

„Wpływ wybranych parametrów klinicznych i molekularnych na efektywność mobilizacji komórek macierzystych szpiku”

Aleksandra Bogucka Fedorczyk

STRESZCZENIE

Mobilizacja komórek macierzystych (HSC) to procedura mająca na celu pozyskanie HSC z krwi obwodowej pacjenta. Ma ona zastosowanie u zdrowych dawców oraz u pacjentów, u których wskazane jest przeprowadzenie autologicznego przeszczepienia komórek hematopoetycznych (autoHSCT), czyli podanie ich własnych HSC, celem umożliwienia odtworzenia układu krwiotwórczego po leczeniu wysokimi dawkami chemioterapii. W drugiej grupie znajdują się głównie chorzy z rozpoznaniem chłoniaków nieziarniczych (NHL), chłoniaka Hodgkina (HL) oraz szpiczaka plazmocytoowego (MM). Efektywność mobilizacji nie zawsze spełnia oczekiwania lekarza oraz pacjenta. Niepowodzenie procedury zazwyczaj wyraża się w uzyskaniu niewystarczającej do odnowy hematopoetycznej ilości HSC. Trwają próby określenia czynników złego rokowania dla skuteczności mobilizacji. Wymieniane są głównie aspekty kliniczne a jednym z najczęściej przytaczanych jest rozpoznanie NHL.

Stymulację powstawania i migracji do krwi obwodowej HSC, charakteryzujących się ekspresją antygeny powierzchniowego CD34+, uzyskuje się poprzez podawanie pacjentowi czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów (G-CSF). Molekularny mechanizm działania G-CSF, a także powstawania oraz dalszego różnicowania się komórek CD34+, nie został do końca poznany. Regulacja ekspresji genów odpowiedzialnych za procesy zachodzące w komórce na jej wczesnym stadium rozwoju odbywa się poprzez liczne zjawiska epigenetyczne, m.in. udział mikroRNA (miR).

MiR to jednoniciowe, niekodujące cząsteczki RNA, złożone zazwyczaj z 21-23 nukleotydów. Ich funkcją jest potranskrypcyjna regulacja ekspresji genów w mechanizmie blokowania translacji, bądź przez promowanie degradacji targetowych fragmentów informacyjnego RNA (mRNA). Wyniki badań przeprowadzonych na liniach komórkowych oraz modelu mysim wskazują na udział niektórych miR w proliferacji, migracji i różnicowaniu HSC.

W niniejszym badaniu podjęłam próbę określenia wpływu czynników molekularnych w postaci ekspresji wybranych miR, oraz czynników klinicznych, na skuteczność i efektywność mobilizacji HSC u pacjentów z chorobą limfoproliferacyjną. Badaną grupę stanowiło 45 chorych z rozpoznaniem z grupy NHL z dojrzałych komórek B, mobilizowanych w Klinice Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku we Wrocławiu w latach 2018-2021. Wszystkim chorym podano chemioterapię przeciwnowotworową a od dnia +5 po zakończonej chemioterapii, wykonywano podskórne iniekcje G-CSF w dawce ok. 5ug/kg masy ciała podawanej dwa razy dziennie. Począwszy od piątego dnia stosowania G-CSF, w ramach standardowego postępowania, dokonywano codziennych pomiarów stężenia HSC we krwi obwodowej aż do uzyskania wartości odpowiednich dla wykonania leukaferazy lub decyzji o zakończeniu mobilizacji. Separację przeprowadzano przy użyciu aparatu Spectra Optia. Za pomocą cytometrii przepływowej w uzyskanym materiale oznaczano stężenie HSC czyli komórek CD34+. Wyniki odnoszono następnie do wagi pacjenta. Procedurę uznawano za skuteczną w przypadku uzyskania w separacie min. 2×10^6 komórek CD34+/kg masy ciała. Dodatkowo dokonywano pomiaru ekspresji miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-155 i miR-223 w dobie poprzedzającej planowane włączenie G-CSF oraz przed rozpoczęciem pierwszej aferezy lub, w przypadku niewystarczającej ilości komórek CD34+ we krwi obwodowej badanych, w ostatnim dniu przyjmowania G-CSF. Krew do badań molekularnych mrożono w dedykowanych do tego próbkach PAX Gen Blood RNA Tubes (Qiagen) zapewniających natychmiastową stabilizację RNA, a następnie przechowywano w temperaturze -70°C . Izolacja materiału genetycznego została przeprowadzona z użyciem zestawu RT-qPCR - Paxgene RNA Isolation Kit IVD (Qiagen) oraz ddPCR- *mirVana*™ miRNA Isolation Kit (AMBION). Po wyizolowaniu RNA zastosowano zestaw do odwrotnej transkryptazy - The TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Do określenia poziomu ekspresji miR wykorzystano odpowiednie sondy TaqMan (Thermo Fisher Scientific Waltham). Wszystkie procedury wykonywano według zaleceń producentów wymienionych zestawów. Ponadto, zebrano dane demograficzne oraz kliniczne dotyczące badanych, a także informacje o przebiegu mobilizacji takie jak przebyte infekcje i stosowana antybiotykoterapia.

Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu oprogramowania R 4.1.1 (the R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Mobilizacja była skuteczna u 37 chorych (82% całej grupy badanej), u 8 (18%) procedura zakończyła się niepowodzeniem. Żaden pacjent z drugiej grupy nie uzyskał zakładanego stężenia komórek CD34+ we krwi i co za tym idzie, nie wykonywano u nich

leukaferazy. Wykazano istotny statystycznie negatywny wpływ występowania chorób współistniejących na ilość pozyskanych HSC ($p = 0.0014$). Mediana ilości komórek CD34+/kg m.c. u osób u których mobilizacja była skuteczna i które mają choroby współistniejące wynosi 3.6 a dla osób bez chorób współistniejących wynosi 7.16. Wykazano także istotnie mniejszą ilość uzyskanych komórek CD34+ w przeliczeniu na kg masy ciała chorych w grupie z nadwagą i otyłością ($p = 0.04$). Mediana ilości komórek u osób, u których mobilizacja była skuteczna i które mają otyłość lub nadwagę wynosiła 4.10, a dla osób z BMI w normie wynosiła 7.08. Nie stwierdzono zależności skuteczności mobilizacji od wagi, płci, wieku ani przebytego wcześniej leczenia przeciwnowotworowego, odpowiedzi na nie czy chemioterapii stosowanej w mobilizacji.

Część pacjentów przebyła w trakcie mobilizacji infekcję w stopniu maksymalnie 2 wg CTCAE 5.0. Wszystkie infekcje zostały zakończone do dnia wykonania leukaferazy a próbka pobranego separatu rutynowo była poddawana badaniom mikrobiologicznym. Przebiec infekcji wpływało pozytywnie na jej efektywność ($p=0,03$), zaś stosowanie antybiotykoterapii, transfuzji koncentratu krwinek płytkowych lub czerwonych ani stężenie leukocytów, hemoglobiny czy płytek krwi w dniu leukaferazy nie wpływało na skuteczność ani efektywność mobilizacji.

Spośród badanych miR, ekspresja miR-223 w dniu leukaferazy negatywnie korelowała ze stężeniem HSC w separacie, natomiast ekspresja miR-125a w tym samym punkcie czasowym korelowała pozytywnie ze stężeniem HSC zarówno w separacie jak i we krwi obwodowej pacjentów. Wyższą ekspresję miR-125a powiązano także z wystąpieniem infekcji w trakcie mobilizacji. Wykazano także zależność pomiędzy spadkiem ekspresji miR-223 w trakcie mobilizacji a jej wyższą efektywnością.

Mobilizacja HSC w grupie chorych z rozpoznaniem NHL charakteryzuje się dość wysoką skutecznością, jednak nadal u pewnej liczby pacjentów kończy się niepowodzeniem. Czynniki pozwalającymi wstępnie zidentyfikować takich pacjentów są nadwaga i otyłość oraz występowanie chorób współistniejących. W takiej grupie koniecznym może się okazać dodatkowe wspomaganie mobilizacji, np. poprzez zastosowanie plerixaforu. W aspekcie teoretycznym wydaje się, że krótkotrwały stan zapalny spowodowany infekcją wpływa pozytywnie na mechanizmy hematopoezy, co może być powiązane ze wzrostem stężenia miR-125a. Ekspresja miR-223 zmniejsza się natomiast w miarę mobilizacji HSC a zatem jego dynamika może służyć do prognozowania efektywności procedury.

ABSTRACT

Mobilization of hematopoietic stem cells (HSC) is a procedure aimed at obtaining HSC from a patient's peripheral blood. It is used in healthy donors as well as in patients who require autologous hematopoietic stem cell transplantation (autoHSCT), which involves giving the patient their own HSC to enable the regeneration of the hematopoietic system after high-dose chemotherapy. The second group mainly consists of patients diagnosed with non-Hodgkin lymphoma (NHL), Hodgkin's lymphoma (HL), and multiple myeloma (MM). The effectiveness of mobilization does not always meet the expectations of the physician or the patient. The failure of the procedure is usually expressed by obtaining an insufficient amount of HSC for hematopoietic renewal. Attempts are being made to identify poor prognostic factors for the effectiveness of mobilization, mainly clinical aspects, and NHL diagnosis is one of the most frequently cited factors.

Stimulation of HSC production and migration to peripheral blood, characterized by expression of the CD34+ surface antigen, is achieved by administering the patient a granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). The molecular mechanism of action of G-CSF, as well as the formation and further differentiation of CD34+ cells, has not been fully understood. The regulation of gene expression responsible for processes occurring in the cell at its early developmental stage occurs through numerous epigenetic phenomena, including the involvement of microRNAs (miR).

MiR is a single-stranded, non-coding RNA molecule typically composed of 21-23 nucleotides. Their function is post-transcriptional regulation of gene expression by blocking translation mechanisms or by promoting degradation of target fragments of mRNA. Research conducted on cell lines and a mouse model indicates the involvement of some miRs in HSC proliferation, migration, and differentiation.

In this study, I attempted to determine the influence of molecular factors in the form of the expression of selected miRs, as well as clinical factors, on the effectiveness and efficiency of HSC mobilization in patients with lymphoproliferative disease. The study group consisted of 45 patients diagnosed with NHL with mature B cells, mobilized at the Hematology, Blood Neoplasms, and Bone Marrow Transplantation Clinic in Wrocław between 2018 and 2021. All patients received anticancer chemotherapy, and from day +5 after chemotherapy, subcutaneous injections of G-CSF were administered at a dose of approximately 5ug/kg body weight twice daily. Starting from the fifth day of G-CSF use, daily measurements of HSC concentration in peripheral blood were performed until values

appropriate for leukapheresis were obtained or the decision was made to terminate mobilization. Separation was performed using the Spectra Optia apparatus. The concentration of HSC, i.e., CD34+ cells, was determined in the obtained material using flow cytometry, and the results were then related to the patient's weight. The procedure was considered effective if at least 2×10^6 CD34+/kg body weight cells were obtained in the separation. Additionally, the expression of miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-155, and miR-223 was measured the day before the planned administration of G-CSF and before the start of the first apheresis or, in the case of an insufficient number of CD34+ cells in peripheral blood of the patients, on the last day of G-CSF administration. Blood samples for molecular analysis were collected in dedicated PAX Gen Blood RNA Tubes (Qiagen) providing immediate RNA stabilization and then stored at -70°C . Genetic material was isolated using the RT-qPCR kit - Paxgene RNA Isolation Kit IVD (Qiagen) and the dedicated low molecular weight RNA isolation kit for ddPCR- mirVana™ miRNA Isolation Kit (AMBIION). After RNA isolation, the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) was used for reverse transcription. The expression levels of miRs were determined using specific TaqMan probes (Thermo Fisher Scientific Waltham). All procedures were strictly performed according to the manufacturers' recommendations for the mentioned kits. Additionally, demographic and clinical data of the patients were collected, as well as information on the mobilization process such as infections, and antibiotic therapy. Statistical analysis was performed using R software 4.1.1 (the R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Mobilization was successful in 37 patients (82% of the entire study group), while in 8 patients (18%) the procedure was unsuccessful. None of the patients in the second group achieved the expected CD34+ cell concentration in the blood, and as a result, leukapheresis was not performed on them. A statistically significant negative impact of comorbidities on the number of HSCs obtained was demonstrated ($p = 0.0014$). The median number of CD34+ cells/kg body weight in patients with successful mobilization and comorbidities was 3.6, while in patients without comorbidities, it was 7.16. A significantly lower number of CD34+ cells was also found in overweight and obese patients ($p = 0.04$). The median number of cells in patients with successful mobilization and obesity or overweight was 4.10, while in patients with a normal BMI, it was 7.08. There was no relationship between the effectiveness of mobilization and weight, sex, age, or previous anti-cancer treatment, response to it, or chemotherapy used in mobilization. Some patients experienced an infection during mobilization, up to grade 2 according to CTCAE 5.0. All infections were resolved by the day of leukapheresis, and a sample of the obtained concentrate was routinely subjected

to microbiological tests. The occurrence of an infection positively influenced its effectiveness ($p=0.03$), while the use of antibiotic therapy, transfusion of platelet or red blood cell concentrates, or the concentration of leukocytes, hemoglobin, or platelets in the blood on the day of leukapheresis did not affect the effectiveness or efficiency of mobilization. Among the studied miRs, the expression of miR-223 on the day of leukapheresis negatively correlated with the concentration of HSCs in the concentrate, while the expression of miR-125a at the same time point positively correlated with the concentration of HSCs in both the concentrate and peripheral blood. Higher expression of miR-125a has also been associated with the occurrence of infection during mobilization. A relationship has also been shown between the decrease in miR-223 expression during mobilization and its higher efficiency.

Mobilization of HSCs in patients with NHL is characterized by fairly high effectiveness, but it still fails in some patients. Factors that can help identify such patients are overweight and obesity, as well as the presence of comorbidities. In such a group, additional support for mobilization may be necessary, such as the use of plerixafor. Theoretically, a short-term inflammatory state caused by infection appears to positively influence hematopoietic mechanisms, which may be related to an increase in miR-125a levels. The expression of miR-223 decreases during HSC mobilization, so its dynamics may serve to predict the effectiveness of the procedure.