekcji.

Badanie zostało przeprowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi nr RNN/129/17/KE.

U wszystkich pacjentów w trakcie leczenia onkologicznego, u których wystąpiła gorączka w okresie neutropenii przeprowadzono szczegółowe badanie przedmiotowe oraz wykonywano dodatkowe badania laboratoryjne i mikrobiologiczne wg poniższego schematu:

1. morfologia krwi,
2. badania mikrobiologiczne w kierunku patogenów bakteryjnych: posiew krwi (pobrany z żyły i/lub cewnika naczyniowego), posiew moczu, posiew kału, wymaz z gardła,
3. oznaczenie stężeń białka C-reaktywnego, proklacytoniny oraz badanych chemokin w surowicy krwi w dwóch punktach czasowych:
  - a) przy pierwszej gorączce – punkt czasowy 1. (CRP-1, PCT-1, MIG-1, IP-10-1, I-TAC-1),
  - b) w 12. -24. godzinie od pierwszej gorączki – punkt czasowy 2. (CRP-2, PCT-2, MIG-2, IP-10-2, I-TAC-2),
4. inne badania diagnostyczne wymagane aktualnym stanem pacjenta np. RTG (zdjęcie rentgenowskie, ang. roentgen), USG (ultrasonografia, ang. ultrasonography).

Następnie zaplanowano podział epizodów gorączki neutropenicznej ustalony w oparciu o stanowiska m.in. Infectious Diseases Society of America oraz Immunocompromised Host Society. Klasyfikacja uwzględnia trzy główne grupy:

- 1) gorączka o nieustalonej przyczynie (FUO, ang. fever of unknown origin), definiowaną jako gorączka bez klinicznych i mikrobiologicznych dowodów infekcji,

2) infekcje udokumentowane klinicznie (CDI, ang. clinically documented infection), definiowane jako zakażenia rozpoznane na podstawie objawów klinicznych z ujemnymi wynikami badań mikrobiologicznych,

3) infekcje udokumentowane mikrobiologicznie (m.in. bakteryjne, grzybicze) (MDI, ang. microbiologically documented infection), definiowane jako infekcje o potwierdzonej mikrobiologicznie etiologii zakażenia.

Stężenie białka C-reaktywnego oznaczano ilościowo z użyciem metody immunoturbidymetrycznej, zaś stężenie prokalcytoniny testem immunofluorescencyjnym. Do oznaczenia stężeń badanych chemokin wykorzystano metodę immunoenzymatyczną ELISA.

Analizy statystycznej wyników uzyskanych badań dokonano za pomocą programu komputerowego STATISTICA 13.3 (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

#### Wyniki

Do badania ostatecznie zakwalifikowano 100 epizodów gorączki neutropenicznej u 62 pacjentów. Wszyscy pacjenci byli w trakcie intensywnego leczenia przeciwnowotworowego.

Mediana wieku badanej grupy wynosiła 9,79 lat (4,9 - 13,65). Najczęstszą chorobą nowotworową była ostra białaczka limfoblastyczna B-komórkowa, która stanowiła 50% rozpoznań w grupie badanej.

W 66,13% przypadków u pacjenta występował tylko 1 epizod gorączki neutropenicznej (41/62). U 22,58% pacjentów obserwowano po 2 epizody (14/62).

Trzy i więcej epizodów obserwowano u 7 pacjentów: u 2 pacjentów 3 epizody (3,23%), u 2 pacjentów 4 epizody (3,23%), u 1 pacjenta 5 epizodów (1,6%) i u 2 pacjentów 6 epizodów (3,23%).

Na podstawie badania przedmiotowego, badań laboratoryjnych oraz mikrobiologicznych wyodrębniono trzy podgrupy o różnej ciężkości zakażeń:

#### 1) Grupa FUO

W przypadku 34 epizodów gorączki neutropenicznej nie uzyskano klinicznych ani mikrobiologicznych dowodów infekcji.

#### 2) Grupa CDI/MDI z wyłączeniem zakażeń krwi (łącznie 47 epizodów)

a) Do grupy CDI zaliczono 26 epizodów: zakażenia przewodu pokarmowego - 6,

neutropeniczne zapalenie jelit (typhlitis) - 1, mucositis - 8, zapalenia płuc - 7,  
zakażenia tkanek miękkich – 4,

b) wśród zakażeń MDI rozpoznano 21 epizodów: zakażenia przewodu  
pokarmowego - 15, zakażenia układu moczowego - 6.

### 3) Grupa BSI/ICU (19 epizodów)

Do grupy zakwalifikowano infekcje uważane za stany najcięższe, łącznie 19  
epizodów, do których zaliczono:

a) zakażenia krwi (BSI, ang. bloodstream infection): bakteriemie - 11, posocznice -  
2,

b) ciężkie infekcje wymagające hospitalizacji na oddziale intensywnej terapii (ICU,  
ang. Intensive Care Unit). W tej grupie było 6 epizodów: posocznice - 2,  
niewydolności wielonarządowej przebiegające z drgawkami - 2, typhlitis - 2.

Nie stwierdzono istotnych różnic w średnim wieku, długości trwania neutropenii,  
ani w średniej liczbie neutrofilii w badanych grupach epizodów infekcyjnych.

Obserwowano, że w grupie FUO częściej były rozpoznane guzy mózgu i guzy lite,  
w porównaniu do grupy CDI/MDI oraz BSI/ICU, w których przeważały białaczki  
( $p=0,05$ ).

Najczęstszym patogenem w grupie MDI była *Escherichia coli* oraz *Enterobacter  
cloacae*. Wśród zakażeń krwi (BSI) przeważały bakterie Gram-dodatnie, najczęściej  
z rodzaju *Staphylococcus* (8/13).

W punkcie czasowym 1. porównywano stężenia badanych markerów w czterech  
grupach: BSI/ICU vs CDI/MDI vs FUO vs grupa kontrolna. Stwierdzono statystycznie  
istotnie wyższe stężenie CRP-1 w grupie CDI/MDI w porównaniu do grupy kontrolnej  
(mediana: 26,1 mg/l vs 0,3 mg/l,  $p<0,001$ ) oraz w grupie BSI/ICU w porównaniu do  
grupy kontrolnej (mediana: 24,4 mg/l vs 0,3 mg/l,  $p=0,026$ ). Nie obserwowano istotnej  
różnicy stężeń CRP-1 między grupą FUO w stosunku do grupy kontrolnej (mediana: 16,2  
mg/l vs 0,3 mg/l,  $p=0,256$ ). Stężenia CRP-1 nie różniły się pomiędzy grupami epizodów  
infekcyjnych (mediana: 24,4 mg/l vs 26,1 mg/l vs 16,2 mg/l,  $p=0,48$ ).

Stwierdzono istotnie statystycznie wyższe stężenie PCT-1 w grupie BSI/ICU  
w porównaniu do grupy CDI/MDI (mediana: 0,24 ng/ml vs 0,16 ng/ml,  $p=0,005$ ) oraz  
w grupie BSI/ICU w porównaniu do grupy FUO (mediana: 0,24 ng/ml vs 0,16 ng/ml,

$p=0,029$ ). Podobnie w grupie BSI/ICU w porównaniu do grupy kontrolnej (mediana: 0,24 ng/ml vs 0,02 ng/ml,  $p=0,001$ ).

Stężenia MIG-1 nie różniły się w poszczególnych grupach epizodów infekcyjnych oraz grupie kontrolnej.

Stwierdzono istotnie wyższe stężenie IP-10-1 oraz I-TAC-1 w grupie CDI/MDI w porównaniu do grupy kontrolnej, odpowiednio: mediana: 97,95 pg/ml vs 78,31 pg/ml ( $p=0,026$ ) oraz mediana: 71,77 pg/ml vs 53,74 pg/ml ( $p=0,027$ ).

W punkcie czasowym 2. oceniano różnicę pomiędzy trzema grupami: BSI/ICU vs CDI/MDI vs FUO. Stwierdzono istotnie wyższe stężenie PCT-2 w grupie BSI/ICU w porównaniu do grupy CDI/MDI (mediana: 1,2 ng/ml vs 0,16 ng/ml,  $p=0,041$ ).

W porównaniu stężeń IP-10-2 stwierdzono granicznie wyższe stężenie w grupie CDI/MDI w porównaniu do grupy FUO (mediana: 168,12 pg/ml vs 102,4 pg/ml,  $p=0,054$ ). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniach CRP-2, MIG-2 oraz I-TAC-2 w badanych grupach epizodów infekcyjnych.

Kolejnym etapem badania była ocena stężeń badanych parametrów infekcji w grupie stanów obarczonych najmniejszym ryzykiem poważnego zakażenia (FUO) w porównaniu do wszystkich pozostałych epizodów (CDI/MDI+BSI/ICU). Analiza wykazała istotnie wyższe stężenie IP-10-1 w grupie CDI/MDI+BSI/ICU w porównaniu do grupy FUO (mediana: 96,84 pg/ml vs 59,95 pg/ml,  $p=0,044$ ). Obserwowano istotnie wyższe stężenie I-TAC-1 w grupie CDI/MDI+BSI/ICU w porównaniu do grupy FUO (mediana: 70,99 pg/ml vs 48,63 pg/ml,  $p=0,026$ ).

Stwierdzono istotnie wyższe stężenie IP-10-2 w grupie CDI/MDI+BSI/ICU w porównaniu do grupy FUO (149,38 pg/ml vs 102,4 pg/ml,  $p=0,045$ ).

Dla parametrów, dla których uzyskano istotne statystycznie różnice pomiędzy grupą FUO a pozostałymi epizodami infekcyjnymi, wyznaczono najlepsze wartości progowe różnicujące te stany za pomocą krzywej ROC (ang. receiver operating characteristic). Za wartość odcięcia dla IP-10-1 wyznaczono stężenie 67,29 pg/ml uzyskując czułość na poziomie 70,8% i swoistość 57,1%, AUC (95% CI) = 0,627 (0,515 - 0,740). Za wartość odcięcia dla I-TAC-1 wyznaczono stężenie 33,4 pg/ml uzyskując wartości: czułość 89,2% i swoistość 42,9%, AUC (95% CI) = 0,653 (0,537 - 0,768).

Wartość odcięcia dla IP-10-2 o stężeniu 129,9 pg/ml wykazała najwyższą czułość 58,5%



i swoistość 71,4%, AUC (95% CI) = 0,629 (0,516 - 0,741).

Porównując narastanie stężeń badanych markerów pomiędzy punktem czasowym

1. a punktem czasowym 2., obserwowano istotny wzrost stężeń w czasie w przypadku białka C-reaktywnego, prokalcytoniny oraz chemokiny IP-10. Nie stwierdzono istotnego statystycznie wzrostu stężeń chemokin MIG oraz I-TAC.

Wnioski

1. Nowotwory hematologiczne, w szczególności białaczki, predysponują do epizodów zakażeń o cięższym przebiegu. FUO częściej stwierdza się w czasie leczenia onkologicznego pacjentów z guzami litymi i guzami mózgu.
2. Najczęstszą etiologią zakażeń bakteryjnych u pacjentów z gorączką neutropeniczną są zakażenia Gram-ujemne o etiologii *Escherichia coli* oraz *Enterobacter cloacae*. Wśród zakażeń krwi przeważają bakterie Gram-dodatnie, najczęściej z rodzaju *Staphylococcus*.
3. Stężenie CRP w grupie pacjentów onkologicznych w okresie gorączki neutropenicznej nie ma wartości różnicującej poszczególne stany infekcyjne.
4. Prokalcytonina może służyć jako marker infekcji wysokiego ryzyka, jednak opóźniony wzrost powyżej normy referencyjnej (0,5 ng/ml) ogranicza jej przydatność we wczesnej fazie zakażenia u pacjentów onkologicznych.
5. W przebiegu zakażeń potwierdzonych klinicznie lub mikrobiologicznie stwierdza się wyższe stężenia chemokin I-TAC oraz IP-10 w porównaniu do pacjentów z FUO.
6. Wybrane prozapalne chemokiny: I-TAC i IP-10 mogą pomóc w odróżnieniu pacjentów z infekcją rozpoznaną klinicznie lub mikrobiologicznie od pacjentów z FUO. Ze względu na stosunkowo niską czułość i swoistość powinny być oceniane wraz ze standardowymi markerami infekcji (CRP, PCT).