

lek. Szymon Grochans

Ekspresja chemokiny CCL18 oraz jej receptorów CCR8 i PITPNM3 w glejaku wielopostaciowym. Znaczenie w procesie nowotworzenia

Glioblastoma multiforme – expression and impact of the CCL18, CCR8, and PITPNM3 on the process of oncogenesis

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu. Dyscyplina nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n. med. Irena Baranowska-Bosiacka

Promotor pomocniczy: dr n. zdr. Anna Cybulska

STRESZCZENIE

Wstęp: Glejak wielopostaciowy (GMB) jest jednym z najbardziej agresywnych nowotworów złośliwych. GBM jest też najczęstszym złośliwym pierwotnym guzem mózgu oraz centralnego układu nerwowego. Mimo wielu badań dotyczących GBM oraz wpływu chemokin na onkogenezę w dostępnym piśmiennictwie brakuje prac dotyczących wpływu komórek nowotworowych w GMB na zmiany ekspresji chemokin wytwarzanych przez komórki związane z nowotworem, w tym szczególnie makrofagi. Opisanie tych zależności z uwzględnieniem specyficznych warunków panujących w obrębie guza nowotworowego (hipoksja, zmniejszona dostępność substancji odżywczych) może prowadzić do lepszego zrozumienia mechanizmów onkogenezy oraz umożliwić opracowanie nowych terapii i leków. Celem badań było przedstawienie roli chemokin i ich receptorów w interakcji komórek glejaka wielopostaciowego z komórkami towarzyszącymi nowotworom w warunkach panujących w guzie. Szczegółowe cele obejmowały: określenie udziału CCL18 i jej receptorów CCR8 i PITPNM3 w procesie nowotworzenia w GMB, określenie wpływu warunków panujących w guzie na proces nowotworzenia, określenie wpływu płci chorych na progresję nowotworu, przegląd epidemiologii glejaka wielopostaciowego, czynników ryzyka i czynników ochronnych zachorowania na GMB. W pracy przedstawiono także aktualne dane z piśmiennictwa naukowego dotyczące epidemiologii glejaka wielopostaciowego, omówiono działanie chemokin 1–28 i ich receptorów w kontekście nowotworów oraz opisano udział CCL18 i jej receptorów CCR8 i PITPNM3 w procesie nowotworzenia w GMB.

Materiał i metody badań: Badania przeprowadzono z wykorzystaniem guzów nowotworowych pobranych od chorych operowanych z powodu glejaka wielopostaciowego oraz linię komórkową ludzkich komórek glejaka (glioblastoma astrocytoma (U-87 MG), którą poddano

działaniu czynników odzwierciedlających warunki panujące w guzie (hipoksja i niedobór składników odżywczych). Analizie poddano również dane z medycznych baz danych w wersji elektronicznej. Ekspresję CCL18 oraz jej receptorów CCR8 i PITPNM3 w komórkach oraz w guzie i w okolicy okołoguzowej GMB zbadano za pomocą metody łańcuchowej reakcji polimerazy z obrazowaniem w czasie rzeczywistym (qRT-PCR). Przeprowadzono badania immunohistochemiczne guza GMB oraz badania proliferacji i migracji komórek U-87 MG pod wpływem inkubacji z CLL18.

Wyniki i wnioski: Chemokiny wykazują właściwości pro- oraz przeciwnowotworowe w zależności od czynników współistniejących. Z tego powodu zwiększona ekspresja danej chemokiny nie zawsze jednoznacznie wskazuje na pogorszenie lub poprawę rokowania dla chorych na GMB. Chemokiny powodują rekrutację różnych komórek do niszy nowotworu i migrację oraz inwazję komórek nowotworowych. W przeprowadzonych badaniach w guzie glejaka wielopostaciowego ekspresja cytokiny CCL18 uległa zwiększeniu, zmieniona była również ekspresja jej receptorów CCR8 i PITPNM3. Stwierdzono również różnice w ekspresji CCL18 i jej receptorów u kobiet i mężczyzn, które mogą tłumaczyć większą zachorowalność i śmiertelność mężczyzn chorujących na GBM. W rejonie guza glejaka wielopostaciowego objętym hipoksją doszło do nagromadzenia makrofagów. Charakterystyka warunków panujących w tym obszarze guza prowadziła do różnicowania tych komórek do fenotypu M2, który charakteryzuje się zwiększoną ekspresją CCL18. Zwiększona ekspresja CCL18 oraz PITPNM3 w guzie nowotworowym skutkowałą pobudzeniem migracji komórek nowotworowych. Mechanizm ten może przyczyniać się do inwazji/rozsiewu GBM i prowadzi do pogorszenia rokowania dla chorych.

Przeanalizowane czynniki ryzyka wystąpienia glejaka, jak i czynniki o działaniu protekcyjnym pozwalają na stwierdzenie, że pomimo niepokojącego trendu dotyczącego zachorowalności na GBM, nadal trudno bezpośrednio określić przyczyny jego występowania. Dotychczasowe dane sugerują, że ryzyko zachorowania na GBM jest większe u mężczyzn, osób otyłych oraz zwiększa się wraz z wiekiem i wzrostem. Dostępne dane nie pozwalają jednoznacznie określić, jaki wpływ na rozwój glejaka ma stosowanie używek, niektórych leków (np. NLPZ) czy stosowanie telefonów komórkowych.

ABSTRACT

Introduction: Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most aggressive malignancies, and the most common primary malignant tumour of the brain and the central nervous system. Despite many studies on GBM and the influence of chemokines on oncogenesis, the available literature is lacking study works on the effect of cancer cells in GMB on changes in the expression of chemokines produced by tumour-associated cells, particularly macrophages. Describing these relationships with consideration of specific conditions within the tumour (hypoxia, reduced nutrient availability) may lead to a better understanding of the mechanisms of oncogenesis and enable the development of new therapies and drugs.

The aim of this study was to describe the role of chemokines and their receptors in the interaction of glioblastoma multiforme cells with tumour-associated cells under tumour conditions. Specific objectives included: determination of the contribution of CCL18 and its receptors CCR8 and PITPNM3 to tumourigenesis in GMB, determination of the influence of tumour conditions on tumourigenesis, determination of the influence of patient gender on tumour progression, review of the epidemiology of glioblastoma multiforme, risk factors and protective factors for GMB.

The publication presents current data from the scientific literature on the epidemiology of glioblastoma multiforme, discusses the action of chemokines 1–28 and their receptors in the context of cancer, as well as describes the involvement of CCL18 and its receptors CCR8 and PITPNM3 in the tumourigenesis process in GMB.

Study material and methods: The study was conducted using tumour samples taken from patients operated on for glioblastoma multiforme, and human glioblastoma astrocytoma cell line (U-87 MG) treated to reflect tumour conditions (hypoxia and nutrient deprivation). The data from electronic medical databases was also analysed. The expression of CCL18 and its receptors (CCR8 and PITPNM3) in cells and in the tumour and peri-tumoral area of the GMB was examined by real-time imaging polymerase chain reaction (qRT-PCR). Immunohistochemical studies of the GMB tumour and studies of U-87 MG cell proliferation and migration under incubation with CCL18 were performed.

Results and conclusions: Chemokines exhibit pro- and anti-tumour properties depending on concomitant factors. Therefore, increased expression of a particular chemokine does not always unequivocally indicate a worsened or improved prognosis for GMB patients. Chemokines induce the recruitment of different cells into the tumour niche, and the migration and invasion of tumour cells. In the following study, the expression of the cytokine CCL18 in glioblastoma multiforme was increased, and the expression of its receptors CCR8 and PITPNM3 was also

altered. Differences in the expression of CCL18 and its receptors in men and women were also found, which may explain the higher morbidity and mortality in men with GBM. There was an accumulation of macrophages in the hypoxic region of the tumour. The characteristics of the conditions in this tumour area led to the differentiation of these cells to the M2 phenotype characterised by an increased CCL18 expression. An increased expression of CCL18 and PITPNM3 in the tumour resulted in stimulation of tumour cell migration.

This mechanism may contribute to GBM invasion/dissemination and leads to a poorer patient's prognosis. After analysis of the risk factors as well as factors with a protective effect for glioma, it was concluded that despite the worrying trend in the incidence of GBM, it is still difficult to directly identify the causes of GBM. Previous data suggests that the risk of GBM is higher in men, obese individuals and increases with age and height.

The available data is not clear in determining what impact the use of stimulants, certain drugs (e.g. NSAIDs) or the use of mobile phones has on the development of glioma.