

Makrofagi i ich rola w układzie krwiotwórczym

Macrophages and their function in hematopoietic system

Joanna Kopeć-Szlęzak

Zakład Cytobiologii Hematologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

Streszczenie

Makrofagi są komórkami prezentującymi antygen. Wykazują dwa główne rodzaje polaryzacji: aktywowany klasycznie typ M1 i alternatywnie typ M2, w zależności od rodzaju sygnałów aktywujących, to jest odpowiednio: interferonu (IFN) i/lub substancji bakteryjnych oraz interleukin IL-4 i IL-13. Jednocześnie makrofagi wykazują dużą zmienność charakteru polaryzacji w odpowiedzi na zmiany mikrośrodowiska. W szpiku makrofagi występują w wyspach erytroblastycznych jako główny regulator procesu dojrzewania erytrocytów oraz w niszach hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych, wpływając na ich przemieszczanie. W węzłach chłonnych wyróżnia się makrofagi zatoki podtorebkowej oraz makrofagi zatoki rdzeniowej i rdzenia węzła. Makrofagi podtorebkowe wykazują wysoką zdolność fagocytarną wobec patogenów pochodzących z limfy, a makrofagi części rdzeniowej podtrzymują przeżycie komórek plazmatycznych (tzw. krótko żyjących). W śledzionie makrofagi rozmieszczone w strefie brzeżnej fagocytują patogeny pochodzące z krwi i wytwarzają interferon γ . W miazdze czerwonej makrofagi fagocytują apoptotyczne erytrocyty i przechowują żelazo uwolnione z hemoglobiny w postaci ferrytyny.

Makrofagi są obecne w nowotworach układu krwiotwórczego, podobnie jak w guzach litych. W szpiczaku mnogim uczestniczą w angiogenezie, między innymi tworząc „pseudonaczynia” włosowate, i zwiększają tolerancję na komórki szpiczakowe, współdziałając z komórkami immunosupresyjnymi pochodzenia mieloidalnego. W chłoniaku ziarnicznym wysoką liczebność makrofagów uważa się za niekorzystny czynnik rokowniczy, a w chłoniakach niezziarnicznych z komórek B stwierdzono ich udział w procesie neoangiogenezy. W przewlekłej białaczce limfocytowej jako tak zwane komórki odżywcopodobne przedłużają czas przeżycia limfocytów białaczkowych B, chroniąc je przed apoptozą. Trwają próby in vitro stosowania terapii lenalidomidem, w której niszczone są nie tylko limfocyty białaczkowe B, ale i makrofagi.

Słowa kluczowe: makrofagi, makrofagi w szpiku, makrofagi w układzie chłonnym, makrofagi w nowotworach układu krwiotwórczego i chłonnego

J. Transf. Med. 2014; 7: 84–92

Summary

Macrophages are antigen presenting cells (APC) and show two polarization states: the classically activated type 1 macrophages (M1) and the alternative activated type 2 (M2), in response to various signals (interferon γ /bacterial products or IL-4/IL-13 respectively). Simultaneously macrophages display great polarization plasticity. In bone marrow macrophages are present in erythroblastic islands as main erythrocyte differentiation regulator and promote the retention of

hematopoietic stem and progenitor cells in osteoblastic and vascular niche. Lymph nodes macrophages have been divided into subscapsular sinus macrophages (MSMs) as well as medullary sinus and medullary cord macrophages (MCMs). MSMs are highly phagocytic and mediated clearance of pathogens and dying cells from the lymph; MCMs support plasma cell survival. In the spleen macrophages are located in marginal zone, where phagocyte blood-borne pathogens: bacteria and viruses and can make production of interferon- γ . In red pulp ageing red blood cells are phagocytosed by macrophages and hemoglobin's iron is stored in macrophages as ferritin.

Macrophages are present in most human tumors and hematological malignancies. Macrophages within multiple myeloma bone marrow environment participate in tumor angiogenesis and growth of plasma cells. These macrophages show "vasculogenic mimicry" and enhance anti-tumor immune toleration via cross-talk with myeloid-derived suppressor cells (MDSCs). In Hodgkin's lymphoma macrophages may predict treatment outcome. In B non-Hodgkin's lymphoma, as lymphoma associated macrophages (LAM), promote lymphoma angiogenesis and enhance lymphoma progression. In B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) as nurse-like cells (NLCs) interact with B-leukemia cells and enhance their survival. However, lenalidomide treatment in vitro decreases viability of these cells.

Key words: macrophages, macrophages in bone marrow, macrophages in lymphatic system, macrophages in hematological malignancies

J. Transf. Med. 2014; 7: 84–92

Wstęp

Makrofagi stanowią populację komórek w układzie odpornościowym, która pochodzi od prekursorów monocytów krwi i przechodzi specyficzne zróżnicowanie w zależności od cech mikrośrodowiska, w którym się znajdują. Są to komórki, które funkcjonują zarówno w procesach odporności wrodzonej, jak i nabytej (adaptacyjnej) i wykazują działanie tak ochronne, jak i patogenne w organizmie. Jako komórki prezentujące antygen wykazują ekspresję molekuł HLA klasy II oraz molekuł stymulujących i/lub hamujących aktywność limfocytów T, a w mniejszym stopniu komórek dendrytycznych [1].

Makrofagi utrzymują stan homeostazy w tkankach głównie dzięki swoim własnościom fagocytarnym oraz charakterystycznej ekspresji wielu receptorów na błonie komórkowej, to jest molekuł rozpoznających na przykład lipopolisacharydy bakterii (LPS, *lipopolysaccharide*) i komórki o cechach apoptozy, na przykład obumierające erytrocyty w krążącej krwi. Czas przeżycia makrofagów jest zróżnicowany i wynosi od kilku godzin do kilku lat, zależnie od przebiegu odpowiedzi immunologicznej, w której uczestniczą [2].

Ogólna charakterystyka makrofagów

Wśród makrofagów wyróżnia się zwykle dwa rodzaje subpopulacji: M1 — pośredniczące w od-

powiedzi immunologicznej i reakcjach przeciwnowotworowych, oraz M2 — o właściwościach supresyjnych, takimi jak obniżenie odporności antynowotworowej przy poprawie gojenia ran. Powstawanie dwóch typów makrofagów określane jest terminem „polaryzacja”. Podział na subpopulacje M1 i M2 stanowi pewne uproszczenie, ponieważ makrofagi wykazują dużą plastyczność fenotypową i funkcjonalną, a pod wpływem zmian czynników mikrośrodowiska mogą tworzyć formy zbliżone do typów M1 lub M2, a także zmieniać postać immunofenotypu charakterystycznego dla M1 na immunofenotyp przypisywany typowi M2 i odwrotnie. Jednakże dla ułatwienia analizy komórek o własnościach makrofagów w piśmiennictwie wyróżnia się podział na dwa podtypy makrofagów [2, 3].

Typ makrofagów M1 powstaje w odpowiedzi na działanie substancji pochodzenia bakteryjnego wskutek aktywności receptorów *Toll*-podobnych (TLR, *Toll-like receptors*) na makrofagach lub działania interferonu γ (IFN- γ), a przede wszystkim pod wpływem czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). W polaryzacji makrofagów w kierunku M1 może uczestniczyć także czynnik wzrostu i różnicowania zwany aktywiną, należącą do nadrodziny wielofunkcyjnych czynników wzrostu (TGF, *transforming growth factor*), która też hamuje polaryzację typu M2 [4].

Tabela 1. Charakterystyka makrofagów typu M1 i M2 (wg [2, 3, 5, 12])**Table 1.** Macrophages type 1 (M1) and M2 type (accord. [2, 3, 5, 12])

Typ polaryzacji makrofaga	Immunofenotyp	Wydzielane cytokiny
M1 (czynniki stymulujące: IFN- γ /LPS bakterii oraz GM-CSF)	MHC-II, CD11b, CD14, CD68, CD80, CD86, CD204, TLR-4 (CD284), IL-1R, CXCR7, receptor IFN	IL-12, IL-1, IL-6, IL-23, IFN- α , IFN- β
M2 (czynniki stymulujące: IL-4 i/lub IL-13 oraz M-CSF)	MHC-II, CD14, CD23, CD68, CD169, CD206, CD163	IL-10, chemokiny: CCL17, CCL18, CCL22, CCL24, CXCL1

IFN — interferon; LPS (*lipopolysaccharides*) — lipopolisacharydy; IL — interleukina; GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) — czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów; M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) — czynnik stymulujący wzrost kolonii makrofagów

Zasadnicze funkcje makrofagów M1 to fagocytoza i destrukcja bakterii, eliminacja komórek nowotworowych oraz wytwarzanie cytokin prozapalnych — jako główne czynności w ramach odporności wrodzonej. Typ M1 charakteryzuje promowanie odpowiedzi przeciwnowotworowej poprzez aktywację komórek o własnościach cytotoksycznych [3]. W reakcjach odpowiedzi nabytej ważna jest prezentacja antygeny przez makrofagi limfocytom T oraz wydzielanie IL-12, stymulującej powstawanie limfocytów T [5]. Proces różnicowania monocytów w makrofagi zależy również od typu monocytu: tak zwane klasyczne monocyty CD14⁺ CD16⁻ po przejściu przez śródbłonek naczyń do tkanek w odpowiedzi na chemokinę CCL2 różnicują się w typ M1, wykazujący ekspresję HLA-DR⁺ oraz CD68, a zachodzi to w środowisku bogatym w czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF α , *tumor necrosis factor alpha*) oraz interleukinę IL-1 β [1].

Immunofenotyp makrofagów M1 charakteryzuje zwykle ekspresja CD68, CD11b, CD204, CD80, CD86, HLA-DR (tab. 1); makrofagi te mogą usuwać komórki krwi o cechach apoptozy; przykładem może być fagocytoza neutrofilii usuwanych z ogniska zapalnego, co ogranicza proces zapalny [6].

Typ M2 różnicuje się w odpowiedzi na czynnik stymulujący wzrost kolonii makrofagów (M-CSF, *macrophage colony-stimulating factor*), a powstawanie poszczególnych podtypów kształtują różnorodne czynniki. Powstanie podtypu M2a, czyli „głównego”, alternatywnego dla podtypu M1, charakteryzującego się ekspresją molekuly MHC-II i wydzielaniem interleukiny IL-10, stymulują interleukiny IL-4, IL-13. Powstanie podtypu M2b stymulują ligandy dla receptorów TLR na makrofagach, receptora IL-1 (IL-1R) oraz kompleksów immunologicznych; makrofagi te wydzielają IL-6, TNF α , IL-1 i IL-10. Różnicowanie w kierunku

podtypu M2c stymuluje głównie IL-10, a czynności makrofagów to wydzielanie również IL-10 (auto-sprężenie) i TGF β [5]. Niejednorodność immunofenotypu makrofagów jest częsta, czego przykładem może być obserwacja, że makrofagi M2 pochodzące z monocytów krążących wykazują ekspresję molekuly CD206 i mają zdolność ukierunkowania naiwnych limfocytów T CD4 w limfocyty T regulacyjne (Treg), natomiast makrofagi M2 pochodzące z komórek osiadłych w tkance są CD206-ujemne [7]. W badaniach *in vitro* wykazano, że różnicujące się makrofagi w kierunku M2 przybierają wydłużony kształt z jednoczesnym pojawieniem się immunofenotypu makrofagów M2 oraz redukcją wydzielania cytokin prozapalnych, charakterystycznych dla makrofagów M1 [8].

Najważniejszą funkcją makrofagów M2 jest ich udział w rozwoju nowotworów, to jest w ich progresji, co dotyczy zarówno guzów litych, jak i nowotworów układu krwiotwórczego. Makrofagi są obecne podczas wszystkich stadiów progresji nowotworu i odgrywają pierwszoplanową rolę w nowotworach pierwotnych, stymulując angiogenezę między innymi poprzez wydzielanie w tkance nowotworowej czynnika wzrostu naczyń (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) i inwazję komórek nowotworowych; promują wyjście do naczyń krwionośnych komórek nowotworowych, czyli ułatwiają powstawanie przerzutów [9]. Makrofagi typu M2 równocześnie wywołują immunosupresję, czyli inaktywację reakcji obronnej komórek układu odpornościowego [10]. Trwają próby leczenia nowotworów traktujące makrofagi jako cel terapeutyczny. W nowotworach skóry i w przerzutach płucnych u doświadczalnych myszy stwierdzono, że związki trójterpenoidowe (np. kwas oleanolowy) poprzez supresję czynnika transkrypcyjnego STAT3 (*signal transducers and activators of transcription*) hamują polaryzację makrofagów

w kierunku M2 (czyli tzw. pronowotworowych). Związki te uwrażliwiają także komórki nowotworowe na działanie leków przeciwnowotworowych: adriamycynę i cisplatinę [11].

Makrofagi M2 uczestniczą w procesach gojenia ran, stymulując powstawanie limfocytów pomocniczych Th2 [12, 13]. Szczególne „pozytywne” znaczenie makrofagów M2 obserwowano w mięśniu sercowym po zawale. Napływające tam najpierw liczne makrofagi M1 tworzą ognisko zapalne, ale po tym wczesnym okresie pojawia się duża liczba makrofagów M2, które wykazują zdolność gojenia powstałego uszkodzenia i ograniczają miejscowy stan zapalny [14].

W proces polaryzacji makrofagów zaangażowane są czynniki transkrypcyjne i to one decydują bezpośrednio o kierunku polaryzacji komórki makrofaga. Do głównych czynników polaryzacji w kierunku M1 zalicza się STAT-1, indukowany przez interferon IFN- γ oraz heterodimer STAT1/STAT2, indukowany przez LPS bakterii. Ponadto w procesie polaryzacji do typu M1 istotną rolę odgrywa czynnik jądrowy κ B (NF- κ B, *nuclear factor* κ B), natomiast w polaryzacji w kierunku M2 uczestniczą przede wszystkim czynniki transkrypcyjne STAT-3 i STAT-6, indukowane przez IL-4. Elementami współuczestniczącymi w procesie polaryzacji są cząsteczki kwasu rybonukleinowego, tak zwane mikroRNA — na przykład miR 124 uczestniczy w polaryzacji M2, a miR 155 (indukowany przez LPS) w polaryzacji w kierunku makrofagów typu M1 [15]. Zróżnicowanie makrofagów na typy M1 i M2 znajduje odzwierciedlenie we właściwościach migracyjnych tych komórek. Migracja makrofagów jest istotnym elementem ich funkcji, w tym warunkiem udziału w reakcjach zapalnych i w rozwoju nowotworów. Typ M2 wykazuje większe zdolności migracyjne niż typ M1, choć ekspresja molekuł adhezyjnych i receptorów chemokin nie różni się od M1 i makrofagów nieaktywnych, czyli M0. Różnice występują natomiast w rozmieszczeniu włókien białka kurczliwego aktyny: w makrofagach typu M2 aktyna jest rozmieszczona równomiernie w cytoplazmie całej komórki, a w makrofagach M1 — tylko w zewnętrznej warstwie cytoplazmy [16].

Od 50 lat opisywany opisuje się tak zwany makrofagowy czynnik hamujący migrację (MIF, *migratory inhibitory factor*), który jest prozapalną cytokiną, a jej wydzielanie stwierdzono najpierw w limfocytach T. Obecnie wiadomo, że MIF jest wytwarzany także przez makrofagi w odpowiedzi na stymulację endotoksynami i promieniami ultrafioletowymi. Czynniki ten pełni ponadto wiele

funkcji biologicznych; może indukować rozwój stanu zapalnego, wpływa na rozwój reakcji odpornościowych i ma właściwości pronowotworowe dzięki stymulacji angiogenezy i stymulowania proliferacji komórek nowotworowych [17].

Makrofagi w układzie krwiotwórczym

Makrofagi w szpiku kostnym

W szpiku kostnym makrofagi występują jako komórka centralna wysp erytroblastycznych, decydująca o rozwoju komórek linii erytroidalnej — od komórki progenitorowej przez erytroblasty i retikulocyt do dojrzałego erytrocytu [18]. W stanie homeostazy erythropoetycznej około 10^{10} erytrocytów jest wytwarzanych w ciągu godziny w wyspach erytroblastycznych u człowieka przy udziale makrofaga CD169+. Jest on zwykle otoczony przez od 5 do 30 komórek erytroidalnych i znajduje się w centrum wyspy erytroblastycznej. Uważa się go za główny regulator procesu dojrzewania erytrocytów [19]. Szczególnym procesem jest enukleacja, w której tak zwany pyrenocyt, czyli jądro komórkowe erytroblastu z zagęszczoną chromatyną otoczone błoną z powierzchniowo rozmieszczoną fosfatydyloseryną, jest fagocytowane przez makrofag [20]. W stanach patologicznych, na przykład w czerwienicy prawdziwej (PV, *polycythemia vera*) bądź w β -talasemii wpływ makrofagów na dojrzewanie erytroblastów jest szczególnie widoczny. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że w β -talasemii charakterystyczne cechy erytropoezy, to jest zwiększona proliferacja komórek erytroidalnych i upośledzony proces ich dojrzewania, ustępują po usunięciu makrofagów z wysp erytroblastycznych. W PV usunięcie makrofagów zmniejsza retikulocytozę [21].

Makrofagi występujące w szpiku uczestniczą we wczesnych etapach hematopoezy komórek macierzystych i progenitorowych, występują w obu rodzajach nisz ich dojrzewania: osteoblastycznej i naczyniowej. Pełnią tam funkcję między innymi regulatorów uwalniania krwiotwórczych komórek macierzystych CD34+ do obiegu krwi, co ma również wpływ na przebieg procesu mobilizacji tych komórek w procedurach transfuzjologicznych [22]. Populacja makrofagów w szpiku wykazuje ekspresję molekuły CD169 i odpowiada głównie za przemieszczanie się komórek macierzystych w nisze szpikowych [23]. W badaniach z udziałem mysz doświadczalnych stwierdzono, że makrofagi szpiku wykazują także własności samoodnawiania (proliferaacji) w przypadku rozwoju procesów zapalnych [24].

Makrofagi w węzłach chłonnych

W węzłach chłonnych zwykle wyróżnia się trzy subpopulacje makrofagów w zależności od ich lokalizacji: makrofagi zatoki podtorebkowej, zatoki rdzeniowej i rdzenia. Makrofagi podtorebkowe wykazują ekspresję sialoadhezyny CD169, molekuly CD11b/CD18 oraz molekul adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1, które ułatwiają kontakty z limfocytami B w procesie rozpoznawania i niszczenia obcych antygenów, a także molekuly CD209 (DC-SIGN, *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule*) [25]. Sialoadhezyna CD169 odgrywa szczególną rolę jako receptor charakterystyczny dla makrofagów zatoki podtorebkowej węzłów chłonnych oraz makrofagów rdzenia węzłów. Ma ona właściwości wiązania ligandów — pochodnych kwasu sialowego, co jest istotne w procesie zatrzymania (nawet do 72 godzin) antygenów na powierzchni makrofagu i dalszego przedstawienia ich limfocytom T i B [26, 27]. Niektórzy badacze uważają CD169 za kluczową molekulę dla rozpoczęcia procesu odpowiedzi immunologicznej, między innymi wskutek zdolności „pochłaniania” egzosomów (pęcherzyków ograniczonych błoną) zawierających antygeny [28]. Makrofagi te są skierowane na antygeny przynieszone przez naczynia limfatyczne, dochodzące do węzła chłonnego. Rolą makrofagów w zatoce podtorebkowej jest szybkie wychwytywanie antygenów, w czym uczestniczy molekuła CD169 [29]. Występuje ona także na makrofagach zatoki podtorebkowej i rdzeniowej w węzłach chłonnych. Cechuje się zdolnością rozpoznawania wielu patogennych antygenów, choć własności te opisuje się głównie w badaniach *in vitro* [30]. W rejonach węzła chłonnego pomiędzy grudkami makrofagi występują sporadycznie [25].

Makrofagi części rdzeniowej węzłów chłonnych pełnią trzy zasadnicze funkcje:

- fagocytozę patogenów i cząstek antygenowych z limfy;
- wspomaganie komórek plazmatycznych tak zwanych krótko żyjących, licznych w tej części węzła;
- kierowanie komórek opuszczających węzeł do limfatycznych naczyń wyprowadzających — węzły limfatyczne pełnią bowiem rolę „filtra limfy”.

Makrofagi części rdzeniowej cechuje wysoka zdolność fagocytarna, fagocytowany materiał może wypełniać tak zwane fagolizosomy w makrofagach. Ponadto istotną funkcją makrofagów tego rejonu węzła jest podtrzymywanie aktywności krótko żyjących komórek plazmatycznych w pierwszym okresie odpowiedzi immunologicznej, a także apop-

toza tych plazmatycznych komórek w późniejszym okresie reakcji odpornościowej [25].

Główne cytokiny mające znaczenie w funkcjonowaniu makrofagów węzłów chłonnych to czynnik wzrostowy CSF-1 uczestniczący w różnicowaniu makrofagów CD169+ zatoki podtorebkowej oraz limfotoksyna $LT-\alpha 1\beta 2$. Limfotoksyny, należące do nadrodziny TNF, wydzielane przez limfocyty B w węzłach chłonnych „podtrzymują” aktywność makrofagów zatoki podtorebkowej. Stwierdzono, że makrofagi te mogą pochłaniać wiriony pochodzące z niektórych wirusów i wydzielają interferon zapobiegający rozprzestrzenianiu się zakażenia wirusowego [31].

Makrofagi w śledzionie

Makrofagi występują w strefie brzeżnej śledziony oraz w miazdze czerwonej i pełnią różnorodne funkcje w zależności od lokalizacji. Wyróżnia się także populację makrofagów w miazdze białej pełniącą funkcje zbliżone jak w węzłach chłonnych. W strefie brzeżnej śledziony rozdzielającej miazgę białą i czerwoną występują dwa rodzaje makrofagów — metalofilne i strefy brzeżnej, uczestniczące w degradacji patogenów z licznych bakterii i wirusów (np. adenowirusów). Makrofagi te wykazują ekspresję receptora typu lektyny SIGN-R1, który pośredniczy w rozpoznaniu węglowodanów bakteryjnych (np. pneumokoków) i jest istotnym elementem eliminacji *Streptococcus pneumoniae*. Molekuła CD169 na powierzchni makrofagów może działać jako receptor dla niektórych wirusów [32]. Makrofagi strefy brzeżnej wydzielają interferon typu I [32], oraz IL-1 o właściwościach prozapalnych. W przypadku posocznicy wszystkie makrofagi śledziony wytwarzają czynnik $TNF\alpha$. Ważną rolę makrofagów metalofilnych strefy brzeżnej jest ich udział w podtrzymaniu tolerancji na komórki apoptotyczne z udziałem chemokiny CCL22, co zapobiega nadmiernemu rozbudowaniu reakcji zapalnej [33]. W śledzionie u człowieka zamiast makrofagów metalofilnych występują makrofagi okołotętniczkowe (PAM, *periarteriolar-associated macrophages*) [26].

W miazdze czerwonej makrofagi pełnią rolę oczyszczania krwi z resztkowych erytrocytów w procesie zwanym erytrofagocytozą i są zaangażowane w recykling żelaza. Źródłem żelaza jest hemoglobina pochodząca z degradowanych erytrocytów, przyswajana przez makrofagi drogą endocytozy poprzez molekulę powierzchniową CD163. Żelazo może być w makrofagach magazynowane w postaci ferrytyny lub też uwalniane. Ferrytyna może tworzyć w makrofagach agregaty w postaci homosyderyny, natomiast uwalniane z ferrytyny

żelazo wiązane jest z transferyną osocza. Przedmiotem wielu badań jest problem, w jaki sposób makrofagi miazgi czerwonej odróżniają erytrocyty na ostatnim etapie ich aktywności od erytrocytów w pełni funkcjonalnych. Według najnowszych danych decyduje o tym konfiguracja powierzchniowej molekuly erytrocytów CD47, która może przyjmować formę „proapoptyczną” [34].

W stanach określanych jako stres z niedoborem tlenu lub w nowotworach układu krwiotwórczego erytropoeza pozaszpikowa może zachodzić w śledzionie w przestrzeniach międzyzatkowych, gdzie powstają wyspy erytroblastyczne z centralnym makrofagiem [35].

Makrofagi w nowotworach układu krwiotwórczego

Komórki nowotworowe i komórki mikrośrodowiska nowotworów wytwarzają liczne czynniki wzrostu i chemokiny, które indukują monocyty do różnicowania w makrofagi, zwłaszcza typu M2. Obecne w nowotworach makrofagi wydzielają liczne cytokiny i proteazy, które z kolei stymulują powstawanie naczyń (angiogenezę), a także immunosupresję. Proces immunosupresji zachodzi głównie poprzez stłumienie limfocytów T cytotoksycznych i jednoczesne indukowanie limfocytów regulacyjnych T (Treg). Makrofagi ułatwiają też powstawanie przerzutów między innymi wskutek wydzielania metaloproteinaz powodujących rozkład substancji międzykomórkowych, co sprzyja migracji komórek nowotworowych [12].

Chłoniak ziarniczny

Dane z piśmiennictwa dotyczące roli i znaczenia rokowniczego występowania makrofagów w chłoniaku ziarnicznym wprawdzie nie są zgodne, ale we wszystkich badaniach zaobserwowano obecność licznych makrofagów i w większości z nich wykazano związek pomiędzy liczbą makrofagów w węźle chłonnym a progresją choroby. W badaniach Blum [36], w których makrofagi oznaczano jako komórki CD68+ (w badaniach immunohistologicznych), zauważono, że istnieje zależność długości przeżycia chorego bez progresji a stopniem zajęcia węzła przez makrofagi. Przy stopniu zajęcia powyżej 25% czas ten wynosił 2,7 roku, a u chorych z 5-procentowym zajęciem węzła — około 6 lat. Autorzy sądzą, że jedną z przyczyn tej zależności jest wydzielanie przez makrofagi metaloproteinazy MMP-11, która, dokonując lizy podłoża, ułatwia rozprzestrzenianie się komórek Reed-Sternberga w węźle.

Podobne obserwacje przedstawili Steidl i wsp. [37], którzy wskazują na określanie liczebności makrofagów jako istotny element w rokowaniu przebiegu choroby. Natomiast badania Sanchez i wsp. [38] nie potwierdziły korelacji pomiędzy czasem przeżycia a liczebnością makrofagów w węźle chłonnym. Jednocześnie jednak w badaniach japońskich [39] wykazano, że wzrost liczby makrofagów CD68+ koreluje z krótszym czasem przeżycia bez progresji i skróconym całkowitym czasem przeżycia. Związek liczebności makrofagów z czasem przeżycia w chłoniaku ziarnicznym potwierdzono w ostatnio opublikowanych wynikach badań, w których wykazano związek między wysokim odsetkiem (> 30%) komórek w węźle z ekspresją receptora dla czynnika stymulującego tworzenie kolonii (CSF-1, *colony stimulating factor 1*), który jest czynnikiem wzrostu makrofagów, a zawartością makrofagów CD68+ w mikrośrodowisku węzła i krótszym czasem przeżycia chorych [40].

Szpiczak mnogi

W szpiczaku mnogim (MM, *multiple myeloma*) makrofagi są obecne w mikrośrodowisku szpiku, a w przypadku progresji choroby stwierdzono wzrost liczebności populacji makrofagów [41]. Główny wpływ makrofagów na progresję MM to: udział w angiogenezie i działanie antyapoptyczne poprzez hamowanie kaspazy-3 w komórkach szpiczaka. Udział makrofagów w powstawaniu nowych naczyń krwionośnych w MM jest specyficzny; poza wydzielaniem VEGF makrofagi aktywnie uczestniczą w tworzeniu nowych naczyń włosowatych. Następuje to poprzez wydłużenie ich kształtu aż do formy wrzecionowatej, zbliżonej do kształtu komórek śródbłonna i utworzeniu sieci tych komórek, podobnej do sieci naczyń włosowatych. Proces ten określono jako mimikra neoangiogenezy, która zachodzi w okresie progresji MM. W postaciach „nieaktywnych” MM i w makroglobulinemii Waldenstroma procesu tego nie obserwowano [41]. Makrofagi w MM mogą także tworzyć tak zwane mozaikowe nowe naczynia włosowate, kiedy to wydłużone makrofagi dołączają do komórek śródbłonna w nowo powstających naczyniach włosowatych [42].

Inną pronowotworową aktywnością makrofagów w MM jest ich współpraca z komórkami o własnościach supresyjnych, pochodzącymi z linii mieloidalnej (MDSC, *myeloid derived suppressor cells*), co wzmacnia efekt działania pronowotworowego makrofagów typu M2. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że po 16 godzinach hodowli wzrasta liczba makrofagów typu M2 wskutek indukcji IL-10,

wydzielanej przez komórki MDSC; z kolei powstałe makrofagi pobudzają komórki MDSC do dalszego wydzielania IL-10; powstaje zatem pozytywne sprzężenie zwrotne w działaniu komórek mikrośrodowiska MM [43]. Zatem pronowotworowe działanie makrofagów w MM zachodzi poprzez dwojakiego rodzaju mechanizm: proangionenny oraz immunologiczny (współpraca z komórkami supresyjnymi). Stwierdzono jednak, że bortezomib i kwas zoledronowy dają synergistyczny efekt hamujący aktywność makrofagów, hamują ich proliferację i udział w angiogenezie; zatem terapia ta dezaktywuje makrofagi w MM [41].

Ostatnio wykazano występowanie wzajemnego indukowania proliferacji i różnicowania makrofagów i komórek MM. Rodzina genów *tribble* (*Trib*) koduje białka typu pseudokinaz, które aktywnie uczestniczą w proliferacji i różnicowaniu makrofagów, a *Trib-1* jest czynnikiem krytycznym dla indukowania powstawania makrofagów typu M2. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że komórki MM indukują monocyty do wzrostu ekspresji genu *Trib-1*, który decyduje o różnicowaniu makrofaga typu M2. Z kolei makrofagi M2 wytwarzają pozytywne sprzężenie zwrotne z udziałem genu *Trib-1*, powodujące proliferację komórek MM. Niektórzy autorzy sugerują, że gen *Trib-1* może być potencjalnym celem terapeutycznym MM [44].

Chłoniaki nieziarnicze z komórek B

W chłoniakach typu NHL (*non-Hodgkin's lymphoma*) występują makrofagi związane z ich rozwojem (LAM, *lymphoma associated macrophages*) [45]. W chłoniakach złośliwych stwierdza się podwyższoną liczbę makrofagów typu M2, która wiąże się ściśle ze złym stanem klinicznym i rokowaniem chorego [46]. Bai i wsp. [46] wykazali w badaniach *in vitro*, że makrofagi typu M2 kontaktują się bezpośrednio z chłoniakowymi komórkami B i wzmagają ich proliferację. Proces ten opiera się na wydzielaniu komplementu C5a z makrofagów, który pełni funkcję aktywatora STAT-3 jako elementu wewnątrzkomórkowego szlaku sygnalizacyjnego w komórkach B, promując ich podziały. Inny mechanizm działania makrofagów występuje w rozwoju chłoniaka grudkowego (FL, *follicular lymphoma*); w tym przypadku uważa się, że wydzielana z makrofagów CD68+ metaloproteinaza MMP-9 indukuje powstawanie rozpuszczalnej formy receptora interleukiny 2 (IL-2R) przez „odcięcie” fragmentu łańcucha receptora z komórek T i chłoniakowych B. Mechanizm ten tłumaczy podniesienie zawartości s-IL-2R w surowicy chorych z chłoniakiem grudkowym, co uznaje się za niekorzystny czynnik

rozkowiczny [47]. Podkreśla się także istotną rolę makrofagów w angiogenezie w chłoniakach nieziarniczych typu B poprzez wydzielanie czynników proangiogennych [48].

W przewlekłej białaczce limfocytowej (CLL, *chronic lymphocytic leukemia*) występują tak zwane komórki odżywczo podobne CD68+ (NLC, *nurse-like cells*) rozmieszczone w centrach rozrodczych węzłów chłonnych oraz w śledzionie. Stymulują one przeżycie limfocytów białaczkowych B, podobnie jak czynią to makrofagi w chłoniakach [45]. Komórki te wykazują ekspresję molekuly adhezyjnej CD31, która jest ligandem dla molekuly CD38 na limfocytach białaczkowych B i promuje przeżywalność tych komórek, tak jak wydzielana chemokina CXCL12 — inaczej SDF-1 (*stromal derived factor*). Komórki odżywczo podobne wykazują ekspresję czynnika aktywującego limfocyty B (BAFF, *B cell activating factor*) z rodziny TNF i czynnika indukującego proliferację (APRIL, *a proliferation-inducing ligand*), które mogą wydłużać czas przeżycia limfocytów białaczkowych B przez stymulację chemokina CXCL12, a także wykazują ekspresję receptora c-Met dla wieloczynnościowej cytokiny — wątrobowego czynnika wzrostu HGF (*hepatic growth factor*). Czynniki te stymulują aktywność komórek odżywczo podobnych, co skutkuje zwiększonym „ochronnym” działaniem na limfocyty białaczkowe BCD5+. Komórki NLC wykazują cechy immunosupresyjne makrofagów typu M2 o działaniu pronowotworowym [49]. Komórki te „przyciągają” limfocyty białaczkowe B, wydzielając chemokiny CXCL12 i CXCL13. Z kolei limfocyty białaczkowe B wydzielają chemokiny CCL3 i CCL4, „rekrutujące” komórki odżywczo podobne z ekspresją receptora CCR1/CCR3 do nisz z komórkami BCD5+ [50]. Jest to przykład funkcjonalnego sprzężenia zwrotnego pomiędzy komórką białaczkową B a komórką odżywczo podobną jako elementem mikrośrodowiska nowotworu układu krwiotwórczego. Stosowany w leczeniu CLL typu B lek immunomodulujący (lenalidomid) obniża *in vitro* poziom aktywności komórek odżywczo podobnych, co zmniejsza czas przeżycia limfocytów B CD5+ [51].

Jedną z przyczyn bardzo progresywnego przebiegu chłoniaków nieziarniczych B u chorych na zespół nabytego niedoboru odporności (AIDS, *acquired immunodeficiency syndrome*) może być aktywność makrofagów, charakterystyczna dla infekcji ludzkim wirusem nabytego niedoboru odporności (HIV, *human immunodeficiency virus*). Makrofagi są rezerwuarem wirusa HIV, nie ulegają łatwo apoptozie jak limfocyty T CD4+, długo żyją, a nawet zachodzi w nich replikacja wirusa HIV [52].

Z danych dotyczących roli makrofagów w ostrych białaczkach można przytoczyć przykład myszy chorej na ostrą białaczkę szpikową (AML, *acute myelogenous leukemia*), u której doszło do spontanicznego powstawania komórek fuzyjnych z komórek białaczkowych i makrofagów, podobnie jak to obserwowano w powstawaniu przerzutów w guzach litych. Autorzy sądzą, że jest to mechanizm rozsiewu nowotworu wraz z przenoszeniem genów, w komórkach tych znajdowano bowiem onkogeniczne białko fuzyjne oznaczone jako AML-ETO [53].

Makrofagi w chorobach autoimmunologicznych

Choroby autoimmunologiczne mogą powstawać wskutek defektu eliminacji autoimmunologicznych limfocytów B i T, a defekt ten może wynikać z zaburzeń procesu apoptozy dotyczących rozpoznawania komórek apoptotycznych i samego procesu ich fagocytozy, tak jak to ma miejsce w toczeniu rumieniowym rozsianym (SLE, *systemic lupus erythematosus*). W schorzeniu tym stwierdzono zmiany fenotypu i funkcji makrofagów nie tylko u zwierząt doświadczalnych [54], ale i u ludzi. Zaobserwowano, że u chorych na SLE makrofagi wykazują obniżoną zdolność fagocytarną wobec apoptotycznych neutrofilów (w porównaniu z ludźmi zdrowymi). Jednocześnie stwierdzono, że w makrofagach chorych na SLE 39 na 95 genów związanych z procesem fagocytozy wykazywało ekspresją niższą niż w grupie kontrolnej [55].

Podsumowanie

Wprawdzie od pierwszego opisu makrofagów przez Miecznikowa w 1905 roku minęło już ponad 100 lat, komórki te nadal są przedmiotem licznych badań. Analiza ich roli w dojrzewaniu komórek hematopoetycznych, a także w rozwoju nowotworów układu krwiotwórczego ma istotne znaczenie dla hematologów, podobnie jak poszukiwanie terapii, której celem mogą być makrofagi sprzyjające rozwojowi nowotworów.

Piśmiennictwo

1. Yang J., Zhang L., Yu C., Yang X., Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory disease. *Biomarker Res.* 2014; 2: 1–12.
2. Liu Y., Zou X., Chai Y., Yao Y. Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 2014; 10: 520–530.
3. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. *J. Clin. Invest.* 2012; 122: 787–795.
4. Filardi E.S., Puig-Kroger A., Blanco F.J. i wsp. Activin A skew macrophages polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood* 2011; 117: 5092–5191.
5. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports* 2014; 6: 1–13.
6. De Lorenzo B.H., Godoy L.C., Novaes e Brito R.R. i wsp. Macrophage suppression following phagocytosis of apoptotic neutrophils mediated by the S100A9 calcium-binding protein. *Immunobiology* 2010; 215: 341–347.
7. Gundra U.M., Girgis N.M., Ruckerl D. i wsp. Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically distinct. *Blood* 2014; 123 :110–122.
8. McWhorter F.Y., Wang T., Nguyen P., Chung T., Liu W.F. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013; 110: 17253–17258.
9. He H., Xu J., Warren C.M. i wsp. Endothelial cells provide an instructive niche for the differentiation and functional polarization of M2-like macrophages. *Blood* 2012; 120: 3152–3162.
10. Noy R., Pollard J.W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 2014; 41: 49–61.
11. Fujiwara Y., Takeya M., Komohara Y. A novel strategy for inducing the antitumor effect of triterpenoid compounds: blocking the protumoral functions of TAM macrophages via STAT3 inhibition. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 348539.
12. Heusinkveld M., van der Burg S.H. Identification and manipulation of TAM macrophages in human cancers. *J. Transl. Med.* 2011; 9: 216–222.
13. Sierra-Filardi E., Nieto C., Dominguez-Soto A. CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. *J. Immunol.* 2014; 192: 3858–3867.
14. Fernandez-Velasco M., Gonzalez-Ramos S., Bosca L. Involvement of monocytes/macrophages as key factor in the development and progression of cardiovascular diseases. *Biochem. J.* 2014; 458: 187–193.
15. Tugal D., Laiao X., Jain M.K. Transcriptional control of macrophage polarization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2013; 33: 1135–1144.
16. Vogel D., Heijnen D., Breur M. i wsp. Macrophages migrate in an activation-dependent manner to chemokines involved in neuroinflammation. *J. Neuroinflamm.* 2014; 11: 23–31.
17. Nishira J. Molecular function of macrophage migration inhibitory factor and a novel therapy for inflammatory bowel disease. *Ann. NY Acad. Sci.* 2012; 1271: 53–57.
18. De Back D.J., Kostova E.B., van Kraaij M., van der Berg T.K., van Bruggen R. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Front. Physiol.* 2014; 5: 9.
19. Chow A., Huggins M., Ahmed J. i wsp. CD169+ macrophages a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress. *Nat. Med.* 2013, 19: 429–436.
20. Toda S., Segawa K., Nagata S., Mer T.K. Mediated engulfment of pyrenocytes by central macrophages in erythroblastic islands. *Blood* 2014; 124: 666–668.
21. Ramos P., Casu C., Gardenhi S. i wsp. Macrophages support pathological erythropoiesis in polycythemia vera and β -thalassemia. *Nat. Med.* 2013; 19:437–345.
22. Winkler L.G., Sims N.A., Pettit A.R. Bone marrow macrophage maintain hematopoietic stem cells (HSC) niche and their depletion mobilizes HSC. *Blood* 2010; 116: 4815–4828.
23. Chow A., Lucas D., Hidalgo A. i wsp. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and

- progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J. Exp. Med.* 2011; 208: 261–271.
24. Davies L.C., Jenkins S.J., Allen J.E., Taylor P.R. Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* 2013; 14: 986–995.
 25. Gray E.E., Cyster J.G. Lymph node macrophages. *J. Innate Immun.* 2012; 4: 424–436.
 26. O'Neill A.S., van der Berg T.K., Mullen G.E. Sialoadhesin — a macrophage-restricted marker of immunoregulation and inflammation. *Immunology* 2013; 138: 198–207.
 27. Wei X., Banachereau J. The antigen presenting cells instruct plasma cell differentiation. *Front. Immunol.* 2013; 4: 504–510.
 28. Saunderson S.C., Dunn A.C., Crocker P.R., McLellan A.D. CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node. *Blood* 2014; 123: 208–216.
 29. Gray E.E., Friend S., Suzuki K., Phan T.G., Cyster J.G. Subcapsular sinus macrophage fragmentation and CD169+ bleb acquisition. *PLoS One* 2012; 7: e38258.
 30. Garcia Z., Lemaitre F., van Rooijen N. i wsp. Subcapsular sinus macrophages promote NK cell accumulation and activation in response to lymph-borne viral particles. *Blood* 2012; 120: 4744–4759.
 31. Upadhyay V., Fu Y.X. Lymphotoxin signaling in immune homeostasis and the control of microorganisms. *Nat. Rev. Immunol* 2013; 13: 270–279.
 32. Den Haan J.M., Kraal G. Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen. *J. Innate Immun.* 2012; 4: 437–455.
 33. Ravishankar B., Shinde R., Liu H. i wsp. Marginal zone CD169+ macrophages coordinate apoptotic cell-driven cellular recruitment and tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014; 111: 4215–4220.
 34. Burger P., Hilarius-Stockman P., de Korte D., van den Berg T.K., van Bruggen R. CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood* 2012; 119: 5512–5521.
 35. Miwa Y., Hayashi T., Suzuki S. i wsp. Up-regulated expression of CXCL12 in human spleens with extramedullary haematopoiesis. *Pathology* 2013; 45: 408–416.
 36. Blum K.A. Upcoming diagnostic and therapeutic developments in classical Hodgkin's lymphoma. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2010; 2010: 93–100.
 37. Steidl C., Farinha P., Gascoyne R.D. Macrophages predict treatment outcome in Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2011; 96: 186–189.
 38. Sanchez-Espiridon B., Martin-Moreno S.M., Montalban C. i wsp. Immunohistochemical markers for TAM macrophages and survival in advanced classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2012; 87: 1080–1084.
 39. Tan K.L., Scott D.W., Hong F. Tumor-associated macrophages predict inferior outcomes in classic Hodgkin lymphoma: a correlative study from E2496 intergroup trial. *Blood* 2012; 120: 3280–3287.
 40. Koh W.W., Park C., Yoon D.H., Suh C., Huh J. CSF-1R expression in TAM macrophages is associated with worse prognosis in classical Hodgkin lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 2014; 141: 573–583.
 41. Berardi S., Ria R., Reale A. i wsp. Multiple myeloma macrophages: pivotal players in the tumor microenvironment. *J. Oncol.* 2013; 2013: 183602.
 42. Ria R., Reale A., De Luisi A. i wsp. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Am. J. Blood Res.* 2011; 1: 76–89.
 43. Ostrand-Rosenberg S., Sinha P., Beury D.W., Clements V.K. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC) and macrophages enhances tumor-induced immune suppression. *Semin. Cancer Biol.* 2012; 22: 275–281.
 44. Chen H., Li M., Vardanyan S. Increased M2 macrophages and higher levels of the Tribble family member Trib 1 in monocytes are associated with progressive disease in multiple myeloma patients. *Blood* 2013; 122: 3127–3133.
 45. Burger J.A., Gribben J.G. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology. *Semin. Cancer Biol.* 2014; 24: 71–61.
 46. Bai B., Horlad H., Saito Y. i wsp. Role of Stat3 activation in cell-cell interaction between B-cell lymphoma and macrophages: the in vitro study. *J. Clin. Exp. Hematop.* 2012; 53: 127–133.
 47. Yoshida N., Oda M., Kuroda Y. Clinical significance of sIL-2R levels in B-cell lymphoma. *PLoS One* 2013; 8: e78730.
 48. Ribatti D., Nico B., Renieri G., Seseccchia G., Vacca A. The role of angiogenesis in human non-Hodgkin lymphoma. *Neoplasia* 2013, 15: 231–238.
 49. Giannoni P., Pietra G., Travaini G. i wsp. Chronic lymphocytic leukemia nurse-like cells express hepatocyte growth factor receptor (c-MET) and display features of immunosuppressive type 2 skewed macrophages. *Haematologica* 2014; 99: 1078–1088.
 50. Fecteau J.F., Kipps T.J. Structure and function of the hematopoietic cancer niche: focus on chronic lymphocytic leukemia. *Front. Biosci.* 2012; 4: 61–73.
 51. Schulz A., Durr C., Zenz T i wsp. Lenolidomid reduces survival in chronic lymphocytic leukemia cells in primary cocultures by altering of the microenvironment. *Blood* 2013; 121: 2503–2511.
 52. Huysentruyt L.C., McGrath M.S. The role of macrophages in the development and progression of AIDS-related non-Hodgkin lymphoma. *J. Leukoc. Biol.* 2010; 87: 627–632.
 53. Martin-Padura I., Marighetti P., Gregato G. i wsp. Spontaneous cell fusion of AML-ETO cells and macrophages observed in cells of AML. *Neoplasia* 2012; 14: 1057–1066
 54. Li Y., Lee P.Y., Reeves W.H. Monocyte and macrophage abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2010; 58: 355–364.
 55. Majai G., Kiss E., Tarr T. i wsp. Decreased apopto-phagocytic gene expression in the macrophages of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2014; 23: 133–145.