

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

mgr Mateusz Nowicki

Ocena wybranych elementów niszy szpikowej u pacjentów poddawanych autologicznemu przeszczepowi hematopoetycznych komórek macierzystych

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Na podstawie publikacji:

1. Nowicki M, Stelmach P, Szmigielska-Kapłon A, Selected factors influencing angiogenesis and hematopoietic niche. *Acta Haematol Pol.* 2018; przyjęta do druku dn. 20.08.2018. doi: 10.2478/ahp-2018-0018
2. Nowicki M, Wierzbowska A, Małachowski R, Robak T, Grzybowska-Izydorczyk O, Pluta A, Szmigielska-Kapłon A, VEGF, ANGPT1, ANGPT2, and MMP-9 expression in the autologous hematopoietic stem cell transplantation and its impact on the time to engraftment. *Ann Hematol.* 2017; 96(12): 2103-12. doi: 10.1007/s00277-017-3133-4
3. Nowicki M, Szemraj J, Wierzbowska A, Misiewicz M, Małachowski R, Pluta A, Grzybowska-Izydorczyk O, Robak T, Szmigielska-Kapłon A, miRNA-15a, miRNA-16, miRNA-126, miRNA-146a, and miRNA-223 expressions in autologous hematopoietic stem cell transplantation and their impact on engraftment. *Eur J Haematol.* 2018; 100(5): 426-435. doi: 10.1111/ejh.13036

Promotor: dr hab. n. med. Anna Szmigielska-Kapłon

Łódź, 2018

Streszczenie

Wykaz skrótów

ANGPT1 - angiopoetyna-1

ANGPT2 - angiopoetyna-2

Auto-HSCT - autologiczne przeszczepienie hematopoetycznych komórek macierzystych (autologous hematopoietic stem cell transplantation)

EC – komórki śródbłonna naczyń (endothelial cells)

ELISA – test immunoenzymatyczny (enzyme-linked immunosorbent assay)

HL – ziarnica złośliwa (Hodgkin lymphoma)

HSC- hematopoetyczne komórki macierzyste (hematopoietic stem cells)

HSCT – przeszczep hematopoetycznych komórek macierzystych (hematopoietic stem cell transplantation)

mRNA – matrycowy RNA (messenger RNA)

miRNA – mikroRNA (microRNA)

MM – szpiczak mnogi (multiple myeloma)

MMP-9 - metaloproteinaza macierzy-9

NHL – chłoniaki nieziarnicze (non-Hodgkin lymphoma)

RNA – kwas rybonukleinowy (ribonucleic acid)

UTR – rejon niepodlegający translacji (untranslated region)

VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (vascular endothelial growth factor)

Wstęp

Nisza hematopoetyczna, składająca się z części osteoblastycznej i naczyniowej to miejsce powstawania, dojrzewania i różnicowania krwiotwórczych komórek macierzystych (HSC). Ważną rolę w funkcjonowaniu niszy odgrywają procesy angiogenezy, prowadzące do tworzenia nowych naczyń. Podczas mobilizacji do auto-HSCT następuje uwolnienie HSC z niszy szpikowej do krwi obwodowej. Nisza hematopoetyczna to także miejsce zagnieżdżenia HSC po auto-HSCT. Procesy te są regulowane m.in. przez białka – cytokiny, a także miRNA. MiRNA to niewielkie, endogenne cząsteczki RNA (składające się z 19 - 25 nukleotydów), które łącząc się regionem UTR mRNA hamują translację co prowadzi do degradacji mRNA i hamowania ekspresji genów. Cząsteczki miRNA istotnie wpływają na

ekspresję genów odpowiedzialnych m.in. za procesy angiogenezy, apoptozy czy rozwoju i różnicowania HSC. Poprzez kontrolę ekspresji cytokin istotnie wpływają na zagnieżdżanie HSC w niszy szpikowej i regenerację szpiku po auto-HSCT.

Cele pracy

Celem pracy było zbadanie ekspresji i kinetyki cytokin i miRNA niszy szpikowej u pacjentów z nowotworami limfoproliferacyjnymi, poddawanych autologicznemu przeszczepieniu hematopoetycznych komórek macierzystych, a także poszukiwanie korelacji pomiędzy ekspresją cytokin i miRNA a szybkością wszczepu (regeneracji neutrofilii) po auto-HSCT. W pracy badano ekspresję cytokin i proteaz regulujących angiogenezę i migrację HSC. Oznaczano stężenie: VEGF, ANGPT1, ANGPT2 i MMP-9. Do badanych miRNA należały: miRNA-15a, miRNA-16, miRNA-126, miRNA-146a oraz miRNA-223.

Ocena ekspresji cytokin i proteaz

Materiały i metody

Do badania włączono 43 pacjentów (18 K, 25 M). Mediana wieku wynosiła 57 lat. W grupie badanej znajdowało się 33 pacjentów z MM, 8 z NHL i 2 z HL. Analizowano krew (osocze) pobraną od pacjentów w 5 punktach czasowych: przed chemioterapią kondycjonującą, po chemioterapii lecz w dniu autologicznego przeszczepienia (0) oraz w +7, +14 i +21 dobie po przeszczepieniu. Stężenie cytokin było oznaczane metodą ELISA.

Wyniki

Nasze badanie wykazało zmniejszenie ekspresji VEGF, ANGPT1 i MMP-9 po chemioterapii kondycjonującej trwające do +7 dnia po HSCT (nadir aplazji szpiku) w porównaniu do wartości sprzed chemioterapii. W przypadku VEGF, spadek ekspresji utrzymywał się do +14 dnia. Zaobserwowano spadek stężenia ANGPT2 po leczeniu kondycjonującym, natomiast wzrost ekspresji tej cytokiny zanotowano od dnia +7. Stwierdzono dodatnie korelacje między poziomem ANGPT1 i MMP-9 w dniu

+7 a ilością dni niezbędną do regeneracji neutrofilii. W przeciwieństwie do ANGPT1, zaobserwowano ujemną korelację między poziomem ANGPT2 w dniu +7 a liczbą dni potrzebną do wszczepu.

Ocena ekspresji miRNA

Materiały i metody

Do badania włączono 51 pacjentów (23 K, 28 M). Mediana wieku wynosiła 59 lat. W grupie badanej znajdowało się 42 pacjentów z MM, 7 z NHL i 2 z HL. Analizowano krew (osocze) pobraną od pacjentów w 4 punktach czasowych: przed chemioterapią kondycjonującą, po chemioterapii lecz w dniu autologicznego przeszczepienia (0) oraz w +7 i +14 dobie po przeszczepieniu. Ekspresję miRNA oznaczano metodą Real-time PCR.

Wyniki

Zaobserwowano stały spadek ekspresji wszystkich badanych miRNA po chemioterapii kondycjonującej i we wczesnym okresie poprzyszczepowym w porównaniu do wartości wyjściowych. Stwierdzono, że wyższa ekspresja miRNA-15a, miRNA-16, miRNA-126 i miRNA-146a w dniu 0 korelowała z dłuższym czasem do uzyskania wszczepu. Dodatkowo, zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy poziomami miRNA-15a, miRNA-146a i miRNA-223 ocenianymi w dniu +7 i ilością dni potrzebną do wszczepu.

Zauważono dodatnią korelację pomiędzy ekspresją miRNA-16, miRNA-146a i miRNA-223 w dniu 0 i poziomem ANGPT1. Dodatnią korelację ww. miRNA w dniu 0 zaobserwowano również w przypadku MMP-9. Co więcej, stwierdzono dodatnią korelację między miRNA-15a, miRNA-16, miRNA-126 i miRNA-223 i stosunkiem ANGPT1/ANGPT2 w dniu 0. Zaobserwowano dodatnią korelację między poziomami miRNA-16, miRNA-146a i miRNA-223 ocenianymi w dniu +7 i ekspresją MMP-9.

Wnioski

1. U pacjentów z nowotworami limfoproliferacyjnymi zaobserwowano istotne zmiany stężenia badanych cytokin oraz ekspresji miRNA we wczesnym okresie poprzyszczepowym, co może wskazywać na ich istotną rolę w funkcjonowaniu niszy szpikowej.

2. Wpływ ANGPT1 i ANGPT2 na szybkość wszczepiania się komórek po auto-HSCT jest przeciwstawny.
3. Ekspresja angiopoetyn i MMP-9 w okresie głębokiej aplazji szpiku po chemioterapii koreluje z efektywnością procesu wszczepienia po auto-HSCT, co wskazuje na wspomagającą rolę angiogenezy w procesach regeneracji po chemioterapii oraz transplantacji komórek macierzystych
4. Korelacje pomiędzy ekspresją miRNA po leczeniu kondycjonującym oraz w okresie nadiru aplazji po chemioterapii, a czasem niezbędnym do wystąpienia wszczepienia, wskazują na regulacyjny wpływ poszczególnych miRNA na kluczowe procesy niszy hematopoetycznej po auto-HSCT.
5. Ocena niszy szpiku kostnego podczas przeszczepienia HSC może mieć implikacje kliniczne, zwłaszcza w rzadkich przypadkach opóźnionego wszczepienia lub niewydolności przeszczepu. Biorąc pod uwagę fakt, iż takie powikłania są nieprzewidywalne, uzasadniona jest dalsza ocena biologii niszy szpiku kostnego po transplantacji.

Summary

Introduction

The hematopoietic niche, consisting of osteoblastic and vascular parts, is the site of the formation, maturation, and differentiation of hematopoietic stem cells (HSC). An important role in the functioning of the niche is played by angiogenesis processes leading to the formation of new vessels.

During mobilization for auto-HSCT, HSC is released from the bone marrow niche into the peripheral blood. The hematopoietic niche is also an environment for the HSC homing after auto-HSCT. These processes are regulated, among others, through proteins - cytokines, as well as miRNAs. MicroRNAs (miRNAs) are a class of small nucleotides (19-25), endogenous non-coding RNAs, that play a significant role in the post-transcriptional regulation of gene expression. By targeting the 3'untranslated regions (UTRs) of messenger RNA (mRNA), miRNAs repress translation, which leads to mRNA degradation and therefore downregulation of gene expression. MiRNA molecules significantly affect the expression of genes responsible for the processes of angiogenesis, apoptosis or HSC development, and differentiation. By controlling the expression of cytokines, they significantly affect the homing of HSC in the bone marrow niche and regeneration after auto-HSCT.

Objectives

The aim of the study was to investigate the expression and kinetics of the cytokines, and miRNAs active in the bone marrow niche in patients with lymphoproliferative malignancies, treated with auto-HSCT. Further query investigated the correlation between cytokines and miRNAs level, and the time to engraftment (regeneration of neutrophils) after auto-HSCT. The study evaluated the expression of cytokines and proteases regulating angiogenesis and HSC migration. The

concentrations of VEGF, ANGPT1, ANGPT2, and MMP-9 were determined. The miRNAs tested group included: miRNA-15a, miRNA-16, miRNA-126, miRNA-146a and miRNA-223.

Evaluation of cytokines expression

Materials and Methods

Forty-three patients were enrolled in this study (18 F, 25 M). The mean age of patients was 57 years. The investigated group consisted of 33 MM, 8 NHL, and 2 HL. The venous blood (plasma samples) was collected at five time points: before the conditioning chemotherapy (BC), on the day of HSCT (0), 7 (+7), 14 (+14), and 21 days after HSCT (+21). The levels of cytokines were assessed by ELISA technology.

Results

Our study revealed a decrease in the expression of VEGF, ANGPT1, and MMP-9 after conditioning chemotherapy up to +7 day after HSCT (nadir of bone marrow aplasia), as compared to day BC. In the case of VEGF concentration, a decrease remained from conditioning treatment until day +14. A decrease in ANGPT2 concentration after conditioning treatment was observed, whereas the increase in the expression of this cytokine was observed from day +7. Positive correlations were found between the level of ANGPT1 and MMP-9 on day +7, and neutrophils regeneration. In contrast to ANGPT1, a negative correlation was found between the level of ANGPT2 on day +7 and the number of days needed to engraftment.

Evaluation of miRNAs expression

Materials and methods

Fifty-one patients were enrolled in the study (23 F, 28 M). The median age was 59 years. The investigated group consisted of 42 MM, 7 NHL, and 2 HL patients. The blood plasma samples were

collected at four time points: before conditioning chemotherapy — BC day, on the day of HSCT — day 0, on day +7, and +14 days after HSCT. MiRNA expression was determined by Real-time PCR method.

Results

The miRNA-15a, miRNA-16, miRNA-126, miRNA-146a, and miRNA-223 expressions measured at all time points were significantly decreased as compared to the baseline (BC). It was found that the higher expression of miRNA-15a, miRNA-16, miRNA-126 and miRNA-146a on day 0 correlated with a longer time to engraftment. Additionally, higher levels of miRNA-15a, miRNA-146a, and miRNA-223 assessed on day +7 correlated with longer time to engraftment.

A positive correlation was observed between the expression of miRNA-16, miRNA-146a, and miRNA-223 on day 0, and the ANGPT1 level. A similar correlation at this time point was observed in the case of MMP-9. Furthermore, a positive correlation between miRNA-15a, miRNA-16, miRNA-126, miRNA-223, and the ANGPT1/ANGPT2 ratio was observed on day 0. A positive correlation was observed between the levels of miRNA-16, miRNA-146a, and miRNA-223 assessed on the day +7, and the MMP-9 expression.

Conclusions

1. Significant changes in cytokines concentrations and miRNAs expression were observed in the early post-transplant period in patients with lymphoproliferative malignancies, which may indicate their important role in the functioning of hematopoietic niche.

2. The ANGPT1 and ANGPT2 have opposite effects on the engraftment efficiency.

3. The expression of angiopoietins and MMP-9 during deep bone marrow aplasia after chemotherapy correlates with the engraftment after auto-HSCT, which indicates the supporting role of angiogenesis in the regeneration processes after chemotherapy and HSCT.

4. Correlations between the number of days needed to engraftment and miRNA expression after conditioning treatment, and in the post-chemotherapy nadir of aplasia indicate the regulatory effect of individual miRNAs on key processes of the hematopoietic niche after transplantation.

5. Assessment of the bone marrow niche during HSC transplantation may have clinical implications, especially in rare cases of delayed engraftment or graft failure. Considering the fact that such complications are unpredictable, further assessment of the biology of the bone marrow niche after transplantation is needed.