

## STRESZCZENIE

**Wprowadzenie.** Ostre białaczki należą do hematologicznych nowotworowych chorób rozrostowych, w których leczeniu indukującym wykorzystuje się chemioterapię opartą na antybiotykach antracyklinowych. W przypadku ostrej białaczki szpikowej (*AML – acute myeloid leukemia*) indukcja remisji obejmuje najczęściej podanie protokołów DA 3+7 lub DAC, złożonych z daunorubicyny, arabinozydu cytozyny i ewentualnie kladrybiny. Ostre białaczki limfoblastyczne (*ALL – acute lymphoblastic leukemia*) leczy się według schematu PALG ALL6 lub nowszego – PALG ALL7, w którego skład wchodzi także daunorubicyna. Na podstawie wyników ostatnich badań naukowych, dowiedziono, iż chemioterapia wywołuje nie tylko śmierć komórek nowotworowych na drodze tolerogenicznej apoptozy, ale w odpowiednich warunkach potrafi wzbudzić też korzystne reakcje immunologiczne, angażując efektorowe mechanizmy humoralne i komórkowe do walki z chorobą. Immunogenna śmierć komórki (*ICD – immunogenic cell death*), indukowana zastosowaniem antracyklin, charakteryzuje się translokacją białka kalretikuliny z obszaru retikulum endoplazmatycznego na błonę komórki blastycznej, emisją do macierzy zewnątrzkomórkowej cząsteczek DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) takich, jak ATP, HMGB1, aneksyna A1 czy IFN typu I. Ektopowa forma kalretikuliny jest silnym sygnałem aktywującym dojrzewanie komórek dendrytycznych i fagocytozę. Ekspresja CD47 z kolei, antagonizuje aktywność kalretikuliny i stanowi ważny czynnik umożliwiający przeżycie komórek nowotworu poprzez inhibicję procesu fagocytozy. Rola limfocytów T regulatorowych nie została dotychczas dobrze poznana. W niektórych modelach nowotworów, podwyższony odsetek limfocytów T CD4+CD25<sup>high</sup> korelował negatywnie z przeżyciem i prawdopodobieństwem nawrotu choroby.

**Cel pracy.** Głównym celem pracy było zbadanie udziału wczesnych mechanizmów immunologicznych w osiągnięciu remisji choroby u pacjentów z ostrą białaczką szpikową i limfoblastyczną, u których zastosowano chemioterapię indukującą remisję, opartą na antybiotykach antracyklinowych.

**Material i metody.** Do badań zakwalifikowano 52 pacjentów – 47 z rozpoznaniem AML i 5 z ALL – leczonych w Klinice Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku we Wrocławiu w latach 2013-2017. Badania odsetka ekspresji błonowej kalretikuliny i białka CD47 oraz limfocytów T regulatorowych CD4+CD25<sup>high</sup> przeprowadzono przy pomocy cytofluorometrii przepływowej. Stężenie białka HMGB1 w surowicy chorych oceniono w immunoenzymatycznym teście fazy stałej – ELISA. Oznaczenia wykonywano przed wdrożeniem chemioterapii indukującej remisję zawierającej antracykliny oraz 12-24 godziny po jej aplikacji. Otrzymane dane zostały następnie poddane analizie statystycznej przy wykorzystaniu komputerowych pakietów programów statystycznych EPIINFO Ver. 7.2.3.1. i Statistica

13.3.

**Wyniki.** Nie wykazano istotnych różnic w ekspresji kalretikuliny oznaczonej przed podaniem leczenia cytostatycznego, jak i 12-24 godziny po jego włączeniu, w grupach stratyfikowanych w zależności od osiągnięcia remisji całkowitej ( $p > 0,05$ ). W oznaczeniach wykonanych przed wdrożeniem chemioterapii, chorzy z AML o podwyższonym ryzyku cytogenetycznym prezentowali wyższą ekspresję kalretikuliny ( $p = 0,005$ ). Ponadto w kohorcie pacjentów, którzy zmarli w okresie prowadzonej obserwacji, kalretikulina osiągała znacząco wyższe odsetki ekspresji, zarówno przed, jak i po wprowadzeniu leczenia opartego na antracyklinach ( $p = 0,026$ ,

*Janusz Dąbrowski*

p=0,002). Fakt ten korelował negatywnie z czasem całkowitego przeżycia ( $R=-0,41$ ;  $p=0,005$  oraz  $R=-0,36$ ;  $p=0,019$ ). Ekspresja białka CD47 również nie przejawiała istotnych statystycznie różnic w próbkach pobranych przed i 12-24 godziny po podaniu chemioterapii indukującej, bez względu na uzyskanie remisji choroby, ryzyko cytogenetyczne czy przeżycie w okresie obserwacji ( $p>0,05$ ). Jednak w grupie pacjentów z AML o podwyższonym ryzyku cytogenetycznym stwierdzano większe, aczkolwiek nieistotnie statystycznie, mediany ekspresji CD47 w badaniach wykonanych przed zastosowaniem cytostatyków ( $p=0,236$ ). Uwidoczniono natomiast znacząco wyższe stężenia białka HMGB1 przed podaniem antracyklin w porównaniu do oznaczeń po ich aplikacji u wszystkich chorych na AML ( $p=0,010$ ), przy czym w wyodrębnionej grupie pacjentów, którzy uzyskali remisję nie obserwowano tej zależności ( $p=0,107$ ), natomiast u pacjentów bez remisji – rysował się trend w kierunku istotności statystycznej ( $p=0,080$ ). Stężenie HMGB1 było też znamienne większe przed podaniem leczenia u chorych o podwyższonym ryzyku cytogenetycznym w odniesieniu do wyników uzyskanych po 12-24 godzinach ( $p=0,005$ ). Nie odnotowano korelacji ani wpływu białka HMGB1 na dane przeżyciowe w analizowanych kohortach pacjentów. Nie wykazano różnic w odsetkach limfocytów T regulatorowych w oznaczeniach przeprowadzonych przed i po zastosowaniu cytostatyków niezależnie od uzyskanej remisji całkowitej i przeżycia chorych na AML ( $p>0,05$ ). Jednak w grupie pacjentów, którzy osiągnęli remisję całkowitą choroby, wyższe wartości limfocytów T regulatorowych w obu próbkach pozytywnie korelowały z przeżyciem całkowitym ( $R=0,39$ ;  $p=0,037$  oraz  $R=0,54$ ;  $p=0,004$ ). U wszystkich pacjentów z AML stwierdzono silnie dodatnią korelację pomiędzy ekspresją kalretikuliny a CD47, zarówno przed, jak i po podaniu antracyklin ( $R=0,74$ ;  $p=0,000$  i  $R=0,75$ ;  $p=0,000$ ). Istniała również słaba ujemna korelacja pomiędzy kalretikulina i CD47 a odsetkiem limfocytów T regulatorowych w badaniach wykonanych po 12-24 godzinach ( $R=-0,35$ ;  $p=0,026$  i  $R=-0,34$ ;  $p=0,025$ ).

#### **Wnioski.**

1. Podanie opartej na antracyklinach chemioterapii indukującej remisję w ostrej białaczce szpikowej może powodować zmniejszenie stężenia HMGB1 w osoczu, nie wpływa na ekspresję kalretikuliny, białka CD47 i odsetek limfocytów T regulatorowych.
2. Ekspresja kalretikuliny, CD47, stężenie HMGB1 i odsetek limfocytów T regulatorowych u chorych na AML nie różnią się w zależności od osiągnięcia lub braku remisji całkowitej choroby.
3. Zwiększoną ekspresję kalretikuliny i większe stężenie HMGB1 przed podaniem chemioterapii, wykazują chorzy na AML z podwyższonym, w porównaniu do standardowego, ryzykiem cytogenetycznym.
4. Ekspresja kalretikuliny koreluje pozytywnie z białkiem CD47 u chorych na AML, niezależnie od fazy leczenia.
5. Ekspresja kalretikuliny  $\geq 20\%$  po podaniu antracyklin determinuje krótszy czas całkowitego przeżycia chorych na AML. Jako niezależny czynnik niekorzystnego rokowania może być atrakcyjnym celem dla immunoterapii CAR-T. W grupie pacjentów z AML, którzy osiągnęli remisję całkowitą, całkowity czas przeżycia wykazuje związek z odsetkiem limfocytów T regulatorowych.
6. Nie zaobserwowano odchyień badanych parametrów reprezentatywnych dla mechanizmu immunogennej śmierci komórki wywołanej działaniem antracyklin na blasty białaczkowe.

*Jakub Dobruć*