

STRESZCZENIE

Mgr Ewa Dobak

Ocena cytometryczna komórek o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1+ w szpiku kostnym u pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej i zespołu mielodysplastycznego

W ostatnich latach pojawiły się dowody na istnienie niewielkiego odsetka białaczkowych komórek macierzystych (LSC) biorących udział w powstawaniu takich chorób jak AML, czy MDS. Podobnie jak ich prawidłowy odpowiednik, hematopoetyczne komórki macierzyste (HSC), LSC posiadają zdolność do samoodnawiania, proliferacji oraz różnicowania w bardziej dojrzałe komórki potomne. Uważa się, że najbardziej odporne na chemioterapię, a zatem odpowiedzialne za niepowodzenie w leczeniu i nawrót choroby, są komórki LSC o immunofenotypie CD34+CD38-. Wśród komórek CD34+CD38- znajdują się zarówno komórki LSC, jak i HSC. Dlatego niezwykle ważne jest by dokładnie zidentyfikować cechy odróżniające od siebie obie te populacje. Do dyskryminacji LSC od HSC w przedziale komórek o fenotypie CD34+CD38- metodą cytometrii przepływowej wykorzystano marker CLL-1, który cechuje się stałą nieobecnością na komórkach HSC. Zastosowana metoda cytometrii przepływowej pozwoliła również na zidentyfikowanie różnic w rozproszeniu światła (tj. FSC i SSC) komórek złośliwych względem komórek HSC.

Celem pracy była ocena odsetka komórek CD34+CD38-CLL-1+ w szpiku kostnym u pacjentów z rozpoznaniem AML lub MDS przed leczeniem i w trakcie monitorowania leczenia oraz ocena związku odsetka ww. komórek w porównaniu z rokowaniem, typem morfologicznym i wiekiem. Projekt niniejszy miał na celu także wyszukanie najlepszego parametru do monitorowania komórek CD34+CD38-CLL-1+ techniką cytometrii przepływowej.

Grupę badaną stanowiło 27 pacjentów ze zdiagnozowaną de novo AML, 5 pacjentów na etapie AML – całkowitej remisji oraz 20 pacjentów z MDS. Do grupy kontrolnej zaliczono pacjentów, u których wykluczono MDS oraz AML z populacją komórek CD34+ większą niż 1%.

Do badania posłużył 1 ml szpiku kostnego pobranego do probówki z antykoagulantem EDTA. Próbki szpiku kostnego pobrano jako nadmiar materiału wykorzystywanego w ramach procesu diagnostycznego w Zakładzie Patomorfologii SPSK1 po wcześniejszym uzyskaniu świadomej zgody pacjenta na udział w projekcie. Uzyskany szpik kostny zabarwiono przeciwciałami znakowanymi fluorochromami celem oznaczenia komórek CD34+CD38-CLL-1+, a następnie analizowano w cytometrze przepływowym FASC Canto II w programie BD FACSDivaTMSoftware.

Przeprowadzone badania potwierdziły obecność komórek CD34+CD38-CLL-1+ wśród chorych na AML i MDS, odpowiednio 92% i 80%. Zidentyfikowano wyższą ekspresję komórek LSC w AML aniżeli w MDS. Pacjenci z AML, których leczenie doprowadziło do remisji choroby, cechowali się w trakcie kolejnych pobrań szpiku kostnego stałym spadkiem omawianych komórek, aż do poziomu zerowego. Wykazano istnienie ujemnej korelacji między występowaniem komórek CD34+CD38-CLL-1+ a remisją AML. Jak zakładano, wśród osób w grupie kontrolnej nie zidentyfikowano obecności badanych LSC.

Analiza obecności komórek CD34+CD38-CLL-1+ w kontekście prezentowanego przypadku 1 obejmującego diagnozę AML, remisję i nawrót, okazała się czułym wskaźnikiem monitorującym przebieg choroby. Wszystkie badania szpiku kostnego pochodzące od tego pacjenta charakteryzowały się obecnością wspomnianych komórek przy progu 0,03%. Komórki CD34+CD38-CLL-1+, w odniesieniu do blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+) lub liczby komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L szpiku kostnego, pozwoliły przewidzieć wznowę choroby podczas morfologicznej i molekularnej remisji. Najbardziej przejrzystym i czułym parametrem do monitorowania obecności komórek CD34+CD38-CLL-1+ okazała się liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L szpiku kostnego. W fazie całkowitej remisji opisywana zmienna wskazywała na poziom komórek złośliwych bliski poziomowi komórek złośliwych z momentu rozpoznania. Dane te mogą wyeliminować wyniki fałszywie ujemne w czasie kontroli leczenia i przewidywać wznowę. Średnia intensywność fluorescencji cząsteczki CLL-1 komórek LSC we wszystkich pobraniach badanego szpiku utrzymywała się na stabilnym poziomie, co sugeruje stabilność antygenu CLL-1 jako markera pomocnego w identyfikacji komórek LSC w przedziale komórek CD34+CD38-. Analiza pojedynczych przypadków MDS oraz MPN, z których rozwinęła się AML dowodzi, że nawet znikomy odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ może poprzedzić rozwój choroby w AML.

Przeprowadzono analizę porównawczą obecności komórek CD34+CD38-CLL-1+ w obrębie poszczególnych podtypów AML i MDS. Wszystkie zastosowane parametry określające komórki LSC, tj. w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), w odniesieniu do blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L szpiku kostnego oraz wartość średniej intensywności fluorescencji cząsteczki CLL-1 w komórkach CD34+CD38-CLL-1, wykazały istotnie wyższą obecność badanych komórek w poszczególnych typach AML tj. AMLNOS, AMLMDS, AMLMPN w porównaniu do kontroli. Odsetek komórek LSC, w stosunku do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total) oraz w odniesieniu do blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), ukazały AMLMPN jako bardziej agresywny typ niż AMLNOS. Analogicznie do AML, wszystkie podtypy MDS tj. MDSEB1, MDSEB2, MDSRS, MDSU wykazały istotnie więcej komórek CD34+CD38-CLL-1+ w porównaniu z kontrolą, co również dotyczy wszystkich zmiennych. Rzeczywista liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L szpiku kostnego wykazała że MDSEB2 ma bardziej agresywny charakter niż MDSU.

Nie wykazano zależności między występowaniem komórek CD34+CD38-CLL-1+ a rokowaniem zarówno w AML jak i MDS. W przypadku odsetka komórek LSC, w stosunku do całej populacji komórek szpiku kostnego oraz w stosunku do blastów wykazujących ekspresję CD34+, w AML zaobserwowano jedynie tendencję wzrostową. Podobnie w MDS, odsetek komórek LSC w odniesieniu do blastów z ekspresją CD34+ oraz liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L szpiku kostnego wykazał jedynie tendencję wzrostową. Badania własne nie wykazały istotnego związku

109

między wiekiem, a obecnością komórek CD34+CD38-CLL-1+ w AML oraz MDS. Zaobserwowano natomiast, że pacjenci z AML lub MDS byli starsi od pacjentów którzy osiągnęli całkowitą remisję.

Ocena odsetka złośliwych komórek CD34+CD38-CLL-1+ w szpiku kostnym spełnia ważną rolę w rutynowej diagnostyce AML i MDS. W przypadku AML ma to znaczenie w definiowaniu jakości remisji i przewidywaniu ryzyka nawrotu, natomiast w MDS w ocenie ryzyka wystąpienia AML. Obecność

komórek CD34+CD38-CLL-1+ może przyczynić się do wyeliminowania wyników fałszywie ujemnych podczas monitorowania MRD.