

## STRESZCZENIE

Tlen ma kluczowe znaczenie dla życia organizmów. Stan, w którym dochodzi do zredukowanej lub nieadekwatnej do potrzeb dostępności tlenu nazywamy hipoksją. Głównymi regulatorami odpowiedzi komórkowej na niedotlenienie są czynniki transkrypcyjne indukowane hipoksją HIFs (Hypoxia-Inducible Factors). Poziom HIFs w mechanizmie tlenozależnym jest warunkowany przez hydroksylazy prolylowe PHDs (Prolyl-Hydroxylases) oraz białko VHL (von Hippel-Lindau).

W dotychczasowych badaniach stwierdzono podwyższoną ekspresję HIFs w nowotworach litych, liniach komórkowych i modelach mysich. Jednak nadal brakuje danych na temat roli HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , PHD-2, PHD-3 oraz VHL u chorych na ostrą białaczkę szpikową AML (Acute Myeloid Leukemia).

Dlatego też przeprowadzono badanie, w którym analizowano odsetki blastów HIF-1 $\alpha$ -pozytywnych, HIF-2 $\alpha$ -pozytywnych, PHD-2-pozytywnych, PHD-3-pozytywnych oraz VHL-pozytywnych. Celem było sprawdzenie czy mogą to być czynniki prognostyczne u chorych na AML. Grupę badaną stanowiło 26 chorych na AML, u których analizowano HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , PHD-2, PHD-3 oraz VHL w blastach szpiku kostnego i krwi obwodowej przed podaniem chemioterapii oraz w blastach krwi obwodowej 48h po podaniu leczenia. Grupę kontrolną stanowiły mieloblasty szpiku kostnego 20 zdrowych dawców szpiku kostnego do przeszczepów allogenicznych. Ekspresję wyżej wymienionych parametrów badano metodą cytometrii przepływowej (barwienia powierzchniowe i cytoplazmatyczne).

Najpierw porównano odsetki blastów HIF-1 $\alpha$ <sup>+</sup>, HIF-2 $\alpha$ <sup>+</sup>, PHD-2<sup>+</sup>, PHD-3<sup>+</sup> oraz VHL chorych na AML z odsetkami takich blastów w szpikach osób zdrowych. Następnie dokonano porównania wpływu leczenia indukcyjnego na blasty chorych z AML pomiędzy ich szpikiem kostnym i krwią obwodową oraz znaczenie poziomu ekspresji badanych antygenów na długość przeżycia u tych chorych. Kolejne porównanie dotyczyło odsetków blastów pomiędzy grupami chorych, którzy uzyskali remisję oraz tych, którzy nie odpowiedzieli na leczenie. Dalej porównano blasty u chorych we krwi obwodowej przed leczeniem i 48h po podaniu chemioterapii indukcyjnej. Na koniec zbadano zależność ekspresji HIF-2 $\alpha$  na ryzyko wystąpienia przedwczesnego zgonu.

Uzyskane wyniki wskazują, że wysokie odsetki blastów HIF-1 $\alpha$ <sup>+</sup>, HIF-2 $\alpha$ <sup>+</sup>, niezależnie od innych czynników rokowniczych, przekładają się na krótsze przeżycie

chorych na AML. HIF-2 $\alpha$  ma niekorzystne znaczenie rokownicze, a inhibitory tego białka mogą być uzupełnieniem leczenia przeciwbiałaczkowego, poprawiającym rokowanie w tej chorobie. Cenną obserwacją jest także wykazanie, że u chorych uzyskujących remisję PHD-3 dodatnio koreluje z HIF-2 $\alpha$ , co może świadczyć o hamującym wpływie PHD-3 na pro-nowotworowe działanie HIF-2 $\alpha$ . Ponadto występowanie PHD-2 w blastach chorych na AML może mieć korzystne znaczenie prognostyczne, a niedobór PHD-2 może świadczyć o prymitywnym charakterze tych blastów.

**Słowa kluczowe:** ostra białaczka szpikowa, czynniki indukowane hipoksją, hydroksylazy prolylowe, białko von Hippel-Lindau, cytometria przepływową, remisja całkowita

## SUMMARY

Oxygen is vital to the life of organisms. A state where it comes to a reduced or inadequate availability of oxygen is called hypoxia. The main regulators of hypoxia-mediated cellular responses are transcriptional factors induced by hypoxia HIFs (Hypoxia-Inducible Factors). Their level in the oxygen dependent mechanism is conditioned by PHDs (Prolyl-Hydroxylases) and protein VHL (von Hippel-Lindau).

HIFs have been shown to have an increased expression in previous studies in solid tumors, cell lines and mouse models. However, there is still no data on the role of HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , PHD-2, PHD-3 and VHL in patients with acute myeloid leukemia (AML).

That is why, an experiment has been conducted in which the rates of HIF-1 $\alpha$  positive, HIF-2 $\alpha$  positive, PHD-2 positive, PHD-3 positive and VHL positive blasts have been examined. The aim was to check, if they can be considered predictive factors in AML patients. The study group comprised 26 patients with AML, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , PHD-2, PHD-3 and VHL in bone marrow and peripheral blood blasts before chemotherapy and peripheral blood blasts 48h after treatment. Control group was myeloblast marrow of 20 healthy bone marrow donors for allogeneic transplants. Expression of the mentioned above parameters was investigated by flow cytometry (surface staining and cytoplasmic).

First, the rates of HIF-1 $\alpha$ +, HIF-2 $\alpha$ +, PHD-2+, PHD-3+ and VHL+ AML with the percentage of such blasts in healthy people have been compared. Then, the effect of induction treatment on blasts of AML patients between their bone marrow and peripheral blood, and the importance of the expression level of the antigen tested for survival in these patients have been compared. Another comparison was the percentage of blasts between the remission groups and those who did not respond. Next, blasts in peripheral blood vessels before treatment and 48 hours after induction chemotherapy have been compared. Finally, the dependence of HIF-2 $\alpha$  expression on the risk of premature death has been investigated.

The results show that high rates of HIF-1 $\alpha$ +, HIF-2 $\alpha$ + blasts, regardless of other prognostic factors, translate into a shorter survival rate for AML patients. HIF-2 $\alpha$  has an unfavorable prognostic significance, and inhibitors of this protein may be complementary to anti-leukemic treatment to improve prognosis in this disease. Valuable observation is also showing that in patients with remission PHD-3 positively correlates with HIF-2 $\alpha$ , which may indicate the inhibitory effect of PHD-3 on HIF-2 $\alpha$  pro-tumor activity. In addition, the incidence of PHD-2 in AML blasts may be of beneficial prognostic significance, and PHD-2 deficiency may indicate the primordial nature of these blasts.

**Key words:** acute myeloid leukemia, hypoxia-inducible factors, prolyl hydroxylases, von Hippel-Lindau protein, flow cytometry, complete remission