**Badanie zależności funkcji indukcji różnicowania komórek ostrych białaczek szpikowych od struktury analogów   
witamin D2 oraz D3.**

**STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM**

Podstawową funkcją biologiczną 1,25-dihydroksywitaminy D3 (1,25D) jest utrzymywanie homeostazy wapniowo-fosforanowej organizmu. Poza tym 1,25D pełni liczne funkcje tzw. "nieklasyczne” m.in.: reguluje odpowiedź immunologiczną organizmu, proliferację oraz różnicowanie wielu rodzajów komórek. Swoją aktywność biologiczną, polegającą na transkrypcji genów docelowych, 1,25D uzyskuje poprzez jądrowy receptor (VDR), działający jako zależny od liganda czynnik transkrypcyjny aktywujący szereg szlaków sygnałowych, chociaż dokładny mechanizm działania 1,25D na komórki docelowe nie został jeszcze w pełni poznany. Od lat postuluje się zastosowanie w leczeniu ostrych białaczek szpikowych (AML) związków indukujących różnicowanie się komórek. U chorych, w procesie hematopoezy, dochodzi do blokady szlaku różnicowania komórek linii mieloidalnej, co powoduje nagromadzenie niedojrzałych komórek tzw. blastów i braku ich różnicowania do monocytów i makrofagów. Problemem w klinicznym zastosowaniu 1,25D jest silna aktywność wapniowa przejawiająca się zdolnością do mobilizowania jonów wapnia z kości, jelit i nerek do surowicy krwi, co skutkuje odwapnieniem kości i powstawaniem złogów wapnia w tkankach miękkich. Stąd podejmowane są próby syntezy analogów witaminy D pozbawionych aktywności wapniowej, przy zachowanej lub zwiększonej zdolności do indukcji różnicowania komórek.

W rozprawie doktorskiej badano zdolność 1,25D oraz ośmiu syntetycznych, semi-selektywnych analogów o obniżonej aktywności wapniowej do indukcji różnicowania komórek białaczkowych izolowanych z krwi obwodowej pacjentów oraz linii komórkowych AML: HL60, THP-1, NB-4, U-937, MV4-11, MOLM-13. Podjęto próbę zdefiniowania grup pacjentów, dla których zaproponowana terapia z udziałem związków różnicujących byłaby skuteczna oraz wyselekcjonowano najbardziej aktywne analogi. Dodatkowo zbadano poziom ekspresji genu i białka 24 – hydroksylazy (CYP24A1), odpowiedzialnej za katabolizm 1,25D.

W pracy wykazano, że trzy z badanych analogów okazały się szczególnie skuteczne: analog witaminy D3 – PRI-2191 oraz analogi witaminy D2 – PRI-1906 i PRI-1907. Wyodrębniono dwie grupy pacjentów, których komórki odpowiadały na 1,25D   
i analogi odmiennie: grupę pacjentów z mutacją w genie Flt3, reagującą na związki pro-różnicujące słabiej oraz grupę pacjentów z mutacją w genie NPM1, reagującą silniej niż komórki pacjentów nieposiadających tej mutacji. Komórki linii MV4-11 i MOLM-13, posiadające mutację w genie Flt3 różnicowały się pod wpływem badanych związków, stąd mutacja w genie Flt3 nie jest bezpośrednią i jedyną przyczyną słabszego różnicowania komórek pacjentów z AML.

Analog PRI-1907, posiadający grupę etylową w łańcuchu bocznym cząsteczki, wykazuje bardzo wysoką aktywność w niskich stężeniach, co zaobserwowano zarówno   
w liniach komórkowych, jak i w komórkach pacjentów z AML. Wysoka aktywność PRI-1907 w porównaniu do pozostałych badanych związków pro-różnicujących skłoniła do sprawdzenia, czy nie jest to wynikiem jego odmiennego katabolizmu. We wszystkich badanych komórkach konstytutywny poziom CYP24A1 był bardzo niski, ale w wyniku ekspozycji komórek linii białaczkowych na 1,25D, PRI-1906, PRI-1907 lub PRI-2191 dochodziło do systematycznego, stosunkowo powolnego, ale bardzo dużego wzrostu poziomu mRNA dla CYP24A1. Chociaż stwierdzono, że analog PRI-1907 wykazuje najwyższą aktywność do indukcji różnicowania i w komórkach HL60 powoduje najsłabszą indukcję syntezy mRNA dla CYP24A1, to nie potwierdzono tych obserwacji w innego typu komórkach. Z tego względu za wysoką aktywność PRI-1907 nie jest odpowiedzialny odmienny katabolizm, ale innego typu mechanizm. Próby wzmocnienia różnicowania poprzez zastosowanie specyficznego inhibitora CYP24A1 – CTA09 oraz inhibitorów niespecyficznych nie przyniosły jednak znacznego wzrostu odsetka komórek CD11b lub CD14 pozytywnych.

Dodatkowo uzyskano wyniki świadczące, że istnieje korelacja pomiędzy indukcją ekspresji VDR i zwiększoną ekspresją czynników C/EBPβ w kompartymencie jądrowym   
a zdolnością analogów do różnicowania komórek w kierunku monocytarno – makrofagowym.

Oznaczony polimorfizm FokI VDR w różnych liniach komórkowych oraz w komórkach izolowanych z krwi obwodowej pacjentów z AML nie wyjaśnia ich podatności lub oporności na indukcję różnicowania pod wpływem związków pro-różnicujących.