

# CORRELATION OF REGULATORY T CELLS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA CHARACTERIZED BY HIGH-AFFINITY CD25 EXPRESSION WITH SERUM IL-2 VALUES, IGVH MUTATIONAL STATUS, RAI STAGE, AND THERAPEUTIC LINES

*Corelația celulelor T de reglementare din leucemia limfocitară cronică caracterizate prin expresia cu afinitate ridicată CD25 cu valorile IL-2 serice, status mutațional IGVH, stadiul Rai și linii terapeutice*

Georgiana Ene<sup>1</sup>, Ion Dumitru<sup>1</sup>, Horia Bumbea<sup>1,2</sup>, Minodora Onisâi<sup>1,2</sup>, Ana-Maria Vlădăreanu<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Clinica de Hematologie, Spitalul Universitar de Urgență, București, România

<sup>2</sup> Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București, România

## ABSTRACT

The impact of the importance of regulatory T cells (Treg) in chronic lymphocytic leukemia (CLL) is still controversial and no consensus has been reached on whether the effects generated by these cells are positive or negative in terms of tumor progression. Regulatory T cells comprise subsets of cells with distinct phenotypic and functional properties that may influence CLL prognosis. CD4 + Treg cells expressing the IL-2R $\alpha$  (CD25) play a vital role in the control of adaptive immune responses, in disorders of Treg cell function and frequency in patients with immune conditions.

**Objective.** In our study that included 51 patients with CLL we tried to investigate these hypotheses and assess whether there is a correlation between serum elevated IL-2 levels and IGVH status, Rai stage, therapeutic lines or are independent risk factors.

**Materials and methods.** The study was performed on a group of 51 female and male patients diagnosed with chronic lymphocytic leukemia, registered by the Hematology Clinic of the University Emergency Hospital of Bucharest, between October 2013 and November 2019. In the study, patients were evaluated clinically and paraclinically both at the time of diagnosis and in dynamics, after specific treatment, until the end of the study, death or loss of evidence.

**Results.** The study did not reveal a positive correlation between CD25 expression of regulatory CD4 + T cells with serum IL-2 values, IGVH status, Rai stage or therapeutic lines.

**Discussion.** The limits of the study are the relatively small group of subjects because chronic lymphocytic leukemia is a rare hematological pathology and the fact that the subjects included in the study are not followed for a longer period of time.

**Conclusions.** The Treg identification strategy by expression CD25 high does not find a statistically significant correlation with the serum level of IL-2 and is independent of the Rai stage, the risk groups or the chemotherapy history of the patients.

**Keywords:** regulatory T cells, IL-2, CD25, chronic lymphocytic leukemia

## REZUMAT

**Introducere.** Impactul importanței celulelor T de reglementare (Treg) în leucemia limfocitară cronică (LLC) este încă controversat și nu s-a ajuns la un consens dacă efectele generate de aceste celule sunt pozitive sau negative din perspectiva progresiei tumorale. Celulele T de reglementare cuprind subseturi de celule cu însușiri fenotipice și funcționale distincte care pot influența prognosticul LLC. Celulele Treg CD4+ care exprimă lanțul IL-2R $\alpha$  (CD25) joacă un rol vital în controlul răspunsurilor imune adaptative, în tulburări ale funcției și frecvenței celulelor Treg la pacienții cu condiții imune.

**Obiectiv.** În studiul nostru, care a inclus 51 de pacienți cu LLC, am încercat să cercetăm aceste ipoteze și să evaluăm dacă există corelație între expresia CD25 și nivelurile serice crescute ale receptorului solubil IL-2, statusul IGVH, stadiul Rai, linii terapeutice sau sunt factori independenți de risc.

**Materiale și metode.** Studiul a fost efectuat pe un lot de 51 de pacienți de sex feminin și masculin, diagnosticați cu leucemie limfocitară cronică, aflați în evidența Clinicii de Hematologie a Spitalului Universitar de Urgență București, în perioada octombrie 2013 – noiembrie 2019. În cadrul studiului, pacienții au fost evaluați clinic și paraclinic atât la momentul diagnosticului, cât și în dinamică, după tratamentul specific, până la momentul încheierii studiului, deces sau pierderea din evidență.

**Rezultate.** În urma studiului, nu s-a decelat o corelație pozitivă între expresia CD25 a celulelor T CD4+ de reglementare cu valorile serice IL-2, status IGVH, stadiul Rai sau liniile terapeutice.

Discuții. Limitele studiului sunt lotul relativ mic de subiecți deoarece leucemia limfocitară cronică este o patologie hematologică rară și faptul că subiecții incluși în studiu nu sunt urmăriți pe o perioadă mai lungă de timp.

**Concluzii.** Strategia de identificare Treg prin CD25 high nu găsește corelație semnificativă statistic cu nivelul seric al IL-2 și este independentă de stadiul Rai, grupele de risc sau istoricul chimioterapic al pacienților.

**Cuvinte cheie:** celule T de reglementare, IL-2, CD25, leucemie limfocitară cronică

## INTRODUCERE

Celulele T de reglementare constituie o subpopulație de dimensiuni reduse a celulelor T CD4+, reprezentând circa 1-4% dintre limfocitele CD4+ circulante la om [1]. Ele au fost pentru prima dată descrise în 1995 de către Sakaguchi și colab. și de atunci rolul fiziologic al acestor celule, precum și funcția lor în condiții homeostatice sau patologice a stârnit interesul cercetătorilor [2]. Inițial, celulele Treg au fost definite prin expresia CD4 și CD25, dar, în ultimul deceniu, pentru o mai bună identificare și caracterizare a lor, se asociază și cu expresia altor molecule precum CTLA-4 (proteina 4 asociată cu limfocitele T citotoxice), GITR (glucocorticoid indus de proteina TNFR) [2]. De la prima descriere a acestor celule, în 1995, de-a lungul anilor, au fost propuși mai mulți markeri care să fie caracteristici celulelor Treg, însă până în prezent un marker specific pentru Treg uman nu a fost clar definit [3]. CD25 și FOXP3 rămân markerii cel mai frecvent utilizați în fenotipul Treg umane, deși nu sunt exclusiv markeri specifici Treg.

În general, celulele Treg umane au fost dificil de studiat din două motive. În primul rând, ele reprezintă un subgrup minoritar de celule T CD4+ (aproximativ 5%) și nu sunt suficient disponibile din punct de vedere numeric pentru examinări extinse [3,4]. În al doilea rând, acestea nu au un marker fenotipic specific care să le confirme identitatea și să faciliteze izolarea și caracterizarea lor [3].

Citokinele sunt necesare homeostaziei celulelor Treg, iar IL-2 este o citokină esențială a micromediului, prin rolul ei de activare a mai multor tipuri de celule imune. În 1976, a fost identificată interleukina-2 ca factor de creștere pentru limfocitele T [5] și, deși au trecut mulți ani de atunci, funcția ei în fiziologia sistemului imunitar a rămas enigmatică [6]. IL-2 acționează asupra dezvoltării, creșterii și activității limfocitelor T, B și celulelor NK și este necesară funcției celulelor Treg deoarece, în absența acesteia, celulele Treg nu

reuesc să suprimă proliferarea celulelor T [6]. Celulele Treg depind de IL-2 pentru funcția de supresie, creștere și dezvoltare, iar, în momentul în care concentrația de IL-2 scade, citokina IL-2 își însușește funcția de stimulare în dezvoltarea, funcționarea și homeostazia celulelor Treg. Gradul de disponibilitate a IL-2 pentru celulele imune variază în funcție de stadiul bolii și de tipul de tumoare. Concentrațiile de IL-2 din micromediu sunt dependente de limfocitele acumulate *in situ*, de activarea și numărul lor [7].

Celulele T de reglementare exprimă niveluri ridicate de IL-2R (CD25), iar IL-2 este una dintre citokinele cheie care, datorită receptorului său CD25, ajută la proliferarea celulelor Treg, însă rolul IL-2 în biologia Treg nu este clar deslușit. O mare parte dintre celulele Treg exprimă receptorul lanțului alfa (CD25) al receptorului de interleukină 2 (IL-2R), expresia CD25 fiind strâns legată de semnalizarea IL-2.

Țintirea celulelor Treg cu chimioterapie este o abordare neselectivă și generală, astfel încât este necesară o alternativă terapeutică mai precisă și mai specifică celulelor Treg. Imunoterapia reprezintă o strategie terapeutică care încearcă să vizeze într-un mod particular celulele Treg. Un exemplu de imunoterapie îl reprezintă CD25, care, deși nu caracterizează complet celulele Treg, ar putea reprezenta o opțiune mai bună decât chimioterapia. Efectul administrării unui anticorp anti-CD25 care descrește semnificativ frecvențele celulelor Treg și, în același timp, îmbunătățește imunitatea a fost pentru prima dată demonstrat la modelul murinic [8-10]. În timp ce acțiunea terapeutică asupra CD25 reduce celulele Treg, administrarea de IL-2 la pacienții cu tumori generează un efect opus [2].

## MATERIALE ȘI METODĂ

Prezentul studiu este de tip caz-martor și este parte a tezei de doctorat a autorului. Scopul acestui studiu a fost să cercetăm rolul celulelor Treg CD4+ care exprimă lanțul IL-2R $\alpha$  (CD25) la pacienții cu

LLC, deoarece tot mai multe studii au evidențiat tulburări ale funcției și frecvenței celulelor Treg la pacienții cu condiții imune, alergii [21], și să evaluăm dacă există corelație între nivelurile crescute de IL-2 și statusul IGHV, stadiul Rai, linii terapeutice sau sunt factori independenți de risc.

Studiul a fost efectuat pe un lot de 51 de pacienți de sex feminin și masculin, diagnosticați cu leucemie limfocitară cronică, aflați în evidența Clinicii de Hematologie a Spitalului Universitar de Urgență București, în perioada octombrie 2013 – noiembrie 2019. În cadrul studiului, pacienții au fost evaluați clinic și paraclinic atât la momentul diagnosticului, cât și în dinamică, după tratamentul specific, până la momentul încheierii studiului, deces sau pierderea din evidență.

Diagnosticul a necesitat o abordare complexă a pacientului: examen clinic, evaluarea parametrilor biologici, analiză flowcitometrică și teste de biologie moleculară. Analiza citogenetică a statusului IGHV prin tehnica convențională și prin tehnica FISH a fost posibilă pentru tot lotul de pacienți. Pacienții cu LLC care au exprimat clone IGHV care diferă cu 2% sau mai mult de cea mai similară genă de linie germinală au fost definiți ca LLC cu status IGHV mutant, iar cei cu diferență sub 2% ca LLC cu status nonmutant. Conform literaturii, pacienții cu LLC fără mutație în genele IGHV prezintă un prognostic clinic mai nefavorabil [22].

În cadrul studiului, au fost incluși subiecți cu vârsta peste 18 ani, la care diagnosticul de LLC a fost stabilit prin imunofenotipare și la care s-a obținut consimțământul informat al pacientului și accesul la istoricul medical. De asemenea, studierea celulelor T de reglementare a fost efectuată la toți pacienții prin imunofenotipare folosindu-se platforma Beckman Coulter Gallios, cu 3 lasere și 10 culori. Anticorpii monoclonali utilizați au fost kiturile Beckman Coulter – DuraClone IM Treg (ref B53346), iar setarea canalelor de fluorescență a fost realizată folosind protocolul Harmonemia.

Stadializarea Rai este folosită în evaluarea pacienților cu LLC și se bazează pe examenul fizic și parametrii sanguini (prezența anemiei sau trombocitopeniei), pentru a evalua gradul încărcăturii tumorale. Clasificarea Rai stratifică pacienții în 3 grupe de risc: risc scăzut (stadiul Rai 0), risc intermediar (stadiul Rai I-II), risc crescut (stadiul Rai III-IV). Lotul de pacienți din studiu a fost subîmpărțit în alte 2 stadii: avansat – risc înalt (include stadiile III și IV Rai) – și stadiul precoce – risc scăzut și intermediar (include stadiile 0, I și II Rai).

În ceea ce privește conduita terapeutică, pacienții au beneficiat de una sau mai multe scheme terapeutice,

indicația de tratament fiind stabilită conform criteriilor grupurilor de lucru pentru LLC (NCI și IWCLL).

## REZULTATE

În concordanță cu datele din literatură [11], media valorilor IL-2 în lotul pacienților cu LLC este crescută de x 3,5 ori față de limita superioară (interval normalitate 158-623 kU/l), inclusiv intervalul de 25% din valorile inferioare se plasează peste limita normală (656 kU/l) (tabel 1).

**TABEL 1.** Valoarea serică receptor solubil IL-2 la pacienți diagnosticați cu LLC

Obs	Total	Mean	Variance	Std Dev
51	112788.0000	2211.5294	7283339.3341	2698.7663

Minimum	25%	Median	75%	Maximum	Mode
240.0000	656.0000	1053.0000	2572.0000	11159.0000	861.0000

Cu toate că nivelurile serice de IL-2 sunt crescute în lotul de pacienți cu LLC, o corelație cu expresia receptorului său CD25 nu a fost găsită. Între cei doi markeri nu s-a observat nicio corelație, nici Pearson, nici Spearman (tabelele 2 și 3).

**TABEL 2.** Corelații Pearson

		REC SOL IL-2	Th CD25high
REC SOL IL-2	Pearson Correlation	1	-.060
	Sig. (2-tailed)		.675
	N	51	51
Th CD25high	Pearson Correlation	-.060	1
	Sig. (2-tailed)	.675	
	N	51	51

**TABEL 3.** Corelații Spearman

		REC SOL IL-2	Th CD25high	
Spearman's rho	REC SOL IL-2	Correlation Coefficient	1.000	.057
		Sig. (2-tailed)	.	.689
		N	51	51
	Th CD25high	Correlation Coefficient	.057	1.000
		Sig. (2-tailed)	.689	.
		N	51	51

De asemenea, nivelul seric de IL-2, în funcție de clasificarea Rai, nu este factor de prognostic negativ per total sau pe grupe de risc precoce/avansat.

După cum se observă, cu toate că, aparent, există o corelație între toate variantele de status IGHV și nivelul receptorului solubil de IL-2 ( $p = 0,0134$ ), comparat strict cu cele două subtipuri de status

**TABEL 4.** Corelație între valoarea serică a receptorului solubil de IL-2 și stadiul Rai precoce/avansat la înrolare în studiu

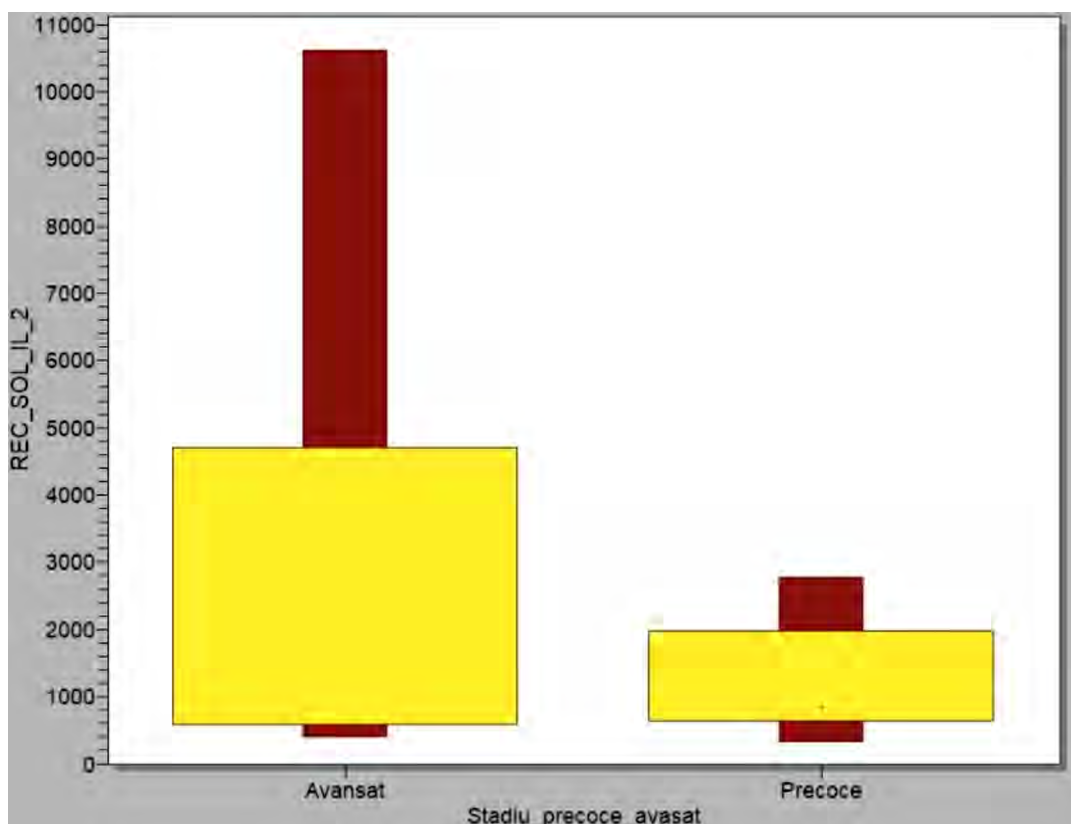
	Obs	Total	Mean	Variance	Std Dev
Avansat	16	59211.0000	3700.6875	15570289.0292	3945.9206
Precoce	34	45909.0000	1350.2647	1216293.2308	1102.8568

	Minimum	25%	Median	75%	Maximum	Mode
Avansat	384.0000	685.5000	1892.5000	6830.0000	11159.0000	384.0000
Precoce	240.0000	656.0000	861.0000	2074.0000	5563.0000	861.0000

Mann-Whitney/Wilcoxon Two-Sample Test  
(Kruskal-Wallis test for two groups)

Kruskal-Wallis H (equivalent to Chi square) =	2.6316
Degrees of freedom =	1
P value =	0.1048

**FIGURA 1.** Reprezentare grafică corelație între valoare serică receptor solubil de IL-2 și stadiul Rai precoce/avansat la înrolare în studiu**TABEL 5.** Comparație între valoarea serică a receptorului solubil IL-2 și status IGHV mutant și nonmutant

	Obs	Total	Mean	Variance	Std Dev
mutant	17.0000	32137.0000	1890.4118	6435865.1324	2536.9007
nonmutant	23.0000	66819.0000	2905.1739	9714019.4229	3116.7322

	Minimum	25%	Median	75%	Maximum	Mode
mutant	360.0000	592.0000	1206.0000	2134.0000	11159.0000	360.0000
nonmutant	571.0000	775.0000	1651.0000	3434.0000	10476.0000	571.0000

Mann-Whitney/Wilcoxon Two-Sample Test  
(Kruskal-Wallis test for two groups)

Kruskal-Wallis H (equivalent to Chi square) =	1.6186
Degrees of freedom =	1
P value =	0.2033

**TABEL 6.** Comparație între valoarea serică a receptorului solubil IL-2 și status IGHV

	Obs	Total	Mean	Variance	Std Dev
borderline	3.0000	9052.0000	3017.3333	5640886.3333	2375.0550
invalid	1.0000	800.0000	800.0000	NaN	NaN
mutant	17.0000	32137.0000	1890.4118	6435865.1324	2536.9007
nonmutant	23.0000	66819.0000	2905.1739	9714019.4229	3116.7322
policlonal	7.0000	3980.0000	568.5714	91351.6190	302.2443

	Minimum	25%	Median	75%	Maximum	Mode
borderline	861.0000	861.0000	2628.0000	5563.0000	5563.0000	861.0000
invalid	800.0000	800.0000	800.0000	800.0000	800.0000	800.0000
mutant	360.0000	592.0000	1206.0000	2134.0000	11159.0000	360.0000
nonmutant	571.0000	775.0000	1651.0000	3434.0000	10476.0000	571.0000
policlonal	240.0000	351.0000	509.0000	733.0000	1154.0000	240.0000

Mann-Whitney/Wilcoxon Two-Sample Test  
(Kruskal-Wallis test for two groups)

Kruskal-Wallis H (equivalent to Chi square) =	12.5971
Degrees of freedom =	4
P value =	0.0134

IGHV semnificative clinic (mutant, nonmutant), nu se observă o corelare statistică ( $p = 0,2033$ ), ca atare sunt doi factori de risc independenți.

Este posibil să existe o corelație între cele 3 variante remanente (borderline, invalid, policlonal) și nivelul IL-2, însă din cauza numărului mic de astfel de variante în lot nu s-a putut valida acest lucru. Chiar dacă această ipoteză s-ar valida, din punct de vedere clinic nu ar aduce beneficii ca factor de prognostic.

De asemenea, nici atitudinea terapeutică anterioară (naivi/chimiotratat), inclusiv sub terapie activă chimioterapică, nu influențează nivelul seric al citokinei IL-2 și nu se corelează ca factor de prognostic sau ca răspuns la tratament (tabel 7).

Comparând lotul de pacienți cu LLC versus lotul martor (tabel 8), în ceea ce privește valoarea expresiei CD25, se observă că mediana grupului de pacienți este 87%, iar mediana în grupul martor este de 73%, însă fără să aibă semnificație statistică.

În urma analizei expresiei de înaltă afinitate a celulelor T de reglementare (Th CD25high) atât prin prisma valorii procentuale, cât și a valorii absolute, între lotul martor și lot pacient nu s-a găsit o corelație care să fie semnificativă din punct de vedere statistic.

Valorile totale ale markerului CD25high, în funcție de clasificarea Rai, în lotul analizat nu reprezintă factor de prognostic negativ per total sau pe grupe de risc precoce/avansat, contrar datelor din literatură.

De asemenea, nici atitudinea terapeutică anterioară (naivi/chimiotratat), inclusiv pacienți aflați sub terapie activă chimioterapică, nu influențează valorile totale CD25. Concluzia fiind că expresia CD25 nu se corelează ca factor de prognostic sau ca răspuns la tratament.

**TABEL 7.** Corelație între valoarea serică receptor solubil de IL-2 și status pacienți aflați sub tratament activ sau nu la înrolare în studiu

	Obs	Total	Mean	Variance	Std Dev
DA	17	41393.0000	2434.8824	9482028.3603	3079.2902
NU	34	71395.0000	2099.8529	6399466.8565	2529.7168

	Minimum	25%	Median	75%	Maximum	Mode
DA	240.0000	800.0000	1201.0000	2396.0000	11159.0000	240.0000
NU	351.0000	592.0000	906.0000	2628.0000	10476.0000	351.0000

Mann-Whitney/Wilcoxon Two-Sample Test  
(Kruskal-Wallis test for two groups)

Kruskal-Wallis H (equivalent to Chi square) =	.4217
Degrees of freedom =	1
P value =	0.5161

**TABEL 8.** Compararea expresiei Th CD25high (valoare absolută) între lotul martor și lotul de pacienți

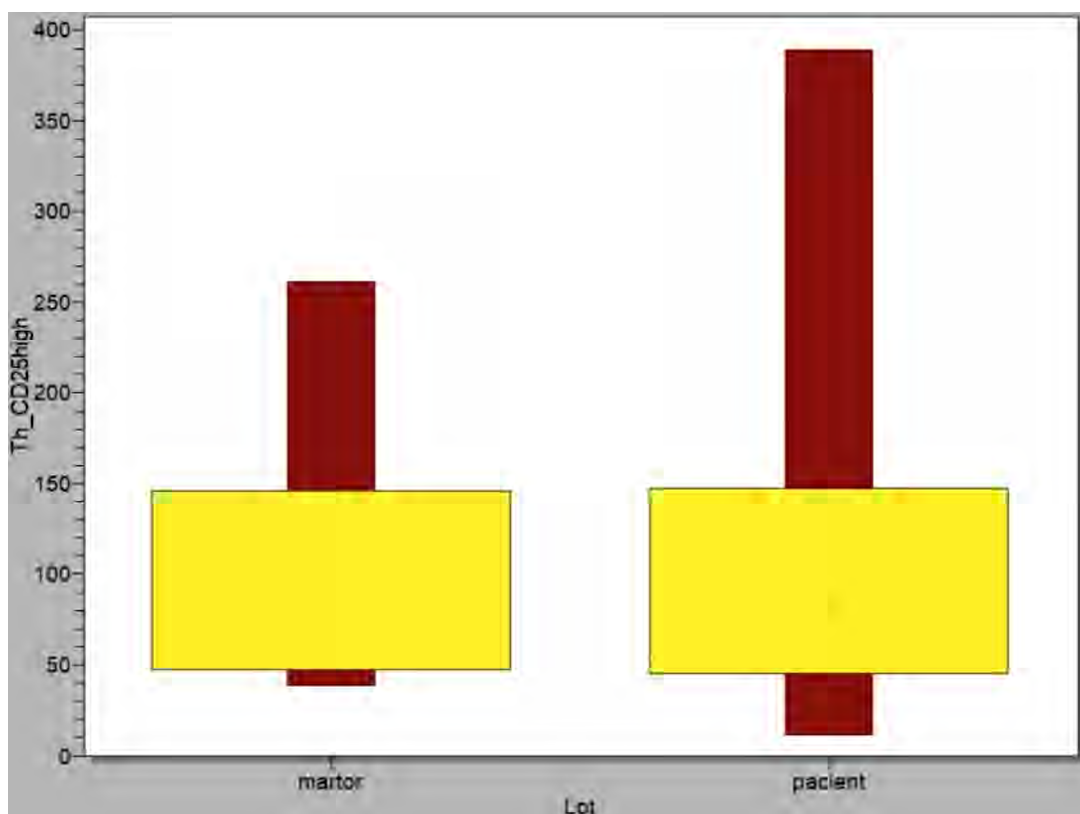
	Obs	Total	Mean	Variance	Std Dev
martor	10	1148.0000	114.8000	7643.7333	87.4284
pacient	51	9578.0000	187.8039	319573.3208	565.3082

	Minimum	25%	Median	75%	Maximum	Mode
martor	38.0000	51.0000	73.5000	154.0000	287.0000	38.0000
pacient	9.0000	44.0000	87.0000	148.0000	4093.0000	21.0000

Mann-Whitney/Wilcoxon Two-Sample Test  
(Kruskal-Wallis test for two groups)

Kruskal-Wallis H (equivalent to Chi square) =	.0692
Degrees of freedom =	1
P value =	0.7925



**FIGURA 2.** Reprezentare grafică comparație expresie Th CD25 high între lotul martor și lotul de pacienți

**TABEL 9.** Compararea expresiei Th CD25high (valoare procentuală) între lotul martor și lotul de pacienți

	Obs	Total	Mean	Variance	Std Dev
martor	10	13.2902	1.3290	1.2028	1.0967
pacient	51	126.6337	2.4830	38.5921	6.2123

	Minimum	25%	Median	75%	Maximum	Mode
martor	0.2270	0.5754	1.0536	2.0199	3.6823	0.2270
pacient	0.1668	0.7014	1.2541	2.3661	45.0771	0.1668

Mann-Whitney/Wilcoxon Two-Sample Test  
(Kruskal-Wallis test for two groups)

Kruskal-Wallis H (equivalent to Chi square) =	.7685
Degrees of freedom =	1
P value =	0.3807

**TABEL 10.** Corelație între expresia Th CD25 high și stadiul Rai la înrolarea în studiu

	Obs	Total	Mean	Variance	Std Dev
0	15	1819.0000	121.2667	6809.3524	82.5188
1	7	964.0000	137.7143	16992.9048	130.3568
2	12	838.0000	69.8333	2157.6061	46.4500
3	3	410.0000	136.6667	5756.3333	75.8705
4	13	5516.0000	424.3077	1227965.0641	1108.1359

	Minimum	25%	Median	75%	Maximum	Mode
0	10.0000	47.0000	102.0000	182.0000	290.0000	10.0000
1	26.0000	72.0000	113.0000	128.0000	422.0000	26.0000
2	15.0000	41.0000	55.5000	102.0000	182.0000	104.0000
3	87.0000	87.0000	99.0000	224.0000	224.0000	87.0000
4	9.0000	38.0000	121.0000	148.0000	4093.0000	36.0000

Mann-Whitney/Wilcoxon Two-Sample Test  
(Kruskal-Wallis test for two groups)

Kruskal-Wallis H (equivalent to Chi square) =	3.9436
Degrees of freedom =	4
P value =	0.4137

**TABEL 11.** Corelație între expresia Th CD25 high și status pacient cu LLC la înrolare în studiu naiv versus cel puțin o linie de tratament

	Obs	Total	Mean	Variance	Std Dev
DA	29	6992.0000	241.1034	556243.1675	745.8171
NU	22	2586.0000	117.5455	10136.9264	100.6823

	Minimum	25%	Median	75%	Maximum	Mode
DA	9.0000	47.0000	100.0000	124.0000	4093.0000	36.0000
NU	10.0000	40.0000	83.5000	175.0000	422.0000	21.0000

Mann-Whitney/Wilcoxon Two-Sample Test  
(Kruskal-Wallis test for two groups)

Kruskal-Wallis H (equivalent to Chi square) =	.0204
Degrees of freedom =	1
P value =	0.8866

**TABEL 12.** Corelație între expresia Th CD25 high versus status pacient în tratament activ sau nu la înrolare în studiu

	Obs	Total	Mean	Variance	Std Dev
DA	21	6444.0000	306.8571	761650.9286	872.7261
NU	30	3134.0000	104.4667	8263.7057	90.9049

	Minimum	25%	Median	75%	Maximum	Mode
DA	9.0000	68.0000	104.0000	147.0000	4093.0000	36.0000
NU	10.0000	38.0000	82.5000	149.0000	422.0000	21.0000

Mann-Whitney/Wilcoxon Two-Sample Test  
(Kruskal-Wallis test for two groups)

Kruskal-Wallis H (equivalent to Chi square) =	.8267
Degrees of freedom =	1
P value =	0.3632

## DISCUȚII

Dintre citokine, interleukina 2 (IL-2) este necesară funcționării celulelor Treg, iar CD25 este receptorul său la nivel celular. În acest studiu, am

evaluat incidența CD25, am corelat expresia acesteia cu caracteristicile clinice și de laborator disponibile și am încercat să determinăm posibile semnificații prognostice.

Diverse studii au investigat expresia prognostică a expresiei CD25 în LLC, dar rezultatele au fost contradictorii. Unele studii au raportat că subiecții care au prezentat expresia CD25 au avut o evoluție nefavorabilă față de cei cu CD25 negativ [12-14]. Pe de altă parte, în alte studii, CD25 a fost catalogat ca marker de prognostic pozitiv [14-16]. În studiul nostru, expresia CD25 nu a putut fi încadrată ca marker de prognostic. În studiul realizat de Jak și colab., s-a analizat celulele Treg folosind expresia CD4+ CD25brightCD127low și au descoperit o creștere a numărului absolut de celule Treg în LLC și, utilizând clasificarea Rai, au raportat că procentul de celule Treg crește odată cu stadiul bolii [17,18]. Beyer și colab. au folosit expresia CD4+ CD25high pentru a identifica celulele Treg și au descoperit procente crescute de Treg în LLC în comparație cu donatorii sănătoși și au observat o corelație între frecvența Treg și stadiul bolii folosind clasificarea Binet [17,19].

Weiss și colab., folosind expresia CD3+ CD4+ CD25+ CD127- pentru a identifica celulele Treg, au găsit o creștere semnificativă a procentului de Treg la pacienții cu LLC comparativ cu donatorii de control sănătoși. În plus, în studiul efectuat de ei, procentul de celule Treg se corelează cu expresia IgVH nemutantă, expresia crescută a CD38 și cu caracteristici citogenetice specifice. Tot acest grup a mai stabilit că celulele Treg reprezintă un predictor independent în ceea ce privește timpul de inițiere al tratamentului la acești pacienți [17,20].

În studiul nostru, celulele Treg caracterizate de expresia CD4+ CD25high prezintă o creștere sem-

nificativă a valorii procentuale față de lotul martor, însă nu a fost observată nicio corelație cu stadiul bolii folosind clasificarea Rai. În studiul nostru, strategia de identificare Treg prin expresia CD4+ CD25high nu găsește corelație semnificativă statistic cu nivelul seric de IL-2 măsurat la pacienții cu LLC, stadiul Rai, grupele de risc sau istoricul chimioterapic al pacienților. O corelație la limita semnificativă statistică se observă între statusul IGVH și evaluarea nivelului seric de IL-2 pentru toate variantele de validare (borderline, invalid, mutant, nonmutant, policlonal), însă fără a se menține pentru cele 2 variante semnificative clinic (mutant, nonmutant).

## CONCLUZII

Valorile serice ale parametrului IL-2 sunt crescute în lotul de pacienți cu LLC (x 3,5 ori față de limita superioară), însă o corelație cu expresia receptorului său CD25 nu a fost găsită. De menționat că valorile serice ale parametrului IL-2 în funcție de clasificarea Rai per total sau pe grupe de risc precoce/avansat nu reprezintă factor de prognostic negativ, iar chimioterapia nu a influențat nivelul seric al IL-2 și, de asemenea, expresia CD25 nu se corelează ca factor de prognostic sau ca răspuns la tratament.

Expresia cu afinitate ridicată CD25 (receptor IL-2) a celulelor T de reglementare din leucemia limfocitară cronică nu se corelează cu valorile IL-2 serice și este independentă de statusul mutațional IGVH, stadiul Rai sau linii terapeutice.

## BIBLIOGRAFIE

- D'Arena G, Vitale C, Coscia M, Festa A et al. Regulatory T Cells and Their Prognostic Relevance in Hematologic Malignancies. *Hindawi Journal of Immunology Research*. 2017;1832968.
- Beyer M, Schultze JL. Regulatory T Cells: Major Players in the Tumor Microenvironment. *Current Pharmaceutical Design*. 2009; 15(16):1879-1892.
- Whiteside TL. The role of regulatory T cells in cancer immunology. *ImmunoTargets and Therapy* 2015;4:159-171.
- Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25 high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2001; 167:1245-1253.
- Kuziel WA, Greene WC. Interleukin-2 and the IL-2 Receptor: New Insight Into Structure and Function. *Journal of Investigative Dermatology*. 1990;94(6):s27-s32.
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cell. *Nature Immunology*. 2005;6(11).
- Whiteside TL. Induced regulatory T cells in inhibitory microenvironments created by cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2014; 14(10):1411-1425.
- Prasad SJ, Farrand KJ, Matthews SA, Chang JH, McHugh RS, Ronchese F. Dendritic cells loaded with stressed tumor cells elicit long-lasting protective tumor immunity in mice depleted of cd4+cd25+ regulatory t cells. *J Immunol*. 2005;174:90-8.
- Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing cd25+cd4+ t cells: A common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol*. 1999;163:5211-8.
- Tanaka H, Tanaka J, Kjaergaard J, Shu S. Depletion of cd4+ cd25+ regulatory cells augments the generation of specific immune t cells in tumor-draining lymph nodes. *J Immunother*. 2002;25:207-17.
- Rossi JF, Klein B, Commes T, Jourdan M. Interleukin 2 production in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1985;66(4):840-7.
- Hjalmar V, Hast R, Kimby E. Cell surface expression of CD25, CD54, and CD95 on B- and T-cells in chronic lymphocytic leukaemia in relation to trisomy 12, atypical morphology and clinical course. *Eur J Haematol*. 2002;68:127-134.
- Tefferi A, Bartholmai BJ, Witzig TE, Jenkins RB, Li CY, Hanson CA, Mesa RA, Phyllyk RL. Clinical correlations of immunophenotypic variations and the presence of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997;95:173-177.
- Shvidel L, Braester A, Bairey O et al. Cell surface expression of CD25 antigen (surface IL-2 receptor alpha-chain) is not a prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia: Results of a retrospective study of 281 patients. *Ann Hematol*. 2012;91:1597-1602.



15. Capello D, Zucchetto A, Degan M, Bomben R, Dal Bo M, Efremov DG, Laurenti L, Del Poeta G, Gaidano G, Gattei V. Immunophenotypic characterization of IgVH3-72 B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). *Leuk Res.* 2006;30:1197-1199.
16. Zucchetto A, Sonogo P, Degan M, Bomben R, Dal Bo M, Russo S, Attadia V, Rupolo M, Buccisano F, Del Principe MI, Del Poeta G, Pucillo C, Colombatti A, Campanini R, Gattei V. Signature of B-CLL with different prognosis by shrunken centroids of surface antigen expression profiling. *J Cell Physiol.* 2005;204:113-123.
17. Biancotto A, Dagur PK, Fuchs JC, Wiestner A, Bagwell CB, McCoy Jr. JP. Phenotypic complexity of T regulatory subsets in patients with B-chronic lymphocytic leukemia. *Mod Pathol.* 2012;25(2):246-259.
18. Jak M, Mous R, Remmerswaal EB et al. Enhanced formation and survival of CD4+ CD25hi FoxP3+ T-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma.* 2009;50(5):788-801.
19. Beyer M, Kochanek M, Darabi K et al. Reduced frequencies and suppressive function of CD4+ CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood.* 2005;106:2018-2025.
20. Weiss EM, Schmidt A, Vobis D et al. Foxp3-mediated suppression of CD95L expression confers resistance to activation-induced cell death in regulatory T cells. *J Immunol.* 2011;187:1684-1691.
21. Ghia P, Strola G, Granziero L, Geuna M, Guida G et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *European Journal of Immunology.* 2002;32:1403-1413.
22. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999;94(6):1848-54.