

Streszczenie

Wprowadzenie: Ostre białaczki szpikowe stanowią zróżnicowaną grupę chorób rozrostowych układu krwiotwórczego. Klon nowotworowy w AML wywodzi się z wczesnych stadiów rozwojowych hematopoezy.

Skuteczność leczenia ostrych białaczek szpikowych, pozostaje wciąż niesatysfakcjonująca. Jedynie u niewielkiej grupy pacjentów, uzyskuje się długotrwałą całkowitą remisję choroby. Pomimo intensywnych badań nad różnorodnymi zjawiskami leżącymi u podstaw leukemogenezy, proces ten nie został nadal w pełni poznany. W licznych doniesieniach potwierdzono istotną rolę neowaskularyzacji w patogenezie AML. Wytwarzanie naczyń krwionośnych jest kontrolowane przez liczne czynniki pro i antyangiogenne. Wśród czynników stymulujących wymienia się między innymi EGFL7, HIF-1 α oraz leptynę. Rolę EGFL7 potwierdzono zarówno w fizjologicznej jak i patologicznej angiogenezie. Nadekspresję tego czynnika obserwowano w stanach niedostatecznej podaży tlenu, a w niektórych guzach litych między innymi w raku wątrobowokomórkowym i glejaku wielopostaciowym wykazano jego znaczenie prognostyczne. Z kolei HIF-1 α jest czynnikiem transkrypcyjnym, który reguluje ekspresję licznych genów, powodując zaadaptowanie do warunków niedotlenienia. W piśmiennictwie istnieją doniesienia na temat jego znaczenia w progresji nowotworów złośliwych takich jak rak jelita grubego czy rak nerki. Natomiast leptyna, będąca plejotropową adipocytokiną, bierze udział nie tylko w angiogenezie, ale również hematopoezie, czy stanach zapalnych. Nadekspresję receptora leptyny obserwowano w raku piersi. W tym typie nowotworu potwierdzono zależność między poziomem ekspresji Ob-R, a czasem przeżycia chorych.

Dotychczas brak jednoznacznych danych dotyczących ekspresji EGFL7, HIF-1 α i Ob-R w ostrych białaczkach szpikowych.

Cel pracy: Celem przeprowadzonych prac była ocena ekspresji EGFL7, HIF-1 α i Ob-R mRNA w szpiku kostnym chorych z rozpoznaną de novo ostrą białaczką szpikową oraz w grupie kontrolnej. A następnie, zbadanie zależności między ekspresją powyższych czynników proangiogennych, a podtypem białaczki, obecnością antygenu CD34, klasycznymi czynnikami ryzyka, parametrami molekularnymi i cytogenetycznymi oraz wynikami leczenia.

Material i metody: Badaniem objęto grupę 103 chorych z ostrą białaczką szpikową z wykluczeniem podtypu z PML RAR α oraz 20 zdrowych osób, stanowiących grupę kontrolną. Do oceny ekspresji EGFL-7, HIF-1 α i Ob-R mRNA w szpiku kostnym wykorzystano metodę

RQ-PCR. Wyniki opracowano przy użyciu pakietu programów statystycznych EPIINFO Ver. 7.1.1.14.

Wyniki: W przeprowadzonych przeze mnie badaniach wykazałam znamienne wyższą ekspresję EGFL7 mRNA w szpiku wszystkich chorych z AML, a także w grupie pacjentów z AML CD34+, w porównaniu do grupy kontrolnej. Istotnie niższy poziom EGFL7 wykazano w przypadku ostrych białaczek szpikowych o najwyższym stopniu dojrzałości komórek blastycznych w porównaniu do AML CD34+. Nie obserwowałam znamiennej statystycznie różnicy poziomu ekspresji EGFL7 w zależności od ryzyka cytogenetycznego. Natomiast w grupie chorych z obecnością postaci wild-type genu FLT3 oraz genu NPM1 stwierdziłam istotnie wyższą ekspresję EGFL7. Nie wykazałam znamienych różnic w poziomie mRNA EGFL7 w zależności od uzyskania remisji całkowitej. Obserwowałam dodatnią korelację między poziomem ekspresji EGFL7, a HIF-1 α oraz EGFL7, a Ob-R. Nie stwierdziłam jednak aby ekspresja EGFL7 w szpiku kostnym chorych z AML miała istotny wpływ na czas wolny od nawrotu białaczki czy czas przeżycia pacjentów.

W mojej pracy obserwowałam znamienne niższy poziom HIF-1 α mRNA w AML niż w grupie kontrolnej. Ponadto ekspresja ta była istotnie wyższa w przypadku AML CD34+ niż w AML CD34- i wyraźnie korelowała ze stopniem dojrzałości blastów. Stwierdziłam najwyższą ekspresję HIF-1 α w grupie chorych o wysokim ryzyku cytogenetycznym (HR), w porównaniu do grup o standardowym i pośrednim ryzyku a różnica ta była znamienne statystycznie. Istotnie wyższy poziom ekspresji HIF-1 α mRNA wykazałam w białaczkach z obecnością postaci wild-type genów FLT3 i NPM1 niż w przypadku obecności zmutowanych form genów. Zaobserwowałam także niższą ekspresję HIF-1 α u chorych, którzy uzyskali CR po leczeniu indukcyjnym, w porównaniu do pacjentów nieodpowiadających na terapię. W grupie powyżej 60 roku życia poziom HIF-1 α mRNA był wyższy niż u chorych młodszych. Stwierdziłam również dodatnią korelację między ekspresją HIF-1 α , a poziomem ekspresji Ob-R. Nie wykazałam zależności między poziomem ekspresji HIF-1 α , a RFS. Jednak w przeprowadzonej analizie wieloczynnikowej obserwowałam, że poziom HIF-1 α , wiek, uzyskanie CR i obecność FLT3mut są czynnikami istotnie wpływającymi na przeżycie, a jedynym niezależnym czynnikiem prognostycznym jest CR.

W przypadku Ob-R nie stwierdziłam istotnych różnic między poziomem ekspresji u chorych z AML, a grupą kontrolną. Natomiast znamienne wyższy poziom Ob-R wykazałam w przypadku AML CD34+ w porównaniu do AML CD34-. Nie obserwowałam istotnej korelacji między ekspresją Ob-R, a cytogenetycznymi i molekularnymi parametrami ryzyka.

Jednak znamienne niższy poziom stwierdziłam w grupie pacjentów, którzy uzyskali całkowitą remisję po terapii indukcyjnej. Wykazałam negatywną korelację między poziomem Ob-R mRNA, a leukocytozą i odsetkiem blastów. Nie obserwowałam zależności między ekspresją Ob-R, a czasem wolnym od nawrotu białaczki i całkowitym przeżyciem.

Wnioski: Ekspresja EGFL7 jest wyższa u chorych z ostrą białaczką szpikową w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto poziom EGFL7 mRNA koreluje ze stopniem dojrzewania komórek blastycznych. Natomiast nie obserwowano zależności między ekspresją EGFL7, a wynikami leczenia AML.

Ekspresja HIF-1 α jest niższa u pacjentów z ostrą białaczką szpikową w porównaniu do grupy kontrolnej, a poziom HIF-1 α mRNA koreluje ze stopniem dojrzewania komórek białaczkowych. Ponadto ekspresja HIF-1 α jest najwyższa u chorych z grupy HR według ELN. Dodatkowo poziom HIF-1 α jest wyższy u pacjentów starszych. Ekspresja HIF-1 α nie koreluje z RFS, ani OS, jakkolwiek poziom HIF-1 α , uzyskanie CR, wiek, obecność mutacji FLT3 mają wpływ na przeżycie, a jedynym niezależnym czynnikiem prognostycznym jest uzyskanie całkowitej remisji po leczeniu indukcyjnym.

Ekspresja Ob-R nie wykazuje istotnej różnicy pomiędzy grupą z AML, a kontrolą. Poziom Ob-R mRNA jest najwyższy w białaczkach CD34+. Ekspresja Ob-R negatywnie koreluje z leukocytozą i odsetkiem komórek białaczkowych. Istnieje zależność między poziomem Ob-R, a prawdopodobieństwem uzyskania CR, jednak nie ma korelacji pomiędzy ekspresją receptora, a RFS i OS.

Ekspresja EGFL7, a HIF-1 α ; EGFL7, a Ob-R; HIF-1 α , a Ob-R wykazuje dodatnią korelację.

Słowa kluczowe: ostra białaczka szpikowa- EGFL7-HIF-1 α - Ob-R-angiogeneza

Summary

Introduction: Acute myeloid leukemias belong to heterogeneous group of hematological malignancies. Neoplastic clone in AML derived from the early stages of myeloid cells.

The efficiency of treatment in acute myeloid leukemia, is still unsatisfactory. Only small group of patients obtain long-term complete remission of disease.

Despite intensive work on different mechanisms go to leukemogenesis, this process is still unknown. Numerous reports confirm the role of neovascularisation in pathogenesis of AML. The production of blood vessels is controlled by many pro and antiangiogenic factors. Among stimuli factors specified inter alia EGFL7, HIF-1 α and leptin. The role of EGFL7 was confirmed in physiological and pathological angiogenesis. Overexpression of this factor was observed in hypoxia condition and in some tumors inter alia in hepatocellular carcinoma and glioblastoma multiforme it was a prognostic factor. Next, HIF-1 α is a transcription factor, which can regulate the expression of numerous genes and result in adaptation to hypoxia. In the literature there are many reports about the significance of HIF-1 α in the progression of cancer for example colon cancer and renal cancer. Then, leptin, which is pleiotropic adipocytokine, takes role not only in angiogenesis, but also in hematopoiesis or inflammation process. Overexpression of leptin receptor was seen in breast cancer. In this type of tumor, relations between the level of expression and overall survival was confirmed.

So far, unambiguous evidence about expression of EGFL7, HIF-1 α and Ob-R in acute myeloid leukemia is lacking.

Aim of the study: The aim of this study was to evaluate the expression of EGFL7, HIF-1 α and Ob-R mRNA in patients with de novo acute myeloid leukemia and in group of healthy individuals. Then results were compared to subtype of leukemia, the CD34 expression, classical prognostic factors, molecular and cytogenetic mediators and treatment results. In final stage evaluation between expression of these proangiogenic factors were analyzed.

Materials and methods: 103 non PML RAR α AML patients and 20 healthy individuals were included in this study. The expression of EGFL7, HIF-1 α and Ob-R in bone marrow was analyzed by RQ-PCR. The results were evaluated using the package statistical programs EPIINFO Ver. 7.1.1.14.

Results: My study shows statistically significant higher expression of EGFL7 mRNA in bone marrow of all AML patients, also in group of AML CD34+, compared to healthy controls.

Significantly lower level of EGFL7 was seen in acute myeloid leukemia with the highest level of maturation compared to AML CD34+. There was no significant difference of level EGFL7 according to cytogenetic risk. However, in group with wild-type FLT3 and NPM1 higher expression of EGFL7 was observed. There was no significant difference between the level of EGFL7 according to complete remission rate. The positive correlation between expression of EGFL7 and HIF-1 α , EGFL7 and Ob-R was observed. There was no significant association between the expression EGFL7 and relapsed free survival and overall survival.

I observed significantly lower level of HIF-1 α mRNA in AML than in healthy individuals. Moreover, the expression was higher in cases of AML CD34+ than in AML CD34- and there was distinct correlation with maturation of blasts. I claimed the highest expression of HIF-1 α in high risk cytogenetic group, compared to standard and intermediate risk group, the difference was statistically significant. The higher level of HIF-1 α expression mRNA was observed in AML with wild-type FLT3 and NPM1 than in subtype with mutations of these genes. I revealed also lower expression of HIF-1 α in patients which obtain complete remission than those with no response to chemotherapy. In group older than 60 years old level of HIF-1 α mRNA was higher than younger patients. I revealed also positive correlation between expression of HIF-1 α and Ob-R. There was no dependency between level of HIF-1 α and relapsed free survival. Although, multifactorial analysis showed that level of HIF-1 α , age, complete remission obtain, FLT3 mutation are mediators associated with survival, but only complete remission obtain is independent risk factor.

There was no statistical significant difference between level expression of Ob-R in AML and control group. However, significantly higher expression was observed in AML CD34+ than in AML CD34-. There was no correlation between expression of Ob-R and cytogenetic and molecular risk mediators. Although, significantly lower level was observed in patients achieving complete remission after induction therapy. Negative dependency between Ob-R mRNA and leukocytosis and percentage of blasts was seen. There was no correlation between Ob-R expression and relapsed free survival or overall survival.

Conclusions: Expression of EGFL7 is higher in patients with acute myeloid leukemia compared to control group. Moreover, level of EGFL7 mRNA correlates with degree of maturation of blast cells. However no dependency between expression of EGFL7 and effects of treatment was observed.

Expression of HIF-1 α is lower in AML patients compared to control group and level of HIF-1 α mRNA correlates with degree of maturation of leukemic cells. Moreover, expression of HIF-1 α is the highest in patients with HR according to ELN. Additionally, level of HIF-1 α is higher in older patients. Expression of HIF-1 α not correlate with RFS and OS, however level of HIF-1 α , CR obtain, age, FLT3 mutation have influence on survival, but only CR achieving is independent prognostic factor.

Expression of Ob-R reveals no difference between AML group and controls. The level of Ob-R mRNA is the highest in AML CD34+. Expression of Ob-R correlates negatively with leukocytosis and percentage of leukemic cells. There is dependency between level of Ob-R and probability of achieving CR, but there is no correlation with RFS and OS.

Expression of EGFL7 and HIF-1 α , EGFL7 and Ob-R, HIF-1 α and Ob-R reveal positive correlation.

Key words: acute myloid leukemia- EGFL7-HIF-1 α -Ob-R – angiogenesis.