Streszczenie w j. polskim

Ostra białaczka szpikowa (AML) jest genetycznie i klinicznie niejednorodną chorobą charakteryzującą się brakiem prawidłowej hematopoezy, proliferacją i akumulacją niedojrzałych komórek blastycznych w szpiku kostnym i krwi obwodowej. AML to agresywna, szybko postępująca choroba, która czasowo nie pozwala na wytworzenie skutecznej odpowiedzi układu odpornościowego na komórki białaczkowe. U większości pacjentów z AML, którzy na podstawie kompleksowej oceny klinicznej kwalifikują się do chemioterapii, leczenie 7-dniowym wlewem cytarabiny i 3-dniowym wlewem daunorubicyny („7+3") nie uległo zmianie w ciągu ostatnich 50 lat.

Inhibitory punktów kontrolnych (ICI) stanowią przełom w dziedzinie onkologii. W nowotworach hematologicznych udział ICI w terapiach jest ograniczony. W ostrej białaczce szpikowej w dostępnych pilotażowych badaniach ICI przyniosły obiecujące wyniki w połączeniu ze środkami hypometylującymi u pacjentów z nawracającą/oporną na leczenie AML, czy też w nawrocie po allogenicznym przeszczepieniu hematopoetycznych komórek macierzystych. Należy podkreślić, iż potencjał, który niosą ze sobą inhibitory punktów kontrolnych wymaga dalszych badań i szerszego wykorzystania tych cząsteczek w terapii AML. Co istotne w dostępnych wynikach badań coraz częściej podkreśla się znaczenie predykcyjne i prognostyczne punktów kontroli immunologicznej (PD-1, CTLA-4, PD-L1, B7-H3) już na etapie wstępnej diagnostyki AML, jako potencjalnych biomarkerów immunologicznych w przewidywaniu uzyskania odpowiedzi na leczenie oraz wpływu na całkowite przeżycie.

Dlatego celem niniejszej pracy doktorskiej było: (1) Określenie znaczenia predykcyjnego wybranych subpopulacji limfocytów T u pacjentów z AML, z uwzględnieniem ekspresji PD-1, PD-L1, CTLA-4 oraz B7-H3 wraz z oceną odsetkową tych limfocytów u pacjentów z AML poddanych standardowej chemioterapii indukującej remisję. (2) Określenie znaczenia predykcyjnego ekspresji PD-1, PD-L1, CTLA-4 oraz B7-H3 na powierzchni mieloblastów CD33+ oraz ilości bezwzględnej tych komórek u pacjentów z AML poddanych standardowej chemioterapii indukującej remisję. (3) Ocena dystrybucji uzyskanych wyników badań immunologicznych w grupach ryzyka cytogenetyczno-molekularnego. (4) W badaniu *in vitro*: ocena żywotności oraz proliferacji blastów pacjentów z AML w odpowiedzi na zastosowanie ICI w obecności lub przy braku podstawowego w terapii AML chemioterapeutyku – cytarabiny. (5) Ocena żywotności, proliferacji, zmian statusu aktywacyjnego limfocytów T w odpowiedzi na zastosowanie ICI w obecności lub przy braku chemioterapeutyku – cytarabiny.

Materiał badany stanowiła krew żylna pobrana na antykoagulant (EDTA) od 72 pacjentów z AML przed włączeniem leczenia chemioterapeutycznego. Z materiału izolowano komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC). Wykorzystując technikę wielokolorowej cytometrii przepływowej, określano poziom ekspresji (MFI) wybranych punktów kontroli immunologicznej – PD-

1, PD-L1, CTLA-4, B7-H3 – na limfocytach T CD3+CD4+ i blastach CD33+ oraz odsetek limfocytów T CD3+CD4+ i ilość bezwzględną blastów CD33 + z ekspresją badanych białek. Celem oceny zmian żywotności, proliferacji blastów i limfocytów oraz zmian statusu aktywacyjnego limfocytów w obecności podstawowego chemioterapeutyku w terapii AML - cytarabiny - oraz wybranych ICIs, wstępne założenia pracy doktorskiej poszerzono o badania hodowli komórkowej z następczą oceną cytometryczną badanych komórek. Do przeprowadzenia hodowli komórkowych *in vitro* z PBMC w obecności ICIs, z dodatkiem lub bez dodatku cytarabiny, wykorzystano materiał od 16 nieleczonych pacjentów z AML, uwzględniając po 8 chorych odpowiednio w grupie CR i NR.

Na podstawie uzyskanych wyników badań wykazano: (1) Pacjenci z AML nieodpowiadający na leczenie standardową chemioterapią (NR) wykazują wyższy odsetek limfocytów T pomocniczych z ekspresją receptora PD-1 oraz wyższy poziom ekspresji PD-1 na limfocytach T pomocniczych w porównaniu do pacjentów odpowiadających na chemioterapię (CR). (2) Pacjenci z AML nieodpowiadający na leczenie standardową chemioterapią (NR) wykazują wyższą ilość bezwzględną blastów CD33+ z ekspresją B7-H3 oraz wyższy poziom ekspresji receptora CTLA-4 na blastach CD33+ w porównaniu do pacjentów odpowiadających na chemioterapię (CR). (3) Pacjenci z AML odpowiadający na leczenie standardową chemioterapią (CR) wykazują wyższy poziom ekspresji PD-1 na blastach CD33+ w porównaniu do pacjentów nieodpowiadających na leczenie (NR). (4) Ocena odsetka limfocytów T pomocniczych oraz ilości blastów CD33+ z ekspresją receptora B7-H3 wykazuje negatywny potencjał prognostyczny całkowitego przeżycia chorych na AML. (5) Zastosowanie przeciwciał blokujących PD-1, PD-L1 lub CTLA4 w obecności lub braku cytarabiny nie wpływa na zwiększoną apoptozę blastów AML w hodowli *in vitro*. (6) Zastosowanie przeciwciał blokujących PD-1 w obecności cytarabiny w hodowli *in vitro* istotnie hamuje proliferację blastów w porównaniu do hodowli z samym chemioterapeutykiem. (7) Zastosowanie przeciwciał blokujących PD-L1 i PD-1 w hodowli *in vitro* jednojądrzastych komórek krwi obwodowej pacjentów z AML w obecności cytarabiny prowadzi do zwiększenia aktywacji limfocytów cytotoksycznych i pomocniczych. (8) Zastosowanie przeciwciał blokujących PD-1, PD-L1 oraz CTLA-4 w hodowli *in vitro* jednojądrzastych komórek krwi obwodowej pacjentów z AML nie wpływa na ilość limfocytów T regulatorowych.

Reasumując, na podstawie przeprowadzonych wykazałam znaczenie punktów kontroli immunologicznej (PD-1, CTLA-4, PD-L1, B7-H3) jako potencjalnych predykcyjnych i prognostycznych biomarkerów immunologicznych w AML.