

„Znaczenie ekspresji i polimorfizmu genu kodującego receptor dla czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów (CSF3R) w przeszczepieniu komórek mobilizowanych ze szpiku do krwi obwodowej”

Przeszczepienie komórek krwiotwórczych to metoda leczenia zagrażających życiu chorób nowotworowych i nienowotworowych. Obecnie najpopularniejszym źródłem materiału transplantacyjnego są komórki hematopoetyczne mobilizowane ze szpiku do krwi obwodowej. Mobilizacja inicjowana jest podaniem czynnika stymulującego powstawanie kolonii granulocytów (G-CSF) i przypomina naturalny proces uwalniania komórek progenitorowych do krwi w odpowiedzi na wystąpienie infekcji lub stanu zapalnego. Jednakże, molekularne mechanizmy kierujące tym procesem pozostają niejasne.

Celem niniejszej pracy było zbadanie czy i w jaki sposób zmienność polimorficzna genu receptora dla G-CSF (*CSF3R*), ekspresja wybranych genów szlaku G-CSF (*CSF3R*, czynników transkrypcyjnych *STAT1*, -3, -5 i supresora przekazywania sygnału *SOCS3*) na poziomie mRNA oraz ekspresja receptora *CSF3R* na neutrofilach i monocytach związana jest z efektywnością mobilizacji i tempem odnowy hematologicznej u pacjentów poddanych autologicznemu przeszczepieniu komórek mobilizowanych do krwi.

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa pobrana jednorazowo od 279 osób zdrowych, należących do grupy kontrolnej, oraz dwukrotnie (przed i w piątym dniu mobilizacji) od 105 osób chorych. U wszystkich pacjentów zdiagnozowano nowotwory krwi (szpiczaka mnogiego, chłoniaki nieziarnicze, ziarnicę złośliwą lub ostrą białaczkę szpikową).

Pacjenci ze szpiczakiem mnogim (MM) lub chłoniakami nieziarniczymi (NHL) charakteryzowali się wydajniejszą mobilizacją w porównaniu do osób z ziarnicą złośliwą (HL) ($p=0,022$ dla MM vs. HL oraz $p=0,013$ dla NHL vs. HL). Jednak udokumentowany negatywny efekt zastosowanej intensywnej chemo- i/lub radioterapii nie pozwala na jednoznaczne powiązanie danego typu nowotworu krwi z określoną efektywnością uwalniania komórek hematopoetycznych ze szpiku.

Obecność pięciu wariantów polimorficznych *CSF3R* (rs3917924, rs3918001, rs3918020, rs3918021 i rs146617729) zbadano metodą PCR-RFLP lub z użyciem zestawów starterów i sond LightSNiP do PCR z analizą krzywej topnienia. Natomiast polimorfizm rs148916169 analizowano wykorzystując sekwencjonowanie DNA.

Nie stwierdzono związku obecności żadnego z przebadanych wariantów polimorficznych genu *CSF3R* z ekspresją *CSF3R* (zarówno na poziomie mRNA jak i białka). Zaobserwowano jedynie tendencję, iż obecność dzikiego allelu C i genotypu CC

polimorfizmu rs3917924 związana jest z wyższym poziomem mRNA *CSF3R* przed podaniem G-CSF ($p=0,093$ dla genotypu *C+* vs. *TT* oraz $p=0,079$ dla genotypu *CC* vs. *TT*). Nie stwierdzono zależności żadnego z przebadanych wariantów genetycznych z efektywnością mobilizacji ani z tempem odnowy hematologicznej po przeszczepieniu.

Względny poziom ekspresji wybranych genów został określony wykorzystując ilościowy PCR z odwrotną transkrypcją. Ekspresja badanych genów zmieniała się w zróżnicowany sposób: u jednych pacjentów poziomy mRNA rosły w następstwie podania G-CSF, podczas gdy u innych osób malały bądź pozostawały na stałym poziomie.

Warto zauważyć, że w większości przypadków ekspresja jednych genów związana była z poziomami mRNA innych genów, choć nie zawsze były to silne korelacje. Przed rozpoczęciem mobilizacji ekspresja *CSF3R* była najsilniej związana z poziomem mRNA *STAT3* i *SOCS3* ($p<0,001$ zarówno dla korelacji *CSF3R-STAT3* jak i *CSF3R-SOCS3*). W piątym dniu mobilizacji związek ekspresji *CSF3R* z poziomem mRNA *STAT3* i *SOCS3* pozostał silny ($p<0,001$, jak poprzednio). W tym samym punkcie czasowym istotne stały się także korelacje między *STAT3* i *STAT5A*, *STAT3* i *STAT5B*, *SOCS3* i *STAT5A*, jak również między *STAT3* i *SOCS3* ($p<0,001$ dla wszystkich zależności).

Natomiast efektywność uwalniania komórek progenitorowych do krwiobiegu okazała się być zależna w sposób negatywny od ekspresji *STAT1* przed podaniem G-CSF ($p=0,033$) oraz *STAT3* w piątym dniu mobilizacji ($p=0,025$).

Do zbadania ekspresji receptora dla G-CSF na powierzchni neutrofilów i monocytów posłużyła cytometria przepływowa. Stwierdzono, że liczba komórek należących do obu powyższych subpopulacji istotnie wzrosła u pacjentów w następstwie podania G-CSF ($p=0,033$ i $p=0,004$, odpowiednio dla neutrofilów i monocytów). Jednak nie zaobserwowano, aby liczba neutrofilów lub monocytów była związana z efektywnością mobilizacji.

Odsetek neutrofilów i monocytów posiadających na swojej powierzchni receptor dla G-CSF był znacząco wyższy u pacjentów w porównaniu do osób zdrowych ($p<0,001$ dla neutrofilów *CSF3R+* oraz $p=0,017$ dla monocytów *CSF3R+*). Zaobserwowano, że ekspresja *CSF3R* na powierzchni neutrofilów - zarówno przed ($p=0,064$) jak i w piątym dniu mobilizacji ($p=0,075$) - była negatywnie skorelowana z wydajnością uwalniania komórek progenitorowych ze szpiku, choć relacje te nie były istotne statystycznie.

Podsumowując, wyniki niniejszych badań pozwoliły lepiej zrozumieć procesy zachodzące w organizmie w następstwie indukowanej G-CSF mobilizacji. Wskazały na potencjalny udział monocytów, obok neutrofilów, w procesie mobilizacji. Sugerują także, że *STAT3*, *STAT5A*, *STAT5B* i *SOCS3* pełnią ważną rolę w odpowiedzi na podanie G-CSF oraz wskazują, że ekspresja genów szlaku G-CSF może być związana z wydajnością mobilizacji.