Streszczenie pracy doktorskiej lek. Wojciecha Strojnego

Promotor: dr hab. Szymon Skoczeń, prof. UJ
Temat pracy doktorskiej: *„Looking for potential markers of late effects of hematopoietic cell transplantation in children"*
***(„Poszukiwanie potencjalnych wskaźników odległych powikłań przeszczepienia komórek krwiotwórczych u dzieci")* – cykl publikacji**

Przeszczepienie komórek krwiotwórczych (hematopoietic cell transplantation - HCT) jest jedną z kluczowych metod radykalnego leczenia nowotworów złośliwych i niektórych chorób nienowotworowych. Odległe powikłania HCT mogą niekorzystnie wpływać na stan zdrowia skutecznie wyleczonych pacjentów, co ma szczególne znaczenie u dzieci z uwagi na wykonywanie procedury w wieku rozwojowym i przewidywane długoletnie przeżycie po leczeniu. HCT stanowi potwierdzony czynnik ryzyka rozwoju otyłości, nadciśnienia tętniczego i zespołu metabolicznego, jako częstych odległych powikłań terapii. Dzieci i młodzież leczeni z powodu nowotworów złośliwych stanowią istotną grupę ryzyka rozwoju tych późnych powikłań terapii. Brakuje wiarygodnych biomarkerów prognostycznych pozwalających na identyfikację w populacji dzieci otrzymujących leczenie przeciwnowotworowe, w tym HCT, pacjentów obciążonych zwiększonym ryzykiem odległych powikłań, w tym nadciśnienia tętniczego, otyłości i zespołu metabolicznego. Takie wskaźniki pozwoliłyby na wprowadzenie intensywniejszych badań przesiewowych i profilaktyki u osób z grup zwiększonego ryzyka i na potencjalną poprawę wykrywalności i wyników leczenia odległych powikłań terapii.

Cel badań

Celem badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej była ocena wybranych parametrów klinicznych, biochemicznych i genetycznych u dzieci przed i po leczeniu HCT z uwzględnieniem ich możliwego potencjalnego wykorzystania jako biomarkerów późnych powikłań leczenia tą metodą. Cykl badań obejmuje 3 publikacje.

Metodyka i wyniki badań

1. Artykuł oryginalny: Strojny W, Drożdż D, Fijorek K, Korostyński M, Piechota M, Balwierz W, Pietrzyk JA, Kwinta P, Siedlar M, Skoczeń S; Looking for new diagnostic tools and biomarkers of hypertension in obese pediatric patients: Blood Pressure Monitoring 2017, 22:122–130. Celem pracy było ustalenie optymalnej metodologii badania różnic ekspresji genów związanych z nadciśnieniem tętniczym u dzieci na podstawie porównania grup

pacjentów z otyłością i bez otyłości, pomiaru ciśnienia tętniczego z wykorzystaniem całodobowego pomiaru ciśnienia tętniczego (ambulatory blood pressure monitoring – ABPM) jako narzędzia diagnostycznego u dzieci, a także oceny częstości występowania zespołu metabolicznego w badanej populacji dzieci. Badaniem objęto 49 dzieci z otyłością prostą i 25 dzieci zdrowych stanowiących grupę kontrolną. Pomiary ciśnienia tętniczego wykonywano metodą klasyczną oraz metodą ABPM. Stosując metodę mikromacierzy oceniano poziom transkryptu 12 genów związanych z nadciśnieniem tętniczym i 45 wariantów genetycznych związanych z nadciśnieniem tętniczym. Stwierdzono brak istotnych różnic w ekspresji genów związanych z nadciśnieniem tętniczym w porównywanych grupach pacjentów. Dokonano oceny ABPM jako metody diagnostycznej w badaniu–nadciśnienia tętniczego u dzieci. We wnioskach stwierdzono, że ABPM jest użyteczną i wiarygodną metodą badania ciśnienia tętniczego w populacji pediatrycznej, która pozwoliła na wykrycie nieprawidłowych wartości ciśnienia tętniczego u ok. 50% dzieci z otyłością, a ponadto stosując powyższą metodologię wykryto cechy zespołu metabolicznego u prawie 1/3 dzieci z tej grupy. Stwierdzono też, że choć uzyskane wyniki były negatywne, analizę mikromacierzy można wykorzystać w badaniach u dzieci w kierunku oceny cech genetycznych związanych z nadciśnieniem tętniczym.

2. Artykuł oryginalny: Strojny W, Kwiecińska K, Fijorek K, Korostyński M, Piechota M, Balwierz W, Skoczeń S; Comparison of blood pressure values and expression of genes associated with hypertension in children before and after hematopoietic cell transplantation: Scientific Reports 2021: 11; 9303) Celem pracy była ocena ciśnienia tętniczego i ekspresji genów związanych z nadciśnieniem tętniczym u dzieci przed i po HCT w porównaniu z dziećmi z otyłością prostą (grupą cechującą się znaczną częstością występowania zespołu metabolicznego, co potwierdzono także w pierwszym doniesieniu) i dziećmi zdrowymi jako potencjalnych markerów nadciśnienia tętniczego u dzieci leczonych HCT. Badaniem objęto 44 dzieci z chorobami nowotworowymi i nienowotworowymi leczonych HCT (grupa przed HCT), 27 dzieci z tej grupy pozostających w obserwacji po 6 miesiącach po HCT (grupa po HCT), 49 dzieci z otyłością prostą bez chorób współistniejących (grupa kontrolna pacjentów otyłych) i 26 dzieci zdrowych (grupa kontrolna dzieci zdrowych). Ciśnienie tętnicze badano metodą klasyczną i za pomocą ABPM zgodnie z metodologią opisaną w pierwszej publikacji. Ponadto stosując metodę analizy mikromacierzy porównano ekspresję genów związanych z nadciśnieniem tętniczym w grupach przed HCT i po HCT oraz w grupie pacjentów z otyłością. W badaniu ciśnienia tętniczego zarówno metodą klasyczną jak i metodą ABPM nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy wartościami ciśnienia skurczowego i rozkurczowego

pomiędzy grupami dzieci przed HCT i po HCT. Stwierdzono, że w tych grupach wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego były istotnie niższe, niż w grupie pacjentów otyłych i nie różniły się istotnie od grupy dzieci zdrowych. Ważną obserwacją było stwierdzenie istotnej nadekspresji niektórych genów związanych z nadciśnieniem tętniczym w grupach leczonych HCT, zarówno przed jak i po procedurze, w porównaniu z grupą pacjentów otyłych. W grupie dzieci przed HCT stwierdzono istotnie niższą ekspresję genów *AGTR2, BLK, FLJ32810* i *TMEM133* oraz istotnie wyższą ekspresję genów *MOV10* i *WNK1* w porównaniu z grupą kontrolną dzieci z otyłością. W grupie dzieci po HCT stwierdzono istotnie niższą ekspresję genów *AGTR2, FLJ32810, NR3C2* i *TMEM133* oraz istotnie wyższą ekspresję genów *BAT2D1, MOV10, PIK3CG* i *WNK1* w porównaniu z grupą kontrolną dzieci z otyłością. W przypadku genów *MOV10* i *WNK 1* nadekspresję względem grupy kontrolnej dzieci z otyłością stwierdzono zarówno w grupie dzieci przed HCT jak i po HCT. We wnioskach stwierdzono, że w krótkoterminowej obserwacji wartości ciśnienia tętniczego oceniane metodą klasyczną i za pomocą ABPM nie wykazywały istotnych różnic u dzieci przed HCT i po HCT niezależnie od stosowania u nich leków potencjalnie powodujących nadciśnienie tętnicze. Sugeruje to, że wartości ciśnienia tętniczego w krótkoterminowej ocenie po HCT mogą nie być użytecznym markerem nadciśnienia tętniczego jako odległego powikłania tej metody leczenia. Niemniej jednak stwierdzono, że nadekspresja niektórych genów związanych z nadciśnieniem tętniczym mogłaby sugerować ich potencjalne wykorzystanie jako wskaźników ryzyka nadciśnienia tętniczego u pacjentów leczonych HCT w długoterminowej obserwacji, co może stanowić uzasadnienie dla dalszych badań w tym kierunku.

3. Artykuł oryginalny: Strojny W, Czogała W, Tomasik P, Bik-Multanowski M, Wójcik M, Miklusiak K, Miklusiak K, Hałubiec P, Skoczeń S. Concentrations of insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding proteins and respective gene expressions in children before and after hematopoietic stem cell transplantation: Nutrients 2021, 13, 4333. Celem pracy była ocena stężeń insulinopodobnych czynników wzrostu 1 i 2 (IGF-1 i IGF-2) oraz ich białek wiążących (IGFBP 1-7) i ekspresji kodujących je genów u dzieci przed HCT i po HCT oraz u dzieci zdrowych jako potencjalnych wskaźników odległych powikłań HCT o charakterze metabolicznym. Badaniem objęto 19 pacjentów leczonych HCT z powodu chorób nowotworowych lub nienowotworowych i grupę kontrolną 21 dzieci zdrowych. Oceniano parametry antropometryczne, stężenia IGF-1 i IGF-2, IGFBP 1-7, a także stężenia szeregu parametrów metabolicznych (glukozy, insuliny, leptyny, rozpuszczalnego receptora leptyny, adiponektyny, apeliny, cholecystokininy, , GLP-1, ghreliny, rezystyny, FGF-21, wisfatyny). Przeprowadzono też ocenę ekspresji genów kodujących IGF i IGFBP w grupie leczonej HCT

przed i po przeszczepieniu. Stwierdzono istotne korelacje pomiędzy stężeniem IGF-1 i szeregiem parametrów antropometrycznych. Nie stwierdzono istotnych korelacji pomiędzy stężeniem IGF-2 i parametrami antropometrycznymi. Nie stwierdzono istotnych korelacji pomiędzy stężeniami IGF-1 i IGF-2. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy stężeniami IGF-1 i IGF-2 przed i po przeszczepieniu, ale stężenia obu czynników były istotnie mniejsze w podgrupie przed i po HCT w porównaniu z grupą kontrolną dzieci zdrowych. Stwierdzono też, że u większości pacjentów leczonych HCT zarówno przed jak i po procedurze stężenia IGF-1 pozostawały w uznanych w piśmiennictwie granicach normy, natomiast stężenia IGF-2 pozostawały poniżej wartości prawidłowych cytowanych w piśmiennictwie. Stwierdzono szereg istotnych korelacji pomiędzy stężeniem IGFBP-1 i niektórymi parametrami antropometrycznymi, natomiast w odniesieniu do IGFBP2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 IGFBP-6 i IGFBP-7 nie stwierdzono istotnych korelacji z parametrami antropometrycznymi i biochemicznymi w analizie zbiorczej, chociaż korelacje takie stwierdzano w analizie podgrup przed i po procedurze. U większości pacjentów leczonych HCT stężenia IGFBP-3 pozostawały poniżej wartości referencyjnych publikowanych piśmiennictwie, dla pozostałych IGFBP takich wartości brak. W porównaniu dzieci przed HCT i po HCT nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie ekspresji genów kodujących IGF-1, IGF-2 i IGFBP-1-7 przed i po procedurze. We wnioskach stwierdzono, że stężenia IGF-1, IGF-2 i IGFBP-1-7 nie wykazywały istotnych różnic u dzieci przed HCT i po HCT, a ponadto nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie ekspresji kodujących je genów w powyższych podgrupach dzieci, chociaż stwierdzono szereg istotnych korelacji pomiędzy stężeniami IGF i IGFBP a szeregiem parametrów antropometrycznych i biochemicznych, co pozostaje w zgodzie z ich prawdopodobną rolą w regulacji metabolizmu opisywaną dotychczas w piśmiennictwie. Niemniej jednak, na podstawie uzyskanych wyników, które należy oceniać z ostrożnością, z uwagi na niewielką liczebność próby i krótki czas obserwacji, nie można aktualnie wnioskować o użyteczności oznaczeń stężeń IGF i IGFBP oraz ekspresji kodujących je genów jako wskaźników odległych powikłań metabolicznych u dzieci leczonych HCT.

Wnioski

1. Opracowano metodologię oceny parametrów klinicznych (ciśnienie tętnicze, parametry antropometryczne), biochemicznych i genetycznych (badanie metodą mikromacierzy), którą planowano zastosować w cyklu badań. W szczególności opisano zastosowanie techniki analizy mikromacierzy w ocenie genów związanych z nadciśnieniem tętniczym jako potencjalnego

biomarkera rozwoju nadciśnienia tętniczego u dzieci z otyłością, co w chwili publikacji było według wiedzy autorów pierwszym takim doniesieniem w piśmiennictwie. Ponadto uzyskano potwierdzenie efektywności i wykonalności pomiarów metodą ABPM w tej grupie pacjentów co uzasadniało jej zastosowanie w dalszych badaniach.

2. Stosując opracowaną metodologię dokonano porównawczej oceny wartości ciśnienia tętniczego u dzieci leczonych HCT przed i po procedurze. W badaniu metodą klasyczną i ABPM nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie parametrów ciśnienia tętniczego przed HCT i w krótkoterminowej obserwacji po HCT, co sugeruje, że wykorzystanie wczesnej oceny tych parametrów jako wskaźników rozwoju nadciśnienia tętniczego w przyszłości wydaje się niezasadne. Niemniej jednak, w analizie metodą mikromacierzy stwierdzono nadekspresję kilku genów związanych z nadciśnieniem tętniczym u pacjentów leczonych HCT, zarówno przed, jak i po procedurze. Ta obserwacja, która według wiedzy autorów stanowi pierwsze takie doniesienie w piśmiennictwie, może stanowić podstawę do dalszych badań nad wykorzystaniem analizy genów związanych z nadciśnieniem tętniczym metodą mikromacierzy w charakterze wskaźników rozwoju nadciśnienia tętniczego jako odległego powikłania HCT.

3. Stosując opracowaną metodologię badań dokonano porównawczej oceny stężeń insulinopodobnych czynników wzrostu (IGF-1, IGF-2) i ich białek wiążących (IGFBP-1 do -7), oraz analizy kodujących je genów metodą mikromacierzy. Nie stwierdzono istotnych różnic stężeń IGF i IGFBP w grupie leczonej HCT przed i po procedurze. Podobnie w analizie metodą mikromacierzy nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy ekspresją genów kodujących insulinopodobne czynniki wzrostowe i ich białka wiążące przed i po HCT. Powyższe obserwacje wskazują na małe prawdopodobieństwo wykorzystania stężeń IGF i IGFBP oraz ekspresji kodujących je genów jako potencjalnych wskaźników odległych powikłań HCT u dzieci, chociaż wyniki te należy traktować z ostrożnością z uwagi na małą liczebność próby i krótki okres obserwacji.

4. Podsumowując, wyniki cyklu badań sugerują, że w obszarze objętym powyższymi doniesieniami najbardziej obiecującym kierunkiem przyszłych badań pod kątem wskaźników odległych powikłań HCT u dzieci wydaje się analiza metodą mikromacierzy genów związanych z nadciśnieniem tętniczym.

Summary

Hematopoietic cell transplantation (HCT) is one of the key methods of radical treatment of selected malignancies and non-neoplastic diseases. Late effects of HCT may adversely affect the health of successfully treated patients. This is particularly important in children who undergo the treatment in the period of growth and have long life expectancy after successful therapy. HCT is a well-established risk factor of obesity, hypertension and metabolic syndrome as frequent late effects of this treatment modality. Children and adolescents treated for malignancies are an important risk group for these late effects of therapy. Currently there are no reliable biomarkers allowing for identification of patients at increased risk of late effects of treatment, such as obesity, hypertension and metabolic syndrome, in a population of children receiving antineoplastic treatment, including HCT. Such biomarkers could be used to institute more intensive screening and preventive measures in higher-risk patients and therefore to potentially improve detection and outcomes of late effects of cancer treatment.

Aims of the research

The aim of the doctoral thesis was assessment of selected clinical, biochemical and genetic parameters in children before and after HCT with respect to their potential use as biomarkers of late effects of this treatment modality. The research cycle included three publications.

Methods and results

1. Original paper: Strojny W, Drożdż D, Fijorek K, Korostyński M, Piechota M, Balwierz W, Pietrzyk JA, Kwinta P, Siedlar M, Skoczeń S; Looking for new diagnostic tools and biomarkers of hypertension in obese pediatric patients: Blood Pressure Monitoring 2017, 22:122–130. The aim of the study was to establish an optimal methodology of assessment of differences in the expressions of genes associated with hypertension in children on the basis of comparison of groups of patients with and without obesity, measurements of blood pressure using ambulatory blood pressure monitoring (ABPM) as a diagnostic method in children, as well as assessment of prevalence of metabolic syndrome in the study population using these methods. The study included 49 children with simple obesity and 25 healthy children as a control group. Office measurements and ABPM were used to measure blood pressures. Microarray analysis was used to measure transcript levels of 12 genes related to hypertension and 45 gene variants related to

hypertensions. ABPM was evaluated as a diagnostic method of hypertension in children. No significant differences in the expressions of the genes related to hypertension were found in the study groups. The authors concluded that ABPM is a useful method of measurement of blood pressure in pediatric population and that it allowed for identification of abnormal blood pressure values in approximately 50% children with obesity, while features of metabolic syndrome were found in almost one-third of children in this group. It was also concluded that despite the negative results of the current comparison microarray analysis can be used in children to assess genetic features associated with hypertension.

2. Original paper: Strojny W, Kwiecińska K, Fijorek K, Korostyński M, Piechota M, Balwierz W, Skoczeń S; Comparison of blood pressure values and expression of genes associated with hypertension in children before and after hematopoietic cell transplantation: Scientific Reports 2021: 11; 9303. The aim of the study was to compare blood pressure values and expressions of genes related to hypertension in children before and after HCT and with children with simple obesity (a group of high prevalence of metabolic syndrome as it was confirmed in the first paper) and healthy children, as potential markers of hypertension in children treated with HCT. The study included 44 children with malignancies and non-malignant diseases treated with HCT (pre-HCT group), 27 children from this group who remained in follow up 6 months after HCT (post-HCT group), 49 children with simple obesity and no comorbidities (obesity control group) and 26 healthy children (healthy control group). Blood pressure was measured using classical office method and ABPM according to the methodology presented in the first paper. Moreover, microarray analysis was used to compare expressions of genes related to hypertension in the pre-HCT, post-HCT and obesity control groups. Office and ABPM measurements of blood pressures revealed no statistically significant differences of systolic and diastolic blood pressures in children before and after HCT. In these groups systolic and diastolic blood pressure values were significantly lower than in obese controls while no significant differences were found compared with the healthy controls. An important observation were significant overexpressions of individual genes related to hypertension in patients treated with HCT, both before and after the procedure, compared with patients with obesity. In children before HCT significantly lower expressions of *AGTR2*, *BLK*, *FLJ32810* and *TMEM133* genes and significantly higher expressions of *MOV10* and *WNK1* were found compared with control children with obesity. In children after HCT significantly lower expressions of *AGTR2*, *FLJ32810*, *NR3C2* and *TMEM133* genes and significantly higher expressions of *BAT2D1*, *MOV10*, *PIK3CG* and *WNK1* genes were found compared with control children with obesity. In the case of *MOV10* and *WNK 1* genes the overexpressions compared with obesity control

group were found both before and after HCT. The authors concluded that in short-term follow up blood pressure values measured using both the classical office method and ABPM revealed no statistically significant differences in children before and after HCT despite the use of potentially hypertensive drugs in these patients. This suggests that blood pressure values in a short-term observation after HCT may not be a useful marker of hypertension as a late effect of this treatment modality. However, it was concluded that overexpressions of certain genes related to hypertension may suggest their potential use as biomarkers of long-term risk of hypertension in patients treated with HCT and therefore may support further research in this area.

3. Original paper: Strojny W, Czogała W, Tomasik P, Bik-Multanowski M, Wójcik M, Miklusiak K, Miklusiak K, Hałubiec P, Skoczeń S. Concentrations of insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding proteins and respective gene expressions in children before and after hematopoietic stem cell transplantation: Nutrients 2021, 13, 4333. The aim of the study was to compare concentrations of insulin-like growth factors 1 and 2 (IGF-1 and IGF-2), insulin-like growth factor binding proteins 1-7 (IGFBP 1-7) and expressions of their genes in children before and after HCT and healthy controls as potential biomarkers of metabolic late effects of HCT. The study included 19 patients treated with HCT for neoplastic or non-neoplastic diseases and a control group of 21 healthy children. The assessments included anthropometric parameters, concentrations of IGF-1, IGF-2, IGFBP 1-7, as well as several metabolic parameters (glucose, insulin, leptin, soluble leptin receptor, adiponectin, apelin, cholecystokinin, GLP-1, ghrelin, resistin, FGF-21, visfatin). Expressions of genes encoding IGFs and IGFBPs were compared in patients before and after HCT. Significant correlations were found between IGF-1 levels and several anthropometric parameters, while no such significant correlations were found for IGF-2 levels. No significant correlations between concentrations of IGF-1 and IGF-2 before and after HCT were found, but the levels of both IGFs were significantly lower in both groups of children treated with HCT compared with healthy controls. It was also found that in a majority of patients treated with HCT, both before and after the procedure, the concentrations of IGF-1 were within normal range published in the literature, and concentrations of IGF-2 were below the published normal values. Several significant correlations were found between concentrations of IGFBP-1 and some of the anthropometric parameters, while in the case of IGFBP2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6 and IGFBP-7 no significant correlations with anthropometric and biochemical parameters were found in a pooled analysis, although some correlations were found in subgroups before and after HCT. In the majority of patients treated with HCT concentrations

of IGFBP-3 were below the reference values published in the literature; for the remaining IGFBPs no such values were published to date. In children treated with HCT no significant differences were found in the expressions of genes encoding IGF-1, IGF-2 and IGFBP-1-7 before and after the procedure. The authors concluded that concentrations of IGF-1, IGF-2 and IGFBP-1-7 revealed no significant differences in children before and after HCT and no differences in the expressions of their genes were found. However, numerous significant correlations between concentrations of IGFs and IGFBPs and several anthropometric and biochemical parameters were found, which is consistent with their possible role in metabolic regulation suggested in the literature. Nevertheless, based on the results of this study, which should be taken with much caution due to a small sample and short follow-up, no conclusions can be made on the usefulness of measurements of concentrations of IGFs or IGFBPs and expressions of their genes as possible biomarkers of late metabolic effects in children treated with HCT.

Conclusions

1. Methodology was established for the assessments of clinical (blood pressure, anthropometry), biochemical and genetic (microarray analysis) parameters planned for the research cycle. In particular, the use of microarray analysis of the expressions of genes related to hypertension as a potential biomarker of hypertension in children with obesity was assessed, which, to the knowledge of authors, was the first such report in the literature at the time of publication. Moreover, feasibility and usefulness of blood pressure measurements using ABPM was confirmed in this group of patients which provided rationale for its use in the subsequent research.
2. Using the methodology developed in the first study comparisons of blood pressure values in children before and after HCT were performed. Using both classical office measurements and ABPM no significant differences of blood pressure values were found before HCT and in short-term follow-up after the procedure therefore suggesting that the use of early measurements of these parameters as biomarkers of the development of hypertension as a late effect seems unjustified. Nevertheless, in the microarray analysis overexpressions of several genes related to hypertension were found in patients treated with HCT, both before and after the procedure. This observation, which to the knowledge of the authors was the first such report in the literature at the time of publication, may form a basis for further research on the use of microarray

analysis of genes related to hypertension as possible biomarkers of hypertension as a late effect of HCT.

3. Using the above methodology comparisons of concentrations of insulin-like growth factors (IGF-1, IGF-2), insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1 to -7) and microarray analysis of expressions of their genes were performed. No significant differences of levels of IGFs or IGFBPs were found in children treated with HCT both before and after the procedure. Moreover, in the microarray analysis no significant differences were found in the expressions of genes encoding IGFs or IGFBPs before and after HCT. These observations suggest low likelihood of using concentrations of IGFs or IGFBPs and expressions of their genes as potential biomarkers of late metabolic effects of HCT in children, although the results must be taken with much caution due to the small sample size and short follow-up.

4. In conclusion, the results suggest that in the scope of the performed research the most promising direction of future studies aimed at identification of biomarkers of late effects of HCT in children appears to be the microarray analysis of genes related to hypertension.