

STRESZCZENIE

Nowotwory złośliwe stanowią poważny problem zdrowotny, społeczny i ekonomiczny w Polsce i na świecie. W ciągu ostatnich trzydziestu lat odnotowano w Polsce ponad dwukrotny wzrost zachorowalności na nowotwory złośliwe. Jednym z najczęściej występujących u osób dorosłych nowotworów hematologicznych jest ostra białaczka szpikowa. Ostra białaczka szpikowa charakteryzuje się niekontrolowaną proliferacją i brakiem różnicowania niedojrzałych hematopoetycznych komórek macierzystych i komórek progenitorowych. Prowadzi to do akumulacji w organizmie niedojrzałych i upośledzonych czynnościowo komórek białaczkowych. Naciekanie szpiku przez komórki nowotworowe prowadzi do zaburzenia hematopoezy, czego konsekwencją jest niedokrwistość, małopłytkowość i neutropenia. Najpoważniejszym problemem jest leczenie nawrotowych oraz pierwotnie opornych ostrych białaczek szpikowych. Pomimo ciągłych prób poprawy skuteczności terapii ostrej białaczki szpikowej, efektywność leczenia pozostaje na niemal niezmiennym poziomie od dziesięcioleci. Terapią o najwyższej skuteczności jest intensywna chemioterapia i przeszczep komórek krwiotwórczych, jednak przeprowadzenie takiego leczenia możliwe jest u ograniczonej liczby pacjentów. Wysoka fenotypowa i genotypowa heterogenność ostrej białaczki szpikowej sprawiają, że konieczne jest opracowanie spersonalizowanego podejścia do terapii, opartego na określaniu indywidualnej wrażliwości komórek białaczkowych na chemioterapeutyki.

Celem niniejszej rozprawy jest opracowanie metod diagnostycznych i wspomagających terapię chemoopornej ostrej białaczki szpikowej. W rozprawie przedstawiono interdyscyplinarne badania z zakresu inżynierii biomedycznej, wykorzystujące najnowsze pomiarowe techniki optyczne. Autorska metoda diagnostyki chemoopornych klonów ostrej białaczki szpikowej oparta jest na badaniu zmian właściwości biomechanicznych komórek pod wpływem działania cytostatyków oraz leków epigenetycznych. Przeprowadzono badania zmian właściwości biomechanicznych komórek białaczkowych, otrzymanych ze szpiku kostnego pacjentów z ostrą białaczką szpikową, poddanych działaniu inhibitorów topoizomerazy II (epirubicyny i daunorubicyny) za pomocą holograficznej pęsety optycznej. Wyniki eksperymentów skorelowano z jądrową lokalizacją leków, którą określano za pomocą fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej. Stwierdzono, że zmiany właściwości biomechanicznych komórek białaczkowych na skutek działania leku występują jedynie wówczas, gdy substancja cytotoksyczna akumulowała się w obrębie jądra komórkowego. Nie obserwowano zmian sztywności komórek nowotworowych, kiedy lek lokalizował się w cytoplazmie. Wywnioskowano, że zmiany właściwości biomechanicznych komórek nowotworowych po inkubacji w obecności substancji cytotoksycznej świadczą o wrażliwości komórek na cytostatyki. Jednocześnie stwierdzono, że jądrowa lokalizacja leków świadczyć może o wrażliwości komórek na chemioterapeutyki. Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu dostarczała wyniki badań cytogenetycznych i molekularnych pacjentów z ostrą białaczką szpikową. Skorelowano wyniki badań genetycznych i immunofenotypowych pacjentów z ostrą białaczką szpikową z wynikami pomiarów sztywności komórek białaczkowych oraz z jądrową lokalizacją inhibitorów topoizomerazy II w komórkach. Stwierdzono, że obecność mutacji genetycznych (FLT3-ITD, NPM1) lub antygenów

powierzchniowych (CD33, CD34, CD123), stanowiących niekorzystny czynnik rokowniczy, powoduje, że inhibitory topoizomerazy II nie lokalizują się w obrębie jądra komórkowego, a także nie obserwuje się zmian sztywności komórek na skutek inkubacji z tymi związkami. Zbadano również wpływ daunorubicyny na sztywność jąder komórkowych. Daunorubicyna jest antybiotykiem antracyklinowym stosowanym w każdym schemacie leczenia pacjentów z ostrą białaczką szpikową. W wyniku eksperymentów stwierdzono, że wraz ze wzrostem stężenia leku sztywność jąder komórkowych zwiększa się nawet 10-krotnie. Wzrost sztywności jąder komórkowych obserwowano również na skutek działania niskich stężeń inhibitorów metylacji DNA – azacytydyny i decytabiny. Inhibitory metylacji DNA wywołują aktywację genów supresorowych i regulujących cykl komórkowy. Azacytydyna i decytabina stosowane w małych dawkach wpływają na metylację kwasów nukleinowych poprzez hamowanie metylotransferazy DNA.

Opracowano autorską metodę określania wewnątrzkomórkowej lokalizacji daunorubicyny za pomocą cytometrii przepływowej. Stwierdzono, że za pomocą cytometrii przepływowej możliwe jest badanie obecności daunorubicyny w komórkach, stosując ponad 100 razy mniejsze stężenie leku niż za pomocą mikroskopii konfokalnej. Dodatkowo opracowano technikę badania uwalniania daunorubicyny z komórek białaczkowych za pomocą cytometrii przepływowej. Opracowana metoda umożliwia monitorowanie zmian ilości leku w komórkach. Za pomocą tej metody wykazano aktywne usuwanie leku z komórek. Daunorubicyna nie dyfunduje biernie przez błonę komórkową na zewnątrz komórki, a usuwanie leku z komórek badanych linii komórkowych jest procesem aktywnym.

Zaproponowana metoda terapii chemoopornej ostrej białaczki szpikowej oparta jest na uwrażliwianiu komórek chemoopornych z wykorzystaniem inhibitorów metylacji DNA. Zaobserwowano, że decytabina przywraca wrażliwość chemoopornych komórek ostrej białaczki szpikowej na cyklofosfamid, który stosowany jest w chemioterapii pacjentów zakwalifikowanych do przeszczepu. Ponadto, stwierdzono, że decytabina wpływa na morfologię komórek, ilość i długość wypustek komórkowych oraz zmniejsza potencjał proliferacyjny klonów białaczkowych w działaniu długoterminowym powyżej 7 dni.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów potwierdzają możliwość zastosowania szybkiego i skutecznego testu wykrywającego komórki chemooporne w oparciu o właściwości biomechaniczne komórek oraz wewnątrzkomórkową lokalizację leków z wykorzystaniem oprzyrządowania dostępnego w szpitalu. Uwrażliwienie chemoopornych komórek białaczkowych na cytostatyki pozwoliłoby na zwiększenie możliwości terapeutycznych pacjentów z ostrą białaczką szpikową oraz ograniczenie efektów niepożądanych związanych z chemioterapią.

mgr inż. Aleksandra Kaczorowska