

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Wstęp:

Układ odporności wrodzonej stanowi pierwszą linię obrony organizmu przed wnikającymi drobnoustrojami chorobotwórczymi. Jednym z elementów tego układu są receptory rozpoznające wzorce molekularne związane z patogenem (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs): receptory NOD-podobne (NLRs), receptory RIG-I-podobne (RLRs) i receptory Toll-podobne (TLRs). Są to białka zlokalizowane na powierzchni lub we wnętrzu komórek należących do układu immunologicznego: limfocytów, granulocytów, makrofagów a także komórek spoza układu odpornościowego: komórek endotelialnych, fibroblastów i innych. W odpowiedzi na rozpoznany antygen uruchamiane są wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe prowadzące do wzmożonej produkcji cytokin prozapalnych i czynników proapoptotycznych służące jak najszybszemu opanowaniu infekcji. Pobudzenie mechanizmów odporności nieswoistej prowadzi do aktywacji układu odporności nabytej i wytworzenia pamięci immunologicznej. Receptory NLRs, RLRs i TLRs rozpoznają także wzorce molekularne związane z uszkodzeniem tkanek (damage-associated molecular patterns, DAMPs), w tym przypadku aktywacja receptorów służy naprawie i regeneracji uszkodzonych struktur organizmu. Przedłużona, patologiczna aktywacja receptorów rozpoznających wzorce prowadzi do występowania przedłużonego stanu zapalnego i rozwoju przewlekłych chorób zapalnych, chorób autoimmunologicznych i karcynogenezy.

Choroby rozrostowe układu krwiotwórczego to heterogenna grupa schorzeń, dotyczących linii mieloidalnej i limfoidalnej szpiku kostnego oraz nowotwory układu chłonnego, których przebieg może być ostry lub przewlekły. Rokowanie w tych chorobach jest zależne od wielu czynników: zmian cytogenetycznych, molekularnych, stopnia zaawansowania choroby, stanu ogólnego pacjenta, jego wieku, chorób towarzyszących. Leczenie jest zazwyczaj intensywne a jego przebieg może być powikłany wystąpieniem różnorodnych działań niepożądanych. Najczęściej występują powikłania infekcyjne, które mogą doprowadzić do wystąpienia wstrząsu septycznego i śmierci pacjenta. Stale trwają poszukiwania nowych czynników, które pozwolą na identyfikację pacjentów szczególnie narażonych na powikłania leczenia, czynników korelujących z przebiegiem, rokowaniem i przeżyciem wśród chorych na złośliwe choroby rozrostowe układu krwiotwórczego. Metody leczenia złośliwych chorób szpiku kostnego i układu limfatycznego nadal bazują na chemioterapii choć do leczenia wprowadzane są nowe cząsteczki, których zadaniem jest zwiększenie skuteczności terapii, zmniejszenie ryzyka wystąpienia działań ubocznych i przedłużenie przeżycia całkowitego pacjentów.

Cel pracy:

Celem pracy była odpowiedź na pytanie w jakim stopniu ekspresja receptorów związanych z wrodzonym układem odpornościowym wpływa na rozwój, przebieg, powikłania leczenia i rokowanie u pacjentów z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego.

Materiał i metody:

Pierwsza publikacja jest artykułem poglądowym, który opisuje aktualną wiedzę na temat receptorów NOD-podobnych, RIG-I-podobnych i Toll-podobnych. Na podstawie piśmiennictwa dostępnego w bazach publikacji PubMed i Google Scholar podsumowano budowę, funkcje, mechanizm i efekt działania wyżej wymienionych trzech grup receptorów. Opisano trwające badania nad zastosowaniem cząsteczek-agonistów receptorów jako możliwych nowych elementów immunoterapii chorób układu krwiotwórczego.

W kolejnym artykule przedstawiono badanie dotyczące korelacji ekspresji genów dla receptorów TLR2, TLR4 i TLR9, i występowaniem infekcji u pacjentów poddawanych procedurze autoHSCT z powodu złośliwych chorób układu limfatycznego. Grupa badana liczyła 60 chorych z rozpoznaniem szpiczaka plazmocytozy (20 osób), chłoniaków niezłośliwych (20 osób) i chłoniakiem Hodgkina (20 osób). Próbkę krwi obwodowej pobierano trzykrotnie: przed rozpoczęciem megachemioterapii, przed wykonaniem ASCT oraz po regeneracji krwiotworzenia. Metodą real-time PCR oznaczono ekspresję genów dla TLR2, TLR4 i TLR9, a następnie ustalono związek z częstością występowania infekcji oraz wpływ ekspresji TLRs na regenerację neutrofilów po autoprzeszczepieniu. Ponadto oznaczono ekspresję receptorów TLR2, TLR4 i TLR9 w grupie kontrolnej i porównano wyniki z grupą osób chorych. W trzecim artykule grupę badaną stanowiło 90 pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej, u których oznaczono 15 polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w genach dla różnych receptorów NLR, RLR i TLR a następnie opisano związek tych polimorfizmów z różnymi cechami klinicznymi, przebiegiem leczenia i rokowaniem u pacjentów z AML. Materiałem badanym była krew obwodowa pobierana w momencie diagnozy ostrej białaczki szpikowej. Polimorfizmy oznaczano metodą real-time PCR.

Wyniki:

Praca poglądowa podsumowuje dotychczasową wiedzę na temat funkcji receptorów NLRs, RLRs i TLRs jako kluczowych elementów układu odporności wrodzonej, wskazuje także na możliwość zastosowania w przyszłości agonistów tych receptorów jako elementów immunoterapii chorób rozrostowych szpiku kostnego. W kolejnej pracy wykazano, że ekspresja genów dla TLR4 i TLR9 zmienia się po wykonaniu procedury autoHSCT: ekspresja TLR4 jest wyższa przed wykonaniem ASCT niż po wykonaniu procedury a ekspresja TLR9 jest wyższa po ASCT niż przed autotransplantacją. Niska ekspresja receptorów TLR4 i TLR9 przed ASCT ma znaczenie dla wystąpienia powikłań infekcyjnych na dalszych etapach procedury. Ponadto zaobserwowano pozytywną korelację pomiędzy ekspresją TLR9 a szybkością regeneracji neutrofilów po ASCT. W trzeciej publikacji zaobserwowano zależności w występowaniu różnych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w genach TLR4 rs4986791, TLR9 rs5743836 i NOD2 rs2066847 a poziomem CRP w momencie rozpoznania AML oraz RLR-1 rs10738889 z poziomem LDH w surowicy. Ponadto stwierdzono, że genotyp TLR3 rs5743305 AA występuje częściej u pacjentów z infekcjami. Kolejne opisane zależności dotyczą genotypów TLR9 rs187084 C, który jest związany z lepszym ryzykiem wg ELN (European Leukemia Group) oraz RLR-1 rs9695310 GG, który jest skojarzony ze starszym wiekiem w momencie diagnozy AML. Po podzieleniu grupy badanej na grupę pacjentów młodszych (≤ 55 lat) i grupę pacjentów starszych (> 55 lat) zaobserwowano, że niektóre

zależności występują tylko w grupie pacjentów młodszych, inne zaś tylko wśród starszych chorych.

Wnioski:

Elementy wrodzonego układu immunologicznego poza pełnieniem funkcji obronnych mogą mieć wpływ na rozwój wielu nowotworów, w tym chorób rozrostowych układu krwiotwórczego. Poza tym mogą wpływać na przebieg leczenia i rokowanie. Agoniści receptorów NLRs, RLRs i TLRs wykazują potencjał jako forma immunoterapii nowotworów układu krwiotwórczego, jednak ich wprowadzenie do leczenia wymaga dalszych badań. Stopień ekspresji receptorów TLR może być użytecznym biomarkerem do przewidywania wystąpienia powikłań infekcyjnych w trakcie ASCT wykonywanego jako forma leczenia konsolidującego w chorobach rozrostowych układu krwiotwórczego. Zależności pomiędzy poszczególnymi SNP w genach kodujących receptory Toll-podobne, NOD-podobne i RIG-I-podobne a specyficznymi cechami klinicznymi pacjentów z AML mogą wpływać na rokowanie. Opisane polimorfizmy mogą w przyszłości stać się czynnikami prognostycznymi w ostrej białaczce szpikowej.

II. ABSTRACT

Introduction:

The innate immune system plays a pivotal role in the first line of organism defence against pathogenic microorganisms. Among many of its elements we distinguish receptors recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) such as: NOD-like receptors (NLRs), RIG-I-like receptors (RLRs) and Toll-like receptors (TLRs). These are proteins located on the surface or inside the immune cells, such as: lymphocytes, granulocytes, macrophages, but also on the surface of endothelial cells, fibroblasts and others. In response of recognized antigen, they activate the intracellular signalling pathways leading to increase production of inflammatory cytokines and proapoptotic factors for rapid infection control. Stimulation of the mechanisms of innate immune system leads to activation of the adaptive immune system and to creation of immunological memory. The NLRs, RLRs and TLRs receptors also recognize the damage-associated molecular patterns (DAMPs). In this case, their activation leads to repairing and regeneration of damaged structures. Prolonged pathological activation of these receptors leads to prolonged inflammation and the development of chronic inflammatory diseases, autoimmune diseases and carcinogenesis.

Hematopoietic diseases are a group of variety of diseases related to the myeloid and lymphoid lines of the bone marrow and neoplasms of the lymphatic system, the course of which may be acute or chronic. Prognosis in these diseases depends on many factors: cytogenetic and molecular changes, general condition of the patient, its age and comorbidities. Treatment is usually intensive and might be difficult due to presence of various complications, most commonly infectious, which may lead to septic shock and patient's death. Nowadays many ongoing research aims to find the new factors that allow identification of patients which are particularly at the risk of treatment complications and the factors correlating with the course, prognosis and survival among patients with haematopoietic malignancies. Methods of treatment in bone marrow and lymphatic system diseases are still based on chemotherapy, although new molecules are introduced into the treatment. These new therapeutic agents aim to increase the therapy effectiveness, reduce the risk of side effects and extend overall survival of patients.

The aim of the study:

The aim of the study was to answer the question to what extent the expression of receptors related to the innate immune system affects the development, course, treatment complications and prognosis in patients with proliferative hematopoietic diseases.

Material and methods:

The first publication is a review article describing current understanding of NOD-like, RIG-I-like and Toll-like receptors. Based on scientific articles available in PubMed and Google Scholar databases, the structure, functions, mechanism of action and effect of the

mentioned three groups of receptors have been summarized. Ongoing research about the use of receptor agonist molecules as possible novel agents in the immunotherapy of haematopoietic diseases has been described.

The next paper presents a study on the correlation of gene expression for TLR2, TLR4 and TLR9 receptors and the incidence of infections in patients undergoing the autoHSCT procedure due to malignant lymphatic system diseases. The study group consisted of 60 patients diagnosed with multiple myeloma (20 patients), non-Hodgkin's lymphoma (20 patients) and Hodgkin's lymphoma (20 patients). Peripheral blood samples were collected three times: before starting mega chemotherapy, before performing ASCT and after hemopoiesis regeneration. The expression of genes for TLR2, TLR4 and TLR9 was determined by the real-time PCR, then the relationship with the frequency of infection and the influence of TLRs expression on the neutrophils regeneration after haematopoietic auto transplantation was established. Moreover, the expression of TLR2, TLR4 and TLR9 receptors was determined in the control group and the results were compared with the study group.

In the third article polymorphism of single nucleotides in receptors genes were examined. The study group consisted of 90 patients with acute myeloid leukemia, in which 15 different variants of single nucleotides polymorphisms in NLR, RLR and TLR receptors were established. Then the relationship of these polymorphisms with various clinical features, treatment course and prognosis in patients with AML was described. Polymorphisms were determined using real-time PCR method from blood obtained from patients during the AML diagnosis.

Results:

The review paper summarizes the current knowledge about the functions of NLRs, RLRs and TLRs as key elements of the innate immune system and indicates the possibility of using agonists of these receptors in the future as elements of immunotherapy in bone marrow proliferative diseases. In the second study authors prove that the expression of TLR4 and TLR9 genes changes after the autoHSCT procedure: TLR4 expression is higher before ASCT than after the procedure, and TLR9 expression is higher after ASCT than before bone marrow auto transplantation. Low expression of TLR4 and TLR9 receptors before ASCT plays an important role for the occurrence of infectious complications at further stages of the procedure. Moreover, a positive correlation between TLR9 expression and the rate of neutrophil regeneration after ASCT were observed.

In the next publication, the relationship between the occurrence of various single nucleotide polymorphisms in the TLR4 rs4986791, TLR9 rs5743836 and NOD2 rs2066847 genes and the CRP level at the time of diagnosis of AML and RLR-1 rs10738889 with the level of LDH in the serum was observed. In addition, it was found that the TLR3 rs5743305 AA genotype is more common in patients with infections. Authors also described dependencies concern the TLR9 rs187084 C genotypes, which is associated with a greater risk according to ELN (European Leukemia Group) and RLR-1 rs9695310 GG, which is associated with older age at the time of AML diagnosis. After dividing the study group into a group of younger (≤ 55 years) and older

patients (> 55 years), authors observe that some dependencies are only found in the group of younger patients, while others only among elderly group.

Conclusions:

Elements of the innate immune system, apart of their defence functions, may influence on the development of many cancers, including proliferative diseases of the haematopoietic system. Moreover, they might influence the course of treatment and prognosis. The NLRs, RLRs and TLRs agonists have potential as a form of immunotherapy of hematopoietic malignancies, but their introduction to treatment requires further research. The degree of TLR expression might be a useful biomarker for predicting infectious complications during ASCT as a form of consolidation therapy in haematopoietic malignancies. The relationship between particular SNPs in the genes encoding Toll-like, NOD-like, and RIG-I-like receptors and specific clinical features of AML patients may influence prognosis. The described polymorphisms may become prognostic factors in acute myeloid leukemia in the future.