

## KOMÓRKI OPIEKUŃCZE BIAŁACZKOWYCH LIMFOCYTÓW B

NURSE LIKE CELLS OF LEUKEMIA B LYMPHOCYTES

Sylwia POPEK, Agata Anna FILIP

Zakład Genetyki Nowotworów z Pracownią Cytogenetyczną  
I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym  
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

*Streszczenie:* Przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) jest najczęściej rozpoznawanym typem białaczki u dorosłych. W białaczkowo zmienionych limfocytach B dochodzi do zaburzenia procesu apoptozy. Głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za to zjawisko są sygnały pochodzące z mikrośrodowiska. Najlepiej poznanym elementem mikrośrodowiska w przewlekłej białaczce limfocytowej są komórki opiekuńcze, różnicujące z monocytów CD14<sup>+</sup> w obecności limfocytów białaczkowych. Ko-hodowle komórek opiekuńczych z limfocytami białaczkowymi są najlepszym modelem mikrośrodowiska *in vitro*. Główną rolą komórek opiekuńczych jest promowanie przeżycia komórek białaczkowych. Komórki opiekuńcze oddziałują również z innymi komórkami układu immunologicznego, m.in. limfocytami T. Czynniki wpływające na różnicowanie komórek opiekuńczych nie zostały do tej pory jednoznacznie określone. Wiadomo, że na ten proces wpływają cytokiny wytwarzane przez komórki białaczkowe. NLCs w swojej morfologii i funkcji przypominają makrofagi towarzyszące nowotworom (TAM). Interakcje komórek mikrośrodowiska z komórkami białaczkowymi stają się głównym celem w terapii chorych na PBL. Dlatego dokładniejsze poznanie zależności między białaczkowymi limfocytami a komórkami opiekuńczymi przyczyni się do rozwoju nowych strategii terapeutycznych.

*Słowa kluczowe:* PBL, komórki opiekuńcze, NLCs, mikrośrodowisko, komórki białaczkowe

*Summary:* Chronic lymphocytic leukemia is the most common leukemia in adults. The leukemic cells are resistant to programmed cell death. The signals from microenvironment play the main role in alterations of apoptosis. Nurse like cells (NLCs) are the best known part of the microenvironment. NLCs differentiate from CD14<sup>+</sup> monocytes, but only at presence of leukemic cells. Co-cultures of nurse like cells and leukemia cells are the best model of microenvironment in *in vitro* conditions. Support of leukemic cells is the main function of nurse like cells but they can interact with other immune cells. The factors responsible for the differentiation of NLCs are still unknown. Probably, this

process depends on signals from leukemic cells. NLCs are similar to tumor associated macrophages (TAM). Intensive research on the role of the NLCs and microenvironment in survival and inhibition of apoptosis in leukemia cells caused that the modulation of the impaired death process of tumor cells has become the main direction of development of the therapy of chronic lymphocytic leukemia.

*Key words:* CLL, nurse like cells, NLCs, microenvironment, leukemic cells

## WSTĘP

Przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) (ang. *Chronic Lymphocytic Leukemia*, CLL) jest najczęściej rozpoznawanym typem białaczki u dorosłych. PBL stanowi grupę chorób klonalnych, w których dochodzi do postępującej akumulacji małych, morfologicznie dojrzałych limfocytów we krwi, szpiku oraz węzłach chłonnych [44]. Limfocyty białaczkowe wywodzą się z limfocytów B, charakteryzują się koekspresją antygenów charakterystycznych dla typowych limfocytów B, czyli CD19 i CD20 oraz ekspresją antygenów CD5 i CD23 [35]. W limfocytach białaczkowych dochodzi do zaburzenia procesu apoptozy. Komórki zatrzymane w fazie  $G_0/G_1$  cyklu komórkowego są odporne na sygnały prowadzące do programowanej śmierci. Dowiedziono, że istotną rolę w przeżyciu tych komórek odgrywają czynniki zewnętrzne, czyli sygnały pochodzące z mikrośrodowiska [43].

W długoterminowej hodowli *in vitro* komórek jednojądrzastych (ang. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) wyizolowanych z pełnej krwi obwodowej pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową pojawiają się duże adherentne komórki promujące przeżycie limfocytów białaczkowych. Z racji pełnionej funkcji komórki te noszą nazwę komórek opiekuńczych (ang. *Nurse Like Cells*, NLCs) [43]. NLCs są jednym z elementów mikrośrodowiska wspierającego komórki białaczkowe. Zarówno komórki opiekuńcze jak i komórki białaczkowe wydzielają cytokiny, przez co wzajemnie regulują swój metabolizm. Dodatkowo, istotną rolę w interakcjach między NLCs i komórkami PBL odgrywa działanie kontaktowe poprzez molekuly adhezyjne.

W ostatnim czasie dużą uwagę poświęca się badaniom nad interakcjami między komórkami białaczkowymi a komórkami mikrośrodowiska. Dokładne poznanie tych zależności przyczyni się do opracowania nowych strategii terapeutycznych. Profil cytokinowy nowotworu wydaje się być obecnie równie istotny jak profil genetyczny komórek nowotworowych. Niniejsza praca jest próbą syntezy wiedzy dotyczącej pochodzenia i roli komórek opiekuńczych w przebiegu przewlekłej białaczki limfocytowej. Dodatkowo uwzględniono aspekt terapeutyczny dotyczący badanych obecnie leków celowanych w mikrośrodowisko komórek białaczkowych.

## POCHODZENIE I RÓŻNICOWANIE KOMÓREK OPIEKUŃCZYCH

Komórki opiekuńcze (ang. *Nurse-Like Cells*, NLCs) to duże, adherentne komórki różnicujące z monocytów CD14+ w obecności komórek białaczkowych [11]. Ich rolą jest, jak sama nazwa wskazuje, opieka nad zmienionymi nowotworowo limfocytami B. Po raz pierwszy komórki opiekuńcze zostały opisane u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (ang. *Reumatoid Arthritis*, RA). Dokonał tego w 1999 roku Tomita i jego współpracownicy [42]. Następnie, w roku 2000, Burger wraz z zespołem opisali obecność komórek opiekuńczych w hodowli komórek jednojądrzastych izolowanych z krwi obwodowej pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową [11]. Komórki opiekuńcze zawdzięczają swoją nazwę podobieństwu do komórek opiekuńczych tymocytów, występujących w grasicy [11].

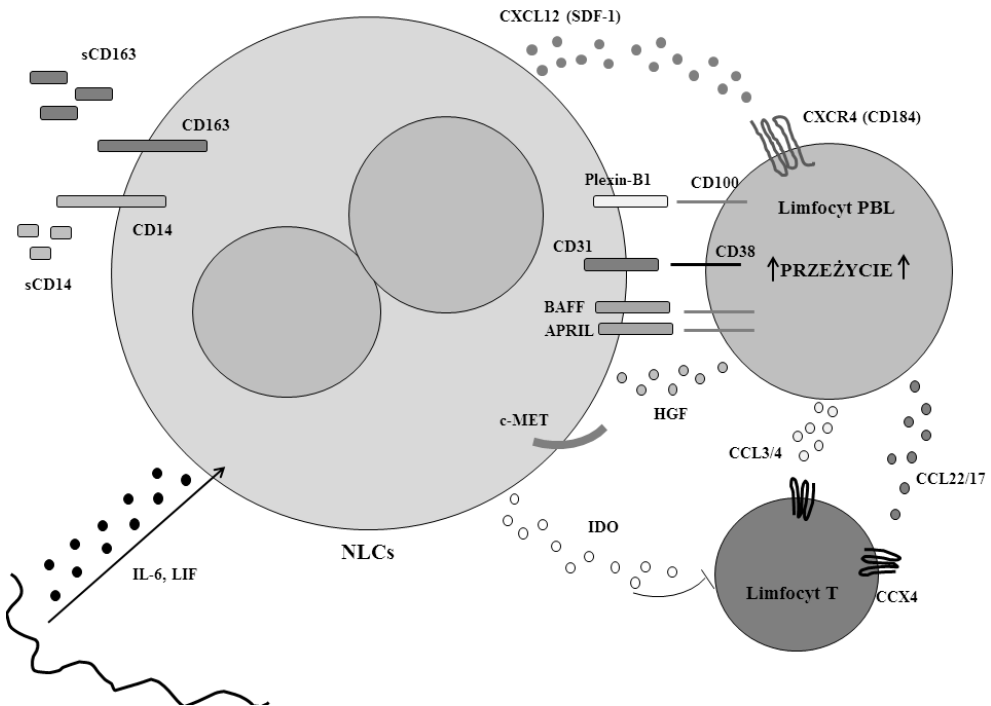
NLCs pojawiają się w 3-4 dniu prowadzenia standardowej hodowli długoterminowej komórek jednojądrzastych wyizolowanych z krwi obwodowej pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową. Ich liczba zwiększa się do ok. 8-10 dnia hodowli, potem pozostaje niezmienna [17, 18]. Komórki opiekuńcze nie różnicują w hodowli komórek jednojądrzastych izolowanych od zdrowych osób [17]. Godny uwagi jest fakt, że komórki o podobnej morfologii do komórek opiekuńczych pojawiają się w ko-hodowli monocytów CD14+ pochodzących od zdrowych dawców z białaczkowymi limfocytami B CD19+, co przedstawił w swojej pracy Tsukada [43]. Biorąc pod uwagę tę zależność, można stwierdzić, iż na różnicowanie komórek opiekuńczych mają wpływ czynniki wydzielane przez zmienione białaczkowo limfocyty B. Jednak mechanizmy wpływające na różnicowanie NLCs nie zostały do tej pory jednoznacznie określone. Natomiast poznano już częściowo morfologię komórek NLCs.

Antygeny powierzchniowe komórek opiekuńczych scharakteryzował Tsukada i wsp. Naukowcy wykazali, że na powierzchni NLCs ulegają ekspresji cząsteczki: CD14, CD11b, CD33, CD40, CD45RO, CD68, CD80, CD86, HLA-DQ, HLA-DR [43]. Dodatkowo, wykazano obecność czynników, które biorą udział w interakcjach z komórkami białaczkowymi: czynniki BAFF (ang. *B-cell-activating factor of the tumor necrosis factor family*), APRIL (ang. *A Proliferation Inducing Ligand*), CD31 oraz proteinę plexin-B1. Cząstki te biorą udział w blokowaniu programowanej śmierci komórek czyli apoptozy.

*In vivo* komórki opiekuńcze są obecne w śledzionie oraz tkance limfatycznej pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową [8, 13]. Liczba komórek opiekuńczych pojawiająca się w hodowli *in vitro* w przeprowadzonych do tej pory badaniach korelowała z poziomem  $\beta$ 2-mikroglobuliny w surowicy oraz liczbą monocytów. Podwyższony poziom  $\beta$ 2-mikroglobuliny jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym w przebiegu PBL. Żadne inne parametry kliniczne opisujące pacjen-

tów z PBL nie wykazywały związku z liczbą NLCs [19]. Jednak zaobserwowano tendencję do występowania zależności między liczbą NLCs a czasem całkowitego przeżycia chorych z PBL (ang. *Overall Survival, OS*).

Czynniki, jakie warunkują różnicowanie komórek opiekuńczych nie zostały do tej pory jednoznacznie określone. Jia i wsp. wykazali, że na różnicowanie komórek opiekuńczych może wpływać białko HMGB1 (ang. *High-Mobility Group protein B-1*). Naukowcy zauważyli podwyższony poziom HMGB1 w surowicy krwi pacjentów z PBL w porównaniu do osób zdrowych. Dodatkowo, poziom białka korelował pozytywnie ze stopniem leukocytozy [26]. HMGB1 jest proteiną jądrową, która może być pasywnie uwalniana z uszkodzonych lub martwych komórek oraz aktywnie wydzielana przez komórki układu immunologicznego oraz komórki nowotworowe [38]. Białko HMGB1 reguluje czynniki transkrypcyjne a jego mechanizm działania jest podobny do mechanizmu działania cytokin pro-



**RYCINA 1.** Molekularne interakcje komórek opiekuńczych z białaczkowymi limfocytami B oraz innymi komórkami mikrośrodowiska w przewlekłej białaczce limfocytowej. Szczegółowy opis rysunku w tekście

**FIGURE 1.** Molecular interactions between nurse like cells and leukemic cells and other microenvironment cells in chronic lymphocytic leukemia. Description in the text

zapalnych [26, 38]. Według Jia i wsp. różnicowanie NLCs w warunkach *in vitro* było związane z wydzielaniem HMGB1 przez komórki PBL. Natomiast zablokowanie szlaku sygnałowego HMGB1-RAGR/TLR9 zapobiegało różnicowaniu komórek opiekuńczych. RAGR i TLR9 są to receptory powierzchniowe dla białka HMGB1, ulegające ekspresji na komórkach mikrośrodowiska towarzyszącego komórkom białaczkowym, m.in. na komórkach NLCs [26].

Rozważa się potencjalny udział interleukiny 6 (IL-6) w procesie różnicowania NLCs. IL-6 jest jedną z głównych cytokin prozapalnych, obecnych w mikrośrodowisku komórek nowotworowych [14]. Lai i wsp. przeprowadzili analizę poziomu IL-6 w surowicy krwi 100 chorych na PBL. Naukowcy zaobserwowali podwyższony poziom IL-6 w surowicy chorych w zaawansowanym stadium choroby (III/IV wg Rai). Dodatkowo wykazali korelację poziomu IL-6 w surowicy krwi ze stadium zaawansowania choroby wg Rai, wiekiem chorych, liczbą WBC (ang. *White Blood Cells*) oraz poziomem  $\beta$ 2-mikroglobuliny [29]. Natomiast Duluc wsp. zbadali potencjalny udział IL-6 oraz czynnika LIF (ang. *Leukemia Inhibitory Factor*; LIF) w różnicowaniu makrofagów związanych z nowotworem (ang. *Tumor Associated Macrophages*, TAMs) w raku jajnika [15]. Wykazali oni, że czynniki IL-6 i LIF obecne w mikrośrodowisku komórek nowotworowych (ryc. 1) indukowały różnicowanie monocytów do komórek TAMs [15]. Jeżeli mechanizm różnicowania komórek NLCs jest analogiczny do powstawania komórek TAMs, to udział IL-6 w tym procesie jest bardzo prawdopodobny.

## KOMÓRKI OPIEKUŃCZE A MAKROFAGI TOWARZYSZĄCE NOWOTWOROM

W pracach poświęconych komórkom opiekuńczym często poruszane są zagadnienia dotyczące podobieństwa NLCs do makrofagów związanych z nowotworem (ang. *Tumor Associated Macrophages*, TAMs). Komórki TAMs najczęściej związane są z guzami litymi. Natomiast odpowiednikiem komórek NLCs w nowotworach węzłów chłonnych są makrofagi związane z chłoniakami (ang. *Lymphoma Associated Macrophages*, LAM) [9]. Wysoka ekspresja cząstki CD68 na powierzchni NLCs jest porównywalna z ekspresją CD68 na powierzchni LAM w chłoniaku grudkowym oraz innych chłoniakach z limfocytów B [7]. Potwierdza to podobieństwo obu typów komórek. NLCs, TAMs oraz LAMs różnicują z monocytów CD14+ i są składowymi mikrośrodowiska towarzyszącego komórkom nowotworowym [9, 11, 15].

Filip i wsp. przeprowadzili analizę profilu genetycznego komórek opiekuńczych. Wzorzec ekspresji genów (ang. *Gene Expression Pattern*, GEP) komórek NLCs wskazuje na ich częściowe podobieństwo do subpopulacji makrofagów M2. Makrofagi są to całkowicie wyróżnicowane komórki, rezydujące w tkankach. Polaryzacja makrofagów, w kierunku podtypów M1 i M2 zależy od czynników po-

budzających. Klasyczna aktywacja makrofagów nadaje im fenotyp M1. Odbywa się w odpowiedzi na niektóre cytokiny oraz na mikroorganizmy, w tym ich fragmenty [16]. Z kolei fenotyp M2 powstaje alternatywnie w odpowiedzi na działanie cytokin tj.: IL-4, IL-13, IL-10 [16, 31]. Makrofagi M1 są komórkami prozapalnymi biorącymi udział w uśmiercaniu komórek nowotworowych natomiast makrofagi M2 biorą udział w procesach regeneracyjnych po zapaleniu [16, 31]. Dla zachowania homeostazy organizmu bardzo ważny jest odpowiedni stosunek obu fenotypów makrofagów M1/M2 [16]. Podwyższona ekspresja genów dla IL-10 oraz brak zmian w ekspresji IL-12 sugeruje podobieństwo NLCs do subpopulacji makrofagów M2 [18]. Typowa dla M2 jest ekspresja genów *CD11b* oraz *CCL2* [18]. Z kolei za fenotypem M1 przemawia ekspresja genów dla cząsteczki CD14 oraz zdolność komórek opiekuńczych do fagocytowania m.in. bakterii [17, 18]. W przypadku makrofagów TAMs, w zależności od panujących warunków w mikrośrodkowisku nowotworu rozwija się ich właściwy fenotyp. Jako pierwsze, na antygeny nowotworowe odpowiadają makrofagi M1, które następnie szybko przełączają fenotyp na M2. Dzieje się tak pod wpływem cytokin uwalnianych przez komórki nowotworowe oraz w warunkach hipoksji [31].

Boissard i wsp. wykazali, że na powierzchni komórek opiekuńczych oprócz CD68 pojawia się antygen CD163 (ryc. 1), jest to kolejna cecha wspólna z komórkami TAMs [5]. Glikoproteina CD163 ulega ekspresji wyłącznie na powierzchni makrofagów i monocytów [30]. Istotny jest fakt, że cząsteczka CD163 występuje także w formie rozpuszczalnej (ang. *soluble CD163*, sCD163), która obecna jest w surowicy krwi. Wzrost stężenia sCD163 można zaobserwować po aktywacji makrofagów [30]. TAMs wykazują wysoką ekspresję CD163, jednak niewiele jest prac poświęconych analizie sCD163 u pacjentów onkologicznych. Do tej pory wykazano podwyższone stężenie sCD163 u chorych z AML (ang. *Acute Myeloid Leukemia*) oraz czerniakiem [4, 25, 30]. sCD163 ma szansę stać się markerem charakteryzującym mikrośrodkowisko komórek nowotworowych, w tym środowisko komórek przewlekłej białaczki limfocytowej.

## KOMÓRKI OPIEKUŃCZE PROMUJĄ PRZEŻYWANIE LIMFOCYTÓW BIAŁACZKOWYCH

Główną rolą komórek opiekuńczych w przebiegu przewlekłej białaczki limfocytowej jest blokowanie spontanicznej oraz indukowanej lekami apoptozy w zmienionych białaczkowo limfocytach B. Do czynników „wabiących” komórki PBL, wydzielanych przez NLCs należą: chemokina CXCL12 oraz CXCL13, molekuly adhezyjne BAFF, APRIL, CD31, BCR oraz plexin-B1 [9, 13].

Oś funkcjonalna CXCL12-CXCR4 (ryc. 1) jest jednym z najlepiej poznanych czynników biorących udział w blokowaniu apoptozy komórek białaczkowych [7, 11]. Chemokina CXCL12 (ang. *Stromal Derived Factor-1*, SDF-1) jest zaangażowana

zowana w proces dojrzewania prawidłowych limfocytów B promując ich przeżycie i stymulując rozwój. Dodatkowo czynnik ten w obecności IL-7 bierze udział w proliferacji progenitorowych limfocytów B [28]. SDF-1 jest wytwarzana przez komórki opiekuńcze oraz komórki stromalne szpiku kostnego [11]. Receptory wiążące CXCL12 to CXCR4 (CD184) oraz CXCR7, obecne między innymi na powierzchni limfocytów PBL. Chemokina SDF-1 wydzielana jest przez komórki opiekuńcze i reaguje z receptorem CXCR4 obecnym na powierzchni limfocytów białaczkowych. Aktywacja receptora wyzwała wewnątrzkomórkowy szlak sygnalizacyjny, który hamuje apoptozę białaczkowych limfocytów B [27]. W białaczkowych limfocytach B poziom białek antyapoptotycznych tj. BCL-2, MCL-1 czy SURVIVIN jest podwyższony. Zjawisko to nie jest spowodowane występowaniem mutacji w genach kodujących wymienione białka, co wskazuje na udział sygnałów pochodzących z mikrośrodowiska komórek PBL [32]. Agarwal i wsp. przeprowadzili analizę porównawczą poziomu SDF-1 w surowicy krwi chorych we wczesnym stadium PBL (0/I/II wg Rai) oraz w stadium zaawansowanym choroby (III/IV wg Rai). Poziom SDF-1 u pacjentów z zaawansowanym stadium PBL okazał się znacząco wyższy w porównaniu do osób w stadium początkowego [1].

Giannoni i wsp. zauważyli w surowicy chorych na PBL obecność czynnika wzrostu hepatocytów (ang. *Hepatocyte Growth Factor*, HGF). Dodatkowo, stężenie HGF w surowicy osób chorych było wyższe niż u osób zdrowych. Według autorów główną rolą HGF jest promowanie przeżycia białaczkowych limfocytów B. Dalsze analizy wykazały, że receptor dla tego czynnika o nazwie c-MET ulega silnej ekspresji na powierzchni komórek opiekuńczych [22].

Komórki opiekuńcze na swojej powierzchni posiadają proteinę CD31 (ang. *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*, PECAM-1), która jest ligandem dla glikoproteiny CD38 (ryc. 1) występującej na powierzchni limfocytów PBL [33]. Ekspresja CD38 na powierzchni komórek białaczkowych jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym w przebiegu PBL [12]. Deaglio i wsp. wykazali, że glikoproteina CD38 w komórkach PBL jest aktywowana przez ligand CD31. Sygnały pochodzące z cząsteczki CD38 po interakcji z CD31 biorą udział w regulacji proliferacji i przeżycia komórek białaczkowych [12]. Poggi i wsp. wykazali obecność CD31 także na komórkach białaczkowych [33]. Stymulacja glikoproteiny CD31 przez swoje przeciwciała prowadziła do aktywacji kinazy białkowej Akt za pośrednictwem 3-kinazy fosfatidyloinozytolu (ang. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*, PI3K) oraz czynników transkrypcyjnych NFκ-B efektem, czego był wzrost ekspresji białek anty-apoptotycznych: BCL-2 oraz BCL-X<sub>L</sub> [33].

Komórki opiekuńcze różnicują z monocytów CD14+ [11]. Seiffert i wsp. wykazali, że monocyty w warunkach *in vitro* mogą wspierać przeżycie komórek białaczkowych przez uwalnianie rozpuszczalnej formy cząstki CD14 (ang. *soluble CD14*, sCD14) (ryc. 1). sCD14 aktywuje czynnik transkrypcyjny NFκB, doprowadzając do wzrostu ekspresji genów pro-przeżyciowych w limfocytach białaczkowych [37].

Komórki białaczkowe znajdujące się w krwi obwodowej, węzłach chłonnych, szpiku kostnym, grudkach chłonnych a następnie w śledzionie i wątrobie są w kontakcie z komórkami mikrośrodowiska. Rezydualne komórki białaczkowe zasiedlające szpik kostny i węzły chłonne pozostają pod ochronnym działaniem m.in. komórek opiekuńczych i mogą być przyczyną występowania choroby resztkowej (ang. *Minimal Residual Disease*, MRD) [6, 23, 34].

## MODULACJA MIKOROŚRODOWISKA PRZEZ KOMÓRKI OPIEKUŃCZE I KOMÓRKI BIAŁACZKOWE

NLCs i komórki PBL są zdolne do produkcji czynników – cytokin i chemokin, które nie tylko wpływają na ich wzajemne interakcje, ale modulują różnicowanie, dojrzewanie oraz funkcjonowanie innych komórek układu odpornościowego m.in. limfocytów T. Upośledzenie funkcji limfocytów T u chorych na PBL odgrywa istotną rolę w typowych dla tej białaczki zaburzeniach odporności. Giannoni i wsp. wykazali, że komórki opiekuńcze stale wytwarzają 2,3 dioksygenazę indolową (ang. *indoleamine 2,3-dioxygenase*, IDO), która negatywnie wpływa na proliferację limfocytów T [22]. IDO katabolizuje tryptofan do N-formylokynureniny, pozbawiając przy tym limfocyty T niezbędnego aminokwasu [47]. IDO jest jednym z wielu mediatorów ułatwiających komórkom nowotworowym ucieczkę spod kontroli układu immunologicznego [47].

W odpowiedzi na stymulację receptora BCR oraz w obecności komórek opiekuńczych komórki białaczkowe wydzielają chemokiny CCL3 oraz CCL4 (ryc. 1) [8, 10]. Burger i wsp. wykazali podwyższony poziom obu chemokin w surowicy krwi chorych na PBL. Dodatkowo poziom CCL3 korelował z markerami prognostycznymi oraz z czasem wolnym od leczenia [10, 39]. Wytwarzane przez limfocyty białaczkowe chemokiny mogą działać chemotaktycznie wobec limfocytów T i monocytów [8]. Zwabione przez CCL3/CCL4 limfocyty T (CD4+) aktywują następnie limfocyty PBL przez przyłączenie CD40L do cząsteczki CD40. Interakcja CD40/CD40L promuje przeżycie i ekspansję komórek białaczkowych [24]. Limfocyty T regulatorowe ( $T_{reg}$ ) FOXP3 pozytywnie posiadają na swojej powierzchni receptor CCX4 (ryc. 1), dla którego ligandami są chemokiny CCL22 oraz CCL17 [8]. Białko FOXP3 jest głównym czynnikiem transkrypcyjnym, który reguluje ekspresję genów związanych z właściwościami immunoregulacyjnymi limfocytów  $T_{reg}$  [45]. Ekspresja FOXP3 w ludzkich  $T_{reg}$  jest zmienna i w dużym stopniu zależy od profilu cytokinowego mikrośrodowiska [45]. Limfocyty FOXP3 migrują zgodnie z gradientem CCL22/CCL17. Komórki PBL izolowane z zasiedlanych tkanek, ale nie z krwi, wykazują ekspresję chemokiny CCL22 [8].



## TERAPIA UKIERUNKOWANA NA KOMÓRKI MIKROŚRODOWISKA

Szczegółowe poznanie zależności między komórkami mikrośrodowiska a komórkami białaczkowymi owocuje rozwojem nowych strategii terapeutycznych. Jednym z pierwszych leków ukierunkowanych na te powiązania, zastosowanych w leczeniu PBL był lenalidomid. Lenalidomid jest lekiem immunomodulującym stosowanym w leczeniu szpiczaka mnogiego (ang. *Multiple Myeloma*, MM). Jednym z mechanizmów działania lenalidomidu jest interwencja w mikrośrodowisko komórek nowotworowych. Mechanizm działania lenalidomidu jest przedmiotem wielu badań.

Fiorcari i wsp. zbadali wpływ lenalidomidu na limfocyty PBL oraz komórki opiekuńcze. Naukowcy wykazali, że lenalidomid obniżał w komórkach NLCs ekspresję genów odpowiedzialnych za wytwarzanie czynników pro-przeżyciowych m.in. CCL2, IGF1, CXCL12, HGF1. Dodatkowo modulował on fenotyp komórek NLCs, który z bliskiego fenotypowi M2 stawał się bliższy fenotypowi makrofagów M1, z wyższą ekspresją IL-2 i obniżoną ekspresją IL-10, IL-8 oraz CD163 [20]. Schulz i wsp. wykazali, że lenalidomid osłabia migrację komórek PBL, redukując przy tym ich przeżycie zależne od NLCs [36].

Ze względu na te właściwości, podjęto próby zastosowania leku u pacjentów z PBL. Trzecia faza badań klinicznych (ORIGIN) z zastosowaniem lenalidomidu (*Revlimid*, Celgene) objęła 450 chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową, w wieku powyżej 65 lat. Niestety, musiała zostać przerwana, a przyczyną była zbyt wysoka liczba zgonów (34 na 210 chorych) w grupie leczonej lenalidomidem. W grupie chorych, którym podawano chlorambucil, lek standardowo stosowany w leczeniu PBL, liczba zgonów wyniosła 18 na 211 badanych osób [46].

Innym lekiem znoszącym sygnały pochodzące z mikrośrodowiska jest AMD3100 (pleriksafor) [41]. Pleriksafor to antagonist receptoru CXCR4, stosowany w celu uwolnienia komórek macierzystych ze szpiku do krążenia obwodowego [2]. Jak wskazują dane literaturowe AMD3100 blokuje oś funkcjonalną SDF-1-CXCR4 ograniczając protekcyjne wobec komórek PBL sygnały pochodzące z komórek NLCs, co uwarząliwia komórki białaczkowe na działanie podawanych leków [41].

Idelalisib, inhibitor 3-kinazy fosfatydyloinozytoli (PI3K), znosi sygnały pochodzące z mikrośrodowiska. Zablockowanie szlaku PI3K, aktywowanego przez cytokiny, indukuje w komórkach białaczkowych proces apoptozy [3]. Ibrutinib jest inhibitorem BTK (ang. *Bruton Tyrosine Kinase*), głównej kinazy aktywowanej po stymulacji receptora BCR [40]. Ibrutinib hamuje sekrecję chemokin CCL3 i CCL4, zależną od aktywacji BCR [40]. Według doniesień z ASCO 2014 (*American Society of Clinical Oncology Annual Meeting*) zarówno w przypadku idelalisibu jak i ibrutinibu wyniki leczenia chorych z PBL są obiecujące [21]. Podejście terapeutyczne w leczeniu PBL zmienia się diametralnie.

## PODSUMOWANIE

Ko-hodowle limfocytów białaczkowych oraz komórek opiekuńczych są jak do tej pory najlepszym modelem *in vitro* odzwierciedlającym stan mikrośrodowiska w przewlekłej białaczce limfocytowej. Sieć zależności między komórkami występującymi w obrębie mikrośrodowiska jest bardzo rozbudowana. Komórki, wpływając na siebie wzajemnie, kształtują określony profil mikrośrodowiska. Mediatorzy uwalniane z komórek opiekuńczych oraz komórek białaczkowych krążą w surowicy krwi chorych na PBL. Określenie wzorca cytokinowego mikrośrodowiska komórek nowotworowych może w przyszłości stać się nowym czynnikiem prognostycznym. Uwalniane cytokiny krążące w surowicy są łatwo dostępne, a detekcja tych czynników jest nieinwazyjna dla pacjenta.

Od kilku lat badania nad komórkami opiekuńczymi są prowadzone intensywnie, jednak nie udało się jednoznacznie określić jakie czynniki powodują ich powstawanie. NLCs wydają się niezbędnym elementem mikrośrodowiska promującego przeżycie komórek białaczkowych. Dlatego dalsze starania naukowców związane identyfikacją natury NLCs mogą zaowocować przełomem terapeutycznym w leczeniu chorych na PBL.

## LITERATURA

- [1] AGARWAL A, COOKE L, RILEY C, QI W, MOUNT D, MAHADEVAN D. Genetic and cytokine changes associated with symptomatic stages of CLL. *Leuk Res* 2014; **38**(9): 1097-1101.
- [2] ALVAREZ P, CARRILLO E, VÉLEZ C, HITA-CONTRERAS F, MARTÍNEZ-AMAT A, RODRÍGUEZ-SERRANO F, BOULAIZ H, ORTIZ R, MELGUIZO C, PRADOS J, ARÁNEGA A. Regulatory system in bone marrow for hematopoietic stem/progenitor cells mobilization and homing. *BioMed Research International* 2013; doi: 10.1155/2013/312656
- [3] AWAN FT, BYRD JC. New Strategies in chronic lymphocytic leukemia: shifting treatment paradigms. *Clin Cancer Res* 2014; **20**(23): 5869-74.
- [4] BACHLI EB, SCHAER DJ, WALTER RB, FEHR J, SCHOEDON G. Functional expression of the CD163 scavenger receptor on acute myeloid leukemia cells of monocytic lineage. *J Leukoc Biol* 2006; **79**: 312-318.
- [5] BOISSARD F, FOURNIE JJ, LAURENT C, POUPOUT M, YSEBAERT L. Nurse like cells: chronic lymphocytic leukemia associated macrophages. *Leuk Lymphoma* 2015; doi:10.3109/10428194.2014.991731
- [6] BURGER JA. Chemokines and chemokine receptors in chronic lymphocytic leukemia (CLL): from understanding the basic towards therapeutic targeting. *Semin Cancer Biol* 2010; **20**: 424-430.
- [7] BURGER JA. Nature versus Nurture: The Microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011; **2011**: 96-103.
- [8] BURGER JA. The CLL cell microenvironment. [w] Malek S [red.] *Advances in Chronic Lymphocytic Leukemia*. New York: Springer Science 2013; **XI**: 25-45.
- [9] BURGER JA, GRIBBER JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other cell malignancies: Insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol* 2014; **24**: 71-81.

- [10] BURGER JA, QUIROGA MP, HARTMANN E, BÜRKLE A, WIERDA WG, KEATING MJ, ROSENWALD A. High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurse-like cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood* 2009; **113**(13): 3050-3058.
- [11] BURGER JA, TSUKADA N, BURGER M, ZVAIFLER NJ, DELL'AQUILA M, KIPPS TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 2000; **96**: 2655-2663.
- [12] DEAGLIO S, AYDIN S, GRAND MM, VAISITTI T, BERGUI L, D'ARENA G, CHIORINO G, MALAVASI F. CD38/CD31 interaction activate genetic pathways leading to proliferation and migration in chronic lymphocytic leukemia cells. *Mol Med*. 2010; **16**(3-4): 87-91.
- [13] DEAGLIO S, VAISITTI T, BERGUI L, BONELLO L, HORENSTEIN AL, TAMAGNONE L, BOUMSELL L, MALAVASI F. CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* 2005; **105**(8): 3042-50.
- [14] DIJKGRAAF EM, HEUSINKVELD M, TUMMERS B, VOGELPOEL LTC, GOEDEMANS R, JHA V, NORTIER JWR, WELTERS MJP, KROEP JR, VAN DER BURG SH. Chemotherapy alters monocyte differentiation to favor generation of cancer-supporting M2 macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Res* 2013; **73**(8): 2480-2491.
- [15] DULUC D, DELNESTE Y, TAN F, MOLES MP, GRIMAUD L, LENOIR J, PREISSER L, ANEGON I, CATALA L, IFRAH N, DESCAMPS P, GAMELIN E, GASCAN H, HEBBAR M, JEANNIN P. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophages-like cells. *Blood* 2007; **110**(13): 4319-4330.
- [16] ELIASZEWICZ A, GACKOWSKA L, KUBISZEWSKA I, JANKOWSKI M, URBAŃSKA M, WIESE M, HELMIN\_BASA A, MICHALKIEWICZ J, ZEGARSKI W. Aktywność makrofagów w rozwoju choroby nowotworowej. *Współczesna Onkol* 2010; **14**(1): 1-6.
- [17] FILIP AA. Rola komórek opiekuńczych (nurse-like cells) w procesie apoptozy limfocytów przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej. Rozprawa habilitacyjna. Lublin: Uniwersytet Medyczny 2009.
- [18] FILIP AA, CISEL B, KOCZKODAJ D, WAŚIK-SZCZEPANEK E, PIERSIAK T, DMOŻYŃSKA A. Circulating microenvironment of CLL: Are nurse-like cells related to tumor-associated macrophages? *Blood Cell Mol Dis* 2013; **50**: 263-270.
- [19] FILIP AA, CISEL B, WAŚIK-SZCZEPANEK E. Guilty bystanders: nurse-like cells as a model of microenvironment support for leukemic lymphocytes. *Clin Exp Med* 2015; **15**: 73-83.
- [20] FIORCARI S, MARTINELLI S, BULGARELLI J, AUDRITO V, ZUCCHINI P, COLACI E, POTENZA L, NARNI F, LUPPI M, DEAGLIO S, MARASCA R, MAFFEI R. Lenalidomide interferes with tumor-promoting properties of nurse-like cells in chronic lymphocytic leukemia. *Hematologica* 2015; **100**(2): 253-260.
- [21] FUERST M. CLL: New drugs bring paradigm shift for high-risk disease. *Oncology Times* 2014; **26**(15): 40-41.
- [22] GIANNONI P, PIETRA G, TRAVAINI G, QUARTO R, SHYTI G, BENELLI R, OTTAGGIO L, MINGARI MC, ZUPO S, CUTRONA G, PIERRI I, BALLEARI E, PATTAROZZI A, CALVARUSO M, TRIPODO C, FERRARINI M, DE TOTERO D. Chronic lymphocytic leukemia nurse-like cells express hepatocyte growth factor receptor (c-MET) and indoleamine 2,3-dioxygenase and display features of immunosuppressive type 2 skewed macrophages. *Haematologica* 2014; **99**(6): 1078-1087.
- [23] GIANNOPOULOS K. Biologia i rokowanie w przewlekłej białaczce limfocytowej. *Acta Haematol Pol* 2010; **41**(3): 433-440.
- [24] HACKEN E, BURGER JA. Microenvironment dependency in chronic lymphocytic leukemia: the basis for new targeted therapies. *Pharmacol Ther* 2014; **144**(3): 338-348.
- [25] JENSEN TO, SCHMIDT H, MÖLLER HJ, HØYER M, MANIECKI MB, SJOEGREN P, CHRISTENSEN IJ, STEINICHE T. Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 3330-3337.

- [26] JIA L, CLEAR A, LIU F, MATTHEWS J, UDDIN N, MCCARTHY A, HOXHA E, DURANCE C, IQBAL S, GRIBBEN J. Extracellular HMGB1 promotes differentiation of nurse-like cells in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014; **123**(11): 1709-1719.
- [27] KOPEĆ-SZŁĘZAK J, WOŹNIAK J. Znaczenie receptora CXCR4 (CD184) w układzie krwiotwórczym, *Acta Haematologica Polonica*. 2006; **4**: 475-483
- [28] KOWALSKI K, MARKOWSKA-ZAGRAJEK A, PLAKOTA I, KOWALEWSKA M, ARCHACKI R, ARCHACKA K, CZERWIŃSKA AM, GRABOWSKA I, ZIMOWSKA M, JAŃCZYK I, LACH K, STREMIŃSKA W, CIEMERYCH MA, BRZÓSKA-WÓJTOWICZ E. Rola SDF-1 w procesach regeneracji i nowotworzenia. *Post Pol Med i Farm* 2012; **2**(1): 29-38.
- [29] ] LAI R, O'BRIEN S, MAUSHOURI T, ROGERS A, KANTARIAN H, KEATING M, ALBITAR M. Prognostic value of plasma interleukin-6 levels in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2002; **95**(5): 1071-1075.
- [30] MØLLER HJ. Soluble CD163. *Scand J Clin Lab Inv* 2012; **72**: 1-13.
- [31] NAZIMEK K, BRYNIARSKI K. Aktywność biologiczna makrofagów w zdrowiu i chorobie. *Postepy Hig Med Dosw* 2012; **66**: 507-520.
- [32] PODHORECKA M. Proces apoptozy w patogenezie przewlekłej białaczki limfatycznej B komórkowej. *Postepy Hig Med Dosw* 2004; **58**: 236-242
- [33] POGGI A, PREVOSTO C, CATELLANI S, ROCCO I, GARUTI A, ZOCCHI MR. Engagement of CD31 delivers an activating signal that contributes to the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells. *Brit J Hematol* 2010; **151**: 252-264.
- [34] PURROY N, ABRISQUETA P, CARABIA J, CARPIO C, PALACIO C, BOSCH F, CRESPO M. Co-culture of primary CLL cells with bone marrow mesenchymal cells, CD40 ligand and CpG ODN promotes proliferation of chemoresistant CLL cells phenotypically comparable to those proliferating *in vivo*. *Oncotarget* 2014; w druku.
- [35] ROBAK T, BŁOŃSKI JZ, KASZNICKI M. Przewlekłe białaczki limfocytowe. [w] Dmoszyńska A, Robak T [red] *Podstawy hematologii*. Lublin: Czelej 2008: 289-298.
- [36] SCHULZ A, DÜRR C, ZENZ T, DÖHNER H, STILGENBAUER S, LICHTER P, SEIFFERT M. Lenalidomide reduces survival of chronic lymphocytic leukemia cells in primary cocultures by altering the myeloid microenvironment. *Blood* 2013; **121**(13): 2503-2511.
- [37] SEIFFERT M, SCHULTZ A, OHI S, DOHNER 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**(20): 4223-4230.
- [38] SIMS GP, ROWE DC, RIETDIJK ST, HERBST R, COYLE AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 2010; **28**: 367-388.
- [39] SIVINA M, HARTMANN E, KIPPS TJ, RASSENTI L, KRUPNIK D, LERNER S, LAPUSHIN R, XIAO L, HUANG X, WERNER L, NEUBERG D, KANTARIAN H, O'BRIEN S, WIERDA WG, KEATING MJ, ROSENWALD A, BURGER JA. CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) plasma levels and the risk for disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; **117**(5): 1662-1669.
- [40] SIVINA M, KREITMAN RJ, ARONS E, RAVANDI F, BURGER JA. The bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) blocks hairy cell leukaemia survival, proliferation and B cell receptor signalling: a new therapeutic approach. *Br J Haematol* 2014; **166**(2): 177-188.
- [41] STAMATOPOULOS B, MEULEMAN N, DE BRUYN C, PIETERS K, MINEUR P, LE ROY C, SAINT-GEORGES S, VARIN-BLANK N, CYMBALISTA F, BRON D, LAGNEAUX L. AMD3100 disrupts the cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and a mesenchymal stromal or nurse-like cell-based microenvironment: pre-clinical evidence for its association with chronic lymphocytic leukemia treatments. *Haematologica* 2012; **97**(4): 608-615.
- [42] TOMITA T, TAKEUCHI E, TOYOSAKI-MAEDA T, OKU H, KANEKO M, TAKANO H, SUGAMOTO K, OHZONO K, SUZUKI R, OCHI T. Establishment of nurse-like stromal cells from bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: indication of characteristic bone marrow microenvironment in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 1999; **38**: 854-863.

- [43] TSUKADA N, BURGER JA, ZVAIFLER NJ, KIPPS TJ. Distinctive of “nurselike” cells differentiate in context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; **99**: 1030-1037.
- [44] WARZOCHA K. Optymalizacja strategii leczenia pierwszej linii przewlekłej białaczki limfocytowej. *Oncologia w Praktyce Klinicznej* 2007; **3**(2): 78-86.
- [45] WOJAS J, PAJTASZ-PIASECKA E. Oddziaływanie komórek dendrytycznych z limfocytami T regulatorowymi. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2010; **64**: 167-174.
- [46] [www.medscape.com/viewarticle/808216](http://www.medscape.com/viewarticle/808216); data dostępu 9.12.2013.
- [47] ZAMANAKOU M, GERMENIS AE, KARANIKAS V. Tumor immune escape mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunol Lett* 2007; **111**(2): 69-75.

*Redaktor prowadzący –*

*Otrzymano:*

*Przyjęto:*

*Sylwia Popek*

*Zakład Genetyki Nowotworów z Pracownią Cytogenetyczną*

*I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym*

*Uniwersytet Medyczny w Lublinie*

*ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin*

*tel. 0-81 448 61 00*

*email: sylwia.popek@gmail.com*

