

7. Streszczenie

Ostra białaczka szpikowa (AML) jest heterogenną grupą chorób o wysokim współczynniku zgonów wynoszącym 2.7 na 100000 mieszkańców, stąd poznanie jej biologii stanowi ważne wyzwanie badawcze.

Ważną rolę w rozwoju AML pełnią białaczkowe komórki macierzyste (LSC) oraz ich oddziaływanie z mikrośrodowiskiem szpiku. Komórki białaczkowe wpływają na komórki podścieliska szpiku kostnego tworzące tzw. niszę hematopoetyczną (NH) i modyfikują ją w taki sposób, aby stworzyć optymalne warunki dla przeżycia LSC. Istnieją dowody, że komórki NH chronią LSC przed apoptozą indukowaną przez chemioterapię. Wykazano, że LSC oddziałują na komórki NH zarówno za pomocą zmienionej ekspresji białek powierzchniowych jak i poprzez wydzielanie różnego rodzaju cytokin i chemokin.

Analiza piśmiennictwa pokazuje, że wzajemna interakcja macierzystych komórek krwiotwórczych (HSC) z komórkami podścieliska szpiku zachodzi poprzez szereg układów ligand-receptor w tym m.in. Robo4-Slit2, CXCR4-SDF1, Notch-Jagged1, Tie2-Ang-1. Interakcja Slit2/Robo4 wpływa na regulację homeostazy HSC w niszy szpiku kostnego oraz migrację HSC. CXCL12 i CXCR4 odgrywają kluczową rolę w lokalizacji i funkcji HSC w NH. Sygnalizacja Notch wpływa na wiele różnych procesów komórkowych, w tym na podtrzymanie populacji komórek macierzystych w szpiku kostnym (BM), określanie losu komórek, różnicowanie, proliferację i apoptozę. Sygnalizacja Ang1-Tie2 odgrywa kluczową rolę w hematopoezie szpiku oraz zachowaniu zdolności do samoodnawiania puli HSC. Mechanizmy oddziaływania LSC z NH szpiku kostnego są podobne do tych jakie wykorzystują prawidłowe HSC. NH reguluje ważne funkcje samoodnowy, proliferacji i różnicowania HSC. Zaburzenia tej regulacji mogą prowadzić do procesów nowotworzenia i rozwoju AML.

Celem pracy była ocena liczby białaczkowych komórek macierzystych (LSC) i prawidłowych macierzystych komórek krwiotwórczych (HSC) w próbkach szpiku kostnego chorych z nowo rozpoznaną ostrą białaczką szpikową. Oznaczano i porównywano ekspresję receptorów białek niszy hematopoetycznej (BNH): Robo4, CXCR4, Notch1, Tie2, na powierzchni LSC oraz na HSC za pomocą 10 – kolorowej cytometrii przepływowowej. Poszukiwano zależności pomiędzy liczbą LSC i ekspresją receptorów poszczególnych BNH a parametrami odzwierciedlającymi masę guza białaczkowego i znanymi czynnikami prognostycznymi. Przeprowadzono również ocenę zależności pomiędzy ekspresją poszczególnych BNH na LSC a całkowitym przeżyciem (OS; overall survival).

Przeprowadzone badanie jest badaniem jednoośrodkowym. Pacjenci rekrutowani byli spośród chorych hospitalizowanych na Oddziale Hematologii Wojewódzkiego Wielospecjalistycznego Centrum Onkologii i Traumatologii/Klinice Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w okresie rekrutacji od 1. kwietnia 2019 roku do 12. grudnia 2021 roku. Do badania włączani byli kolejni pacjenci z nowo rozpoznaną ostrą białaczką szpikową. Analizą objęto 54 osoby (31 kobiet, 23 mężczyzn) w wieku od 25 do 86 lat (mediana wieku wynosiła 62,5 lata). Po uzyskaniu pisemnej zgody na udział w badaniu od pacjentów pobierano próbki krwi celem oceny podstawowych parametrów morfologicznych krwi obwodowej i wybranych wskaźników biochemicznych oraz próbki szpiku kostnego. Próbki szpiku po poddaniu wstępnej obróbce zostały poddane ocenie pod kątem ekspresji białek Robo4, CXCR4, Tie2, Notch1 na powierzchni LSC i HSC. Oceny dokonywano za pomocą cytometrii przepływowej. Na badanie uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej nr RNN/16/18/KE z dnia 15 lutego 2018 r.

Wyniki: Wykazano, że w badanej populacji chorych na AML liczba LSC była istotnie wyższa niż liczba prawidłowych HSC. Liczba LSC negatywnie wpływała także na całkowite przeżycie w grupie pacjentów leczonych za pomocą intensywnej chemioterapii. Pacjenci z większą liczbą LSC (>30/milion komórek) żyli krócej w porównaniu do osób z mniejszą (<30/milion komórek) liczbą LSC. Podobnej zależności nie odnotowano w grupie osób leczonych nieintensywnie. Wykazano zwiększoną ekspresję Tie2 na LSC w porównaniu do HSC, co może wskazywać, że interakcja ANG-Tie2 jest jednym z istotnych mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymywanie LSC w stanie uśpienia. Potwierdzono występowanie ekspresji receptora Notch1 na komórkach LSC u ludzi. Wykazano, też większą ekspresję białka Notch1 na LSC w porównaniu do HSC. Nie wykazano natomiast istotnego związku pomiędzy poziomem ekspresji białka Notch1 a całkowitym przeżyciem. W pracy wykazano, że CXCR4 ulega ekspresji na komórkach LSC oraz, że jego ekspresja na LSC jest niższa niż na HSC. Ponadto wykazano, że większe stężenie CXCR4 u pacjentów leczonych intensywnie na komórkach LSC wiązało się z gorszym rokowaniem. Nie obserwowano efektu wpływu ekspresji CXCR4 na OS w grupie pacjentów leczonych nieintensywnie. Potwierdzono też ekspresję białka Robo4 na LSC. Ekspresja Robo4 na LSC była mniejsza w porównaniu do HSC.

Na podstawie uzyskanych wyników można wysunąć następujące wnioski:

1. Wykazano wyższą liczbę LSC w porównaniu do HSC w próbkach szpiku kostnego chorych z nowo rozpoznana AML co wskazuje na preferencyjny i konkurencyjny dla HSC wzrost klonu nowotworowego, który wypiera prawidłową hematopoezę.
2. Wysoka liczba LSC w szpiku kostnym wiązała się z wyższym odsetkiem blastów w szpiku i krótszym całkowitym przeżyciem chorych leczonych intensywną chemioterapią. Obserwacja ta wskazuje, że ilościowa ocena LSC może stanowić dodatkowy biomarker umożliwiający lepszą identyfikację chorych o niekorzystnym rokowaniu.
3. Na powierzchni białaczkowych komórek macierzystych stwierdzono wyższą ekspresję Notch1 oraz Tie2 w porównaniu do prawidłowych HSC, co sugeruje większą zależność LSC od interakcji z mikrośrodowiskiem szpiku w porównaniu do prawidłowych HSC.
4. Spośród wszystkich analizowanych białek, jedynie zwiększona ekspresja CXCR4 na LSC wiązała się z gorszym rokowaniem i krótszym czasem przeżycia co wskazuje na wiodącą rolę szlaku CXCR4-CXCL12 w oddziaływaniu pomiędzy mikrośrodowiskiem szpiku a LSC. Obserwacja ta może stanowić podstawę dla badań nad zastosowaniem selektywnych inhibitorów CXCR4 i/lub CXCL12, które zmniejszając protekcyjny wpływ niszy hematopoetycznej mogą zwiększyć wrażliwość LSC na konwencjonalną chemioterapię.
5. Wyższa ekspresję Robo4 na HSC niż na LSC wskazuje, że interakcja Robo4-Slit2 jest raczej cechą prawidłowej hematopoezy a jej rola w AML może być mniej istotna.