

lek. Edyta Ulińska

**Ocena aktywności i ekspresji kinazy mTOR w blastach
oraz jej wpływu na przebieg kliniczny ostrej białaczki
limfoblastycznej B-komórkowej u dzieci**

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w zakresie medycyny**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Michał Matysiak

Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Warszawskiego
Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą I Wydziału Lekarskiego
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2018

Ostre białaczki są najczęstszymi chorobami nowotworowymi wieku dziecięcego. Wśród nich ponad 75% stanowi ostra białaczka limfoblastyczna. Obecnie długoletnie przeżycia uzyskuje się u ponad 85 % dzieci z ALL, jednak mimo to, wciąż istotnym problemem pozostają wznowy choroby, obserwowane także u pacjentów zakwalifikowanych do grupy standardowego i pośredniego ryzyka. Wyniki leczenia wznów są wciąż niezadawalające z uwagi na lekooporność komórek białaczkowych. Dzieci po leczeniu nawrotu choroby są bardziej narażone na wystąpienie późnych powikłań intensywnego leczenia przeciwnowotworowego. Powikłania po leczeniu cytostatykami w dzieciństwie stają się obecnie istotnym problemem w populacji ludzi dorosłych. Stosowana aktualnie w protokołach terapeutycznych ALL analiza czynników prognostycznych, wymaga udoskonalenia. Konieczne są dalsze prace w tym kierunku, które umożliwią precyzyjną kwalifikację pacjentów do grup ryzyka i dobór odpowiedniej intensywności terapii.

W ostatnich latach dokonał się istotny postęp w zrozumieniu biologii komórek nowotworowych oraz patogenezy chorób rozrostowych układu krwiotwórczego. Pozwoliło to na wprowadzenie koncepcji leczenia biologicznego, skierowanego na ważne szlaki regulacyjne związane z nowotworzeniem. Stanowi ona obiecującą alternatywę dla dzieci z ALL oporną na konwencjonalne leczenie. Uważa się, że włączenie leków celowanych do terapii ostrej białaczki limfoblastycznej może odegrać ważną rolę w poprawieniu wyników terapeutycznych oraz zminimalizowaniu późnych powikłań obecnie stosowanego leczenia cytostatycznego. Potrzebne jest wyodrębnienie grupy pacjentów, która mogłaby odnieść potencjalnie największe korzyści z zastosowania tego typu leczenia.

Szczególną rolę w procesie onkoogenezy przypisuje się aktywności kinazy białkowej treoninowo-serynowej mTOR. Szlak PI3K/AKT/mTOR jest kluczowy dla kontroli proliferacji, różnicowania, wzrostu i przeżycia komórek, a jego wzmożoną aktywność opisano w wielu nowotworach, w tym także układu krwiotwórczego. Leki ukierunkowane na tę ścieżkę transdukcji sygnału wewnątrzkomórkowego znajdują już zastosowanie w leczeniu niektórych chorób nowotworowych. Istnieją liczne doniesienia przedkliniczne wskazujące, iż mogą być skuteczne także u pacjentów z ALL, co jest obecnie poddawane ocenie także w badaniach klinicznych I i II fazy.

Dotychczas nie zanalizowano jednak jeszcze ekspresji kinazy mTOR w blastach u dzieci z ALL. Wpływ jej aktywności na przebieg kliniczny choroby u pediatrycznych pacjentów również nie został określony.

Celem niniejszej pracy było zbadanie aktywności i ekspresji kinazy mTOR w blastach dzieci z B-komórkową ALL oraz jej wpływu na przebieg kliniczny białaczki. Analizie poddano grupę 68 pacjentów w wieku 1-18 lat: 48 kolejnych chorych, z rozpoznaniem ALL postawionym w latach 2009-2011, u których do chwili obecnej nie rozpoznano wznowy białaczki oraz 20 pacjentów, u których pierwsze zachorowanie wystąpiło w latach 2009-2013 i u których do końca 2015r. wystąpiło niekorzystne zdarzenia w postaci nawrotu pierwszej choroby, albo drugiego nowotworu układu krwiotwórczego. Pacjenci byli leczeni zgodnie z obowiązującym protokołem (ALLIC 2002 oraz 2009) w Katedrze i Klinice Pediatrii Hematologii i Onkologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Klinice Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Ocenie poddano ekspresję wybranych białek szlaku PI3K/mTOR: mTOR, p-mTOR oraz p-S6rp, za pomocą metody immunocytochemicznej, przy użyciu swoistych króliczych przeciwciał monoklonalnych (Cell Signaling). Barwienia immunocytochemiczne zostały wykonane na preparatach rozmazowych szpiku kostnego uzyskanych od pacjentów w dniu rozpoznania przy pierwszym zachorowaniu lub we wznowie.

Porównując grupę pacjentów żyjących do tej pory w pierwszej remisji oraz grupę dzieci u których rozpoznano drugie zachorowanie na białaczkę, analizie poddano wpływ ekspresji i aktywności mTOR na ryzyko niekorzystnego przebiegu choroby i jej nawrotu.

Ponadto, analizując całą grupę pacjentów, zbadano, czy istnieje zależność pomiędzy ekspresją i aktywnością omawianego białka oraz parametrami klinicznymi takimi jak: płeć pacjenta, wiek w momencie rozpoznania, wysokość wstępnej leukocytozy, odpowiedź na zastosowane leczenie indukcyjne (odpowiedź na glikokortykosteroidy w 8. dobie oraz odpowiedź na leczenie w 15. i 33. dobie terapii), grupa ryzyka ustalona wg. obowiązującego Protokołu terapeutycznego, koekspresja antygenów linii mieloidalnej na komórkach blastycznych oraz obecność niektórych aberracji genetycznych w blastach.

Dodatkowo badanie obejmowało porównanie ekspresji i aktywności mTOR w komórkach nowotworowych przy pierwszym rozpoznaniu oraz we wznowie choroby. U dzieci, u których doszło do drugiego zachorowania na białaczkę z zajęciem szpiku, dokonano porównania aktywności i ekspresji kinazy mTOR przy pierwszym oraz drugim rzucie choroby.

Wykazano, że aktywność mTOR wyraźnie różni się u poszczególnych pacjentów, korelując istotnie z ryzykiem nawrotu ALL, oraz jest wyższa przy wznowie, niż przy pierwszym rozpoznaniu choroby. Nie potwierdzono natomiast statystycznie istotnego związku pomiędzy aktywnością białka mTOR, a innymi uznanymi czynnikami niekorzystnego rokowania oraz pozostałymi podstawowymi danymi klinicznymi włączonymi do analizy.

Tym samym pokazano, iż aktywność mTOR w blastach B-komórkowej ALL u dzieci, może być rozpatrywana jako niezależny czynnik złego rokowania, a jej rutynowa ocena mogłaby stanowić podstawę do wyodrębnienia pacjentów o niekorzystnej prognozie, którzy mogliby potencjalnie odnieść korzyść z terapii inhibitorami kinazy mTOR.

Ze względu na niewielką grupę pacjentów poddanych ocenie, a także ograniczony zakres przebadanych białek szlaku kinazy mTOR, wnioskom tym należy przypisywać charakter wstępny. Wymagają one potwierdzenia na większej grupie chorych oraz uzupełnienia o równoległą ocenę ekspresji mTOR na poziomie RNA i białka, analizę aktywności obu kompleksów białkowych mTORC1 i mTORC2, białek stymulujących oraz efektorowych, a także równoległych interferujących szlaków sygnałowych.

Edyta Ulińska


MIEROWNIK
Katedry i Kliniki
Pediatрії, Hematologii i Onkologii
prof. dr hab. n. med. Michał Matysiak