

**mgr Magdalena Ostafin**

**Tworzenie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych w przebiegu ostrych białaczek u dzieci**

**STRESZCZENIE**

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych  
w zakresie biologii medycznej**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Urszula Demkow

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Olga Ciepiela

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku  
Rozwojowego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą I Wydziału Lekarskiego  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2018

**Rozprawa doktorska:**  
**Tworzenie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych w przebiegu ostrych białaczek  
u dzieci.**

**Autor: Magdalena Ostafin**

Neutrofile stanowią pierwszą linię obrony organizmu przed patogenami takimi jak bakterie, grzyby czy pierwotniaki. Do mechanizmów obronnych tych komórek należą: fagocytoza, wydzielanie ziarnistości (degranulacja), produkcja wolnych rodników, a także uwalnianie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs, ang. Neutrophil Extracellular Traps). Tworzenie NETs polega na wygenerowaniu siecjo-podobnej struktury na zewnątrz komórki, zbudowanej głównie z DNA i histonów. Sieci neutrofilowe pozwalają na unieruchomienie patogenu, co chroni organizm gospodarza przed rozprzestrzenianiem się mikroorganizmów. Nieprawidłowości w procesie powstawania NETs mogą być przyczyną zwiększonej podatności na infekcje.

Dzieci chore na ostre białaczki znajdują się w grupie wysokiego ryzyka wystąpienia ciężkich zakażeń, a infekcje pozostają główną przyczyną zgonów w tej grupie chorych. Celem niniejszej pracy była ocena procesu uwalniania NETs przez granulocyty izolowane z krwi obwodowej dzieci chorych na ostre białaczki. W analizie uwzględniono również wpływ rodzaju ostrej białaczki, leczenia, ostrego zakażenia i czynników kwalifikujących pacjentów do poszczególnych grup ryzyka na zdolność neutrofilów krwi obwodowej do tworzenia NETs. Podjęto również próbę oceny korelacji między stężeniem wybranych cytokin i białek ostrej fazy w osoczu a tworzeniem zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych.

Do badania włączono 47 dzieci w wieku od 8 miesięcy do 16 lat (mediana 5 lat), leczonych w Klinice Hematologii i Onkologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z powodu ostrej białaczki. Analiza procesu uwalniania NETs przez neutrofile izolowane od chorych była prowadzona w trzech punktach czasowych: w momencie rozpoznania ostrej białaczki (przed włączeniem leczenia), między 30 a 37 dobą terapii (licząc od momentu rozpoczęcia chemioterapii) oraz w trakcie epizodów ciężkiej infekcji. Ponadto badaniu zostało poddanych 30 zdrowych dzieci w wieku od 1 do 16 lat, skierowanych do poradni przyszpitalnej w celu przeprowadzenia rutynowych badań kontrolnych.

Uwalnianie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych oceniano jakościowo za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej i ilościowo za pomocą fluorymetrii. Zdolność do NETozy była analizowana w neutrofilach spoczynkowych oraz po ich aktywacji za pomocą

PMA (ang. Phorbol Myristate Acetate), fMLP (ang. N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine) i CI (ang. Calcium Ionophore). Stężenie wybranych cytokin w osoczu oznaczano metodami Multiplex ELISA oraz ELISA. Natomiast stężenia albuminy, ferrytyny, białka C-reaktywnego i transferyny w surowicy oraz fibrynogenu w osoczu były oceniane przy użyciu analizatorów biochemicznych i koaguologicznych w laboratorium Samodzielnego Publicznego Dziecięcego Szpitala Klinicznego (SPDSK).

Wykazano, że neutrofile dzieci z ostrymi białaczkami stymulowane PMA i fMLP istotnie statystycznie słabiej uwalniają NETs w każdym punkcie czasowym pomiaru w porównaniu do neutrofilii dzieci z grupy kontrolnej. Nie wykazano różnic w uwalnianiu NETs w zależności od rodzaju białaczki, wieku pacjenta, liczby białych krwinek oraz trombocytów we krwi obwodowej pacjenta w momencie rozpoznania choroby. Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w uwalnianiu NETs przez granulocyty dziewczynek oraz chłopców z ostrymi białaczkami po zastosowaniu jako stymulatora CI (w 0, 60, 120 i 180 minucie pomiaru) i fMLP (tylko w 120 minucie pomiaru). W grupie kontrolnej nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w uwalnianiu NETs w zależności od płci.

U dzieci chorych na ostre białaczki w trakcie leczenia wykazano zmniejszenie uwalniania NETs po stymulacji granulocytów za pomocą CI (w 60, 120 i 180 minucie pomiaru) w odniesieniu do wyników uzyskanych w chwili rozpoznania choroby. Nie zaobserwowano wpływu zakażenia na uwalnianie sieci z granulocytów izolowanych z krwi pobranej od dzieci z ostrymi białaczkami.

U chorych na ostre białaczki w momencie rozpoznania choroby wykazano korelację między stężeniem IL-1Ra, IL-2, INF- $\gamma$ , G-CSF i GM-CSF a uwalnianiem NETs. U dzieci badanych w trakcie leczenia zaobserwowano zależność uwalniania NETs od stężenia IL-6, IL-7, IL-8, IL-13, IL-15 i LTB<sub>4</sub>. Uwalnianie zewnątrzkomórkowego DNA z granulocytów dzieci z grupy kontrolnej korelowało ze stężeniem IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  i G-CSF.

Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że:

- I. granulocyty obojętnochłonne dzieci chorych na ostre białaczki posiadają zmniejszoną zdolność do wyrzutu zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych po stymulacji na drodze niezależnej od przekaźnictwa komórkowego zależnego od wapnia. Osłabiona produkcja NETs może przyczyniać się do częstego występowania ciężkich, układowych zakażeń u tych chorych;
- II. uwalnianie NETs przez granulocyty dzieci chorych na ostrą białaczkę zależy od płci i jest słabsze u chłopców;

- III. w trakcie leczenia ALL i AML produkcja NETs przez granulocyty obojętnochłonne zależna od przeżywalności wapniowej zmniejsza się;
- IV. uwalnianie NETs przez neutrofile dzieci chorych na białaczki w trakcie ostrego zakażenia nie ulega zmianie;
- V. zaburzenia uwalniania NETs w przebiegu ostrych białaczek mogą wynikać ze zmniejszonego uwalniania cytokin warunkujących prawidłową aktywność i dojrzewanie neutrofilów oraz ich interakcje;
- VI. zmiany stężenia białek ostrej fazy we krwi pacjentów w przebiegu ostrych białaczek dziecięcych nie korelują z wyrzutem sieci granulocytarnych.

Magdalena Ostafin

KIEROWNIK  
Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej i  
Immunologii Klinicznej Wzrostu i Rozwoju  
*[Signature]*  
prof. dr hab. n. med. Urszula Demkow

KIEROWNIK  
Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej  
Wydziału Nauki o Zdrowiu  
*[Signature]*  
Dr hab. n. med. Olga Ciepela