



**НАЦИОНАЛНА СПЕЦИАЛИЗИРАНА БОЛНИЦА
ЗА АКТИВНО ЛЕЧЕНИЕ
НА ХЕМАТОЛОГИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ**

д-р Бранимир Владимиров Спасов

**ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ КЛИНИКО-
БИОЛОГИЧНАТА ЗНАЧИМОСТ НА
ЕКСПРЕСИЯТА НА ТУМОРНИЯ ГЕН НА
WILMS ПРИ ПАЦИЕНТИ С ОСТРА
МИЕЛОИДНА ЛЕВКЕМИЯ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане
на образователната и научна степен “ДОКТОР”

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт”
Професионално направление: „Медицина” (шифър 7.1.)
Научна специалност: “Хематология и преливане на кръв”

Научен ръководител: доц. д-р Дончо Б. Пейчев, дм

Научни консултанти: доц. д-р Маргарита Л. Генова, дм
доц. д-р Георги Н. Балаценко, дм

Научно жури:

Проф. Тошко Ж. Лисичков, дмн

Проф. д-р Стоян Г. Лалчев

Проф. д-р Румен М. Балански

Доц. д-р Дончо Б. Пейчев

Доц. д-р Евгений А. Хаджиев

София, 2013

Дисертационният труд е написан на 120 страници и включва 18 фигури и 22 таблици. Използвани са 244 литературни източника, от които 2 на кирилица и 242 на латиница.

Изследванията са проведени в лабораторията по хематопатология и имунология и в лабораторията по цитогенетика и молекулярна биология към Националната Специализирана Болница за Активно Лечение на Хематологични Заболявания - София, както и в лабораторията по експериментална химиотерапия и молекулярна фармакология към Катедрата по фармакология, фармакотерапия и токсикология (Фармацевтичен факултет, МУ – София). Терапията на всички изследвани болни с остра миелоидна левкемия беше проведена в Клиниката по хематология към Националната Специализирана Болница за Активно Лечение на Хематологични Заболявания – София. Изследванията бяха осъществени с финансовата подкрепа на Фонд „Научни изследвания” към Министерството на образованието и науката (договор № ВУ-Л-203/2006; договор № Д 02-35/2009) и Съвет по Медицинска Наука към Медицински Университет – София (Договор № 36/2006).

Дисертационният труд е разгледан и одобрен от съвета на Клиниката по хематология към Националната Специализирана Болница за Активно Лечение на Хематологични Заболявания – София.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 2013 г.
от _____ часа, в заседателната зала на Националната Специализирана Болница за Активно Лечение на Хематологични Заболявания (гр. София, ул. Пловдивско поле №6).
Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на болницата.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

CD	Cluster of differentiation (клъстер на диференциация)
CI	Confidence interval (интервал на доверителност)
CR	Complete remission (пълна ремисия)
FAB	French-American-British (френска-американска-британска)
FLAG	Терапевтичен протокол, включващ прилагане на Флударабин, Цитозар и гранулоцитен растежен фактор
FLT3-ITD	Fms-like tyrosine kinase 3 – internal tandem duplication (вътрешни тандемни дубликации на Fms-подобна тирозин киназа 3)
HAM	Терапевтичен протокол, включващ прилагане на високи дози Цитозар и стандартни дози Митоксантрон
ID	Induction death (индукционна смъртност)
IDA-FLAG	Терапевтичен протокол, включващ прилагане на Идарубицин, Флударабин, Цитозар и гранулоцитен растежен фактор
MDR1	Multidrug resistance 1 gene (гена на множествена лекарствена резистентност 1)
MITO-FLAG	Терапевтичен протокол, включващ прилагане на Митоксантрон, Флударабин, Цитозар и гранулоцитен растежен фактор
mRNA/ и .РНК	Информационна рибонуклеинова киселина
NF-kB	Nuclear factor kB (ядрен фактор kB)
RT-PCR	Reverse transcription PCR (полимеразна верижна реакция след обратна транскрипция)
WB	Western blot
WT1	Wilms' tumor gene 1 (туморен ген на Wilms 1)
wt1	Wilms' tumor protein 1 (туморен протеин на Wilms 1)
ЕДТА	етилен диамин тетра-ацетатна киселина
ЛДХ	Лактат дехидрогеназа
НСБАЛХЗ	Национална Специализирана Болница за Активно Лечение на Хематологични Заболявания

ВЪВЕДЕНИЕ

Острата миелоидна левкемия (ОМЛ) е клонално, малигнено заболяване на хематопоеичната тъкан, което се характеризира с пролиферация на патологични бласти, предимно в костния мозък и нарушено образуване на нормални кръвни клетки. В патогенезата на ОМЛ участват разнообразни молекулни нарушения. Някои намират широко приложение в клиничната практика като маркери с диагностична или прогностична стойност. В допълнение, наличието на тези молекулярни аномалии единствено в клетките от малигнената популация позволява мониторирането на промените в туморния обем и съответно - отчитане на терапевтичния отговор. Особено перспективни в тази насока са нарушения с висока честота на разпространение.

Един от молекулярните маркери с клинична значимост при ОМЛ е WT1. При много пациенти с ОМЛ се наблюдава свръхекспресия на този ген, като се счита, че нарушената функция на WT1 играе важна роля в патогенезата на заболяването.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проучи клинико-биологичната значимост на експресия на туморния ген на Wilms (WT1) при пациенти с de novo остра миелоидна левкемия и да се определи неговото прогностично значение.

Задачи

1. Да се проучи експресията на WT1-гена и wt1-протеина при пациенти с de novo ОМЛ към момента на диагнозата.
2. Да се проучат клинико-лабораторните характеристики на пациенти с de novo ОМЛ в зависимост от експресията на WT1.
3. Да се проучат корелациите между експресията на WT1 и други ключови биомаркери при пациенти с de novo ОМЛ.
4. Да се проучи значението на експресията на WT1 и на изследваните молекулярни маркери за терапевтичния отговор и продължителността на свободната от болест и обща преживяемост при пациенти с de novo ОМЛ.
5. Да се определи независимата прогностичната стойност на изследваните към момента на диагнозата биомаркери при пациенти с de novo ОМЛ.

ПАЦИЕНТИ

В настоящото проучване са включени 110 (сто и десет) пациенти с de novo ОМЛ. Пациентите са диагностицирани и лекувани в НСБАЛХЗ – София в периода между м.октомври 2003 г. и м.септември 2010 година. Като контроли са използвани 4 пациенти с нехематологични заболявания.

Основните характеристики на пациентите с ОМЛ са обобщени в табл. 1.

Табл. 1 Характеристики на пациентите с ОМЛ, включени в настоящото проучване

Пациенти	
<i>Възраст - години</i>	
Медиана (Обхват)	51 (19-76)
<i>Пол – брой пациенти (%)</i>	
Мъже	61 (55,5%)
Жени	49 (44,5%)
<i>Брой левкоцити ($\times 10^9/\text{л}$) (n=106)</i>	
Медиана (Обхват)	28,2 (0,5-337)
<i>Ниво на хемоглобина (gr/л) (n=106)</i>	
Медиана (Обхват)	92 (49-145)
<i>Брой тромбоцити ($\times 10^9/\text{л}$) (n=105)</i>	
Медиана (Обхват)	58,2 (5-397)
<i>Ниво на лактат дехидрогеназа (Е/л) (n=102)</i>	
Медиана (Обхват)	817 (140-6945)
<i>Бластни клетки в костния мозък (%) (n=102)</i>	
Медиана (Обхват)	86 (23-100)
<i>Бластни клетки в периферната кръв (%) (n=103)</i>	
Медиана (Обхват)	63 (0-100)
<i>ФАБ класификация – брой пациенти (%)</i>	
M0	5 (4,5%)
M1	22 (20%)
M2	17 (15,5%)
M4	25 (22,7%)
M5	27 (24,5%)
M6	2 (1,8%)
Липсващи данни	12 (10,9%)
<i>СЗО класификация – брой пациенти (%)</i>	
ОМЛ с повтарящи се генетични нарушения	18 (16,4%)
ОМЛ с миелодисплазия-свързани промени	18 (16,4%)
ОМЛ, неклассифицируема другаде	74 (67,3%)

Индукционното лечение беше проведено при 44 от пациентите с ОМЛ под 60-годишна възраст, при които беше изследвана експресията на WT1. То включваше прилагане на един или два курса - комбинация на Цитозин-арабинозид (Cytosar – 100 mg/m²/ден; в продължение на пет или седем дни); антрациклинов антибиотик – [Idarubicin (12 mg/m²/ден), Farmorubicin (45 mg/m²/ден) или Novantrone 10 mg/m²/ден в

продължение на два или три дни]; с или без приложение на Etoposide (100 mg/m²/ден); в продължение на три или пет дни).

При пациентите под 60-годишна възраст с ОМЛ, резистентна на конвенционалната индукционна терапия, беше проведено високодозово индукционно лечение, което включваше прилагане на терапевтични курсове по схема FLAG, IDA-FLAG, MITO-FLAG, HAM или интермедиерни дози Cytosar в комбинация с Митоксантрон.

При 20 от пациентите, при които беше постигната пълна ремисия, бяха проведени различни цитостатични консолидиращи курсове. При трима от пациентите след проведената цитостатична консолидираща терапия беше осъществена трансплантация на хемопоеични стволови клетки (СКТ). Алогенна СКТ беше приложена при двама пациенти, докато автоложна СКТ беше проведена при един болен.

Профилактичното прилагане на тромбоцитни концентрати се осъществяваше при тромбоцитен брой под $20 \times 10^9 / L$ или в случаите на хеморагична диатеза. Еритроцитни концентрати се преливаха при пациенти с ниво на хемоглобина под 65 g/L. При наличието на фебрилитет (телесна температура $\geq 38^\circ C$) или други клинични белези за инфекция, пациентите бяха лекувани с широкоспектърни антибиотици и антимикотици.

МЕТОДИ

Цитологичен, цитохимичен и флоуцитометричен анализ

Проби от костен мозък и/или периферна кръв бяха оцветявани по Романовски-Гимза и впоследствие наблюдавани на светлинен микроскоп. При цитохимичния анализ най-често използваните ензими бяха миелопероксидаза или Судан Шварц и алфа-неспецифичната естераза. При флоуцитометричното изследване беше използван панел от Т-клетъчни (CD3, CD4, CD7, CD8, CD5, CD2), В-клетъчни (CD10, CD19, CD20, CD22, CD79b), миелоидни (CD13, CD14, CD15, CD16, CD33, CD64) и други маркери (CD34, CD38, CD117, CD56, CD45, гликофорин А, HLA-DR).

Цитогенетичен анализ

Изследвани бяха проби от костен мозък или периферна кръв, които бяха поставяни в епруветки с хепарин или ЕДТА. Цитогенетичният анализ беше проведен върху метафазни хромозоми след култивиране върху краткотрайни култури в продължение на 24 или 48 часа.

Молекулярно-биологични методи за анализ на генна и протеинна експресия

1. Изолиране на мононуклеарни клетки (МНК)

МНК бяха изолирани от венозна кръв или костен мозък на пациенти с de novo ОМЛ, взети с ЕДТА или хепарин, до третия час от получаването им с помощта на градиентно центрофугиране. Използван е методът на центрофугиране в плътностен градиент Polysep (Pharmachim) или Ficoll-Paque (Amersham Biosciences), при което клетките се разделят на фракции в зависимост от теглото и формата си.

2. *Екстракция на РНК*

РНК беше екстрахирана с TRIzol (Gibco BRL), следвайки препоръките на фирмата-производител. Концентрацията на РНК беше определена на спектрофотометър СФ-26 Ломо при дължина на вълната 260 nm, след разреждане на разтворената РНК с дестилирана вода по формулата: $C [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = 40 \times \text{ОП} \times \text{ФР}$, където ФР е фактор на разреждането (500), а ОП е намерената оптична плътност.

3. *Обратна транскрипция и синтез на комплементарна ДНК*

Комплементарната ДНК (кДНК) беше синтезирана с помощта на хексамерни олигонуклеотиди. кДНК беше синтезирана чрез последователно инкубиране на пробите при 37°C в продължение на 60 минути и при 99°C в продължение на 3 минути.

4. *Полимеразна верижна реакция*

Експресията на гените WT1, сурвивин и MDR1, както и наличието на FLT3-ITD беше изследвана посредством полимеразна верижна реакция. За изследване експресията на WT1 беше използвана следната двойка праймери: 5'-AAG CTG TCC SAC TTA CAG ATG-3' и 5'-CAG CTG GAG TTT GGT CAT GTT-3'. За изследване експресията на сурвивин бяха използвани следните праймери: 5'-GCATGGGTGCCCGACGTTG-3' и 5'-GCTCCGGCCAGAGGCCTCAA-3'. Експресията на MDR1 беше установена с помощта на следната двойка праймери: TL9 и TL10. Наличието на FLT3-ITD беше установено посредством използването на следните праймери: R5, 5'-TGTCGAGCAGTACTCTAAACA-3' и R6, 5'-ATC-STAGTACSTTCCCAAACCTC-3'.

Продуктите на реакцията бяха анализирани чрез електрофореза в 2% агарозен гел, оцветен с етидиев бромид, и визуализирани с помощта на ултравиолетова светлина.

Силата на реакцията беше полуколичествено характеризирана въз основа на интензивността на видимия банд: (-) отрицателна реакция, липса на видим банд – липсваща експресия; (+) слабо до умерено видим банд, по-слаб по интензивност от банд на положителната контрола – ниска експресия; (++) силно или много силно видим банд, сходен или по-силен по интензивност от банд на положителната контрола – висока експресия.

Установено е, че концентрацията на WT1 и РНК в пробите на пациенти със силна експресия на гена е 1-2 \log_{10} по-висока в сравнение с пробите на болни, при които се установява липсваща или слаба експресия на гена.

При провеждане на статистическия анализ на данните болните бяха разделени на две групи: с липсваща или слаба експресия на WT1 (WT1-отрицателни пациенти) и със силна експресия на WT1 (WT1-положителни пациенти).

Освен изследване на експресията на гореспоменатите гени, беше проведена и RT-PCR за установяване наличието на най-честите хромозомни аберации при пациентите с ОМЛ - *AML1-ETO*, *CBFb-MYH11*, *PML-RARa*, *M-BCR-ABL* и *t-BCR-ABL*.

5. *Имуноблот (Western blot)*

Методът е използван за установяване на определени протеини в самите клетки (след първоначалното им лизиране). Пробите са подлагани на електрофореза в

полиакрилами-ден гел при денатуриращи условия, след което е провеждан електротрансфер на фракционирани протеини върху поливинилидендифлуоридна (PVDF) мембрана. Мембраните са обработвани последователно с първично немаркирано антитяло срещу търсения протеин и съответно вторично антитяло, конюгирано с пероксидаза от хрян. Визуализирането на образуваните комплекси антиген-антитяло е осъществявано чрез хемилуминесцентна реакция, като резултатите са регистрирани трайно върху фотографски филм и впоследствие са анализирани чрез програмата за денситометрия Quantity One. При подходяща възможност е провеждано стрипиране (отстраняване на свързаните антитела от вече обработените мембрани), за да може мембраните да се маркират отново с други антитела срещу друг търсен протеин.

Посредством имуноблот е установена експресията на wt1 и NF- κ B.

Статистически методи

Статистическият анализ на данните беше осъществен посредством готов статистически програмен пакет SPSS v 16.0 (for Windows). За сравнение на разпределението на дискретните клинични и биологични характеристики на изследваните подгрупи болни беше използван Fisher's exact test. За сравнение на разпределението на непрекъснати величини между две групи болни беше приложен непараметричен анализ по метода на Mann Whitney's U test, а при повече от две групи за сравнение беше прилаган тестът Kruskal Wallis. Общата преживяемост (OS) беше изчислена от датата на поставяне на диагнозата до датата на настъпване на смъртта. Преживяемостта, свободна от заболяване (DFS), беше изчислена от датата на постигане на пълна ремисия до датата на регистриран рецидив или датата на настъпване на летален изход. Продължителността на OS и DFS беше анализирана посредством метода на Kaplan-Meier, като различията между отделните групи пациенти статистически бяха оценени чрез log rank теста. За ниво на статистическа значимост беше приета p-value <0,05.

РЕЗУЛТАТИ

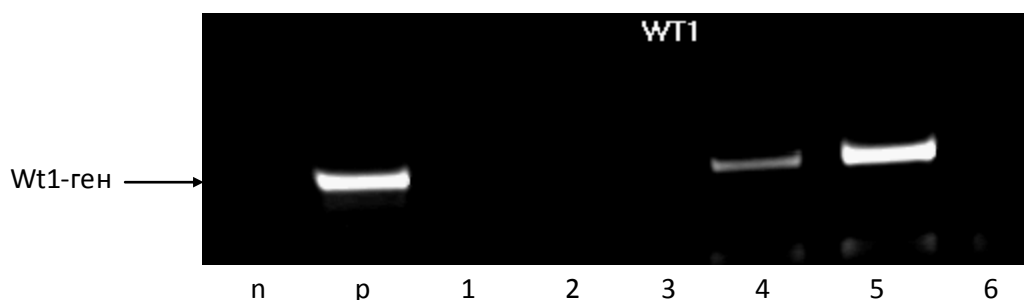
Експресия на WT1 mRNA и wt1 при пациенти с de novo ОМЛ

1. Експресия на wt1 и WT1 при здрави индивиди и пациенти с нехематологични заболявания

При изследване експресията на WT1 и wt1 посредством съответно RT-PCR и WB в периферната кръв на десет здрави кръводарители не беше установено наличие на този молекулярен маркер. В четирите проби от костен мозък на пациенти с нехематологични заболявания, изследвани посредством WB, не беше наблюдавана експресия на wt1. В три от пробите на тези болни, изследвани посредством RT-PCR, не беше регистрирана експресия на WT1, докато при четвъртата - беше наблюдавана много ниска експресия на транскрипционния фактор.

2. Експресия на WT1 при пациенти с de novo ОМЛ към момента на диагнозата, установена посредством RT-PCR

При 81 пациенти с de novo ОМЛ беше изследвана експресията на WT1 посредством RT-PCR – фиг. 1.

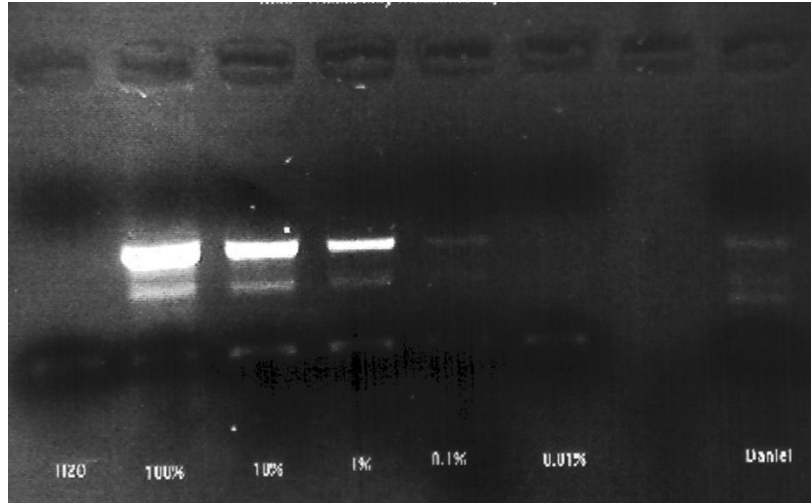


n – отрицателна контрола, p – положителна контрола (клетъчна линия K562), проба 5 – силно положителна, проба 4 – слабо положителна, проби 1, 2, 3 и 6 – отрицателни

Фиг. 1 Експресия на WT1, установена посредством RT-PCR.

Анализът на серийни разреждания на клетъчна линия K562 установи чувствителност на реакцията от 10^{-3} (фиг. 2). Видим банд се долавя при 1000-кратно разреждане на клетъчната линия K562.

RT-PCR позволи идентифициране на отчетлив сигнал от амплификацията на WT1 и РНК при общо 72,8% (59/81) от изследваните пациенти и липса на амплификация при съответно 27,2% (22/81). В допълнение, резултатите ясно демонстрираха хетерогенност на установения сигнал. Направена беше полуколичествена оценка на продукта при отделните пациенти, които в зависимост от възприетите критерии за оценка, бяха разпределени в следните групи: болни с висока експресия 45,7% (37/81); болни с ниска експресия 27,16% (22/81) и 27,16% (22/81) – пациенти, не експресиращи РНК.

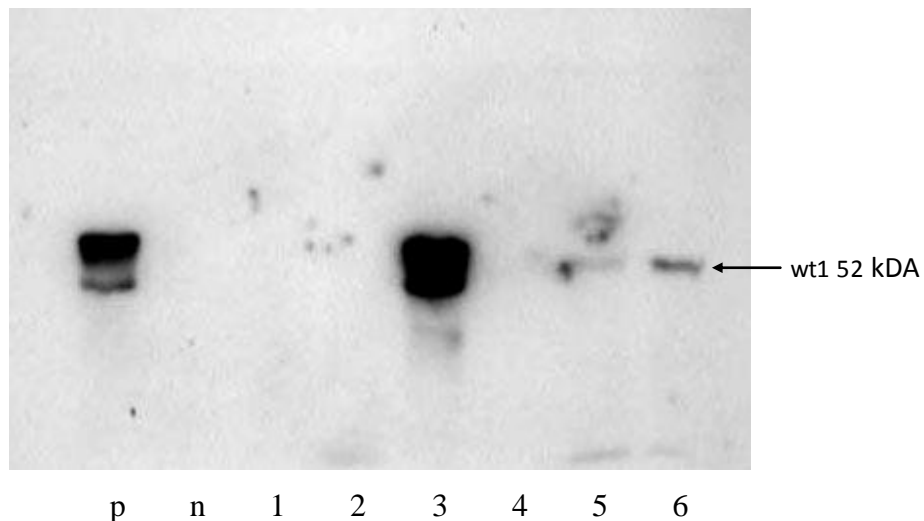


Фиг. 2 Чувствителност на WT1-специфичната RT-PCR

Чувствителността на реакцията беше определена посредством серийни разреждания на клетъчна линия K562. Видим банд се долавя при 1000-кратно разреждане на клетъчната линия.

3. Експресия на wt1 при пациенти с de novo ОМЛ към момента на диагнозата, установена посредством WB

При общо 42 от включените в проучването пациенти беше изследвана и експресията на wt1 към момента на диагнозата посредством WB – фиг. 3.



p – положителна контрола (клетъчна линия K562), n – негативна контрола (клетъчна линия U937), проби 1,2,4 – отрицателни, проба 3 – силно положителна (++/+++), проби 5 и 6 – слабо положителни (+)

Фиг. 3 Експресия на wt1-протеин, установена посредством WB.

Отчетлива експресия на wt1 беше установена при 50% (21/42) от пациентите, като силна експресия на белтъка беше регистрирана при общо 28,6% (12/42), а при 21 болни изследването показва липса на белтък.

Сравнителният анализ показва много добра корелация (Pearson chi-square, $p < 0,001$) между резултатите на mRNA и протеиново ниво, получени съответно чрез RT-PCR и WB. Данните от сравнителния анализ са представени в табл. 2.

Табл. 2 Сравнителен анализ между степента на експресия на WT1 и wt1, изследвани съответно чрез RT-PCR и WB.

Ген/РНК (RT-PCR)		Протеин (WB)			Общо
		wt1 ++	wt1 +	wt1-	
	WT1++	12	5	1	18
	WT1+	0	4	9	13
	WT1-	0	0	11	11
	Общо	12	9	21	Chi square p < 0,001

Корелация на експресията на WT1 mRNA с основни клинично-лабораторни показатели при пациенти с de novo ОМЛ

1. Експресия на WT1 в корелация с основни характеристики на пациентите с ОМЛ

Този сравнителен анализ има за цел изясняване на някои възможни особености в биологичното разнообразие на ОМЛ и произтичащите от това насоки в цялостното клинично поведение. Табл. 3 съдържа основни клинично-лабораторни параметри при новооткрити и нелекувани болни, в зависимост от експресията на WT1, оценена посредством RT-PCR.

Статистическият анализ на данните показва, че пациенти, чиито левкемични бласти са морфологично диференцирани (ОМЛ-M2 и ОМЛ-M5), експресират WT1 значително по-рядко в сравнение с останалите болни с de novo ОМЛ (Pearson chi-square, $p=0,046$). Беше установена статистически достоверна разлика в нивото на WT1 между пациенти с рекурентни генетични аномалии и останалите болни с de novo ОМЛ (Fisher's exact test, $p=0,036$).

Табл. 3 Експресията на WT1 при пациенти с de novo ОМЛ според пола и възрастта на пациентите, FAB и СЗО подтипа на заболяването

	WT1 (+) пациенти	%	Статистическа значимост (p)
Общ брой пациенти	59/81	72,8	
Възраст (n=81)			
< 60 години	43/59	72,9	
≥ 60 години	16/22	72,2	1,0*
Пол (n=81)			
Мъже	38/50	76	
Жени	21/31	67,7	0,450 [#]
FAB подтип (n=89)			
M ₀	1/2	50	
M ₁	16/20	80	
M ₂	8/13	61,5	
M ₄	16/19	84,2	
M ₅	10/17	58,8	
M ₆	1/1	100	
Неустановен подтип	7/9	77,8	0,046 ^{##}
СЗО [^] подтип (n=81)			
ОМЛ с рекурентни генетични аномалии	6/13	46,1	
ОМЛ с МДС промени	11/13	84,6	
ОМЛ, некласифицируема другаде	42/55	76,4	0,036 ^{^^}

*Не се открива значима разлика в WT1-експресията в зависимост от възрастта на пациентите с de novo ОМЛ (Fisher's exact test, p=1,0).

[#] Не се установява значима разлика в WT1-експресията в зависимост от пола на пациентите с de novo ОМЛ (Fisher's exact test, p=0,450).

^{##} При пациенти, страдащи от ОМЛ-M₂ и ОМЛ-M₅, се установява значително по-рядко експресия на WT1 в сравнение с останалите болни с de novo ОМЛ (Pearson chi-square, p=0,046).

^{^^} Установява се статистически достоверна разлика в експресията на WT1 между пациенти с рекурентни генетични аномалии и останалите болни с de novo ОМЛ (Fisher's exact test, p=0,036).

Високата експресия на WT1 също беше установена значително по-рядко при пациенти с de novo ОМЛ и рекурентни генетични аномалии в сравнение с останалите болни (Fisher's exact test, p=0,004) - табл. 4.

Табл. 4 Висока експресия на WT1 при пациенти с de novo ОМЛ според СЗО подтипа

СЗО [^] подтип (n=81)	WT1 (+) пациенти*	%	Статистическа значимост (p)
ОМЛ с рекурентни генетични аномалии	1/13	7,7	
ОМЛ с МДС промени	7/13	53,8	
ОМЛ, неклафицируема другаде	29/55	52,7	0,004 [^]

*WT1 (+) пациенти: ОМЛ - пациенти с висока експресия на WT1

[^] При пациенти с de novo ОМЛ и рекурентни генетични аномалии се установява значително по-рядко висока експресия на WT1 в сравнение с останалите болни (Fisher's exact test, p=0,004).

Не беше установена статистически значима разлика между експресията на WT1 и възрастта и пола на пациентите с de novo ОМЛ.

Анализът на основните лабораторни показатели в зависимост от WT1-статуса не показва статистически значими корелации между експресията на молекулярния маркер и изследваните лабораторни показатели, като левкоцитен и тромбоцитен брой, ниво на хемоглобин, концентрация на ЛДХ, бластна инфилтрация на костния мозък и периферната кръв.

При болни с de novo ОМЛ и висока експресия на WT1 беше установено статистически достоверно по-висок тромбоцитен брой (p=0,031) и по-висок % бласти в периферната кръв (p=0,031) и костния мозък (p=0,053) към момента на диагнозата в сравнение с пациентите с ниска или липсваща експресия на молекулярния маркер – табл. 5.

Табл. 5 Стойности на лабораторните показатели в зависимост от високата експресия на WT1 при пациенти с de novo ОМЛ

Лабораторен показател	WT1(+) пациенти*	WT1(-) пациенти [^]	Статистическа значимост (p)
Брой левкоцити (10⁹/L) (n=79)			
Медиана	46,3	22,2	0,166
Обхват	1,6-298	0,95-211	
Ниво на хемоглобин (g/L) (n=79)			
Медиана	93	90,5	0,559
Обхват	49-145	50-157	
Брой тромбоцити (10⁹/L) (n=78)			
Медиана	68,5	40	0,031 [#]
Обхват	9-313	5-177	
ЛДХ (Е/л) (n=77)			
Медиана	1128	911	0,348
Обхват	140-4033	166-6945	
% бласти в костен мозък (n=75)			
Медиана	89	82,5	0,053 ^{^^}
Обхват	35-100	25,5-100	
% бласти в периферна кръв (n=78)			
Медиана	69	52,5	0,031 ^{##}
Обхват	10-100	0-90	

* WT1(+) пациенти – пациенти с висока експресия на WT1

[^] WT1(-) пациенти – пациенти с ниска или липсваща експресия на WT1

[#] При WT1(+) пациенти се наблюдава достоверно по-висок тромбоцитен брой в сравнение с WT1(-) болни (p=0,031).

^{##} При WT1(+) пациенти се наблюдава достоверно по-висока бластна инфилтрация в периферната кръв в сравнение с WT1(-) болни (p=0,031).

^{^^} При WT1(+) пациенти се наблюдава тенденция към по-висока бластна инфилтрация в костния мозък в сравнение с WT1(-) болни (p=0,053).

2. Корелация между експресията WT1 и основни цитогенетични/молекулярни характеристики на пациентите с ОМЛ

Анализирана беше експресията на WT1 в зависимост от цитогенетичния/молекулярния риск при болните с de novo ОМЛ. Успешна кариотипизация беше осъществена при 75,3% (61/81) от тях. Анализът показва, че при пациенти с цитогенетични или молекулярни аномалии, свързани с нисък риск,

достоверно по-рядко се наблюдава експресия на WT1 в сравнение с тези, свързани с интермедиерен или висок риск (Fisher's exact test, $p=0,024$) - табл. 6.

Табл. 6 Експресия на WT1 в зависимост от цитогенетичния риск на пациенти с ОМЛ

Цитогенетичен/молекулярен риск	WT1(+) пациенти	%	Статистическа значимост (p)
Нисък	4/11	36,4	
Интермедиерен	35/45	77,8	0,012 [#]
Висок	9/10	90	0,023 [#]
Неустановен (непроведен анализ или липса на годни за анализ метафазни пластини)	11/15	73,3	

[#] При пациенти с нисък цитогенетичен/молекулярен риск се установява статистически достоверно по-рядко експресия на WT1 в сравнение с болните с интермедиерен цитогенетичен/молекулярен риск (Fisher's exact test, $p=0,012$) и висок цитогенетичен/молекулярен риск (Fisher's exact test, $p=0,023$).

Високата експресия на WT1 се наблюдава значително по-рядко при пациентите с цитогенетични/молекулярни аномалии, свързани с нисък риск, отколкото при болни с интермедиерен (Fisher's exact test, $p=0,0015$) и висок цитогенетичен риск (Fisher's exact test, $p=0,0010$).

3. Корелация между експресията на WT1 и основни имунофенотипни характеристики на бластната популация при пациенти с ОМЛ

Фенотипът на бластната популация беше изследван при 75 болни с de novo ОМЛ (табл. 7). Не бяха наблюдавани корелации между експресията на WT1 и изследваните имунологични маркери (CD7, CD33, CD34, CD56, HLA-DR, CD117 и CD14).

Табл. 7 WT1-експресия в зависимост от имунологичния маркер фенотипа на бластна популация при пациенти с ОМЛ

Имунологичен маркер	WT1(+) пациенти %	WT1(-) пациенти %	Статистическа значимост (p)
CD34 (n=73)	37,5	57,5	0,103
CD33 (n=74)	92,7	96,9	0,624
CD56 (n=65)	36,1	41,4	0,798
HLA-DR (n=70)	87,2	93,5	0,452
CD117 (n=72)	77,5	81,2	0,776
CD 14 (n=66)	13,5	34,4	0,074
CD 7 (n=66)	27	24,1	1,0

Беше проведено изследване на експресията на WT1 при пациенти с нормален фенотип и при болни с линейно-кръстосана или асинхронна антигенна експресия под 60-годишна възраст (табл. 8 и табл. 9).

Табл. 8 WT1-експресия при пациенти под 60-годишна възраст с нормален фенотип спрямо болни с линейно-кръстосана или асинхронна антигенна експресия

	WT1(+) пациенти %	WT1(-) пациенти %	Статистическа значимост (p)
Пациенти с линейно-кръстосана антигенна експресия vs пациенти с нормален фенотип			
CD4+CD33+CD34±	76,9	23,1	
vs			
CD4-CD33+CD34+	22,2	77,8	0,027 [#]
CD7+ CD33+CD34±	45,4	54,6	
vs			
CD7- CD33+CD34+	31,2	68,8	ns*
CD56+CD13±CD14±CD15±CD33+	55	45	
vs			
CD56-CD13±CD14±CD15±CD33+	46,2	53,8	ns*

[#] При пациенти с линейно-кръстосана експресия на CD4 се установява статистически достоверно по-често висока експресия на WT1, в сравнение с пациентите с нормален фенотип (p=0,027).

* статистически незначима стойност

Анализът на данни показва, че при пациенти с de novo ОМЛ и линейно-кръстосана експресия на CD4 се установява значително по-често висока експресия на WT1, в сравнение с пациентите с нормален фенотип (p=0,027).

Табл. 9 WT1-експресия при пациенти под 60-годишна възраст с нормален фенотип спрямо болни с асинхронна антигенна експресия

	WT1(+) пациенти %	WT1(-) пациенти %	Статистическа значимост (p)
Пациенти с асинхронна антигенна експресия vs пациенти с нормален фенотип			
CD34+CD33+CD14+	0	100	
vs			
CD34+CD33+CD14-	41,2	58,8	ns*
CD34+CD33+CD15+	14,3	85,7	
vs			
CD34+CD33+CD15-	57,1	42,9	0,044 [#]
CD34+CD56+	50	50	
vs			
CD34+CD33+CD13+CD14±CD15±	75	25	ns*

[#] При пациенти с ОМЛ и асинхронна експресия на CD15 се установява статистически достоверно по-рядко експресия на WT1, в сравнение с пациентите с нормален фенотип (p=0,044).

* статистически незначима стойност

Беше установено, че бластите на пациентите с *de novo* ОМЛ и асинхронна експресия на CD15 експресират значително по-рядко WT1, в сравнение с бластите на пациенти с нормален фенотип (Fisher's exact test, $p=0,044$). Пациенти с асинхронна експресия на CD15 по-често експесираха маркери с нисък цитогенетичен/молекулярен риск (Fisher's exact test, $p=0,020$).

Беше проведено изследване на експресията на WT1 в зависимост от фенотипа на бластната популация (млад vs зрял фенотип) при пациенти с *de novo* ОМЛ. Беше установена статистически достоверна корелация между експресията на WT1 и по-младия левкемичен фенотип на бластните клетки [88,9% (8/9) vs 27,3% (3/11); Fisher's exact test, $p=0,010$]. Данните са представени в табл. 10.

Табл. 10 WT1-експресия в зависимост от фенотипа на бластна популация при пациенти с *de novo* ОМЛ

Левкемичен фенотип	WT1(+) пациенти %	WT1(-) пациенти %	Статистическа значимост (p)
Зрял фенотип [CD15(+); CD14(±); CD16(±)]	27,3	72,7	
Млад фенотип [CD15(-); CD14(-); CD16(-)]	88,9	11,1	0,010*

* Левкемични бласти, притежаващи млад фенотип експресират достоверно по-често WT1 в сравнение с клетките с по-зрял фенотип (Fisher's exact test, $p=0,010$).

Експресия на ключови молекулярни маркери при пациенти с ОМЛ

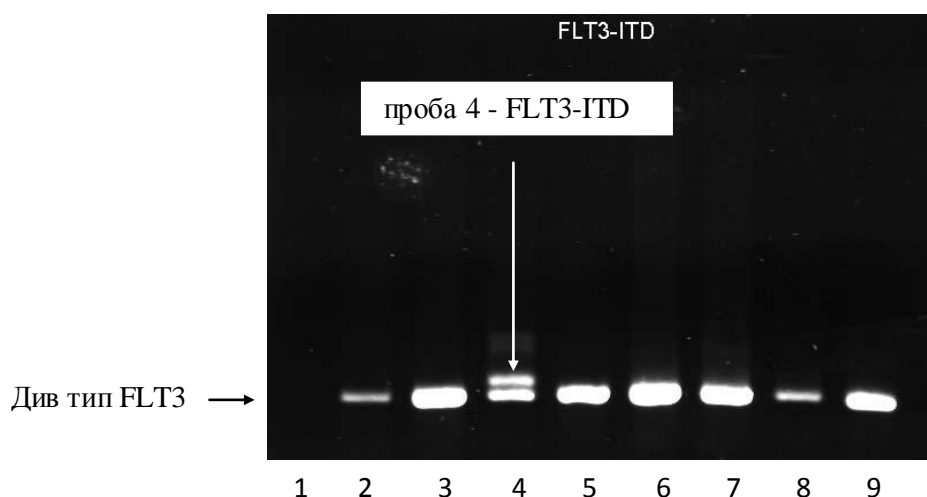
Този сравнителен анализ има за цел изясняване на някои възможни взаимодействия и зависимости между ключови гени, ангажирани в левкемогенезата и прогресията, които биха могли да обусловят определени особености в биологичното и клинично поведение на ОМЛ.

1. Изследване на FLT3-ITD при пациенти с ОМЛ чрез RT-PCR

Бяха изследвани пробите на 105 пациенти с *de novo* ОМЛ за наличието на FLT3-ITD. Медианата на възрастта на изследваните индивиди беше 51 години (обхват 19-76 години), като 80,9% (85/105) от болните бяха под 60-годишна възраст.

Експресията на FLT3-ITD беше изследвана посредством RT-PCR (фиг. 4). Беше установено, че чувствителността на реакцията е 10^{-2} . Наличието на този молекулярен маркер беше установено при 33,3% (35/105) от всички анализирани болни с *de novo* ОМЛ. Честотата на този маркер беше съответно 35,3% (30/85) и 25% (5/20) при пациенти под и над 60-годишна възраст.

Анализът на данни показва, че наличието на FLT3-ITD се наблюдава статистически по-често при пациенти с нормален кариотип (50%; 24/47) в сравнение с останалите заболели (11,8%; 4/34) – Fisher's exact test, $p=0,0003$.



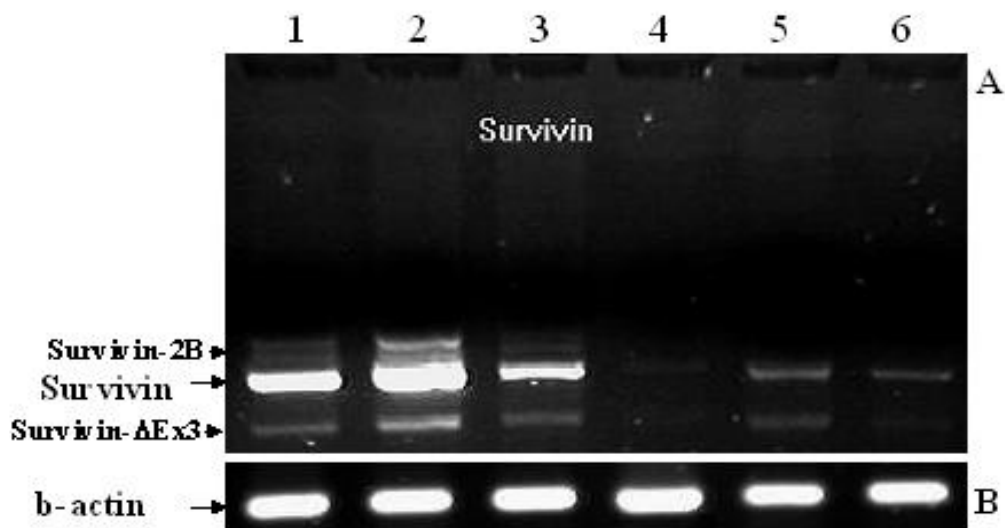
Проба 1 представлява отрицателна контрола, докато проби 2-9 са получени от различни пациенти с ОМЛ. Високо-молекулярният банд в проба 4 представлява FLT3-ITD (мутирал ген FLT3). При същия болен беше установена и експресия на нормалния ген FLT3.

Фиг. 4 RT-PCR амплификация на FLT3 и РНК при пациенти с ОМЛ.

2. Изследване на експресията на сурвивин чрез RT-PCR при пациенти с ОМЛ

Бяха изследвани пробите на 48 пациенти с de novo ОМЛ за експресия на сурвивин посредством RT-PCR. Медианата на възрастта на изследваните индивиди беше 51 години (обхват 19-76 години), като 68,8% (33/48) от болните бяха под 60-годишна възраст. Експресията на сурвивин и неговите сплайс варианти (2В и-ΔEx3) беше изследвана посредством RT-PCR (фиг. 5). Беше установено, че чувствителността на RT-PCR е 10^{-3} . Като вътрешна контрола беше използвана амплификацията на β -актиновия ген.

RT-PCR позволи идентифициране на отчетлив сигнал от амплификацията на сурвивин и РНК при общо 58,3% (28/48) от изследваните пациенти и установи липса на амплификация при съответно 41,7% (20/48). Резултатите от проведения молекулярен анализ демонстрираха хетерогенност на установения сигнал. Беше направена полуколичествена оценка на продукта при отделните болни, които в зависимост от въприетите критерии за оценка бяха разпределени в следните групи: болни с висока експресия 29,2% (14/48), болни с ниска експресия 29,2% (14/48) и болни с липсващ продукт на RT-PCR реакцията 41,7% (20/48). Като положителни бяха приети пробите на пациентите с ОМЛ, при които беше установена ниска или висока експресия на молекулярния маркер.



Проби 1-3 представляват пациенти със свръхекспресия на гена, докато проби 5 и 6 представляват болни с нормална експресия на молекулярния маркер. Проба 4 е отрицателна.

Фиг. 5 RT-PCR амплификация на сурвивин и неговите сплайс варианти (сурвивин-2В и сурвивин-ΔEx3) при пациенти с de novo ОМЛ.

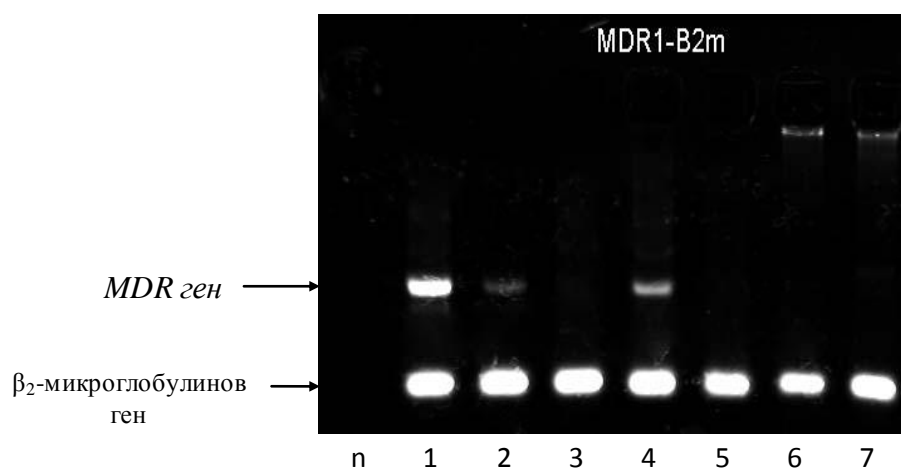
Честотата на установима експресия на сурвивин не показва значими различия в зависимост от възрастта, като свръхекспресията на гена беше установена при 57,6% (19/33) и 66% (9/15) от пациентите под- и над 60-годишна възраст.

3. Изследване на експресията на MDR1-гена чрез RT-PCR при пациенти с de novo ОМЛ

Изследвани бяха пробите на 39 пациенти с de novo ОМЛ за експресията на MDR1-гена. Медианата на възрастта на изследваните индивиди беше 52 години (обхват 27-72 години), като 76,9% (30/39) от болните бяха под 60-годишна възраст.

Експресията на MDR гена беше изследвана посредством RT-PCR (фиг. 6). Като вътрешна контрола беше използвана амплификацията на β_2 -микроглобулиновия ген.

В нашето проучване свръхекспресията на MDR1-гена беше установена при 56,4% (22/39) от всички пациенти с de novo ОМЛ, без разлика във възрастта на изследваните пациенти - 56,7% (17/30) при пациенти под и съответно 55,5% (5/9) при пациенти над 60-годишна възраст.



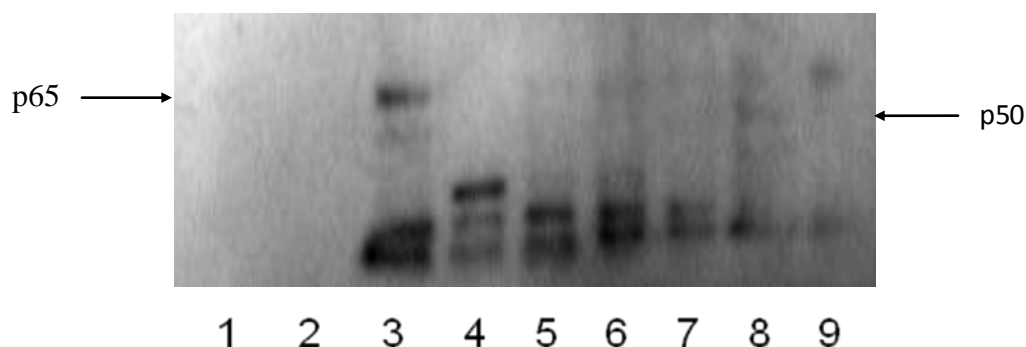
n-негативна контрола, проби 1, 2 и 4 – положителни, проби 3, 5, 6 и 7 – отрицателни

Фиг. 6 Експресия на MDR-гена, установена посредством RT-PCR

4. Изследване на експресията на NF-kB протеин чрез WB при пациенти с de novo ОМЛ

Изследвани бяха пробите на 25 пациенти с de novo ОМЛ за едновременната експресия на двата протеина. Медианата на възрастта на изследваните индивиди беше 53 години (обхват 32-72 години), като 68% (17/25) от болните бяха под 60-годишна възраст.

Експресията на NF-kB беше изследвана посредством WB (фиг.7). Беше установено, че експресията на този маркер се установява при 52% (13/25) от всички пациенти. Честотата на NF-kB беше съответно 52,9% (9/17) и 50% (4/8) при пациенти под и над 60-годишна възраст.



Проби 1 и 2 – отрицателни; 3, 4, 5 и 6 силно положителни (+++/+++); 7, 8 и 9 слабо положителни (+)

Фиг. 7 Установяване на експресията на NF-kB (p65 и p50) – субединици на NF-kB, посредством WB

Корелация на изследваните маркери с експресията на WT1 или wt1 при пациенти с de novo ОМЛ към момента на диагнозата

На фиг. 8 са представени обобщени резултатите от изследванията за наличие на FLT3-ITD, определяне експресията на survivin и MDR1 посредством RT-PCR, представени в зависимост от експресията на WT1, оценена посредством RT-PCR.

На фиг. 9 е показана експресията на ключовия транскрипционен фактор NF-kB, определена чрез WB, в зависимост от експресията на wt1.

1. Корелация между наличието на FLT3-ITD и експресията на WT1

Едновременната експресия на FLT3-ITD и WT1 беше изследвана при 80 пациента с de novo ОМЛ. Медианата на възрастта на изследваните индивиди беше 51,5 години (обхват 22-76 години), като 73,8% (59/80) от болните бяха под 60-годишна възраст.

Анализът на едновременната експресия на WT1 и FLT3-ITD при всички пациенти с de novo ОМЛ показва тенденция към корелация между експресията на FLT3-ITD и високата експресия на WT1 (Fisher's exact test, $p=0,084$). Беше установено, че при пациенти с липсваща експресия на FLT3-ITD, 57,9% (33/57) не експресират или слабо експресират WT1. При 65,2% (15/23) от FLT3-ITD положителните пациенти се установява висока експресия на WT1.

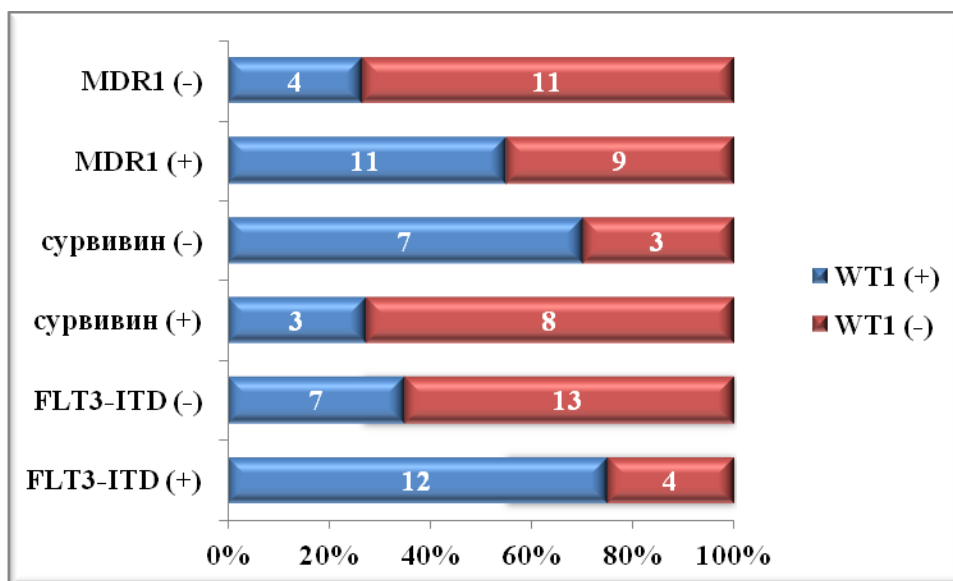
Анализът на данни показва статистически достоверна корелация между наличието на FLT3-ITD и високата експресия на WT1 при пациенти с de novo ОМЛ с нормален кариотип (Fisher's exact test, $p=0,022$). Пациенти с липсваща експресия на FLT3-ITD, 65% (13/20) не експресират или слабо експресират WT1. При 75% (12/16) от FLT3-ITD положителните пациенти се установява висока експресия на WT1.

2. Корелация между експресията на гените сурвивин и WT1

Едновременната експресия на сурвивин и WT1 беше изследвана при 44 пациенти с de novo ОМЛ. Медианата на възрастта на изследваните индивиди беше 52,5 години (обхват 25-76 години), като 65,9% (29/44) от болните бяха под 60-годишна възраст. Не беше установена статистически значима връзка между експресията на сурвивин и високата експресия на WT1 към момента на диагнозата (Fisher's exact test, $p=0,541$). Статистически достоверна връзка между експресията на сурвивин и степента на експресия на WT1 не беше установена и при пациенти с нормален кариотип (Fisher's exact test, $p=0,178$).

3. Корелация между експресията на гените MDR1 и WT1

Бяха изследвани пробите на 35 пациенти с de novo ОМЛ за едновременна експресия на MDR1 и WT1. Медианата на възрастта на изследваните индивиди беше 54 години (обхват 27-72 години), като 74,3% (26/35) от болните бяха под 60-годишна възраст. Анализът на данни показва, че липсва статистически значима корелация между степента на експресия на WT1- и експресията на MDR1-гена (Fisher's exact test, $p=0,167$) – фиг. 8.



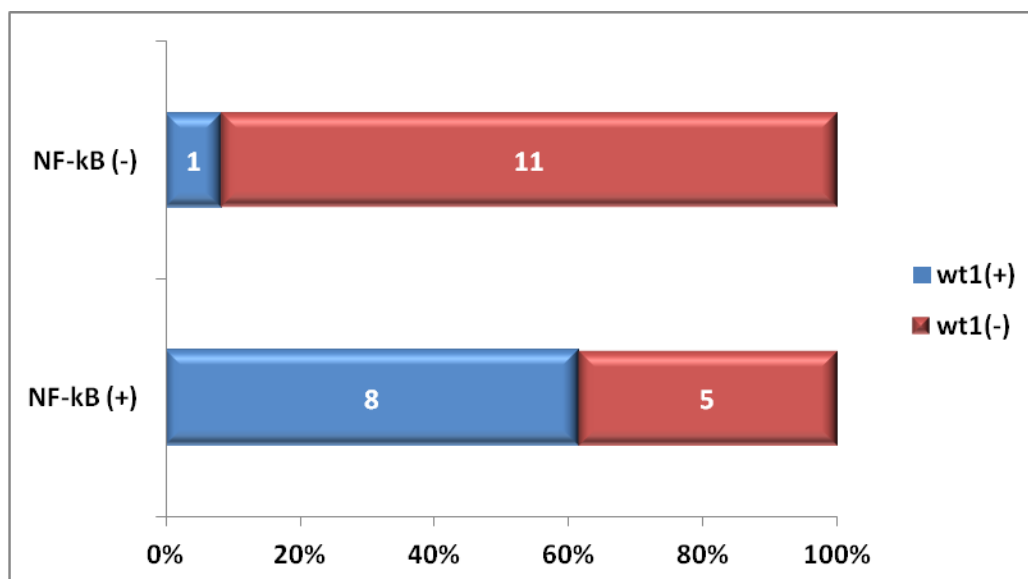
WT1(+) – пациенти с висока експресия на WT1

WT1(-) – пациенти със слаба или липсваща експресия на WT1

Фиг. 8 Схематично представяне експресията на MDR1, сурвивин и FLT3-ITD в зависимост от експресията на WT1

4. Корелация между експресията на протеините NF-kB и wt1

Пробите на 25 пациенти с de novo ОМЛ бяха изследвани за едновременната експресия на протеините wt1 и NF-kB. Беше установено, че при болни с липсваща експресия на NF-kB, 91,6% (11/12) от тях не експресират или слабо експресират wt1. Анализът на данни показва статистически достоверна корелация между експресията на NF-kB и високата експресия на wt1 (Fisher's exact test, $p=0,011$), като при 61,5% (8/13) от NF-kB (+) пациенти, беше установява висока експресия на wt1.



wt1(+) – пациенти с висока експресия на wt1

wt1(-) – пациенти със слаба или липсваща експресия на wt1

Фиг. 9 Схематично представяне експресията на NF-kB протеина в зависимост от експресията на wt1

Корелация между комбинираната експресия на WT1 или wt1 и изследваните ключови молекулярни маркери с клиничко-лабораторни параметри при пациенти с de novo ОМЛ към момента на диагнозата

1. Корелация между експресията на WT1 и наличието на FLT3-ITD при пациенти с ОМЛ и нормален кариотип, и основни клиничко-лабораторни параметри

Тъй като наличието на FLT3-ITD се установява предимно при пациенти с de novo ОМЛ и нормален кариотип, в настоящия анализ бяха включени само такива болни. В зависимост от наличието или липсата на FLT3-ITD и степента на експресия на WT1, пациентите с ОМЛ бяха разпределени в четири групи. В табл. 11 са представени стойностите на лабораторните показатели в зависимост от експресията на молекулярните маркери при четирите групи пациенти с ОМЛ.

Анализът на данни показва, че независимо от WT1-статуса, левкоцитният брой и степента на бластна инфилтрация в периферната кръв статистически значително зависят от наличието на FLT3-ITD (Fisher's exact test, $p=0,003$).

Табл. 11 Стойности на лабораторните показатели в зависимост от експресията на FLT3-ITD и WT1 при пациенти с ОМЛ с нормален кариотип

	<i>FLT3-ITD(+)</i> <i>WT1(+)</i>	<i>FLT3-ITD(+)</i> <i>WT1(-)</i>	<i>FLT3-ITD(-)</i> <i>WT1(-)</i>	<i>FLT3-ITD(-)</i> <i>WT1(+)</i>	<i>p</i>
<i>Брой пациенти</i>	12	4	13	7	
<i>Брой левкоцити (10⁹/L)</i>					
Медиана	108,4	142,5	12,15	13,2	0,003 [#]
Обхват	6,2-298	37,9-211	0,95-66,1	2,1-98	
<i>Хемоглобин (g/L)</i>					
Медиана	92,5	102	94	77	0,411
Обхват	68-123	82-127	54-109	63-101	
<i>Брой тромбоцити (10⁹/L)</i>					
Медиана	86,8	89,4	90	39	0,181
Обхват	25-313	50-155	12-177	15,7-105	
<i>ЛДХ (Е/л)</i>					
Медиана	1238	1102,5	560	712	0,167
Обхват	518-4033	406-2931	350-1420	341-2723	
<i>% бласти в костен мозък</i>					
Медиана	90,5	93	83,5	82	0,202
Обхват	58-100	92-96	40-99	40,5-98	
<i>% бласти в периферна кръв</i>					
Медиана	87	82	60	47	0,060 [^]
Обхват	37-100	44-87	0-90	20-84	

WT1(+) – пациенти с висока експресия на туморния ген на Wilms

WT1(-) – пациенти със слаба или липсваща експресия на туморния ген на Wilms

[#] Пациентите с FLT3-ITD(-)/WT1(-) имат значително по-нисък левкоцитен брой в сравнение с останалите болни (p=0,003).

[^] Пациентите с FLT3-ITD(-)/WT1(-) имат тенденция към по-ниска бластна инфилтрация в периферната кръв в сравнение с останалите болни (p=0,060).

2. Корелация между ко-експресията на WT1 и сурвивин при пациенти с de novo ОМЛ и основни клиничко-лабораторни параметри

В зависимост от експресията на сурвивин и WT1, пациентите с ОМЛ бяха разпределени в четири групи. В табл. 12 са представени стойностите на лабораторните показатели в зависимост от експресията на молекулярните маркери при четирите групи пациенти.

Табл. 12 Стойности на лабораторните показатели в зависимост от експресията на сурвивин и WT1 при пациенти с ОМЛ

	сурвивин(+) WT1(+)	сурвивин(+) WT1(-)	сурвивин(-) WT1(-)	сурвивин(-) WT1(+)	p
Брой пациенти	19	7	6	12	
<i>Брой левкоцити (10⁹/L)</i>					
Медиана	14,1	31	83,1	29,75	
Обхват	1,7-137	5,3-83	9-206	2,1-298	0,123
<i>Хемоглобин (g/L)</i>					
Медиана	93	98	103	84	
Обхват	49-145	57-111	69-157	54-113	0,462
<i>Брой тромбоцити (10⁹/L)</i>					
Медиана	55,5	34	39	29	
Обхват	19-223	7-177	17-90	9-264	0,063 [^]
<i>ЛДХ (Е/л)</i>					
Медиана	7781	825	1616	1079	
Обхват	166-3982	545-3193	406-3347	300-4033	0,445
<i>% бласти в костен мозък</i>					
Медиана	86	81	96	93	
Обхват	25,5-98	47-96	84-100	57-100	0,022 [*]
<i>% бласти в периферна кръв</i>					
Медиана	53	78	87	70	
Обхват	3-96	18-89	65-90	20-100	0,036 [*]

* При пациенти с експресия на WT1 и сурвивин [WT1(+)/сурвивин(+)] се наблюдава статистически достоверно по-ниска бластна инфилтрация в костния мозък (p=0,022) и периферната кръв (p=0,036) към момента на диагнозата в сравнение с останалите пациенти с de novo ОМЛ.

[^] При пациенти с експресия на WT1 и сурвивин [WT1(+)/сурвивин(+)] се наблюдава тенденция към по-висок тромбоцитен брой към момента на диагнозата в сравнение с останалите пациенти с de novo ОМЛ (p=0,063).

3. Корелация между ко-експресията на WT1- и MDR1-гените при пациенти с de novo ОМЛ и основни клинично-лабораторни параметри

В зависимост от наличието или липсата на WT1- и MDR1-гените, пациентите с ОМЛ бяха разпределени в четири групи. Статистическият анализ на данните не показва наличие на достоверна корелация между експресията на WT1- и MDR1-гените с броя на левкоцити и тромбоцити, ниво на хемоглобин и ЛДХ, както и бластната инфилтрация в костния мозък и периферната кръв – табл. 13.

Табл. 13 Стойности на лабораторните показатели в зависимост от експресията на MDR1 и WT1-гените при пациенти с de novo ОМЛ

	MDR(+) WT1(+)	MDR(+) WT1(-)	MDR(-) WT1(-)	MDR(-) WT1(+)	p
Брой пациенти	18	2	5	10	
<i>Брой левкоцити (10⁹/L)</i>					
Медиана	13,65	91,4	32	16,2	
Обхват	1,7-144	5,3-177,5	30,9-65	4,3-196,5	0,411
<i>Хемоглобин (g/L)</i>					
Медиана	96,5	108,5	60	88	
Обхват	54-140	106-111	50-98	64-132	0,053
<i>Брой тромбоцити (10⁹/L)</i>					
Медиана	57	25,5	8	40	
Обхват	7-223	17-34	5-100	8-264	0,247
<i>ЛДХ (Е/л)</i>					
Медиана	781	1235,5	1044	1239	
Обхват	360-3982	551-1920	825-2931	300-2777	0,654
<i>% бласти в костен мозък</i>					
Медиана	88	71	52,5	78,5	
Обхват	25,5-98	58-84	47-58	27-100	0,335
<i>% бласти в периферна кръв</i>					
Медиана	66	76,5	73	44	
Обхват	3-100	63-90	58-82	10-90	0,210

4. Корелация между комбинираната експресия на wt1- и NF-kB протеина и основни клиничко-лабораторни параметри при пациенти с de novo ОМЛ

В зависимост от наличието или липсата на wt1- и NF-kB протеините, пациентите с de novo ОМЛ бяха разпределени в четири групи – табл. 14.

Табл. 14 Стойности на лабораторните показатели в зависимост от експресията на NF-kB и високата експресия на WT1 при пациенти с de novo ОМЛ

	NF-kB(+) WT1(+)	NF-kB(+) WT1(-)	NF-kB(-) WT1(-)	NF-kB(-) WT1(+)	p
Брой пациенти	8	5	7	5	
Брой левкоцити ($10^9/L$)					
Медиана	41,65	26,2	6,1	13,65	
Обхват	1,7-144	4,3-37,9	3,9-36,2	7,1-51,2	0,672
Хемоглобин (g/L)					
Медиана	101	95	89	92,5	
Обхват	63-132	91-111	54-126	81-140	0,713
Брой тромбоцити ($10^9/L$)					
Медиана	64,5	34	30	43,5	
Обхват	25-189	7-100	7-177	36-223	0,546
ЛДХ (Е/л)					
Медиана	781	874	710	2196	
Обхват	360-2073	300-2931	389-1298	597-3982	0,303
% бласти в костен мозък					
Медиана	89,5	86	57	93	
Обхват	42-100	58-92	25,5-96	49-96	0,086*
% бласти в периферна кръв					
Медиана	55	82	44	68	
Обхват	20-100	63-90	3-89	50-80	0,065*

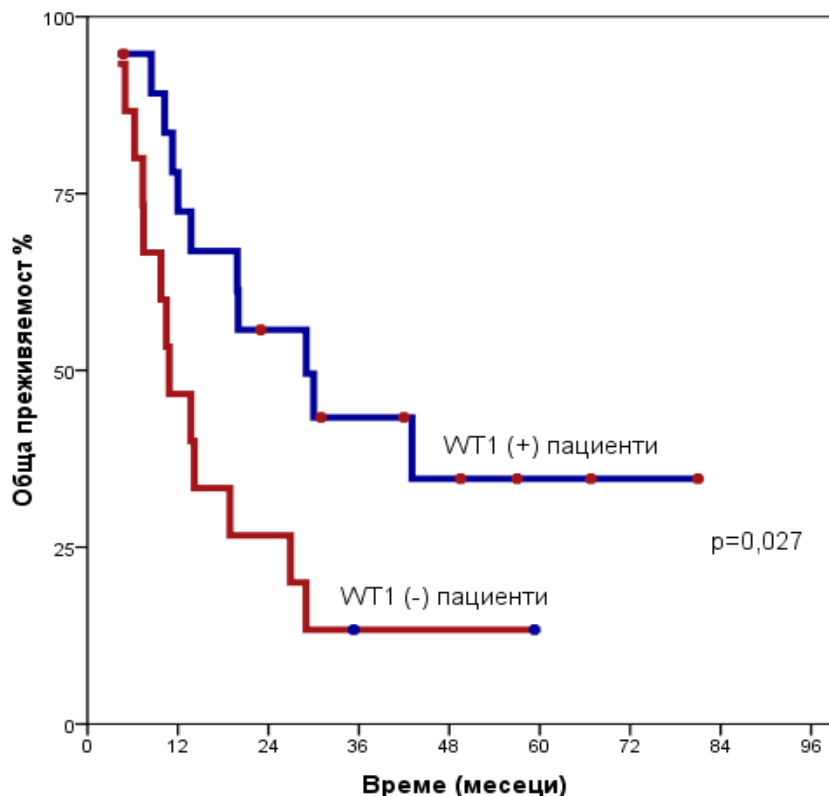
* При пациенти с липсваща или слаба експресия на WT1 и липсваща експресия на NF-kB [WT1(-)/NF-kB (-)] се наблюдава тенденция към по-ниска бластна инфилтрация в костния мозък (p=0,086) и в периферната кръв (p=0,065) в сравнение с останалите болни с de novo ОМЛ.

Прогностична стойност на експресията на WT1 mRNA при пациенти с de novo ОМЛ

Възможното прогностично значение на WT1-експресията към момента на диагнозата беше оценено при анализа на болните с ОМЛ, подложени на интензивна (в т.ч. високо-дозова) индукционна ПХТ по отношение на постигането на CR, наличието на RD, продължителността на OS и DFS. Интензивна индукционна ПХТ беше проведена при 44 от пациентите под 60-годишна възраст, които бяха разделени в две групи: WT1 (+) пациенти, при които се установява висока експресия на WT1, и WT1 (-) болни, при които се установява ниска или липсваща експресия на молекулярния маркер. Индукционната смъртност на пациентите, лекувани с конвенционална и високо-дозова индукционна терапия в НСБАЛХЗ, беше 22,7% (10/44).

1. **Прогностична стойност на експресията на WT1 mRNA за постигане на CR** - CR беше постигната при 56,8% (25/44) от анализираниите пациенти с de novo ОМЛ под 60-годишна възраст. При пациенти с висока експресия на WT1 значително по-рядко беше постигната CR след прилагане на конвенционална ПХТ, в сравнение с останалите болни [4/19 (21,05%) vs 15/25 (60%)]; Fisher's exact test, $p=0,014$). След прилагане на конвенционална и високо-дозова индукционна терапия, обаче, не беше наблюдавана статистически достоверна разлика при постигане на CR между WT1 (+) пол. и WT1 (-) отр. пациенти (52,6% vs 60%; Fisher's exact test, $p=0,421$).

2. **Прогностична стойност на експресията на WT1 mRNA за продължителността на OS** - След среден период на проследяване от 20 (5-64) месеца, при 70,6% (24/34) от изследваните пациенти с de novo ОМЛ под 60-годишна възраст, независимо от постигането на CR или наличие на резистентно заболяване, настъпи летален изход. Изчислената медиана на OS беше 18,9 месеца (95% CI; 11,82 – 25,97 месеца). Летален изход беше регистриран при 57,9% (11/19) от WT1(-) и при 86,7% (13/15) от WT1(+) болни (Fisher's exact test, $p=0,128$). Статистическият анализ на данни показва, че изчислената медиана на OS при WT1(-) пациенти е 29 месеца (95% CI; 10,15 – 47,90 месеца), докато при WT1(+) пациенти е 10,83 месеца (95% CI; 5,81 – 15,84 месеца) – фиг. 10. На 48^{-мия} месец беше отчетена значително по-продължителна OS при 34,7% от WT1 (-)болни в сравнение с 13,3% от WT1(+) пациенти (log rank, $p=0,027$).

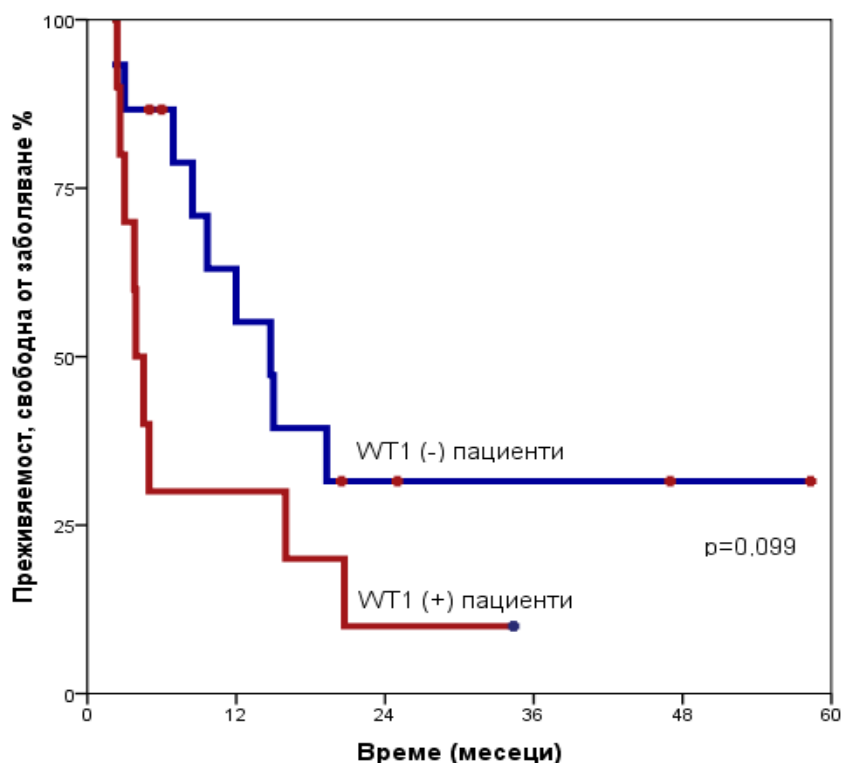


WT1 (-) пациенти – пациенти с ниска или липсваща експресия на WT1

WT1 (+) пациенти – пациенти с висока експресия на WT1

Фиг. 10 Изчислена обща преживяемост на пациенти с de novo ОМЛ в зависимост от различната степен на експресия на WT1, лекувани в НСБАЛХЗ

3. **Прогностична стойност на експресията на WT1 mRNA за продължителността на DFS** - В хода на проследяването беше регистриран рецидив при 72% (18/25) от пациентите с de novo ОМЛ, постигнавши ремисия, като изчислената медиана на DFS беше 12 месеца (95% CI; 3,31–20,68 месеца). Рецидив беше установен при 60% (9/15) от WT1(-) и при 90% (9/10) от WT1(+) болни (Fisher's exact test, $p=0,179$). Изчислената медиана на WT1(-) пациенти беше 14,7 месеца (95% CI; 9,5–19,9 месеца), докато при болните с висока експресия на маркера – 3,9 месеца (95% CI; 2,7-5,03 месеца). Анализът на данните показва наличие на тенденция към статистически достоверна разлика между двете групи заболявали по отношение продължителността на DFS (log rank, $p=0,099$) – фиг. 11. Общата DFS на 48^{-мия} месец беше съответно 31,5 % и 10% при WT1(-) и WT1(+) болни.



WT1 (-) пациенти – пациенти с ниска или липсваща експресия на WT1

WT1 (+) пациенти – пациенти с висока експресия на WT1

Фиг. 11 Изчислената преживяемост, свободна от заболяване на пациенти с de novo ОМЛ под 60-годишна възраст в зависимост от различната степен на експресия на WT1

Прогностична стойност на експресията на останалите ключови молекулярни маркери при пациенти с ОМЛ

Тъй като интензивна ковенционална, както и високо-дозовата ПХТ можеше да бъде проведена единствено при пациентите под 60-годишна възраст, прогностичната стойност на ключовите молекулярни маркери беше изследвана само при тази пациентска кохорта.

1. **Прогностична стойност на експресията на останалите ключови молекулярни маркери за постигане на CR** – Унивариационният анализ показва, че постигането на CR при прилагане на конвенционална ПХТ зависи от ниската или липсващата експресия на WT1 (Fisher’s exact test, $p=0,014$), липсата на FLT3-ITD (Fisher’s exact test, $p=0,021$) и наличието на цитогенетични или молекулярни аномалии, свързани с нисък риск (Fisher’s exact test, $p=0,005$) – табл. 15.

Табл. 15 Статистическа значимост на различни молекулярно-цитогенетични маркери по отношение постигане на CR след прилагане на конвенционална ПХТ при пациенти с de novo ОМЛ

CR						
показател	пациенти	%	показател	пациенти	%	P
WT1 (-)	15/25	60	WT1 (+)	4/19	21,05	0,014
FLT3-ITD (-)	17/31	54,8	FLT3-ITD (+)	2/13	15,4	0,021
сурвивин (-)	4/12	33,3	сурвивин (+)	6/15	40	ns
NF-kB (-)	4/6	66,7	NF-kB (+)	0/5	0	ns
нисък цитогенетичен риск	7/8	87,5	всички останали	20/59	33,9	0,005

2. **Прогностична стойност на експресията на останалите ключови молекулярни маркери за продължителността на OS** – Анализът на данни показва, че продължителността на OS зависи от липсващата или слаба експресия на WT1 (Fisher’s exact test, $p=0,024$), липсата на FLT3-ITD експресия (Fisher’s exact test, $p=0,0001$) и наличието на цитогенетични или молекулярни аномалии, свързани с нисък риск (Fisher’s exact test, $p=0,036$) – табл. 16.

Табл.16 Статистическа значимост на различни молекулярно-цитогенетични маркери по отношение продължителност на OS при пациенти с de novo ОМЛ

OS						
показател	живи пациенти	месеци (медиана)	показател	живи пациенти	месеци (медиана)	P
WT1 (-)	8/27	29	WT1 (+)	2/21	10,83	0,024
FLT3-ITD (-)	17/50	14,17	FLT3-ITD (+)	1/21	7,33	0,0001
сурвивин (-)	3/9	26,93	сурвивин (+)	2/15	13,7	ns
NF-kB (-)	2/8	12	NF-kB (+)	1/9	3	ns
нисък цитогенетичен риск	4/7	не е достигната	всички останали	16/68	10,83	0,036

3. *Прогностична стойност на експресията на останалите ключови молекулярни маркери за продължителността на DFS* - Беше установено, че продължителността на DFS статистически достоверно се определя от липсата на FLT3-ITD експресия (Fisher's exact test, p=0,002) – табл. 17.

Табл.17 Статистическа значимост на различни молекулярно-цитогенетични маркери по отношение продължителност на DFS при пациенти с de novo ОМЛ

<i>DFS</i>						
показател	пациенти в CR	месеци (медиана)	показател	пациенти в CR	месеци (медиана)	P
WT1 (-)	6/16	15,0	WT1 (+)	1/9	3,9	ns
FLT3-ITD (-)	7/24	15,0	FLT3-ITD (+)	1/9	4,4	0,002
сурвивин (-)	0/6	12,0	сурвивин (+)	2/6	16,0	ns
NF-kB (-)	-	-	NF-kB (+)	-	-	-
нисък цитогенетичен риск	3/6	16,0	всички останали	7/26	9,67	ns

Прогностична стойност на едновременната експресия на WT1 и наличието на FLT3-ITD при пациенти с de novo ОМЛ

Предвид наличието на неблагоприятна прогноза при пациенти с експресия на WT1 или FLT3-ITD, беше предположено, че болни с наличие на FLT3-ITD и/или висока експресия на WT1 ще имат по-лоша прогноза в сравнение с другите пациенти, при които не се установява експресия и на двата молекулярни маркера.

Сравнени бяха две групи болни: в първата група бяха включени пациенти с липсваща експресия на FLT3-ITD и слаба или липсваща експресия на WT1 [WT1(-)/FLT3-ITD(-)], а в другата – всички заболели, при които беше установена експресия на поне един от двата молекулярни маркера [WT1(+)/FLT3-ITD(+)] - табл. 18.

Анализът на данни показва, че при провеждане на конвенционална и високо-дозова индукционна терапия липсва значителна разлика по отношение постигане на CR между двете пациентски кохорти. При провеждане само на конвенционална индукционна терапия, обаче, CR се установява достоверно по-често при [WT1(-)/FLT3-ITD(-)] пациенти, в сравнение с останалите болни с ОМЛ (Fisher's exact test, p=0,0055).

Табл. 18 *Терапевтичен отговор при пациенти с ОМЛ в зависимост от експресията на WT1 и FLT3-ITD под 60-годишна възраст*

Показател	Общо	WT1(-) FLT3-ITD(-)	WT1(+) FLT3-ITD(+)	Статистическа значимост (p)
Всички пациенти n (%)	44	21 (47,8)	23 (52,2)	
ID n (%)	10 (22,7)	3 (14,3)	7 (30,4)	ns
CR n (%)	25 (56,8)	14 (66,7)	11 (47,8)	ns [#]
RD n (%)	9 (20,5)	4 (19)	5 (21,7)	ns
Рецидив n (%)	18 (72)	8 (57,1)	10 (90,9)	ns
ССР* n (%)	7 (28)	6 (42,8)	1 (9,1)	ns
Летален изход* n (%)	24 (70,6)	10 (55,6)	14 (87,5)	0,063

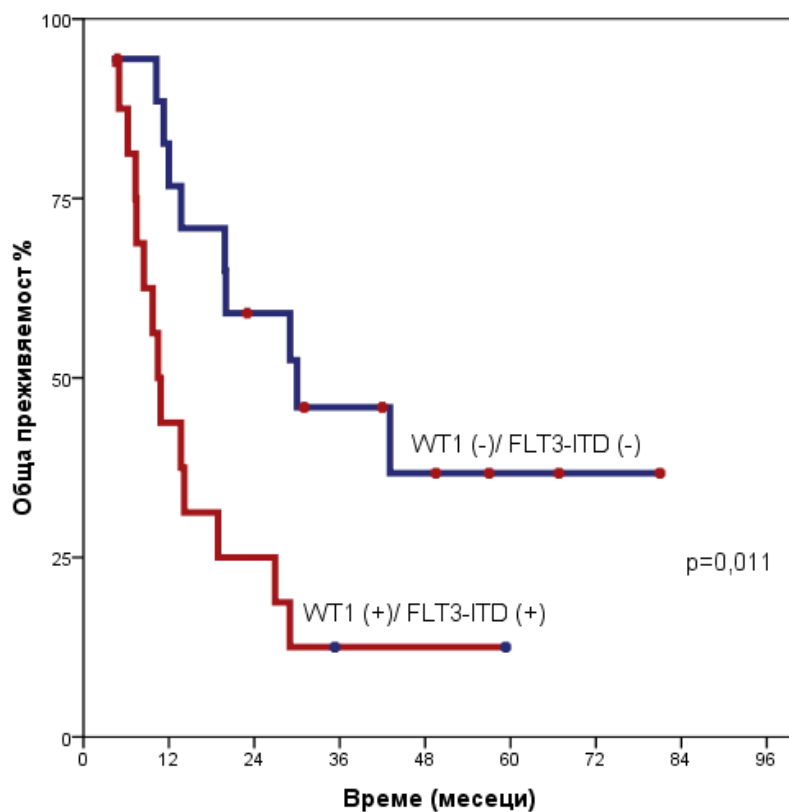
ID – индукционна смъртност при пациенти, провели конвенционална и високо-дозова ПХТ
WT1(-)/FLT3-ITD(-) – пациенти с липсваща или слаба експресия на WT1 и липсваща експресия на FLT3-ITD

WT1(+)/FLT3-ITD(+) – пациенти с висока експресия на WT1 и/или експресия на FLT3-ITD

[#] При провеждане на конвенционална и високо-дозова индукционна терапия липсва значима разлика по отношение постигане на CR между двете пациентски кохорти. При провеждане само на конвенционална индукционна терапия CR се установява достоверно по-често при [WT1(-)/FLT3-ITD(-)] пациенти, в сравнение с останалите болни с ОМЛ [14/21 (66,7%) vs 5/23 (21,7%); Fisher's exact test, p=0,0055].

* при пациенти с ОМЛ, при които беше постигната пълна ремисия или беше регистрирано резистентно заболяване

Летален изход беше регистриран при 55,6% (10/18) от WT1(-)/FLT3-ITD(-) и при 87,5% (14/16) от WT1(+)/FLT3-ITD(+) болни, при които беше постигната CR или беше установено резистентно заболяване (Fisher's exact test, p=0,063). Продължителността на OS на двете пациентски групи е представена на фиг. 12.

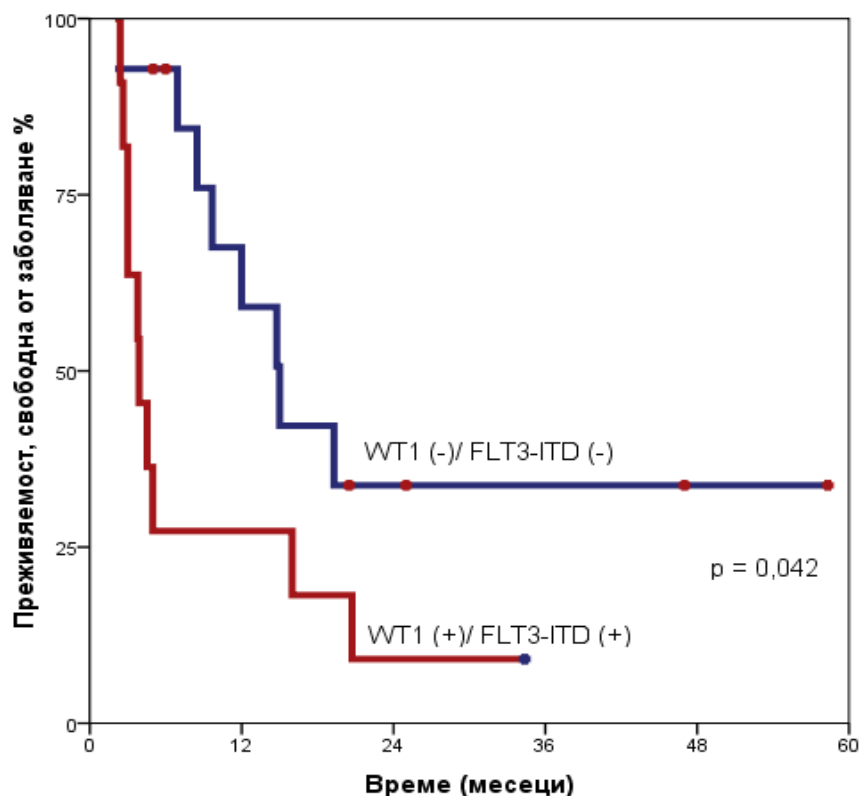


WT1(-)/FLT3-ITD(-) – пациенти с липсваща или слаба експресия на WT1 и липсваща експресия на FLT3-ITD

WT1(+)/FLT3-ITD(+)- пациенти с висока експресия на WT1 и/или експресия на FLT3-ITD

Фиг. 12 Изчислената обща преживяемост на пациенти с *de novo* ОМЛ под 60-годишна възраст в зависимост от експресията на WT1 и FLT3-ITD

Рецидив беше установен при 57,1% (8/14) от WT1(-)/FLT3-ITD(-) и при 90,9% (10/11) от WT1(+)/FLT3-ITD(+)- болни. Продължителността на DFS при двете пациентски кохорти е представена на фиг. 13.



WT1(-)/FLT3-ITD(-) – пациенти с липсваща или слаба експресия на WT1 и липса на FLT3-ITD

WT1(+)/FLT3-ITD(+)- пациенти с висока експресия на WT1 и/или наличие на FLT3-ITD

Фиг. 13 Изчислената преживяемост, свободна от заболяване на пациенти с *de novo* ОМЛ под 60-годишна възраст в зависимост от експресията на WT1 и FLT3-ITD

Статистическите данни за продължителността OS и DFS при двете пациентски кохорти са представени в табл. 19.

Табл. 19 Статистически данни за продължителността OS и DFS при WT1(+)/FLT3-ITD(+) и WT1(-)/FLT3-ITD(-) пациенти с ОМЛ, лекувани в НСБАЛХЗ – София

Показател	WT1(-) FLT3-ITD(-)	WT1(+) FLT3-ITD(+)	Статистическа значимост (log rank; p)
OS (месеци; обхват)	30 (4,9–55)	10,47 (8,3-12,6)	0,011
DFS (месеци; обхват)	15 (10–19,9)	3,9 (2,2–5,5)	0,042

WT1(-)/FLT3-ITD(-) – пациенти с липсваща или слаба експресия на WT1 и липсваща експресия на FLT3-ITD

WT1(+)/FLT3-ITD(+)- пациенти с висока експресия на WT1 и/или експресия на FLT3-ITD

Не беше наблюдавана статистически достоверна разлика между пациентите с ОМЛ, двойно положителни за експресията на двата молекулярни маркера и тези, експресиращи един от двата гена.

Анализът на данни показва, че пациентите с поне една от двете молекулярни аномалии имат значително по-неблагоприятен клиничен ход. При тези болни се наблюдава по-рядко постигане на CR след проведена конвенционална индукционна терапия, по-ниска продължителност на постигнатите ремисии и по-кратка OS.

Регресионен анализ на Cox

Беше проведен регресионен анализ на Cox, посредством който беше оценено прогностичното значение на високата експресия на WT1, експресията на FLT3-ITD и наличието на нисък цитогенетичен/молекулярен риск по отношение на продължителността на OS. В таблицата са отразени единствено параметрите, които имат статистически достоверно прогностично значение за продължителността на OS при анализиранияте пациенти с de novo ОМЛ. Данните са представени в табл. 20.

Табл. 20 Прогностично значение на високата експресия на WT1 и експресията на FLT3-ITD по отношение продължителността на общата преживяемост при пациенти с новодиагностицирана ОМЛ, установено посредством регресионен анализ на Cox

	Пациенти ≤60 години	
	<i>p</i>	95% CI
WT1 (+) vs WT1 (-)	0,867	
Нисък цитогенетичен/молекулярен риск vs всички останали	0,06	4,04 (0,94 – 17,41)
FLT3-ITD (+) vs FLT3-ITD (-)	0,001	3,3 (1,59 – 6,8)

Данни от табл. 20 показват, че WT1 губи самостоятелното си значение по отношение на продължителността на OS в присъствието FLT3-ITD. Това наблюдение предполага, че високата експресия на WT1 опосредствява неблагоприятна прогностична роля на FLT3-ITD.

ОБОБЩЕНИ ИЗВОДИ

1. Експресията на WT1 следва да се приеме за биомаркер, който отграничава левкемичните от нормални хемопоеични клетки, тъй като се установява при над 70% от пациентите с ОМЛ към момента на диагнозата, при липсваща експресия в периферната кръв и костния мозък на здрави индивиди.
2. Тъй като е налице много добра корелация между експресията на WT1 и wt1, в клиничната практика за оценка на биомаркера могат да се използват както имунологични, така и молекулярни методи с еквивалентна информативност.
3. Високата експресия на WT1 корелира с незрял и аберантен фенотип на левкемичните бласти и висока степен на ангажиране на костния мозък и периферната кръв.
4. Установената корелация между WT1-експресията и тази на NF- κ B, както и наличие на FLT3-ITD, предполага директно или индиректно взаимодействие на биомаркерите помежду им или участието им в общи пътища на сигнална трансдукция. Липсата на корелация с други молекулярни аномалии с доказана неблагоприятна прогностична значимост (сурвивин и MDR1) предполага особености в биологията на заболяването и вариации в механизмите на левкемогенезата.
5. Експресията на WT1 може да бъде използвана като метод за риск-стратифициране на пациентите с ОМЛ с цел индивидуализиране на терапевтичния подход. Пациентите с ниска или липсваща експресия на молекулярния маркер имат по-благоприятен клиничен ход на заболяването, свързан с по-висока честота на постигане на CR след приложение на конвенционална химиотерапия, по-продължителни OS и DFS. Високата експресия на WT1 към момента на диагнозата налага по-често използване на интензивни индукционни терапевтични режими.
6. WT1 няма независима неблагоприятна прогностична роля при пациентите с ОМЛ. Този маркер опосредства прогностичното значение на други гени или протеини, които участват в процесите на малигна трансформация.

ПРИНОСИ

Научно-теоретични приноси

1. Проведено е за първи път в България комплексно проучване на разпространението и клиничното значение на експресията на WT1 и wt1 при пациенти с ОМЛ. Установена е хетерогенност по отношение на нивото на експресия при отделните болни.
2. Установена е по-честа експресия на WT1 при пациенти с остра миелоидна левкемия с незрял имунофенотип, линейно-кръстосана и асинхронна антигенна експресия.
3. Анализирани са взаимодействия на молекулярния маркер с други биомаркери, като е установена корелация между високи нива на WT1 и наличието на FLT3-ITD, както и с експресията на NF-κB протеина, което се съобщава за първи път.
4. Потвърдено е, че високата експресия на WT1 корелира с по-краткотрайна обща преживяемост при пациенти с ОМЛ. Установено е, че това неблагоприятно прогностично значение се опосредства чрез други биомолекули при пациенти с ОМЛ.

Научно-приложни приноси

1. Установена е значима корелация между експресията на WT1 и wt1, изследвана посредством съответно RT-PCR и WB, като по този начин в клиничната практика за оценка на биомаркера могат да се използват както имунологични, така и молекулярни методи с еквивалентна информативност.
2. Установено е, че изследването на експресията на WT1 към момента на диагнозата може допълнително да прецизира оценката на риска при пациентите с ОМЛ за индивидуализиране на терапевтичния подход.

Публикации във връзка с дисертационния труд

1. **Б. Спасов**, С. Константинов, Д. Пейчев и Д. Ходжаджик. ТРАНСКРИПЦИОНЕН ФАКТОР НА WILMS И ОСТРА МИЕЛОИДНА ЛЕВКЕМИЯ, КЛИНИЧНА И ТРАНСФУЗИОННА ХЕМАТОЛОГИЯ, 2006, Том XLII , №1-2
2. **Б. Спасов**, П. Ганева, М. Станева, И. Гълъбова, Ю. Жечев, Г. Арнаудов, Д. Пейчев, Г. Балаценко, В. Хрисчев, А. Стоименов, М. Генова, С. Ангелова, Г. Михайлов. Клинично проследяване на постигнатия терапевтичен ефект при възрастни пациенти под 60-годишна възраст с новодиагностицирана остра миелоидна левкемия. Клинична и трансфузионна хематология, Том XLVI, 2010, №1-2, 28-33.
3. С. Ангелова, Г. Балаценко, М. Романова, **Б. Спасов**, Н. Петкова, И. Христов, Е. Хаджиев, Н. Цветков и Ст. Тошков. Седем случая с рекурентна за остра миелоидна левкемия t(9;11)(p22;q23)/MLLT3-MLL: Диагностични особености и отговор на терапията. Клинична и трансфузионна хематология, Том XLVII, 2011, №1-2, 71-75.
4. **Spasov BV**, Stoimenov AS, Balatzenko GN, Genova ML, Peichev DB, Konstantinov SM. Wilms' tumor protein and FLT3-internal tandem duplication expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. Hematology. 2011 Jan;16(1):37-42.

Участия в научни форуми, във връзка с дисертационния труд:

1. **В. Spasov**, G. Balatzenko, D. Peichev, M. Guenova, S. Konstantinov - Prognostic implication of Wilms' tumor protein and survivin expression in adult acute myeloid leukemia patients - XXXIII World Congress of the International Society of Hematology, October 10-13, 2010, ICC Jerusalem International Convention Center, Israel.
2. **Branimir V Spasov**, Margarita L. Guenova, Gueorgui N. Balatzenko, Georgi Tz. Momekov, Spiro M. Konstantinov - Expression of Wilms' tumor 1 and nuclear factor kappa B proteins in blast cells of de novo acute myeloid leukemias - Apoptosis World 2008, From mechanisms to application, January 23th to 26th, 2008; European Conference Center Kirchberg, Luxembourg.
3. **Б. Спасов**, П. Ганева, М. Станева, И. Гълъбова, Ю. Жечев, Г. Арнаудов, Д. Пейчев, Г. Балаценко, В. Хрисчев, А. Стоименов, М. Генова, С. Ангелова, Г. Михайлов. Клинично проследяване на постигнатия терапевтичен ефект при възрастни пациенти под 60-годишна възраст с новодиагностицирана остра миелоидна левкемия - VIII Национална Конференция по Хематология и IV Балкански Хематологични дни, 18-20 септември 2009, хотел "Хилтън", София.
4. **В. Spasov**, A. Stoimenov, G. Balatzenko, D. Peichev, S. Konstantinov – Wilms' tumor protein (WT1), multidrug resistance gene (MDR) and FLT3-internal tandem duplication (FLT3-ITD) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia (AML) – The 11th World Congress on Advances in Oncology, and 9th International Symposium on Molecular Medicine, 12-14 October 2006, Hersonissos, Crete, Greece.
5. **Бранимир Спасов**, М. Станева, Д. Пейчев, С. Константинов, Дж. Ходжаджик – Проследяване експресията на онкопротеина на Wilms' като прогностичен белег при пациенти с остра миелоидна левкемия – VIII национален конгрес по клинична и трансфузионна хематология с международно участие, 26-29 септември 2007 г., комплекс Слънчев ден, Варна.