

## INCREASED CIRCULATING PLATELET-NEUTROPHIL COMPLEXES IN ADULT NEWLY DIAGNOSED NON-HODGKINS'S LYMPHOMA PATIENTS

**Sheniz Yuzeir**

Clinic of Hematology, Medical University in Varna, Bulgaria, shenizyuzeir@abv.bg

**Bozhidara Shtereva**

Department of Medical Genetics, Medical University in Varna, Bulgaria, darashtereva@gmail.com

**Liana Gercheva**

Clinic of Hematology, Acibadem City Clinic Tokuda Hospital in Sofia, Bulgaria,  
lianagercheva@gmail.com

**Abstract:** Non-Hodgkin's lymphoma (NHL) is a group of lymphoproliferative malignant disorders with heterogeneous histological, biological and clinical characteristics. Non-Hodgkin's lymphoma is characterized by clonal abnormal proliferation and/or accumulation of B or T lymphocytes. Platelets and neutrophils interact during infection, inflammation and thrombosis and modulate each other's functions. The formation of complexes between neutrophils and circulating platelets (platelet-neutrophil complexes - PNC) is a fundamental mechanism that is known but poorly studied in non-Hodgkin's lymphomas. Aims: We aimed to investigate the serum level of circulating platelet-neutrophil complexes in newly diagnosed non-Hodgkin's lymphoma (NHL) patients and their relationship with clinicopathological characteristics and prognostic parameters. Material and methods: A total 88 patients with pathologically verified NHL and 20 healthy controls were analyzed. 34 were with Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), 9 with Mantel cell lymphoma (MCL), 4 with Peripheral T-cell lymphoma (PTCL), 15 with Marginal zone lymphoma (MZL), 10 with Follicular lymphoma (FL), 1 patient with Plasmoblastic lymphoma (PBL), 1 with Lymphoplasmacytic Lymphoma (LPL) and 14 with Small lymphocytic lymphoma (SLL). Serum levels of PNC were measured by flow cytometric analysis of peripheral blood. The results were statistically analyzed by dispersion, comparison and regression methods.

Results: PNC levels were significantly higher in patients with NHL compared to healthy controls ( $p < 0.01$ ). PNC levels were significantly higher in the group of patients with aggressive NHL compared with the group of patients with indolent NHL (respectively  $p = 0.05$ ). There was a strong significant correlation between PNC and Platelet ( $p = 0.032$ ), PNC and Absolute Neutrophil Count (ANC) ( $p = 0.015$ ) and PNC and Hemoglobin ( $r = 0.463$ ;  $p < 0.001$ ). No correlation was found with leukocyte count, LDH, B symptoms,  $\beta_2$ -микроглобулин and absolute lymphocyte count (ALC).

Conclusions: Elevated levels of PNC are associated with increased tumor growth and could be an independent negative prognostic factor in development of NHL.

**Keywords:** platelet-neutrophil complexes, aggressive and indolent Non-Hodgkin's lymphoma

## ВИСОКИ НИВА НА ЦИРКУЛИРАЩИ НЕУТРОФИЛНО-ТРОМБОЦИТНИ КОМПЛЕКСИ ПРИ НОВОДИАГНОСТИЦИРАНИ ПАЦИЕНТИ С НЕХОЧКИНОВИ ЛИМФОМИ

**Шениз Юзеир**

Клиника по Хематология, УМБАЛ "Света Марина", Медицински университет, Варна, България,  
shenizyuzeir@abv.bg

**Божидара Щерева**

Катедра по Медицинска генетика, УМБАЛ "Света Марина", Медицински университет, Варна,  
България, darashtereva@gmail.com

**Лиана Герчева**

Клиника по Хематология, Аджибадем Сити Клиник Болница Токуда, София, България,  
lianagercheva@gmail.com

**Резюме:** Нехочкиновите лимфоми (НХЛ) са група злокачествени заболявания на лимфната тъкан с хетерогенен спектър от клинични, биологични и хистологични характеристики. Те се характеризират с абнормна клонална пролиферация и/или акумулация на В и Т лимфоцити. Взаимодействието между

тромбоцити и неутрофили модулира различни патологични състояния, като възпаление, тромбоза, инфекциозни процеси. Образоването на комплекси между неутрофилите и циркулиращите тромбоцити (platelet-neutrophil complexes - PNC) е фундаментален механизъм, който е известен, но недобре проучен при Нехочкиновите лимфоми. Цел

на изследването: да се проучат нивата на PNC при пациенти с индолентни и агресивни Нехочкинови лимфоми (НХЛ) и връзката им с клинично-лабораторните показатели на пациентите. Методи: Изследвани са общо 88 новодиагностицирани пациенти с хистологично верифицирани НХЛ и 20 здрави контроли. Разпределението според вида на лимфома е както следва: 34 са с Дифузен В-едроклетъчен НХЛ, 9 с Мантелноклетъчен НХЛ, 4 пациенти с Периферен Т-клетъчен НХЛ, 15 с Маргинално зонови НХЛ, 10 с Фоликуларен НХЛ, 1 пациент с Плазмобластен, 1 с Лимфоплазмоцитоиден и 14 с Дребноклетъчни НХЛ. Нивата на PNC са определяни преди започване на имуно-химиотерапията чрез флоуцитометричен анализ на венозна кръв. Резултатите са обработени с SPSS v. 20.0, като са използвани дисперсионен, регресионен и сравнителен анализи. Резултати: Средните нива на PNC са статистически значимо по-високи при пациентите с НХЛ в сравнение с групата на здрави контроли ( $p < 0.01$ ). Установи се значима разлика в нивата на PNC при агресивните в сравнение с индолентните НХЛ ( $p = 0.05$ ). Доказа се сигнификантна правопрпорционална зависимост между циркулиращите PNC и стойностите на тромбоцитите ( $p = 0.032$ ), както и с абсолютния неутрофилен брой (ANC) ( $p = 0.015$ ). При направения анализ се регистрира обратно-пропорционална зависимост между PNC и стойностите на хемоглобина ( $r = 0.463$ ;  $p < 0.001$ ). Не се установи корелационна зависимост с левкоцитния брой, ЛДХ, бета 2 микроглобулин, наличието на В симптоми и абсолютния лимфоцитен брой (ALC). Заключение: Високите нива на PNC могат да служат като независим негативен прогностичен маркер в развитието на НХЛ.

**Ключови думи:** неутрофилно-тромбоцитни комплекси, агресивни и индолентни Нехочкинови лимфоми.

## 1. ВЪВЕДЕНИЕ

Нехочкиновите лимфоми (Non Hodgkin's Lymphoma - NHL) са група неоплазми на лимфната тъкан с хетерогенен спектър от клинични, биологични и хисто-патологични характеристики (Evans LS et al. 2003). В развитието на лимфомния процес участват плеяда от цитокинови молекули, които се намесват в клетъчните взаимодействия между левкоцитите, тромбоцитите и ендотелните клетки (Kirton CM et al. 2000). Тромбоцитите имат специфични инфламаторни и прокоагулантни свойства, като техният брой се увеличава многократно след активация и последваща агрегация (Coughlin S.R. 2005). Те проявяват изразена склонност да се свързват с неутрофилите в циркулиращата кръв, образувайки комплекси с тях, наречени „platelet-neutrophil complexes“ (PNC). Ключов момент при формирането на тези комплекси е експресията на Р-селектин от активираните тромбоцити и свързването им с лиганса PSGL (Etulain J et al. 2015).

Активацията на тромбоцитите протича в резултат на задвижването на два пускови механизма. От една страна те могат да бъдат активирани от неутрофилните гранулоцити (Celi A et al. 1994), като в свързано с последните състояние нивото им се увеличава два пъти повече, отколкото в несвързано (Peters MJ et al. 1997). Falanga и сътрудници установяват зависимост между PNC и експресията на CD11b, което доказва, че активирането на неутрофилите допринася за формиране на тромбоцитно-неутрофилните комплекси (Falanga A et al. 2000). Активацията на тромбоцити води до повишена експресия на повърхностни рецептори и по този начин се стимулират процесите на тромбоцитна адхезия, агрегация, клетъчна сигнализация и имуноен отговор (Kasirer-Friede A et al. 2007). От друга страна активирането на тромбоцитите може да се иницира от протромботичен сигнал, който се получава от т.нар G-протеин или тирозин-свързан рецептор и води до активиране на интегрин. Тези взаимодействия между рецептор и лиганд медиират процесите на адхезия на тромбоцитите към ендотелните клетки и иницират каскада от вътреклетъчни сигнали, довеждащи до освобождаване на тромбоцитни агонисти като аденозин дифосфат (ADP) и тромбин, с последващо образуване на агрегати (Coughlin S.R et al. 2005 ;Arachiche A et al. 2014; Khan A et al. 2014; Jin J et al. 1998). Колективно това води до допълнителна агрегация на тромбоцитите, медирана от интегрини, особено интегрин  $\alpha IIb\beta 3$  и локализиране в местата на тъканно увреждане или инфекция (Kauffenstein G et al. 2001; Chen H et al. 2003).

PNC се наблюдават при редица патологични състояния, като техният брой се увеличава при хронични възпалителни заболявания на червата (Pamuk et al. 2006), автоимунни заболявания (Joseph JE et al. 2001), солидните тумори (Claire K Meikle et al. 2020), коронарна артериална болест (Furman MI et al. 2001), кистична фиброза (Mattosio Det al. 2010), сепсис (Gawaz M et al. 1995) и други. За разлика от описаните по-горе състояния, при лимфопролиферативните неоплазми ролята на PNC все още не е изяснена, както по отношение хода на протичане на заболяванията, включително като рисков показател, така и като евентуален

прогностичен фактор за изхода от провежданото лечение. В това проучване нашата цел е да оценим нивата на PNC при пациенти с Нехочкинови лимфоми и връзката им с клинично-лабораторните показатели и да се потърси прогностичната им тежест.

## 2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

**Пациентска популация:** В проучването са включени общо 88 новодиагностицирани пациенти с хистологично верифицирана диагноза Нехочкинови лимфоми, съобразно патолого-анатомичните критерии за поставяне на диагнозата и 20 здрави контроли. Пациентската популация е със средна възраст 60.6 г. (28-88 г.), като 52.3 % са мъже. Агресивните НХЛ съставляват 52.3 %, а индолентните 47,7 %. Разпределението според вида на лимфома е както следва: 34 са с Дифузен В-едроклетъчен НХЛ, 9 с Мантелноклетъчен НХЛ, 4 пациенти с Периферен Т-клетъчен НХЛ, 15 с Маргинално зонови НХЛ, 10 с Фоликуларен НХЛ, 1 пациент с Плазмобластен, 1 с Лимфоплазмоцитоилен и 14 с Дребноклетъчни НХЛ. Основните характеристики на пациентите са посочени в таблица 1.

**Методи:** Анализът на образуването на тромбоцитно-левкоцитни комплекси е извършен чрез флоуцитометричен анализ на венозна кръв според метод на Mauler и съавтори с модификации (Mauler M et al. 2016). Циркулиращите неутрофилно-тромбоцитни комплекси се отчитат по двойно-позитивния сигнал на тромбоцитния маркер CD41a и неутрофилния маркер CD15. Като краен резултат е използван дялът на тромбоцитно-левкоцитните агрегати в нестимулираната кръв, а стимулираната с РМА (форбол миристат) или ADP (аденозин дифосфат) венозна кръв служи за позитивен контрол. Резултатите са обработени с SPSS v.20.0, като са използвани дисперсионен, вариационен, регресионен и сравнителен анализи. За ниво на значимост приемаме  $p < 0.05$ .

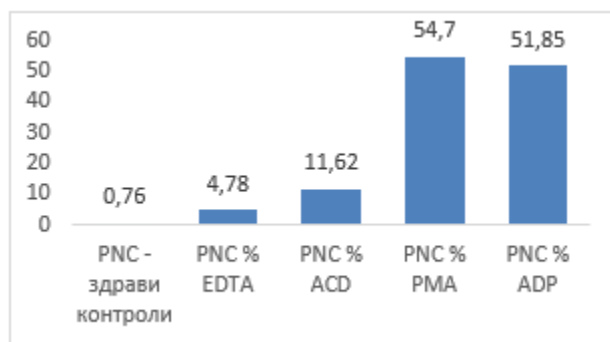
## 3. РЕЗУЛТАТИ

При анализиране на резултатите се установяват високи нива на PNC % при новодиагностицираните пациенти с НХЛ в сравнение с контролната група ( $p < 0.001$ ). Такава сигнификантна разлика има между PNC % преди стимулация (PNC EDTA% и PNC ACD%) и след стимулация ( PNC РМА% и PNC ADP %) с тромбоцитни агонисти РМА( форбол- миристат ацетат) и ADP ( аденозин дифосфат) (Фигура 1). Също така съществена разлика се регистрира между двете групи агресивни и индолентни НХЛ, като статистическият анализ показва три пъти по-високи нива на PNC % при агресивните лимфоми.

*Табл. 1. Основни характеристики на пациентите*

Показател		Брой/ %
Пол	Мъже	46/52.3 %
	Жени	42/47.7 %
Възраст (години)	mean±SD (range)	60.7 ± 11.8 (28-88)
Вид на лимфома	Индолентен	42/47.7 %
	Агресивен	46/52.3 %
PNC%	mean±SD (range)	4.79±5.15 (0.88-39.47)
Hb g/l	mean±SD (range)	116.89±23.52 (43.00-161.00)
Leu x 10 <sup>9</sup>	mean±SD (range)	10.94±13.04 (2.01-82.81)
Plt10 x 10 <sup>9</sup> /l	mean±SD (range)	239.89±184.72 (30.00-1117.00)
ANC x10 <sup>9</sup> /L	mean±SD (range)	4.37±3.34 (0.38-22.15)
ALC x10 <sup>9</sup> /L	mean±SD (range)	3.73±5.37 (0-27.63)
LDH U/L	mean±SD (range)	715.95±993.39 (143.00-5935.00)
β2-микроглобулин mg/l	mean±SD (range)	4.21±2.08 (1.60-8.50)

Фиг. 1. Средна стойност на PNC при пациенти с Агресивни и Индолентни НХЛ и здрави контроли



В групата пациенти с Агресивни лимфоми жените имат два пъти по-високи нива на PNC% ( $p=0.001$ ), в сравнение с жените с Индолентни лимфоми. При мъжете, както при Агресивните, така и при Индолентните НХЛ не се установява значима разлика в стойностите на PNC%. С цел да се потърси връзка между PNC% и клинично-лабораторните показатели при пациентите се използва линеен регресионен анализ. От една страна се установи, че PNC% имат обратно пропорционална зависимост със стойностите на хемоглобина и право пропорционална зависимост с тромбоцитния брой и ANC (таблица 2). При направения анализ не се наблюдава сигнификантна разлика между нивата на PNC и изследваните други параметри (ЛДХ, бета 2-микроглобулин и абсолютен лимфоцитен брой (ALC)).

Табл. 2. Линеен регресионен анализ между PNC% и изследваните клинично-лабораторни показатели при агресивни и индолентни НХЛ

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
<b>Индолентни НХЛ</b>					
(Constant)	2,641	4,186		,631	,532
Hb	-,022	,025	-,158	-,875	,388
Leu	-,083	,101	-,334	-,818	,419
1 Pit	,009	,005	,288	1,822	,077
ANC	,512	,217	,364	2,356	,024
ALC	,261	,206	,462	1,266	,214
LDH	,288	,312	,172	,921	,363
<b>Агресивни НХЛ</b>					
(Constant)	8,834	4,494		1,966	,057
Hb	-,076	,031	-,265	-2,475	,018
Leu	-,046	,159	-,088	-,288	,775
1 Pit	,008	,003	,271	2,684	,011
ANC	1,245	,222	,779	5,615	,000
ALC	-,166	,362	-,116	-,459	,649
LDH	-,372	,308	-,125	-1,210	,234

#### 4. ДИСКУСИЯ

В редица проучвания, както при бенигни, така и при малигни заболявания е описано спонтанно образуване на агрегати между неутрофилите и тромбоцитите, т.нар. PNC. Доказано е и ключовата им роля в туморната биология, ангиогенеза и процесите на метастазирание (Kral JB et al. 2016). Настоящите резултати показват, че при пациентите с НХЛ се регистрираха високи нива на PNC в сравнение със здравите контроли. Такива резултати са докладвани и от други изследователски групи (Joseph JE et al. 2001). В нашето проучване можем да обобщим три важни зависимости между PNC и изследваните показатели. Първата важна зависимост е многократно увеличени брой на образувани агрегати между неутрофили и тромбоцити при пациентите с НХЛ. Досега PNC са изследвани при множество заболявания, като солидни тумори, миелопролиферативни неоплазии, инфекциозни заболявания, сърдечно-съдови заболявания,

автоимунни и метаболитни болести, но при Нехочкиновите лимфоми тяхната роля все още не е напълно проучена.

Втората зависимост е установяването на два пъти по-високи нива на PNC при агресивните лимфоми в сравнение с индолентните. По-високата активност на PNC при агресивните лимфоми свързваме с напреднала фаза на заболяването, по-голям туморен обем, по-затегнато протичане и по-висок процент на инфекциозни и тромботични усложнения.

Третата зависимост включва регистрирането на правопрорациона зависимост между нивата на PNC и тромбоцитния брой, което е докладвано и в други проучвания, основно при миелопрролиферативните неоплазии (Kaplar M et al. 2000). По-високите нива на PNC при агресивните лимфоми корелират с наличието на тромбоцитоза, като израз на активност на лимфома. При статистическия анализ се отчита и обратнопропорционална зависимост между стойностите на хемоглобина и PNC, което потвърждава тежестта на клиничните прояви. Въз основа на горесцитираните данни можем да констатираме, че циркулиращите неутрофилно-тромбоцитни комплекси (PNC), изследвани при новодиагностицирани пациенти са значими не само като рисков показател, но и като предиктивен маркер за еволюцията и тежестта на НХЛ. Нашето проспективно проучване потвърждава, че Нехочкиновите лимфоми като група лимфоидни неоплазии, подобно на другите малигнени заболявания, се характеризират с висока активност на PNC, което бихме свързвали с висока степен на агресивност на лимфома, по-напреднала фаза на заболяването и по висок процент на усложнения.

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Високите нива на циркулиращи неутрофилно-тромбоцитни комплекси могат да играят роля на негативен предиктивен маркер в развитието на НХЛ.

## БИБЛИОГРАФИЯ

- Arachiche, A., Mumaw, M. M., de la Fuente, M., & Nieman, M. T. (2013). Protease-activated receptor 1 (PAR1) and PAR4 heterodimers are required for PAR1-enhanced cleavage of PAR4 by  $\alpha$ -thrombin. *J Biol Chem.* 288(45): p. 32553-32562
- Celi, A., Pellegrini, G., Lorenzet, R. et al. (1994). P-Selectin Induces the Expression of Tissue Factor on Monocytes. *PNAS.*;91:8767–8771.
- Coughlin, S.R. (2005). Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost.* 3: p. 1800-1814
- Chen, H., & Kahn, M. L. (2003). Reciprocal Signaling by Integrin and Nonintegrin Receptors during Collagen Activation of Platelets. *Mol Cell Biol.* 23(14): p. 4764-4777.
- Claire, K. M., Adam, J. M., Cara, M. B., Joseph, A. J., Nabila, A., Priyanka, G., Erin, L. C., Clare, A. K., Tess, Z. G., Leah, M. W., James, C. W., Randall, G. W., (2020). Platelet-T cell aggregates in lung cancer patients: Implications for thrombosis *PLoS One.* 2020 Aug 10;15(8):e0236966. doi: 10.1371/journal.pone.0236966
- Evans, L.S., & Hancock, B.W. (2003). Non-Hodgkin lymphoma, *Lancet*362(9378):139-46. doi: 10.1016/S0140-6736(03)13868-8
- Etulain, J., Martinod, K., Wong, S.L., Cifuni, S.M., Schattner, M., & Wagner, D.D. (2015). P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood* 126:242–6. doi:10.1182/blood-2015-01-624023
- Falanga, A., Marchetti, M., vangeliata, V., Vignoli, A., Cicini, M., Balicco, M. et al (2000). Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera, *Blood.*;96:4261-6.
- Furman, M.I., Barnard, M.R., Krueger, L.A. et al. (2001). Circulating monocyte- platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction. *JAm Coll Cardiol.* 38:1002–1006.
- Gawaz, M., Fateh-Moghadam, S., Pilz, G., et al.(1995). Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur J Clin Invest* ;25:843–851.
- Jin, J., Daniel, J. L., & Kunapuli S. P. (1998). Molecular Basis for ADP-induced Platelet Activation. *J Biol Chem.* 273: p. 2030-2034
- Joseph, J.E., Harrison, P., Mackie, J.M., et al (2001). Increased circulating Platelet –leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis.*Br J Haematol.*;115:451–459
- Kaplar, M., Kappelmayer, J., Kiss, A., et al. (2000). Increased leukocyte-platelet adhesion in chronic myeloproliferative disorders with high platelet counts.*Platelets.* 11:183–184.
- Kasirer-Friede, A., Kahn, M. L., & Shattil, S. J (2007). Platelet integrins and immunoreceptors. *Immunological Reviews.*, 218: p. 247-264

- Kauffmanstein, G., Bergmeier, W., Eckly, A., Ohlmann, P., Léon, C., Cazanave, J. P., Nieswandt, B., Gachet, C (2001). The P2Y<sub>12</sub> receptor induces platelet aggregation through weak activation of the alpha<sub>IIb</sub>beta<sub>3</sub> integrin--a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *FEBS Lett.*, 505(2): p. 281-290.
- Khan, A., Li, D., Ibrahim, S., Smyth, E., & Woulfe, D. S. (2014). The physical association of the P2Y<sub>12</sub> receptor with PAR4 regulates arrestin-mediated Akt activation. *Mol Pharmacol*, 86(1): p. 1-11.
- Kirton, C.M., & Nash, G.B. ( 2000). Activated platelets adherent to an intact endothelial cell monolayer bind flowing neutrophils and enable them to transfer to the endothelial surface. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine*136:303–313
- Kral, J.B., et al (2016). Platelet interaction with innate immune cells.*Transfus Med Hemother.*;43(2):78–88.
- Mattoscio D, Evangelista V, De Cristofaro R, Recchiuti A, Pandolfi A, Di Silvestre S, Manarini S, Martelli N, Rocca B, Petrucci G, Angelini DF, Battistini L, Robuffo I, Pensabene T, Pieroni L, Furnari ML, Pardo F, Quattrucci S, Lancellotti S, Davì G, Romano M (2010), Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) expression in human platelets: impact on mediators and mechanisms of the inflammatory response. *FASEB J.*; 24: 3970–3980
- Mauler, M., Seyfert, J., Haenel D. Seeba, H. Guenther J., Stallmann D., Schoenichen C., Hilgendorf I., Bode, C., Ahrens I., & Duerschmied, D. (2016). Platelet-neutrophil complex formation-a detailed in vitro analysis of murine and human blood samples. *Journal of Leukocyte Biology*, 99(5), 781–789
- Pamuk, G.E., Vural, O., Turgut, B., Demir, M., Umit, H., & Tezel, A. (2006). Increased circulating platelet-neutrophil, platelet-monocyte complexes, and platelet activation in patients with ulcerative colitis: a comparative study. *Am J Hematol* 81:753–759
- Peters, M.J., Heyderman, R.S., Hatch, D.J., et al. (1997). Investigation of platelet-neutrophil interactions in whole blood by flow cytometry. *J Immunol Methods.*;209:125–135.