



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Haematologica Polonica

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/achaem](http://www.elsevier.com/locate/achaem)

Praca oryginalna/Original research article

# Monocyty z ekspresją Tie-2 u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową

## Tie-2 expressing monocytes in chronic lymphocytic leukemia

Agnieszka Bojarska-Junak<sup>1,\*</sup>, Piotr Grundzok<sup>1</sup>, Małgorzata Waldowska<sup>1</sup>, Justyna Woś<sup>1</sup>, Sylwia Chocholska<sup>2</sup>, Iwona Hus<sup>3</sup>, Wioleta Kowalska<sup>1</sup>, Katarzyna Gęca<sup>1</sup>, Waldemar Tomczak<sup>2,4</sup>, Jacek Roliński<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny, Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jacek Roliński, Lublin, Polska

<sup>2</sup>Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet Medyczny, Kierownik: dr hab. n. med. Marek Hus, Lublin, Polska

<sup>3</sup>Samodzielna Pracownia Transplantologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny, Kierownik: prof. dr hab. n. med. Iwona Hus, Lublin, Polska

<sup>4</sup>Katedra Interny z Zakładem Pielęgniarstwa Internistycznego, Uniwersytet Medyczny, Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jadwiga Daniluk, Lublin, Polska



## INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 14.07.2016

Zaakceptowano: 08.08.2016

Dostępne online: 16.08.2016

Słowa kluczowe:

- przewlekła białaczka limfocytowa
- Tie-2
- monocyty
- TEM
- CD38
- ZAP-70

Keywords:

- Chronic lymphocytic leukemia
- Tie-2
- monocytes
- TEM

## A B S T R A C T

**Introduction:** In peripheral blood, monocytes form a heterogeneous population of cells. One particular subset of circulating monocytes is expressing the angiopoietin receptor Tie-2 (Tie2-expressing monocyte; TEM). TEM are characterized by tumor promoting properties. However, the role of TEM in chronic lymphocytic leukemia (CLL) immunopathogenesis remains undefined. **Material and Methods:** Here, we evaluated the monocytes with Tie-2 expression (CD14<sup>+</sup>Tie-2<sup>+</sup>) in peripheral blood of CLL patients (n = 55) and normal subjects (n = 15) by flow cytometry. We investigated possible associations between TEM and poor prognostic factors such as CD38 or ZAP-70 expression, Rai stage and unfavorable cytogenetic abnormalities. Moreover, we investigated the association of TEM percentage with CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes and Treg percentages. **Results:** We found that CLL patients had a higher percentage of CD14<sup>+</sup>Tie-2<sup>+</sup> monocytes compared to normal controls. The percentage of TEM was positively associated with ZAP-70 expression as well as with unfavourable cytogenetic changes: del(17p) and/or del(11q). The frequency of TEM increased with the disease stage. We showed no correlation between the percentage of TEM and CD38 expression. The percentage of TEM at diagnosis was associated with white blood cell count as well as with the percentages of CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> lymphocytes and Tregs. The majority of CD14<sup>+</sup>Tie-2<sup>+</sup> cells belonged to the intermediate monocytes subset (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) while fewer of them were among the classical (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>) or non-classical monocyte (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) subsets. TEM and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes have

\* Adres do korespondencji: Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej UM w Lublinie, ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin, Polska. Tel.: +48 81 4486420.

Adres email: [abojarskajunak@gmail.com](mailto:abojarskajunak@gmail.com) (A. Bojarska-Junak).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.achaem.2016.08.001>

0001-5814/© 2016 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

- CD38
- ZAP-70

a proangiogenic activity, suppress T-cell activation and promote Treg expansion. The results suggest that monitoring of TEM number and function may provide useful information in determining disease activity.

© 2016 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

## Wstęp

Liczne dane wskazują, że zaburzenia immunologiczne obserwowane u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową (PBL) dotyczą nie tylko limfocytów B. Nieprawidłowości obserwuje się praktycznie we wszystkich elementach odpowiedzi humoralnej i komórkowej [1, 2]. Istotną rolę w patogenezie tej jednostki chorobowej wydają się odgrywać monocyty oraz wywodzące się z nich makrofagi [2, 3]. U chorych na PBL wykazano istotną zależność pomiędzy monocytózą stwierdzoną w momencie diagnozy a krótkim czasem od rozpoznania do rozpoczęcia leczenia oraz całkowitym czasem przeżycia. Ponadto zaobserwowano, że monocytosis wiąże się z występowaniem aberracji chromosomowych: del(17p) i del(11q). Wysoka liczba monocytów wiąże się również z wyższym stadium zaawansowania klinicznego ocenianego według skali Bineta oraz stanem mutacji IGVH (*immunoglobulin variable heavy chain genes*) [3]. Jednak, monocyty wciąż pozostają jednymi z najsłabiej poznanych składników układu immunologicznego w patogenezie PBL.

Warto podkreślić, że rola monocytów w odpowiedzi przeciwnowotworowej nie jest jednoznaczna. W wyniku kontaktu z komórkami nowotworowymi mogą wytwarzać czynniki zarówno pro-, jak i przeciwnowotworowe. Ponadto badania ostatnich lat dowiodły, że monocyty znajdujące się we krwi obwodowej są heterogenną populacją komórek [4, 5]. Część z puli krążących we krwi monocytów ma na powierzchni receptor dla angiopoetyn (Tie-2). Populacja ta określana jest jako monocyty z ekspresją Tie-2 (*Tie-2-expressing monocytes*; TEM), wykazujące właściwości proangiogenne. W warunkach fizjologicznych populacja TEM stanowi ok. 20% populacji monocytów [6]. Liczba TEM może jednak istotnie wzrastać w różnych stanach patologicznych, np. w chorobie nowotworowej [6, 7].

Sugeruje się, że TEM są grupą niedojrzałych monocytów, które mogą być prekursorami makrofagów tkankowych [8, 9]. U chorych z nowotworem obecność TEM wykazano we krwi obwodowej i, co ciekawe, również w obrębie nowotworu. TEM są trudno wykrywalne w prawidłowych, nienowotworowych tkankach [9, 10]. Stymulacja angiogenezy to prawdopodobnie kluczowa rola TEM w progresji nowotworu. TEM uwalniają bFGF – cytokinę zaangażowaną w proces fizjologicznej i patologicznej angiogenezy [11]. Molekularne podstawy aktywności proangiogennej tej subpopulacji monocytów wciąż jednak nie są w pełni wyjaśnione. Wiadomo, że liczebność i aktywność monocytów Tie-2-pozytywnych jest bezpośrednio zależna od angiopoetyny-2 (Ang-2) [7, 12]. TEM migrują ku Ang-2 uwalnianej m.in. przez aktywowane komórki śródbłonna i nowo powstałe naczynia w obrębie guza, co sugeruje mechanizm naprowadzający

TEM do tkanki nowotworowej [9]. Co ciekawe, limfocyty białaczkowe w PBL wydzielają Ang-2 [13]. W związku z tym funkcja TEM może zależeć także od komórek PBL. Zaobserwowano, że Ang-2 wpływa na syntezę cytokin przez TEM, m.in. hamuje uwalnianie prozapalnego TNF [14, 15] oraz IL-12 cytokiny o silnym działaniu antyangiogenym [14]. Wykazano również, że wysoki poziom Ang-2 wiąże się z krótszym czasem od rozpoznania do rozpoczęcia leczenia, ma związek z agresywnym przebiegiem choroby i szybką progresją PBL [13]. Ostatnie doniesienia wskazują, że monocyty z ekspresją Tie-2 hamują odpowiedź T-komórkową oraz zwiększają powstawanie limfocytów T regulatorowych (Treg). Przypuszcza się, że ma to bezpośredni związek z aktywnością IL-10. Cytokiną o działaniu przeciwzapalnym, uwalnianą przez tę subpopulację monocytów [7, 16].

W aktualnej literaturze istnieje tylko jedno doniesienie dotyczące TEM u chorych na PBL. Wskazuje się, że liczba tych komórek jest silnie związana z nieprawidłowościami cytogenetycznymi, takimi jak delecja 17p [16]. Niemniej jednak, badania nad znaczeniem TEM w biologii i patogenezie PBL są bardzo nieliczne.

## Material i metody

### Charakterystyka chorych

Badaniem objęto grupę 55 chorych (29 mężczyzn i 26 kobiet) w momencie rozpoznania PBL, hospitalizowanych w Katedrze i Klinice Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Badani chorzy znajdowali się w różnych stadiach zaawansowania klinicznego choroby według Rai'a. Stadium 0 stwierdzono u 20 chorych, stadium I u 18 chorych, stadium II u 7 chorych, stadium III u 6 chorych, a stadium IV u 4 chorych. Chorych podzielono na trzy grupy według zmodyfikowanej klasyfikacji Rai'a: grupę niskiego ryzyka (st. 0), grupę pośredniego ryzyka (st. I/II) oraz grupę wysokiego ryzyka (st. III/IV). Charakterystykę ocenianych chorych na PBL przedstawiono w Tabeli I. Grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych dawców (9 mężczyzn i 6 kobiet) w wieku od 32 do 85 lat (mediana 56 lat). Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Lublinie (nr KE-0254/107/2013 oraz KE-0254/52/2016). Wszyscy chorzy wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu.

### Material do badań

Material do badań stanowiła krew obwodowa, pobrana na EDTA. Material uzyskiwano od chorych podczas rutynowych badań diagnostycznych.

**Tabela I – Charakterystyka chorych na PBL**  
**Table I – Characteristics of CLL patients**

	Liczba chorych (%)
<b>Grupy ryzyka</b>	
Grupa niskiego ryzyka (st. 0)	20 (36,4)
Grupa pośredniego ryzyka (st. I/II)	25 (45,4)
Grupa wysokiego ryzyka (st. III/IV)	10 (18,2)
<b>ZAP-70 (wartość odcięcia <math>\geq 20\%</math>)</b>	
dodatni	21 (38,2)
ujemni	34 (61,8)
<b>CD38 (wartość odcięcia <math>\geq 30\%</math>)</b>	
dodatni	18 (32,7)
ujemni	37 (67,3)
<b>Aberracje cytogenetyczne</b>	
del(17p13.1) i/lub del(11q22.3)	10 (18,2)
bez del(17p13.1) i/lub del(11q22.3)	37 (67,3)
Nie określono	8 (14,5)
mediana (minimum– maksimum)	
Wiek (lata)	65 (49–87)
WBC (G/L)	26,59 (10,11–194,54)
Limfocytoza (G/L)	20,30 (5,51–181,09)
$\beta_2$ M (mg/dL)	2,39 (1,36–5,86)
LDH (IU/L)	373 (266–839)
Hemoglobina (g/dL)	13,95 (8,10–17,20)
PLT (G/L)	199 (49–399)
CD19+/CD5+/ZAP-70+ (%)	14,64 (0,21–44,29)
CD19+/CD5+/CD38+ (%)	9,42 (0,22–80,90)
WBC – liczba krwinek białych ( <i>white blood cell</i> ), leukocytoza; LDH – dehydrogenaza mleczanowa ( <i>Lactate dehydrogenase</i> ); $\beta_2$ M – $\beta_2$ -microglobulina; PLT – płytki krwi	

### Ocena monocytów CD14<sup>+</sup>Tie-2<sup>+</sup>

Ekspresję antygenów powierzchniowych monocytów oceniono metodą cytometrii przepływowej. Badanie wykonano

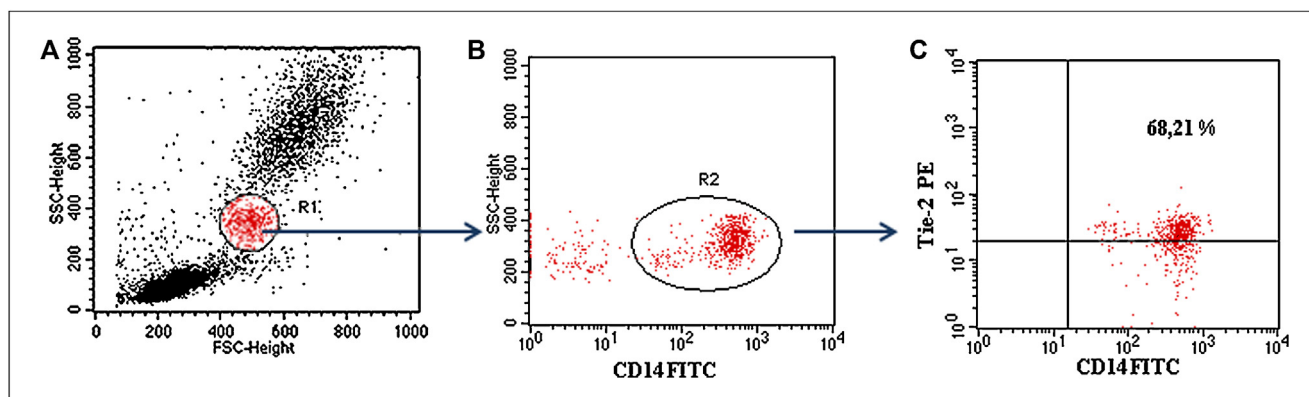
z użyciem krwi pełnej. Krew obwodową poddawano znakowaniu przeciwciałami monoklonalnymi: anti-CD14 FITC, anti-CD16 PE-Cy5 (BD Pharmingen) oraz anti-CD202b PE (Tie-2/Tek) (BioLegend). Przeciwciała stosowano w ilości zgodnej z zaleceniami producenta. Po 20 minutach inkubacji (temperatura pokojowa, w ciemności) przeprowadzano lizę erytrocytów roztworem FACS Lysing Solution (Becton Dickinson). Po dwukrotnym odpłukaniu roztworem PBS próbki oceniano w cytometrze przepływowym. Do oceny monocytów CD14<sup>+</sup>Tie-2<sup>+</sup> wykorzystano cytometr przepływowy BD FACSCalibur™ (BD Biosciences). Oceniono odsetek monocytów z ekspresją Tie-2 wśród komórek CD14<sup>+</sup> (Ryc. 1). Ponadto oceniono odsetek komórek CD14<sup>+</sup>Tie-2<sup>+</sup> wśród subpopulacji monocytów CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (monocyty klasyczne), CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (monocyty pośrednie) oraz CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (monocyty nieklasyczne). Do analizy oraz graficznej prezentacji danych wykorzystano program CellQuest Pro.

### Oznaczenia odsetka limfocytów Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>

Odsetek limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>/FOXP3<sup>+</sup> oznaczono za pomocą Human Treg Flow™ Kit (FOXP3 Alexa Fluor 488/CD4 PE-Cy5/CD25 PE) firmy BioLegend. Znakowanie limfocytów Treg przeprowadzono zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta.

### Ocena ekspresji ZAP-70 i CD38

Ocenę ekspresji ZAP-70 w limfocytach CD19+/CD5+ we wszystkich badanych próbkach przeprowadzono za pomocą przeciwciał monoklonalnych: anti-CD19 FITC, anti-ZAP-70 PE (klon 1E7.2) oraz anti-CD5 PE-Cy5 (BD Pharmingen, USA). Do oceny ekspresji CD38 użyto przeciwciał monoklonalnych: anti-CD19 FITC, anti-CD38, PE anti-CD5 PE-Cy5 (BD Pharmingen, USA).



**Ryc. 1 – Przykładowy obraz z cytometru przepływowego przedstawiający analizę monocytów CD14<sup>+</sup> wykazujących ekspresję Tie-2. (A) Układ FSC/SSC – ustanowienie bramki (region R1) dla monocytów. (B) Pośród komórek zgromadzonych w regionie R1 wyodrębniano komórki CD14<sup>+</sup> (region R2). (C) Końcowy obraz przedstawiający komórki w układzie CD14 FITC/Tie-2 PE zawiera komórki z rejonów R1 i R2. Komórki w prawym górnym rogu przedstawiają odsetek monocytów CD14<sup>+</sup> z ekspresją Tie-2 (CD14<sup>+</sup>Tie-2<sup>+</sup>; TEM)**

**Fig. 1 – The flow cytometry dot plots showing the analysis of the percentage of CD14<sup>+</sup> monocytes with Tie-2 expression (CD14<sup>+</sup>Tie-2<sup>+</sup>; TEM). (A) The dot plot shows FSC/SSC distribution and the gate (region R1) used to select monocytes. (B) The R1 gate events were then analyzed for CD14 expression. CD14<sup>+</sup> cells were gated (region R2). (C) The final dot plot CD14 FITC/Tie-2 PE was established by combined gating of events using R1 and R2. The number in upper right quadrant on the dot plot represent percentage of CD14<sup>+</sup> monocytes with Tie-2 expression (CD14<sup>+</sup>Tie-2<sup>+</sup>; TEM)**

Wartość odcięcia (punkt cut-off) dla komórek białaczkowych z ekspresją ZAP-70 wynosiła  $\geq 20\%$ , natomiast dla komórek białaczkowych z ekspresją CD38  $\geq 30\%$ .

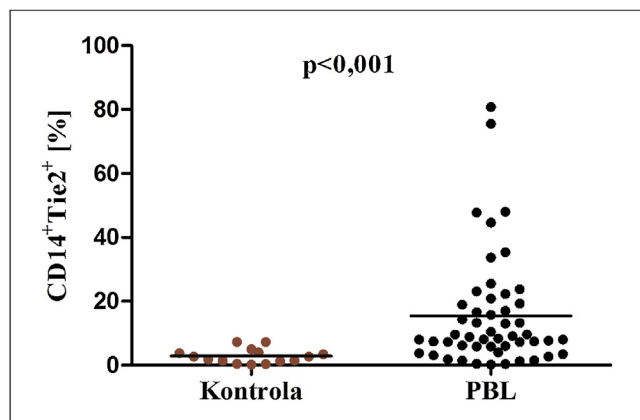
## Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej uzyskanych wyników wykorzystano program Statistica 10.0 PL. W celu oceny różnic pomiędzy grupami wykorzystano test nieparametryczny U Manna-Whitneya. Istnienie związków statystycznych pomiędzy zmiennymi oceniano, wyznaczając współczynnik korelacji rang Spearmana. Za istotne statystycznie uznawano wyniki, których próg poziomu istotności był  $p < 0,05$ .

## Wyniki i omówienie

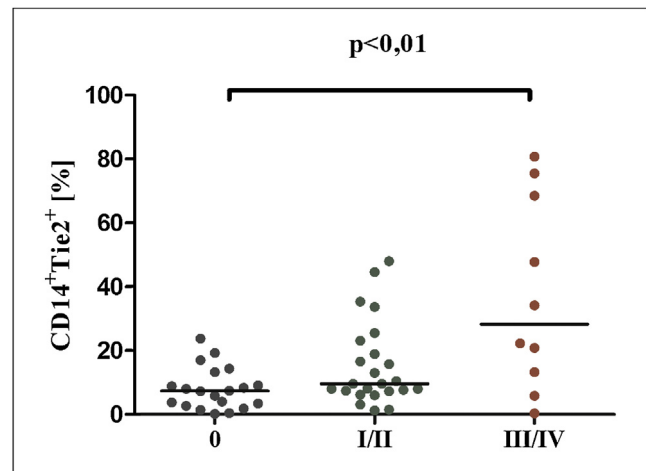
W patogenezie wielu chorób nowotworowych wykazano naciekanie nowotworu przez monocyty/makrofagi. W przewlekłej białaczce limfocytowej monocytoza wiąże się z niekorzystnym rokowaniem [3, 17]. Zaobserwowano również, że w PBL monocyty za pośrednictwem cząsteczki CD14 lub jej rozpuszczalnej formy sCD14 chronią białaczkowe limfocyty B przed śmiercią na drodze apoptozy [18]. Monocyty stanowią heterogenną populację komórek wykazującą m.in. zróżnicowaną ekspresję cząsteczek CD16 i CD14 [4, 5]. Ponadto część z puli krążących we krwi monocytów ma na powierzchni receptor Tie-2 [6]. Badania określające znaczenie poszczególnych subpopulacji monocytów w patogenezie PBL są jednak bardzo nieliczne.

W przeprowadzonych badaniach oceniono monocyty CD14<sup>+</sup>Tie-2<sup>+</sup> (TEM) u chorych na PBL. Wykazano istotnie wyższy odsetek TEM u chorych na PBL (mediana 15,47%) niż u zdrowych dawców (mediana: 2,90%) ( $p < 0,001$ ) (Ryc. 2). Ponadto, stwierdzono znamienne niższy odsetek komórek CD14<sup>+</sup>Tie-2<sup>+</sup> u chorych zakwalifikowanych do grupy niskiego ryzyka (stadium 0 wg Rai'a) w porównaniu z grupą o wysokim stopniu ryzyka (stadium III-IV wg Rai'a) ( $p < 0,01$ ) (Ryc. 3). Nie wykazano natomiast istotnych statystycznie



Ryc. 2 – Odsetek TEM u chorych na PBL oraz w grupie kontrolnej

Fig. 2 – The percentage of TEM in CLL patients and health controls



Ryc. 3 – Odsetek TEM u chorych na PBL znajdujących się w różnych stadiach zaawansowania wg Rai i wsp.

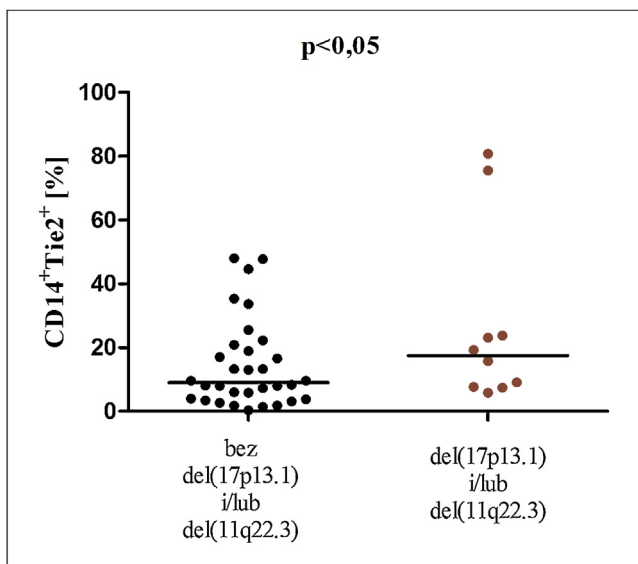
Fig. 3 – The percentage of TEM in CLL patients in different stages of disease

różnic w odsetku monocytów CD14<sup>+</sup>Tie-2<sup>+</sup> pomiędzy grupą chorych w stadium 0 a grupą w stadium I/II (Ryc. 3). Maffei i wsp. [16] wykazali wzrost liczby TEM we krwi obwodowej chorych na PBL. Autorzy nie wykazali jednak zależności pomiędzy liczbą TEM a stopniem zaawansowania klinicznego PBL.

Obecność specyficznych aberracji chromosomowych, w szczególności del(17p) czy del(11q) jest jednym z niekorzystnych czynników rokowniczych w PBL [19]. W przeprowadzonej analizie porównano odsetek TEM u chorych z niekorzystnymi zmianami cytogenetycznymi del(17p13.1) i/lub del(11q22.3) z odsetkiem występującym w grupie chorych bez tych niekorzystnych aberracji (Ryc. 4). W grupie chorych wykazujących obecność delekcji 17p i/lub 11q stwierdzono znamienne wyższy odsetek monocytów CD14<sup>+</sup>Tie-2<sup>+</sup> (mediana: 17,5% vs 9,02%) ( $p < 0,05$ ) (Ryc. 4). Wyniki te są zgodne z rezultatami badań Maffei i wsp. [16], którzy wykazali wyższą liczbę TEM u chorych z delecją 17p.

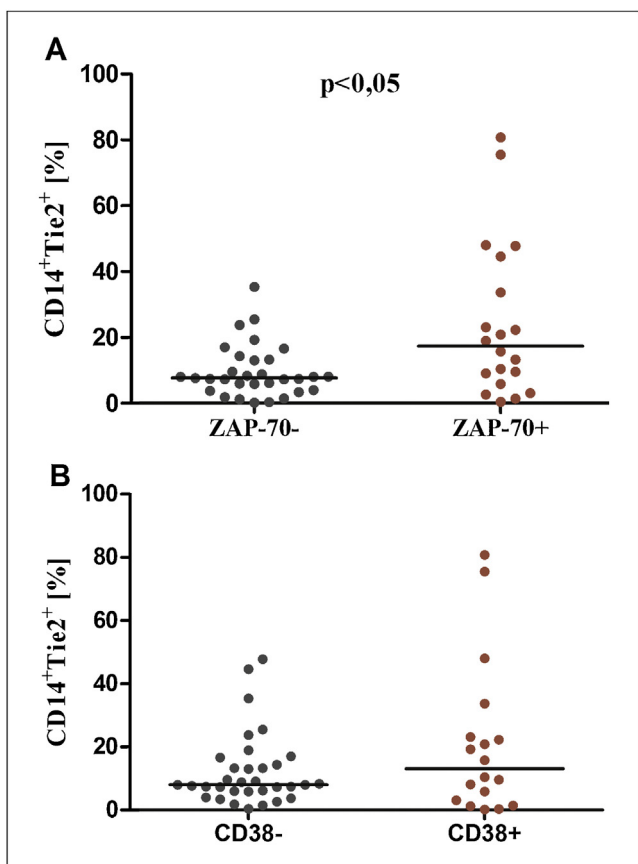
U wszystkich ocenianych chorych na PBL oznaczono ekspresję markera CD38 oraz określono wewnątrzkomórkową ekspresję białka ZAP-70 w komórkach CD19<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup>. W przeprowadzonej analizie wykazano dodatnią korelację pomiędzy ekspresją ZAP-70 a odsetkiem monocytów CD14<sup>+</sup>Tie-2<sup>+</sup> ( $p < 0,001$ ). Wykazano istotnie wyższy odsetek TEM wśród monocytów CD14<sup>+</sup> u chorych ZAP-70+ (mediana: 17,37%) w porównaniu z chorymi ZAP-70- (mediana: 7,69%) (Ryc. 5A). Jednak analogicznie do badań Maffei i wsp. [16] nie zaobserwowano zależności pomiędzy odsetkiem TEM a ekspresją CD38 (Ryc. 5B).

W przeprowadzonych badaniach nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy odsetkiem TEM a poziomem  $\beta_2$ -mikroglobuliny, liczbą płytek krwi, stężeniem hemoglobiny lub aktywnością LDH w surowicy. Nie stwierdzono także statystycznie istotnych zależności pomiędzy odsetkiem TEM a wiekiem chorych. Odnotowano natomiast istotną statystycznie zależność pomiędzy odsetkiem CD14<sup>+</sup>Tie-2<sup>+</sup> a leukocytozą ( $R = 0,324$ ;  $p < 0,05$ ) (Ryc. 6A).



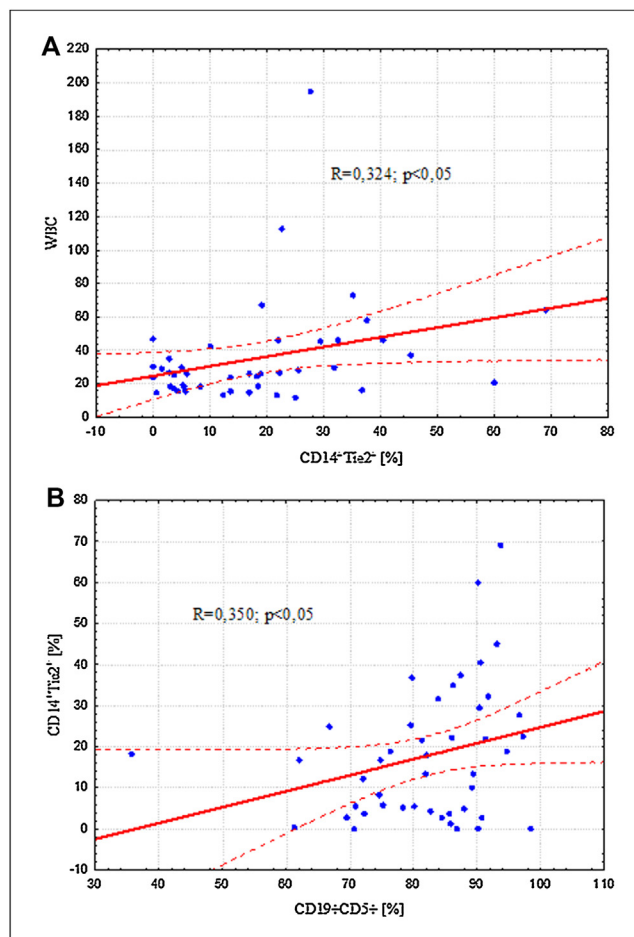
Ryc. 4 – Odsetek TEM u chorych na PBL w zależności od występowania aberracji chromosomowych: del(11q) i/lub del(17p)

Fig. 4 – The percentage of TEM in CLL patients subdivided according to cytogenetic aberrations del(11q) or/and del(17p)



Ryc. 5 – Odsetek TEM u chorych na PBL wykazujących różną ekspresję antygenów ZAP-70 i CD38

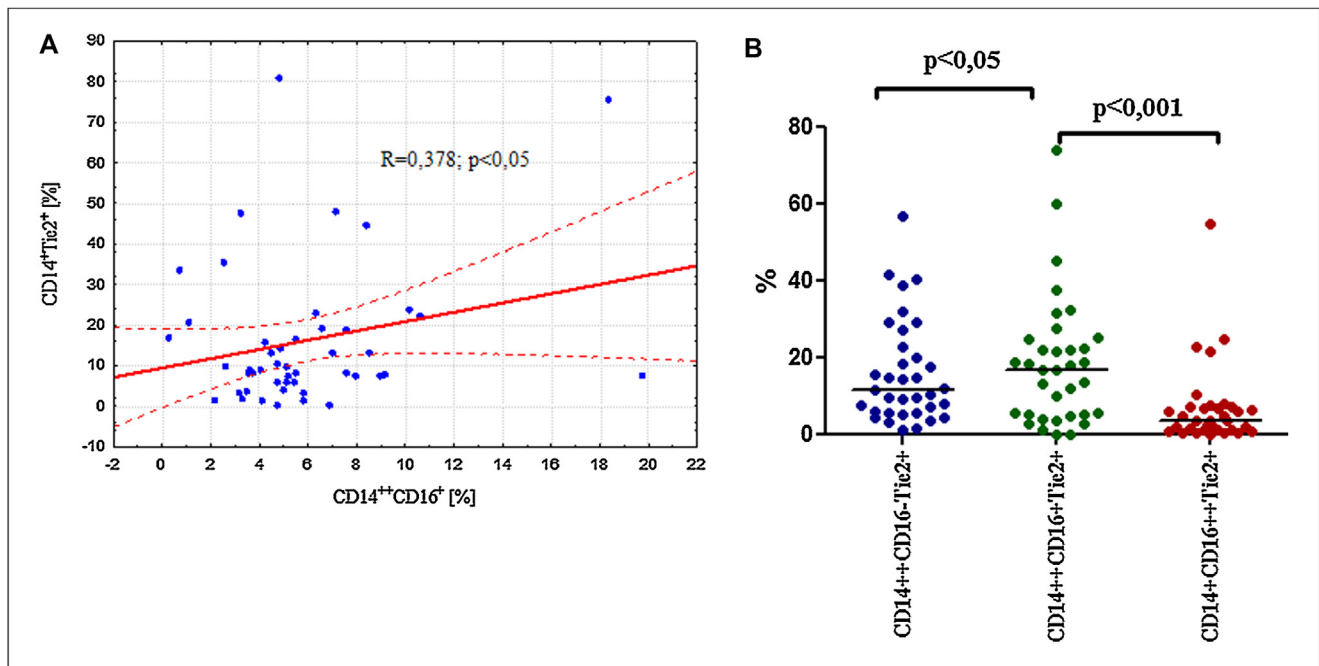
Fig. 5 – The percentage of TEM in CLL patients with different ZAP-70 and CD38 antigen expression



Ryc. 6 – Zależność pomiędzy odsetkiem TEM (CD14<sup>+</sup>Tie2<sup>+</sup>) a leukocytozą (A) oraz odsetkiem limfocytów CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> (B)  
Fig. 6 – The relationship between percentage of TEM (CD14<sup>+</sup>Tie2<sup>+</sup>) and white blood cell count (A) and percentage of CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> cells (B)

Przeciwnie, Maffei i wsp. [16] nie wykazali istotnych zależności pomiędzy liczbą TEM a WBC. Warto jednak zwrócić uwagę, że badacze oceniali mniejszą liczbę chorych (n = 26) w porównaniu z liczbą chorych przebadanych w niniejszej pracy (n = 55). W przeprowadzonych badaniach nie oceniano wpływu TEM na przeżycie komórek PBL. Zaobserwowano jednak, że odsetek monocytów z ekspresją Tie-2 dodatkowo koreluje nie tylko z leukocytozą, ale także z odsetkiem białaczkowych limfocytów B CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> (R = 0,350; p < 0,05) (Ryc. 6B).

Przeżycie limfocytów PBL przypuszczalnie zależy od wzmożonego wydzielania immunosupresyjnych cytokin, m.in. IL-10 oraz TGF-β. Cytokiny te uwalniane są zarówno przez białaczkowe limfocyty B, jak i przez komórki wchodzące w skład mikrośrodowiska w tym monocyty [1]. Jak już wspomniano, istotnym źródłem IL-10 (indukującej ekspansję Treg) mogą być monocyty z ekspresją Tie-2, [7, 12, 16]. W PBL obserwuje się akumulację Treg, a odsetek tych limfocytów często wiąże się ze stadiem zaawansowania klinicznego oraz gorszą prognozą [20]. W przeprowadzonej analizie wykazano u chorych na PBL istotną zależność



Ryc. 7 – Zależność pomiędzy odsetkiem TEM (CD14<sup>+</sup>Tie2<sup>+</sup>) a odsetkiem monocytołów pośrednich u chorych na PBL (A). Odsetek monocytołów Tie-2<sup>+</sup> spośród monocytołów klasycznych (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) pośrednich (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) i nieklasycznych (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) (B)

Fig. 7 – The relationship between percentage of TEM (CD14<sup>+</sup>Tie2<sup>+</sup>) and percentage of intermediate monocytes subset. The percentage of Tie-2<sup>+</sup> monocytes among the classical (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), intermediate (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) and non-classical (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) monocyte subsets (B)

pomiędzy odsetkiem TEM a odsetkiem limfocytów Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>) (R = 0,306; p < 0,05). Warto przypomnieć, że komórki PBL wydzielają znaczne ilości angiopoe-tyny-2 [13], która z kolei jest bezpośrednio odpowiedzialna za wzrost liczebności i aktywność TEM [7, 12]. Ponadto, TEM są odpowiedzialne za hamowanie proliferacji limfocytów T i osłabienie odpowiedzi T komórkowej tak istotnej w zwalczaniu nowotworu [12].

Do istotnych mechanizmów związanych z patogenezą PBL należą również zaburzenia związane z angiogenezą [21–24]. Ostatnie lata pokazały kluczowe znaczenie tego procesu nie tylko w rozwoju guzów litych, ale również w patomechanizmie nowotworów limfoproliferacyjnych w tym PBL [21, 22]. U chorych na PBL stwierdzono zwiększoną gęstość unaczynienia węzłów chłonnych [21]. Zwiększone unaczynienie obserwowano również w szpiku kostnym [22]. Zaobserwowano, że zwiększone unaczynienie w szpiku u nowo zdiagnozowanych chorych, znajdujących się we wczesnym stadium PBL, wiąże się z większym ryzykiem do progresji choroby [22]. Stymulacja angiogenezy to prawdopodobnie kluczowa rola TEM w progresji nowotworu. Monocyty z ekspresją Tie-2 uwalniają bFGF zaangażowany w proces angiogenezy [6, 11]. U chorych na PBL podwyższony poziom bFGF związany jest ze stadiem zaawansowania choroby [21]. Ponadto, wysokie stężenie bFGF związane jest z wydłużonym czasem przeżycia białaczkowych limfocytów oraz niekorzystnym przebiegiem choroby [23, 24]. W przeprowadzonych badaniach nie oceniano związku TEM z angiogenezą w PBL. Zaobserwowano natomiast dodatnią korelację pomiędzy odsetkiem TEM

a odsetkiem monocytołów pośrednich (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) (R = 0,378; p < 0,05) (Ryc. 7A). Ostatnie badania wykazały, że to monocyty pośrednie stanowią subpopulację o właściwościach proangiogennych. Ponadto, monocyty CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> analogicznie do TEM hamują odpowiedź T-komórkową oraz symulują powstawanie limfocytów Treg. Jest to więc subpopulacja monocytołów, która sprzyja rozwojowi nowotworu [16]. Reasumując, najwyższy odsetek monocytołów z ekspresją Tie-2 wykazano spośród monocytołów pośrednich (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) (mediana: 16,85%). Podczas gdy mniej ich było spośród monocytołów klasycznych (mediana: 11,82%) lub nieklasycznych (mediana: 3,83%) (Ryc. 7B). Z wynikami tymi koresponduje rezultat badań Maffei i wsp. [16], którzy również wykazali istotnie wyższy odsetek monocytołów z ekspresją Tie-2 spośród subpopulacji monocytołów pośrednich.

## Wnioski

Podsumowując uzyskane wyniki badań, należy sądzić, że TEM odgrywają istotną rolę w patogenezie PBL. Na dalszą ocenę zasługuje przeprowadzenie badań funkcjonalnych i analiza aktywności monocytołów Tie-2<sup>+</sup>. Niemniej jednak, u chorych na PBL odsetek TEM koreluje z czynnikami ryzyka (ekspresja ZAP-70, del(17p) i/lub del(11q), stadium wg Rai'a). Ponadto, odsetek CD14<sup>+</sup>Tie-2<sup>+</sup> koreluje z leukocytozą oraz odsetkiem białaczkowych limfocytów CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>. Prawdopodobnie TEM mają istotne znaczenie w akumulacji limfocytów nowotworowych w PBL. Przypuszczalnie, monitorowanie

liczby i funkcji tej subpopulacji monocytów może dostarczyć informacji określających aktywność choroby. Istotną zależność pomiędzy odsetkiem TEM a odsetkiem limfocytów Treg może potwierdzać immunosupresyjne właściwości CD14<sup>+</sup>Tie-2. W związku z korelacją pomiędzy odsetkiem TEM a odsetkiem monocytów pośrednich CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (mających właściwości proangiogenne) uzasadnione jest kontynuowanie badań nad wpływem TEM na angiogenezę w PBL.

### Wkład autorów/Authors' contributions

Według kolejności.

### Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

### Finansowanie/Financial support

Praca naukowa finansowana za środków przeznaczonych na badanie statutowe nr Ds. 458 Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Praca powstała z wykorzystaniem sprzętu zakupionego w ramach Projektu „Wyposażenie innowacyjnych laboratoriów prowadzących badania nad nowymi lekami stosowanymi w terapii chorób cywilizacyjnych i nowotworowych” w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007–2013, Osi priorytetowej I Nowoczesna Gospodarka, Działania I.3 Wspieranie Innowacji.

### Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

### P I Ś M I E N N I C T W O / R E F E R E N C E S

- [1] Caligaris-Cappio F. Inflammation, the microenvironment and chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2011;96:353–355.
- [2] Łapuć I, Eljaszewicz A, Kłoczko J, Moniuszko M. Rola monocytów w patogenie przewlekłej białaczki limfocytowej. *Acta Haematol Pol* 2014;45:340–346.
- [3] Mazumdar R, Evans P, Culpin R, Bailey J, Allsup D. The automated monocyte count is independently predictive of overall survival from diagnosis in chronic lymphocytic leukaemia and of survival following first-line chemotherapy. *Leuk Res* 2013;37:614–618.
- [4] Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol* 2014;5:514. eCollection 2014.
- [5] Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010;116:e74–e80.
- [6] De Palma M, Murdoch C, Venneri MA, Naldini L, Lewis CE. Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications. *Trends Immunol* 2007;28:519–524.
- [7] Coffelt SB, Tal AO, Scholz A, De Palma M, Patel S, Urbich C, et al. Angiopoietin-2 regulates gene expression in TIE2-expressing monocytes and augments their inherent proangiogenic functions. *Cancer Res* 2010;70:5270–5280.
- [8] Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003;19:71–82.
- [9] Venneri MA, De Palma M, Ponzoni M, Pucci F, Scielzo C, Zonari E, et al. Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood* 2007;109:5276–5285.
- [10] Bron S, Henry L, Faes-Van't Hull E, Turrini R, Vanhecke D, Guex N, et al. TIE-2-expressing monocytes are lymphangiogenic and associate specifically with lymphatics of human breast cancer. *Oncoimmunology* 2015;5:e1073882. eCollection 2016.
- [11] De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi L, Politi LS, Sampaolesi M, et al. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and amesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 2005;8:211–226.
- [12] Coffelt SB, Chen YY, Muthana M, Welford AF, Tal AO, Scholz A, et al. Angiopoietin 2 stimulates TIE2-expressing monocytes to suppress T cell activation and to promote regulatory T cell expansion. *J Immunol* 2011;186:4183–4190.
- [13] Maffei R, Martinelli S, Castelli I, Santachiara R, Zucchini P, Fontana M, et al. Increased angiogenesis induced by chronic lymphocytic leukemia B cells is mediated by leukemia-derived Ang2 and VEGF. *Leuk Res* 2010;34:312–321.
- [14] Lewis CE, De Palma M, Naldini L. Tie2-expressing monocytes and tumor angiogenesis: regulation by hypoxia and angiopoietin-2. *Cancer Res* 2007;67:8429–8432.
- [15] Murdoch C, Tazzyman S, Webster S, Lewis CE. Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2. *J Immunol* 2007;178:7405–7411.
- [16] Maffei R, Bulgarelli J, Fiorcari S, Bertocelli L, Martinelli S, Guarnotta C, et al. The monocytic population in chronic lymphocytic leukemia shows altered composition and deregulation of genes involved in phagocytosis and inflammation. *Haematologica* 2013;98:1115–1123.
- [17] Herishanu Y, Kay S, Sarid N, Kohan P, Braunstein R, Rotman R, et al. Absolute monocyte count trichotomizes chronic lymphocytic leukemia into high risk patients with immune dysregulation, disease progression and poor survival. *Leukemia Research* 2013;37:1222–1228.
- [18] Seiffert M, Schulz A, Ohl S, Döhner H, Stilgenbauer S, Lichter P. Soluble CD14 is a novel monocyte-derived survival factor for chronic lymphocytic leukemia cells, which is induced by CLL cells in vitro and present at abnormally high levels in vivo. *Blood* 2010;116:4223–4230.
- [19] Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Döhner H, German CLL Study Group (GCLLSG). Chronic lymphocytic leukemia. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* 2002;16:993–1007.
- [20] Lad DP, Varma S, Varma N, Sachdeva MU, Bose P, Malhotra P. Regulatory T-cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia: their role in disease progression and autoimmune cytopenias. *Leuk Lymphoma* 2013;54:1012–1019.
- [21] Chen H, Treweeke AT, West DC, Till KJ, Cawley JC, Zuzel M, et al. In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2000;96:3181–3187.

- [22] Molica S, Vacca A, Ribatti D, Cuneo A, Cavazzini F, Levato D, et al. Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:3344-3351.
- [23] Menzel T, Rahman Z, Calleja E, White K, Wilson EL, Wieder R, et al. Elevated intracellular level of basic fibroblast growth factor correlates with stage of chronic lymphocytic leukemia and is associated with resistance to fludarabine. *Blood* 1996;87:1056-1063.
- [24] König A, Menzel T, Lynen S, Wrazel L, Rosén A, Al-Katib A, et al. Basic fibroblast growth factor (bFGF) upregulates the expression of bcl-2 in B cell chronic lymphocytic leukemia cell lines resulting in delaying apoptosis. *Leukemia* 1997;11:258-265.