

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE

XXVIII CICLO

Settore: Medicina e Chirurgia

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Alfredo Ferro

**Alterazioni dei Neutrofili nei Pazienti
con Mieloma Multiplo.**

Dottoranda:

Dottssa Nunziatina Laura Parrinello

Relatore:

Chiar.mo Prof. Francesco Di Raimondo

Tutor:

Chiar.mo Prof. Francesco Di Raimondo

Anno Accademico 2014-2015

INDICE

Abstract	pag.3
Mieloma Multiplo	pag.5
<i>Introduzione</i>	pag.5
<i>Patogenesi</i>	pag.6
<i>Interazioni delle plasmacellule neoplastiche e microambiente</i>	pag.7
Cellule Mieloidi Soppressorie	pag.8
<i>Introduzione</i>	pag.8
<i>MDSC nel MM</i>	pag.9
<i>Meccanismi di immunosoppressione delle MDSC</i>	pag.10
<i>MDSC e Angionegesi</i>	pag.12
<i>MDSC Immunofenotipo</i>	pag.13
<i>Valutazione delle G-MDSC</i>	pag.14
Leucociti polimorfonucleati neutrofili (PMN)	pag.17
Scopo della Tesi	pag.21
Materiali e Metodi	pag.22
<i>Pazienti e raccolta dei campioni</i>	pag.22
<i>Isolamento di Neutrofili e Linfociti</i>	pag.24
<i>Valutazione Citofluorimetrica delle G-MDSC</i>	pag.25
<i>Valutazione citofluorimetrica di marcatori di superficie cellulare</i>	pag.26
<i>Specie Reattive dell'Ossigeno</i>	pag.26
<i>Fagocitosi</i>	pag.27
<i>Burst Ossidativo</i>	pag.28
<i>Stimolazione in vitro dei neutrofili Lipopolisaccaride (LPS) indotta</i>	pag.29
<i>Estrazione dell'RNA e Real time RT-PCR per l' espressione</i>	
<i>Genica di Arginasi-1 e PROK-2/BV8</i>	pag.29
<i>ELISA per la valutazione nel siero di Arginasi-1 e PROK-2/BV8</i>	pag.30
<i>Proliferazione T- cellulare</i>	pag.31
<i>Attivazione T- cellulare</i>	pag.32
Analisi Statistiche	pag.33
Risultati	pag.34
Discussione	pag.50
Bibliografia	pag.56

Abstract

Nel mieloma multiplo (MM), ma non nella gammopatie monoclonali di significato incerto (MGUS), la funzione immunitaria è alterata, conseguenza di un microambiente immunologicamente ostile e di difetti cellulari, tra cui la riduzione dell' immuno-sorveglianza e la disfunzione dei T-linfociti.

Recenti studi indicano che l'asse mieloide avrebbe un ruolo importante nella progressione tumorale. Dal momento che i granulociti neutrofili del sangue periferico potrebbero riflettere il complesso sistema mieloide, abbiamo indagato alcuni aspetti fenotipici e funzionali dei neutrofili di pazienti con MM all'esordio (MM-N) confrontandoli con quelli di MGUS (MGUS-N) e di soggetti sani (HS-N).

Abbiamo osservato che rispetto a MGUS-N e HS-N, i MM-N all' esordio hanno un'alterata espressione di alcuni markers di superficie quali CD64, CD11b, CD16 e CD62L, aumentati livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS), ridotta attività fagocitaria e di burst ossidativo.

MM-N hanno anche aumentati livelli di Arginasi-1 e PROK2/BV-8 e risultano avere proprietà immunosoppressive in coculture con cellule T allogene, in quanto inibiscono la proliferazione e la capacità di stimolazione dei T-linfociti. I risultati di questo studio forniscono nuove informazioni sia sul microambiente che caratterizza il MM rispetto ad MGUS e sia sui meccanismi che riguardano l'aumentata suscettibilità alle infezioni di questi pazienti.

Mieloma Multiplo

Introduzione

Il Mieloma Multiplo (MM) è un disordine proliferativo della linea B caratterizzato da un eccesso di plasmacellule monoclonali nel midollo osseo, associato al riscontro di una paraproteina rilevabile nel siero o nelle urine (componente monoclonale CM) e di lesioni osteolitiche.

Il termine “multiplo” fa riferimento alla proliferazione delle plasmacellule neoplastiche in diverse zone del midollo osseo (plasmocitomi midollari) o nei tessuti molli (plasmocitomi extramidollari) che sono alla base di una moltitudine di sintomi e disfunzioni gravi, tra cui dolore osseo associato a lesioni osteolitiche (80% dei casi), insufficienza renale (60%), anemia, ipercalcemia, suscettibilità ad infezioni, compromissione della produzione di immunoglobuline normali (IgG, IgA, IgD o IgE).¹

Il processo di trasformazione neoplastica si estrinseca in tre fasi principali:

indolente: in cui il tasso di crescita e morte delle cellule mielomatose si equivale. Corrisponde clinicamente alla forma di gammapatia monoclonale di incerto significato (MGUS) o di smoldering_myeloma (SMM), stado IA di Durie e Salmon che al momento non richiede nessun trattamento, salvo un atteggiamento di vigile attesa.

attiva: si ha un progressivo aumento della componente monoclonale e del danno d'organo. La malattia è dipendente dallo stroma per crescita e sopravvivenza ed è chemiosensibile: sono in questa fase i pazienti che meglio rispondono al trattamento, con terapia ad alte dosi e autotrapianto.

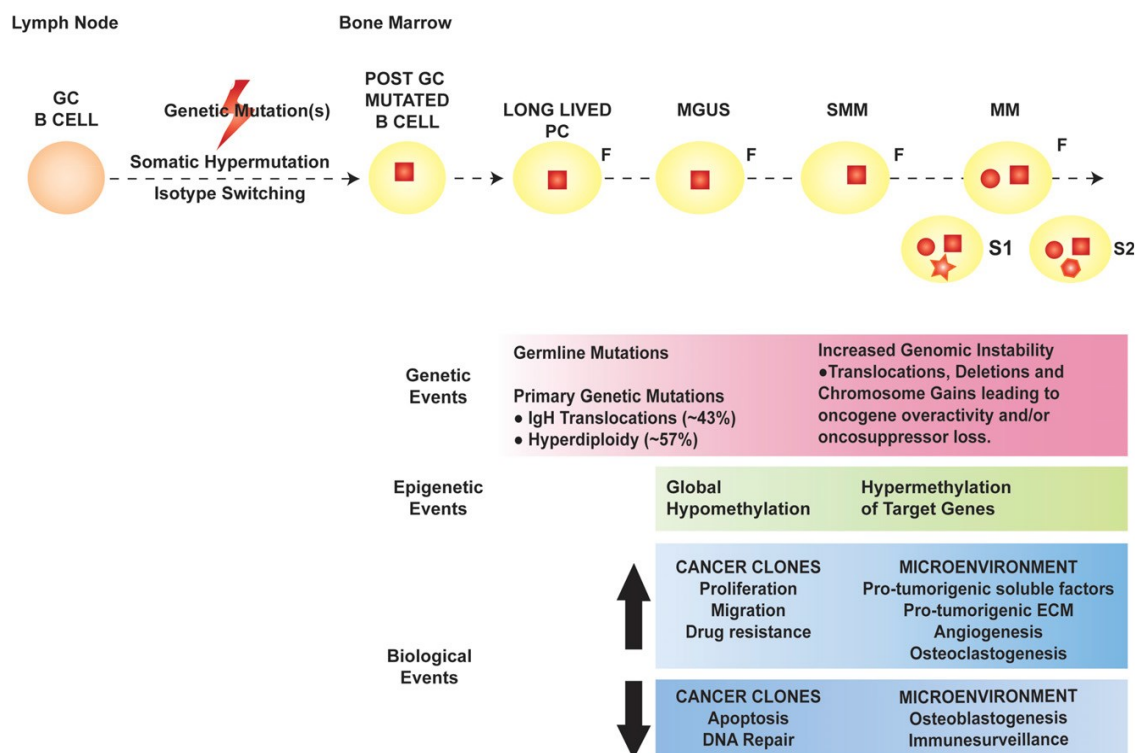
aggressiva (terminale): le cellule mielomatose diventano indipendenti dallo stroma, svincolate dall'azione dell'IL-6: si ha aumento dell'LDH e cell labelling index>1%, manifestazioni extramidollari. In questa fase i pazienti non rispondono più alla terapia, comprese le alte dosi.²⁻⁴

Patogenesi

Nella patogenesi del MM sono coinvolte diverse alterazioni cromosomiche e molecolari, tra cui la regione 14q32, sito dei geni codificanti per le catene pesanti delle immunoglobuline, la regione 13q14 e anomalie quali l'iperploidia.

Mutazioni a livello del pathway del fattore nucleare KB (NF-KB), di RAS, MYC e p53 sono considerate invece eventi più tardivi nello sviluppo e nella progressione del MM.²⁻³⁻⁵

Oltre agli eventi molecolari che interessano il clone plasmacellulare, un ruolo determinante è svolto dalle alterazioni del microambiente, quali produzione di citochine, switch angiogenico, immunosoppressione, alterazioni del rimodellamento osseo che distinguono il MM in fase sintomatica dalle forme indolenti quali MGUS e SMM.⁶⁻⁹



Interazioni delle plasmacellule neoplastiche e microambiente

L'interazione del clone mielomatoso con il microambiente midollare determina, tramite il rilascio di opportune citochine, la distruzione dell'osso, la sopravvivenza delle cellule neoplastiche e la loro proliferazione, la resistenza ai farmaci e l'instabilità genetica.¹⁰⁻¹¹

A questa interazione segue l'attivazione da parte delle cellule stromali di una cascata di tipo infiammatorio con infiltrato cellulare e rilascio paracrino di citochine, tra cui IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-11, stem cell factor, HGF, MIP-1- α , IGF-2 e IGF-1, che vanno sotto il termine di OAFs (osteoclast- activating factors) a seguito dell'attivazione di MAPK e NF κ B.

Un ruolo fondamentale è svolto dall' IL-6 prodotta dalle cellule neoplastiche ma anche dai macrofagi, osteoclasti e osteoblasti del microambiente midollare. Fisiologicamente IL-6 stimola il differenziamento dei precursori B in plasmacellule con relativa produzione di immunoglobuline. Sulla cellula mielomatosa IL-6 stimola la proliferazione cellulare con azione protettiva nei confronti di eventuali segnali di tipo apoptotico, cui segue l'attivazione di una serie di enzimi per lo più di tipo tirosinchinasico.¹²

Il risultato di queste complesse interazioni molecolari porta alla proliferazione cellulare incontrollata, sostenuta da IL-6, IGF1, VEGF, TNF- α IL-21 e mediata da Raf, all'aumentata attività antiapoptotica (alterazione delle vie a valle delle caspasi 8 e 9, overespressione del bcl-2) e, nelle fasi più avanzate, alla chemioresistenza; il tutto associato ad una progressiva perdita del controllo sul ciclo cellulare e sui meccanismi di migrazione e interazione cellulare.¹³

Da queste osservazioni emerge un *continuum* patogenetico di alterazioni riguardanti sia il clone mielomatoso sia il microambiente midollare che, attraverso acquisizioni e perdite di funzioni di geni, porta progressivamente, *step by step*, alla malattia clinicamente manifesta.⁹⁻¹⁹

CELLULE MIELOIDI SOPPRESSORIE

Introduzione

Uno stato di immuno-soppressione tumore-dipendente è stato riscontrato in diversi tipi di neoplasie quali linfomi, tumori cutanei, carcinoma della cervice uterina, tumori della testa e del collo, mentre un'aumentata risposta immunitaria associata a un fenomeno di regressione spontanea è stata osservata in altri tipi di neoplasie quali i melanomi. È ipotizzabile che un tumore in grado di generare una situazione di immunosoppressione abbia un vantaggio evolutivo, in quanto meno soggetto ai processi di immunosorveglianza.

Lo sviluppo neoplastico è spesso accompagnato da un progressivo accumulo nel midollo osseo, sangue, milza e sito tumorale di cellule appartenenti alla linea mieloide definite “cellule soppressorie di derivazione mieloide (dalla traduzione inglese di myeloid derived suppressor cells, MDSC)”.²⁰⁻²⁴

Numerose evidenze, indicano che il reclutamento e la maturazione in senso soppressorio delle MDSC sono promossi da fattori derivanti dal tumore: la resezione del tumore primario, in modelli murini e in pazienti umani, porta ad una diminuzione nel numero di queste cellule, e la coltura di cellule del midollo osseo con surnatanti derivanti da linee tumorali dà origine ad elementi soppressori.²⁵

La citochina che sembra principalmente coinvolta nel reclutamento delle MDSC è il GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), la quale è stata utilizzata per diversi anni con l'intento di aumentare l'efficacia dei vaccini antitumorali in diversi protocolli preclinici.²⁶

La natura dicotomica del GM-CSF è stata studiata anche nell'uomo, dove si è osservata una relazione dose-effetto. Questa citochina ad alte dosi induce i macrofagi ed altre cellule mieloidi a rilasciare fattori immunosoppressivi, mentre a basse dosi sembra agire da adiuvante per la presentazione antigenica.²⁷

Probabilmente il reclutamento e l'azione delle MDSC è in relazione non solo al tipo di citochine presenti a livello sistemico e locale ma anche al loro dosaggio e alla loro durata di espressione.

Un altro fattore chiave nell'attivazione delle MDSC è la COX-2 (ciclo ossigenasi-2), enzima che regola l'espressione di Arginasi 1 (ARG1), di Ossido Nitrico Sintetasi inducibile (iNOS) e di Prostaglandine E2 (PGE2). Molti tumori producono PGE2 e COX2, i quali contribuiscono al quadro infiammatorio ivi presente.

MDSC nel Mieloma Multiplo

Nei pazienti affetti da MM, recenti lavori hanno dimostrato un' espansione di MDSC sia a livello del sangue midollare che periferico.²⁸⁻³⁰

In un modello murino, la progressiva crescita del plasmocitoma dopo somministrazione di cellule tumorali ha confermato che l'estensione del tumore si accompagna a un progressivo incremento di MDSC sebbene non in maniera lineare e variabile sulla base del tipo di linea tumorale iniettata.

Cellule mononucleate di soggetti sani esposte per 21 giorni a diverse linee cellulari umane di MM IL-6 dipendenti o meno, sensibili o resistenti ai farmaci correntemente usati in clinica, hanno modificato il proprio fenotipo in MDSC, come confermato da successivi studi funzionali, confermando una potenziale interazione bidirezionale tra MDSC, plasmacellule neoplastiche e cellule immunitarie effettrici.²⁹⁻³¹

Gorgun et.al, hanno osservato un incremento di G-MDSC e ne hanno verificato l'attività immunosoppressiva quando posti in co-cultura con linfociti T isolati da donatori sani in maniera tempo e dose dipendente, rivelando un'attività immunosoppressiva maggiore per G-MDSC in confronto a mo-MDSC per i campioni ricavati dal sangue periferico, e una simile attività soppressiva per G-MDSC e mo-MDSC per campioni ricavati da sangue midollare.³⁰

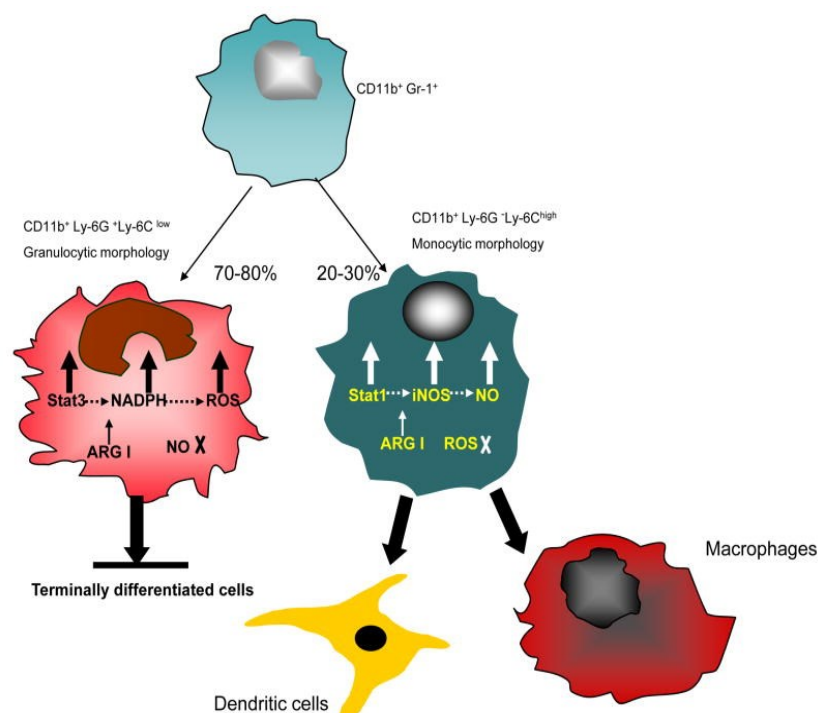
Meccanismi di Immunosoppressione delle MDSC

La soppressione dell'attività T-linfocitaria mediata dalle MDSC si esplica attraverso vari meccanismi tra cui:³²⁻³³

1. **Citochine immunosoppressive:** I tumori sono in grado di secernere diverse citochine che agiscono sui precursori midollari, quali GM-CSF, IL3, GCSF, e che, verosimilmente, sono responsabili della mobilitazione delle MDSC, le quali di conseguenza producono citochine che sopprimono l'immunità antitumorale. La secrezione di IL-10 downregola la produzione di IL-2 nei macrofagi. Inoltre IL-10 e VEGF inibiscono la maturazione delle cellule dendritiche (DC). In modelli murini di fibrosarcoma e carcinoma del colon, il TGF- β prodotto dalle MDSC in risposta alla stimolazione dell'IL-3, riduce l'immunosorveglianza tumorale dei T-linfociti citotossici.³⁴
2. **Alterato metabolismo dell'L-arginina:** Dal punto di vista funzionale, le MDSC presentano una peculiare attività soppressiva a carico dei T-linfociti mediata da un'aumentata produzione dell'enzima arginasi-1 (ARG-1) che tramite deplezione di arginina dal microambiente rende anergici i T-linfociti. Bassi livelli di questo amminoacido comportano una ridotta emivita dell'mRNA per la catena CD3 ζ che media il segnale di traduzione nel TCR con conseguente inibizione della proliferazione dei T linfociti.³⁵⁻³⁷
3. **Up-regolazione dell'ossido nitrico (NO):** L'ossido nitrico rilasciato dalle MDSC modula le proteine coinvolte nella segnalazione intracellulare sia tramite S-nitrosilazione di residui cisteinici sia attivando la guanilato ciclastasi solubile e la protein-chinasi dipendente da cGMP. Nei linfociti T, NO agisce bloccando la fosforilazione, e quindi l'attivazione, di proteine coinvolte nelle tre principali vie di segnalazione del recettore per l'IL-2 (JAK/STAT, Ras/MAPK, fosfoinositolo 3-chinasi/Akt). Studi su cellule T umane hanno anche evidenziato che NO influenza la stabilità dell'mRNA codificante per l'IL-2 e il rilascio di IL-2 da linfociti T attivati. In topi con carcinoma mammario e individui portatori di HIV è stato notato poi che un rilascio

persistente di NO da parte delle MDSC è associato ad una perdita trascrizionale di STAT5A e STAT5B nei linfociti T e B. Infine, su cellule T esposte ad alte concentrazioni di NO è stato osservato un effetto proapoptotico diretto, che potrebbe essere causato dall'accumulo di p53, dall'interazione mediata da Fas o da membri della famiglia del recettore per TNF, o da segnalazioni attraverso vie indipendenti dalle caspasi.³⁸

4. **Up-regolazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS):** Diversi fattori rilasciati dal tumore come TGF- β , IL-3, IL-6, IL-10, PDGF (platelet-derived growth factor) e GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor), possono indurre la produzione di ROS nelle MDSC, tra cui anione superossido (O_2^-), perossido di idrogeno (H_2O_2), perossinitriti ($ONOO^-$), i quali inibiscono i T-linfociti $CD8^+$ catalizzando la nitratura del TCR e inibendo l'interazione con il peptide del MHC.³⁹⁻⁴¹

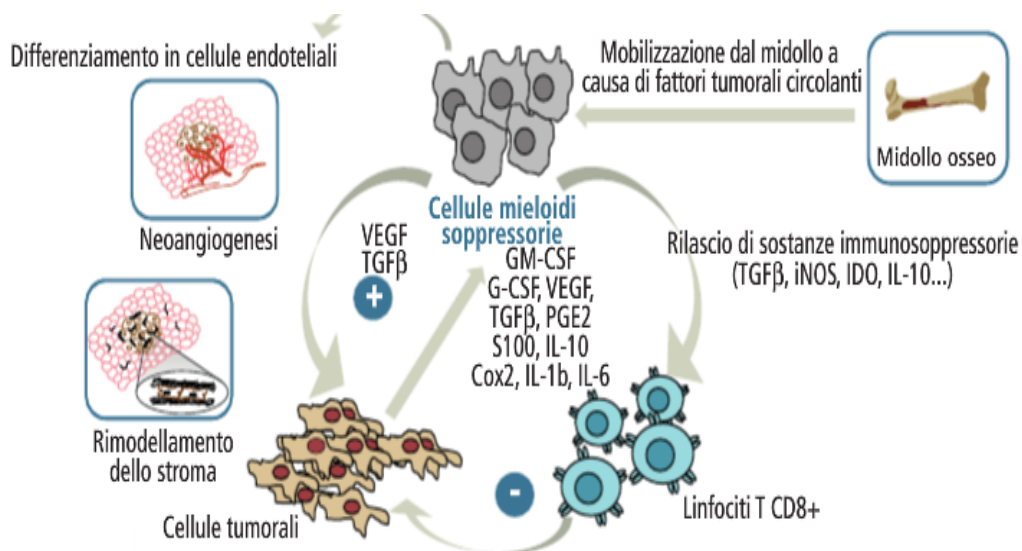


MDSC e Angiogenesi

E' stato documentato inoltre un contributo delle MDSC nei processi di angiogenesi che accompagnano lo sviluppo neoplastico.

Tra i meccanismi responsabili di tale fenomeno un ruolo di primaria importanza sembrerebbe essere esercitato dall'attivazione della via di trasduzione del segnale proangiogenico mediato dalla proteina Bv8, la cui sintesi appare significativamente aumentata nelle MDSC. L'attivazione di tale via, funzionalmente indipendente da quella mediata dai membri della famiglia VEGF (vascular endothelial growth factor), rappresenterebbe inoltre la base patogenetica della resistenza di diversi modelli tumorali al trattamento con anticorpi monoclonali neutralizzanti il VEGF.⁴²

Un secondo meccanismo presumibilmente coinvolto nella promozione dell'angiogenesi potrebbe consistere nell'aberrante espressione, da parte delle cellule mieloidi CD11b, di molecole di adesione, membri della superfamiglia delle immunoglobuline (Ig), come CEACAM1 (CEA-related cell-adhesion molecule). Il ruolo di CEACAM1 nei fenomeni di neoformazione vasale è stato documentato in modelli sperimentali di leishmaniosi cutanea.⁴³



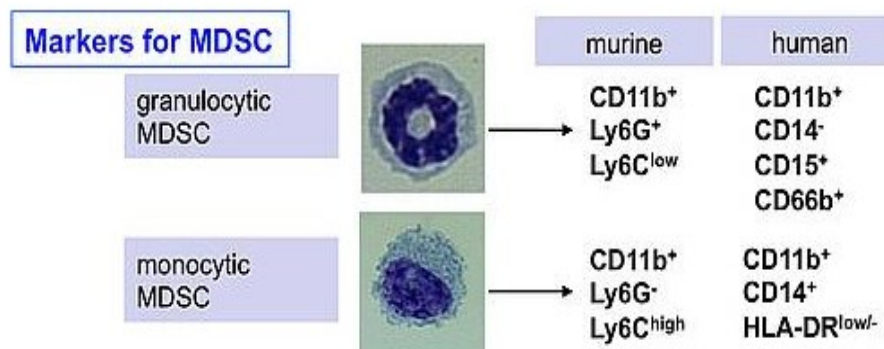
Immunofenotipo delle MDSC

Nei topi, le MDSC sono caratterizzate dalla co-espressione dei marcatori di superficie Gr-1 e CD11b. Nei topi sani, cellule con questo fenotipo costituiscono circa il 20-30% delle cellule nel midollo osseo, circa il 2-4% delle cellule presenti nella milza, e ancora meno nei linfonodi.⁴⁷ La frequenza di queste cellule aumenta nei topi portatori di tumore.⁴⁴

L'anticorpo GR-1 può legare due epitopi separati: Ly6G, molecola espressa soprattutto dai granulociti e Ly6C, espressa invece dai monociti,^{45,46} per cui le MDSC vengono ulteriormente distinte in 2 subsets: le CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low} (PMN-MDSC), con fenotipo di polimorfonucleati e le CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high} (MO-MDSC) con fenotipo monocitario.

In aggiunta a Gr-1 e CD11b, altri marcatori di superficie sono stati proposti come markers per discriminare i subsets di MDSC, tra questi: CD80 (B7.1), CD31, CD124, interleukin (IL)-4 receptor α -chain, CD115 e macrophage-colony stimulating factor receptor (MCSFR).⁴⁷⁻⁴⁹

Nell'uomo, il fenotipo delle MDSC è meno definito in quanto manca l'analogo del marcatore Gr-1 e con il termine di MDSC sono state individuate fondamentalmente due popolazioni cellulari: le MDSC granulocitarie (G-MDSC) aventi fenotipo: Lin⁻, CD14⁻, HLA-DR⁻, CD15⁺, CD11b⁺, CD33⁺ e le MDSC monocitarie (Mo-MDSC) con fenotipo CD14⁺, HLA-DR^{low / neg}.⁵⁰⁻⁵³



Valutazione delle G-MDSC

La natura delle G-MDSC nell'uomo ancora non è ben chiarita poiché queste cellule hanno aspetti simili a quelli dei granulociti neutrofili sia per immunofenotipo che morfologia e alcuni autori identificano le G-MDSC come neutrofili immunosoppressori.⁵⁴

Ad oggi, le G-MDSC-soppressive vengono distinte dai neutrofili circolanti attraverso i seguenti metodi:

Citofluorimetria : CD11b e CD33 sono i markers tradizionalmente utilizzati per valutare le MDSC nell'uomo. Tuttavia, questi marcatori sono espressi su tutte le cellule della linea mielocitica, quindi non sono specifici per le G-MDSC.⁵⁵ Un altro marker utilizzato è il CD15 ma la sua espressione è simile tra G-MDSC e Granulociti. A tal proposito, diversi studi sono stati condotti al fine di identificare un marker, valutabile in citometria, specifico per queste cellule. Greifenberg et al. hanno individuato nei milza di topi sani due sottoinsiemi di neutrofili con una diversa espressione di CD11b e le cellule che esprimono il CD11b ad una più bassa intensità sono risultati essere immunosoppressivi.⁵⁶

Youn et al. hanno trovato nel topo un' aumentata espressione di SLAMF4 (CD244) sui neutrofili immunosoppressivi.⁵⁷

Nell'uomo è stato riscontrato che cellule mieloidi immunosoppressive presentano un'aumentata espressione di IL-4R α (CD124).⁵⁸ Tuttavia, Mandruzzato et al. hanno dimostrato che l'espressione di questo marker correla con un'immunosoppressione mediata solo dalle MDSC monocitarie e non granulocitarie ⁵⁸ e pertanto resta incerto il fatto che il CD124 possa essere utilizzato come marker di G-MDSC.

Pillay J. et al, hanno individuato un subset di cellule mieloidi CD62L^{dim}/CD16^{bright} con proprietà immunosoppressive.⁵⁴ Tuttavia, in contrasto alle osservazioni di Greifenberg⁵⁶ secondo le quali le G-MDSC hanno una più bassa espressione di CD11b, questo subset CD62L^{dim}/CD16^{bright} individuato da Pillay ha una più alta espressione di CD11b.

Pertanto, diversi markers sono stati presi in considerazione per distinguere le cellule G-MDSC soppressive dai neutrofili non soppressivi, ma ad oggi i dati riportati in letteratura sono alquanto contraddittori e finora non c'è una combinazione di marcatori di superficie specifica per le G-MDSC.

Centrifugazione per gradiente di densità: Solitamente, la separazione dei leucociti da sangue intero si ottiene tramite centrifugazione su strato con una densità di 1.077g/ml. I neutrofili avendo una densità relativamente alta si pongono sul fondo dello strato, sopra la frazione degli eritrociti, mentre le cellule mononucleate (PBMC) si trovano nell'interfase tra questo strato e il plasma.

Schmielau J et al⁵⁹. e Rodriguez et al.⁶⁰ hanno trovato nella frazione PBMC di pazienti affetti da cancro G-MDSC immunosoppressive. Queste cellule hanno tuttavia un fenotipo di neutrofili attivati, caratterizzati da un'aumentata espressione di CD66b e CD11b.

Inoltre, questi autori non hanno dimostrato se i neutrofili a densità normale degli stessi pazienti avessero anche proprietà soppressive, così è incerto se la centrifugazione su gradiente di densità sia effettivamente in grado di distinguere tra cellule soppressive e non-soppressive. Inoltre, stimolando in vitro i neutrofili di donatori sani, questi acquisiscono stessa densità e capacità soppressiva delle G-MDSC, suggerendo che in questo sistema le G-MDSCs potrebbero essere neutrofili attivati⁶⁰.

- **Morfologia nucleare:** In generale le MDSC sono descritte come cellule giovani o immature.⁶¹ I neutrofili hanno una distinta morfologia nucleare ai vari stadi di sviluppo. I progenitori hanno un nucleo rotondo, che cambia durante la maturazione in uno a forma a ferro di cavallo o a "banda". Le cellule mature hanno un nucleo "segmentato". Quando il nucleo ha 5 o più segmenti è detto "ipersegmentato". Dal momento che i neutrofili acquisiscono più segmenti nel corso della maturazione, si è tentati a considerare le cellule ipersegmentate come "vecchie". Tuttavia, vi è evidenza

che i neutrofili segmentati e ipersegmentati negli esseri umani hanno simile età.⁶²

Secondo quanto riportato da Greifenberg et al. la popolazione G-MDSC ha una morfologia nucleare a forma di anello, mentre le cellule con un nucleo segmentato non hanno proprietà soppressive.⁵⁶

Questo supporta l'idea che le G-MDSC siano cellule giovani o immature. Altri autori tuttavia, non hanno trovato alcuna differenza nella morfologia nucleare tra Neutrofili e G-MDSC.⁶³

In conclusione, i metodi sopra riportati non sembrerebbero essere specifici per l'identificazione e la distinzione nell'uomo delle G-MDSC dalla componente granulocitica matura non soppressiva.

Leucociti polimorfonucleati neutrofili (PMN)

I leucociti polimorfonucleati neutrofili (PMN) insieme ai monociti sono cellule essenziali dell'immunità innata ed hanno un ruolo fondamentale nella difesa nel sistema immunitario da microrganismi patogeni. Sono le prime cellule che intervengono in caso di infezione, soprattutto batterica e fungina e in corso di processi infiammatori. Essi ingeriscono microrganismi in circolo e penetrano nei tessuti extravascolari sede di infezione, esercitando anche in quella sede le loro funzioni fagocitiche e andando incontro a morte nel giro di poche ore.

Il processo che porta all'uccisione dei microorganismi patogeni comprende più fasi: riconoscimento, adesione alla particella da fagocitare, ingestione, uccisione e digestione dei microorganismi. Diversi recettori espressi sulla superficie dei fagociti sono coinvolti nel riconoscimento e nella internalizzazione delle particelle. A tal proposito, le principali classi di recettori, presenti sulla membrana plasmatica dei PMN, implicati nel processo di fagocitosi comprendono:

Recettori per Fc γ : sono recettori di superficie che legano la porzione Fc delle Immunoglobuline G e che consentono ai fagociti di riconoscere particelle opsonizzate da IgG. L'attivazione di recettori ad alta affinità (CD64/Fc γ -RI) e a bassa affinità (CD32/Fc γ -RII e CD16/Fc γ -RIII), innesca la fagocitosi attraverso la polimerizzazione dell'actina, che permette l'estensione della membrana plasmatica e la formazione di protrusioni che circondano la particella e ne determinano l'ingestione.⁶⁴

Recettori del complemento: I PMN esprimono tre diversi tipi di recettori per il complemento: CR1(CD35), CR3 (integrina CD11b/CD18) e CR4 (integrina CD11bc/CD18), tramite i quali i neutrofili riconoscono i microorganismi opsonizzati da fattori del complemento. Il CR1 lega componenti del complemento quali C1q, C4b e C3b. Prodotti batterici quali il lipopolisaccaride (LPS), citochine infiammatorie quali il TNF α stimolano la fagocitosi attraverso il recettore CR3. In vitro, l'attivazione di questo recettore

può essere stimolato dal forbol miristato acetato(PMA) e porta all'attivazione di protein chinasi C.

L'attivazione contemporanea dei recettori CR e Fcγ ha un effetto “cooperativo” sul processo di internalizzazione delle particelle.⁶⁵

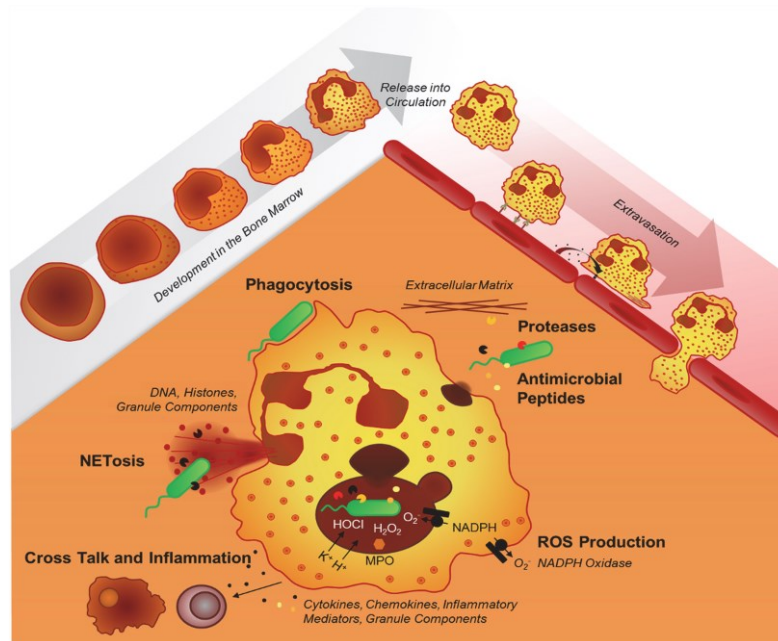
Lectine: mediano il riconoscimento di carboidrati endogeni ed esogeni cooperando al riconoscimento dei microorganismi; in particolare, risultano coinvolti nell'internalizzazione dello zymosan.⁶⁶

L'adesione tra la cellula bersaglio opsonizzata e i recettori presenti sulla superficie dei PMN dà inizio al processo di avvolgimento della membrana del fagocita attorno alla particella. Tale interazione recettoriale avvia un riarrangiamento nel citoscheletro actinico dei neutrofili che permette loro di avvolgersi attorno alla particella da fagocitare con un meccanismo definito “a cerniera”: le estroflessioni citoplasmatiche (*pseudopodi*) si estendono in continuo contatto con la superficie microbica fino a fondersi tra loro formando il cosiddetto *fagosoma* (o vacuolo di fagocitosi).

L'internalizzazione dei microorganismi attraverso la fagocitosi è accompagnata dalla produzione di molecole di segnale proinfiammatorie e dall'attivazione di meccanismi antimicrobici. I neutrofili sono infatti in grado di uccidere i patogeni internalizzati grazie alla simultanea cooperazione di più processi: la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), scatenata dall'attivazione del complesso enzimatico NADPH ossidasi (*meccanismi ossigeno-dipendenti*); la degranulazione dei compartimenti citoplasmatici nel fagolisosoma, che porta al rilascio di proteasi preformate e proteine antibiotiche (*meccanismi ossigeno-indipendenti*); la formazione, recentemente evidenziata, di *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs).

La fagocitosi dei microorganismi patogeni si accompagna inoltre ad un aumento del metabolismo ossidativo, evento definito “burst” respiratorio. L'enzima responsabile del burst ossidativo è la NADPH ossidasi. In risposta ad uno stimolo infiammatorio, infatti, la NADPH ossidasi catalizza il trasferimento di elettroni, derivati dallo “shunt” dei pentoso-fosfati, dal

donatore nel citoplasma (il NADPH) all'acceptore nel fagosoma o nello spazio extracellulare (l'ossigeno molecolare), permettendo così la formazione di anioni superossido.⁶⁷⁻⁷⁰



Di recente, ci sono sempre più evidenze che i neutrofili, tradizionalmente considerati come semplici componenti del sistema immune innato con una limitata serie di funzioni pro-infiammatorie, sono cellule complesse, con una plasticità fenotipica e funzionale, capaci di una vasta gamma di funzioni specializzate. Sono senza dubbio i principali effettori dell' infiammazione acuta, ma sembrerebbero avere un ruolo importante anche nelle patologie infiammatorie croniche, nella risposta immunitaria adattiva e nella biologia del tumore.⁷¹⁻⁷⁴

Molti pazienti con tumore a stadio avanzato hanno un elevato numero di granulociti circolanti nel sangue periferico⁷⁵ e una elevata ratio neutrofili/linfociti (NLR) è associata ad una cattiva prognosi.⁷⁶

Diversi esperimenti documentano un'azione immunosoppressiva e pro-tumorale dei neutrofili.⁷⁷⁻⁷⁸

Tra i meccanismi di immunosoppressione mediata da queste cellule vi sono l'aumentata espressione di Arginasi-1 e l'aumentata produzione di ROS.⁷⁹⁻⁸⁰

In diversi modelli murini è stato dimostrato che i neutrofili hanno la capacità di inibire la risposta antitumorale dei T-linfociti CD8⁺ e questo effetto immunosoppressorio sembrerebbe essere coinvolto nella formazione di metastasi tumorali in un modello murino di cancro al seno.⁸⁶

In questo studio è stato dimostrato anche che i T-linfociti- $\gamma\delta$ determinano il reclutamento dei neutrofili al sito tumorale con un conseguente switch del fenotipo neutrofilico da pro-(N1) ad anti-tumorale (N2).⁸¹⁻⁸²

I neutrofili hanno un ruolo importante anche nei processi di angiogenesi in quanto esprimono metallo-proteasi della matrice, quali MMP9.⁸³⁻⁸⁴

Scopo della Tesi

Il MM, nonostante le molteplici informazioni sui meccanismi di trasformazione neoplastica e i molteplici strumenti farmacologici disponibili al momento, è una patologia ancora gravata da un elevato tasso di mortalità e per molti pazienti inguaribili. Tra l'altro lo stato di immunosoppressione di questi pazienti facilita la progressione tumorale determinando un'aumentata suscettibilità alle infezioni, una delle principali cause di morbidità e mortalità nel MM.

Il primo obiettivo di questo studio è stato quello di valutare, nei pazienti con MM all'esordio e con MGUS, le G-MDSC, cellule che hanno un ruolo determinante nel favorire la tolleranza immunologica attraverso il silenziamento dei linfociti T, inizialmente su PBMC e successivamente su sangue periferico.

Abbiamo osservato che i livelli di G-MDSC su sangue periferico correlano con quelli dei neutrofili circolanti, e tra l'altro avendo un fenotipo pressoché sovrapponibile non si riescono a distinguere da questi ultimi.

I granulociti neutrofili, cellule essenziali dell'immunità innata, hanno un ruolo fondamentale nella difesa dell'ospite contro i microorganismi estranei e negli ultimi anni è emerso un loro ruolo nel sostenere l'infiammazione associata al tumore nonché la stessa progressione tumorale.

Tra l'altro un recente report indica che un $NLR > 2$ nei pazienti con MM è un fattore prognostico negativo sia in termini di progression-free survival (PFS) che di overall survival (OS).⁸⁵

Il significato biologico del NLR e quello che lo lega ad una cattiva prognosi non è ancora stato ben definito.

Abbiamo pertanto ipotizzato che nel sangue periferico di pazienti con MM i neutrofili maturi possano essere rappresentativi di tutta la popolazione mieloide soppressiva e il secondo obiettivo di questo studio è stato quello di indagare alcuni aspetti fenotipici e funzionali dei neutrofili maturi di MM (MM-N) e di MGUS (MGUS-N) rispetto a quelli di soggetti sani (HS-N).

Materiali e Metodi

Pazienti e raccolta dei campioni

Tra gennaio 2013 e dicembre 2014, sono stati inclusi in questo studio, svolto presso la *Sezione di Ematologia, dell'ospedale Ferrarotto di Catania (Azienda Policlinico-OVE, Università di Catania)*, n. 60 pazienti (pts) con MM di nuova diagnosi e n.30 pts con MGUS. I pazienti arruolati non hanno malattie immuno-mediate nè infezioni virali acute e/o croniche al fine di evitare qualsiasi interferenza sui meccanismi immuno-regolatori. Inoltre, tutti i pazienti con MM hanno una malattia misurabile e tutti i pazienti con MGUS hanno una malattia cronica stabile con almeno 2 anni di follow-up. Trenta soggetti sani (età > 45 anni) sono stati reclutati nello studio come controlli. Nessuno dei pazienti reclutati ha ricevuto trattamenti medici che potessero avere avuto un impatto sulla loro condizione immunitaria.

I dati clinici dei pazienti sono mostrati nella *Tabella 1*.

Tabella 1: Dati clinici dei pazienti in esame.

WBC: white blood cells count; ALC: absolute lymphocyte count; ESR: Erythrocyte Sedimentation Rate; ISS: International Staging System

	MGUS (<i>n</i> =30)	MM (<i>n</i> =60)
Median age (range)	67 (49-70)	64 (40-81)
Males/Females	21/9	37/23
Istotype, n		
<i>IgG k</i>	0	18
<i>IgG λ</i>	0	10
<i>IgAk</i>	6	7
<i>IgA λ</i>	10	5
<i>IgM</i>	0	2
<i>IgG</i>	11	4
<i>K</i>	0	7
<i>λ</i>	3	7
Cytogenetics, n		
<i>Normal</i>	15	22
<i>del 13</i>	2	18
<i>del 17</i>	0	6
<i>t (4;14)</i>	3	7
<i>not performed/failed</i>	10	7
Haemoglobin, g/l (range)	12.8 (12-14.5)	10.6 (6.5-13.8)
Platelets ·1000/uL (range)	219 (180-315)	221 (90-384)
Bone marrow plasmacytosis >50 %, n (%)	0	30 (60)
C-reactive protein, mg/l (range)	0.1 (0.01-4)	0.4 (0.01-8.5)
LDH, U/l (range)	195 (132-213)	209 (109-708)
ESR , mm/h	17 (0-26)	72 (6-134)
STAGE ISS, n		
<i>1</i>	N.A.	14
<i>2</i>	N.A.	35
<i>3</i>	N.A.	11

Isolamento di Neutrofili e Linfociti

Le cellule mononucleate (PBMC) sono state ottenute mediante centrifugazione su gradiente di densità con Ficoll-Hypaque (Pharmacia LKB Biotechnology). Il sangue intero (40 ml) raccolto da donatori sani, da pts con MGUS e da pts con MM all'esordio, in provette contenenti EDTA, è stato diluito 1:1 con destrano 3% entro 2 ore.

Questa diluizione è stata delicatamente depositata su uno strato di Ficoll-Hypaque in modo che il gradiente risulti costituito da un volume di Ficoll e due volumi di sangue diluito. La provetta è stata quindi centrifugata per 20 minuti a $880 \times g$ alla temperatura di 20°C . Questa centrifugazione permette di separare lo strato linfo-monocitario (l'anello bianco all'interfaccia tra il plasma e lo strato di Ficoll, da cui sono stati recuperati successivamente i linfociti T), dai granulociti neutrofili e dagli eritrociti che sedimentano sul fondo della provetta. Per rimuovere gli eritrociti che contaminano la preparazione dei neutrofili, il pellet rimasto dopo la rimozione del surnatante è stato sottoposto a un trattamento di lisi ipotonica (155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0.1 mM EDTA, pH 7.4) per 15 minuti in ghiaccio.

I neutrofili sono stati quindi recuperati mediante centrifugazione per 7 minuti a $460 \times g$, alla temperatura di 4°C , sottoposti ad un primo lavaggio nello stesso tampone di lisi e ad un secondo lavaggio in PBS. La popolazione neutrofila così ottenuta ha una purezza $> 90\%$ testata al citofluorimetro.

L'anello linfo-monocitario, è stato lavato due volte con Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) (Celbio) e quindi da questo sono stati recuperati i T-linfociti attraverso selezione immunomagnetica con microbiglie su colonne miniMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germania), ottenendo una popolazione T-cellulare con una purezza e una vitalità $>90\%$ testata al citofluorimetro.

Valutazione Citofluorimetrica delle G-MDSC

Per la valutazione delle G-MDSC sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali (MoAb) tutti della Beckman Coulter: CD11b FITC (clone bear-1), CD33 PE (clone D3HL60.251), CD14 PC5, (clone RMO52), HLA-DR-ECD (Clone Immu-357).

Le G-MDSC, tramite gate logici sequenziali, sono state individuate come: Lin⁻/CD11b⁺/CD33⁺/CD14⁻/HLA-DR^{LOW/-}.

In 15 pazienti con MM, in 15 con MGUS e in 15 donatori sani, le G-MDSC sono state valutate da PBMC (cellule mononucleate di sangue periferico) isolate mediante separazione su gradiente di densità di Ficoll. 1×10^6 cellule sono state marcate con 10 μ l di ciascun moab e incubate al buio a temperatura ambiente per 20 minuti. Dopodichè le cellule sono state lavate, risospese in PBS e acquisite al citofluorimetro.

In 60 pazienti con MM, in 30 con MGUS e in 30 donatori sani, le G-MDSC sono state valutate da sangue periferico (PB) raccolto in provette tipo vacutainer contenenti acido etilendiamminotetraacetico (EDTA).

50 microlitri (μ l) di campione è stato marcato con 10 μ l di ciascun moab, incubato al buio a temperatura ambiente per 20 minuti. I globuli rossi sono stati lisati con una soluzione di cloruro d'ammonio 10x per 10 minuti e quindi letto al citofluorimetro.

I risultati sono stati espressi come valori percentuali e correlati con alcuni aspetti clinici quali: burden tumorale (stadio ISS, albumina, beta-2 microglobulina, numero di lesioni osteolitiche, LDH, infiltrato di plasmacellule nel midollo); parametri di infiammazione (fibrinogeno, ESR, C-RP); citogenetica; NLR;

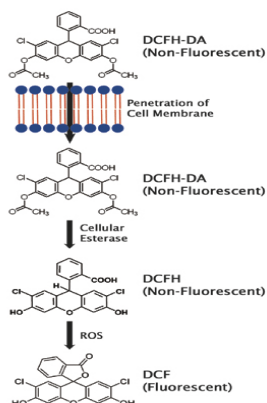
Valutazione citofluorimetrica di marcatori di superficie cellulare

50 µl di campione ottenuto da pb raccolto in provette contenenti EDTA è stato marcato con 10 µl dei seguenti anticorpi monoclonali (MoAb): CD64 FITC (clone 22), CD11b FITC (clone bear1), CD62L FITC (clone DREG56), CD16 FITC (clone 3G8) tutti della Beckman Coulter.

Tutti i tubi sono stati incubati al buio per 20 minuti a temperatura ambiente. I globuli rossi sono stati lisati con una soluzione di cloruro d'ammonio 10x per 10 minuti a temperatura ambiente e quindi i campioni sono stati acquisiti e analizzati al citofluorimetro. I neutrofili sono stati selezionati secondo i parametri di forward and 90° light scatter. Per ogni campione sono stati acquisiti 10.000 eventi. I risultati sono stati espressi come intensità media di fluorescenza (MFI).

Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS)

La valutazione dei ROS è stata ottenuta su campione da sangue periferico in EDTA, utilizzando il "Carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate. (Sigma).



Carboxy-H2DCFDA è un colorante non fluorescente che attraversa la membrana plasmatica ed in presenza di ROS, questo reagente viene ossidato ed emette una fluorescenza verde.

Da 100 µl di sangue intero in EDTA, sono stati lisati i globuli rossi con una soluzione di cloruro d'ammonio 10x per 10 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state lavate con phosphate-buffered saline (PBS), quindi incubate con carboxy-H2DCFDA (1µM) per 30 minuti al buio a 37°C, al 5% di CO₂. Dopo due lavaggi con PBS, le cellule sono state acquisite al citofluorimetro usando il canale FL-1 (fluorescenza verde).

I neutrofili sono stati selezionati secondo i parametri di forward and 90° light scatter. Per ogni campione sono stati acquisiti 10.000 eventi. I risultati sono stati espressi come Intensità Media di Fluorescenza (MFI).

Fagocitosi

La fagocitosi è stata valutata utilizzando il "Phagotest kit" (Opregen Pharma, Heidelberg, Germany) che permette di valutare la percentuale di fagociti in grado di ingerire batteri opsonizzati di Escherichia coli (E.coli) marcati con fluoresceina (FITC). In breve, 100 µl di sangue intero in eparina portato in ghiaccio ad una temperatura di 0 °C, è stato incubato con 20 µl di batteri di E.coli marcati FITC a 37 °C a bagnomaria per 10 minuti mentre un campione di controllo negativo è rimasto in ghiaccio. La fagocitosi è stata fermata riponendo il campione in ghiaccio e aggiungendo la soluzione di "quenching", che elimina la fluoresceina dei batteri legati alla superficie e lascia inalterata la fluorescenza delle particelle ingerite, permettendo così di discriminare tra l'adesione e l'assunzione interna di batteri.

Seguono due lavaggi con la "washing solution" e la lisi degli eritrociti con l'aggiunta della "lysing solution". Dopodiché è stata aggiunta una soluzione colorante il DNA "DNA staining solution" che permette di eliminare gli aggregati artefatti di batteri o di cellule e il campione quindi è stato letto al citofluorimetro. I neutrofili sono stati selezionati secondo i parametri di forward and 90° light scatter. Per ogni campione sono stati acquisiti 10.000 eventi. I risultati sono stati espressi come valori percentuali di neutrofili fluorescenti (FITC), calcolati sottraendo la percentuale del controllo negativo (<1%) dal campione positivo.

Burst Ossidativo

Il burst ossidativo è stato studiato utilizzando il "Phagoburst kit" (Glycotope Biotechnology GmbH, Heidelberg, Germany). Questo Kit contiene batteri opsonizzati di E.coli non marcati, forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) e peptide chemiotattico N-formil-Met-Leu-Phe (fMLP) come stimolanti, diidrorodamina (DHR) 123 come substrato fluorogenico e permette di valutare la percentuale di fagociti che producono ossidanti reattivi (conversione di DHR 123 a Rodamina 123).

In breve 100 μ l di sangue intero in eparina è stato incubato con i vari stimolanti a 37 °C e un campione con solo sangue è stato utilizzato come controllo negativo. Sotto stimolazione, i granulociti producono metaboliti reattivi dell'ossigeno (anione superossido, perossido di idrogeno, acido ipocloroso) che distruggono i batteri all'interno del fagosoma.

La formazione di reattivi ossidanti durante il burst ossidativo è stata monitorata attraverso l'aggiunta e l'ossidazione di DHR 123. La reazione è stata stoppata con l'aggiunta della "lysing solution" che elimina gli eritrociti e consente una parziale fissazione dei leucociti. Dopo uno step di lavaggio con la "wash solution", è stato aggiunto un colorante del DNA "DNA staining solution" per eliminare gli artefatti e i campioni sono stati letti al citofluorimetro. I neutrofili sono stati selezionati secondo i parametri di forward and 90° light scatter. Per ogni campione sono stati acquisiti 10.000 eventi. I risultati sono stati espressi come valori percentuali di neutrofili che producono radicali dell'ossigeno.

Tutte le valutazioni citofluorimetriche sono state fatte utilizzando come citofluorimetro l'Epics XL - MCL a quattro colori e l'analisi è stata effettuata con il software EXPO32 ADC Analysis™ entrambi della Beckman Coulter.

Stimolazione in vitro dei neutrofili Lipopolisaccaride (LPS) indotta

I Neutrofili isolati da n.5 donatori sani, da 5 MGUS e da 5 MM, sono stati messi in coltura in incubatore con il 5% di CO₂ a 37 °C in assenza ed in presenza di LPS (Sigma Tau) alla concentrazione di 5 ug/ml. Ai tempi indicati di 1,2,6 e 24 ore, 1x10⁶ cellule di ogni condizione sperimentale, sono state marcate con 10 µl dei seguenti anticorpi monoclonali coniugati FITC: CD64, CD16, CD62L, CD11b ed incubate per 20 minuti al buio a temperatura ambiente. Le cellule quindi sono state lavate due volte con PBS, risospese in 300 µl di PBS e analizzate al citofluorimetro. I neutrofili sono stati selezionati secondo i parametri di forward and 90° light scatter. Per ogni campione sono stati acquisiti 10.000 eventi. I risultati sono stati espressi come Intensità Media di Fluorescenza (MFI) e ogni condizione sperimentale con LPS è stata normalizzata rispetto al proprio controllo negativo (senza LPS).

Estrazione dell'RNA e Real time RT-PCR per l'espressione genica di Arginasi-1 e PROK-2/BV8

L'RNA è stato estratto utilizzando il reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Il cDNA è stato sintetizzato mediante trascrizione inversa con Applied Biosystem kit (Foster City, CA, USA). L'espressione genica è stata valutata con il kit TaqMan Gene Expression (Applied Biosystem) e la quantificazione è stata effettuata utilizzando il metodo di rivelazione 7900HT Fast Start Real-Time PCR (Applied Biosystem). È stata analizzata l'espressione di Arg-1 e PROK-2/BV8 .

Per ogni paziente, il livello di espressione genica è stato eseguito in triplicato e normalizzato utilizzando il GAPDH come controllo interno.

ELISA per la valutazione nel siero di Arginasi-1 e PROK-2/BV8

Arg-1 e BV8 sono stati valutati anche nel siero di donatori sani (n.20) e di pazienti con MGUS (n.20) e con MM (n.20) utilizzando kit ELISA (BioVendor CS058 e CUSABIO CSB-EL018747HU rispettivamente) e seguendo le opportune istruzioni. Per la raccolta del siero, il campione di sangue è stato centrifugato entro 2 ore a 1600 xg per 10 minuti a temperatura ambiente e il surnatante è stato conservato a -80 °C per un tempo non superiore a 2 mesi. L'assorbanza è stata valutata a 450 nm tramite spettrofotometro e la concentrazione di Arg1 e PROK2 è stata calcolata sulla base della curva standard.

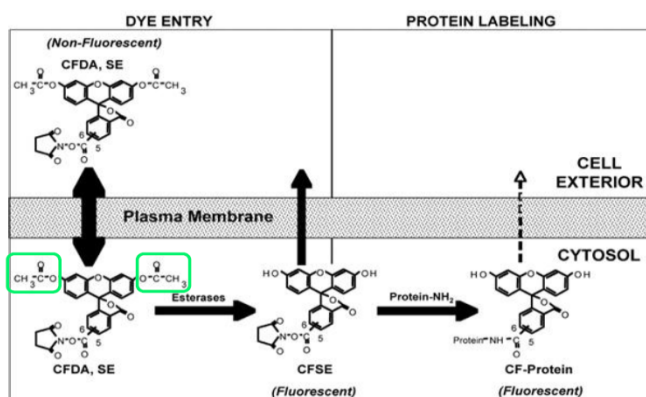
Valutazione dell'attività soppressiva dei neutrofili

Per valutare l'attività soppressiva dei neutrofili, abbiamo valutato la loro capacità di inibire la proliferazione e l'attivazione dei T-linfociti.

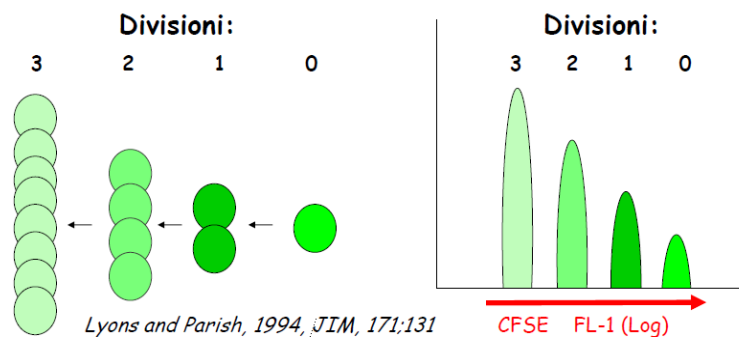
➤ Proliferazione T- cellulare

La capacità immunosoppressiva dei neutrofili è stata analizzata mediante co-coltura con i linfociti T allogenici marcati con Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) e stimolati con fitoemoagglutina (PHA).

Il CFSE è una molecola fluorescente lipofila, in grado di diffondere liberamente attraverso la membrana cellulare. All'interno della cellula i gruppi acetati sono rimossi da esterasi, rendendo la molecola incapace di attraversare la membrana.



I T-linfociti isolati da n. 5 donatori sani sono stati marcati incubando 5×10^5 cellule a 37°C per 20 minuti in 1ml di PBS contenente CFSE 1 μ M (BD Phamigen). Le cellule sono state in seguito stimulate con 5mg/ml di PHA (Sigma-Aldrich) per indurre la proliferazione T-cellulare e messi in co-coltura con i neutrofili (N) ottenuti da n.5 MM, n.5 MGUS e n. 5 soggetti sani in rapporto 1:2 e 1:8. La proliferazione dei T-linfociti è stata misurata valutando la diluizione del CFSE in citometria a flusso dopo 72 ore di incubazione. Infatti durante la mitosi, ogni cellula figlia erediterà una quantità dimezzata di CFSE e la fluorescenza di conseguenza sarà dimezzata.



Come controllo positivo è stato utilizzato il campione di soli T-linfociti marcati con CFSE e stimolati con PHA e come controllo negativo i soli T-linfociti marcati con CFSE ma non stimolati con PHA.

✧ **Attivazione T-cellulare**

Contemporaneamente, i T-linfociti allogenici isolati da n. 5 donatori sani sono stati lavati due volte con PBS contenente 0,2% di albumina di siero bovino (BSA) e 0,1% di sodio azide e sono stati messi in una piastra a 96 pozzetti in polipropilene alla concentrazione 5×10^5 cellule/pozzetto. Dopo stimolazione con PHA (5 mg/ml) sono stati messi in co-coltura con i neutrofili (N) isolati da n.5 MM, n.5 MGUS e n. 5 soggetti sani in rapporto

1: 2 e 1: 8. Ai tempi di incubazione indicati di 24, 48 e 72 ore, è stata valutata l'espressione sui T-linfociti di alcuni marcatori di attivazione quali: HLA-DR, CD69 e CD71 e come controllo, abbiamo usato i soli T-linfociti PHA-stimolati.

Pertanto, 5×10^5 cellule di ogni condizione sperimentale sono state marcate con 10 μ l dei seguenti anticorpi monoclonali (Beckman Coulter):HLA-DR-PC5 (Clone Immu-357), CD3 ECD (clone UCHT1), CD69 PE (clone TP1.55.3), CD71 FITC (clone DYJ1.2.2) e incubate per 30 minuti al buio e a temperatura ambiente. Le cellule quindi sono state lavate due volte con PBS, risospese in 300 μ l di PBS e analizzate al citofluorimetro. Per ogni condizione sono stati acquisiti 10.000 linfociti T CD3 positivi.

L'espressione dei marcatori valutati è stata riportata come valore percentuale sul gate side light scatter (SSC)/CD3+.

Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state effettuate mediante GraphPad Prism version 6.00 per Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com. I dati sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard (DS). Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo per le differenze tra i gruppi sperimentali e i gruppi di controllo. Il confronto tra i vari gruppi è stato effettuato tramite t-test o ANOVA test. Le associazioni tra le variabili sono state valutate tramite regressione lineare.

Risultati

Incremento delle G-MDSC nei pazienti affetti da MGUS e MM

Abbiamo riscontrato un aumento delle G-MDSC (CD11b+/CD33+/CD14⁻/HLADR^{low}-) sia su PBMC che su PB di pts con MM rispetto ad MGUS e HS: 22.2±0.8, vs 7.3±1.1, vs 3.1± 0.7 rispettivamente su PBMC (Figura 1 B) e 61.2±1.6, vs 56.2±1.2, vs 51.7±1.4 rispettivamente su PB (Figura 2B).

Le figure 1A e 2A sono immagini rappresentative dei dot plots dell' analisi citofluorimetrica delle G-MDSC valutate rispettivamente su PBMC e su PB.

Le G-MDSC sono più alte nei pts con estesa malattia ossea (almeno 3 lesioni con X-ray scan, (45.9±8.6% vs 60.2±1.9%, p=0.02), nei pts con LDH ≥2 UPN (53.7 ± 2.2% vs 66.8 ± 3.4%, p=0.0025) e con fibrinogeno ≥450 mg/dL (51.8 ± 3.4% vs 62.9 ± 2.2%, p=0.01, Tabella 2).

Poichè le G-MDSC nel sangue periferico hanno un fenotipo sovrapponibile a quello dei granulociti maturi, abbiamo valutato la ratio tra il numero assoluto dei neutrofili e il numero assoluto dei linfociti (NLR) e abbiamo riscontrato che i pts con MM hanno una NLR più alta rispetto ad MGUS e HS: 3.2 ± 0.4% vs 1.8 ± 0.08% (p=0.0002), vs 1.6 ± 0.07%, (p=0.0029) rispettivamente (Figura 3 A) e questa correla positivamente con la percentuale di G-MDSC in pb.(r²=0.60, p<0.0001, Tabella 2 e Figura 3B).

Tabella 2. G-MDSC pb e variabili cliniche nel MM

Clinical variable	G-MDSC	
	Mean $\pm$ SEM	p-value
ISS stage 1-2	57.9 $\pm$ 2.8	0,97
ISS stage 3	57.7 $\pm$ 3.0	
Albumin <3.5 g/dL	60.8 $\pm$ 4.2	0,4
Albumin $\geq$ 3.5 g/dL	56.7 $\pm$ 2.4	
Beta-2 microglobulin <5.5 g/dL	57.3 $\pm$ 2.6	0,71
Beta-2 microglobulin $\geq$ 5.5 g/dL	59.1 $\pm$ 3.5	
Bone lesions 0-2	45.9 $\pm$ 8.6	0,02
Bone lesions >2	60.2 $\pm$ 1.9	
LDH <2UPN	53.7 $\pm$ 2.2	0,0025
LDH $\geq$ 2 UPN	66.8 $\pm$ 3.4	
Fibrinogen < 450 mg/dL	51.8 $\pm$ 3.4	0,01
Fibrinogen $\geq$ 450 mg/dL	62.9 $\pm$ 2.2	
ESR < 40mm/hour	58.5 $\pm$ 3.8	0,85
ESR $\geq$ 40mm/hour	57.5 $\pm$ 2.6	
C-RP <5 mg/L	58.4 $\pm$ 3.7	0,83
C-RP $\geq$ 5 mg/L	57.5 $\pm$ 2.5	
Normal cytogenetics	55.8 $\pm$ 2.5	0,92
Abnormal cytogenetics	56.3 $\pm$ 2.2	
NLR $\leq$ 2	46.7 $\pm$ 1.9	<0,0001
NLR $\geq$ 2	66.0 $\pm$ 1.5	
LMR >2.9	55.1 $\pm$ 2.0	0,01
LMR $\leq$ 2.9	66.5 $\pm$ 3.4	
Plasma cells in bone marrow <50 %	55.5 $\pm$ 3.4	0,35
Plasma cells in bone marrow $\geq$ 50 %	59.7 $\pm$ 2.4	

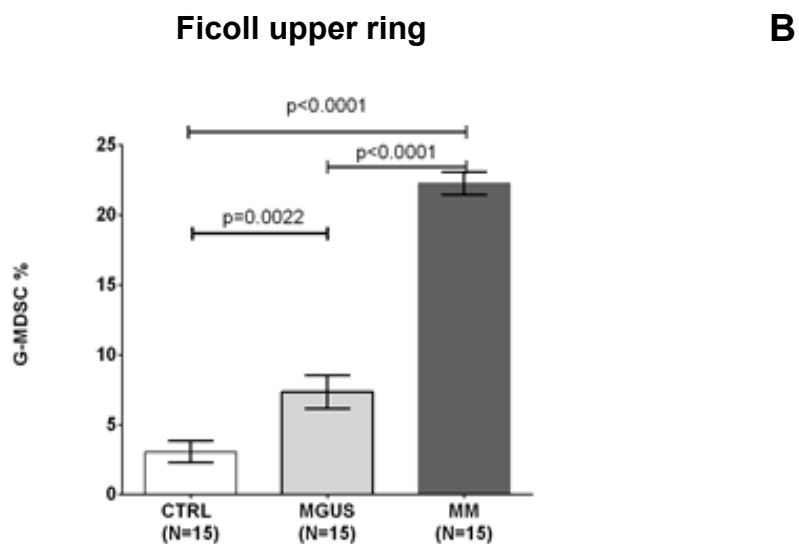
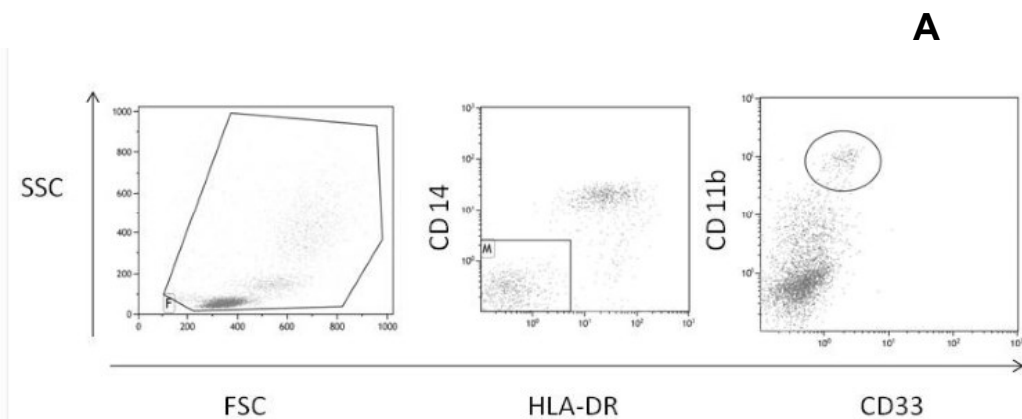
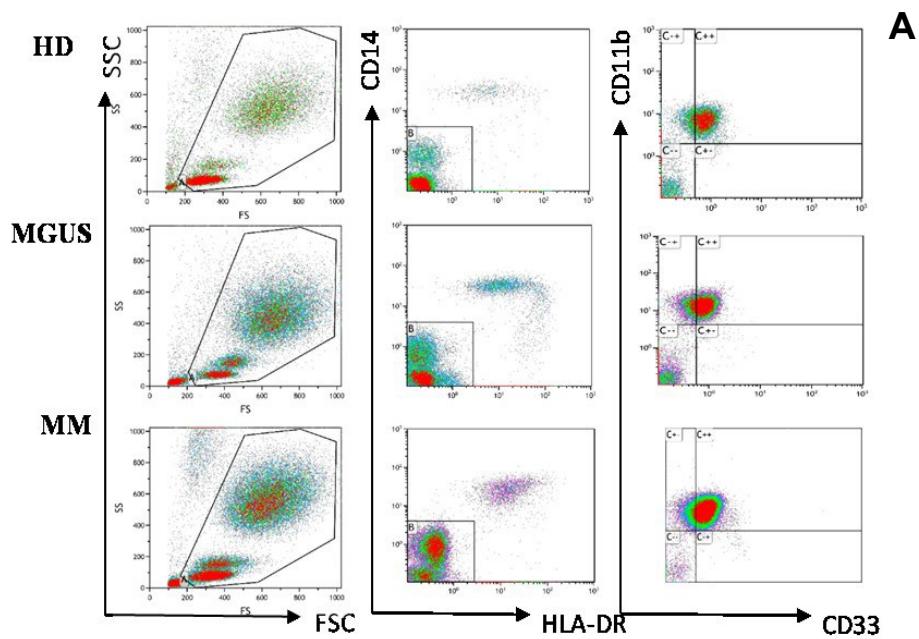


Figura 1. (A) Dot plots rappresentativi dell'analisi citofluorimetrica eseguita tramite gate sequenziali delle G-MDSC (CD11b+CD33+CD14-HLADR^{-/low}.) nella frazione PBMC di un soggetto con MM. **(B)** Media $\pm$ DS, delle cellule G-MDSC nel PBMC di soggetti sani (Ctrl), MGUS e MM.



Sangue Periferico

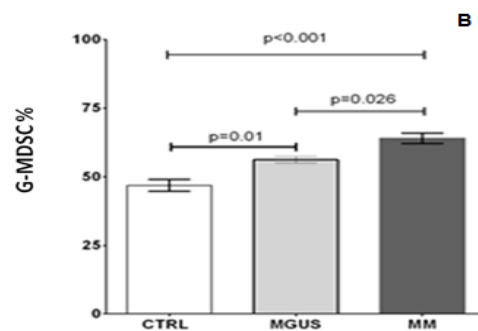


Figura 2. (A) Dot plots rappresentativi dell'analisi citofluorimetrica eseguita tramite gate sequenziali delle G-MDSC (CD11b+CD33+CD14-HLA-DR^{low}.) nel PB di un soggetto sano, (HD), MGUS e MM.

(B) Media $\pm$ DS, delle cellule G-MDSC nel PB di soggetti sani (Ctrl), MGUS e MM.

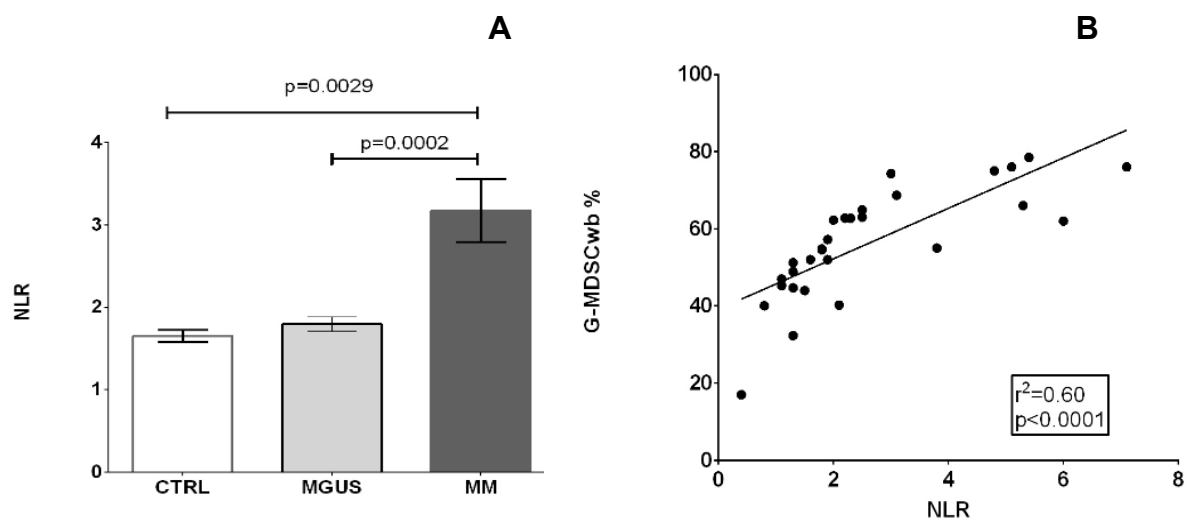


Figura 3. (A) NLR in n.30 soggetti sani, n.30 MGUS e n.30 pts con MM alla diagnosi.

(B) correlazione tra percentuale di GMDSC in PB e NLR nei pts con MM.

I neutrofili di MM hanno un'alterata espressione dei marcatori di superficie

I neutrofili di MM (N-MM), rispetto a quelli di MGUS (N-MGUS) e dei donatori sani (N-HS) hanno un' aumentata espressione di CD64 ($p=0.02$ e $p=0.01$), di CD11b ($p=0.03$ e $p=0.04$) ed una ridotta espressione di CD62L ($p=0.04$ e $p=0.0003$). Il CD16 è ridotto sia nei N-MM che nei N-MGUS rispetto a N-HS ($p=0.02$ e $p=0.009$).

Non abbiamo osservato differenze significative tra N-MGUS e N-HS nell'espressione degli antigeni CD64 ,CD11b , CD62L.

I risultati sono riassunti nella Tabella 3 e Figura 4 A-D.

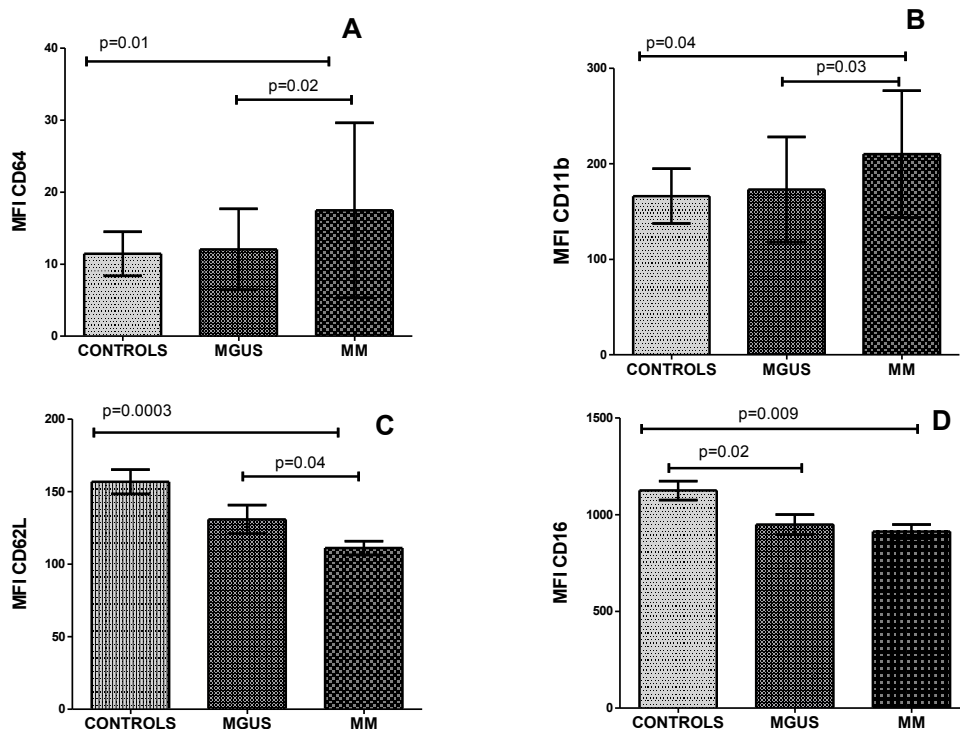


Figura 4. MFI dei seguenti markers: (A) CD64,(B) CD11b,(C) CD62L,(D) CD16, valutati in citometria sulla superficie dei neutrofili di soggetti sani (controls), di MGUS e di MM.

Alterata attività funzionale dei N-MM

Abbiamo valutato allo steady state l'attività funzionale dei neutrofili in termini di produzione di ROS, di attività fagocitica e burst ossidativo. I risultati sono riassunti nella Tabella 3 e Figura 5 E-F-G.

N-MM, rispetto a N-MGUS e N-HS presentano elevati livelli di ROS ($p=0.0001$ e $p<0.0001$, Fig. 5 E), ridotta attività fagocitica ($p=0.02$ e $p=0.002$, Fig. 5 F), e ridotta capacità di burst ossidativo ($p=0.01$ e $p=0.0003$, Fig. 5 G).

N-MGUS rispetto a N-HS hanno un' aumentata produzione di ROS ($p=0.02$, Fig. 5 E) e una parziale e non significativa riduzione dell'attività fagocitica e di burst ossidativo (Fig. 5 F-G).

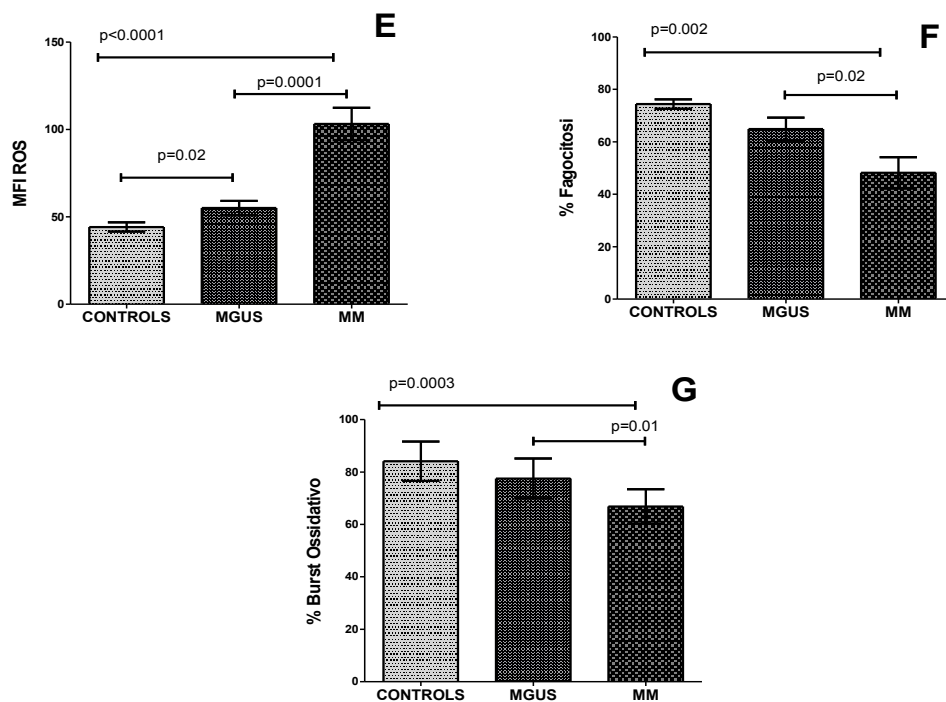


Figura 5. Valutazione in citometria sulla popolazione neutrofila di: (E) ROS (MFI), (F) di fagocitosi (%), (G) di burst ossidativo (%).

Tabella 3 Espressione dei recettori di superficie e attività funzionale (ROS, fagocitosi, e burst ossidativo attività) dei neutrofili in soggetti sani, MGUS e MM.

		Media $\pm$ deviazione standard	p-valore
MFI CD64	Controlli	11 $\pm$ 3	
	MGUS	12 $\pm$ 6	§ p=n.s.
	MM	17 $\pm$ 12	# p=0.01, *p=0.002
MFI CD16	Controlli	1125 $\pm$ 178	
	MGUS	948 $\pm$ 228	§ p=0.02
	MM	913 $\pm$ 273	# p=0.009, *p=ns
MFI CD62L	Controlli	157 $\pm$ 26	
	MGUS	131 $\pm$ 45	§ p=n.s.
	MM	119 $\pm$ 38	# p=0.0003, *p=0.04
MFI CD11b	Controlli	166 $\pm$ 28	
	MGUS	187 $\pm$ 47	§ p=n.s.
	MM	210 $\pm$ 66	# p=0.04, *p=0.03
Attività Fagocitica (%)	Controlli	74 $\pm$ 6	
	MGUS	65 $\pm$ 19	§ p=n.s.
	MM	48 $\pm$ 24	# p=0.002, *p=0.02
ROS production	Controlli	44 $\pm$ 11	
	MGUS	55 $\pm$ 14	§ p=0.02
	MM	103 $\pm$ 33	# p<0.0001, *p=0.0001
Burst Ossidativo (%)	Controlli	84 $\pm$ 7	
	MGUS	77 $\pm$ 7	§ p=n.s.
	MM	67 $\pm$ 6	# p=0.0003, *p=0.01

n.s : p non statisticamente significativa

MM vs Controlli

* MM vs MGUS

§ MGUS vs Controlli

Espressione in vitro dei marcatori di superficie cellulare dopo esposizione con LPS

Abbiamo valutato in vitro, come viene modulata l'espressione sui neutrofili degli antigeni di superficie, precedentemente studiati nel PB, dopo 1, 2, 6, 24 ore di esposizione al LPS. Abbiamo normalizzato il valore di MFI di ogni condizione sperimentale in presenza di LPS, con la rispettiva condizione sperimentale priva di LPS, attribuendo a quest'ultima il valore arbitrario di 100. Abbiamo osservato che i N-MM incubati con LPS modulano in maniera differente l'espressione di CD64,CD11b,CD16,CD62L rispetto a N-MGUS e N-HS.

N-MGUS hanno una cinetica di espressione di questi antigeni simile a quella di N-HS. (Figura 6 A-D)

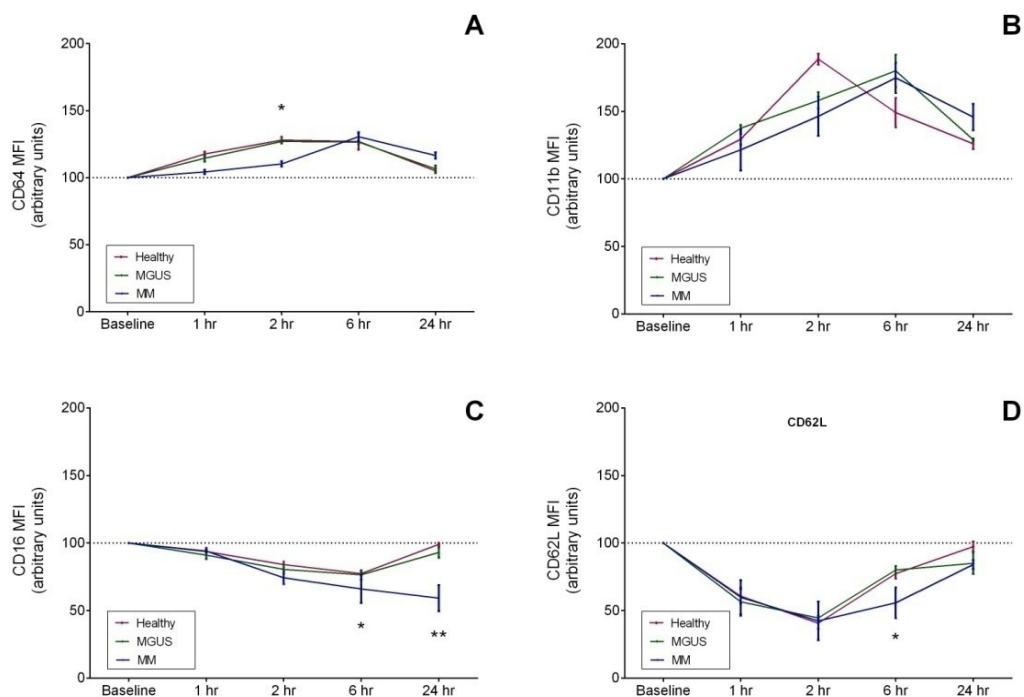


Figura 6. Espressione di CD64 (A), CD11b (B), CD16 (C) e CD62L (D) sulla superficie dei neutrofili isolati da soggetti sani (Healthy), MGUS e MM dopo esposizione a LPS per 1, 2, 6, 24 ore.

I risultati rappresentano la media $\pm$ SD di 5 donatori sani, 5 MGUS e 5 MM.

L'espressione di Arginasi-1, un mediatore di immunosoppressione, è aumentata nei pazienti con MM

Abbiamo studiato l'espressione di Arg-1 in N-MM, N-MGUS e N-HS isolati da PB e abbiamo assegnato il valore arbitrario di 1 all'espressione di Arg-1 in N-HS.

In N-MM, l'espressione di ARG-1 è aumentata rispetto a N-MGUS e a N-HS (26.5 ± 3.7 vs 1.8 ± 0.5 , vs 1, $p=0.001$ e $p=0.001$ rispettivamente) (Figura 7A).

Arginasi-1 è aumentata nel siero di pazienti con MM

Similmente, abbiamo riscontrato aumentati livelli sierici di Arg-1(s Arg-1) nei pts con MM rispetto ai pts con MGUS e ai soggetti sani (183.6 ± 21.9 vs 88.3 ± 15.6 vs 98.8 ± 11.4 ng / ml $p = 0,002$). I livelli di s Arg-1 nei pts con MGUS sono simili a quelli dei soggetti sani. (Range calibrazione 5-320 ng/ml). (Figura 7 B).

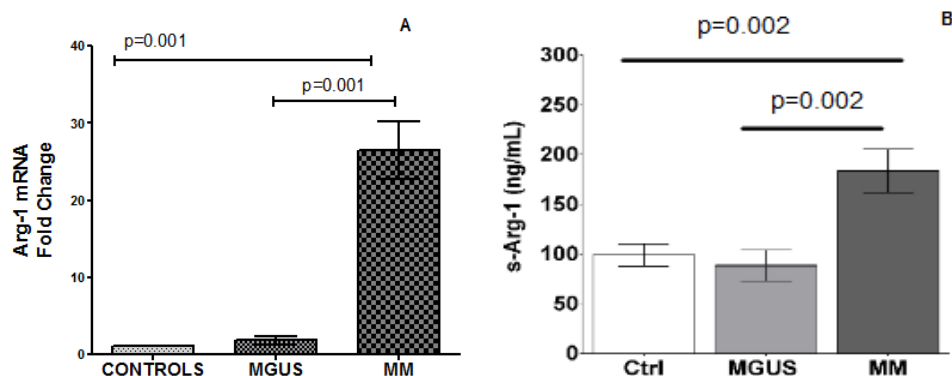


Figure 7. (A) Espressione di Arginasi-1 mRNA sui neutrofili isolati da PB di soggetti sani (Controls), MGUS e MM. (B) Livelli sierici di Arginasi-1 in soggetti sani (Ctrl), MGUS e MM.

L'espressione di PROK-2/BV8 è aumentata nei pazienti con MM

Abbiamo studiato l'espressione di BV8 in N-MM, N-MGUS e N-HS isolati da PB e abbiamo assegnato il valore arbitrario di 1 all'espressione di BV8 in N-HS.

Rispetto ai N-HS, l'espressione di BV-8 è aumentata sia nei N-MGUS (21 ± 11 , $p=0,004$.) che nei N-MM (292 ± 68 $p<0.0001$, Figura 8 A).

PROK-2/BV8 è aumentato nel siero di pazienti con MM

Abbiamo riscontrato aumentati livelli sierici di BV8 nei pts con MM rispetto ai pts con MGUS e ai soggetti sani (32.6 ± 6.5 vs 16.7 ± 7 vs 13.5 ± 4.7 pg/ml $p = 0.002$ e $p<0.0001$ rispettivamente). I livelli di BV8 nei pts con MGUS sono simili a quelli dei soggetti sani (Range calibrazione 6.25-400 pg/ml). (Figura 8 B).

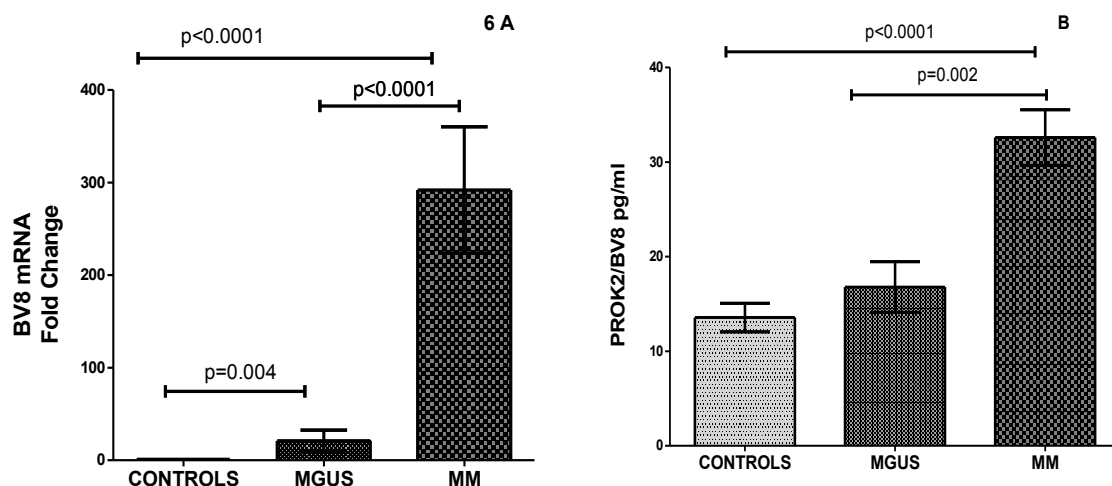


Figure 8. (A) Espressione di BV8 mRNA sui neutrofili isolati da PB di soggetti sani (Controls), MGUS e MM. (B) Livelli sierici di BV8 in soggetti sani (Ctrl), MGUS e MM.

I Neutrofili di MM inibiscono la proliferazione T-cellulare

Per valutare l'eventuale attività immunosoppressiva dei neutrofili, abbiamo testato la loro capacità di inibire la proliferazione T cellulare, mettendo in coltura i neutrofili isolati da MM, MGUS e donatori sani con i linfociti allogenici di soggetti sani marcati con CFSE e stimolati con PHA.

Dopo 72 h di stimolazione mitogena (PHA), abbiamo notato che alla ratio 1:8, la percentuale di cellule CFSE negative passa da $58\pm4\%$ nel controllo positivo (soli linfociti stimolati con PHA), a $57.4\pm3.7\%$, $51\pm4\%$ e $36.8\pm3\%$ nelle coculture con i neutrofili rispettivamente di donatori sani, di MGUS e MM. Abbiamo riscontrato pertanto una inibizione della proliferazione T-cellulare del $12\pm6\%$ ($p=0.03$) nei N-MGUS e del $37\pm4\%$ ($p<0.0001$) nei N-MM (Figura 9 A e B).

Nei N-MM ma non nei N-MGUS abbiamo osservato un effetto inibitorio anche alla ratio 1:2 (dati non mostrati).

Il trattamento con 200 μ M di nor-NOHA, un inibitore Arg-1, recupera parzialmente tale effetto inibitorio, 57.6 ± 2 ($p=0.01$) e 51.2 ± 3 ($p<0.0001$) rispettivamente per N-MGUS e N-MM. (Figura 10).

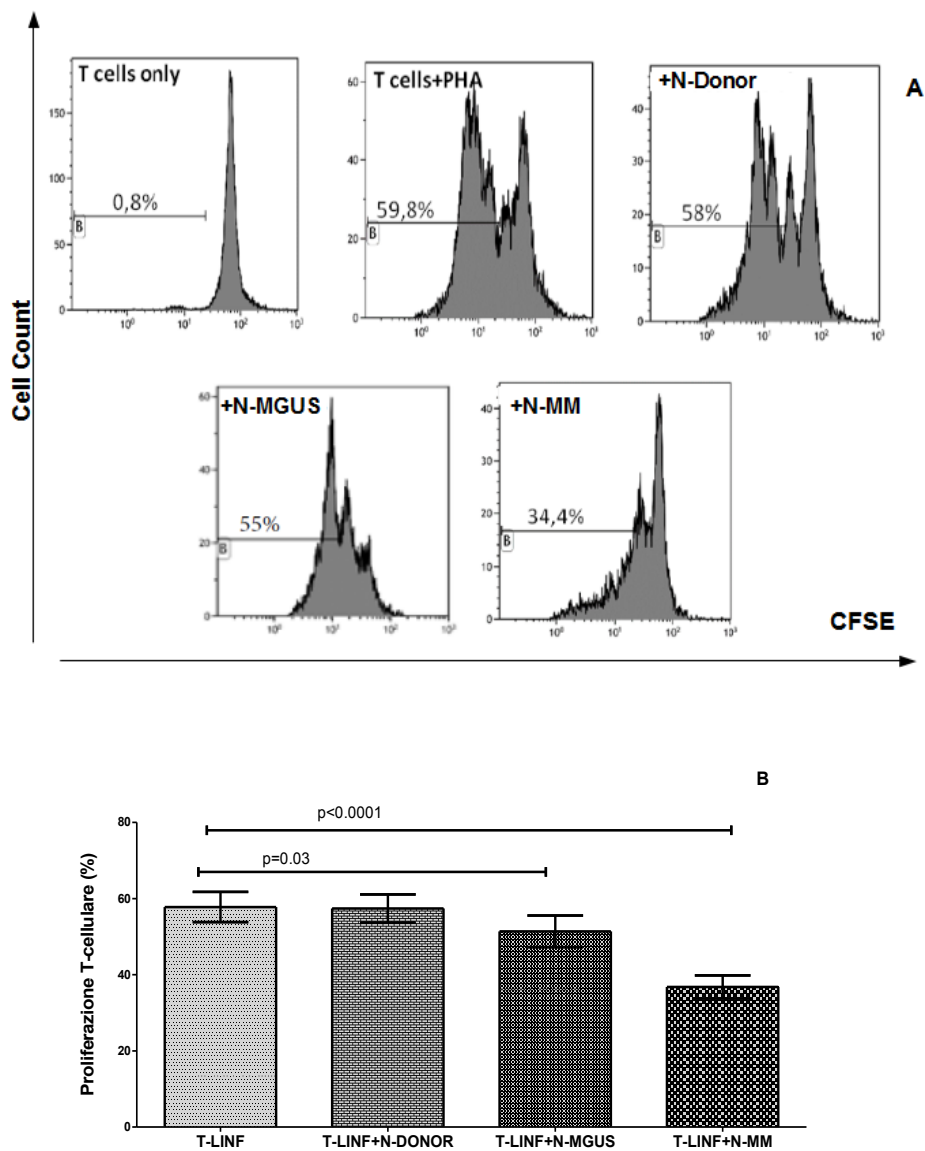


Figura 9. (A) istogrammi rappresentativi l'analisi citofluorimetrica della proliferazione cellulare, nei linfociti allogenici+PHA e in presenza di neutrofili di Donor, MGUS e MM. (B) media $\pm$ DS della proliferazione cellulare di 5 donatori sani, 5 MGUS e 5 MM.

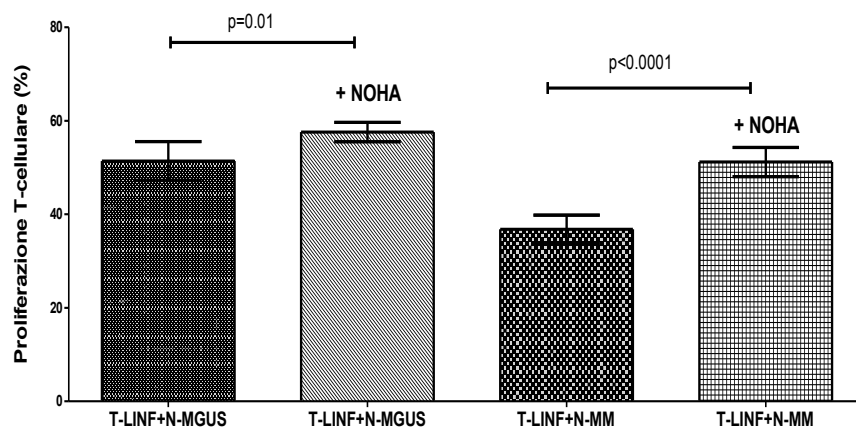


Figura 10. Media $\pm$ DS della proliferazione cellulare di 5 MGUS e 5 MM in presenza di NOHA 200uM, un inibitore di Arg-1.

I Neutrofili di MM inibiscono l'attivazione T-cellulare

Abbiamo valutato la capacità di stimolazione dei T-linfociti di donatori sani stimolati con PHA da soli e in cocoltura con i neutrofili di donatori sani, di MGUS e MM. Abbiamo pertanto monitorato in citometria, l'espressione sui T-linfociti di alcuni marcatori di attivazione quali CD69, CD71 e HLA-DR.

Abbiamo osservato che nei T-linfociti di donatori sani+PHA, il CD69 ha un picco di espressione a 24 ore dopodiché si riduce a 48 e a 72 ore in maniera tempo dipendente. Il CD71 e HLA-DR sono markers di attivazione più tardivi rispetto al CD69, infatti hanno incremento tempo dipendente con un picco a 72 ore.

L'espressione di questi markers è down-regolata nella cocoltura con i N-MM alla ratio 1:2 e 1:8. I N-MGUS downregolano parzialmente l'espressione di questi markers alla ratio 1:8 ma non alla ratio 1:2 (Figura 11).

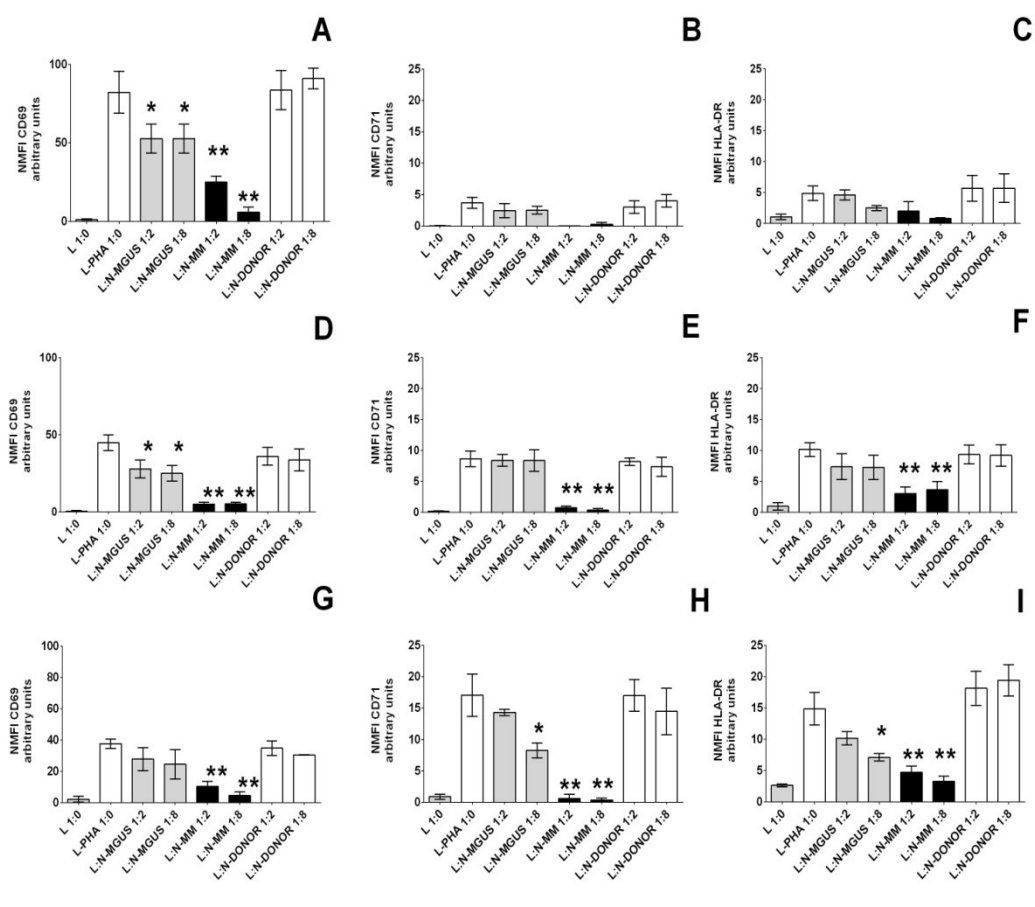


Figure 11. Linfociti di donatori sani in presenza o meno di PHA e in cocoltura con i neutrofili isolati da donatori sani, MGUS e MM alla ratio 1:2 e 1:8. Valutazione di CD69,CD71,HLA-DR dopo 24 ore (A-B-C), 48 ore (D-E-F) e 72 ore (G-H-I). I risultati rappresentano la media $\pm$ DS di 5 donatori sani, 5 MGUS e 5 MM.

Discussione

Il microambiente gioca un ruolo chiave nella patogenesi e nella progressione del MM. L'interazione tra cellule di MM e microambiente, che avviene principalmente attraverso l'espressione di molecole di adesione, comporta la produzione di numerose citochine e fattori di crescita, i quali agendo in modo autocrino e paracrino innescano diversi pathways che determinano l'aumentata regolazione di proteine che a loro volta attivano il ciclo cellulare con funzione anti-apoptotica, pro-proliferativa e pro-angiogenica supportando così la crescita e la sopravvivenza cellulare. Allo stesso tempo, l'interazione tra cellule di MM e microambiente determina alterazioni significative del microambiente stesso che sono alla base dei segni quali anemia, immunosoppressione, switch angiogenico e alterazioni del rimodellamento osseo che distinguono il MM sintomatico da quello indolente.

Un possibile meccanismo di immunosoppressione recentemente riportato nel MM, è l'espansione delle cellule mieloidi soppressorie (MDSC).

Le MDSC sono una popolazione eterogenea di cellule mieloidi in diversi stadi di maturazione, che aumentano nel sangue periferico e negli organi linfoidi di animali portatori di tumore e di pazienti affetti da cancro e che inibiscono la risposta immunitaria antitumorale attraverso l'inibizione della proliferazione delle cellule T, la secrezione di citochine e il reclutamento di cellule T regolatorie. Le MDSC promuovono anche l'angiogenesi e la formazione di metastasi.

Vari fattori, tra cui GM-CSF, COX2, IL-6, VEGF prodotti dalle cellule tumorali e dal microambiente tumorale sono coinvolti nell'espansione e nell'attivazione delle MDSC. E' stato anche dimostrato che l'ipossia può modulare la funzione e il differenziamento di queste cellule.

Una prima osservazione emersa da questo studio è che i pazienti con MM all'esordio, hanno aumentati livelli di G-MDSC su PBMC rispetto ai pazienti con MGUS e ai soggetti sani. Questo dato conferma quanto riportato in letteratura, senonchè diversi autori sostengono che le G-MDSC siano in realtà neutrofili attivati con una densità più bassa, motivo per cui si ritrovano nello strato di cellule mononucleate. La centrifugazione su gradiente di

densità è un metodo ampiamente utilizzato per isolare le G-MDSC umane nei pazienti con tumore, tuttavia la metodica stessa potrebbe contribuire alla attivazione delle cellule granulocitarie e tra l'altro nella maggior parte di questi studi non ci sono dati sulle differenze funzionali tra queste G-MDSC e i neutrofili degli stessi pazienti. Di recente, abbiamo dimostrato che nei pazienti con leucemia mieloide cronica, i leucociti polimorfonucleati maturi hanno la stessa capacità immunosoppressiva delle G-MDSC.⁸⁶

Pertanto, abbiamo valutato le G-MDSC su sangue periferico dei pts con MM all'esordio, che risultano aumentate rispetto ai pts con MGUS e ai soggetti sani e correlano con la malattia ossea (lesioni ossee >2), con i livelli di fibrinogeno (≥ 450 mg/dL), con i livelli di LDH (≥ 2 UPN) e con NLR(>2), (tab 2).

Ci sono sempre più evidenze in letteratura che NLR>2 sia un fattore prognostico negativo sia nei tumori solidi che nei linfomi. In un recente lavoro abbiamo dimostrato che NLR combinato all' International Staging System (ISS) contribuirebbe a stratificare meglio i pazienti ad alto rischio e sembrerebbe essere un fattore predittivo di PFS che di OS.⁸⁷

Ad oggi, il significato biologico di NLR e il perchè impatti in maniera negativa sulla prognosi non è stato chiarito.

Un' ipotesi che si potrebbe avanzare è che NLR rifletta la capacità immunosoppressiva delle G-MDSC che sono aumentate nel PB di pts con MM.

Recentemente, l'impairment immunologico nel MM è stato indagato come strumento addizionale nel predire l'outcome di questi pazienti⁸⁸ e la sopravvivenza a lungo termine sarebbe associata ad un distinto profilo immunologico, con ridotta capacità soppressiva.⁸⁹

Le G-MDSC circolanti su PB hanno caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche sovrapponibili a quelle dei neutrofili maturi, cellule essenziali dell'immunità innata che hanno un ruolo fondamentale sia nella difesa dell'ospite contro i microorganismi estranei, sia nel sostenere la progressione tumorale.

Pertanto abbiamo indagato nel sangue periferico i neutrofili di pazienti con MM all'esordio (MM-N) sia dal punto di vista fenotipico che funzionale comparandoli con quelli di MGUS(MGUS-N) e di soggetti sani (HD-N) ipotizzando che nel sangue periferico di pazienti con MM i neutrofili maturi possano essere un surrogato di tutta la popolazione mieloide soppressiva .

Abbiamo valutato l'espressione di recettori di superficie quali CD64, CD16, CD62L e CD11b mediante citometria a flusso. Il CD64 è il recettore ad alta affinità per le IgG ed è un noto marker di attivazione dei neutrofili, promuove il riconoscimento e la fagocitosi di particelle rivestite da IgG e attiva la risposta ossidativa dei neutrofili.⁹⁰⁻⁹¹ Il CD16 è il recettore a bassa affinità per le IgG, costitutivamente espresso sui neutrofili maturi tramite GPI linkage e proteoliticamente clivato da ADAM17 quando i neutrofili diventano apoptotici o attivati. Il CD16 riconosce IgG contenenti immunocomplessi, e può anche favorire una eccessiva attivazione dei neutrofili con il rilascio di elevate quantità di fattori citolitici e pro-infiammatori.⁹²

Il CD62-L (L-selectina) è una molecola di adesione, che media il rolling dei neutrofili alle cellule endoteliali. Esso ha un ruolo importante nella migrazione dei neutrofili dal circolo ematico al sito infiammatorio e si perde rapidamente dopo attivazione dei neutrofili tramite taglio proteolitico. A questo segue l'adesione e la migrazione transendoteliale dei granulociti mediata da beta2 integrine, quali CD11b (CR3, o Mac1) e CD18.⁹³

CD11b/CD18 (Mac-1, CR3) promuove anche la fagocitosi di particelle iC3b rivestite e aumenta la sua espressione rapidamente in seguito all'attivazione dei fagociti. Sia la perdita di CD62L tramite autoproteolisi che l'up-regolazione di CD11b attraverso traslocazione da vescicole citoplasmatiche indicano un'attivazione dei neutrofili.

Abbiamo trovato che MM-N hanno un'alterata espressione dei marcatori di superficie studiati, essendo caratterizzati da un up-regolazione di CD64 e CD11b e da una down-regolazione di CD16 e CD62L. Questo pattern fenotipico riflette uno stato di attivazione del neutrofilo di MM allo steady state.

E' ben noto che nel microambiente di MM, sono aumentate una serie di citochine proinfiammatorie, tra cui l'interleuchina (IL)-8 e il fattore di necrosi tumorale (TNF)- α , che down-regolano l'espressione di CD62L e up-regolano il CD11b, mentre il granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) e interferon- γ (IFN- γ) up-regolano l'espressione del CD64.⁹⁴ Così, in MM, i neutrofili possono essere attivati da diversi stimoli, e questi determinano cambiamenti nell'espressione dei recettori di superficie cellulare, rilascio di proteasi nell'ambiente extracellulare, produzione di chemochine e citochine contribuendo al reclutamento di cellule infiammatorie, ai danni dei tessuti circostanti e alla compromissione della risposta immunitaria.⁹⁵

Abbiamo confermato in vitro dopo esposizione a LPS che MM-N hanno un stato di attivazione aberrante. L'attivazione sistemica dei neutrofili associata a immunoparesi è ben riconosciuta nella sepsi grave, ma poco indagata in ambito MM.

Abbiamo riscontrato che i MM-N hanno un importante difetto dell'attività fagocitica e di burst ossidativo e presentano aumentati livelli di ROS.

La ridotta attività fagocitica potrebbe determinare una maggiore suscettibilità alle infezioni così come una risposta anti-tumorale inefficace.⁹⁶⁻⁹⁷

La fagocitosi è cruciale per l'uccisione di agenti patogeni che vengono internalizzati e distrutti all'interno della cellula. Di solito, è facilitata dalle interazioni tra la frazione Fc delle Ig o da fattori del complemento (iC3b) e FCRS o CR sulla superficie dei fagociti. Le interazioni tra i recettori e i loro ligandi attiva la formazione di fagopodi che portano alla fine alla cattura completa della particella. Dopo la formazione del fagosoma, si ha il rilascio di proteasi e di ROS (burst ossidativo) con la distruzione delle particelle. E' stato dimostrato che Le G-MDSC, isolate dalla milza o dal peritoneo di topi portatori di tumore hanno attività fagocitaria più bassa e più elevati livelli di ROS rispetto ai neutrofili degli stessi comparti.⁹⁸⁻⁹⁹

Abbiamo quindi indagato le proprietà soppressive dei MM-N, riscontrando aumentati livelli di Arginasi-1 sia come espressione che nel siero rispetto ad MGUS e ai soggetti sani.

Arginasi 1 (nota anche come arginasi epatica) è un enzima citosolico, espresso soprattutto negli epatociti e coinvolto nel ciclo dell'urea, che viene indotta in cellule mieloidi murine da citochine di tipo Th2, quali IL-4 e IL-13, da TGF- β e GM-CSF, a differenza dell'altra isoforma, arginasi 2 (o di tipo renale) che è invece un enzima mitocondriale, costitutivamente espresso in cellule renali, neuroni, macrofagi ed enterociti.

Il coinvolgimento dell'enzima ARG1 nell'attività soppressiva è stato riscontrato in diversi modelli tumorali. L'attivazione di arginasi 1 provoca una riduzione di L-arginina extracellulare associata alla down-regolazione della catena CD3 ζ del recettore dei linfociti T (T cell receptor, TCR) con conseguente alterazione della segnalazione a valle e inibizione della proliferazione T-linfocitaria. Infatti la riduzione di L-arginina altera la traduzione e causa l'arresto del ciclo cellulare in fase G0-G1. La privazione di amminoacidi è un meccanismo importante di regolazione della risposta linfocitaria, come dimostrano dati recenti che correlano la soppressione dell'attivazione dei CTL con la deplezione di cisteina da parte delle MDSC o con la riduzione di fenilalanina, indotta da IL-4-induced gene 1 (IL4I1), e del triptofano, causata da indoleamina-2,3-ossigenasi (IDO), ad opera di altre cellule mieloidi regolatorie.

I pazienti con MM rispetto a MGUS e ai donatori sani presentano anche aumentati livelli di PK2/BV8 sia come espressione che nel siero.

E' documentato che le cellule mieloidi CD11b+/Gr1+ hanno aumentati livelli di BV8, proteina coinvolta nei processi di angiogenesi. La produzione di BV8 da parte di queste cellule da un lato favorisce il differenziamento di MDSC in macrofagi, dall'altro lato induce una maggiore mobilitazione di MDSC dal midollo osseo nel flusso sanguigno. I macrofagi infiltranti il microambiente tumorale a loro volta secernono PK2/BV8, portando ad un aumento della proliferazione e della migrazione delle cellule endoteliali, ad un aumento di citochine pro-infiammatorie quali interleuchina (IL) -1 β e IL-12, a una riduzione di citochine antinfiammatorie quali IL-4 e IL-10, contribuendo a modificare il profilo delle citochine nel microambiente tumorale.¹⁰⁰

Da esperimenti di cocoltura abbiamo dimostrato che MM-N inibiscono sia la proliferazione dei T-linfociti, parzialmente ripristinata mediante l'aggiunta di nor-NOHA, un inibitore Arg-1, che la capacità di stimolazione dei T-linfociti valutata tramite l'espressione sulle cellule T di alcuni marcatori di attivazione dopo stimolazione con PHA.

In sintesi, dal nostro studio è emerso che i neutrofili di pazienti con MM sono attivati allo stady state, come dimostrato dalle variazioni fenotipiche dei marcatori di superficie studiati, ma allo stesso tempo sono disfunzionali in quanto hanno un importante difetto di fagocitosi, di burst ossidativo con alti livelli di ROS. Essi hanno anche attività immunosoppressiva documentata dalla capacità di inibire la proliferazione e l'attivazione dei T-linfociti rendendoli anergici. Questi effetti immunosoppressivi potrebbero essere mediati da alti livelli di ROS di Arginasi e di BV8.

In conclusione, il Mieloma Multiplo pur essendo una patologia B-linfoproliferativa presenta importanti alterazioni a carico della componente mieloide granulocitaria.

I difetti riscontrati sui neutrofili potrebbero contribuire a spiegare la maggiore suscettibilità alle infezioni, principale causa di mortalità nei pazienti con MM. Inoltre, queste alterazioni potrebbero essere eventi precoci di disfunzione immunologica poichè i neutrofili di MGUS mostrano un fenotipo più simile a quello dei donatori sani con una parziale disfunzione e una limitata attività immunosoppressiva e pertanto potrebbero avere un ruolo importante nella progressione di malattia.

BIBLIOGRAFIA

1. Borrello I., Can we change the disease biology of multiple myeloma?. *Leukemia research*. 2012; **36** (Suppl1):S3-12
2. Kyle RA., Remsten ED., Therneau TM., Dispenzieri A., Kurtin PJ., Hodnefield JM., Larson DR., Plevak MF., Jelinek DF., Fonseca R., Melton LJ 3rd, Rajkumar SV., Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 2007; **356**(25):2582-90
3. Morgan GJ., Walter BA., Davies FE., The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature reviews. Cancer*. 2012; **12**(5):335-48
4. Mitsiades CS., Mitsiades N., Munshi NC., Anderson KC. Focus on multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2004; **6**(5):439-44
5. Fonseca R., Blood E., Rue M., Harrington D., Oken MM., Kyle RA., Dewald GW., Van Ness B., Van Wier SA., Henderson KJ., Bailey RJ., Greipp PR., Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood*. 2003; **101**(11):4569-75
6. Ribatti D., Nico B., Vacca A., Importance of the bone marrow microenvironment in inducing the angiogenic response in multiple myeloma. *Oncogene*. 2006; **25**(31):4257-66
7. Mitsiades CS., Mitsiades NS., Munshi NC., Richardson PG., Anderson KC., The role of the bone microenvironment in the pathophysiology and therapeutic management of multiple myeloma: interplay of growth factors, their receptors and stromal interactions. *European journal of cancer*. 2006; **42**(11):1564-73

8. Roodman GD., Role of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Journal of bone and mineral research*. 2002 ;**17**(11):1921-5

9. Bianchi G., Munshi NC., Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood*. 2015; **125**(20):3049-58

10. Fowler JA., Mundy, GR., Lwin ST. and Edwards CM., Bone marrow stromal cells create a permissive microenvironment for myeloma development: a new stromal role for Wnt inhibitor Dkk1. *Cancer Research*. 2012; **72**(9):2183–2189

11. Nefedova Y., Landowski TH., and Dalton WS., Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms. *Leukemia*. 2003; **17**(6):1175–1182

12. Chauhan D., Uchiyama H., Akbarali Y., Urashima M., Yamamoto K., Libermannn, TA., Anderson KC. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood* . 1993; **87**(3):1104-12

13. Dankbar B., Padró T., Leo R., Feldmann B., Kropff M., Mesters RM., Serve H., Berdeln WE., Kienast J., Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood*. 2000; **95**(8):2630-36

14. Hideshima T., Chauhan D., Schlossman R., Richardson P., Anderson KC., The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene*. 2001; **20**(33):4519-27

15. Urashima M., Ogata A., Chauhan D., Hatziyanni M., Vidriales MB., Dederda DA., Schlossman RL., Anderson KC., Transforming growth factor-beta1: differential effects on multiple myeloma versus normal B cells. *Blood*. 1996;**87**(5):1928-38

16. Kline M., Donovan K., Wellik L., Lust C., Jin W., Moon-Tasson L., Xiong Y., Witzig TE., Kumar S., Rajkumar SV., Lust JA., Cytokine and chemokine profiles in multiple myeloma; significance of stromal interaction and correlation of IL-8 production with disease progression. *Leukemia research*. 2007;**31**(5):591-98

17. Rajkumar SV., Mesa RA., Fonseca R., Schroeder G., Plevak MF., Dispenzieri A., Lacy MQ., Lust JA., Witzig TE., Gertz MA., Kyle RA., Russell SJ., Greipp PR., Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clin Cancer Res*. 2002;**8**(7):2210-16.

18. Michigami T., Shimizu N., Williams PJ., Niewolna M., Dallas SL., Mundy GR., Yoneda T., Cell-cell contact between marrow stromal cells and myeloma cells via VCAM-1 and alpha(4)beta(1)-integrin enhances production of osteoclast-stimulating activity. *Blood*. 2000;**96**(5):1953-60.

19. Michael Kuehl W. and Leif Bergsagel P., *Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor*. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012;**122**(10):3456-63

20. Bronte V., Apolloni E., Cabrelle A., Ronca R., Serafini P., Zamboni P., Restifo NP., Zanollo P., Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood*. 2000.**96**(12):3838-46

21. Yang L., DeBusk LM., Fukuda K., Fingleton B., Green-Jarvis B., Shyr Y., Matrisian LM., Carbone DP., Lin PC., Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell*. 2004;**6**(4):409-21

22. Kusmartsev SA., Li Y., Chen SH., Gr-1⁺ myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation. *The Journal of immunology*. 2000;**165**(2):779-85.

23. Almand B., Clark JL., Nikitina E., van Beynen J., English NR., Knight SC., Carbone DP., Gabrilovich DL., Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *The Journal of immunology*. 2001;**166**(1):678-89.

24. Gabrilovich DL., Velders MP., Sotomayor EM., Kast WM., Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1⁺ myeloid cells. *The Journal of immunology*. 2001;**166**(9):5398-406

25. Salvadori S., Martinelli G., Zier K., Resection of solid tumors reverses T cell defects and restores protective immunity. *The Journal of immunology*. 2000;**164**(4):2214-20

26. Takeda K., Hatakeyama K., Tsuchiya Y., Rikiishi H., Kumagai K., A correlation between GM-CSF gene expression and metastases in murine tumors. *Int J Cancer*. 1991;**47**(3):413-20

27. Ageitos AG., Ino K., Ozerol I., Tarantolo S., Heimann DG., Talmadge JE., Restoration of T and NK cell function in GM-CSF

- mobilized stem cell products from breast cancer patients by monocyte depletion.*Bone Marrow Transplant.* 1997;**20**(2):117-23
- 28.Ramachandran IR., Martner A., Pisklakova A., Condamine T., Chase T., Vogl T., Roth J., Gabrilovich D., Nefedova Y.,Myeloid-derived suppressor cells regulate growth of multiple myeloma by inhibiting T cells in bone marrow.*The Journal of immunology.*2013;**190**(7):3815-23
- 29.Görgün GT., Whitehill G., Anderson JL., Hideshima T., Maguire C., Laubach J., Raje N., Munshi NC., Richardson PG., Anderson KC.,Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans.*Blood.*2013;**121**(15):2975-87.
- 30.Favaloro J., Liyadipitiya T., Brown R., Yang S., Suen H., Woodland N., Nassif N.,Hart D., Fromm P., Weatherburn C., Gibson J., Ho PJ., Joshua D.,Myeloid derived suppressor cells are numerically, functionally and phenotypically different in patients with multiple myeloma.*Leukemia & lymphoma.* 2014;**55**(12):2893-900
- 31.Van Valckenborgh E., Schouppe E., Movahedi K., De Bruyne E., Menu E., De Baetselier P., Vanderkerken K., Van Ginderachter JA., Multiple myeloma induces the immunosuppressive capacity of distinct myeloid-derived suppressor cell subpopulations in the bone marrow. *Leukemia.* 2012;**26**(11):2424-28
- 32.Kim R., Emi M., Tanabe K., Arihiro K.,Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression.*Cancer Res.* 2006;**66**(11):5527-36.

33. Almand B., Clark JI., Nikitina E., Van Beynen J., English NR., Knight SC., Carbone DP., Gabrilovich DI., Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *The Journal of immunology*. 2001;**166**(1):678-89.
34. Brierie B., Moses HL., Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer. *Cytokine & growth factor reviews*. 2010;**21**(1):49-59
35. Rodriguez PC., Quiceno DG., Zabaleta J., Ortiz B., Zea AH., Piazuelo MB., Delgado A., Correa P., Brayer J., Sotomayor EM., Antonia S., Ochoa JB., Ochoa AC., Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer research*. 2004;**64**(16):5839-49
36. Chang CI., Liao JC., Kuo L., Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. *Cancer research*. 2001;**61**(3):1100-06
37. Davel LE., Jasnias MA., de la Torre E., Gotoh T., Diamant M., Magenta G., Sacerdote de Lustig E., Sales ME., Arginine metabolic pathways involved in the modulation of tumor-induced angiogenesis by macrophages. *FEBS Lett*. 2002;**532**(1-2):216-20
38. Mazzoni A., Bronte V., Visintin A., Spitzer JH., Apolloni E., Serafini P., Zanovello P., Segal DM., Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *The Journal of immunology*. 2002;**168**(2):689-95

- 39.Xia Y., Roman LJ., Masters BS., Zweier JL.,Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain.*The Journal of biological chemistry*. 1998;**273**(35):22635-39

- 40.Xia Y., Zweier JL.,Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages”, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(13):6954-58

- 41.Bronte V., Serafini P., Mazzoni A., Segal DM., Zanovello P.,L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends in immunology*. 2003;**24**(6):302-06

- 42.Ferrara N., Role of myeloid cells in vascular endothelial growth factor-independent tumor angiogenesis. *Current opinion in hematology*. 2010;**17**(3):219-24

- 43.Skubitz KM., Skubitz AP.,Interdependency of CEACAM-1, -3, -6, and -8 induced human neutrophil adhesion to endothelial cells. *Journal of translational medicine*. 2008;**10** (6):78

- 44.Kusmartsev S., Gabrilovich DI.,Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer. *Cancer immunology, immunotherapy* . 2006;**55**(3):237-45.

- 45.Movahedi K., Guilliams M., Van den Bossche J., Van den Bergh R., Gysemans C., Beschin A., De Baetselier P., Van Ginderachter JA.,Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity.*Blood*. 2008;**111**(8):4233-44

46. Fleming TJ., Fleming ML., Malek TR., Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *The Journal of immunology*. 1993;**151**(5):2399-408

47. Sunderkötter C., Nikolic T., Dillon MJ., Van Rooijen N., Stehling M., Drevets DA., Leenen PJ., Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *The Journal of immunology*. 2004;**172**(7):4410-7.

48. Yang R., Cai Z., Zhang Y., Yutzy WH., Roby KF., Roden RB., CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells. *Cancer research*. 2006;**66**(13):6807-15

49. Gallina G., Dolcetti L., Serafini P., De Santo C., Marigo I., Colombo MP., Basso G., Brombacher F., Borrello I., Zanovello P., Biccato S., Bronte V., Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *The Journal of clinical investigation*. 2006;**116**(10):2777-90

50. Huang B., Pan PY., Li Q., Sato AI., Levy DE., Bromberg J., Divino CM., Chen SH., Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer research*. 2006;**66**(2):1123-31

51. Talmadge JE., Pathways Mediate the Expansion and immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells and their relevance to cancer therapy. *Clin Cancer Res., Clinical cancer research*. 2007;**13**(18):5243-48

52. Nagaraj S., Gabrilovich DI., Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells. *Clinical cancer research*. 2008;**68**(8):2561-63
53. Gabrilovich DI., Ostrand-Rosenberg S., Bronte V., Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature reviews. Immunology*. 2012;**12**(4):253-68
54. Pillay J., Kamp VM., van Hoffen E., Visser T., Tak T., Lammers JW., Ulfman LH., Leenen LP., Pickkers P., Koenderman L., A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *The Journal of clinical investigation*. 2012;**122**(1):327-36
55. Griffin JD., Linch D., Sabbath K., Larcom P., Schlossman SF., A monoclonal antibody reactive with normal and leukemic human myeloid progenitor cells. *Leukemia research*. 1984;**8**(4):521-34
56. Greifenberg V., Ribechini E., Rössner S., Lutz MB., Myeloid-derived suppressor cell activation by combined LPS and IFN-gamma treatment impairs DC development. *European journal of immunology*. 2009;**39**(10):2865-76
57. Youn JI., Collazo M., Shalova IN., Biswas SK., Gabrilovich DI., Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice *Journal of leukocyte biology*. 2012;**91**(1):167-81
58. Mandruzzato S., Solito S., Falisi E., Francescato S., Chiarion-Sileni V., Mocellin S., Zanon A., Rossi CR., Nitti D., Bronte V., Zanovello

- P., IL4R α + myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients. *The Journal of immunology*. 2009;**182**(10):6562-68.
59. Schmielau J., Finn OJ., Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer research*. 2001;**61**(12):4756-60
60. Rodriguez PC., Ernstoff MS., Hernandez C., Atkins M., Zabaleta J., Sierra R., Ochoa AC., Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer research*. 2009;**69**(4):1553-60
61. Gabrilovich DL., Nagaraj S., Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews. Immunology* . 2009;**9**(3):162-74
62. Fliedner TM., Cronkite EP., Killamann SA., Bond VP. Granulocytopoiesis. II. Emergence and Pattern of Labeling of Neutrophilic Granulocytes in Humans. *Blood*. 1964; **2**:683-700
63. Dumitru CA., Moses K., Trellakis S., Lang S., Brandau S. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer immunology, immunotherapy*. 2012;**61**(8):1155-67
64. Rada BK., Geiszt M., Kaldi K., Timar C., Ligeti E. Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing. *Blood*. 2004;**104**(9):2947-53

65. Mayadas TN., Cullere X., Lowell CA., The multifaceted functions of neutrophils. *Annual review of pathology*. 2014;**9**:181-218

66. Harboe M., Garred P., Lindstad JK., Pharo A., Müller F., Stahl GL., Lambris JD., Mollnes TE., The role of properdin in zymosan- and Escherichia coli-induced complement activation. *The Journal of immunology*. 2012 ;**189**(5):2606-13

67. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss DS., Weinrauch Y., Zychlinsky A., Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;**303**(5663):1532-35

68. Papayannopoulos V., Metzler KD., Hakkim A., Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology*. 2010;**191**(3):677-91

69. Menegazzi R., Decleva E., Dri P. Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? *Blood*. 2012;**119**(5):1214-6

70. Gunzer M., Traps and hyper inflammation - new ways that neutrophils promote or hinder survival. *British journal of haematology*. 2014;**164**(2):189-99

71. Kruger P., Saffarzadeh M., Weber AN., Rieber N., Radsak M., von Bernuth H., Benarafa C., Roos D., Skokowa J., Hartl D., Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS pathogens*. 2015;**11**(3)

72. Kolaczowska E., Kubes P., Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology*. 2013;**13**(3):159-75
73. Piccard H., Muschel R.J., Opdenakker G., On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2012;**82**(3):296-309
74. Sagiv JY., Michaeli J., Assi S., Mishalian I., Kisos H., Levy L., Damti P., Lumbroso D., Polyansky L., Sionov RV., Ariel A., Hovav AH., Henke E., Fridlender ZG., Granot Z., Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell reports*. 2015;**10**(4):562-73
75. Schmidt H., Bastholt L., Geertsen P., Christensen IJ., Larsen S., Gehl J., von der Maase H. Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: a prognostic model. *British journal of cancer*. 2005;**93**(3):273-78
76. Templeton AJ., McNamara MG., Šeruga B., Vera-Badillo FE., Aneja P., Ocaña A., Leibowitz-Amit R., Sonpavde G., Knox JJ., Tran B., Tannock IF., Amir E. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014;**106**(6)
77. Coffelt SB., Kersten K., Doornebal CW., Weiden J., Vrijland K., Hau CS., Verstegen NJ., Ciampicotti M., Hawinkels LJ., Jonkers J., de Visser KE. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2015;**522**(7556):345-48

- 78.Brandau S., Dumitru CA., Lang S., Protumor and antitumor functions of neutrophil granulocytes. *Seminars in immunopathology*. 2013;**35**(2):163-76
- 79.Munder M., Mollinedo F., Calafat J., Canchado J., Gil-lamaignere C., Fuentes M.,Luckner C., Doschko G., Soler G., Eichmann K., Müller FM., Ho AD., Goerner M., Modolell M., Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood*. 2005;**105**(6):2549-56
- 80.Nathan C., Ding A., Snapshot: reactive oxygen intermediates (ROI). *Cell*. 2010 ;**140**(6):951-951e2
- 81.Leliefeld PH., Koenderman L., Pillay J.,How neutrophils shape adaptive immune responses. *Frontiers in immunology*. 2015;**14**(6):471
- 82.Fridlender ZG., Sun J., Kim S., Kapoor V., Cheng G., Ling L., Worthen GS., Albelda SM.,Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*. 2009;**16**(3):183-94
- 83.Kuang DM., Zhao Q., Wu Y., Peng C., Wang J., Xu Z.,Yin XY., Zheng L., Peritumoral neutrophils link inflammatory response to disease progression by fostering angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*. 2011;**54**(5):948-55
- 84.Jablonska J., Leschner S., Westphal K., Lienenklaus S., Weiss S., Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *The Journal of clinical investigation*. 2010;**120**(4):1151-64

85. Kelkitli E., Atay H., Cilingir F., Guler N., Terzi Y., Ozatli D., Turgut M., Predicting survival for multiple myeloma patients using baseline neutrophil/lymphocyte ratio. *Annals of hematology*. 2014;**93**(5):841-6
86. Giallongo C., Parrinello N., Tibullo D., La Cava P., Romano A., Chiarenza A., Barbagallo I., Palumbo GA., Stagno F., Vigneri P. Di Raimondo F., Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSCs) Are Increased and Exert Immunosuppressive Activity Together with Polymorphonuclear Leukocytes (PMNs) in Chronic Myeloid Leukemia Patients. *PLoS One*. 2014;**9**(7)
87. Romano A., Parrinello NL., Consoli ML., Marchionni L., Forte S., Conticello C., Pompa A., Corso A., Milone G., Di Raimondo F., Borrello I., Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) improves the risk assessment of ISS staging in newly diagnosed MM patients treated upfront with novel agents. *Annals of hematology*. 2015;**94**(11):1875-83
88. Pessoa de Magalhaes RJ., Vidriales MB., Paiva B., Fernandez-Gimenez C., Garcia-Sanz R., Mateos MV., Gutierrez NC., Lecomte Q., Blanco JF., Hernandez J., Delas Heras N., MartinezLopez J., Roig M., Costa ES., Ocio EM., Perez-Andres M., Maiolino A., Nucci M., De La Rubia J., Lahuerta JJ., San-Miguel J.F., Orfao A., Analysis of the immune system of multiple myeloma patients achieving long-term disease control by multidimensional flow cytometry. *Haematologica*. 2013; **98**(1):79–86
89. Bryant C., Suen H., Brown R., Yang S., Favaloro J., Aklilu E., Gibson J., Ho PJ., Iland H., Fromm P., Woodland N., Nassif N., Hart D., Joshua DE., Long-term survival in multiple myeloma is

associated with a distinct immunological profile, which includes proliferative cytotoxic T-cell clones and a favourable Treg/Th17 balance. *Blood Cancer Journal*.2013;**3**(9): e148

90. Qureshi SS., Lewis SM., Gant VA., Treacher D., Davis BH., Brown KA., Increased distribution and expression of CD64 on blood polymorphonuclear cells from patients with the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Clinical and experimental immunology*. 2001;**125**(2):258-65
91. Ohsaka A., Saionji K., Takagi S., Igari J., Increased expression of the high-affinity receptor for IgG (FcRI, CD64) on neutrophils in multiple myeloma. *Hematopathology and molecular hematology*. 1996;**10**(3):151-60
92. Moulding DA., Hart CA., Edwards SW., Regulation of neutrophil FcγRIIIb (CD16) surface expression following delayed apoptosis in response to GM-CSF and sodium butyrate. *Journal of Leukocyte Biology*.1999; **65**(6): 875-82
93. Ley K., Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunological reviews*. 2002;**186**:8-18
94. Pappa CA., Tsirakis G., Boula A., Sfiridaki A., Psarakis FE., Alexandrakis MG., Stathopoulos EN., Significance of non correlation between interleukin-8 serum levels with bone marrow microvascular density in patients with myeloma multiple. *Pathology oncology research*. 2013;**19**(3):539-43.
95. Taylor NJ., Nishtala A., Manakkat Vijay GK., Abeles RD., Auzinger G., Bernal W., Ma Y., Wendon JA., Shawcross DL., Circulating

- neutrophil dysfunction in acute liver failure. *Hepatology*. 2013;**57**(3):1142-52.
96. Jacobson DR., Zolla-Pazner S., Immunosuppression and infection in multiple myeloma. *Seminars in oncology* . 1986;**13**(3):282-90.
97. Dasanu CA., Immune alterations in untreated and treated multiple myeloma. *Journal of oncology pharmacy practice*. 2012;**18**(2):257-63.
98. Fridlender ZG., Sun J, Kim S., Kapoor V., Cheng G., Ling L., Worthen GS., Albelda SM., Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell*. 2009;**16**(3):183-94.
99. Mishalian I., Bayuh R., Levy L., Zolotarov L., Michaeli J., Fridlender ZG., Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression. *Cancer immunology, immunotherapy* . 2013;**62**(11):1745-56.
100. Hasnis E., Alishekevitz D., Gingis-Veltski S., Bril R., Fremder E., Voloshin T., Raviv Z., Karban A., Shaked Y., Anti-Bv8 Antibody and Metronomic Gemcitabine Improve Pancreatic Adenocarcinoma Treatment Outcome Following Weekly Gemcitabine Therapy. *Neoplasia*. 2014;**16**(6):501-10

