

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)

Acta Haematologica Polonica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem

Praca oryginalna/Original research article

Ocena ekspresji cząsteczki CD1d na limfocytach B u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową



Expression of CD1d molecules on B cells in patients with chronic lymphocytic leukemia

Justyna Woś^{1,*}, Agnieszka Bojarska-Junak¹, Iwona Hus²,
Monika Pieczykolan¹, Karolina Olszewska-Bożek¹,
Ewa Wąsik-Szczepanek², Waldemar Tomczak², Jacek Roliński¹

¹Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jacek Roliński, Lublin, Polska

²Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Kierownik: prof. dr hab. n. med. Anna Dmoszyńska, Lublin, Polska

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 31.05.2013

Zaakceptowano: 04.07.2013

Dostępne online: 24.07.2013

Słowa kluczowe:

- przewlekła białaczka limfocytowa
- CD1d
- NKT
- CD38
- ZAP-70

Keywords:

- Chronic lymphocytic leukemia
- CD1d
- NKT
- CD38
- ZAP-70

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) which is the most common leukemia in adults in Western countries still remains incurable. There is an intense search for the prognostic markers that might facilitate the treatment of patients according to individual prognosis. The aim of the presented study was to evaluate the expression of CD1d molecule on peripheral blood B cells from 70 untreated patients with CLL and 20 healthy donors. The samples were analyzed by flow cytometry directly after preparation.

The results of the study showed that the median percentage of CD1d-positive B cells was significantly lower in peripheral blood of patients with CLL than in healthy subjects from control group. Additionally, the percentage of CD1d+ B cells in CLL patients varied in patients with different Rai stages. We have also observed significant differences in CD1d expression depending on CD38 or ZAP70 expression. Moreover, patients with CLL had lower percentages of iNKT cells than healthy donors and the percentage of CD1d+/CD19+ cells inversely correlated with the percentage of iNKT cells. Our results suggest the important role of CD1d molecule in the development and progression of CLL, as well as its potential prognostic significance.

© 2013 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

* Adres do korespondencji: Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej UM w Lublinie, ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin, Polska. Tel.: +48 81756 4854; fax: +48 81756 4840.

Adres email: justyna.wos1@gmail.com (J. Woś).

Wstęp

Przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) jest chorobą o bardzo zróżnicowanym przebiegu klinicznym, zmiennym nasileniu objawów chorobowych oraz różnym stopniu zaawansowania klinicznego choroby w chwili jej rozpoznania. Dotychczas poznane markery prognostyczne, takie jak stan mutacji genów dla IgV_H , ekspresja antygeny CD38 czy białka ZAP-70, oceniają klon białaczkowych limfocytów B, prawdopodobnie istotne znaczenie może mieć również wgląd w inne populacje komórek układu immunologicznego [1–5]. W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień na temat roli komórek NKT oraz ich pobudzania przez komórki CD1d+ w procesach odporności przeciwnowotworowej.

Większość komórek hemopoetycznych człowieka ma na swojej powierzchni cząsteczkę CD1, która pod względem budowy przypomina cząsteczki MHC klasy I [6–8] i zbudowana jest z łańcucha α - i β_2 -mikroglobuliny. U ludzi cząsteczki te dzielimy na dwie grupy: grupę I, do której zaliczamy CD1a, CD1b, CD1c i CD1e, oraz grupę II, w skład której wchodzi CD1d [8–10]. Przynależność do grupy wynika z podobieństwa sekwencji aminokwasów łańcucha α [8]. W odróżnieniu od klasycznych cząsteczek MHC klasy I prezentujących antygeny peptydowe, monomorficzna cząsteczka CD1d prezentuje antygeny o charakterze lipidów i glikolipidów. Obecnie znanych jest wiele ligandów, które cząsteczka CD1d prezentuje komórkom NKT czy też innym komórkom T CD1d-zależnym. Zaliczamy do nich między innymi: glikolipidy z gąbek morskich, bakteryjne, a także endogenne glikolipidy. Stwierdzono, że cząsteczka CD1d wiąże się z α -galaktozyloceramidem (α -GalCer), syntetycznym glikosfingolipidem otrzymywanym z gąbek morskich *Agelas mauritanicus* [6]. Cząsteczka α -GalCer prezentowana w kontekście CD1d silnie pobudza zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio przeciwnowotworowe działanie komórek iNKT [11, 12]. Komórki NKT stanowią specyficzną subpopulację limfocytów T wykazującą ekspresję zarówno markerów charakterystycznych dla limfocytów T, jak też typowych dla komórek NK. Prezentacja antygeny

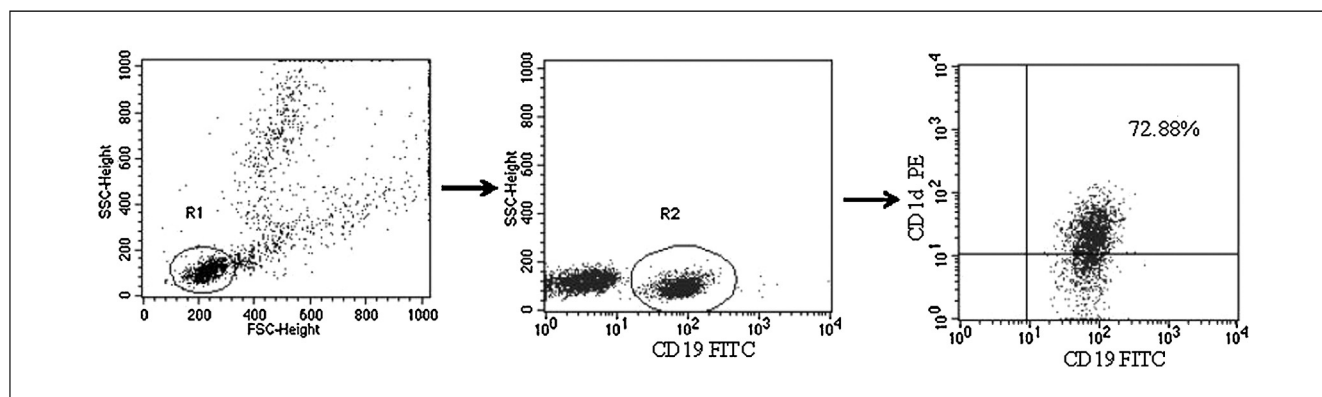
powoduje aktywację komórek NKT, które nabierają właściwości limfocytów cytotoksycznych i wydzielają cytokiny Th1 i Th2. Liczne funkcje regulacyjne, a także efektorowe oraz unikatowa zdolność do rozpoznawania antygenów lipidowych, zarówno komórek prawidłowych, jak też guzów czy patogenów, sprawiają, że komórki NKT odgrywają istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej w przebiegu różnego rodzaju infekcji, nowotworów oraz wielu innych chorób [13]. Jest prawdopodobne, że komórki nowotworowe mające ekspresję CD1d mogą prezentować antygeny bezpośrednio komórkom NKT i wzmacniać ich aktywność przeciwnowotworową.

Materiał i metody

Do badań zakwalifikowano 70 chorych z rozpoznaniem PBL ustalonym w Klinice Hemato-onkologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Rozpoznanie PBL ustalono na podstawie standardowych morfologicznych i immunofenotypowych kryteriów opracowanych przez NCI-WG (National Cancer Institute-Working Group) [5]. Wiek badanych chorych wahał się w granicach 38–79 lat (średnia $62 \pm 10,1$; mediana 63). W grupie badanej było 24 kobiet i 46 mężczyzn. Stopień zaawansowania choroby został określony według klasyfikacji Rai [14]. W grupie niskiego ryzyka (st. 0 według Rai) znalazło się 24 chorych, w grupie pośredniego ryzyka (st. I/II według Rai) – 36 chorych, zaś w grupie wysokiego ryzyka (st. III/IV według Rai) – 10 chorych. Grupę kontrolną stanowiła krew obwodowa 20 zdrowych dawców krwi w przedziale wiekowym 38–70. roku życia (średnia $56,1 \pm 13,1$; mediana 59), w tym 14 kobiet i 6 mężczyzn. Badania wykonano zgodnie z protokołem zaakceptowanym przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym w Lublinie.

Ocena ekspresji CD1d

W celu oceny markerów powierzchniowych wykorzystano 100 μ l krwi pełnej oraz stosowną (wg procedur zalecanych



Ryc. 1 – Analiza cytometryczna limfocytów CD19+ wykazujących ekspresję cząsteczki CD1d

A) Układ FSC/SSC – ustawienie bramki dla limfocytów (Region R1). B) Limfocyty z regionu R1 w układzie CD19 FITC/SSC – wyodrębnienie limfocytów CD19+ (Region R2). C) Limfocyty (z regionu R2) w układzie CD19 FITC/CD1d PE. Uwzględniając limfocyty zgromadzone w regionach R1 i R2, oceniono odsetek limfocytów CD19+ wykazujących ekspresję cząsteczki CD1d (CD19+/CD1d+).

Fig. 1 – The analysis method for identification of CD19+ cells with CD1d+ expression

przez producenta) objętość odpowiednich przeciwciał monoklonalnych: anti-CD1d PE (klon CD1d42, IgG1), anti-CD19 FITC (klon HIB19, IgG1) (BD Pharmingen). Tak przygotowane próbki inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. Następnie do próbek dodawano po 2 ml płynu lizującego erytrocyty. Po 10 minutach próbkę odwirowywano, dwukrotnie płukano zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS) i niezwłocznie poddawano analizie cytometrycznej. Akwizycję i analizę danych wykonano przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur (Becton Dickinson, USA). Komórki z ekspresją CD1d oceniane były wśród limfocytów CD19+. Na [rycynie 1](#) przedstawiono przykładową analizę cytometryczną komórek CD19+ wykazujących ekspresję CD1d. Oceniano odsetek komórek pozytywnie wyznakowanych przeciwciałami monoklonalnymi. W celu określenia ilości miejsc wiążących przeciwciało i w pośredni sposób określenia ilości antygenu na powierzchni komórek posługiwano się oceną średniej intensywności fluorescencji (*mean fluorescence intensity*, MFI). Do analizy wyników i ich graficznej prezentacji posłużył program komputerowy CellQuest Pro (Becton Dickinson).

Ocena komórek iNKT

Próbki krwi pełnej (100 μ l) inkubowano z przeciwciałami monoklonalnymi: anti-iNKT FITC (anty-V α 24) (BD Pharmingen) oraz anti-CD3 PE (BD Pharmingen). Po inkubacji próbki poddawano lizie. Po dwukrotnym odplukaniu roztworem PBS próbki oceniano w cytometrze przepływowym FACSCalibur.

Ocena ekspresji ZAP-70 i CD38

Ocenę ekspresji ZAP-70 w limfocytach CD19+/CD5+ we wszystkich badanych próbkach przeprowadzono za pomocą przeciwciał monoklonalnych anti-ZAP-70 (klon 1E7.2) (BD Biosciences) oraz anti-CD38 (BD Pharmingen) sprzężonych z fikoerytryną (PE) zgodnie z protokołem opisanym uprzednio [15].

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną uzyskanych wyników badań przeprowadzono za pomocą programu Statistica 9,0 PL. Z uwagi na

Tabela I – Ekspresja cząsteczki CD1d u chorych na PBL i grupie kontrolnej
Table I – CD1d expression on B CD19+ from CLL patients and healthy controls

	PBL mediana (zakres)	Kontrola mediana (ranges)	p
CD19+/CD1d+ (%)	10,16 (0,21–91,02)	92,70 (84,54–97,89)	0,0001
CD19+/CD1d+ (MFI)	28,56 (14,67–142,15)	33,50 (21,08–65,13)	0,046

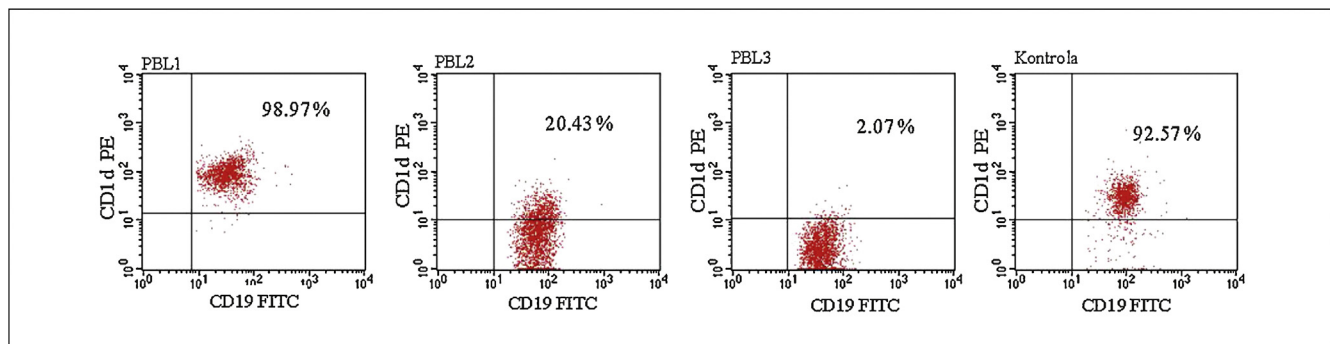
MFI – mean fluorescence intensity.

fakt, że badane zmienne nie miały rozkładu normalnego, w analizie stosowano testy nieparametryczne. Test U Manna-Whitneya wykorzystano dla porównania różnic pomiędzy grupą chorych a grupą kontrolną oraz pomiędzy grupą chorych we wczesnych stadiach PBL a grupą chorych w zaawansowanych stadiach PBL. Test ANOVA rang Kruskala-Wallisa posłużył do analizy różnic pomiędzy stadiami klinicznymi choroby. Istnienie związków statystycznych pomiędzy zmiennymi oceniano, obliczając współczynnik korelacji rang Spearmana. Za istotne statystycznie uznawano wyniki, których próg poziomu istotności był $p < 0,05$.

Wyniki

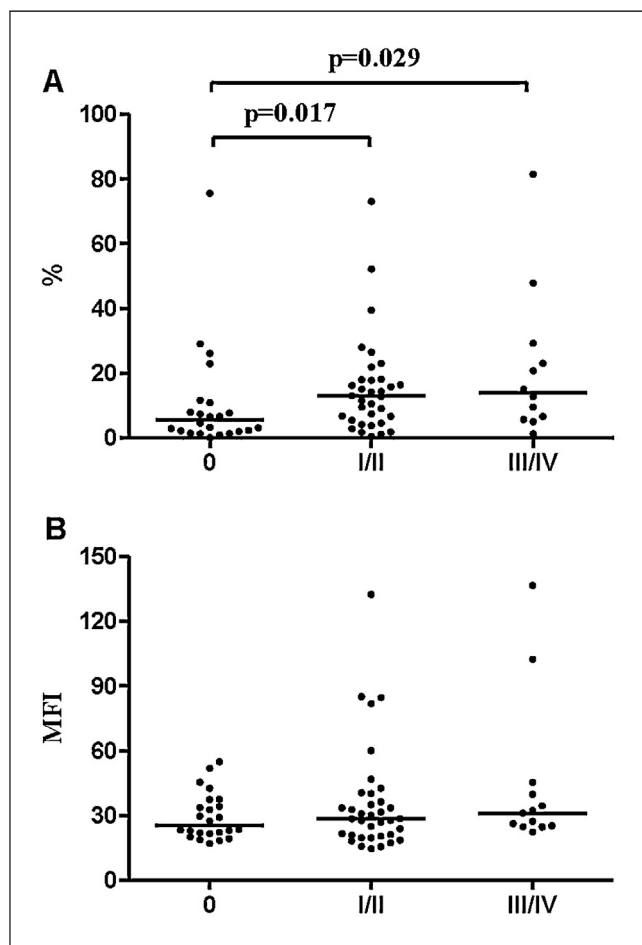
Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono istotnie niższy odsetek limfocytów B CD19+ z ekspresją cząsteczki CD1d u chorych na PBL w porównaniu z grupą kontrolną ($p = 0,0001$) ([Tab. 1](#)). Podobnie, średnia intensywność fluorescencji u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową była istotnie niższa w porównaniu z grupą zdrowych dawców ($p = 0,046$) ([Tab. 1](#)). Na [rycynie 2](#) przedstawiono przykładowe obrazy z cytometru przepływowego z różną ekspresją cząsteczki CD1d u 3 chorych z PBL oraz 1 zdrowego dawcy.

Obserwowano niewielkie zróżnicowanie ekspresji CD1d na limfocytach B osób zdrowych. Natomiast w grupie chorych na PBL ekspresja CD1d była znacznie zróżnicowana. Wykazano istotnie niższą ekspresję tej cząsteczki u chorych będących w stadium 0 według Rai (mediana: 5,50%) w porównaniu z chorymi w stadium I-II (mediana: 13,01%)



Ryc. 2 – Przykładowy obraz z cytometru przepływowego przedstawiający ekspresję cząsteczki CD1d na limfocytach CD19+ u 3 pacjentów z PBL i 1 osoby zdrowej

Fig. 2 – The dot plots show representative data 3 CLL patients and 1 healthy control, illustrating the CD1d expression on CD19+ cells



Ryc. 3 – Ekspresja CD1d na limfocytach B chorych znajdujących się w różnych stadiach zaawansowania wg Rai i wsp.

Fig. 3 – CD1d expression on B cells from CLL patients in different stages of disease

($p = 0,017$) i III-IV (mediana: 14,00%) ($p = 0,029$) (Ryc. 3A). Średnia intensywność fluorescencji była niższa w grupie niskiego ryzyka (25,55 MFI) w porównaniu z grupą pośredniego ryzyka (28,64 MFI) i grupą wysokiego ryzyka (31,19 MFI). Jednak różnica nie była istotna statystycznie (rycina 3B). W przeprowadzonych badaniach wykazano również istotną zależność pomiędzy błonową ekspresją cząsteczki CD1d a liczbą leukocytów krwi obwodowej (WBC) ($R = 0,296$; $p < 0,05$).

Stwierdzono, że odsetek komórek B19+ z błonową ekspresją cząsteczki CD1d jest istotnie wyższy u chorych z ekspresją ZAP-70 (mediana: 16,33%) w porównaniu z chorymi ZAP-70-negatywnymi (mediana: 7,04%) ($p = 0,0009$) (Ryc. 4A). Podobnie MFI CD1d na limfocytach B w grupie chorych ZAP-70+ (mediana: 32,75 MFI) było istotnie wyższe w porównaniu z grupą chorych ZAP-70- (mediana: 28,15) ($p = 0,012$) (Ryc. 4B). Dodatkowo, obserwowano istotnie wyższy odsetek komórek CD19+/CD1d+ wśród chorych na PBL z dodatnią ekspresją antygenu CD38 (mediana: 17,03%) w porównaniu z grupą CD38- (mediana: 6,80%) ($p = 0,0001$) (Ryc. 5A). Również średnia intensywność fluorescencji CD1d

była wyższa u chorych CD38+ (mediana: 30,15 MFI) niż u CD38- (mediana: 27,59 MFI), jednak różnica nie była istotna statystycznie ($p = 0,053$) (Ryc. 5B).

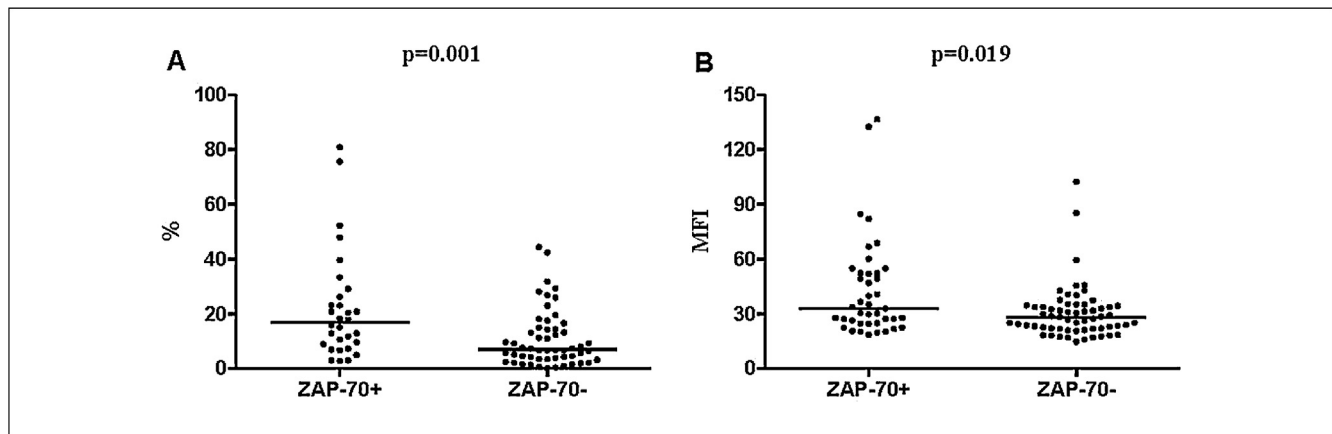
Stwierdzono odwrotną zależność między odsetkiem komórek CD19+/CD1d+ a odsetkiem komórek iNKT ($R = -2,236$; $p < 0,05$). Przeprowadzone badania wykazały istotnie niższy odsetek komórek iNKT u chorych na PBL (mediana: 0,52%) niż u zdrowych dawców (mediana 0,83%) ($p < 0,001$). Ponadto, przypadki PBL z bardzo niskim odsetkiem komórek CD19+/CD1d+ ($< 10\%$) odznaczały się istotnie niższym ($p = 0,01$) odsetkiem komórek iNKT (mediana: 0,53%) w porównaniu z pacjentami, u których odsetek komórek CD19+/CD1d+ był powyżej 10% (mediana: 0,82%).

Omówienie

Od wielu lat przedmiotem zainteresowań badaczy jest poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój chorób nowotworowych. Ostatnie lata przyniosły znaczną liczbę publikacji na temat komórek NKT oraz ich aktywacji przez komórki CD1d+, prezentujących antygeny o charakterze lipidów i glikosfingolipidów. Aktywowanym komórkom NKT przypisuje się ważną funkcję w niszczeniu komórek nowotworowych. Jest prawdopodobne, że komórki nowotworowe mające antygen CD1d mogą prezentować antygeny lipidowe (również nowotworowe) bezpośrednio komórkom NKT. Stwierdzono jednak, że nie wszystkie komórki białaczkowe wykazują ekspresję CD1d [16]. Ponadto stwierdzono, że pacjenci z różnego typu nowotworami wykazują istotnie zmniejszoną liczbę krążących komórek NKT. Niewiele jest jednak doniesień na temat liczby i roli komórek NKT oraz ekspresji cząsteczki CD1d w PBL. Przeprowadzone badania wykazały istotnie niższą ekspresję cząsteczki CD1d u chorych na PBL w porównaniu z grupą kontrolną. W dotychczasowych badaniach potwierdzono obecność cząsteczki CD1d na powierzchni komórek nowotworowych w AML, M4, M5, MLL, a także w CLL [17]. Fais i wsp. wykazali niższą ekspresję CD1d na komórkach CLL w porównaniu z grupą kontrolną oraz obserwowali homogeną ekspresję CD1d na limfocytach B osób zdrowych [18].

Większość informacji na temat CD1d pochodzi z badań na myszach, jednak funkcja tej cząsteczki u ludzi jest bardzo podobna [8]. Opublikowano wiele prac, na podstawie których stwierdzono, że u myszy z obniżoną ekspresją cząsteczki CD1d nie dochodzi do aktywacji komórek NKT. Z innych badań wynika, że w obecności komórek CD1d+ prezentujących α -GalCer prawie zawsze dochodzi do pobudzenia komórek NKT. Prowadzono również badania oceniające związek między ekspresją CD1d a zdolnością komórek NKT do wydzielania IL-4, IFN- γ i TNF. Wykazano, że dodanie do hodowli przeciwciał anti-CD1d zmniejsza wydzielanie wymienionych cytokin przez komórki NKT [8, 19]. Fais i wsp. [18], oceniając komórki NKT i ekspresję cząsteczki CD1d u chorych na PBL, nie wykazali zależności pomiędzy ekspresją CD1d na limfocytach 19+ a zdolnością komórek NKT do indukcji apoptozy limfocytów białaczkowych. Autorzy sugerują, że może to wynikać z heterogenicznej ekspresji cząsteczki CD1d na komórkach białaczkowych [20, 21].

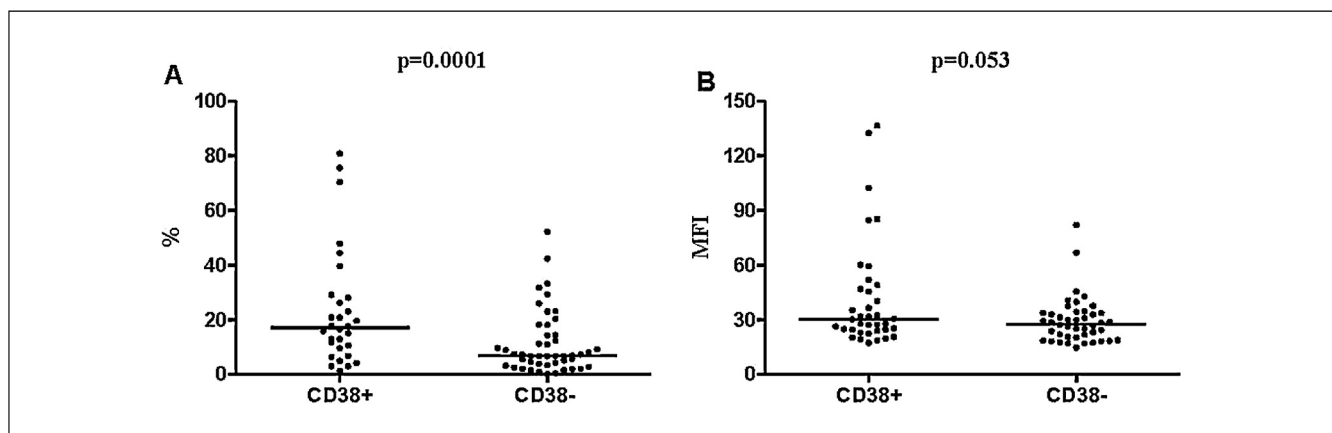
W przeprowadzonych badaniach obserwowano istotne zróżnicowanie ekspresji CD1d w zależności od stadium



Ryc. 4 – Ekspresja CD1d na limfocytach B pacjentów ZAP-70-pozytywnych i ZAP-70-negatywnych
 Fig. 4 – CD1d expression on B cells from ZAP-70-positive and ZAP-70-negative patients

zaawansowania klinicznego choroby, a także istotnie wyższy odsetek komórek 19+/CD1d+ u chorych z ekspresją CD38 oraz ZAP-70 w porównaniu z chorymi CD38-negatywnymi czy ZAP-70-negatywnymi. Ekspresja wewnątrzkomórkowego białka ZAP-70 jest jednym z najważniejszych czynników prognostycznych w PBL, korelującym z aktywnością choroby i czasem przeżycia chorych [22, 23]. W licznych badaniach wykazano ścisłą zależność pomiędzy ekspresją ZAP-70 a ekspresją antygeny CD38 [24]. Wysoka ekspresja antygeny CD38 na komórkach białaczkowych wiąże się z bardziej agresywnym przebiegiem klinicznym i krótszym czasem przeżycia chorych na PBL. Pomimo że ekspresja ZAP-70 znacznie silniej koreluje ze stanem mutacji genów IgV_H wiele badań wskazuje, że ekspresje ZAP-70 i CD38 stanowią wzajemnie uzupełniające się informacje prognostyczne, co pozwala na wyodrębnienie chorych o dobrym, pośrednim i złym rokowaniu [25, 26]. W przeprowadzonych badaniach obserwowano istotnie wyższą ekspresję cząsteczki CD1d u pacjentów ZAP-70+, CD38+, a także w grupie wysokiego ryzyka (st. III/IV wg Rai). W wielu badaniach wykazano brak lub zmniejszoną ekspresję cząsteczek MHC klasy I na komórkach nowotworowych. Jest to jeden z mechanizmów ucieczki nowotworów przed odpowiedzią immunologiczną

gospodarza. Jednak wyniki ostatnich badań nie potwierdzają jednoznacznie zależności między ekspresją cząsteczek MHC a złośliwością nowotworu. Warto zwrócić uwagę, że o ile ekspresja cząsteczek MHC na komórkach nowotworowych jest konieczna do rozpoznania ich przez limfocyty T, to brak tych cząsteczek uwrażliwia komórki nowotworowe na aktywność cytotoksyczną komórek NK [27, 28]. Niestety, nie jest znana rola ekspresji cząsteczki niepolimorficznego MHC – CD1d na komórkach nowotworowych. Z jednej strony w przeprowadzonych badaniach obserwowano istotnie niższą ekspresję tej cząsteczki na komórkach białaczkowych w porównaniu z osobami zdrowymi, z drugiej zaś wykazano pozytywną zależność pomiędzy ekspresją CD1d a ekspresją CD38 czy ZAP-70. Być może, obniżona ekspresja cząsteczki CD1d obserwowana u pacjentów z PBL odgrywa ochronną rolę, oszczędzając komórki nowotworowe przed lizą za pośrednictwem komórek NKT. Z drugiej zaś strony wzrost ekspresji CD1d obserwowany w wyższych stadiach zaawansowania choroby oraz u pacjentów CD38+ lub ZAP-70+ sugeruje związek wysokiej ekspresji CD1d z bardziej agresywnym przebiegiem klinicznym PBL. Na uwagę zasługuje również odwrotna zależność między odsetkiem komórek CD19+/CD1d+ a odsetkiem komórek iNKT. Może to mieć istotne



Ryc. 5 – Ekspresja CD1d na limfocytach B pacjentów CD38-pozytywnych i CD38-negatywnych
 Fig. 5 – CD1d expression on B cells from CD38-positive and CD38-negative patients

znaczenie, z uwagi na fakt, że pobudzane komórki NKT są cytotoksyczne dla wielu komórek nowotworowych [29]. Aktywowane komórki NKT wydzielają cytokiny IL-4, IL-5 i IL-10 charakterystyczne dla limfocytów Th2 biorących udział w odpowiedzi humoralnej oraz IFN- γ i TNF, cytokiny charakterystyczne dla limfocytów Th1 biorących udział w odpowiedzi komórkowej. Ponadto, komórki NKT wykazują aktywność cytotoxiczną, ze względu na wysoki poziom perforyny, granzymu B, TRAIL oraz ligandu receptora FAS. Przyczyniają się w ten sposób do eliminacji komórek docelowych [11, 30]. Liczne badania potwierdziły aktywność przeciwnowotworową komórek NKT [31, 32]. Można oczekiwać, że komórki NKT działają cytotoxicznie nie tylko na komórki nowotworowe, ale również w stosunku do monocytów, komórek dendrytycznych czy też prawidłowych limfocytów B wykazujących ekspresję cząsteczki CD1d [18]. Z badań przeprowadzonych na myszach wynika, że do pobudzenia komórek NKT stymulowanych α -galaktozyloceramidem może dochodzić w sposób niezależny od CD1d, co wskazywałoby, że przeciwnowotworowe działanie komórek NKT nie musi być ściśle związane z ekspresją cząsteczki CD1d [31, 33]. Dhodapkar i wsp. [34] wykazali, że w przebiegu niektórych nowotworów z ekspresją CD1d na komórkach nowotworowych liczba i stan funkcjonalny obwodowych NKT nie uległy zaburzeniu. Zauważono również, że po zastosowaniu leczenia z wykorzystaniem α -GalCer komórki nowotworowe z ekspresją CD1d stawały się bardziej wrażliwe na cytotoxiczne działanie komórek NKT [17]. W przeprowadzonych badaniach wykazano również istotną zależność pomiędzy błonową ekspresją cząsteczki CD1d a liczbą WBC. Wydaje się, że wysoka ekspresja CD1d może być związana z promowaniem akumulacji komórek nowotworowych.

Cząsteczki CD1d prawdopodobnie pośredniczą w odpowiedzi immunologicznej przeciw komórkom PBL, a ocena ekspresji CD1d może przyczynić się do dokładniejszej charakterystyki przewlekłej białaczki limfocytowej. Celowa wydaje się ocena zależności między ekspresją CD1d na komórkach PBL a zdolnością komórek NKT do indukcji apoptozy tych komórek. Ponadto, cząsteczka CD1d może mieć potencjalne znaczenie jako marker diagnostyczny, a dokładne poznanie jej funkcji istotnie przyczynić się do dokładniejszej charakterystyki PBL.

Wkład autorów/Authors' contributions

Według kolejności.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Praca wykonana w ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki (NCN) nr N N402 439139 i N N402 351438.

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 ujednoliczonymi 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] Hamblin T. Chronic lymphocytic leukaemia: one disease or two? *Ann Hematol* 2002;81:299–303.
- [2] Mellstedt H, Choudhury A. T and B cells in B-chronic lymphocytic leukemia: Faust, Mephistopheles and the pact with the Devil. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55: 210–220.
- [3] Wierda WG, O'Brien S, Wang X, et al. Characteristics associated with important clinical end points in patients with chronic lymphocytic leukemia at initial treatment. *J Clin Oncol* 2009;27:1637–1643.
- [4] Rai KR, Chiorazzi N. Determining the clinical course and outcome in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:1797–1799.
- [5] Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008;111:5446–5456.
- [6] Liu W, Huber SA. Cross-talk between cd1d-restricted nkt cells and $\gamma\delta$ cells in t regulatory cell response. *Virology* 2011;8:32.
- [7] Speak AO, Cerundolo V, Platt FM. CD1d presentation of glycolipids. *Immunology and Cell Biology* 2008;86:588–597.
- [8] Kościelak J. Komórki NKT, CD1 i lipidy: ostatnio odkryte ramie układu odpornościowego otwiera nowe możliwości leczenia nowotworów i chorób na tle autoimmunologicznym. *Acta Haemat Pol* 2000;31:229–239.
- [9] Brutkiewicz RR. CD1d Ligands: The Good, the Bad, and the Ugly. *J Immunol* 2006;177:769–775.
- [10] Wu D, Xing GW, Poles MA, et al. Bacterial glycolipids and analogs as antigens for CD1d-restricted NKT cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:1351–1356.
- [11] Terabe M, Berzofsky JA. The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv Cancer Res* 2008;101:277–348.
- [12] Kawano T, Cui J, Koezuka Y, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997;278:1626–1629.
- [13] Masaki T, Berzofsky JA. The Role of NKT Cells in Tumor Immunity. *Adv Cancer Res* 2008;101:277–348.
- [14] Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46:219–234.
- [15] Hus I, Podhorecka M, Bojarska-Junak A, et al. The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol* 2006;17: 683–690.

- [16] Yoshida T, Kimura N, Sawada H, et al. CD56+CD7+ stem cell leukemia/lymphoma with D2-Jdelta1 rearrangement. *Intern Med* 1999;38:547-555.
- [17] Metelisa LS. Anti-tumor Potential of Type-I NKT cells against CD1d-positive and CD1d-negative Tumors in Humans. *Clin Immunol* 2011;140:119-129.
- [18] Fais F, Morabito F, Stelitano C, et al. CD1d is expressed on B-chronic lymphocytic leukemia cells and mediates α -galaktozyloceramide presentation to natural killer T lymphocytes. *Int J Cancer* 2004;109:402-411.
- [19] Galli G, Nuti S, Tavarini S, et al. CD1d-restricted help to B cells by human invariant natural killer T lymphocytes. *J Exp Med* 2003;197:1051-1057.
- [20] Renner C, Jung W, Sahin U, et al. The role of lymphocyte subsets and adhesion molecules in T cell-dependent cytotoxicity mediated by CD3 and CD28 bispecific monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 1995;25:2027-2033.
- [21] De Rossi G, Zarcone D, Mauro F, et al. Adhesion molecule expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: malignant cell phenotypes define distinct disease subsets. *Blood* 1993;81:2679-2687.
- [22] Wąsik-Szczepanek E. ZAP-70 i jego rola w nowotworach układu krwiotwórczego. (Significance of ZAP-70 in hematologic malignancies.). *Acta Haemat Pol* 2010;41:239-243.
- [23] Hus I, Dmoszyńska A. ZAP-70 nowy czynnik prognostyczny w przewlekłej białaczce limfocytowej B-komórkowej. *Acta Haemat Pol* 2004;3:311-320.
- [24] Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003;348(18):1764-1775.
- [25] D'Arena G, Tarnani M, Rumi C, et al. Prognostic significance of combined analysis of ZAP-70 and CD38 in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2007;82:787-791.
- [26] Del Principe MI, Del Poeta G, Buccisano F, et al. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;108:853-861.
- [27] Armstrong AC, Eaton D, Ewing JC. Science, medicine, and the future: Cellular immunotherapy for cancer. *BMJ* 2001;323:1289-1293.
- [28] Gumperz JE, Parham P. The enigma of the natural killer cell. *Nature* 1995;378:245-248.
- [29] Nicol A, Nieda M, Koezuka Y, et al. Human invariant α 24+ natural killer T cells activated by α -galactosylceramide (KRN7000) have cytotoxic anti-tumour activity through mechanisms distinct from T cells and natural killer cells. *Immunology* 2000;99:229-234.
- [30] Wu L, Gabriel CL, Parekh VV, Van Kaer L. Invariant natural killer T cells: innate-like T cells with potent immunomodulatory activities. *Tissue Antigens* 2009;73:535-545.
- [31] Smyth MJ, Thia KY, Street SE, et al. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 2000;191:661-668.
- [32] Toura I, Kawano T, Akutsu Y, et al. Cutting edge: inhibition of experimental tumor metastasis by dendritic cells pulsed with α -galactosylceramide. *J Immunol* 1999;163:2387-2391.
- [33] Miyagi T, Takehara T, Tatsumi T, et al. CD1d-mediated stimulation of natural killer T cells selectively activates hepatic natural killer cells to eliminate experimentally disseminated hepatoma cells in murine liver. *Int J Cancer* 2003;106:81-89.
- [34] Dhodapkar KM, Cirignano B, Chamian F, et al. Invariant natural killer T cells are preserved in patients with glioma and exhibit anti-tumor lytic activity following dendritic cell-mediated expansion. *Int J Cancer* 2004;109:893-899.