



# UNIwersYTET MEDYCZNY

## IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

**Lek. Dominika Kulej**

Katedra i Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej  
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

**„ Przebieg kliniczny a wyjściowy status białek oporności wielolekowej w  
leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci”**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych w zakresie medycyny

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Alicja Chybicka

Recenzenci: **Prof. dr hab. n. med. Maryna Krawczuk- Rybak**

Klinika Onkologii Dziecięcej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

**Dr hab. med. Beata Zalewska-Szewczyk**

Klinika Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii, Uniwersytet  
Medyczny w Łodzi

Wrocław, 27.06.2014

## **Cirriculum Vitae**

Data urodzenia: 19.07.1978

Miejsce urodzenia: Wrocław

### **Wykształcenie:**

**2011** Dyplom specjalizacyjny z pediatrii

**2004** Dyplom na wydziale lekarskim Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

### **PRZEBIEG PRACY ZAWODOWEJ:**

Od marca 2013	Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu- asystent
Od marca 2011	Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej, Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny nr 1 we Wrocławiu- starszy asystent, specjalizacja z hematologii i onkologii dziecięcej
Marzec 2006- Marzec 2011	Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej, Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny nr 1 we Wrocławiu- specjalizacja z pediatrii
Październik 2005- Wrzesień 2009	Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu- studia doktoranckie
Październik 2004- Październik 2005	Wojskowy Szpital Kliniczny nr 4 we Wrocławiu- staż podyplomowy

## **DOROBEK NAUKOWY:**

Autorka/ współautorka 4 opublikowanych prac oraz 50 doniesień naukowych

## **OPUBLIKOWANE PRACE:**

1. Megachemioterapia i autologiczne przeszczepienie hematopoetycznych komórek macierzystych u dzieci z mięsakiem Ewinga - doświadczenia polskie; Katarzyna Drabko, Agnieszka Zaucha-Prażmo, Marta Choma, Beata Wójcik, Agnieszka Dyla, Dominika Paździor (Kulej), Krzysztof Kałwak, Alicja Chybicka, Szymon Skoczeń, Jolanta Goździk, Jan Styczyński, Mariusz Wysocki, Jerzy Kowalczyk.: Med.Wieku Rozw. 2008 T.12 nr 4 cz.2; s.1069-1073
2. Od objawu do nowotworu : wczesne rozpoznawanie chorób nowotworowych u dzieci. Nieziarnicze chłoniaki złośliwe u dzieci; Alicja Chybicka, Bernarda Kazanowska, Grażyna Wróbel, Ewa Sowińska, Dominika Paździor (Kulej).: red. Alicja Chybicka; Wrocław : Elsevier Urban & Partner, 2009; s.233-245
3. Higher CD34+ and CD3+ cell doses in the graft promote long-term survival, and have no impact on the incidence of severe acute or chronic graft-versus-host disease after in vivo T cell-depleted unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation in children; Krzysztof Kałwak, Julita Porwolik, Monika Mielcarek, Ewa Gorczyńska, Joanna Owoc-Lempach, Marek Ussowicz, Agnieszka Dyla, Jakub Musiał, Dominika Paździor, Dominik Turkiewicz, Alicja Chybicka.: Biol.Blood Marrow Transplant. 2010 Vol.16 no.10; s.1388-1401
4. Ocena skuteczności terapii chelatującej deferyryksem u pacjentów pediatrycznych z hemosyderozą wtórną po allogenicznej transplantacji komórek macierzystych; Dominika Kulej, Monika Mielcarek, Krzysztof Kałwak, Onkol.Pol. 2012 T.15 nr 1; s.24-29

## **STRESZCZENIE**

### **Wstęp**

Pomimo znacznego rozwoju chemioterapii oraz postępów w leczeniu ostrych białaczek limfoblastycznych nadal dochodzi u ok. 15-20% dzieci do nawrotu choroby. Jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za niepowodzenie w leczeniu jest zjawisko usuwania cytostatyków z wnętrza komórki nowotworowej przy udziale białek oporności wielolekowej.

### **Cel pracy**

Głównym celem pracy była ocena ekspresji białek oporności wielolekowej–MDR (MDR-1, MDR-3, MRP-1, LRP, BCRP) u 25 dzieci leczonych z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) w Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej we Wrocławiu. W związku z tym wykonane zostały następujące zadania:

1. Określenie częstości ekspresji białek MDR i ich aktywności na początku leczenia u dzieci z ALL.
2. Porównanie uzyskanych wyników ekspresji MDR z danymi klinicznymi (obecność objawów choroby, badanie fizykalne, wyniki badań laboratoryjnych).
3. Ocena poziomu ekspresji MDR i jej związek z dotychczas uznanymi czynnikami prognostycznymi u dzieci z ALL.
4. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją białek MDR, a kwalifikacją do grup ryzyka wg protokołu leczniczego ALLIC 2002.
5. Ocena ekspresji białek oporności wielolekowej dla przewidywania efektywności leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej- czy ich występowanie wiąże się z gorszą odpowiedzią na leczenie i szybszym nawrotem choroby.
6. Porównanie metod stosowanych do oznaczania MDR w ALL.

## **Materiały i metody:**

Analizę ekspresji białek oporności wielolekowej przeprowadzono w krwi obwodowej u 25 dzieci z noworozpoznaną ostrą białaczką limfoblastyczną w wieku 6 miesięcy do 19 lat oraz u 15 zdrowych dzieci w grupie kontrolnej. Ocena ekspresji była przeprowadzona przy pomocy reakcji odwrotnej transkrypcji RT-PCR oraz cytometrii przepływowej w 1 oraz 15 dniu indukcji leczenia białaczki wg protokołu ALLIC BFM 2002 oraz 1 pacjenta wg programu INTERFANT 06. W grupie kontrolnej oznaczenie było przeprowadzone jednorazowo. Analizowano dane kliniczne dotyczące rozpoznania pacjentów, kwalifikacji do grup ryzyka, programu terapeutycznego oraz jego realizacji, czasu trwania leczenia przeciwnowotworowego, obserwowanych powikłań po leczeniu cytostatycznym i końcowych wyników leczenia.

## **Wyniki:**

Nie ujawniono zależności statystycznej pomiędzy ekspresją białek oporności wielolekowej oznaczanych metodą PCR, a wystąpieniem klinicznych objawów oraz zaburzeń laboratoryjnych w chwili rozpoznania ostrej białaczki limfoblastycznej (pozaszpikowa lokalizacja ALL, zajęcie wątroby, śledziona, regionalnych węzłów chłonnych, poziom leukocytów, hemoglobiny, płytek krwi). Wysoka ilość limfoblastów we krwi obwodowej w chwili diagnozy korelowała z ekspresją białka MRP-1 oraz BCRP w 1 dniu leczenia.

Wykazano związek występowania białek oporności wielolekowej MRP-1 z obecnością limfoblastów w szpiku kostnym. Nie wykazano istotnej statystycznie zależności pomiędzy ekspresją białek oporności wielolekowej, a wystąpieniem czynników uznanych za niekorzystne prognostycznie wg protokołu ALLIC BFM 2002 (wiek, płeć, immunofenotyp). Zaburzeniom cytogenetycznym z niekorzystnym rokowaniem u pacjentów z ALL towarzyszyła ekspresją białek oporności wielolekowej MDR-3, MRP-1, LRP, jednak ze względu na małą liczebnie grupę nie była możliwa analiza statystyczna tych zależności.

Analiza wczesnej odpowiedzi na leczenie (odpowieź na sterydy w 8 dobie, remisja hematologiczna w szpiku kostnym w 15 i 33 dniu) potwierdziła negatywny związek pomiędzy brakiem remisji w 33 dniu, a niekorzystnym rokowaniem, niższym całkowitym przeżyciem (OS) i przeżyciem wolnym od zdarzeń (EFS).

U pacjentów zakwalifikowanych zgodnie z protokołem ALLIC BFM 2002 do określonych grup ryzyka (standardowego, pośredniego lub wysokiego) nie wykazano istotnego związku z ekspresją białek oporności wielolekowej oznaczonej metodą PCR.

W przeprowadzonym projekcie nie potwierdzono ze względu na małą liczebność grupy zależności statystycznej ekspresji białek oporności wielolekowej z wystąpieniem wznowy, jednak istotną jest informacja, że u wszystkich 4 pacjentów, u których doszło do wznowy lub progresji choroby potwierdzono jednoczasową ekspresję co najmniej 3 z 5 białek MDR: MDR-3, MRP-1, LRP.

Wykazano tendencję do niekorzystnego przebiegu choroby (OS) w związku z ekspresją białka MDR-3. Analizując zmianę ekspresji białek MDR w trakcie leczenia wykazano różnice statystyczne pomiędzy 1 a 15 dniem w przypadku białka MRP-1, LRP oraz BCRP. Potwierdzono statystycznie istotny związek ekspresji wykrytego metodą PCR białka MDR-3 oraz BCRP pomiędzy grupą badanych pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną, a grupą kontrolną.

Częstość ekspresji białek oporności wielolekowej oznaczanych metodą RT-PCR była wyższa niż przy zastosowaniu metody FCM (62,5% vs 16,4%). Różnica ta wynikała prawdopodobnie z niskiej zawartości białek MDR w komórkach, a tym samym mniejszej szansy na wykrycie ekspresji tych białek metodą FCM. Potwierdzona metodą PCR ekspresja białek oporności wielolekowej występowała w stosunkowo wysokim procencie w badanej grupie pacjentów (na poziomie 62,5%), natomiast obecność glikoproteiny-P została wykazana najrzadziej w stosunku do pozostałych białek (MDR-3, MRP-1, BCRP, LRP). Wydają się zasadne dalsze badania na większej grupie pacjentów dotyczące ekspresji białek oporności wielolekowej u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną zarówno w rozpoznanej de novo ALL jak i nawrotach choroby.

## **Wnioski:**

1. Wysoka ilość limfoblastów we krwi obwodowej w chwili diagnozy korelowała z ekspresją białka MRP-1 oraz BCRP w 1 dniu leczenia.
2. Potwierdzono związek pomiędzy ekspresją białka MDR-3 oraz BCRP w grupie badanych pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną a grupą kontrolną. Nieopisane do tej pory w piśmiennictwie, a uzyskane przeze mnie wyniki dotyczące ekspresji białka MDR-3 u dzieci z ALL, powinny być podstawą do rozpoczęcia dalszych badań w kierunku predyspozycji genetycznych prowadzonych na większej grupie pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną.
3. Wykazano niekorzystny wpływ na wyniki leczenia EFS pomiędzy wystąpieniem ekspresji białka oporności wielolekowej MRP-1, a obecnością mniejszej niż 90% liczby limfoblastów w szpiku kostnym.
4. Mimo małej liczby pacjentów zaobserwowano związek pomiędzy wystąpieniem translokacji o niekorzystnym rokowaniu, a ekspresją białek oporności wielolekowej MDR-3, MRP-1, LRP, co sugeruje konieczność badań na większej grupie chorych.
5. Ekspresja białka MDR-3 wiąże się z wyraźną tendencją do niekorzystnego przebiegu choroby (OS). To interesujące spostrzeżenie do tej pory niepublikowane w piśmiennictwie wymaga dalszych badań na większej grupie pacjentów z ALL.
6. Potwierdzona metodą PCR ekspresja białek oporności wielolekowej w głównej mierze dotyczyła MDR-3, MRP-1, BCRP, LRP, natomiast obecność glikoproteiny-P kształtowała się na najniższym poziomie wśród wszystkich z grupy MDR.