

PRACA DOKTORSKA



POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W SZCZECINIE

WYDZIAŁ MEDYCYNY I STOMATOLOGII

Ewa Dobak

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

**Cytometric evaluation of cells with CD34+CD38-CLL-1+ immunophenotype
in bone marrow in patients diagnosed with acute myeloid leukemia
and myelodysplastic syndrome**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

wykonana w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii

Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

Promotor

dr hab. n. med. Katarzyna Karpińska - Łukaszewicz

SZCZECIN 2022

Serdecznie dziękuję

mojej Pani Promotor dr hab. n. med. Katarzynie Karpińskiej – Łukaszewicz
za poświęcony czas oraz cenne uwagi w trakcie realizacji pracy.

Pracę dedykuję Rodzicom, Mężowi i moim ukochanym dzieciom,
bez których miłości i poświęcenia nic nie byłoby możliwe.

Spis treści

OBJAŚNIENIA ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW	5
ZASTOSOWANE ALGORYTMY OBLICZEŃ	7
1 WSTĘP	8
1.1 Ostra białaczka szpikowa (AML)	8
1.2 Zespół mielodysplastyczny (MDS)	11
1.3 Częsteczką CLL-1	12
1.4 Minimalna choroba resztkowa (minimal residual disease; MRD)	13
1.4.1 Identyfikacja cytometryczna białaczkowych komórek macierzystych (leukemic stem cell; LSC) w MRD	14
1.5 Leczenie celowane anty-CLL-1	15
2 CEL PRACY	17
3 MATERIAŁ I METODY	18
3.1 Obliczanie liczby WBC	21
3.2 Konfiguracja cytometru	21
3.3 Procedura barwienia	22
3.4 MFI antygenu CLL-1	24
3.5 Strategia bramkowania komórek o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1+	25
3.6 Analiza statystyczna	29
4 WYNIKI	30
4.1 Analiza cytometryczna grupy kontrolnej pod względem badanych parametrów	30
4.2 Obecność komórek o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1+ a wiek pacjentów	32
4.3 Obecność komórek CD34+CD38-CLL-1+ a płeć pacjentów	36
4.4 Odsetek komórek wykazujących ekspresję CD34+CD38-CLL-1+ a liczba WBC	39
4.6 Identyfikacja komórek niszy szpikowej CD34+CD38- w podgrupach pacjentów AML, MDS, AML-CR	42
4.7 Identyfikacja komórek niszy szpikowej CD34+CD38- w AML	45
4.7.1 Komórki niszy szpikowej CD34+CD38- w AML a rokowanie	47
4.8 Identyfikacja komórek niszy szpikowej CD34+CD38- w MDS	49
4.8.1 Komórki niszy szpikowej CD34+CD38- w MDS a rokowanie	52
4.9 Identyfikacja komórek progenitorowych CD34+CD38+CLL-1+, w odniesieniu do odsetka blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), w podgrupach pacjentów AML, MDS, AML-CR	54
4.10 Identyfikacja komórek CD34+CD38-CLL-1+ w podgrupach pacjentów AML, MDS, AML-CR ...	55
4.10.1 Porównanie ziarnistości i wielkości komórek CD34+CD38-CLL-1+ względem CD34+CD38-CLL-1-, w podgrupach AML, MDS	59
4.11 Identyfikacja komórek CD34+CD38-CLL-1+ w podgrupie AML	60

4.11.1 Ziarnistość i wielkość komórek CD34+CD38-CLL-1+ względem CD34+CD38-CLL-1-, w AML.....	63
4.11.2 Komórki CD34+CD38-CLL-1+ w AML a rokowanie	65
4.12 Identyfikacja komórek CD34+CD38-CLL-1+ u pacjentów z MDS.....	67
4.12.1 Ziarnistość i wielkości komórek CD34+CD38-CLL-1+ względem CD34+CD38-CLL-1-, w MDS	71
4.12.2 Komórki CD34+CD38-CLL-1+ w MDS a rokowanie	72
4.13 Korelacja analizowanych parametrów u pacjentów którzy osiągnęli całkowitą remisję AML-CR.....	75
4.13.1 Obecność komórek LSC o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1+, w podgrupie AML-CR	75
4.13.2 Blasty CD34+, w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), w podgrupie AML-CR.....	75
4.13.3 Komórki niszy szpikowej CD34+CD38- w podgrupie AML-CR	76
4.13.4 Komórki CD34+CD38-CLL-1+ w podgrupie AML-CR	78
4.13.5 Porównanie ziarnistości i wielkości komórek CD34+CD38-CLL-1+ względem CD34+CD38-CLL-1-, w podgrupie AML-CR.....	82
4.14 Korelacja parametrów cytometrycznych w diagnostyce prezentowanych przypadków	84
4.14.1 PRZYPADEK 1	84
4.14.2 PRZYPADEK 2	90
4.14.3 PRZYPADEK 3	92
5 PODSUMOWANIE WYNIKÓW.....	94
6 DYSKUSJA.....	98
7 WNIOSKI	106
8 STRESZCZENIE.....	107
9 SUMMARY	110
10 PIŚMIENNICTWO	113
11 ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ.....	124

OBJAŚNIENIA ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW

Skrót	Nazwa polska	Nazwa angielska
ADCC	cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał	antibody-dependent cellular cytotoxicity
allo-HSCT	allogeniczny przeszczep krwiotwórczych komórek macierzystych	allogeneic hematopoietic stem cell transplantation
AML	ostra białaczka szpikowa	acute myeloid leukemia
AML-CR	AML na etapie całkowitej remisji	AML complete remission
AMLnos	AML bliżej nieokreślona	AML not otherwise specified
AMLg	AML z nieprawidłowościami cytogenetycznymi	AML with genetic abnormalities
AMLmds	AML na podłożu zespołu mielodysplastycznego	AML with myelodysplasia changes
AMLmpn	AML na podłożu choroby mieloproliferacyjnej	AML with myeloproliferative changes
AMLk	AML o rokowaniu korzystnym	
AMLp	AML o rokowaniu pośrednim	
AMLnk	AML o rokowaniu niekorzystnym	
APL	ostra białaczka promielocytowa	acute promyelocytic leukemia
CDC	cytotoksyczność zależna od dopełniacza	complement-dependent cytotoxicity
CLL-1	cząsteczka podobna do lektyny typu C-1	c-type lectin-like molecule 1
DLBCL	chłoniak z dużych limfocytów B	diffuse large B-cell lymphoma
ELN	Europejska Grupa Białczkowa	European Leukemia Net
FSC	rozproszenie światła do przodu	forward scatter
grK	grupa kontrolna	
HSC	krwiotwórcze komórki macierzyste	hematopoietic stem cells
IPSS	międzynarodowy system prognostyczny	International Prognostic Scoring System
LSC	białczkowe komórki macierzyste (CD34+CD38-CLL-1+)	leukaemic stem cell
MDS	zespół mielodysplastyczny	myelodysplastic syndrome
MDS-EB1	MDS z nadmiarem blastów 5-9%	MDS with excess of blasts 5-9%
MDS-EB2	MDS z nadmiarem blastów 10-19%	MDS with excess of blasts 10-19%
MDS-RS	MDS z obecnością pierścieniowatych syderoblastów	MDS with ring sideroblast
MDS-RS-SLD	MDS z obecnością pierścieniowatych syderoblastów z jednoliniową dysplazją	MDS with ring sideroblast and single lineage dysplasia
MDS-RS-MLD	MDS z obecnością pierścieniowatych syderoblastów z wieloliniową dysplazją	MDS with ring sideroblast and multilineage dysplasia
MDSu	zespół mielodysplastyczny nieklasyfikowany	MDS unclassifiable
MDSn	MDS o niskim rokowaniu	
MDSp1	MDS o pośrednim 1 rokowaniu	
MDSp2	MDS o pośrednim 2 rokowaniu	

MFI	średnia intensywność fluorescencji	median fluorescein intensity
MFC	wieloparametrowa cytometria przepływowa	multiparameter flow cytometry
Mice (NOD/SCID)	myszy o osłabionej odporności	nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice
n.s.	nieistotne statystycznie	non significant
SSC	rozproszenie światła w bok	side scatter
RT-PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym	real-time polymerase chain reaction
WBC	białe krwinki	white blood cells

ZASTOSOWANE ALGORYTMY OBLICZEŃ

określenie	algorytm	wyjaśnienie
MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+	MFI CLL-1 w komórkach o fenotypie CD34+CD38-CLL-1+, bez tła	średnia intensywność fluorescencji CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ podzielona przez średnią intensywność fluorescencji CLL-1 limfocytów
Różnica wielkości	$(FSC/limf\ CD34+CD38-CLL-1+) - (FSC/limf\ CD34+CD38-CLL-1-)$	różnica względnej wielkości komórek niszy szpikowej CLL-1+ względem CLL-1-, w porównaniu do wielkości limfocytów
Różnica ziarnistości	$(SSC/limf\ CD34+CD38-CLL-1+) - (SSC/limf\ CD34+CD38-CLL-1-)$	różnica względnej ziarnistości komórek niszy szpikowej CLL-1+ względem CLL-1-, w porównaniu do ziarnistości limfocytów
FSC/limf 34+38-CLL-1+	$FSC\ CD34+CD38-CLL-1+ / FSC\ limfocytów$	wielkość komórek z ekspresją CD34+CD38-CLL-1+, w porównaniu do wielkości limfocytów
FSC/limf 34+38-CLL-1-	$FSC\ CD34+CD38-CLL-1- / FSC\ limfocytów$	wielkość komórek z ekspresją CD34+CD38-CLL-1-, w porównaniu do wielkości limfocytów
SSC/limf 34+38-CLL-1+	$SSC\ CD34+CD38-CLL-1+ / SSC\ limfocytów$	ziarnistość komórek z ekspresją CD34+CD38-CLL-1+, w porównaniu do ziarnistości limfocytów
SSC/limf 34+38-CLL-1-	$SSC\ CD34+CD38-CLL-1- / SSC\ limfocytów$	ziarnistość komórek z ekspresją CD34+CD38-CLL-1-, w porównaniu do ziarnistości limfocytów
% total		odsetek badanych komórek, w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego
% blastów CD34+		odsetek badanych komórek, w odniesieniu do populacji blastów wykazujących ekspresję CD34+
CD34+CD38-CLL-1+ / WBC	iloraz komórek CD34+CD38-CLL-1+ do wszystkich badanych komórek szpiku kostnego pomnożony przez WBC	rzeczywista liczba komórek z ekspresją CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ l szpiku kostnego
CD34+CLL-1+ (% blastów CD34+)		odsetek komórek CD34+CLL-1+, w odniesieniu do populacji blastów wykazujących ekspresję CD34+

1 WSTĘP

1.1 Ostra białaczka szpikowa (AML)

Ostra białaczka szpikowa (acute myeloid leukemia; AML) to heterogenna grupa nowotworów. W 2016 roku i obecnie w czerwcu 2022 roku Światowa Organizacja Zdrowia (World Health Organization; WHO), biorąc pod uwagę: obraz kliniczny, morfologiczny, immunofenotypowy oraz profil cytogenetyczno - molekularny, uaktualniła klasyfikację AML wyróżniając różne podjednostki chorobowe, wymagające odmiennego leczenia (1,2,3,4) (Tabela 1,2).

Tabela 1. Klasyfikacja AML wg WHO 2016 (3)

1. AML z powtarzalnymi nieprawidłowościami cytogenetycznymi	Nowotwór mielodysplastyczny – mieloproliferacyjny zależny od terapii (t-MDS/MPN)
AML z t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1	5. AML bliżej nieokreślona
AML z inv(16)(p13.1q22) lub t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11	AML z minimalnym różnicowaniem
APL z PML-RARA	AML z cechami dojrzewania
AML z t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A	Ostra białaczka mielomonocytoza
AML z t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214	Ostra białaczka monoblastyczna/monocytoza
AML z inv(3)(q21.3q26.2) lub t(3;3)(q21.3;q26.2) GATA2, MECOM(EVI1)	Białaczka czystoczerwono-krwinkowa
AML megakarioblastyczna z t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1	Ostra białaczka megakarioblastyczna
AML z rearanżacją BCR-ABL1	Ostra białaczka bazofilowa
2. AML z mutacjami genowymi	Ostra panmieloza z mielofibrozą
AML z mutacją NPM1	6. Mięsak mieloidalny
AML z bialleliczną mutacją CEBPA	7. Mieloprolifracje związane z zespołem Downa
AML z mutacją RUNX1	8. Nowotwór blastyczny z plazmacytoidnych kom.dendrytycznych
3. AML z cechami zależnymi od mielodysplazji	9. Ostra białaczka o nieokreślonym pochodzeniu liniowym
Z wieloliniową dysplazją	Ostra białaczka niezróżnicowana
Poprzedzona zespołem mielodysplastycznym	Ostra białaczka o mieszanym fenotypie z t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1
Współistniejące nieprawidłowości genetyczne związane z mielodysplazją	Ostra białaczka o mieszanym fenotypie z t(v;11q23.3); rearanżacja KMT2A
4. Nowotwory mieloidalne zależne od terapii	Ostra białaczka o mieszanym fenotypie, B/szpikowa, bliżej nieokreślona
Ostra białaczka szpikowa zależna od terapii (t-AML)	Ostra białaczka o mieszanym fenotypie, T/szpikowa, bliżej nieokreślona
Zespół mielodysplastyczny zależny od terapii (t-MDS)	Ostra białaczka o mieszanym fenotypie, T/szpikowa, bliżej nieokreślona

Tabela 2. Klasyfikacja AML wg WHO czerwiec 2022 (2)

1. AML z powtarzalnymi nieprawidłowościami cytogenetycznymi
AML z fuzją RUNX1-RUNX1T1
AML z fuzją CBFβ-MYH11
APL z fuzją PML-RARA
AML z fuzją DEK-NUP214
AML z fuzją BCR-ABL1
AML z fuzją RBM15-MRTFA
AML z rearanżacją KMT2A
AML z rearanżacją MECOM
AML z rearanżacją NUP98
AML z mutacją NPM1
AML z mutacją CEBPA
AML związane z mielodysplazją
AML z innymi zdefiniowanymi zmianami genetycznymi
2. AML określona przez zróżnicowanie
AML z minimalnym różnicowaniem
AML bez cech dojrzwania
AML z cechami dojrzwania
Ostra białaczka mielomonocytowa
Ostra białaczka monocytowa
Białaczka czerwonekrwinkowa
Ostra białaczka megakarioblastyczna
Ostra białaczka bazofilowa

Uważa się, że u podłoża AML leży kumulacja nabytych zaburzeń genetycznych (6,7,8) powstałych w wyniku ekspozycji na czynniki takie jak: promieniowanie jonizujące, niektóre związki chemiczne (np. beznen), leki alkilujące lub palenie tytoniu. Rolę w zainicjowaniu choroby odgrywają również czynniki genetyczne. Choroby charakteryzujące się upośledzeniem mechanizmów naprawy DNA lub niestabilnością DNA (np. zespół Downa), wiążą się z wyższym ryzykiem rozwoju w AML (8).

Zgodnie z ustaleniami Polskiej Grupy ds. Leczenia Białaczek u Dorosłych, ponad 80% wszystkich ostrych białaczek u dorosłych stanowi AML (9,10,11,12,13). Współczynnik zachorowalności na AML wynosi średnio 3,7/100 000 mieszkańców/rok i zwiększa się znacząco wraz z wiekiem. Mężczyźni chorują nieznacznie częściej niż kobiety (8). Pięcioletnie przeżycie pacjentów z nawrotową AML, oporną na leczenie lub niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi wynosi mniej niż 30%, niezależnie od przeszczepu komórek krwiotwórczych (13,14,15). Dane z piśmiennictwa wskazują, że za wznowę choroby odpowiadają ukryte w niszy szpikowej komórki LSC (leukemic stem cells; LSC) o nieograniczonym potencjale samoodnowy, proliferacji i różnicowania (16,17,18). AML jest chorobą rozrostową układu krwiotwórczego, w której dochodzi do niekontrolowanej proliferacji

i gromadzenia się niedojrzałych morfologicznie i czynnościowo komórek białaczkowych. Komórki te naciekają szpik kostny prowadząc do zaburzenia prawidłowej hematopoezy, a w rezultacie do niedokrwistości, małopłytkowości i neutropenii (8).

Rokowanie w AML zależy od wieku pacjenta, ogólnego stanu chorego oraz od czynników związanych z samą chorobą, m.in. obecności zmian cytogenetyczno – molekularnych w komórkach białaczkowych, liczby leukocytów w krwi obwodowej w momencie rozpoznania, obecności zespołu mielodysplastycznego lub mieloproliferacyjnego poprzedzającego wystąpienie AML (19,20,21,22,23). W praktyce klinicznej do oceny ryzyka związanego z leczeniem wykorzystuje się klasyfikację cytogenetyczno – molekularną opracowaną przez ELN (European Leukemia Net). Zgodnie z wytycznymi ELN, w AML wyróżnia się trzy grupy rokownicze (korzystną, pośrednią i niekorzystną) (Tabela 3), co ma wpływ na decyzję klinicysty w doborze odpowiedniej terapii (24).

Tabela 3. Klasyfikacja cytogenetyczno – molekularna w AML wg European Leukemia Net (24)

Rokowanie	Zaburzenia genetyczne
Korzystne	t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) lub t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 MPN1 ^{mut} /FLT3-ITD ^{low} lub z FLT3-ITD ^{low} Bialleliczna CEBPA ^{mut}
Pośrednie	NPM1 ^{mut} /FLT3-ITD ^{high} wtNPM1/FLT3-ITD ^{low} lub z FLT3-ITD ^{low} t(9;12)(p21.3;23.3); MLLT3-KMT2A Zaburzenia cytogenetyczne nie sklasyfikowane jako korzystne lub niekorzystne
Niekorzystne	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214; t(v;11q23.3); rearanżacja KMT2A t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3)(q21.3q26.2) lub t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM(EVI1) -5 lub del(5q); -7; -17/abn(17p); złożony kariotyp; monosomalny kariotyp wtNPM1 i FLT3-ITD ^{high} , RUNX1 ^{mut} , ASXL1 ^{mut} , TP53 ^{mut}

1.2 Zespół mielodysplastyczny (MDS)

MDS to niejednorodna grupa klonalnych zaburzeń hematologicznych charakteryzująca się nieskuteczną hematopoezą, dysplazją prowadzącą do cytopenii oraz ryzykiem progresji do AML (1). AML jest ostatecznie diagnozowana w ponad 40% przypadków MDS (87,131). Opierając się na morfologii szpiku kostnego, procentowej zawartości blastów, obecności zmian chromosomalnych oraz objawach klinicznych w 2016 roku i w czerwcu 2022 roku WHO uaktualniła klasyfikację MDS (Tabela 4,5).

Tabela 4. Klasyfikacja MDS wg WHO 2016 (1)

Zespoły Mielodysplastyczne
MDS z jednoliniową dysplazją (MDS-SLD)
MDS z obecnością pierścieniowatych syderoblastów (MDS-RS) - MDS z jednoliniową dysplazją (MDS-RS-SLD) - MDS z wieloliniową dysplazją (MDS-RS-MLD)
MDS z wieloliniową dysplazją (MDS-MLD)
MDS z nadmiarem blastów (MDS-EB) - MDS-EB1 (5 – 9% blastów) - MDS-EB2 (10 – 19% blastów)
MDS z izolowaną delecją chromosomu 5q
Nieklasyfikowany zespół mielodysplastyczny (MDS-U)

Tabela 5. Klasyfikacja MDS wg WHO czerwiec 2022 (2)

MDS z określeniem nieprawidłowości genetycznych
MDS z niskim odsetkiem blastów <5% i izolowaną delecją 5q (MDS-5q)
MDS z niskim odsetkiem blastów i mutacją SF3B1 (MDS-SF3B1)
MDS z inaktywacją bialleliczną TP53 <20% (MDS-biTP53)
MDS zdefiniowana morfologicznie
MDS z niskim odsetkiem blastów <5% (MDS-LB)
MDS hypoplastyczny (MDS-h)
MDS ze zwiększonym odsetkiem blastów (MDS-IB)
MDS-IB1 5-9% blastów
MDS-IB2 10-19% blastów
MDS ze zwłóknieniem 10-19% blastów

Proces rozwoju MDS jest procesem wieloetapowym, który dotyczy krwiotwórczych komórek macierzystych (HSC) oraz mikrośrodowiska szpiku kostnego. MDS jest zaburzeniem HSC, w obrębie których wystąpiły złośliwe zmiany genetyczne odpowiadające za dysregulację układu

immunologicznego, prowadząc do zaburzeń regulacji cyklu komórkowego i zahamowania różnicowania (26,27,28).

Dane dotyczące zapadalności na tę chorobę w Polsce w latach 2009 – 2015 wskazują, że współczynnik zachorowalności na MDS wynosi średnio 3,8/100000 mieszkańców/rok i zwiększa się znacząco wraz z wiekiem (13). U osób powyżej 70 roku życia zachorowalność wzrasta do 50/100000 mieszkańców/rok (26). Mężczyźni chorują o 50% częściej niż kobiety (29). W najbliższym czasie z powodu starzenia się społeczeństwa należy spodziewać się wzrostu zachorowań na MDS. Wzrośnie również liczba zachorowań na wtórny MDS, związany z radio- lub chemioterapią wśród osób leczonych na inne schorzenia (25). Do rozwoju MDS predysponują również: wrodzone zaburzenia genetyczne, pochodne benzenu oraz palenie tytoniu (8). Prawdopodobieństwo 3-letniego przeżycia chorych na MDS wynosi 45,8% zaś 5-letnie przeżycie wynosi 36,1% (13). Czynniki rokownicze pacjentów z MDS obejmują: analizę cytopenii obwodowej, odsetka blastów w szpiku kostnym i cechy cytogenetyczne. W wyborze terapii stosuje się najczęściej system International Prognostic Scoring System (IPSS) (Tabela 6) (30). IPSS został zmodyfikowany do IPSS-R (IPSS – *revised*) (30,31,32).

Tabela 6. Międzynarodowy Indeks Prognostyczny dla MDS (IPSS) (30)

Punktacja					
	0	0,5	1,0	1,5	2
Blasty (%) (szpik)	< 5	5-10	-	11-20	21-30
Kariotyp	Prawidłowy -Y del(5q) del(20q)	Inne zmiany	Złożony (≥3nieprawidłowości) Zaburzenia chromosomu 7	-	-
Cytopenie	0-1	2-3	-	-	-
Ryzyko			Punktacja		
Niskie			0		
Pośrednie-1			0,5 – 1,0		
Pośrednie-2			1,5 – 2,0		
Wysokie			≥ 2,5		

1.3 Częsteczka CLL-1

Białko CLL-1 (C-type lectin-like molecule 1) to częsteczka podobna do lektyny typu C-1, która jest obecna wyłącznie na powierzchni komórek mieloidalnych w szpiku kostnym i w monocytach krwi obwodowej. W AML stwierdza się nadekspresję białka CLL-1. Białko to zidentyfikowano w części komórek LSC (leukemic stem cells; LSC) zdolnych do zainicjowania AML (17,18).

Komórki LSC w szpiku kostnym mogą posiadać immunofenotyp: CD34+CD38- lub CD34+CD38+ lub CD34- (33,34). Najbardziej odporne na chemioterapię są komórki LSC o immunofenotypie CD34+CD38-, a ich odsetek w momencie rozpoznania koreluje z wystąpieniem minimalnej choroby

resztkowej (minimal residual disease; MRD) i przeżyciem. Wykazano jednak, że wśród komórek niszy szpikowej CD34+CD38- znajdują się zarówno komórki LSC jak i prawidłowe hematopoetyczne komórki macierzyste (hematopoietic stem cells; HSC), dlatego z klinicznego punktu widzenia ważnym jest, by odróżnić obie te populacje (18,35). Ekspresji CLL-1 praktycznie nie stwierdza się w komórkach HSC CD34+CD38- (36). Ekspresja CLL-1 w znikomym odsetku może występować na komórkach progenitorowych w obszarze HSC CD34+CD38+, a badania wskazują, że relatywnie niski odsetek wspomnianych komórek nie ma znaczącego wpływu na spadek poziomu granulocytów w terapii przeciwciałem anti-CLL-1 (33,37,38,39).

Białko CLL-1 związane jest z subpopulacją komórek, odpowiedzialną za nawrót choroby. Złośliwą naturę subpopulacji CD34+CD38-CLL-1+ potwierdzono badaniami polegającymi na przeszczepieniu białaczkowych komórek CD34+CD38-CLL-1+ pochodzenia ludzkiego myszom z NOD/SCID, co spowodowało wystąpienie białaczki u tych zwierząt. Ekspresja CLL-1 okazała się specyficzna dla komórek białaczki CD34+CD38-. W prawidłowej subpopulacji komórek HSC CD34+CD38- nie stwierdza się ekspresji CLL-1, dlatego ocenę ekspresji tego białka można zastosować do diagnostyki MRD. Obecność CLL-1 na komórkach AML jest prawdopodobnie stała, stwierdza się ją przed leczeniem (badanie diagnostyczne) jak i w późniejszych badaniach MRD (18,36,37,39,40,41).

Budowa i funkcja CLL-1 nie zostały do końca wyjaśnione (42). Stwierdzono, że w regionach cytoplazmatycznych CLL-1 znajdują się różne moduły sygnalizacji, tj. moduł hamowania oparty na immunotyrozynie oraz motyw YXXM pełniący rolę receptora sygnalizacyjnego odpowiedzialnego za internalizację po połączeniu się z ligandem. Oparty na tyrozynie moduł hamujący odpowiada za zahamowanie szlaków aktywacji komórek poprzez rekrutację białkowych fosfataz tyrozynowych tj. SHP-1, SHP-2, SHIP. Za mechanizmem wywierania efektu hamującego przemawia fakt, że wraz z dojrzewaniem monocytów poziom CLL-1 ulega obniżeniu, dzięki czemu mogą one zostać aktywowane. Wyjaśnia to dlaczego nie zaobserwowano obecności CLL-1 na makrofagach tkankowych i komórkach dendrytycznych tkanek w czasie, gdy niestymulowane monocyty i komórki dendrytyczne w krwi wykazują obecność CLL-1 (43,44).

1. 4 Minimalna choroba resztkowa (minimal residual disease; MRD)

MRD definiuje się jako obecność komórek białaczkowych, które pozostały po leczeniu i nie wykazują żadnych klinicznych lub hematologicznych objawów choroby. Liczne badania donoszą o znaczącej wartości MRD w AML, która służy do oceny stanu remisji, określenia kinetyki odpowiedzi na zastosowane terapie lub do identyfikacji potencjalnego nawrotu (38,45,46,47,48). Obecnie trwają badania nad zastosowaniem MRD w leczeniu AML (49). Częstość występowania MRD wykazuje silną korelację ze wskaźnikami nawrotów i z przeżyciem (38,48,50) .

Do wykrywania MRD stosuje się dwa główne podejścia tj. techniki molekularne oparte na ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time polymerase chain reaction; RT-PCR) oraz immunofenotypowanie, czyli wieloparametrową cytometrię przepływową (multiparameter flow cytometry; MFC) (45,51,52,53). Spośród tych metod, techniki molekularne uważane są za bardziej czułe (54,55). Celem monitorowania MRD metodą PCR mogą być m.in. geny fuzyjne lub mutacje genów. Badania wykazały, iż mutacja NPM1 w AML stanowi najbardziej odpowiedni cel, ponieważ jest bardzo specyficzna, czuła i stabilna (56). Jednak tylko około połowa pacjentów z AML posiada specyficzne aberracje molekularne nadające się do potencjalnej detekcji MRD (46,55).

Immunofenotypowa metoda wykrywania MRD z wykorzystaniem wieloparametrowej cytometrii przepływowej ma zastosowanie u ponad 90% pacjentów z AML (52,57). Zaletą MFC w porównaniu z technikami molekularnymi jest szybki czas analizy (54). Zasada immunofenotypowania polega na wykorzystaniu wiedzy o dojrzewaniu i różnicowaniu prawidłowych komórek krwiotwórczych ze spójną ekspresją cząsteczek powierzchniowych/cytoplazmatycznych na określonym etapie dojrzewania. Detekcja MRD w MFC opiera się na dwóch koncepcjach:

- (LAIP) immunofenotyp związany z białaczką – definiuje indywidualną specyfikę markerów powierzchniowych i/lub cytoplazmatycznych na komórkach białaczkowych, a następnie monitoruje je w późniejszych badaniach (58,59,60),
- (DfN) różny od prawidłowego – określa nieprawidłowe profile markerów powierzchniowych i/lub cytoplazmatycznych podczas obserwacji i jest w stanie różnicować ewentualne przesunięcia immunofenotypowe (18,58,61).

Jako punkt odcięcia między przypadkiem MRD dodatnim, a MRD ujemnym uznaje się próg 0,1% komórek białaczkowych. Jednak kwantyfikacja MRD poniżej 0,1% nadal może oznaczać obecność komórek białaczkowych, co tłumaczy iż u około 25% pacjentów z MRD poniżej 0,1% może nastąpić nawrót choroby (54,62).

1.4.1 Identyfikacja cytometryczna białaczkowych komórek macierzystych (leukemic stem cell; LSC) w MRD

Niewielka populacja LSC może być odpowiedzialna za nawrót AML i oporność na chemioterapię. Większość obecnych leków stosowanych w chemioterapii eliminuje szybko dzielące się blasty białaczkowe, które stanowią główną masę podmuchu białaczkowego, pozostawiając nienaruszone komórki LSC będące w fazie G0 cyklu komórkowego ukryte w niszy szpikowej (63,64,65). Uważa się, że aby wyleczyć białaczkę, populacja LSC musi zostać wyeliminowana (51). LSC mają bowiem zdolność do nieograniczonego samoodnawiania się oraz produkcji dużej liczby komórek blastycznych (66). Identyfikacja i monitorowanie LSC w MRD poprawia progностyczne

znaczenie wpływu MRD zarówno przy użyciu metody MFC jak i PCR (18,57). Badania porównujące czułość między MFC a metodami molekularnymi stwierdziły zgodność na poziomie około 70% (48,67,68,69). Aktualne zalecenia ELN podają, aby stosować MFC jako metodę z wyboru w przypadku, gdy brak jest znormalizowanego celu molekularnego. (67,68,70).

Jak podaje literatura zidentyfikowanie komórek MRD-LSC u pacjentów z AML uprzedza jawny nawrót kliniczny do 3 miesięcy, co daje potencjalnie czas na przygotowanie się do allogenicznego przeszczepu lub włączenia pacjenta do badania klinicznego (17). Identyfikacja komórek CD34+CD38-CLL-1+ ma sens również wśród pacjentów MDS, postrzegając ich jako grupę szczególnie narażoną na rozwój w AML.

W niniejszym projekcie, do wykrywania LSC o immunofenotypie: CD34+CD38-CLL-1+ została zastosowana metoda MFC. Identyfikacja komórek LSC opierała się na dodatkowej ekspresji markera powierzchniowego CLL-1, który nie występuje w przedziale CD34+CD38- na zdrowych komórkach szpiku kostnego. Zastosowano jednocześnie podejście DfN, polegające na założeniu, iż atypowe komórki różnią się od prawidłowych pod względem wielkości (FSC) i ziarnistości (SSC). Porównano względną wielkość i ziarnistość populacji komórek CD34+CD38-CLL-1+ w stosunku do populacji ujemnej dla CLL-1 tj. CD34+CD38-CLL-1- (71).

1.5 Leczenie celowane anty-CLL-1

Unikalny wzór ekspresji CLL-1 wynikający z obecności tego białka na komórkach AML, przy jednoczesnym braku jego ekspresji w populacji komórek macierzystych, wzbudził zainteresowanie tym białkiem jako potencjalnym obiektem dla terapii celowanej. Podjęto próby opracowania terapii zdolnych do celowania w komórki posiadające CLL-1 na swoich błonach (72).

Zhao i wsp. opracowali dwa monoklonalne przeciwciała anty-CLL-1, które pośredniczą w zależnej od dawki: cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC, complement – dependent cytotoxicity) oraz cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (ADCC, antibody – dependent cellular cytotoxicity) przeciwko liniom komórkowym AML. Przeciwciała te zostały skutecznie internalizowane po związaniu się z CLL-1 w komórkach HL-60, co spowodowało zmniejszenie rozmiaru guza u myszy implantowanych komórkami HL-60 (40,73).

Lu i wsp. opracowali bispecyficzne przeciwciało α CLL-1- α CD3, które rekrutuje cytotoksyczne limfocyty T przeciw komórkom CLL-1 dodatnim i wykazuje w warunkach *in vitro* i *in vivo* silną, selektywną cytotoksyczność wobec różnych linii komórkowych AML, jak również cytotoksyczność *ex vivo* wobec pierwotnych próbek pacjenta (74). Podobnie Leong i wsp. (36) opracowali bispecyficzne przeciwciało (TDB, T cel - dependent bispecific) anty-CD3/anty-CLL-1, które wykazało eliminację komórek białaczkowych CLL-1 dodatnich. Obecnie najbardziej zaawansowane są

prace nad bispecyficznym przeciwciałem MCLA-117, który charakteryzuje się 60-krotnie większym powinowactwem do CLL-1 niż do CD3. W testach cytotoksyczności z wykorzystaniem komórek T od zdrowych dawców oraz komórek nowotworowych AML, MCLA-117 indukowało zależną od antygeny CLL-1 aktywację komórek T, proliferację limfocytów T i lizę komórek docelowych (75,76).

Hutten i wsp. (77) natomiast, aby zapobiec postępowi choroby przyjęli strategię zwiększania obrony przeciwnowotworowej układu odpornościowego. Dowiedli, że CLL-1 na komórkach dendrytycznych może służyć jako wydajny nośnik do prezentacji antygeny w celu zwiększenia swoistej odpowiedzi immunologicznej limfocytów pomocniczych i cytotoksycznych przeciwko komórkom nowotworowym. Dla odmiany, Jiang i wsp. (78) stworzyli koniugat przeciwciała – lek, który wykorzystuje swoistość przeciwciała CLL-1, aby dostarczyć lek do komórek docelowych. Kompleks przeciwciała – lek (CLT030) wykazał silną skuteczność *in vivo* w modelach komórek AML oraz hamował wzrost guza w modelu heteroprzeszczepu pochodzącego od pacjenta AML.

Jednym z nowych podejść terapeutycznych o najwyższej skuteczności w leczeniu AML jest wykorzystanie transdukowanych limfocytów T w tzw. metodzie CAR-T. W celu wytworzenia chimerowego receptora antygeny (CAR), limfocyty T pacjenta modyfikuje się technikami inżynierii genetycznej, w efekcie czego powstaje transdukt, który umożliwia, niezależnie od głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC), celowanie w złośliwe komórki. Wiele grup badawczych (79,80,81,82) opracowało już i zoptymalizowało CLL-1 CAR-T dla AML wykazując skuteczną i swoistą aktywność przeciwbiałaczkową wobec linii komórkowych AML oraz wobec blastów pochodzących od pacjentów AML. CAR-T specyficzne dla CLL-1 selektywnie celuje w komórki nowotworowe zawierające na swej powierzchni epitop CLL-1.

Mając na względzie niejednorodność pacjentów z AML i MDS, niemożliwe jest, aby pojedyncze przeciwciała skierowane przeciw pojedynczemu antygenowi powierzchniowemu wyeliminowało LSC i aby osiągnięto ostateczny cel jakim jest wyleczenie AML lub w przypadku MDS zahamowanie progresji w AML (83,84,85). Tworzy się konstrukty CAR ukierunkowane jednocześnie na CLL-1 i CD33, w których to CLL-1 nakierowuje modyfikowane limfocyty T na komórki LSC, zaś CD33 na główną masę komórek białaczkowych w AML. Zachęcające są wyniki badania klinicznego u ludzi nad komórkami TCLEC12A-CD33 CAR (ICG136), w którym u 44-letniej pacjentki z oporną na leczenie AML, zastosowano konstrukty limfocytów T. Chora osiągnęła ujemny wynik MRD, a następnie przeszła allogeniczny przeszczep krwiotwórczych komórek macierzystych (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; allo-HSCT) pozostając w całkowitej remisji (75,86).

Nowatorskie terapie mogą być pomocne jako pomost przed przeszczepem, uzupełnienie chemioterapii lub jako samodzielna terapia, szczególnie dla pacjentów z oporną na leczenie AML (65,88).

2 CEL PRACY

Celem niniejszej pracy były:

- a) identyfikacja parametrów do monitorowania komórek CD34+CD38-CLL-1+ w szpiku kostnym metodą MFC
- b) ocena związku komórek o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1+ w szpiku kostnym pacjentów z AML i MDS z:
 - wybranymi danymi morfologiczno – klinicznymi
 - rokowaniem

3 MATERIAŁ I METODY

Grupę badaną stanowiło 52 pacjentów leczonych w Klinice Hematologii Dorosłych z Oddziałem Transplantacji Szpiku SPSK1 PUM w Szczecinie, u których w okresie od marca 2018 r. do marca 2020 r. rozpoznano AML lub MDS. Rozpoznanie ustalono na podstawie badań: morfologicznych, cytochemicznych, immunofenotypowych, cytogenetycznych i/lub molekularnych, zgodnie z klasyfikacją WHO 2016. Badanie przeprowadzono na próbkach szpiku kostnego, które stanowiły nadmiar materiału wykorzystywanego w ramach procesu diagnostycznego w Zakładzie Patomorfologii SPSK1 PUM w Szczecinie w latach 2018 - 2020. W każdym przypadku, materiał badany stanowił 1 mL szpiku kostnego pobranego do probówki z antykoagulantem EDTA. Próbkę do analizy metodą MFC przetworzono w ciągu 24 godzin po pobraniu. Wszyscy pacjenci zostali poinformowani o charakterze badawczym projektu i wyrazili pisemną świadomą zgodę na udział w badaniu. Projekt badania został zatwierdzony przez Komitet ds. Etyki Badań w Pomorskim Uniwersytecie Medycznym w dniu 18.12.2017 r.

Grupę badaną stanowiło 52 pacjentów. Podstawowe dane kliniczne całej grupy badanej przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7. Podstawowe dane kliniczne całej grupy badanej

liczba pacjentów	52
płeć kobieta/mężczyzna	25/35
wiek średnia (zakres)	70 (33 -89)
WBC 10⁹ L średnia (zakres)	58 (1,5 – 394)

Spośród 52 prospektywnie zebranych prób szpiku kostnego zidentyfikowano 27 pacjentów z AML *de novo*, 5 pacjentów na etapie AML całkowitej remisji oraz 20 pacjentów z MDS. W Tabeli 8 przedstawiono dane kliniczne w odniesieniu do poszczególnych podgrup grupy badanej.

Tabela 8. Podstawowe dane kliniczne poszczególnych podgrup grupy badanej

	AML	AML-CR	MDS
liczba pacjentów	27	5	20
płeć kobieta/mężczyzna	13/14	4/1	8/20
wiek średnia (zakres)	70 (42 -88)	54 (33- 74)	73 (64 – 89)
WBC 10⁹ L średnia (zakres)	55 (1,5 – 251)	55 (5,1 – 129)	68 (5 – 394)

Charakterystykę pacjentów z AML przedstawiono w Tabeli 9, pacjentów z AML – CR w Tabeli 10, pacjentów z MDS w Tabeli 11.

Tabela 9. Charakterystyka pacjentów AML grupy badanej

Liczba pacjentów	27
Cytogenetyczne grupy ryzyka wg ELN 2017	n (%)
korzystne	2 (7,4)
pośrednie	13 (48,1)
niekorzystne	12 (44,4)
Klasyfikacja AML	n (%)
AML z powtarzalnymi nieprawidłowościami cytogenetycznymi	
AML t(8,21)	1 (3,7)
AML z cechami zależnymi od mielodysplazji	
AML poprzedzona zespołem MDS	14(51,8)
Nowotwory mieloidalne zależne od terapii	
Nowotwór MDS/MPN	5 (18,5)
AML, NOS	
AML bez cech dojrzewania	1 (3,7)
AML z cechami dojrzewania	3 (11,1)
AML mielomonocytoza	2 (7,4)
AML monoblastyczno-monocytoza	1 (3,7)

Tabela 10. Charakterystyka pacjentów AML-CR grupy badanej

Liczba pacjentów	5
Cytogenetyczne grupy ryzyka wg ELN 2017	n (%)
korzystne	4 (80)
pośrednie	1 (20)
Klasyfikacja AML	n (%)
AML z powtarzalnymi nieprawidłowościami cytogenetycznymi	
AML t(8,21)	1 (20)
APL	1 (20)
AML z cechami zależnymi od mielodysplazji	
AML poprzedzona zespołem MDS	1(20)
AML, NOS	
AML z cechami dojrzewania	1(20)
AML mielomonocytoza	1(20)

Tabela 11. Charakterystyka pacjentów MDS grupy badanej

Liczba pacjentów	20
Grupy ryzyka wg IPSS	n (%)
niskie	7 (35)
pośrednie-1	4 (20)
pośrednie-2	9 (45)
Klasyfikacja MDS	n (%)
MDS-RS-SLD	3 (15)
MDS-RS-MLD	5 (25)
MDS-EB1, MDS z obecnością blastów 5-9%	4 (20)
MDS-EB2, MDS z obecnością blastów 10-19%	5 (25)
MDSu, MDS nieklasyfikowany	3 (15)

Zestawienie podstawowych danych klinicznych grupy kontrolnej przedstawia Tabela 12.

Tabela 12. Podstawowe dane kliniczne grupy kontrolnej

liczba pacjentów	13
płeć kobieta/mężczyzna	6/7
wiek średnia (zakres)	65 (38-83)
WBC 10⁹ L średnia (zakres)	70 (6-261)

Grupę kontrolną stanowiło 13 pacjentów, wśród których u 11 pacjentów na podstawie badań (cytologicznych, cytogenetycznych, histopatologicznych i immunofenotypowych) wykluczono MDS i AML oraz 2 pacjentów z rozpoznaniem AML, u których populacja komórek o fenotypie CD34+ stanowiła mniej niż 1%. Literatura podaje, iż w AML o poziomie ekspresji CD34+ <1%, populacja komórek o fenotypie CD34+ ma nienowotworowe pochodzenie i może służyć jako kontrola do oznaczania komórek CD34+CD38-CLL-1+ (35). Charakterystykę grupy kontrolnej przedstawia Tabela 13.

Tabela 13. Charakterystyka grupy kontrolnej

Liczba pacjentów	13
Rozpoznanie:	n(%)
Wykluczono MDS i AML>1% CD34	6 (46)
Małopłytkowość	2 (15)
Chłoniak T bez naciekania szpiku	1 (8)
Chłoniak DLBCL bez naciekania szpiku	2 (15)
AML <1% CD34	2 (15)

3.1 Obliczanie liczby WBC

Liczbę białych krwinek w badanych próbach obliczono manualnie z użyciem komory Bürkera po wcześniejszym wybarwieniu komórek odczynnikiem Türka. W celu wybarwienia leukocytów zastosowano mieszaninę: 50 μL badanego szpiku z 950 μL odczynnika Türka. Po wymieszaniu i 3-minutowej inkubacji naniesiono 10 μL uzyskanej mieszaniny do komory Bürkera, a następnie zliczano wybarwione komórki w mikroskopie świetlnym. Uzyskany wynik mnożono przez zastosowane rozcieńczenie uzyskując pożądaną liczbę WBC w 1 μL szpiku (49).

3.2 Konfiguracja cytometru

Powtarzalną konfigurację cytometru FACSCanto™ II Becton Dickinson (rok produkcji 2011), uzyskano postępując zgodnie z procedurą BD OneFlow™ Assays zalecaną przez konsorcjum EuroFlow (89,90). Do ustawienia linii bazowej cytometru, a następnie do wykonywania codziennej kontroli jakości cytometru, posłużyły kulki CS&T IVD (#656047, Becton Dickinson). Napięcia na fotopowielaczach oraz docelowe wartości MFI dla każdego z fluorochromów uzyskano stosując kulki BD OneFlow™ Setup Beads (#658620, Becton Dickinson). Konsorcjum EuroFlow określiło zestaw docelowych zakresów MFI dla każdego fluorochromu. Główne piki fluorescencji dla każdego z użytych fluorochromów ustawiono przy zastosowaniu BD™FC Beads 8-Color Kit for BDOneFlow™ Assays (#658621, Becton Dickinson). Do ustawienia napięć dla rozpraszania światła forward scatter (FSC) i side scatter (SSC) użyto zlizowaną, przepłukaną krew obwodową.

3.3 Procedura barwienia

Pobrano szpik kostny płukano dwukrotnie w buforze BD CellWASH (#349524, Becton Dickinson), odwirowano 10 min w temp. pokojowej przy 550 obrotów/min, po czym odrzucono supernatant. Zgodnie z zaleceniami grupy EuroFlow (90) w celu identyfikacji AML zastosowano czteroprobówkowy panel przeciwciał skoniugowanych z fluorochromami (w każdej próbówce osiem różnych przeciwciał skoniugowanych z ośmioma różnymi fluorochromami: FITC, PE, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC, APC-H7, Pacific Blue, Pacific Orange) (Tabela 14). Do przygotowanych próbek dodano po 30 µL materiału badanego (tj. przepłukanego szpiku kostnego), po czym inkubowano z przeciwciałami (w ciemności, w temp. pokojowej). Po upływie 20 min każdą próbkę dopełniono do 2 mL buforu lizującego FACS Lysing Solution (#349202, Becton Dickinson) i ponownie inkubowano 10 min (w ciemności, w temp. pokojowej). Kolejno materiał odwirowano (550 obrotów/min przez 10 min w temp. pokojowej), usunięto supernatant i dodano 1,5 mL buforu Cell Wash. Materiał odwirowano (10 min, 550 obrotów/min, temp. pokojowa) odsączono supernatant i dodano 0,5 mL FACSFlow (#342003, Becton Dickinson). Komórki tak przygotowanego szpiku kostnego analizowano w cytometrze przepływowym BD FACS Canto II wyposażonym w trzy lasery: L1-Solid State o długości fali 488 nm, L2-HeNe o długości fali 633 nm oraz L3-Solid State o długości fali 405 nm.

Tabela 14. Panel przeciwciał wykorzystany do diagnostyki AML¹

Przeciwciała								
	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	PB	PO
1	<i>anty - CD16</i>	<i>anty - CD13</i>	<i>anty - CD34</i>	<i>anty - CD117</i>	<i>anty - CD11b</i>	<i>anty - CD10</i>	<i>anty - HLADR</i>	<i>anty - CD45</i>
2	<i>anty - CD35</i>	<i>anty - CD64</i>	<i>anty - CD34</i>	<i>anty - CD117</i>	<i>anty - IREM</i>	<i>anty - CD14</i>	<i>anty - HLADR</i>	<i>anty - CD45</i>
3	<i>anty - CD36</i>	<i>anty - CD105</i>	<i>anty - CD34</i>	<i>anty - CD117</i>	<i>anty - CD33</i>	<i>anty - CD71</i>	<i>anty - HLADR</i>	<i>anty - CD45</i>
4	<i>anty - CD15</i>	<i>anty - CD56</i>	<i>anty - CD34</i>	<i>anty - CD117</i>	<i>anty - CD7</i>	<i>anty - CD19</i>	<i>anty - HLADR</i>	<i>anty - CD45</i>

Po przeanalizowaniu powyższych prób w programie BDFASCDiva™Software version 8.0. i ustaleniu rozpoznania AML lub MDS w celu dalszego oznaczenia komórek LSC przystąpiono do barwienia i pomiaru dwóch dodatkowych próbek. W próbówce 5 umieszczono przeciwciała skierowane przeciw badanym antygenom CLL-1, CD34 i CD38, natomiast w próbówce 6 umieszczono odpowiadające im kontrole izotypowe (Tabela 15). Zastosowane w próbówce 6 przeciwciała miały

identyczne izotypy oraz skoniugowane były z identycznymi fluorochromami, co przeciwiła w próbce badanej. Komórki wykazujące silniejszą fluorescencję od kontroli izotypowej to znaczy ujemnej, zostały sklasyfikowane jako dodatnie.

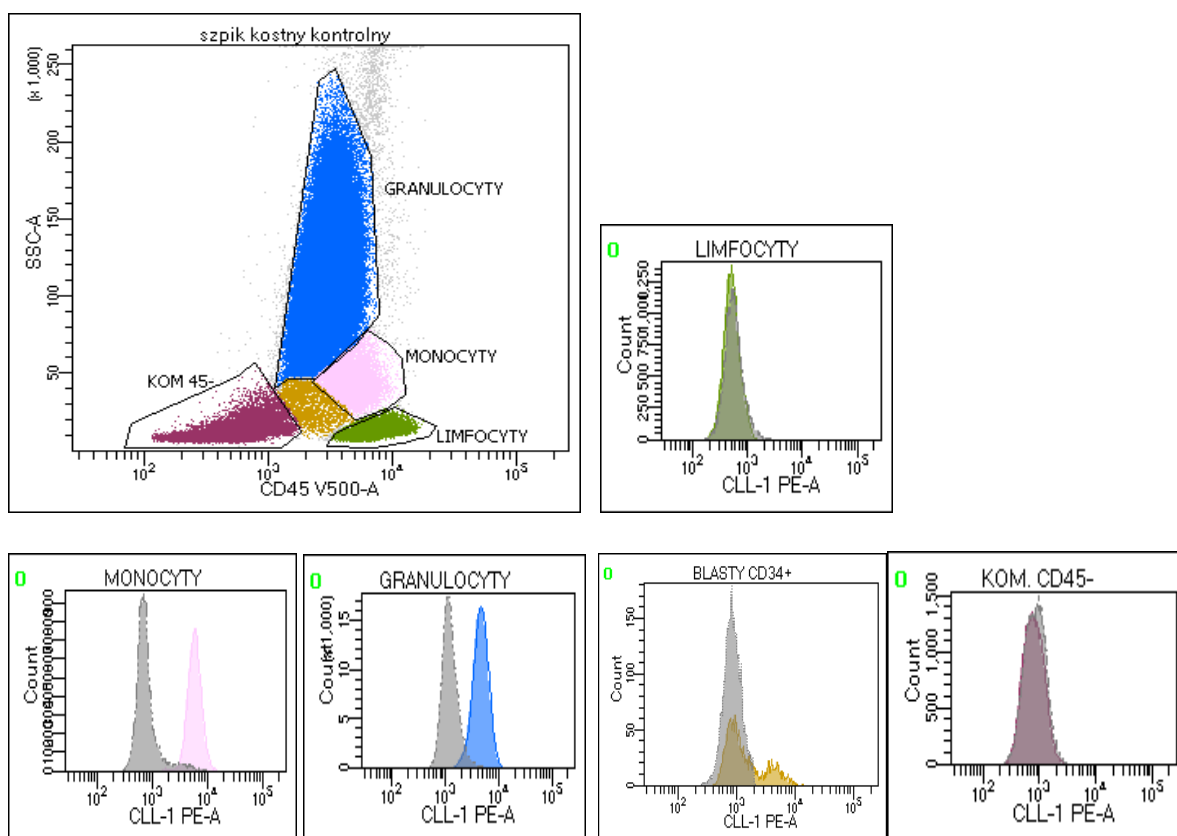
Tabela 15. Panel przeciwciał wykorzystany do detekcji komórek LSC¹

	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	PB	PO
5	SYTO16	anty - CLL-1	anty - CD34	-	-	anty - CD38	-	anty - CD45
6	SYTO16	anty - IgG2a	anty - IgG1	-	-	anty - IgG1	-	anty - CD45

¹Przeciwiła skoniugowane z fluorochromem FITC w zakresie fali lasera L1: anty - CD16 (klon CLBFCRgm/15D2, #M1604, Sanquin Plesmanlaan Amsterdam) oraz anty - CD36 (klon CLB-IVC7, #M1613, Sanquin Plesmanlaan Amsterdam), anty - CD35 (klon E1,1 #555452, Becton Dickinson) oraz anty - CD15 (klon MMA, #332778, Becton Dickinson) i SYTO16 (FITC, #S7578, Thermo Fisher). Przeciwiła skoniugowane z fluorochromem PE w zakresie fali lasera L1: anty - CD13 (klon L138, #347406, Becton Dickinson), anty - CD64 (klon 10,1, #4276682, Becton Dickinson), anty - CD105 (klon1G2, Beckman Coulter), anty - CD56 (klon C5.9, #MBS396540, MyBioSource), anty - CD371(CLL-1) (klon 50C1 562566, Becton Dickinson), Isotype control anty - IgG2a,K (klon G155-178 #554648 Becton Dickinson). Przeciwiła skoniugowane z fluorochromem PerCP-Cy5,5 w zakresie fali lasera L1: anty - CD34 (klon 8G12, #347222, Becton Dickinson), Isotype control anty - IgG1, K (klon X40, #347202, Beckman Dickinson). Przeciwiła skoniugowane z fluorochromem PE-Cy7 w zakresie fali lasera L1: anty - CD117 (klon 104D2D1, #B49221 Beckman Coulter). Przeciwiła skoniugowane z fluorochromem APC w zakresie fali lasera L2: anty - CD11b (klon D12, #333143, Becton Dickinson), anty - CD33 (klon P67.6, #345800, Becton Dickinson), anty - IREM (klon UP-H2, #656158, Becton Dickinson), anty - CD7 (klon BIO124-1D1, #17-0079-42, eBioscience). Przeciwiła skoniugowane z fluorochromem APC-H7 w zakresie fali lasera L2: anty - CD10 (klon HI10a, #655404, Becton Dickinson), anty - CD14 (klon Mp9, #641394, Becton Dickinson), anty - CD71 (klon M-A712, #655408, Becton Dickinson), anty - CD19(klon SJ25C1, #641395, Becton Dickinson), Isotype control anty - IgG1,K (klon X40, #561427, Becton Dickinson). Przeciwiła skoniugowane z fluorochromem Pacific Blue w zakresie fali lasera L3: anty - HLA-DR (klon L243, #307633, BioLegend). Przeciwiła skoniugowane z fluorochromem Pacific Orange/V500C w zakresie fali lasera L3: anty - CD45 (klon 2D1, #655873, Becton Dickinson).

3.4 MFI antygenu CLL-1

Celem określenia, w których populacjach komórek szpiku kostnego występuje ekspresja antygenu CLL-1, oraz które komórki szpiku kostnego mogą posłużyć jako negatywna kontrola wewnętrzna dla badanego antygenu CLL-1, używając cytogramu SSC/CD45, zabramkowano główne populacje komórek (91), po czym obliczono ich wartość MFI (mean fluorescence intensity; MFI) względem antygenu CLL-1 przyrównując je do wartości MFI kontroli izotypowej CLL-1 (92). Następnie zilustrowano MFI antygenu CLL-1 badanych populacji w porównaniu do MFI izotypu CLL-1 (kolor szary) dla tych samych populacji (Rycina 1).



Rycina 1. MFI antygenu CLL-1 głównych populacji komórek szpiku kostnego przyrównane do MFI antygenu CLL-1 kontroli izotypowej

Zarówno populacja limfocytów, jak i populacja komórek CD45- może posłużyć jako ujemna kontrola wewnętrzna dla antygenu CLL-1. Dane te nawiązują do testów hodowli komórkowych przeprowadzonych przez grupę van Rhenen i wsp. (39), w których z populacji CLL-1+ wyhodowano kolonie monocytowe i granulocytowe. W przeciwieństwie do nich z komórek CLL-1- wyhodowano kolonie erytroidalne i megakariocytowe. Larsen i wsp. (92) dowiedli natomiast, iż ekspresja CLL-1 nie występuje na komórkach limfatycznych. W niniejszej pracy z powodów technicznych (łatwiejszego wyodrębnienia populacji limfocytów niż rejonu CD45- w populacji komórek szpiku z AML) zdecydowano, iż limfocyty będą służyć jako kontrola ujemna względem populacji CLL-1+.

3.5 Strategia bramkowania komórek o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1+

W celu identyfikacji komórek o profilu CD34+CD38-CLL-1+ zastosowano strategię bramkowania pokazaną na Rycinie 2 (A – L).

A. W bramce P1 na wykresie FSC-H i FSC-A (odpowiednio: wysokość pików i pole powierzchni pod pikiem dla detektora rozproszenia światła pod niewielkim kątem tzw. „w przód”) zaznaczono grupę komórek najbardziej jednorodną dzięki czemu wykluczono częściowo, tzw. debris oraz zlepki komórek (49).

B. W celu wyodrębnienia komórek żywych od pozostałych zastosowano barwnik fluorescencyjny Syto16, jako wrażliwy dyskryminator żywych i martwych leukocytów. Syto16 należy do barwników witalnych, które łączą się z nieuszkodzonymi kwasami nukleinowymi komórki wykazując wówczas silną fluorescencję (93). Zgodnie z powyższym, komórki o wysokiej ekspresji SYTO16 zdefiniowano jako żywe (bramka P2).

C. Na wykresie rozproszenia SSC/FSC zaznaczono populację komórek P3 wykluczającą komórki jednocześnie ziarniste i bardzo małe (SSC wysokie/FSC niskie) celem wyeliminowania pozostałych szczątków i martwych komórek (49).

D. Na wykresie rozproszenia SSC do CD38 wykluczono z dalszej analizy komórki o bardzo wysokiej ekspresji antygenu CD38, identyfikując je jako plazmocyty (komórki poza bramką P4) (94,95).

E. Wykres SSC do CD45 posłużył do zidentyfikowania limfocytów (kolor zielony). Limfocyty służyły jako negatywna kontrola wewnętrzna względem ekspresji CLL-1 (92,96).

F. F1. Zgodnie z kontrolą izotypową dla przeciwciała CD34 (F1), zaznaczono bramkę z dodatnimi zdarzeniami CD34 (F), klasyfikując je jako blasty.

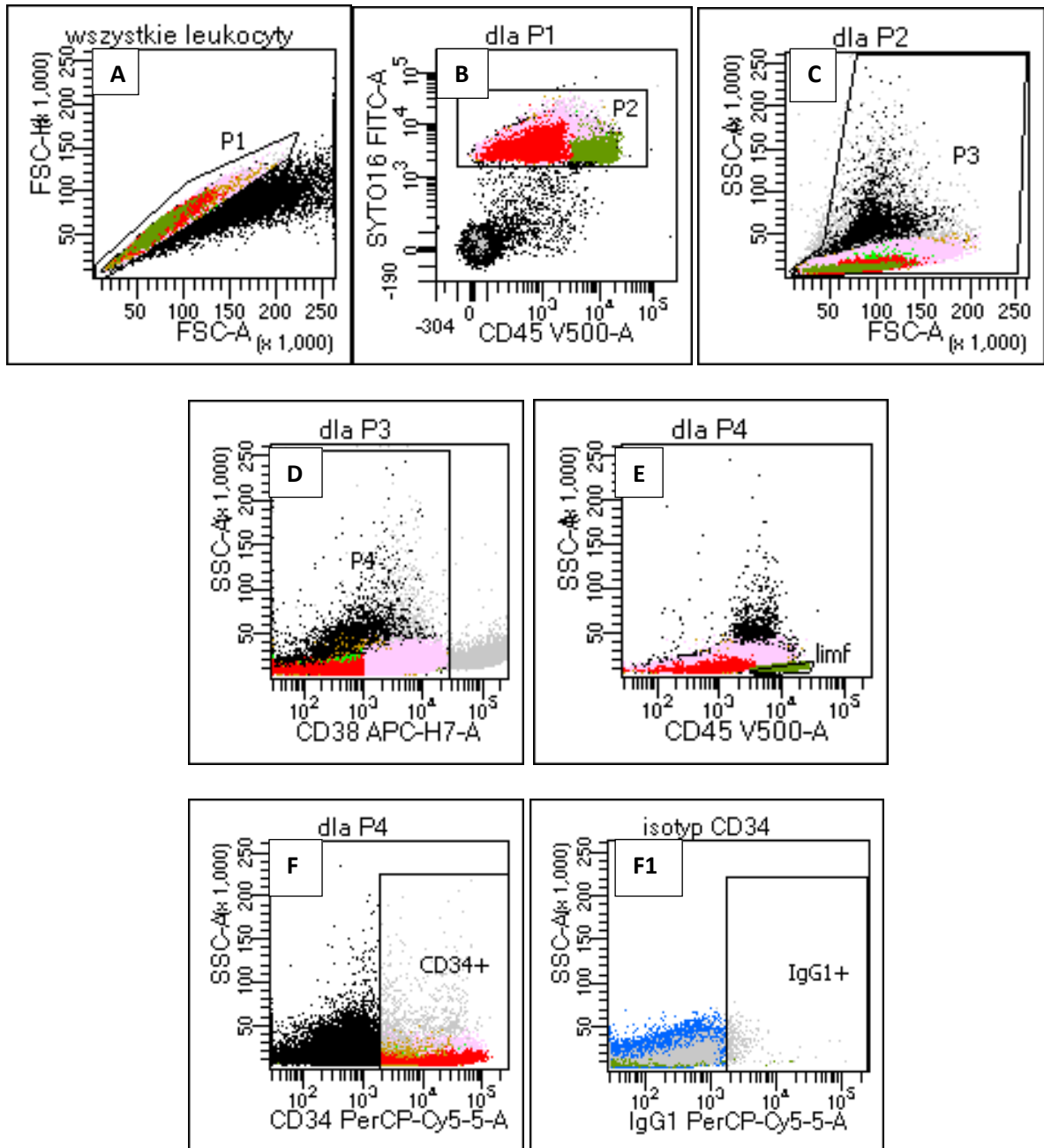
G. Komórki populacji CD34+ wstecznie bramkowano na wykresie rozproszenia FSC/SSC, aby zapewnić jednorodną właściwość rozproszenia światła zdefiniowanej populacji. Wzięto pod uwagę, iż FSC/SSC dla komórek CD34+ jest nieznacznie wyższy od małych limfocytów – bramkę ustawiono biorąc pod uwagę ułożenie limfocytów (bramka P5) przesuując nieco w przód (97,98).

H. H1. W wyselekcjonowanej populacji CD34+/CD45dim/niskie-SSC przy użyciu odpowiedniej dla przeciwciała kontroli izotypowej (H1), bramkowano komórki względem CLL-1 (H).

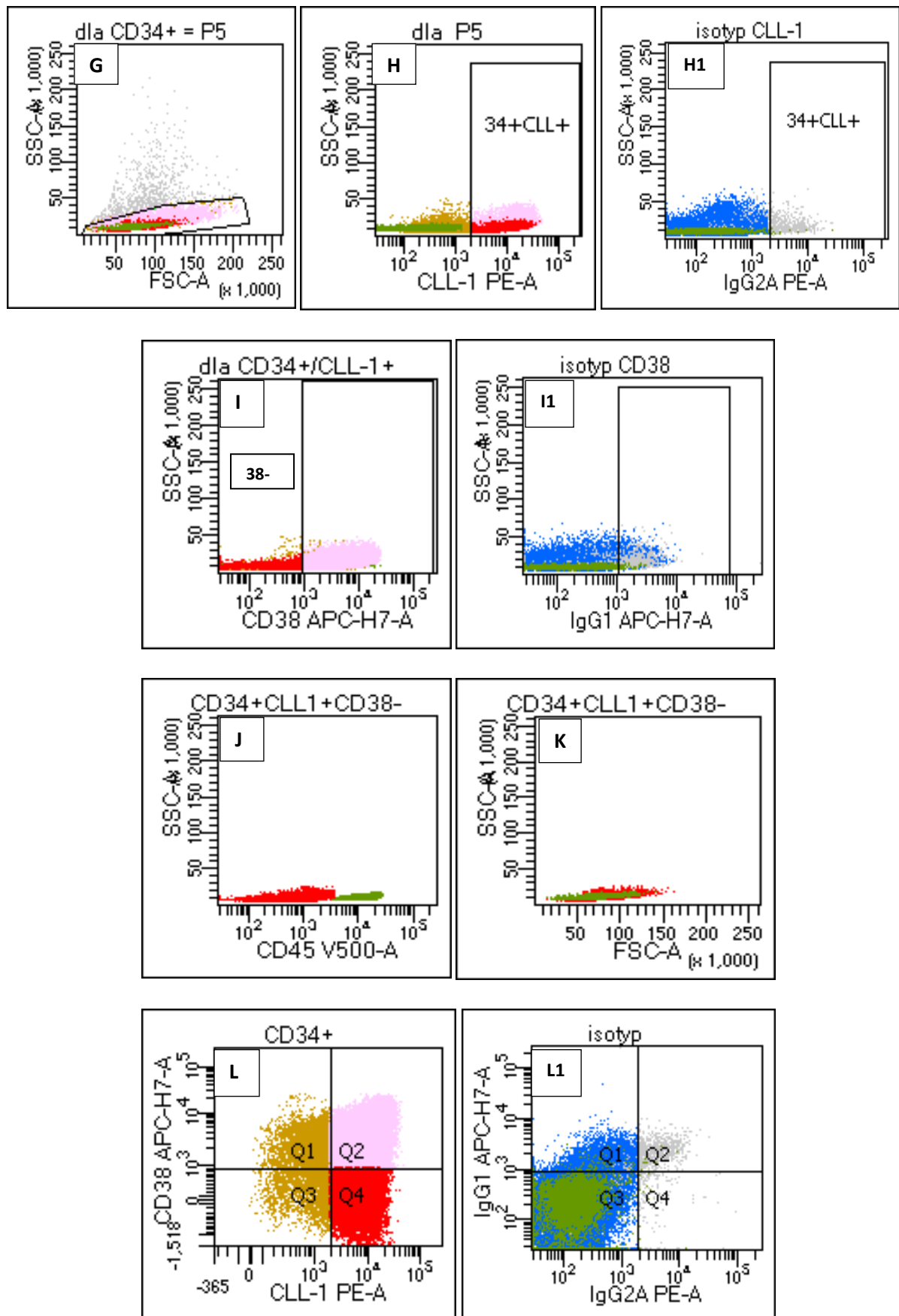
I. I1. W populacji CD34+/CD45dim/niskie-SSC/CLL-1+ wyselekcjonowano komórki CD38-. W związku z tym, iż nie ma wiarygodnej kontroli negatywnej dla przeciwciała CD38, w projekcie zastosowano stały punkt odcięcia równy 10^3 (49,89).

J. K. Ponownie zastosowano wsteczne bramkowanie dla wykresów SSC/CD45 i SSC/FSC, celem sprawdzenia położenia interesującej populacji: CD34+/CD45dim/niskie-SSC/CLL-1+/CD38- i ewentualnego skorygowania rozproszonych komórek (59).

L. L1. Wzór ekspresji komórek CD34+/CD45dim/niskie-SSC na wykresie CD38/CLL-1 oraz analogicznie wzór izotypów dla tych przeciwciał. Prawy dolny kwadrant (kolor czerwony) stanowią komórki CD34+CD38-CLL-1+.

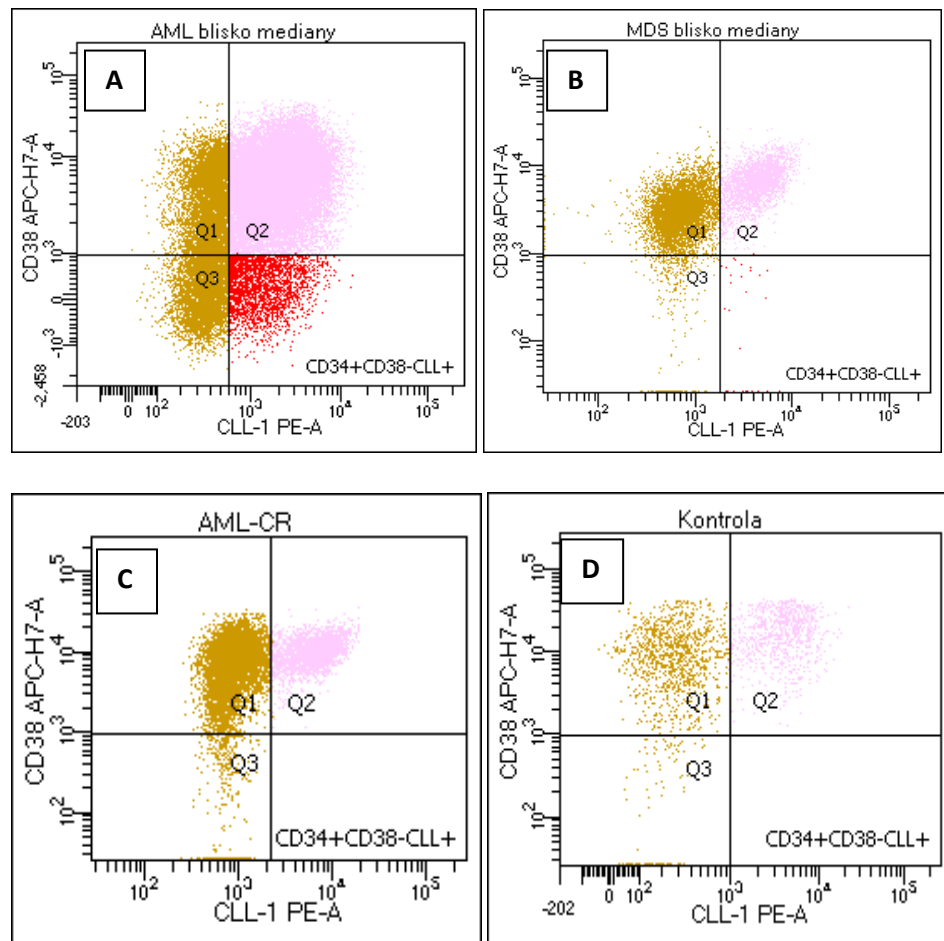


Rycina 2. Strategia bramkowania komórek CD34+CD38-CLL-1+



Rycina 2. Strategia bramkowania komórek CD34+CD38-CLL-1+ (cd.)

Przykładowe wzory ekspresji komórek CD34+CD38-CLL-1+, w odniesieniu do liczby badanych komórek w 1 μ L szpiku kostnego, w badanych jednostkach chorobowych przedstawiono na Rycinie 3.



Rycina 3. Przykładowe wzory ekspresji komórek CD34+CD38-CLL-1+, w odniesieniu do liczby badanych komórek w 1 μ L szpiku kostnego. Prawy dolny kwadrant (kolor czerwony) stanowią komórki CD34+CD38-CLL-1+. **A.** Przypadek AML **B.** Przypadek MDS, **C.** Przypadek AML-CR, brak komórek CD34+CD38-CLL-1+, **D.** Przypadek kontrolny, brak komórek CD34+CD38-CLL-1+

3.6 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną oraz opracowanie graficzne uzyskanych wyników wykonano przy użyciu programu statystycznego STATA 11 nr licencji 30110532736 oraz Microsoft Excel. Analizę przypadków oparto na klasyfikacji WHO z 2016 roku.

Do oceny normalności rozkładów posłużył test Kołmogorowa - Smirnowa. Z uwagi na fakt, iż rozkład danych nie był zgodny z rozkładem normalnym, zastosowano nieparametryczne analizy statystyczne. Do porównań między dwiema zmiennymi w zakresie badanych grup: AML, MDS, AML-CR i grupy kontrolnej użyto testu Manna - Whitney'a. Ponieważ w grupie AML podgrupa badana AMLg wystąpiła w pojedynczym przypadku, nie uwzględniono jej w analizie statystycznej i na wykresach graficznych. AMLg zanalizowano natomiast jako odrębnie prezentowany przypadek, ponieważ dysponowano wystarczającą liczbą badań szpiku kostnego. W próbach powtarzających się obliczono korelację danego parametru z przebiegiem choroby za pomocą testu Korelacji rang Spearmana. Test χ^2 Pearsona posłużył do sprawdzenia różnic wieku pacjentów w całej grupie badanej. Za różnice istotne statystycznie we wszystkich przeprowadzonych testach uznano te, dla których prawdopodobieństwo wyniosło $p < 0,05$. Poziom istotności $p = 0,051 - 0,099$ oznaczono jako trend na granicy istotności statystycznej.

4 WYNIKI

4.1 Analiza cytometryczna grupy kontrolnej pod względem badanych parametrów

Do grupy kontrolnej (n=13) zakwalifikowano pacjentów, u których zostały wykluczone AML lub MDS (n=11) oraz pacjentów z AML z odsetkiem blastów CD34+ <1% (n=2). Wartości mediany, dolny (Q25) i górny (Q75) kwartył oraz istotność statystyczną dla poszczególnych zmiennych przedstawiono w Tabeli 16.

Tabela 16. Porównanie podgrup w grupie kontrolnej

	Zmienna	N	Q25	Mediana	Q75	p
grK	Wiek	11	55	63	80	0,7669
grK AML CD34+ <1%		2		66,5		
grK	WBC	11	31400	45330	60440	0,0484
grK AML CD34+ <1%		2		176600		
grK	CD34+ (% total)	11	0,44	0,50	0,81	0,0299
grK AML CD34+ <1%		2		0,08		
grK	CD34+CD38- (% total)	11	0,04	0,07	0,08	0,6930
grK AML CD34+ <1%		2		0,05		
grK	CD34+CD38- (% blastów CD34+)	11	6,55	10,75	12,05	0,0299
grK AML CD34+ <1%		2		70,61		
grK	CD34+CD38-CLL-1+/WBC	11	0	0	0	--
grK AML CD34+ <1%		2		0		
grK	CD34+CD38-CLL-1+ (% total)	11	0	0	0	--
grK AML CD34+ <1%		2		0		
grK	CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+)	11	0	0	0	--
grK AML CD34+ <1%		2		0		
grK	MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+	11	0	0	0	--
grK AML CD34+ <1%		2		0		
grK	MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-	11	1,37	1,56	2,54	0,4298
grK AML CD34+ <1%		2		1,71		
grK	MFI CLL-1 komórek CD34+CD38+	11	3,94	8,62	9,74	0,1671
grK AML CD34+ <1%		2		20,72		
grK	FSC/limf CD34+CD38-CLL-1+	11	0	0	0	--
grK AML CD34+ <1%		2		0		
grK	SSC/limf CD34+3CD8-CLL-1+	11	0	0	0	--
grK AML CD34+ <1%		2		0		
grK	FSC/limf CD34+CD38-CLL-1-	11	1,27	1,32	1,53	1,0000
grK AML CD34+ <1%		2		1,37		
grK	SSC/limf CD34+CD38-CLL-1-	11	1,55	1,77	1,99	0,6930
grK AML CD34+ <1%		2		1,84		

Opis wyników dla każdego z parametrów:

Wiek: pacjenci w grupie kontrolnej wykazują jednorodność w zakresie analizowanego parametru.

WBC: pacjenci z AML CD34+ <1% wykazują statystycznie istotnie wyższy poziom WBC w porównaniu do pacjentów, u których wykluczono MDS oraz AML z CD34+ >1%.

CD34+ (% total): pacjenci z AML CD34+ <1% posiadają statystycznie istotnie niższy poziom ekspresji CD34+ (% total) w porównaniu do pacjentów, u których wykluczono MDS oraz AML CD34+ >1%.

CD34+CD38- (% total): pacjenci w grupie kontrolnej wykazują jednorodność w zakresie analizowanego parametru.

CD34+/CD38- (% blastów CD34+): pacjenci z AML CD34+ <1% posiadają statystycznie istotnie wyższy poziom CD34+CD38- (% blastów CD34+) w porównaniu z pacjentami, u których wykluczono MDS oraz AML CD34+ >1%.

CD34+CD38-CLL-1+/WBC: u pacjentów z grup kontrolnych wykazano brak komórek CD34+CD38-CLL-1+, co uniemożliwiło obliczenie analizowanego parametru.

CD34+CD38-CLL-1+ (% total): pacjenci z grup kontrolnych wykazywali brak komórek CD34+CD38-CLL-1+, co uniemożliwiło obliczenie analizowanego parametru.

CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+): pacjenci z grup kontrolnych wykazywali brak komórek CD34+CD38-CLL-1+, co uniemożliwiło obliczenie analizowanego parametru.

MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+: pacjenci z grup kontrolnych wykazywali brak komórek CD34+CD38-CLL-1+, co uniemożliwiło obliczenie analizowanego parametru.

MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-: pacjenci w grupie kontrolnej wykazywali jednorodność w zakresie analizowanego parametru.

MFI CLL-1 komórek CD34+CD38+: pacjenci w grupie kontrolnej wykazywali jednorodność w zakresie analizowanego parametru.

FSC/limf CD34+CD38-CLL-1+: pacjenci z grup kontrolnych wykazywali brak komórek CD34+CD38-CLL-1+, co uniemożliwiło obliczenie analizowanego parametru.

SSC/limf CD34+CD38-CLL-1+: pacjenci z grup kontrolnych wykazywali brak komórek CD34+CD38-CLL-1+, co uniemożliwiło obliczenie analizowanego parametru.

FSC/limf CD34+CD38-CLL-1-: pacjenci w grupie kontrolnej wykazywali jednorodność w zakresie analizowanego parametru.

SSC/limf CD34+CD38-CLL-1-: pacjenci w grupie kontrolnej wykazywali jednorodność w zakresie analizowanego parametru.

Wniosek:

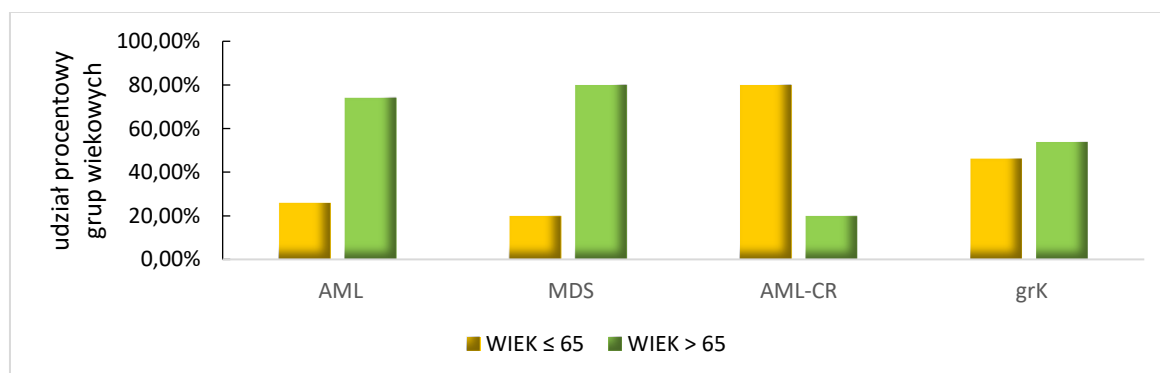
Ze względu na brak różnic istotnych statystycznie w większości analizowanych parametrów, a w szczególności ze względu na brak komórek o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1+ w obrębie podgrup w grupie kontrolnej, do rozważań nad populacją komórek CD34+CD38-CLL-1+ postanowiono zakwalifikować przypadki z AML CD34+ <1%, łącznie z przypadkami, wśród których wykluczono MDS i AML. Różnice istotne statystyczne, dotyczące odsetka komórek CD34+ (% total) wynikają z istoty choroby AML CD34+ <1%. U pacjentów z grupy kontrolnej AML CD34+ <1%, wyższy odsetek komórek niszowych z ekspresją CD34+CD38- (które znajdują się wśród 1% blastów CD34+) wynika z istoty choroby – AML jest chorobą agresywną, podobny obraz uzyskali Plesa i wsp. 2017 (99). Liczba WBC może być zmienna, jednak znacznie częściej jest wyższa u pacjentów z AML, w porównaniu z pacjentami u których wyklucza się AML (8).

4.2 Obecność komórek o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1+ a wiek pacjentów

W celu sprawdzenia czy pacjenci z grupy badanej oraz grupy kontrolnej różnią się pod względem wieku przeprowadzono test Chi² Pearsona. Pacjentów podzielono na dwie grupy gdzie wartością odcięcia był wiek 65 lat. Tabela 17, Rycina 4 przedstawiają uzyskane wyniki.

Tabela 17. Udział procentowy poszczególnych grup wiekowych w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej

	WIEK ≤ 65		WIEK > 65		Razem
AML	7	25,93%	20	74,07%	27
MDS	4	20,00%	16	80,00%	20
AML-CR	4	80,00%	1	20,00%	5
grK	6	46,15%	7	53,85%	13
Razem	21		44		65
Chi ² Pearsona	8,23		df=3		p=0,0415



Rycina 4. Udział procentowy poszczególnych grup wiekowych w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej

Wniosek: w grupie badanej z AML oraz z MDS stwierdza się statystycznie wyższy odsetek osób starszych niż w grupie z AML-CR i grupie kontrolnej.

- **Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+, w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), a wiek pacjentów**

Tabela 18, Rycina 5 przedstawiają rozkład komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w odniesieniu do wieku w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 18. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej a wiek pacjentów

	WIEK	CD34+CD38-CLL-1+ (% total)				
		N	Q25	Mediana	Q75	p
AML	≤ 65	7	0,00	0,02	6,73	n.s.
AML	> 65	20	0,04	0,22	1,55	
MDS	≤ 65	4	0,00	0,00	0,01	n.s.
MDS	> 65	16	0,00	0,00	0,01	
AML-CR	≤ 65	4	0,00	0,00	0,00	--
AML-CR	> 65	1	0,00	0,00	0,00	
grK	≤ 65	6	0,00	0,00	0,00	--
grK	> 65	7	0,00	0,00	0,00	



Rycina 5. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej a wiek pacjentów

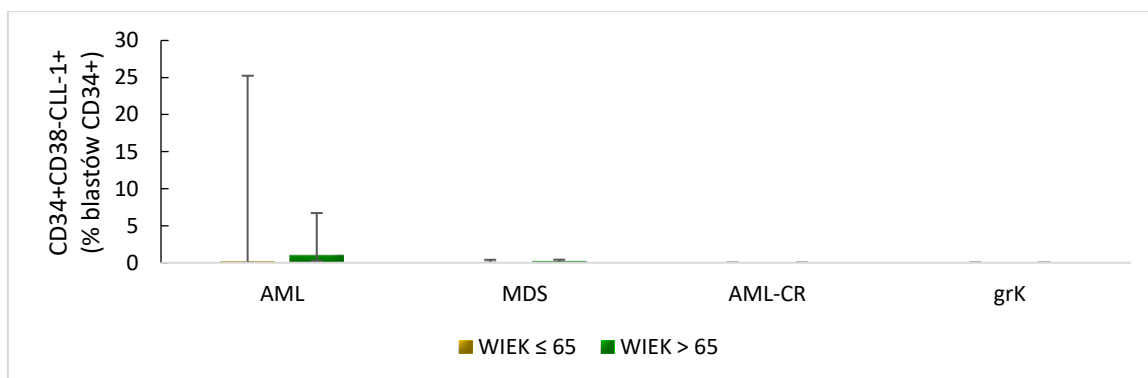
Wniosek: nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności między wiekiem pacjentów a odsetkiem komórek o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1+ (% total) zarówno w grupie badanej jak i grupie kontrolnej.

- **Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+, w odniesieniu do odsetka blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), a wiek pacjentów**

Tabela 19, Rycina 6 przedstawiają odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) względem wieku w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 19. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej a wiek

	WIEK	CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+)				
		N	Q25	Mediana	Q75	p
AML	≤ 65	7	0,00	0,19	25,24	n.s.
AML	> 65	20	0,25	1,01	6,71	
MDS	≤ 65	4	0,02	0,08	0,40	n.s.
MDS	> 65	16	0,02	0,20	0,42	
AML-CR	≤ 65	4	0,00	0,00	0,00	--
AML-CR	> 65	1	0,00	0,00	0,00	
grK	≤ 65	6	0,00	0,00	0,00	--
grK	> 65	7	0,00	0,00	0,00	



Rycina 6. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej a wiek

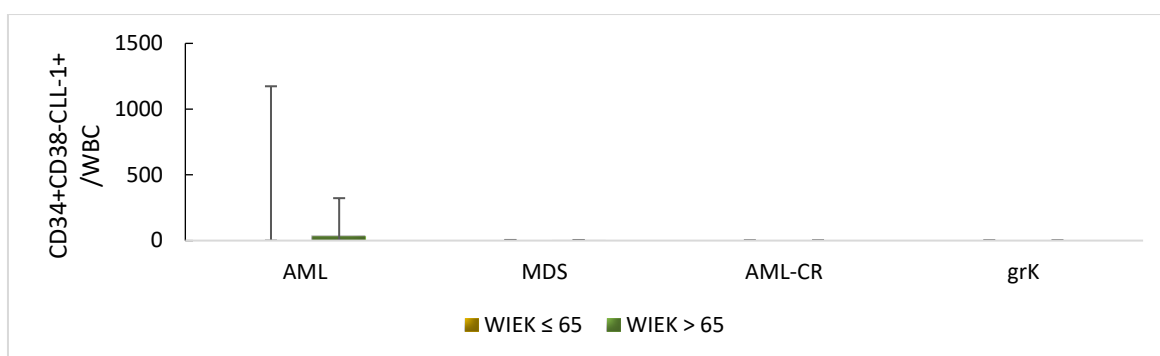
Wniosek: nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności odsetka komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) od wieku pacjentów, zarówno w grupie badanej jak i w grupie kontrolnej.

- **Liczba komórek z ekspresją CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ l szpiku kostnego (CD34+CD38-CLL-1+/WBC), a wiek pacjentów**

Tabela 20, Rycina 7 przedstawiają liczbę komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w zależności od wieku w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 20. Liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej a wiek

		CD34+CD38-CLL-1+/WBC					
		WIEK	N	Q25	Mediana	Q75	p
AML	≤ 65		7	0,00	2,02	1173,73	n.s.
AML	> 65		20	11,09	34,13	322,75	
MDS	≤ 65		4	0,03	0,87	4,73	n.s.
MDS	> 65		16	0,09	0,81	4,71	
AML-CR	≤ 65		4	0,00	0,00	0,00	--
AML-CR	> 65		1	0,00	0,00	0,00	
grK	≤ 65		6	0,00	0,00	0,00	--
grK	> 65		7	0,00	0,00	0,00	



Rycina 7. Liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej a wiek

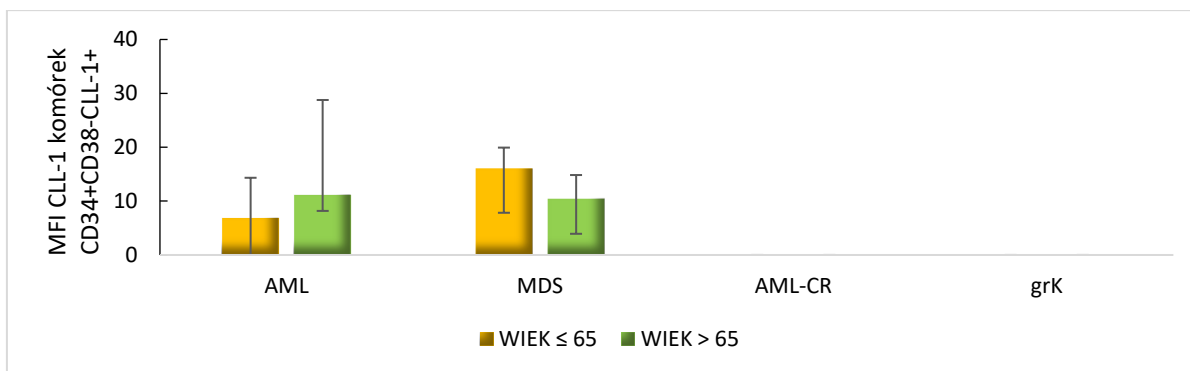
Wniosek: nie stwierdzono znamienych różnic w liczbie komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC względem wieku zarówno w grupie badanej jak i grupie kontrolnej.

- **Wartość średniej intensywności fluorescencji CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ (MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+), a wiek pacjentów**

Tabela 21, Rycina 8 przedstawiają rozkład wartości MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ względem wieku w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 21. MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej a wiek

		MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+					
		WIEK	N	Q25	Mediana	Q75	p
AML	≤ 65		7	0,00	6,86	14,33	n.s.
AML	> 65		20	8,18	11,15	28,77	
MDS	≤ 65		4	7,83	16,08	19,93	n.s.
MDS	> 65		16	3,93	10,43	14,84	
AML-CR	≤ 65		4	0,00	0,00	0,00	--
AML-CR	> 65		1	0,00	0,00	0,00	
grK	≤ 65		6	0,00	0,00	0,00	--
grK	> 65		7	0,00	0,00	0,00	



Rycina 8. MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej a wiek

Wniosek: nie stwierdzono znamiennych związków między wartością MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ a wiekiem pacjentów.

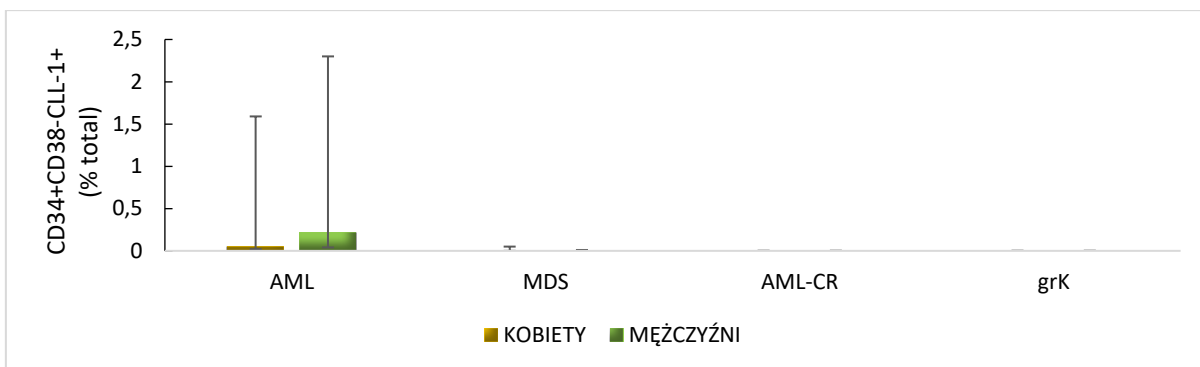
4.3 Obecność komórek CD34+CD38-CLL-1+ a płeć pacjentów

- **Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+, w populacji wszystkich komórek szpiku kostnego (% total), a płeć pacjentów**

Tabela 22, Rycina 9 przedstawiają odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w zależności od płci w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 22. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej a płeć pacjentów

	PŁEĆ	CD34+CD38-CLL-1+ (% total)				
		N	Q25	Mediana	Q75	p
AML	K	13	0,02	0,05	1,59	n.s.
AML	M	14	0,04	0,22	2,30	
MDS	K	8	0,00	0,00	0,05	n.s.
MDS	M	12	0,00	0,00	0,01	
AML-CR	K	4	0,00	0,00	0,00	--
AML-CR	M	1	0,00	0,00	0,00	
grK	K	6	0,00	0,00	0,00	--
grK	M	7	0,00	0,00	0,00	



Rycina 9. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej a płeć pacjentów

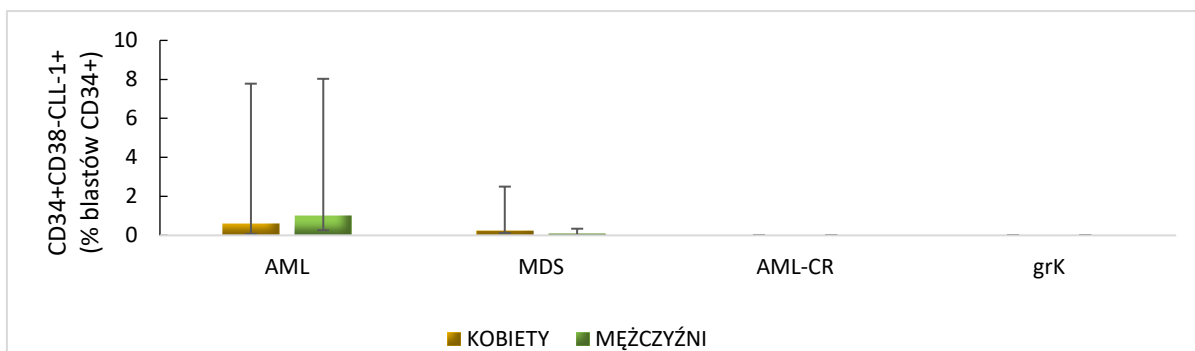
Wniosek: w obrębie badanych grup stwierdzono, że płeć nie wpływa istotnie na wysokość odsetka komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total).

- **Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+, w odniesieniu do odsetka blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), a płeć pacjentów**

Tabela 23, Rycina 10 przedstawiają odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) względem płci w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 23. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej a płeć pacjentów

		CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+)				
	PŁEĆ	N	Q25	Mediana	Q75	p
AML	k	13	0,07	0,61	7,78	n.s.
AML	m	14	0,26	1,01	8,03	
MDS	k	8	0,12	0,25	2,50	n.s.
MDS	m	12	0,00	0,09	0,34	
AML-CR	k	4	0,00	0,00	0,00	--
AML-CR	m	1	0,00	0,00	0,00	
grK	k	6	0,00	0,00	0,00	--
grK	m	7	0,00	0,00	0,00	



Rycina 10. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej a płeć pacjentów

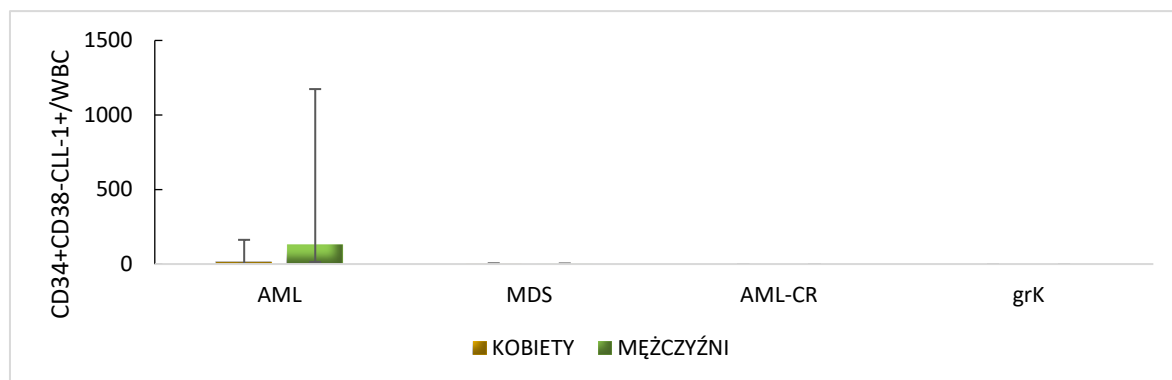
Wniosek: w obrębie badanych grup stwierdzono, że odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) nie ma związku z płcią pacjentów.

- **Liczba komórek z ekspresją CD34+CD38-CLL-1+, w 1 μ L szpiku kostnego (CD34+CD38-CLL-1+/WBC), a płeć pacjentów**

Tabela 24, Rycina 11 przedstawiają liczbę komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC względem płci w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 24. Liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej a płeć pacjentów

	PŁEĆ	CD34+CD38-CLL-1+/WBC				
		N	Q25	Mediana	Q75	p
AML	k	13	2,00	15,27	162,62	n.s.
AML	m	14	14,22	133,00	1173,73	
MDS	k	8	0,23	1,08	5,13	n.s.
MDS	m	12	0,00	0,81	4,01	
AML-CR	k	4	0,00	0,00	0,00	--
AML-CR	m	1	0,00	0,00	0,00	
grK	k	6	0,00	0,00	0,00	--
grK	m	7	0,00	0,00	0,00	



Rycina 11. Liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej a płeć pacjentów

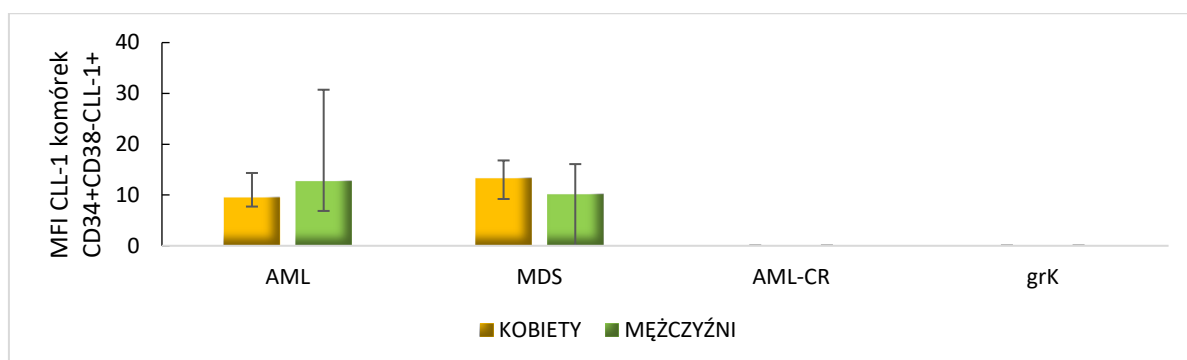
Wniosek: w obrębie badanych grup stwierdzono, że liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC nie ma związku z płcią pacjentów.

- **Wartość średniej intensywności fluorescencji cząsteczki CLL-1 w komórkach CD34+CD38-CLL-1+ a płeć pacjentów**

Tabela 25, Rycina 12 przedstawiają rozkład wartości MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ względem płci w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 25. Wartość MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej a płeć pacjentów

		MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+				
PŁEĆ		N	Q25	Mediana	Q75	p
AML	k	13	7,72	9,50	14,33	n.s.
AML	m	14	6,86	12,74	30,72	
MDS	k	8	9,21	13,28	16,80	n.s.
MDS	m	12	0,00	10,12	16,08	
AML-CR	k	4	0,00	0,00	0,00	--
AML-CR	m	1	0,00	0,00	0,00	
grK	k	6	0,00	0,00	0,00	--
grK	m	7	0,00	0,00	0,00	



Rycina 12. Wartość MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej a płeć

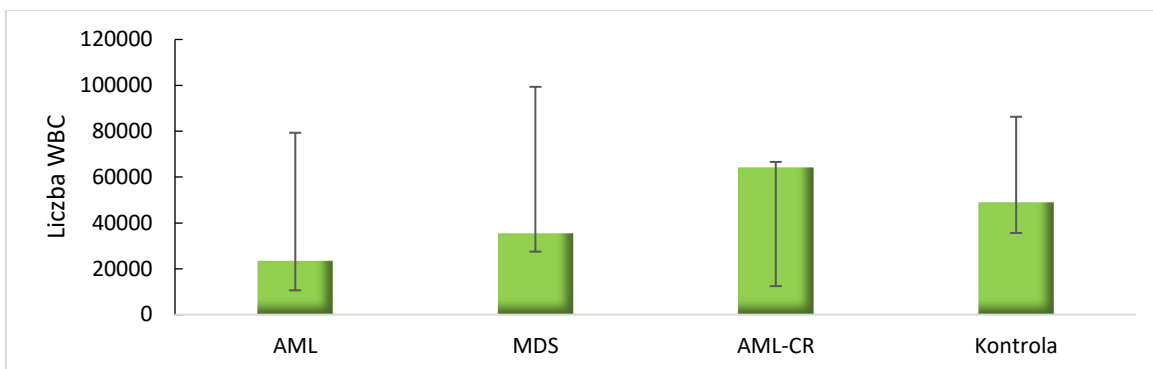
Wniosek: w obrębie badanych grup stwierdzono, że wartość MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ nie ma istotnego związku z płcią pacjentów.

4.4 Odsetek komórek wykazujących ekspresję CD34+CD38-CLL-1+, a liczba WBC

Tabela 26, Rycina 13 przedstawiają liczbę WBC w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 26. Liczba WBC w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej

Liczba WBC				
	Q25	Mediana	Q75	p
AML	10600	23450	79330	n.s.
MDS	27475	35500	99355	n.s.
AML-CR	12450	64220	66600	n.s.
Kontrola	35600	49000	86290	--



Rycina 13. Liczba WBC w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej

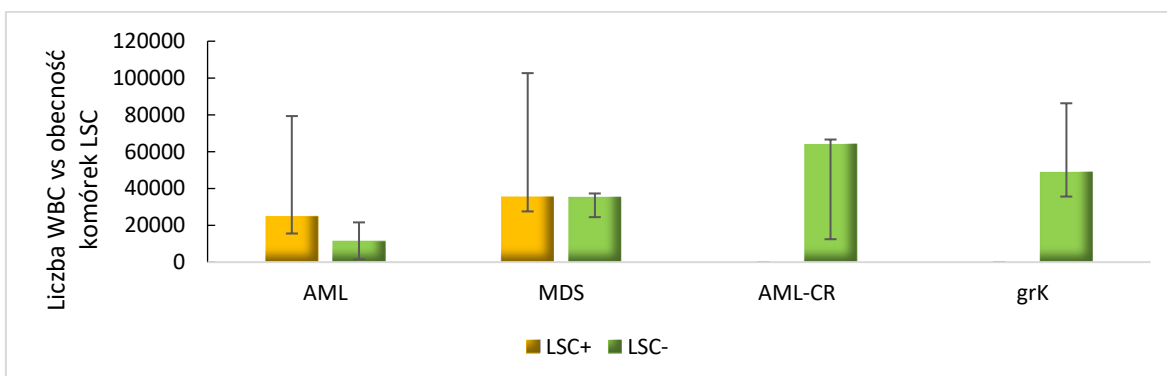
Wniosek: między podgrupami grup badanych AML, AML-CR, MDS a grupą kontrolną nie wykazano statystycznie istotnych różnic w zakresie liczby WBC.

- **Obecność komórek CD34+CD38-CLL-1+ a liczba WBC pacjentów**

Podgrupy grupy badanej podzielono pod względem obecności komórek CD34+CD38-CLL-1+ na populacje dodatnią i ujemną. Tabela 27, Rycina 14 przedstawiają uzyskane w badaniu wyniki

Tabela 27. Obecność komórek CD38+CD38-CLL-1+ w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej a liczba WBC

	CD38+CD38-CLL-1+	Liczba WBC				
		N	Q25	Mediana	Q75	p
AML	-	2	1570	11585	21600	n.s.
AML	+	25	15550	25000	79330	
MDS	-	5	24440	35400	37300	n.s.
MDS	+	15	27550	35600	102660	
AML-CR	-	5	12450	64220	66600	--
grK	-	13	35600	49000	86290	--



Rycina 14. Obecność komórek CD38+CD38-CLL-1+ w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej a liczba WBC

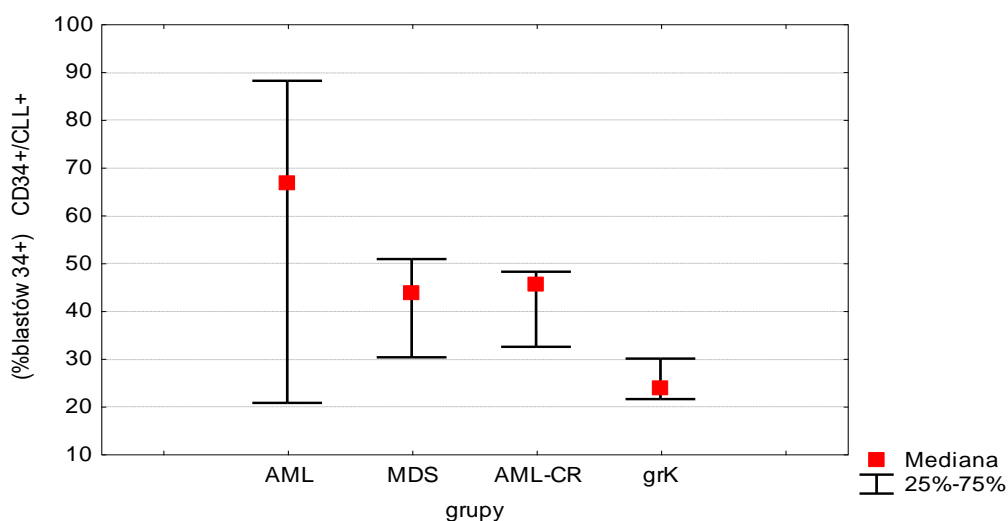
Wniosek: w podgrupach badanych nie wykazano istotnych statystycznie różnic. Nie zidentyfikowano związku obecności komórek CD34+CD38-CLL-1+ z liczbą WBC.

4.5 Identyfikacja komórek CD34+CLL-1+, w grupie blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), w podgrupach pacjentów: AML, MDS, AML-CR

Tabela 28, Rycina 15 przedstawiają odsetek komórek CD34+CLL-1+ (% blastów CD34+) w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 28. Odsetek komórek CD34+CLL-1+ (% blastów CD34+) w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej

CD34+CLL-1+ (% blastów CD34+)				
	Q25	Mediana	Q75	p
AML	20,68	66,68	88,08	0,0418
MDS	30,23	43,59	50,77	0,0014
AML-CR	32,41	45,55	48,12	0,0205
Kontrola	21,47	23,74	29,94	-



Rycina 15. Odsetek komórek CD34+CLL-1+ (% blastów CD34+) w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej

Wniosek: stwierdzono statystycznie istotnie wyższy odsetek komórek CD34+CLL-1+ (% blastów CD34+) u pacjentów w grupie badanej z AML (p=0,0418), MDS (p=0,0014), AML-CR (p=0,0205) w porównaniu z grupą kontrolną.

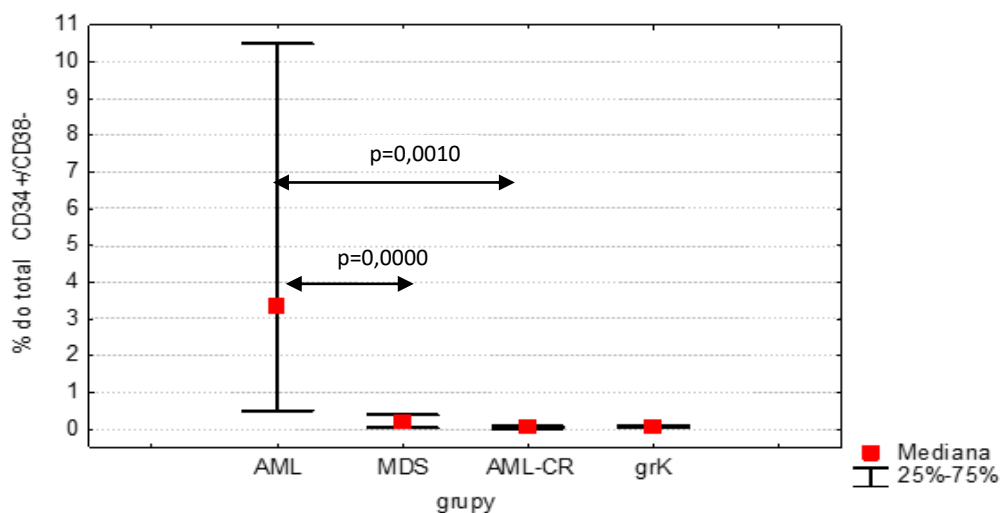
4.6 Identyfikacja komórek niszy szpikowej CD34+CD38- w podgrupach pacjentów AML, MDS, AML-CR

- **Odsetek komórek CD34+CD38- w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), w podgrupach: AML, MDS, AML-CR**

Tabela 29, Rycina 16 przedstawiają odsetek komórek CD34+CD38- (% total) w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 29. Odsetek komórek CD34+CD38- (% total) w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej

CD34+CD38- (% total)				
	Q25	Mediana	Q75	p
AML	0,50	3,35	10,50	0,0000
MDS	0,03	0,18	0,39	n.s.
AML-CR	0,03	0,06	0,08	n.s.
Kontrola	0,04	0,07	0,08	-



Rycina 16. Odsetek komórek CD34+CD38- (% total) w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej

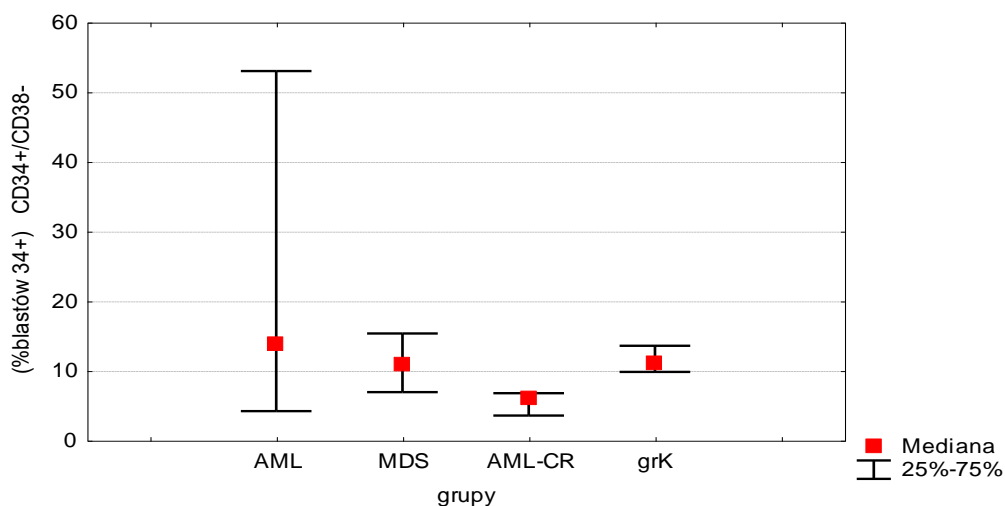
Wniosek: stwierdzono statystycznie istotnie niższy odsetek komórek CD34+CD38- (% total) w grupie kontrolnej w porównaniu do AML ($p=0,0000$). Między podgrupami grupy badanej: AML i AML-CR wykazano istotne statystycznie różnice. Grupa AML-CR charakteryzuje się niższym odsetkiem komórek CD34+CD38- (% total) w porównaniu do: AML ($p=0,0010$). Pacjenci z MDS wykazali statystycznie istotnie niższy odsetek komórek CD34+CD38- (% total) w porównaniu do pacjentów z AML ($p=0,0000$).

- **Komórki CD34+CD38- w odniesieniu do odsetka blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), w podgrupach: AML, MDS, AML-CR**

Tabela 30, Rycina 17 przedstawiają odsetek komórek CD34+CD38- (% blastów CD34+) w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 30. Odsetek komórek CD34+CD38- (% blastów CD34+) w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej

CD34+CD38- (% blastów CD34+)				
	Q25	Mediana	Q75	p
AML	4,19	13,85	52,98	n.s.
MDS	6,92	10,93	15,34	n.s.
AML-CR	3,56	5,97	6,76	n.s.
Kontrola	9,82	11,02	13,56	-



Rycina 17. Odsetek komórek CD34+CD38- (% blastów CD34+) w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej

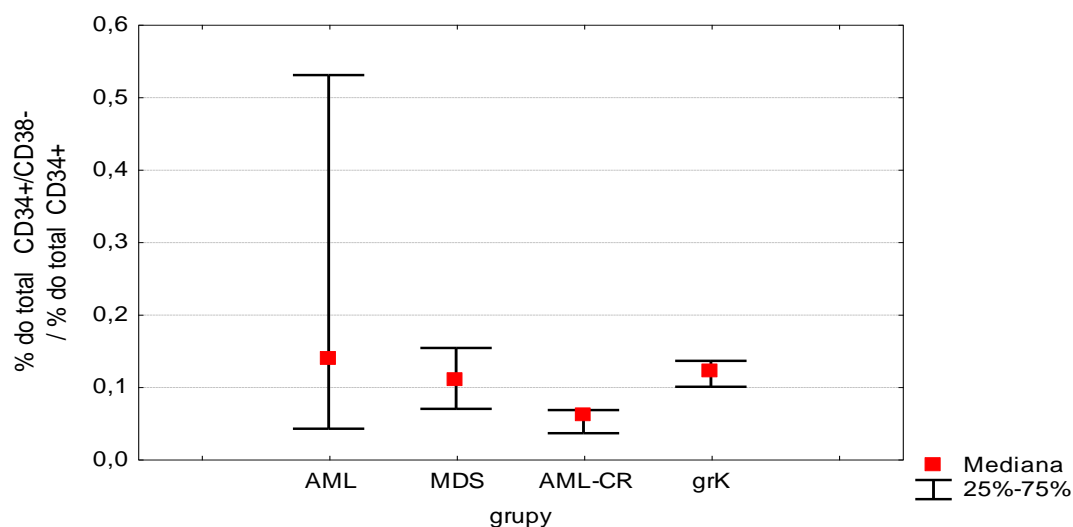
Wniosek: między podgrupami grupy badanej AML, AML-CR, MDS a grupą kontrolną nie wykazano statystycznie istotnych różnic. Pacjenci w grupie badanej również nie różnią się między sobą pod względem odsetka komórek niszy szpikowej CD34+CD38- (% blastów CD34+).

- Komórki niszy szpikowej CD34+CD38- w populacji blastów CD34+, w stosunku do wszystkich komórek szpiku kostnego (% total), w podgrupach pacjentów: AML, MDS, AML-CR

Tabela 31, Rycina 18 przedstawiają odsetek komórek CD34+CD38- wśród blastów CD34+ (% total) w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 31. Odsetek komórek CD34+CD38-/CD34+ (% total) w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej

CD34+CD38-/CD34+ (% total)				
	Q25	Mediana	Q75	p
AML	0,042	0,138	0,530	n.s.
MDS	0,069	0,109	0,153	n.s.
AML-CR	0,036	0,060	0,068	n.s.
Kontrola	0,100	0,121	0,136	-



Rycina 18. Odsetek komórek CD34+CD38-/CD34+ (% total) w grupie badanej (AML, MDS, AML-CR) i grupie kontrolnej

Wniosek: między podgrupami grupy badanej AML, AML-CR, MDS a grupą kontrolną nie wykazano statystycznie istotnych różnic. Pacjenci z pogrup grupy badanej nie różnią się między sobą pod względem liczebności komórek niszy szpikowej CD34+CD38- w populacji blastów CD34+ (% total).

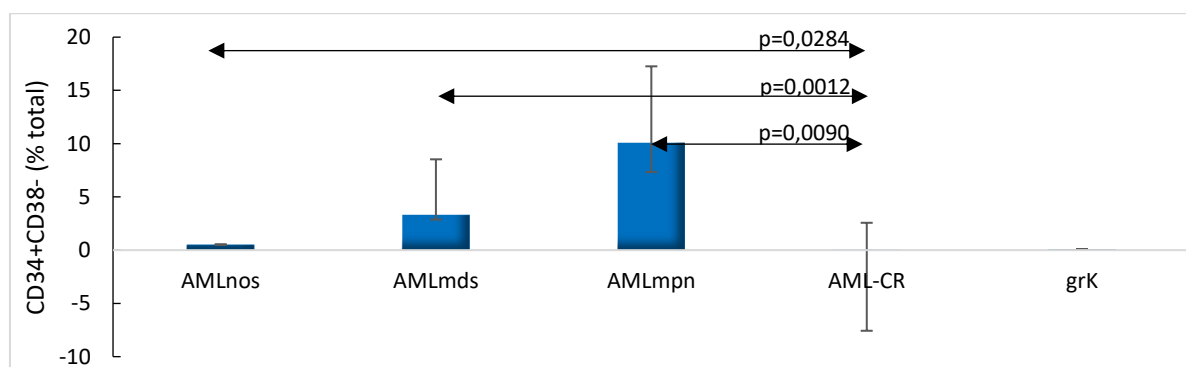
4.7 Identyfikacja komórek niszy szpikowej CD34+CD38- w AML

- **Komórki niszy szpikowej CD34+CD38- u pacjentów z AML, w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total)**

Tabela 32, Rycina 19 przedstawiają odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38- (% total) w AML w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 32. Odsetek komórek CD34+CD38- (% total) w podgrupach AML (AMLnos, AMLmlds, AMLmpn, AML-CR) i grupie kontrolnej

AML	CD34+CD38- (% total)			
	Q25	Mediana	Q75	p
AMLnos	0,08	0,52	5,74	0,0063
AMLmlds	0,58	3,31	10,50	0,0000
AMLmpn	2,44	10,07	12,58	0,0014
AML-CR	0,03	0,06	0,08	n.s.
grK	0,04	0,07	0,08	-



Rycina 19. Odsetek komórek CD34+CD38- (% total) w podgrupach AML (AMLnos, AMLmlds, AMLmpn, AML-CR) i grupie kontrolnej

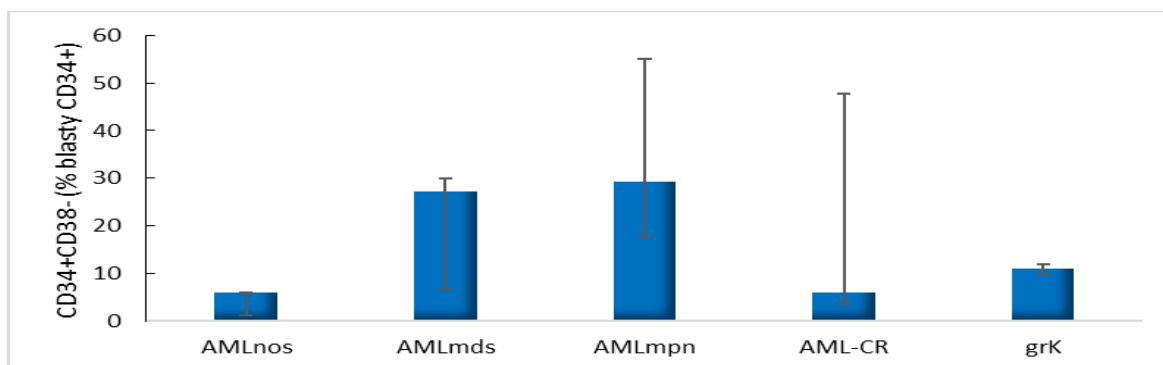
Wniosek: grupa kontrolna charakteryzuje się statystycznie istotnie niższym odsetkiem komórek CD34+CD38- (% total) w porównaniu do podgrup grupy badanej: AMLnos ($p=0,0063$), AMLmlds ($p=0,0000$), AMLmpn ($p=0,0014$). Podobnie AML-CR charakteryzuje się istotnie niższym odsetkiem badanych komórek niż: AMLnos ($p=0,0284$), AMLmlds ($p=0,0012$), AMLmpn ($p=0,0090$).

- **Komórki niszy szpikowej CD34+CD38- u pacjentów z AML, w odniesieniu do odsetka blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+)**

Tabela 33, Rycina 20 przedstawiają odsetek komórek CD34+CD38- (% blastów CD34+) w AML w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 33. Odsetek komórek CD34+CD38- (% blastów CD34+) w podgrupach AML (AMLnos, AMLmds, AMLmpn, AML-CR) i grupie kontrolnej

AML	CD34+CD38- (% blastów CD34+)			
	Q25	Mediana	Q75	p
AMLnos	1,24	5,92	8,67	0,0293
AMLmds	6,59	27,17	52,98	n.s.
AMLmpn	17,91	29,28	71,10	n.s.
AML-CR	3,56	5,97	6,76	0,0341
grK	9,82	11,02	13,56	-



Rycina 20. Odsetek komórek CD34+CD38- (% blastów CD34+) w podgrupach AML (AMLnos, AMLmds, AMLmpn, AML-CR) i grupie kontrolnej

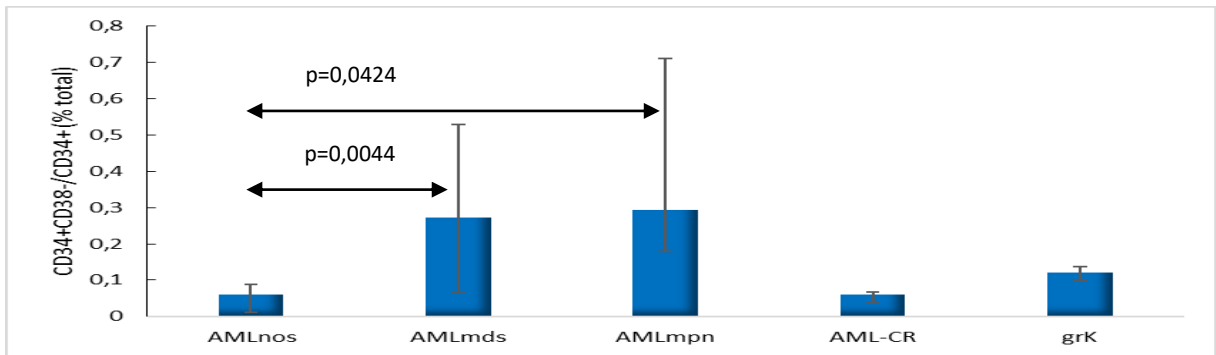
Wniosek: stwierdzono statystycznie istotnie wyższy odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38- (% blastów CD34+) w grupie kontrolnej w porównaniu z podgrupami: AMLnos ($p=0,0293$) i AML-CR ($p=0,0341$).

- **Komórki niszy szpikowej CD34+CD38- w populacji blastów CD34+ u pacjentów z AML, w odniesieniu do wszystkich komórek szpiku kostnego (% total)**

Tabela 34, Rycina 21 przedstawiają odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38- wśród blastów CD34+ (% total) w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 34. Odsetek komórek CD34+CD38-/CD34+ (% total) w podgrupach grupy badanej AML (AMLnos, AMLmds, AMLmpn, AML-CR) i grupie kontrolnej

AML	CD34+CD38-/CD34+ (% total)			
	Q25	Mediana	Q75	p
AMLnos	0,012	0,059	0,087	0,0126
AMLmds	0,066	0,272	0,530	n.s.
AMLmpn	0,179	0,293	0,711	n.s.
AML-CR	0,036	0,060	0,068	0,0090
grK	0,100	0,121	0,136	-



Rycina 21. Odsetek komórek CD34+CD38-/CD34+ (% total) w podgrupach grupy badanej AML (AMLnos, AMLmlds, AMLmpn, AML-CR) i grupie kontrolnej

Wniosek: stwierdzono statystycznie istotnie wyższy odsetek komórek CD34+CD38-/CD34+ (% total) w grupie kontrolnej w porównaniu z AMLnos ($p=0,0126$), AML-CR ($p=0,0090$). U pacjentów z AMLnos stwierdzono statystycznie istotnie niższy odsetek komórek CD34+CD38-/CD34+ (% total) w porównaniu do pacjentów z: AMLmlds ($p=0,0044$), AMLmpn ($p=0,0424$).

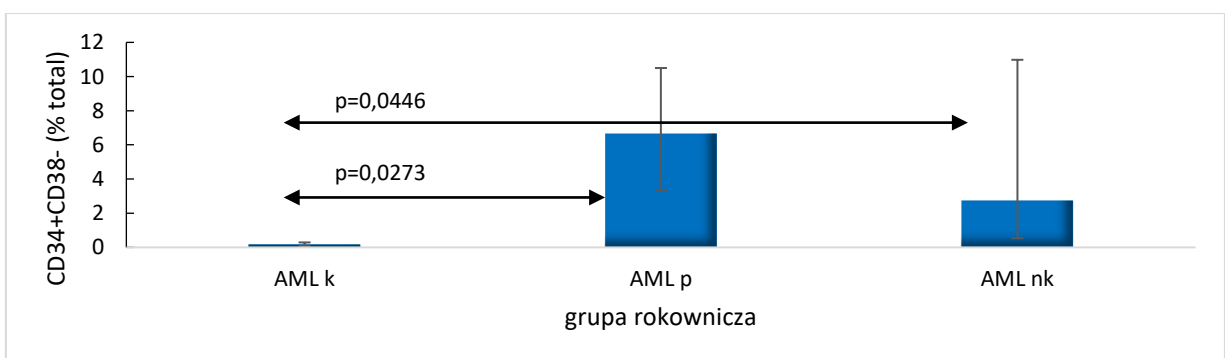
4.7.1 Komórki niszy szpikowej CD34+CD38- w AML a rokowanie

- **Komórki niszy szpikowej CD34+CD38- w populacji wszystkich komórek szpiku kostnego (% total) w AML, a rokowanie**

Tabela 35, Rycina 22 przedstawiają odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38- (% total) w trzech grupach rokowniczych pacjentów z AML.

Tabela 35. Odsetek komórek CD34+CD38- (% total) w AML w trzech grupach rokowniczych

AML - Rokowanie	CD34+CD38- (% total)			
	Q25	Mediana	Q75	p
Korzystne	0,07	0,18	0,29	n.s.
Pośrednie	3,35	6,67	10,50	0,0273
Niekorzystne	0,54	2,75	10,98	0,0446



Rycina 22. Odsetek komórek CD34+CD38- (% total) w AML w trzech grupach rokowniczych

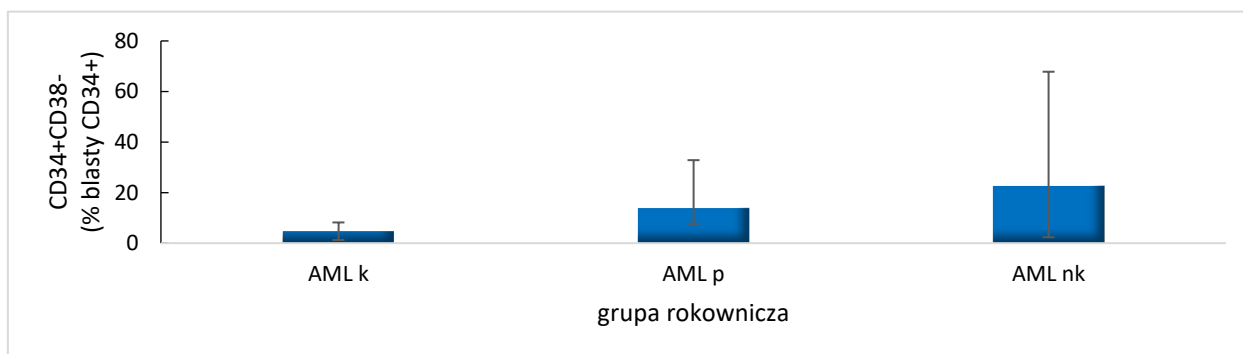
Wniosek: pacjenci z AML o korzystnym rokowaniu wykazali statystycznie istotnie niższy odsetek komórek CD34+CD38- (% total) w porównaniu do pacjentów AML o rokowaniu pośrednim (p=0,0273) oraz niekorzystnym (p=0,0446).

- **Komórki niszy szpikowej CD34+CD38- w populacji blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+) w AML, a rokowanie**

Tabela 36, Rycina 23 przedstawiają odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38- (% blastów CD34+) w trzech grupach rokowniczych pacjentów z AML.

Tabela 36. Odsetek komórek CD34+CD38- (% blastów CD34+) w AML w trzech grupach rokowniczych

AML - Rokowanie	CD34+CD38- (% blastów CD34+)			
	Q25	Mediana	Q75	p
Korzystne	1,24	4,72	8,20	n.s.
Pośrednie	7,66	13,85	32,84	n.s.
Niekorzystne	2,34	22,65	67,83	n.s.



Rycina 23. Odsetek komórek CD34+CD38- (% blastów CD34+) w trzech grupach rokowniczych

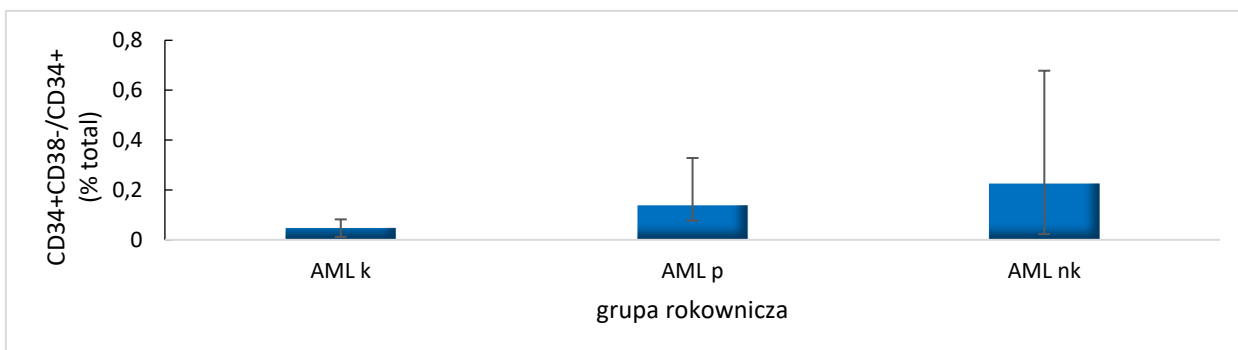
Wniosek: między podgrupami: AMLk, AMLp, AMLnk nie wykazano statystycznie istotnych różnic. Zauważono tendencję wzrostową tj. odnotowano wzrost odsetka komórek niszy szpikowej o profilu CD34+CD38- (% blastów CD34+), wraz z pogorszeniem rokowania.

- **Komórki niszy szpikowej CD34+CD38- w populacji blastów CD34+, w stosunku do wszystkich komórek szpiku kostnego (% total) w AML, a rokowanie**

Tabela 37, Rycina 24 przedstawiają odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38- wśród blastów CD34+ (% total), w trzech grupach rokowniczych pacjentów z AML

Tabela 37. Odsetek komórek CD34+CD38-/CD34+ (% total) w AML w trzech grupach rokowniczych

AML - Rokowanie	CD34+CD38-/CD34+ (% total)			
	Q25	Mediana	Q75	p
Korzystne	0,012	0,047	0,082	n.s.
Pośrednie	0,077	0,138	0,328	n.s.
Niekorzystne	0,023	0,226	0,678	n.s.



Rycina 24. Odsetek komórek CD34+CD38-/CD34+ (% total) w AML w trzech grupach rokowniczych

Wniosek: między podgrupami: AMLk, AMLp, AMLnk nie wykazano statystycznie istotnych różnic. Stwierdzono, że odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38- wśród blastów CD34+ (% total) nie ma związku z rokowaniem pacjentów AML. Zauważono tendencję wzrostową tj. odnotowano wzrost odsetka komórek niszy szpikowej wraz z pogorszeniem rokowania.

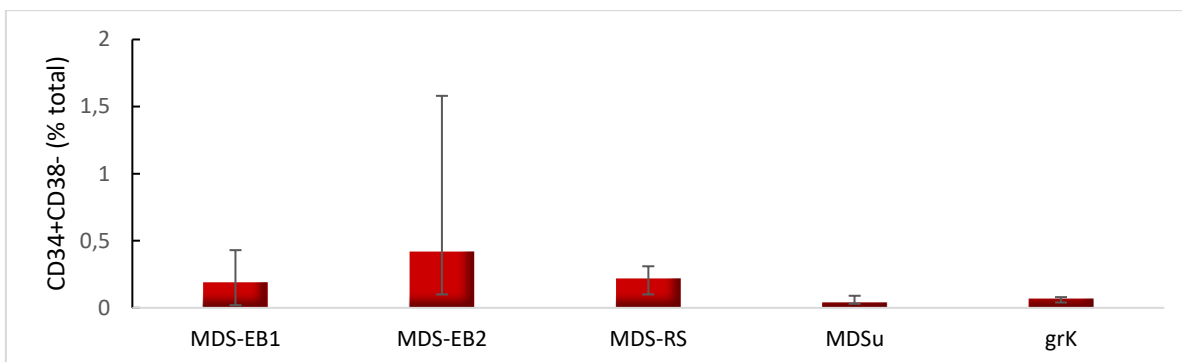
4.8 Identyfikacja komórek niszy szpikowej CD34+CD38- w MDS

- **Komórki niszy szpikowej CD34+CD38- u pacjentów z MDS, w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total)**

Tabela 38, Rycina 25 przedstawiają odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38- (% total) w MDS w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 38. Odsetek komórek CD34+CD38- (% total) w podgrupach MDS (MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu) i grupie kontrolnej

MDS	CD34+CD38- (% total)			
	Q25	Mediana	Q75	p
MDS-EB1	0,02	0,19	0,43	n.s.
MDS-EB2	0,10	0,42	1,58	n.s.
MDS-RS	0,10	0,22	0,31	0,0426
MDSu	0,03	0,04	0,09	n.s.
grK	0,04	0,07	0,08	-



Rycina 25. Odsetek komórek CD34+CD38- (% total) w podgrupach MDS (MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu) i grupie kontrolnej

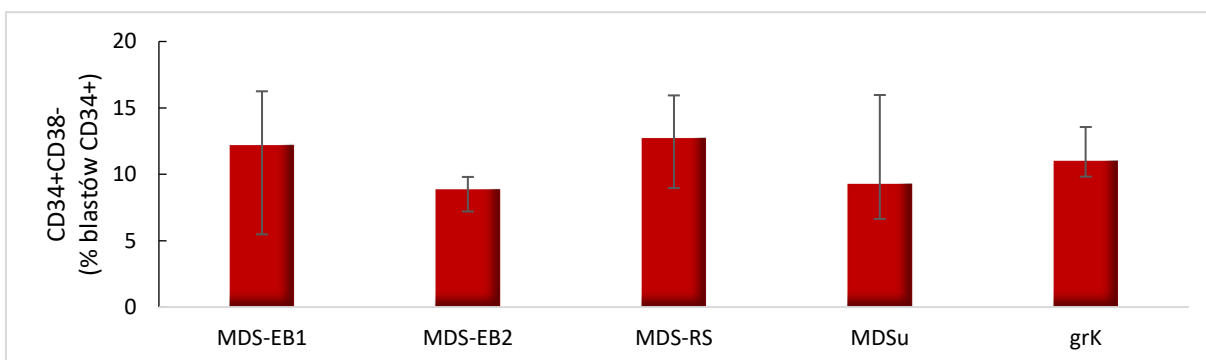
Wniosek: odsetek badanych komórek CD34+CD38- (% total) w grupie kontrolnej był statystycznie istotnie niższy w porównaniu do podgrupy z MDS-RS ($p=0,0426$).

- **Komórki niszy szpikowej CD34+CD38- u pacjentów z MDS, w odniesieniu do blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+)**

Tabela 39, Rycina 26 przedstawiają odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38- (% blastów CD34+) w MDS w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 39. Odsetek komórek CD34+CD38- (% blastów CD34+) w podgrupach MDS (MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu) i grupie kontrolnej

MDS	CD34+CD38- (% blastów CD34+)			
	Q25	Mediana	Q75	p
MDS-EB1	5,48	12,20	16,25	n.s.
MDS-EB2	7,20	8,86	9,80	n.s.
MDS-RS	8,96	12,72	15,94	n.s.
MDSu	6,64	9,27	15,97	n.s.
grK	9,82	11,02	13,56	-



Rycina 26. Odsetek komórek CD34+CD38- (% blastów CD34+) w podgrupach MDS (MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu) i grupie kontrolnej

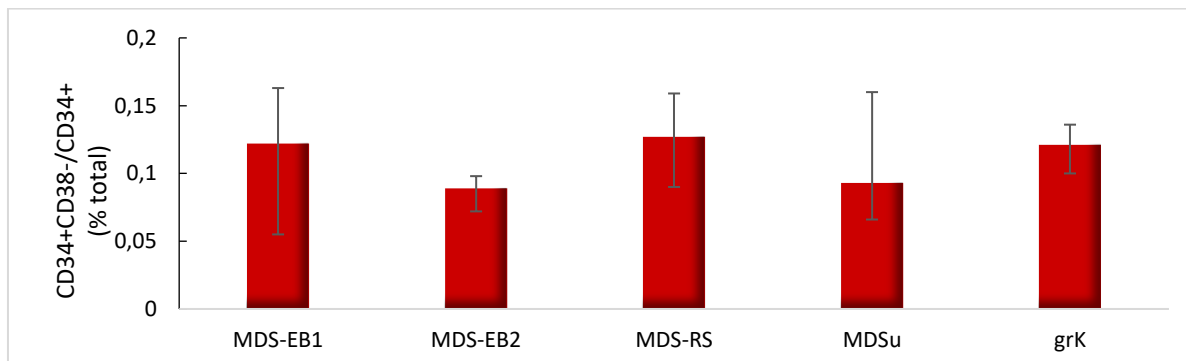
Wniosek: między podgrupami grup badanych MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu a grupą kontrolną nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic. Pacjenci z grup badanych również nie różnią się między sobą pod względem odsetka komórek niszy szpikowej CD34+CD38- (% blastów CD34+).

- **Komórki niszy szpikowej CD34+CD38- w populacji blastów CD34+ u pacjentów z MDS, w stosunku do wszystkich komórek szpiku kostnego (% total)**

Tabela 40, Rycina 27 przedstawiają odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38- wśród blastów CD34+ (% total), w MDS w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 40. Odsetek komórek CD34+CD38-/CD34+ (% total) w podgrupach MDS (MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu) i grupie kontrolnej

MDS	CD34+CD38-/CD34+ (% total)			
	Q25	Mediana	Q75	p
MDS-EB1	0,055	0,122	0,163	n.s.
MDS-EB2	0,072	0,089	0,098	n.s.
MDS-RS	0,090	0,127	0,159	n.s.
MDSu	0,066	0,093	0,160	n.s.
grK	0,100	0,121	0,136	-



Rycina 27. Odsetek komórek CD34+CD38-/CD34+ (% total) w podgrupach MDS (MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu) i grupie kontrolnej

Wniosek: między podgrupami grupy badanej MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu a grupą kontrolną nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic. Pacjenci w obrębie grupy badanej również nie różnią się między sobą pod względem odsetka komórek CD34+CD38-/CD34+ (% total).

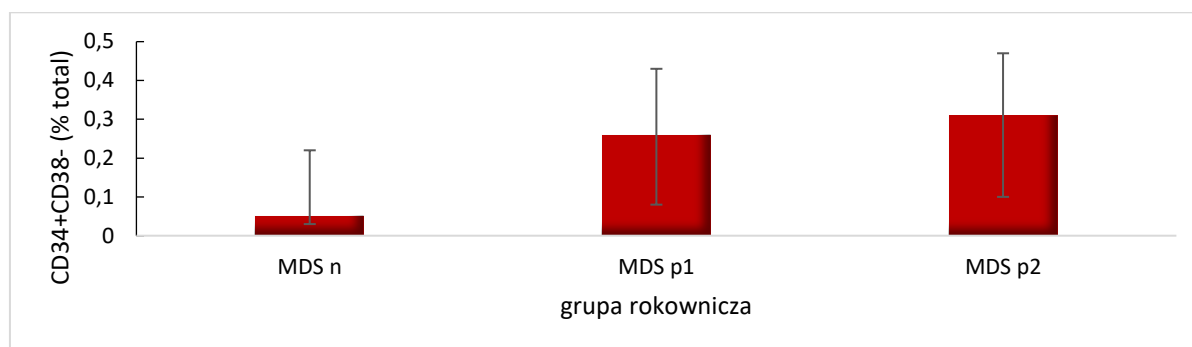
4.8.1 Komórki niszy szpikowej CD34+CD38- w MDS a rokowanie

- **Komórki niszy szpikowej CD34+CD38- w populacji wszystkich komórek szpiku kostnego (% total) w MDS, a rokowanie**

Tabela 41, Rycina 28 przedstawiają odsetek komórek CD34+CD38- (% total) w trzech grupach rokowniczych pacjentów z MDS.

Tabela 41. Odsetek komórek CD34+CD38- (% total) w MDS w trzech grupach rokowniczych

MDS - Rokowanie	CD34+CD38- (% total)			
	Q25	Mediana	Q75	p
Niskie	0,03	0,05	0,22	n.s.
Pośrednie 1	0,08	0,26	0,43	n.s.
Pośrednie 2	0,10	0,31	0,47	n.s.



Rycina 28. Odsetek komórek CD34+CD38- (% total) w MDS w trzech grupach rokowniczych

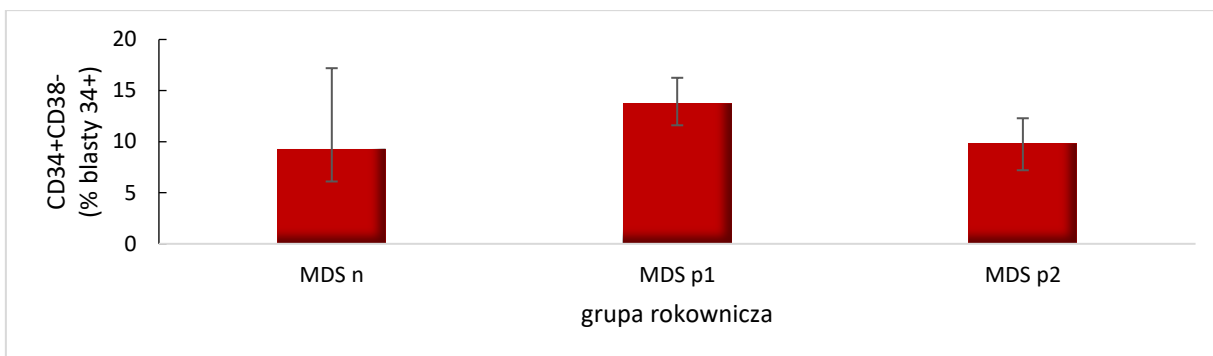
Wniosek: między podgrupami: MDSn, MDSp1, MDSp2 nie wykazano statystycznie istotnych różnic. Stwierdzono, że odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38- (% total) u pacjentów z MDS nie ma związku z rokowaniem. Zauważono tendencję wzrostową, tj. odnotowano wzrost liczby tych komórek wraz z pogorszeniem rokowania.

- **Komórki niszy szpikowej CD34+CD38- w populacji blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+) w MDS, a rokowanie**

Tabela 42, Rycina 29 przedstawiają odsetek komórek CD34+CD38- (% blastów CD34+) w trzech grupach rokowniczych pacjentów z MDS.

Tabela 42. Odsetek komórek CD34+CD38- (% blastów CD34+) w MDS w trzech grupach rokowniczych

MDS - Rokowanie	CD34+CD38- (% blastów CD34+)			
	Q25	Mediana	Q75	p
Niskie	6,10	9,27	17,19	n.s.
Pośrednie 1	11,60	13,75	16,25	n.s.
Pośrednie 2	7,20	9,80	12,29	n.s.



Rycina 29. Odsetek komórek CD34+CD38- (% blastów CD34+) w MDS w trzech grupach rokowniczych

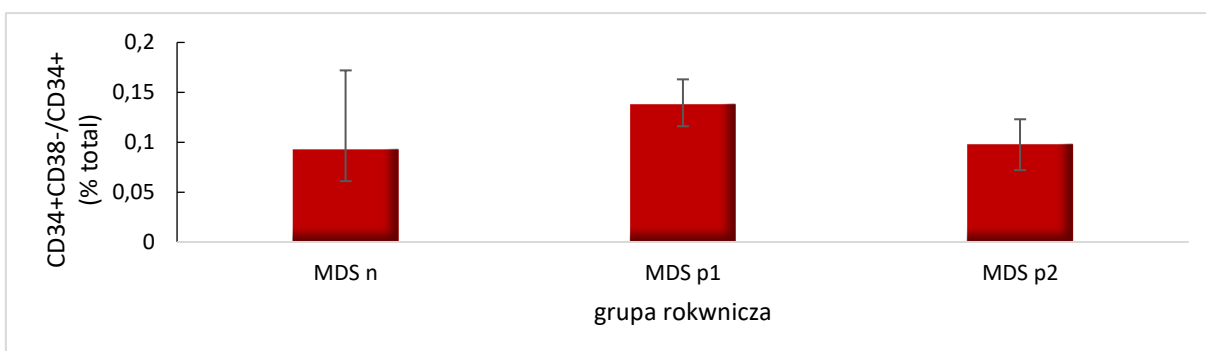
Wniosek: między podgrupami: MDSn, MDSp1, MDSp2 nie wykazano statystycznie istotnych różnic. Stwierdzono że, odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38- (% blastów CD34+) nie ma związku z rokowaniem u pacjentów MDS.

- **Komórki niszy szpikowej CD34+CD38- w populacji blastów CD34+ w stosunku do wszystkich komórek szpiku kostnego (% total) w MDS, a rokowanie**

Tabela 43, Rycina 30 przedstawiają odsetek komórek CD34+CD38- wśród blastów CD34+ (% total), w trzech grupach rokowniczych grupy badanej pacjentów z MDS.

Tabela 43. Odsetek komórek CD34+CD38-/CD34+ (% total) w MDS w trzech grupach rokowniczych

MDS - Rokowanie	CD34+CD38-/CD34+ (% total)			
	Q25	Mediana	Q75	p
Niskie	0,061	0,093	0,172	n.s.
Pośrednie 1	0,116	0,138	0,163	n.s.
Pośrednie 2	0,072	0,098	0,123	n.s.



Rycina 30. Odsetek komórek CD34+CD38-/CD34+ (% total) w MDS w trzech grupach rokowniczych

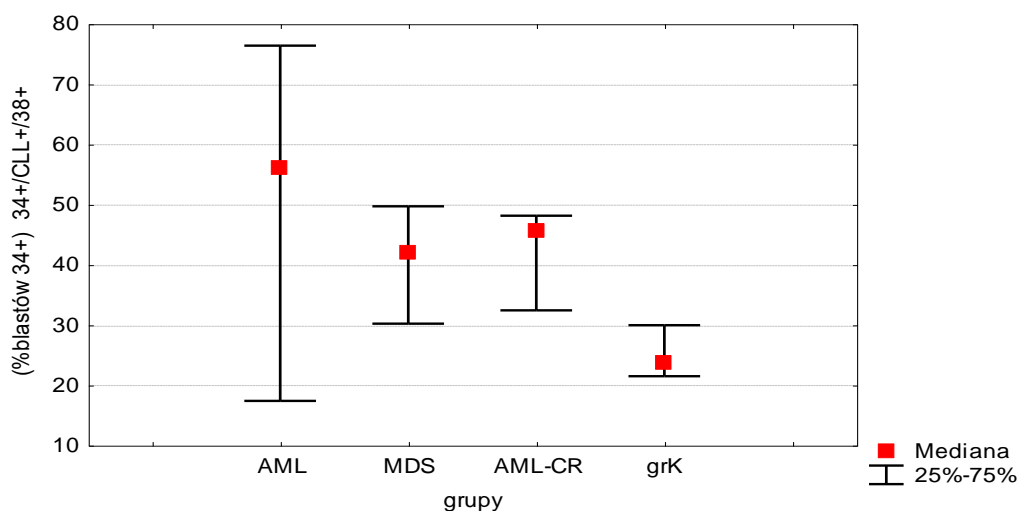
Wniosek: między podgrupami: MDSn, MDSp1, MDSp2 nie wykazano statystycznie istotnych różnic. Stwierdzono że, odsetek komórek CD34+CD38-/CD34+ (% total) nie ma związku z rokowaniem u pacjentów MDS.

4.9 Identyfikacja komórek progenitorowych CD34+CD38+CLL-1+, w odniesieniu do odsetka blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), w podgrupach pacjentów AML, MDS, AML-CR

Tabela 44, Rycina 31 przedstawiają odsetek komórek progenitorowych CD34+CD38+CLL-1+ (% blastów CD34+) w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 44. Odsetek komórek CD34+CD38+CLL-1+ (% blastów CD34+) w podgrupach: AML, MDS, AML-CR i grupie kontrolnej

CD34+CD38+CLL-1+ (% blastów CD34+)				
	Q25	Mediana	Q75	p
AML	17,36	56,08	76,37	n.s.
MDS	30,19	42,00	49,68	0,0015
AML-CR	32,41	45,55	48,12	0,0205
Kontrola	21,47	23,74	29,94	-



Rycina 31. Odsetek komórek CD34+CD38+CLL-1+ (% blastów CD34+) w podgrupach: AML, MDS, AML-CR i grupie kontrolnej

Wnioski: w grupie kontrolnej stwierdzono statystycznie istotnie niższy odsetek komórek CD34+CD38+CLL-1+ (% blastów CD34+) w porównaniu do pacjentów z MDS ($p=0,0015$) czy z AML-CR ($p=0,0205$). Nie wykazano istotnych różnic między pacjentami z AML, a pacjentami z MDS ($p=0,6056$) oraz między pacjentami AML a AML-CR ($p=0,6591$).

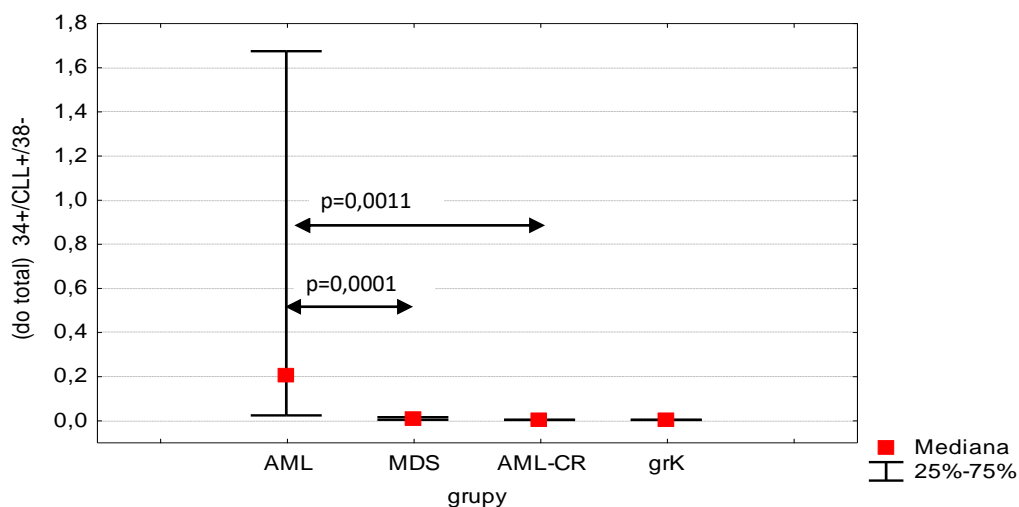
4.10 Identyfikacja komórek CD34+CD38-CLL-1+ w podgrupach pacjentów AML, MDS, AML-CR

- Komórki CD34+CD38-CLL-1+ w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), w podgrupach AML, MDS, AML-CR

Tabela 45, Rycina 32 przedstawiają odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 45. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w podgrupach grupy badanej: AML, MDS, AML-CR i grupie kontrolnej

CD34+CD38-CLL-1+ (% total)				
	Q25	Mediana	Q75	p
AML	0,02	0,20	1,67	0,0000
MDS	0,00	0,00	0,01	0,0001
AML-CR	0,00	0,00	0,00	-
Kontrola	0,00	0,00	0,00	-



Rycina 32. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w podgrupach grupy badanej: AML, MDS, AML-CR i grupie kontrolnej

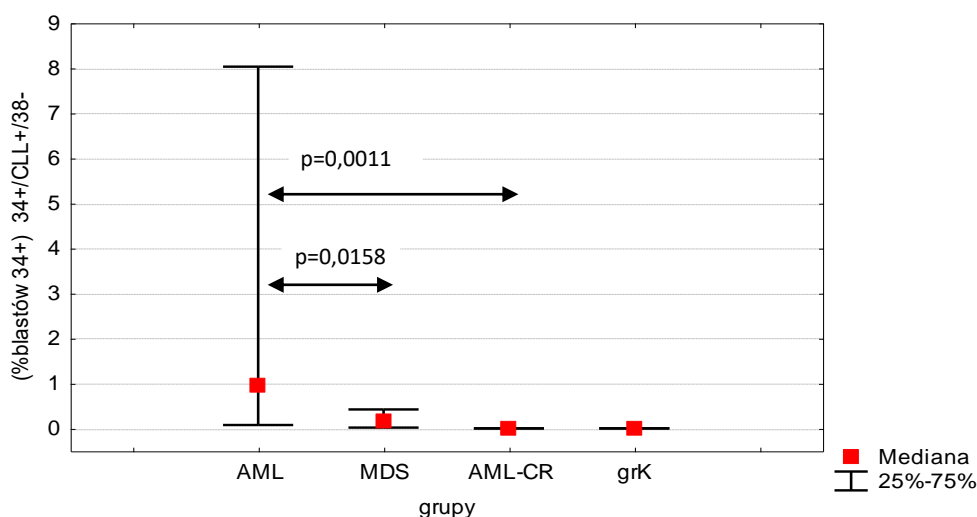
Wyniki: grupa kontrolna charakteryzuje się istotnie niższym odsetkiem komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w porównaniu do pacjentów z AML ($p=0,0000$) oraz MDS ($p=0,0001$), podobnie pacjenci z AML-CR charakteryzują się niższym odsetkiem badanych komórek niż z AML ($p=0,0011$). Pacjenci z AML charakteryzują się wyższym odsetkiem komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w porównaniu do pacjentów z MDS ($p=0,0001$).

- Komórki CD34+CD38-CLL-1+ w odniesieniu do odsetka blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), w podgrupach AML, MDS, AML-CR

Tabela 46, Rycina 33 przedstawiają odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 46. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w podgrupach grupy badanej: AML, MDS, AML-CR i grupie kontrolnej

CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+)				
	Q25	Mediana	Q75	p
AML	0,07	0,95	8,03	0,0000
MDS	0,02	0,16	0,42	0.0001
AML-CR	0,00	0,00	0,00	-
Kontrola	0,00	0,00	0,00	-



Rycina 33. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w podgrupach grupy badanej: AML, MDS, AML-CR i grupie kontrolnej

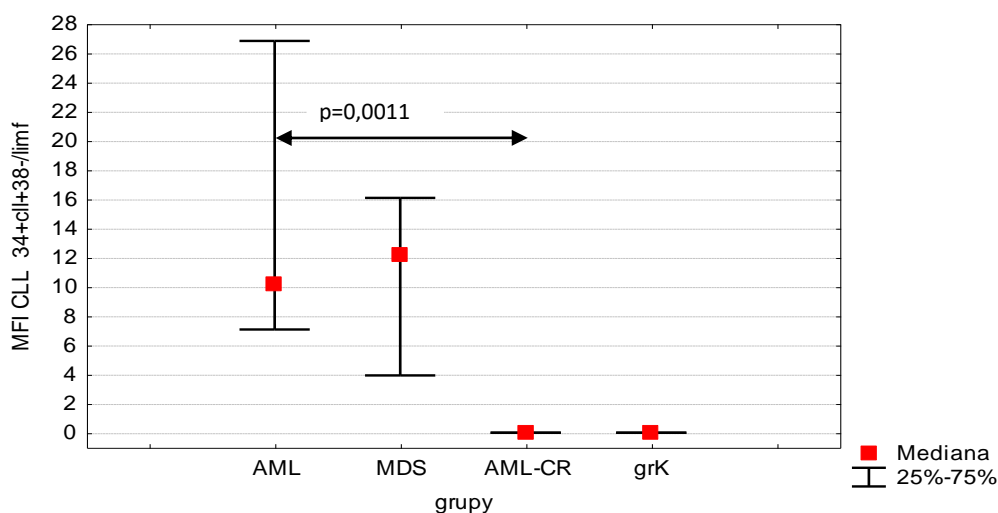
Wnioski: grupa kontrolna charakteryzuje się istotnie niższym odsetkiem komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w porównaniu do pacjentów z: AML ($p=0,0000$), MDS ($p=0,0001$). Pacjenci AML charakteryzują się istotnie wyższym odsetkiem badanych komórek w porównaniu do pacjentów z AML-CR ($p=0,0011$) czy z MDS ($p=0,0158$).

- **Wartość średniej intensywności fluorescencji CLL-1 w komórkach CD34+CD38-CLL-1+, w podgrupach AML, MDS, AML-CR**

Tabela 47, Rycina 34 przedstawiają wartość MFI CLL-1 komórek 34+38-CLL-1+ w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 47. Wartości MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ w podgrupach grupy badanej: AML, MDS, AML-CR i grupie kontrolnej

MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+				
	Q25	Mediana	Q75	p
AML	7,07	10,19	26,82	0,0000
MDS	3,93	12,22	16,08	0,0001
AML-CR	0,00	0,00	0,00	-
Kontrola	0,00	0,00	0,00	



Rycina 34. Wartości MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ w podgrupach grupy badanej: AML, MDS, AML-CR i grupie kontrolnej

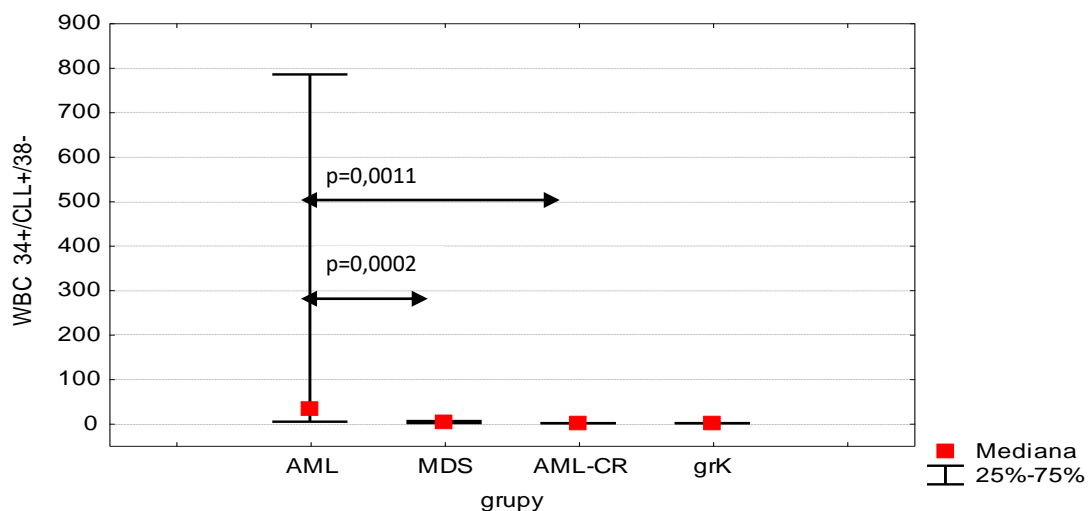
Wnioski: w grupie kontrolnej stwierdzono statystycznie istotnie niższą wartość MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ niż u pacjentów z AML ($p=0,0000$) czy z MDS ($p=0,0001$). Pacjenci z AML-CR charakteryzują się istotnie niższą wartością MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ niż pacjenci z AML ($p=0,0011$).

- Liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L szpiku kostnego (CD34+CD38-CLL-1+/WBC), w podgrupach AML, MDS, AML-CR

Tabela 48, Rycina 35 przedstawiają liczbę komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 48. Liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w podgrupach grupy badanej: AML, MDS, AML-CR i grupie kontrolnej

CD34+CD38-CLL-1+/WBC				
	Q25	Mediana	Q75	p
AML	3,34	33,40	783,84	0,0000
MDS	0,03	0,81	4,71	0,0001
AML-CR	0,00	0,00	0,00	-
Kontrola	0,00	0,00	0,00	



Rycina 35. Liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w podgrupach grupy badanej: AML, MDS, AML-CR i grupie kontrolnej

Wnioski: w grupie kontrolnej stwierdzono statystycznie istotnie mniej komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w porównaniu do pacjentów z AML ($p=0,0000$) czy z MDS ($p=0,0001$). Pacjenci z AML charakteryzują się istotnie wyższą liczbą tych komórek w porównaniu z pacjentami z AML-CR ($p=0,0011$) czy z MDS ($p=0,0002$).

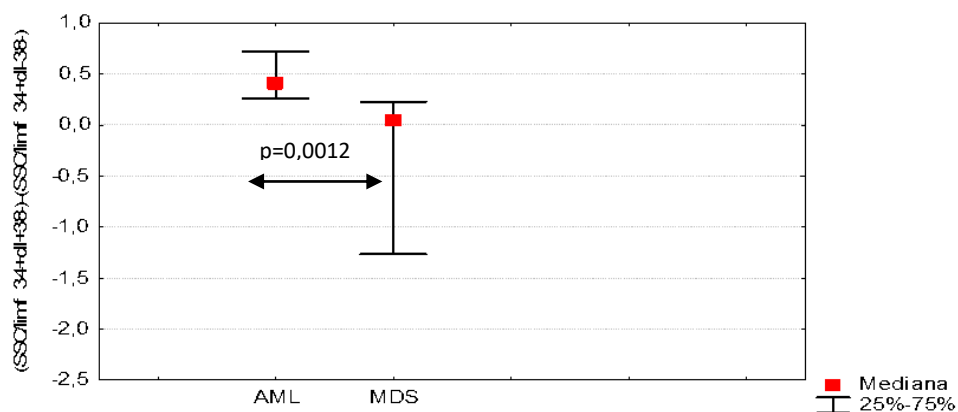
4.10.1 Porównanie ziarnistości i wielkości komórek CD34+CD38-CLL-1+ względem CD34+CD38-CLL-1-, w podgrupach AML, MDS

- **Ziarnistość komórek: CD34+CD38-CLL-1+ względem CD34+CD38-CLL-1-, w podgrupach AML, MDS**

Tabela 49, Rycina 36 przedstawiają różnice ziarnistości komórek w podgrupach grupy badanej.

Tabela 49. Ziarnistość komórek w podgrupach grupy badanej: AML, MDS

Różnica ziarnistości komórek				
	Q25	Mediana	Q75	p
AML	0,26	0,41	0,72	0,0012
MDS	-1,26	0,04	0,23	



Rycina 36. Ziarnistość komórek w podgrupach grupy badanej: AML, MDS

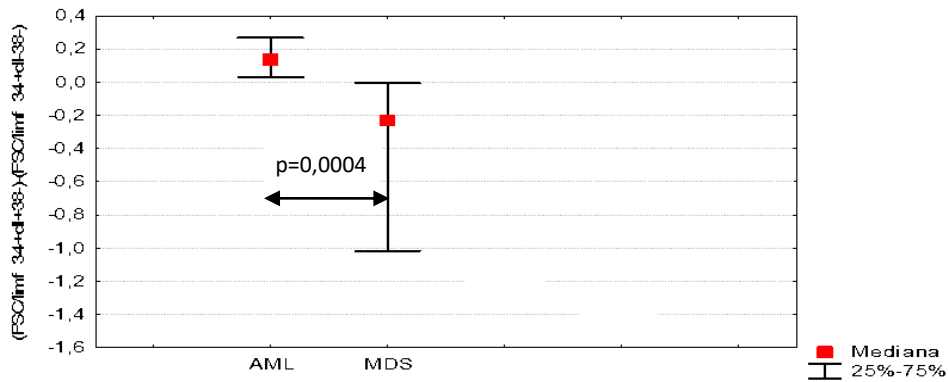
Wnioski: wśród pacjentów z AML stwierdzono komórki bardziej ziarniste niż u pacjentów z MDS (p=0,0012).

- **Wielkość komórek CD34+CD38-CLL-1+ względem CD34+CD38-CLL-1-, w podgrupach AML, MDS**

Tabela 50, Rycina 37 przedstawiają różnice wielkości komórek w podgrupach grupy badanej.

Tabela 50. Wielkość komórek w podgrupach grupy badanej: AML, MDS

Różnica wielkości komórek				
	Q25	Mediana	Q75	p
AML	0,03	0,14	0,27	0,0004
MDS	-1,02	-0,23	-0,01	



Rycina 37. Wielkość komórek w podgrupach grupy badanej: AML, MDS

Wnioski: pacjenci z AML wykazują większe komórki z ekspresją CD34+CD38-CLL-1+ niż pacjenci z MDS (p=0,0004).

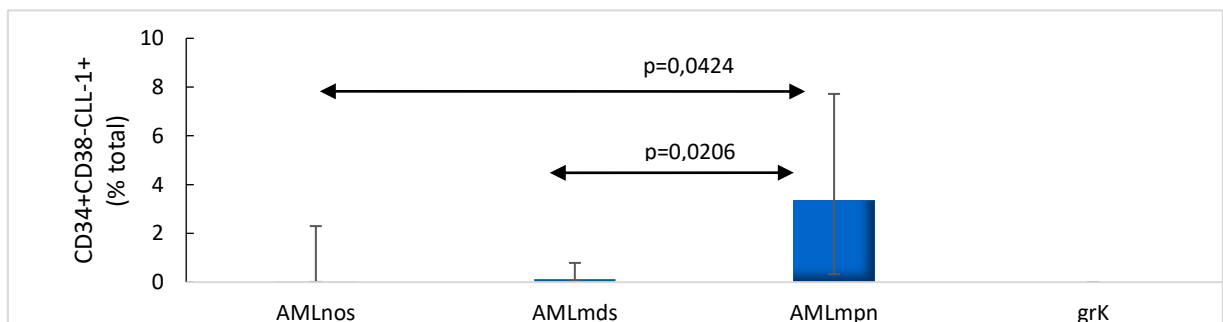
4.11 Identyfikacja komórek CD34+CD38-CLL-1+ w podgrupie AML

- Komórki CD34+CD38-CLL-1+, u pacjentów z AML, w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total)

Tabela 51, Rycina 38 przedstawiają odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 51. Odsetek komórek CD34+CD38+CLL-1+ (% total) w podgrupach grupy badanej AML (AMLnos, AMLmids, AMLmpn) i grupie kontrolnej

AML	CD34+CD38-CLL-1+ (% total)			
	Q25	Mediana	Q75	p
AMLnos	0,01	0,02	2,30	0,0001
AMLmids	0,04	0,12	0,79	0,0000
AMLmpn	0,33	3,34	7,72	0,0001
grK	0,00	0,00	0,00	-



Rycina 38. Odsetek komórek CD34+CD38+CLL-1+ (% total) w podgrupach grupy badanej AML (AMLnos, AMLmids, AMLmpn) i grupie kontrolnej

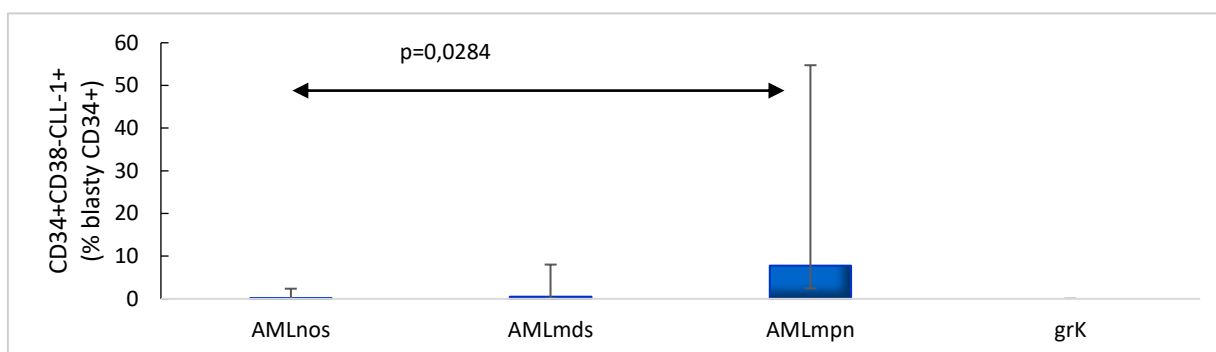
Wnioski: stwierdzono statystycznie istotnie niższy odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w grupie kontrolnej w porównaniu do pacjentów z AMLnos ($p=0,0001$), z AMLmds ($p=0,0000$), z AMLmpn ($p=0,0001$). Pacjenci z AMLmpn charakteryzują się wyższym odsetkiem komórek CD34+CD38+CLL-1+ (% total) w porównaniu do pacjentów z AMLnos ($p=0,0424$) czy z AMLmds ($p=0,0206$).

- **Komórki CD34+CD38-CLL-1+, u pacjentów z AML, w odniesieniu do odsetka blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+)**

Tabela 52, Rycina 39 przedstawiają odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Rycina 52. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w podgrupach grupy badanej AML (AMLnos, AMLmds, AMLmpn) i grupie kontrolnej

AML	CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+)			
	Q25	Mediana	Q75	p
AMLnos	0,03	0,19	2,38	0,0001
AMLmds	0,07	0,52	8,03	0,0000
AMLmpn	2,46	7,78	54,74	0,0001
grK	0,00	0,00	0,00	-



Rycina 39. Odsetek komórek CD34+CD38+CLL-1+ (% blastów CD34+) w podgrupach grupy badanej AML (AMLnos, AMLmds, AMLmpn) i grupie kontrolnej

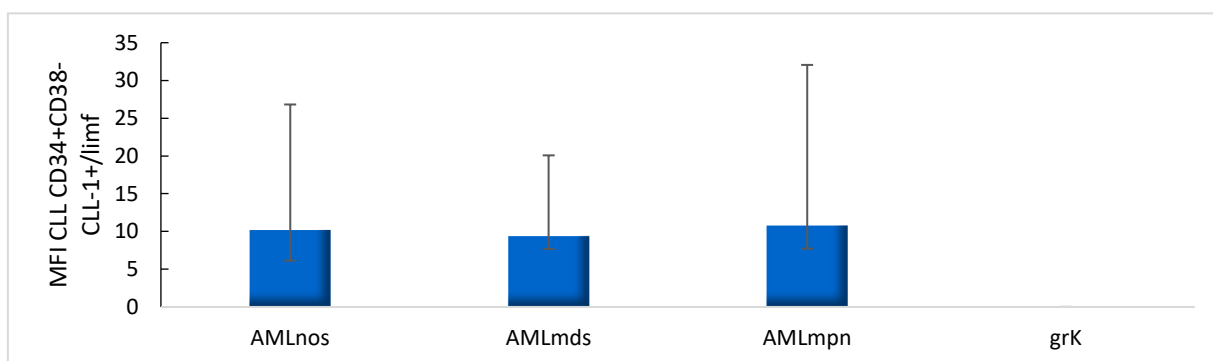
Wyniki: stwierdzono statystycznie istotnie niższy odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) u pacjentów w grupie kontrolnej w porównaniu do pacjentów grup badanych: AMLnos ($p=0,0001$), AMLmds ($p=0,0000$), AMLmpn ($p=0,0001$). Pacjenci z AMLmpn charakteryzują się wyższym odsetkiem komórek CD34+CD38+CLL-1+ (% blastów CD34+) w porównaniu do pacjentów z AMLnos ($p=0,0284$).

- **Wartość średniej intensywności fluorescencji cząsteczki CLL-1 w komórkach CD34+CD38-CLL-1+, u pacjentów z AML**

Tabela 53, Rycina 40 przedstawiają wartości MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 53. Wartości MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ w podgrupach grupy badanej AML (AMLnos, AMLmlds, AMLmpn) i w grupie kontrolnej

AML	MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+			
	Q25	Mediana	Q75	p
AMLnos	6,14	10,19	26,82	0,0001
AMLmlds	7,67	9,37	20,08	0,0000
AMLmpn	7,72	10,79	32,06	0,0001
grK	0,00	0,00	0,00	-



Rycina 40. Wartości MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ w podgrupach grupy badanej AML (AMLnos, AMLmlds, AMLmpn) i w grupie kontrolnej

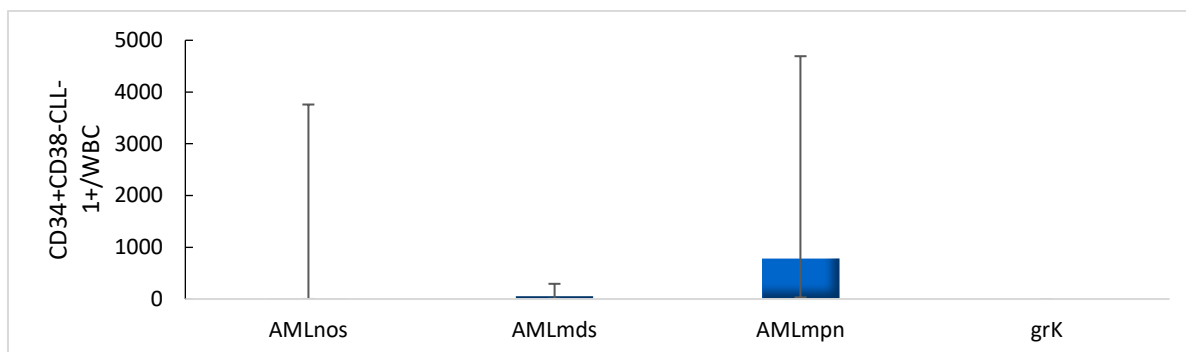
Wyniki: w grupie kontrolnej stwierdzono statystycznie istotnie niższą intensywność fluorescencji cząsteczki CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ w porównaniu z pacjentami: AMLnos ($p=0,0001$), AMLmlds ($p=0,0000$), AMLmpn ($p=0,0001$).

- **Liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ l szpiku kostnego (CD34+CD38-CLL-1+/WBC) u pacjentów z AML**

Tabela 54, Rycina 41 przedstawiają liczbę komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 54. Liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w podgrupach grupy badanej AML (AMLnos, AMLmlds, AMLmpn) i w grupie kontrolnej

AML	CD34+CD38-CLL-1+/WBC			
	Q25	Mediana	Q75	p
AMLnos	2,00	3,34	3759,03	0,0001
AMLmlds	7,49	51,27	294,44	0,0000
AMLmpn	33,40	783,84	4692,62	0,0001
grK	0,00	0,00	0,00	-



Rycina 41. Liczba CD34+CD38-CLL-1+/WBC w podgrupach grupy badanej AML (AMLnos, AMLmlds, AMLmpn) i w grupie kontrolnej

Wniosek: w grupie kontrolnej stwierdzono statystycznie istotnie niższy odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w porównaniu z pacjentami z: AMLnos ($p=0,0001$), AMLmlds ($p=0,0000$), AMLmpn ($p=0,0001$).

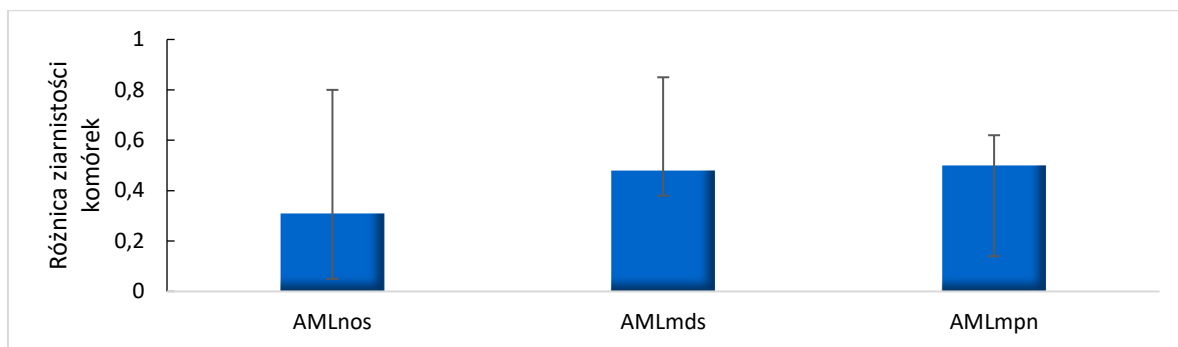
4.11.1 Ziarnistość i wielkość komórek CD34+CD38-CLL-1+ względem CD34+CD38-CLL-1-, w AML

- Ziarnistość komórek CD34+CD38-CLL-1+ względem CD34+CD38-CLL-1-, w AML

Tabela 55, Rycina 42 przedstawiają ziarnistość komórek w podgrupach grupy badanej.

Tabela 55. Ziarnistość komórek w podgrupach grupy badanej AML (AMLnos, AMLmlds, AMLmpn)

AML	Różnica ziarnistości komórek			
	Q25	Mediana	Q75	p
AMLnos	0,05	0,31	0,80	n.s.
AMLmlds	0,38	0,48	0,85	n.s.
AMLmpn	0,14	0,50	0,62	n.s.



Rycina 42. Ziarnistość komórek w podgrupach grupy badanej AML (AMLnos, AMLmids, AMLmpn)

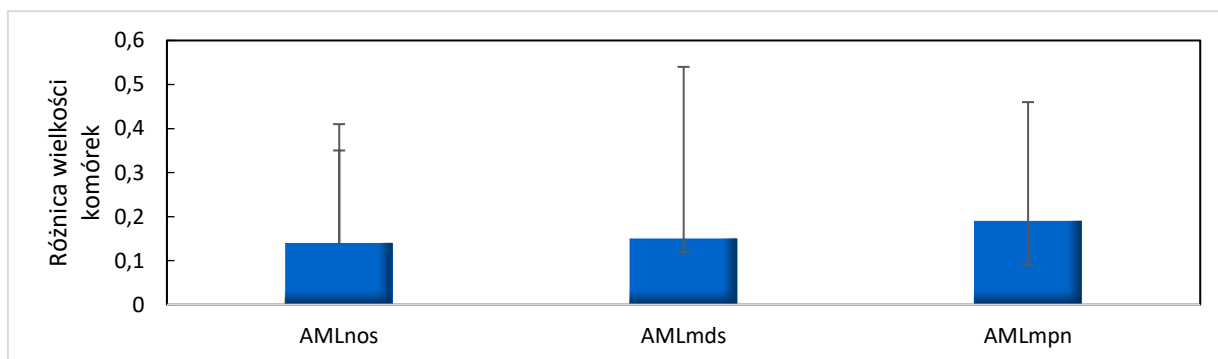
Wyniki: między podgrupami pacjentów z: AMLnos, AMLmids, AMLmpn nie wykazano statystycznie istotnych różnic w zakresie ziarnistości komórek.

- **Wielkość komórek CD34+CD38-CLL-1+ względem CD34+CD38-CLL-1-, w AML**

Tabela 56, Rycina 43 przedstawiają wielkość komórek w podgrupach grupy badanej.

Tabela 56. Wielkość komórek w podgrupach grupy badanej AML (AMLnos, AMLmids, AMLmpn)

AML	Różnica wielkości komórek			
	Q25	Mediana	Q75	p
AMLnos	-0,27	0,14	0,21	n.s.
AMLmids	0,03	0,15	0,39	n.s.
AMLmpn	0,10	0,19	0,27	n.s.



Rycina 43. Wielkość komórek w podgrupach grupy badanej AML (AMLnos, AMLmids, AMLmpn)

Wyniki: między podgrupami pacjentów z: AMLnos, AMLmids, AMLmpn nie wykazano statystycznie istotnych różnic w zakresie wielkości komórek.

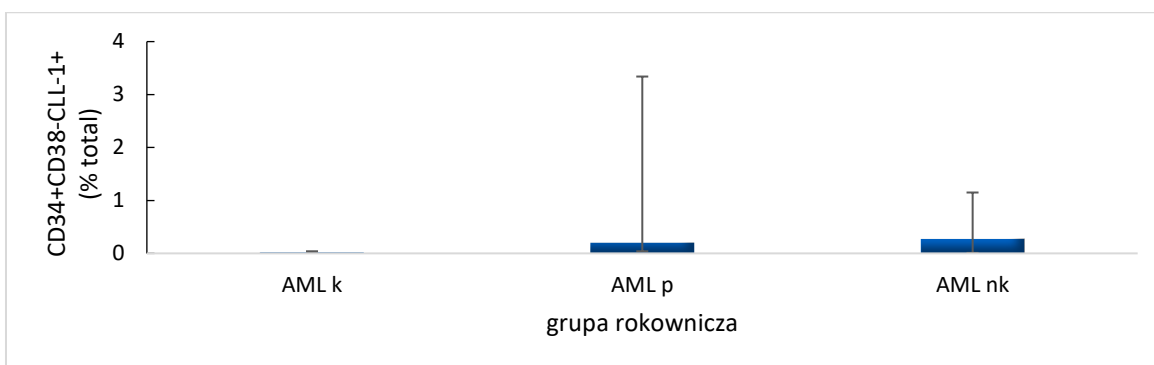
4.11.2 Komórki CD34+CD38-CLL-1+ w AML a rokowanie

- **Komórki CD34+CD38-CLL-1+ w populacji wszystkich komórek szpiku kostnego (% total) w AML, a rokowanie**

Tabela 57, Rycina 44 przedstawiają odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w trzech grupach rokowniczych pacjentów z AML.

Tabela 57. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w AML w trzech grupach rokowniczych

AML - Rokowanie	CD34+CD38-CLL-1+ (% total)			
	Q25	Mediana	Q75	p
Korzystne	0,00	0,02	0,04	n.s.
Pośrednie	0,04	0,20	3,34	n.s.
Niekorzystne	0,01	0,27	1,15	n.s.



Rycina 44. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w AML w trzech grupach rokowniczych

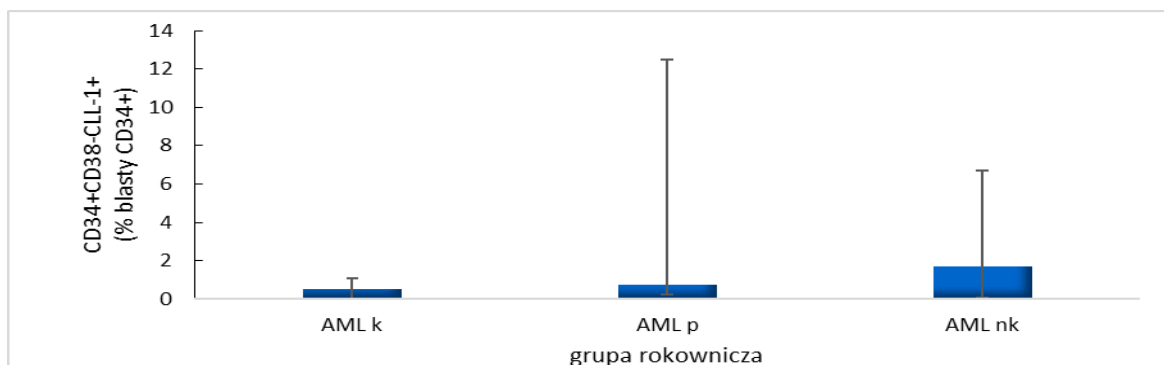
Wniosek: stwierdzono że, odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) nie ma związku z rokowaniem pacjentów z AML.

- **Komórki CD34+CD38-CLL-1+ w populacji blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+) w AML, a rokowanie**

Tabela 58, Rycina 45 przedstawiają odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w trzech grupach rokowniczych grupy badanej pacjentów z AML.

Tabela 58. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w AML w trzech grupach rokowniczych

AML - Rokowanie	CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+)			
	Q25	Mediana	Q75	p
Korzystne	0,00	0,54	1,08	n.s.
Pośrednie	0,24	0,76	12,50	n.s.
Niekorzystne	0,04	1,70	6,71	n.s.



Rycina 45. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w AML w trzech grupach rokowniczych

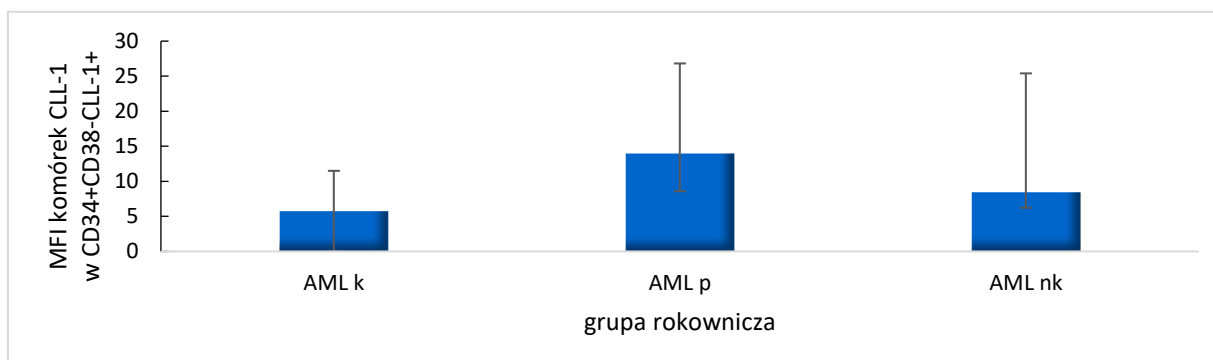
Wniosek: między podgrupami grupy badanej pacjentów z AML: AMLk, AMLp, AMLnk nie wykazano statystycznie istotnych różnic. Stwierdzono że, odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) u pacjentów z AML nie ma związku z rokowaniem. Zaobserwowano tendencję wzrostową tj. odnotowano wzrost liczby komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) wraz z pogorszeniem rokowania.

- **Wartość średniej intensywności fluorescencji cząsteczki CLL-1 w komórkach CD34+CD38-CLL-1+ u pacjentów z AML, a rokowanie**

Tabela 59, Rycina 46 przedstawiają wartości MFI cząsteczki CLL-1 w komórkach CD34+CD38-CLL-1+ w trzech grupach rokowniczych grupy badanej pacjentów z AML

Tabela 59. Wartości MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ w AML w trzech grupach rokowniczych

AML - Rokowanie	MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+			
	Q25	Mediana	Q75	p
Korzystne	0,00	5,75	11,50	n.s.
Pośrednie	8,60	13,98	26,82	n.s.
Niekorzystne	6,23	8,45	25,40	n.s.



Rycina 46. Wartości MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ w AML w trzech grupach rokowniczych

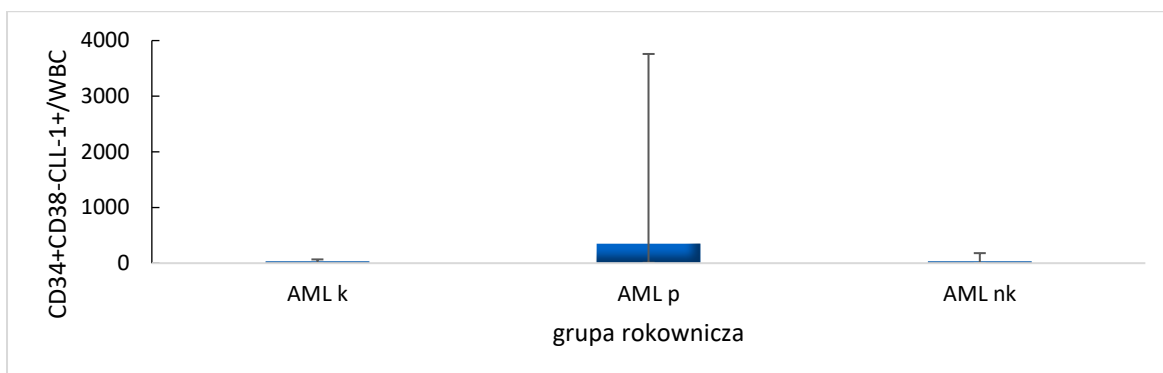
Wniosek: między podgrupami grupy badanej pacjentów z AML: AMLk, AMLp, AMLnk nie wykazano statystycznie istotnych różnic. Stwierdzono że, wartość MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ nie wykazuje związku z rokowaniem u pacjentów AML.

- **Liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L szpiku kostnego (CD34+CD38-CLL-1+/WBC) u pacjentów z AML, a rokowanie**

Tabela 60, Rycina 47 przedstawiają liczbę komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w trzech grupach rokowniczych grupy badanej pacjentów z AML.

Tabela 60. Liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w AML w trzech grupach rokowniczych

AML - Rokowanie	CD34+CD38-CLL-1+/WBC			
	Q25	Mediana	Q75	p
Korzystne	0,00	33,84	67,68	n.s.
Pośrednie	7,95	351,06	3759,03	n.s.
Niekorzystne	2,55	31,90	180,47	n.s.



Rycina 47. Liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w AML w trzech grupach rokowniczych

Wniosek: między podgrupami grup badanych pacjentów z AML: AMLk, AMLp, AMLnk nie wykazano statystycznie istotnych różnic. Stwierdzono że, liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC nie wykazuje związku z rokowaniem pacjentów AML.

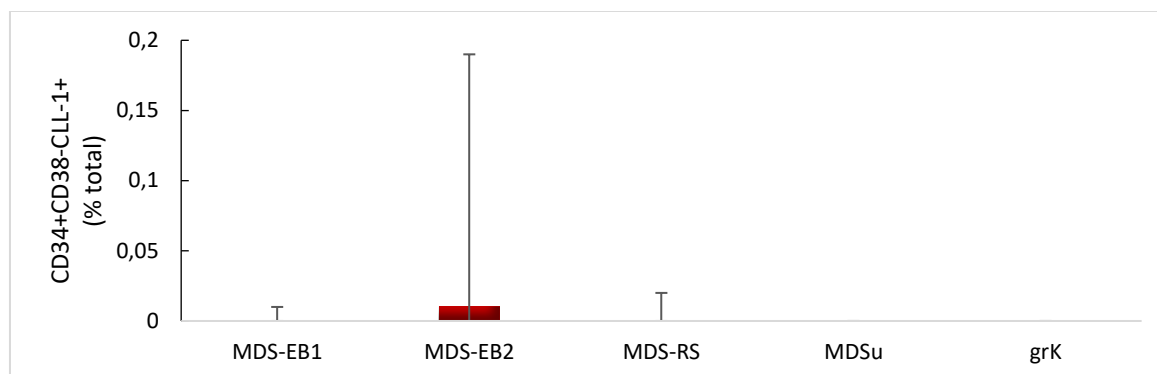
4.12 Identyfikacja komórek CD34+CD38-CLL-1+ u pacjentów z MDS

- **Komórki CD34+CD38-CLL-1+, u pacjentów z MDS, w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total)**

Tabela 61, Rycina 48 przedstawiają odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 61. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w podgrupach MDS (MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu) i w grupie kontrolnej

MDS	CD34+CD38-CLL-1+ (% total)			
	Q25	Mediana	Q75	p
MDS-EB1	0,00	0,00	0,01	0,0009
MDS-EB2	0,00	0,01	0,19	0,0001
MDS-RS	0,00	0,00	0,02	0,0004
MDSu	0,00	0,00	0,00	0,0374
grK	0,00	0,00	0,00	-



Rycina 48. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w podgrupach MDS (MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu) i w grupie kontrolnej

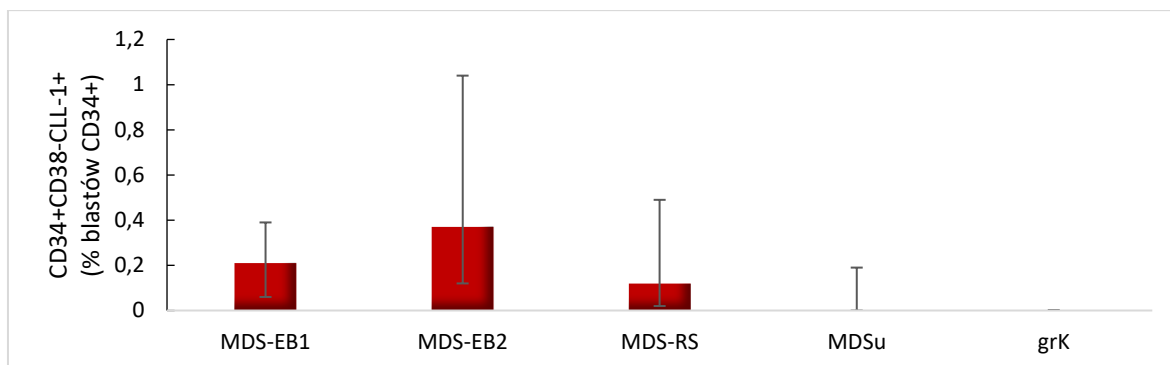
Wyniki: grupa kontrolna charakteryzuje się istotnie niższym odsetkiem komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w porównaniu do pacjentów grup badanych z: MDS-EB1 ($p=0,0009$), MDS-EB2 ($p=0,0001$), MDS-RS ($p=0,0004$) oraz MDSu ($p=0,0374$).

- **Komórki CD34+CD38-CLL-1+, u pacjentów z MDS, w odniesieniu do odsetka blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+)**

Tabela 62, Rycina 49 przedstawiają wartości CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 62. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w podgrupach MDS (MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu) i grupie kontrolnej

MDS	CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+)			
	Q25	Mediana	Q75	p
MDS-EB1	0,06	0,21	0,39	0,0009
MDS-EB2	0,12	0,37	1,04	0,0001
MDS-RS	0,02	0,12	0,49	0,0004
MDSu	0,00	0,00	0,19	0,0374
grK	0,00	0,00	0,00	-



Rycina 49. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w podgrupach MDS (MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu) i grupie kontrolnej

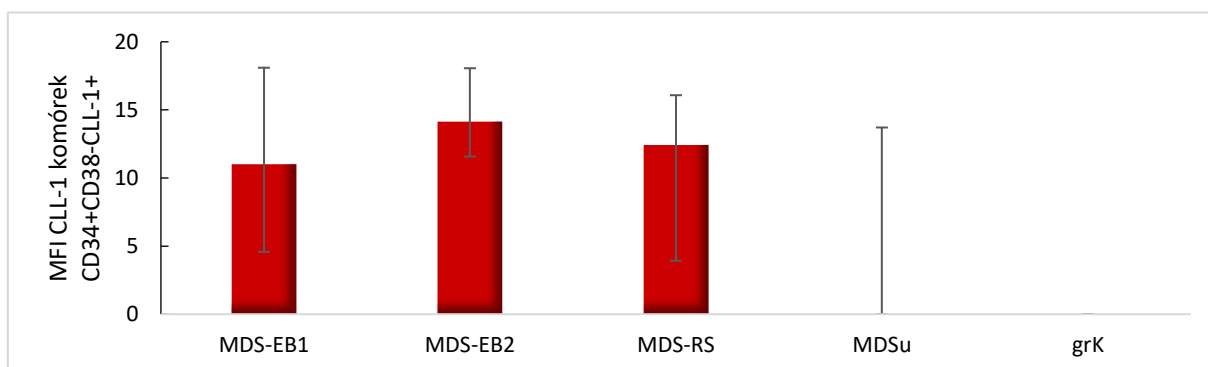
Wyniki: grupa kontrolna charakteryzuje się istotnie niższym odsetkiem komórek CD34+CD38-CLL-1+ w populacji blastów CD34+ w porównaniu do pacjentów z grup badanych: MDS-EB1 ($p=0,0009$), MDS-EB2 ($p=0,0001$), MDS-RS ($p=0,0004$) oraz MDSu ($p=0,0374$).

- **Wartość średniej intensywności fluorescencji cząsteczki CLL-1 w komórkach CD34+CD38-CLL-1+, u pacjentów z MDS**

Tabela 63, Rycina 50 przedstawiają wartości MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 63. Wartości MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ w podgrupach MDS (MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu) i grupie kontrolnej

MDS	MFI CLL komórek CD34+CD38-CLL-1+			
	Q25	Mediana	Q75	p
MDS-EB1	4,58	11,00	18,10	0,0009
MDS-EB2	11,58	14,14	18,06	0,0001
MDS-RS	3,93	12,41	16,08	0,0004
MDSu	0,00	0,00	13,71	0,0374
grK	0,00	0,00	0,00	-



Rycina 50. Wartości MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ w podgrupach MDS (MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu) i grupie kontrolnej

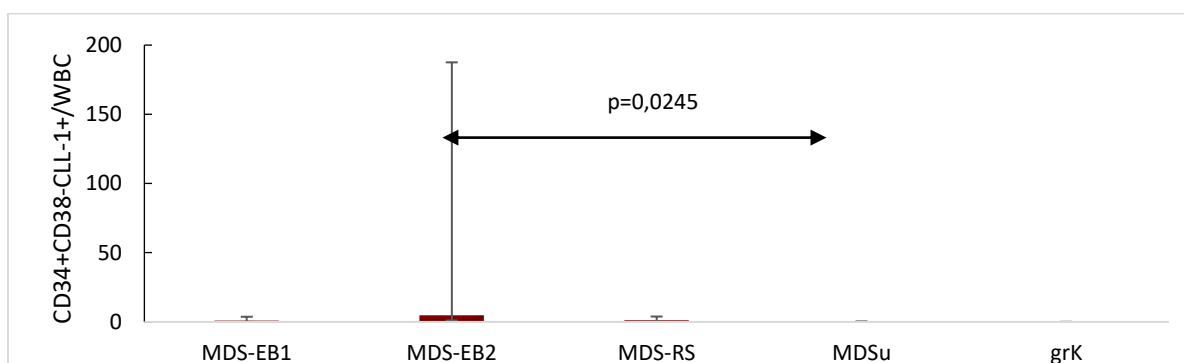
Wyniki: w grupie kontrolnej stwierdzono statystycznie istotnie niższą wartość MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ w porównaniu z pacjentami z grup badanych z: MDS-EB1 ($p=0,0009$), MDS-EB2 ($p=0,0001$), MDS-RS ($p=0,0004$), MDSu ($p=0,0374$).

- **Liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L szpiku kostnego (CD34+CD38-CLL-1+/WBC), u pacjentów z MDS**

Tabela 64, Rycina 51 przedstawiają liczbę komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w podgrupach grupy badanej i w grupie kontrolnej.

Tabela 64. Liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w podgrupach MDS (MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu) i grupie kontrolnej

MDS	CD34+CD38-CLL-1+/WBC			
	Q25	Mediana	Q75	p
MDS-EB1	0,03	0,89	3,71	0,0009
MDS-EB2	1,02	4,84	187,54	0,0001
MDS-RS	0,09	1,06	3,88	0,0004
MDSu	0,00	0,00	0,30	0,0374
grK	0,00	0,00	0,00	-



Rycina 51. Liczba komórek CD34+CD38-CLL+/WBC w podgrupach MDS (MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu) i grupie kontrolnej

Wniosek: grupa kontrolna charakteryzuje się istotnie niższą liczbą komórek CD34+CD38-CLL-1+ w porównaniu do pacjentów grupy badanej z MDS-EB1 ($p=0,0009$), z MDS-EB2 ($p=0,0001$), z MDS-RS ($p=0,0004$) oraz MDSu ($p=0,0374$). Wśród pacjentów MDS-EB2 stwierdzono istotnie wyższą liczbę komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC niż u MDSu ($p=0,0245$).

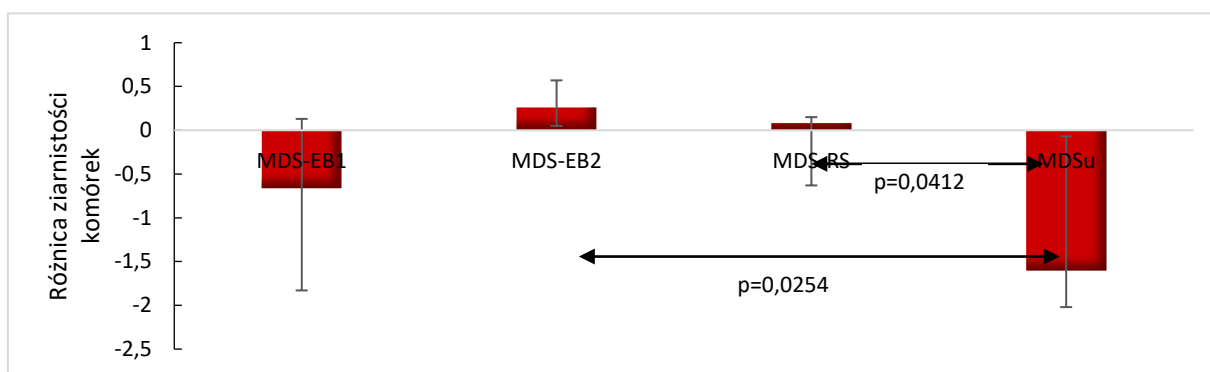
4.12.1 Ziarnistość i wielkości komórek CD34+CD38-CLL-1+ względem CD34+CD38-CLL-1-, w MDS

- **Ziarnistość komórek CD34+CD38-CLL-1+ względem CD34+CD38-CLL-1-, w MDS**

Tabela 65, Rycina 52 przedstawiają ziarnistość komórek w podgrupach grupy badanej z MDS.

Tabela 65. Ziarnistość komórek w podgrupach grupy badanej MDS (MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu)

MDS	Różnica ziarnistości komórek			
	Q25	Mediana	Q75	p
MDS-EB1	-1,83	-0,66	0,13	n.s.
MDS-EB2	0,05	0,26	0,57	p=0,0254
MDS-RS	-0,63	0,08	0,15	p=0,0412
MDSu	-2,02	-1,60	-0,07	n.s.



Rycina 52. Ziarnistość komórek w podgrupach grupy badanej MDS (MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu)

Wyniki: wykazano statystycznie istotną różnicę co do ziarnistości komórek. Pacjenci z MDSu wykazują istotnie niższą ziarnistość komórek w porównaniu z pacjentami z MDS-EB2 ($p=0,0254$) czy MDS-RS ($p=0,0412$).

- **Wielkość komórek CD34+CD38-CLL-1+ względem CD34+CD38-CLL-1-, w MDS**

Tabela 66, Rycina 53 przedstawiają wielkość komórek w podgrupach grupy badanej.

Tabela 66. Wielkość komórek w podgrupach grupy badanej MDS (MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu)

MDS	Różnica wielkości komórek			
	Q25	Mediana	Q75	p
MDS-EB1	-1,02	-0,63	-0,08	n.s.
MDS-EB2	-0,21	-0,01	0,00	n.s.
MDS-RS	-0,72	-0,23	-0,06	n.s.
MDSu	-1,27	-1,22	-0,21	n.s.



Rycina 53. Wielkość komórek w podgrupach grupy badanej MDS (MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu)

Wyniki: między podgrupami pacjentów z: MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS, MDSu nie wykazano statystycznie istotnych różnic w zakresie wielkości komórek.

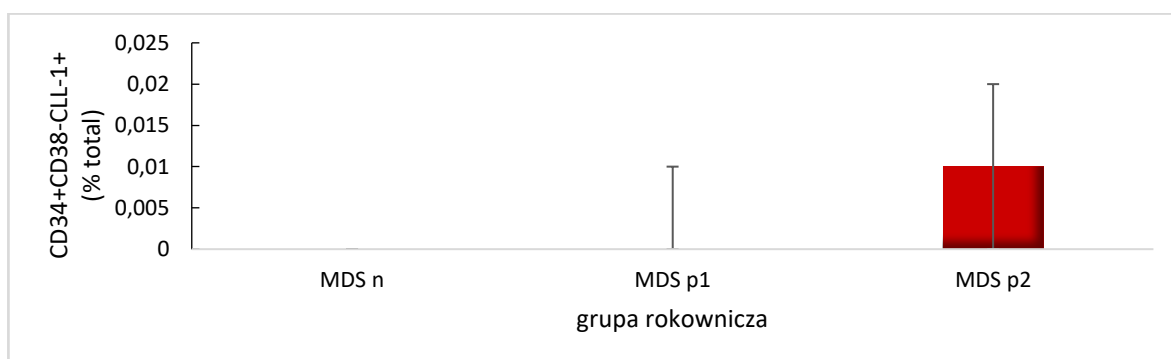
4.12.2 Komórki CD34+CD38-CLL-1+ w MDS a rokowanie

- **Komórki CD34+CD38-CLL-1+ w populacji wszystkich komórek szpiku kostnego (% total) w MDS, a rokowanie**

Tabela 67, Rycina 54 przedstawiają odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total), w trzech grupach rokowniczych grupy badanej pacjentów z MDS.

Tabela 67. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w MDS w trzech grupach rokowniczych

MDS - Rokowanie	CD34+CD38-CLL-1+ (% total)			
	Q25	Mediana	Q75	p
Niskie	0,00	0,00	0,00	n.s.
Pośrednie 1	0,00	0,00	0,01	n.s.
Pośrednie 2	0,00	0,01	0,02	n.s.



Rycina 54. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w MDS w trzech grupach rokowniczych

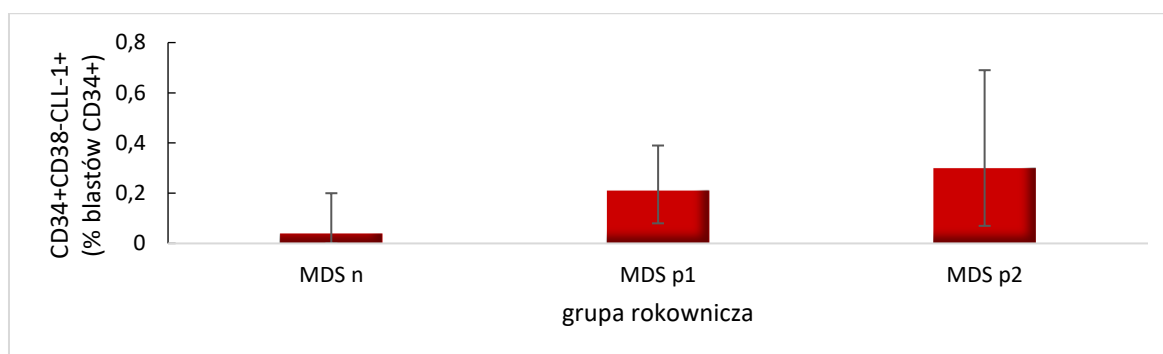
Wynik: między podgrupami pacjentów z: MDSn, MDSp1, MDSp2 nie wykazano statystycznie istotnych różnic. Stwierdzono, że odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) nie ma związku z rokowaniem pacjentów MDS.

- **Komórki CD34+CD38-CLL-1+ w populacji blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+) w MDS, a rokowanie**

Tabela 68, Rycina 55 przedstawiają odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w trzech grupach rokowniczych grupy badanej pacjentów z MDS.

Tabela 68. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w MDS w trzech grupach rokowniczych

MDS - Rokowanie	CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+)			
	Q25	Mediana	Q75	p
Niskie	0,00	0,04	0,20	n.s.
Pośrednie 1	0,08	0,21	0,39	n.s.
Pośrednie 2	0,07	0,30	0,69	n.s.



Rycina 55. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w MDS w trzech grupach rokowniczych

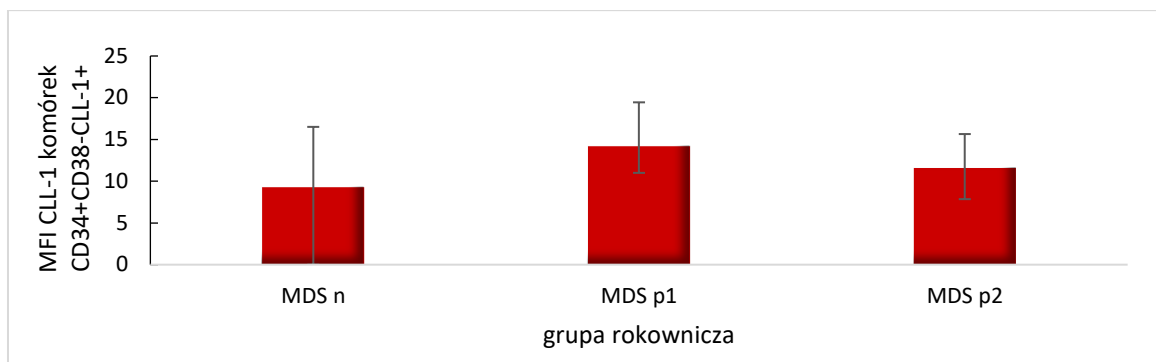
Wynik: między podgrupami grupy badanej MDS: MDSn, MDSp1, MDSp2 nie wykazano statystycznie istotnych różnic. Zauważono tendencję wzrostową tj. odnotowano wzrost odsetka komórek o profilu CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) wraz z pogorszeniem rokowania.

- **Wartość średniej intensywności fluorescencji cząsteczki CLL-1 w przedziale CD34+CD38-CLL-1+ w MDS, a rokowanie**

Tabela 69, Rycina 56 przedstawiają wartość MFI komórek CLL-1+ w przedziale CD34+CD38-CLL-1+, w podgrupach grupy badanej pacjentów z MDS.

Tabela 69. Wartości MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ w MDS w trzech grupach rokowniczych

MDS - Rokowanie	MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+			
	Q25	Mediana	Q75	p
Niskie	0,00	9,28	16,51	n.s.
Pośrednie 1	11,00	14,20	19,45	n.s.
Pośrednie 2	7,85	11,58	15,65	n.s.



Rycina 56. Wartości MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ w MDS w trzech grupach rokowniczych

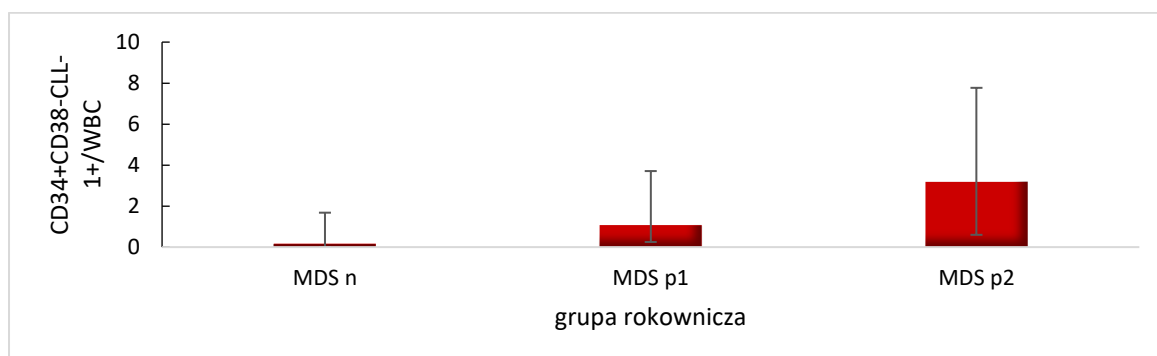
Wynik: między podgrupami grupy badanej pacjentów z MDS: MDSn, MDSp1, MDSp2 nie wykazano statystycznie istotnych różnic. Stwierdzono że, wartość MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ nie wykazuje związku z rokowaniem u pacjentów z MDS.

- **Liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L szpiku kostnego (CD34+CD38-CLL-1+/WBC) u pacjentów z MDS, a rokowanie**

Tabela 70, Rycina 57 przedstawiają liczbę komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w trzech grupach rokowniczych grupy badanej pacjentów z MDS.

Tabela 70. Liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w MDS w trzech grupach rokowniczych

MDS - Rokowanie	CD34+CD38-CLL-1+/WBC			
	Q25	Mediana	Q75	p
Niskie	0,00	0,17	1,68	n.s.
Pośrednie 1	0,25	1,08	3,71	n.s.
Pośrednie 2	0,60	3,18	7,77	n.s.



Rycina 57. Liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w MDS w trzech grupach rokowniczych

Wynik: między podgrupami MDSn, MDSp1, MDSp2 nie wykazano statystycznie istotnych różnic. Stwierdzono że, liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC nie ma wpływu na rokowanie pacjentów

MDS. Zaobserwowano tendencję wzrostową tj. odnotowano wzrost liczby komórek o profilu CD34+CD38-CLL-1+/WBC wraz z pogorszeniem rokowania.

4.13 Korelacja analizowanych parametrów u pacjentów którzy osiągnęli całkowitą remisję AML-CR

4.13.1 Obecność komórek LSC o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1+, w podgrupie AML-CR

W celu obliczenia odsetka komórek LSC u pacjentów z AML, którzy osiągnęli całkowitą remisję, a posiadali pozytywny status komórek LSC na początku leczenia, obliczono współczynnik korelacji rang Spearmana. Tabela 71 przedstawia uzyskane w badaniu wyniki.

Tabela 71. Obecność komórek LSC u pacjentów z AML-CR w trakcie kolejnych badań kontrolnych

Liczba badań	LSC-negatywne		LSC-pozytywne		Razem
	0	0,00%	5	100,00%	
1 badanie	0	0,00%	5	100,00%	5
2 badanie	1	33,33%	2	66,67%	3
3 badanie	1	100,00%	0	0,00%	1
Razem	2		12		14
R rang Spearman	-0,59		t=-2,506		p=0,0276

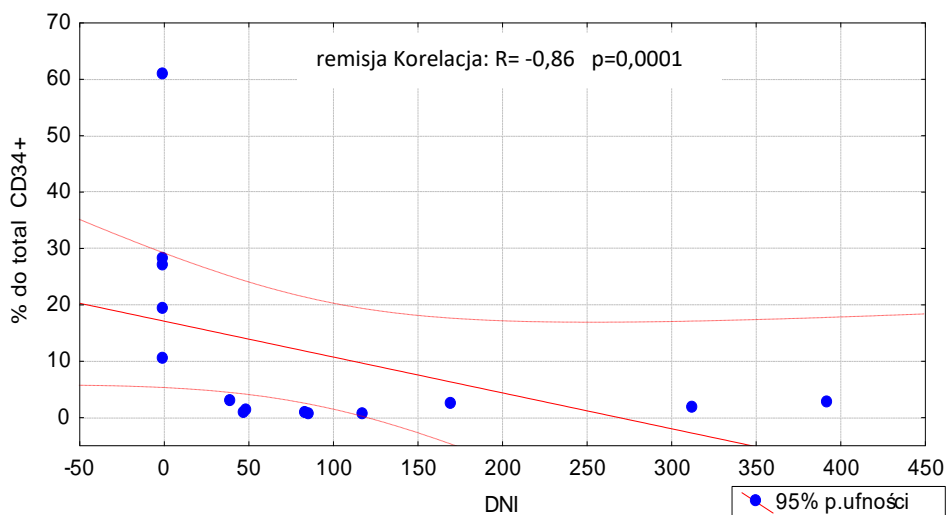
Wniosek: współczynnik korelacji rang Spearmana wyniósł -0,59, co oznacza że odsetek komórek LSC istotnie statystycznie obniżał się ($p = 0,0276$) w trakcie kolejnych badań szpiku kostnego. Pacjenci z AML-CR w ostatnim badaniu kontrolnym szpiku kostnego nie wykazywali obecności komórek LSC.

4.13.2 Blasty CD34+, w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), w podgrupie AML-CR

W celu sprawdzenia odsetka blastów CD34+ (% total) w trakcie kolejnych badań kontrolnych szpiku kostnego u pacjentów z AML-CR, obliczono współczynnik korelacji rang Spearmana. Tabela 72. Rycina 58 przedstawiają uzyskane w badaniu wyniki.

Tabela 72. Odsetek blastów CD34+ (% total) u pacjentów z AML-CR w trakcie kolejnych badań kontrolnych

Nr bad	N	CD34+ (% total)			Rang	Spearman
		Q25	Mediana	Q75	R	p
Liczba badań	5	19,14	26,68	27,89		
1 badanie	5	1,20	1,63	2,22	-0,86	0,0001
2 badanie	3	0,41	0,71	2,40		
3 badanie	1	0,28	0,28	0,28		



Rycina 58. Odsetek blastów CD34+ (% total) u pacjentów AML-CR w trakcie kolejnych badań kontrolnych

Wniosek: współczynnik korelacji rang Spearmana wyniósł $-0,86$, co oznacza, że odsetek komórek CD34+ (% total) istotnie statystycznie obniżał się ($p = 0,0001$) w trakcie kolejnych badań szpiku kostnego. Pacjenci, którzy osiągnęli całkowitą remisję wykazali niższy poziom komórek CD34+ niż na początku leczenia.

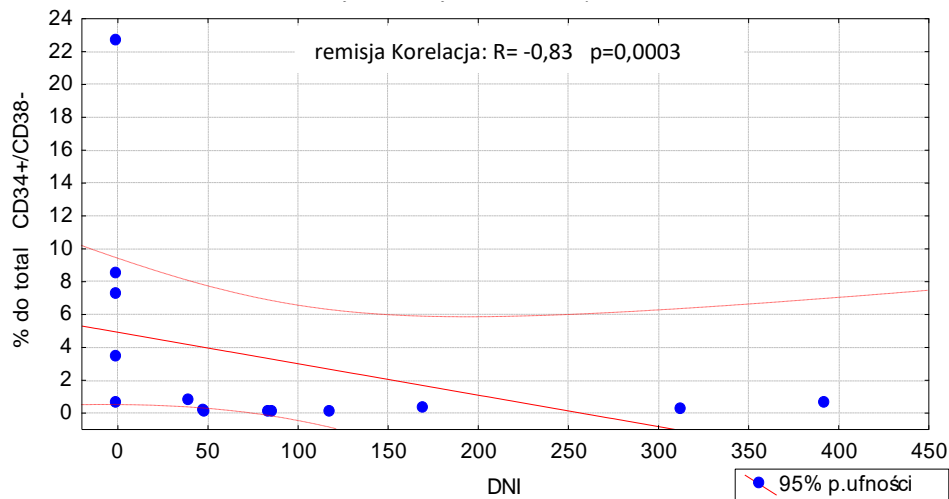
4.13.3 Komórki niszy szpikowej CD34+CD38- w podgrupie AML-CR

- **Komórki niszy szpikowej CD34+CD38-, w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), w podgrupie AML-CR**

W celu oceny różnic odsetka komórek niszy szpikowej CD34+CD38- (% total) w trakcie kolejnych badań kontrolnych u pacjentów z AML-CR obliczono współczynnik korelacji rang Spearmana. Tabela 73, Rycina 59 przedstawiają uzyskane w badaniu wyniki.

Tabela 73. Odsetek komórek CD34+CD38- (% total) pacjentów AML-CR w trakcie kolejnych badań kontrolnych

Nr bad	N	CD34+ (% total)			Rang	Spearman
		Q25	Mediana	Q75	R	p
Liczba badań	5	3,35	7,19	8,40	-0,83	0,0003
1 badanie	5	0,11	0,19	0,29		
2 badanie	3	0,01	0,05	0,53		
3 badanie	1	0,01	0,01	0,01		



Rycina 59. Odsetek komórek CD34+CD38- (% total) pacjentów AML-CR w trakcie kolejnych badań kontrolnych

Wniosek: Współczynnik korelacji rang Spearmana wyniósł -0,83, co oznacza, że odsetek komórek CD34+CD38- (% total) istotnie statystycznie obniżał się ($p = 0,0003$) w trakcie kolejnych badań. Pacjenci, którzy osiągnęli całkowitą remisję wykazali niższy odsetek komórek CD34+CD38- (% total) niż na początku leczenia.

- **Komórki niszy szpikowej CD34+CD38-, w odniesieniu do odsetka blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), w podgrupie AML-CR**

W celu sprawdzenia odsetka komórek niszy szpikowej CD34+CD38- (% blastów CD34+) w trakcie kolejnych badań kontrolnych szpiku kostnego wśród pacjentów AML-CR obliczono współczynnik korelacji rang Spearmana. Tabela 74 przedstawia uzyskane w badaniu wyniki.

Tabela 74. Odsetek komórek CD34+CD38- (% blastów CD34+) pacjentów AML-CR w trakcie kolejnych badań

Nr bad	N	CD34+CD38- (% blastów CD34+)			Rang Spearman	
		Q25	Mediana	Q75	R	p
Liczba badań	5	13,85	26,94	32,84	-0,48	0,0800
1 badanie	5	11,38	13,03	18,35		
2 badanie	3	2,47	6,52	22,06		
3 badanie	1	3,75	3,75	3,75		

Wniosek: współczynnik korelacji rang Spearmana wyniósł -0,48, co oznacza, że odsetek komórek CD34+CD38- (% blastów CD34+) obniżał się w trakcie kolejnych badań kontrolnych. Nie uzyskano istotności statystycznej ($p = 0,0800$) jednak wykazano jako trend malejący.

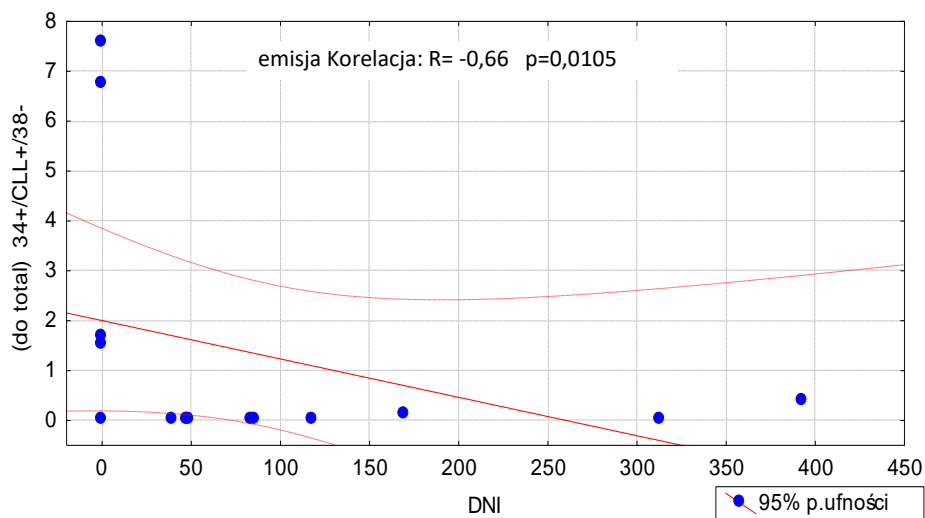
4.13.4 Komórki CD34+CD38-CLL-1+ w podgrupie AML-CR

- **Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+, w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), w podgrupie AML-CR**

W celu oceny odsetka komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) w trakcie kolejnych badań kontrolnych u pacjentów z AML-CR obliczono współczynnik korelacji rang Spearmana. Tabela 75, Rycina 60 przedstawiają uzyskane w badaniu wyniki.

Tabela 75. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) pacjentów AML-CR w trakcie badań kontrolnych

Nr bad	CD34+CD38-CLL-1+ (% total)				Rang	Spearm
	N	Q25	Mediana	Q75	R	p
Liczba badań	5	1,51	1,67	6,73	-0,66	0,0105
1 badanie	5	0,00	0,00	0,01		
2 badanie	3	0,00	0,00	0,39		
3 badanie	1	0,00	0,00	0,00		



Rycina 60. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) pacjentów AML-CR w trakcie badań kontrolnych

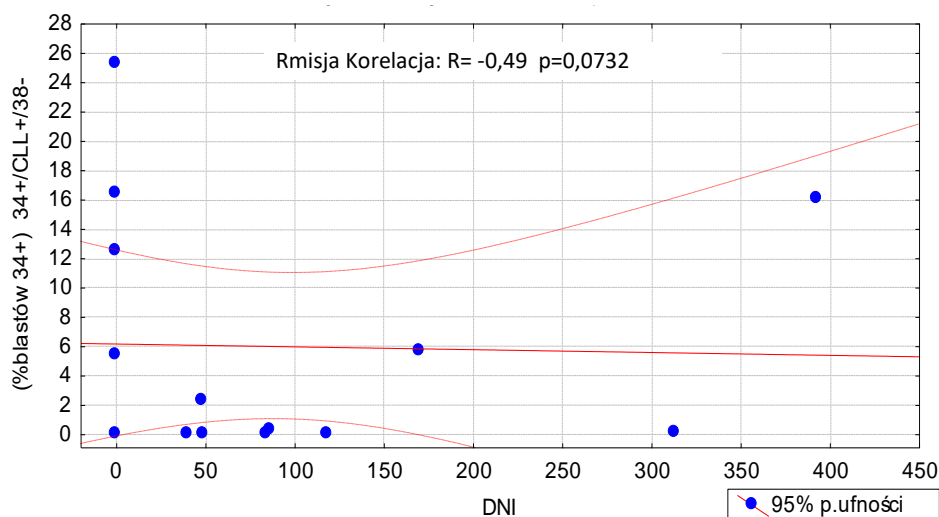
Wniosek: współczynnik korelacji rang Spearmana wyniósł -0,66 co oznacza, że odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) istotnie obniżał się ($p = 0,0105$) w trakcie kolejnych badań kontrolnych. Pacjenci, którzy osiągnęli całkowitą remisję nie wykazywali obecności komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total).

- **Komórki CD34+CD38-CLL-1+, w odniesieniu do odsetka blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), w podgrupie AML-CR**

W celu oceny odsetka komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w trakcie kolejnych badań kontrolnych u pacjentów z AML-CR obliczono współczynnik korelacji rang Spearmana. Tabela 76, Rycina 61 przedstawiają uzyskane w badaniu wyniki.

Tabela 76. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) pacjentów AML-CR w trakcie kolejnych badań kontrolnych

Nr bad	N	CD34+CD38-CLL+ (% blastów CD34+)			Rang	Spearm
		Q25	Mediana	Q75	R	p
Liczba badań	5	5,40	12,50	16,39	-0,49	0,0732
1 badanie	5	0,06	0,08	2,30		
2 badanie	3	0,00	0,33	16,03		
3 badanie	1	0,00	0,00	0,00		



Rycina 61. Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) pacjentów AML-CR w trakcie kolejnych badań kontrolnych

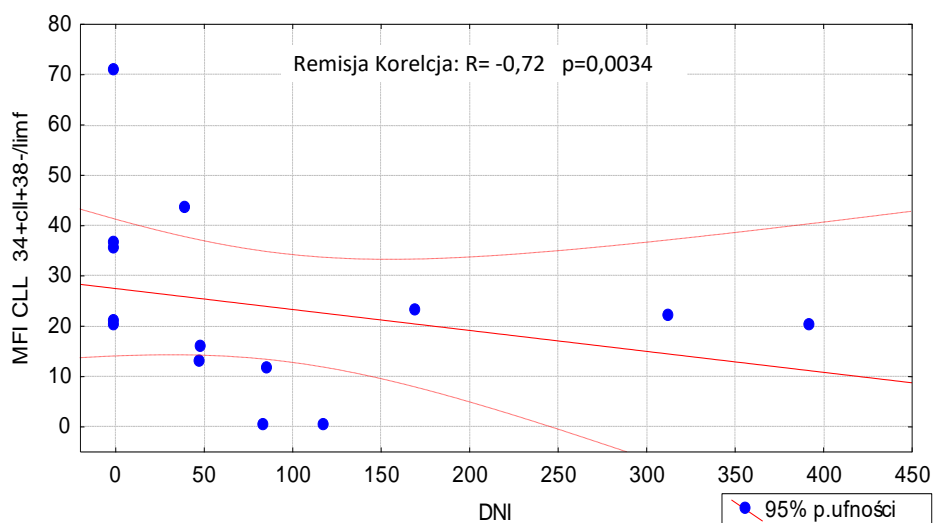
Wniosek: współczynnik korelacji rang Spearmana wyniósł -0,48 co oznacza, że odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) obniżał się w czasie kolejnych badań kontrolnych szpiku kostnego. Nie uzyskano istotności statystycznej ($p = 0,0732$) jednak zmiany te stanowią trend malejący.

- **Wartość średniej intensywności fluorescencji cząsteczki CLL-1 w komórkach CD34+CD38-CLL-1+, w podgrupie AML-CR**

W celu sprawdzenia poziomu MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ w trakcie kolejnych badań kontrolnych u pacjentów z AML-CR, obliczono współczynnik korelacji rang Spearmana. Tabela 77, Rycina 62 przedstawiają uzyskane w badaniu wyniki.

Tabela 77. Wartości MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ pacjentów AML-CR w trakcie kolejnych badań kontrolnych

Nr bad	MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+				Rang	Spearm
	N	Q25	Mediana	Q75	R	p
Liczba badań	5	20,73	35,21	36,41	-0,72	0,0034
1 badanie	5	15,74	21,73	22,99		
2 badanie	3	0,00	11,37	19,89		
3 badanie	1	0,00	0,00	0,00		



Rycina 62. Wartości MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ pacjentów AML-CR w trakcie kolejnych badań kontrolnych

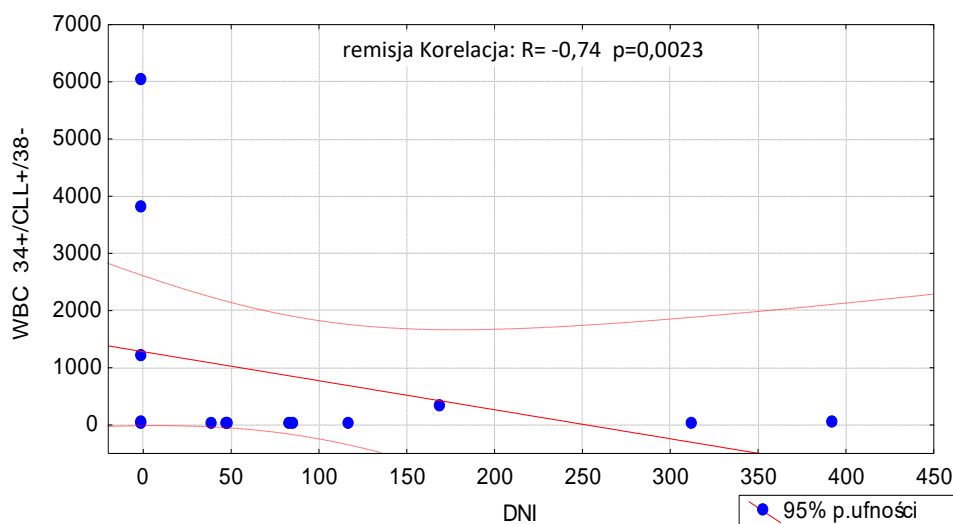
Wniosek: współczynnik korelacji rang Spearmana wyniósł -0,72 co oznacza, że intensywność fluorescencji cząsteczki CLL-1 w komórkach CD34+CD38-CLL-1+ istotnie statystycznie obniżał się ($p = 0,0034$) w trakcie kolejnych badań kontrolnych.

- Liczba komórek z ekspresją CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L szpiku kostnego (CD34+CD38-CLL-1+/WBC), w podgrupie AML-CR

W celu oceny jak kształtowała się liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC w trakcie kolejnych badań kontrolnych u pacjentów z AML-CR obliczono współczynnik korelacji rang Spearmana. Tabela 78, Rycina 63 przedstawiają uzyskane w badaniu wyniki.

Tabela 78. Liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC pacjentów z AML-CR w trakcie kolejnych badań kontrolnych

Nr bad	CD34+CD38-CLL-1+/WBC			Rang	Spearm
	N	Q25	Mediana		
Liczba badań	5	30	1174	3775	
1 badanie	5	0	1	1	-0,74 0,0023
2 badanie	3	0	0	27	
3 badanie	1	0	0	0	



Rycina 63. Liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC pacjentów z AML-CR w trakcie kolejnych badań kontrolnych

Wniosek: współczynnik korelacji rang Spearmana wyniósł -0,74, co oznacza, że liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC istotnie statystycznie obniżała się ($p = 0,0023$) w trakcie kolejnych badań kontrolnych. Pacjenci, którzy osiągnęli całkowitą remisję nie wykazywali obecności komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC.

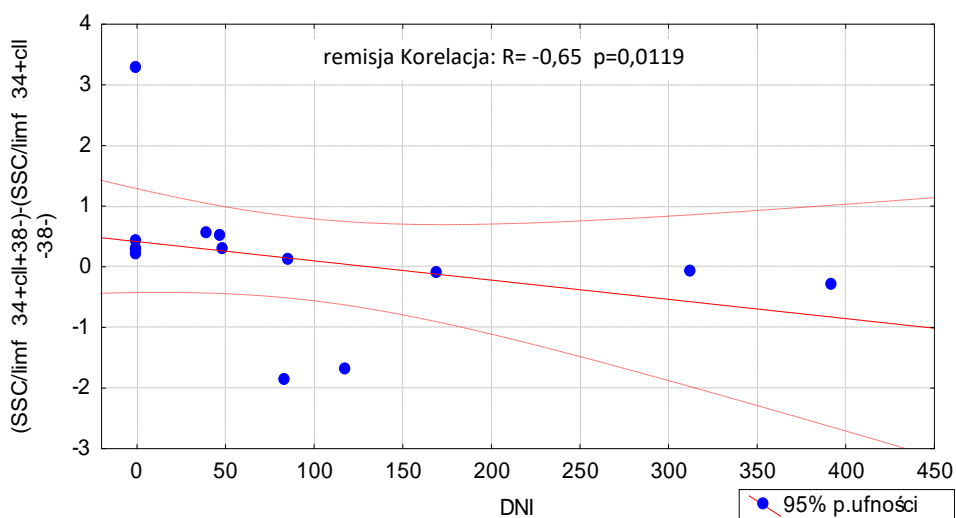
4.13.5 Porównanie ziarnistości i wielkości komórek CD34+CD38-CLL-1+ względem CD34+CD38-CLL-1-, w podrupie AML-CR

- Ziarnistość komórek CD34+CD38-CLL-1+ względem CD34+CD38-CLL-1-, w AML-CR

W celu oceny różnic w ziarnistości komórek u pacjentów z AML-CR, w trakcie kolejnych badań, obliczono współczynnik korelacji rang Spearmana. Tabela 79, Rycina 64 przedstawiają uzyskane w badaniu wyniki.

Tabela 79. Ziarnistość komórek u pacjentów AML-CR w trakcie kolejnych badań kontrolnych

Nr bad	Różnice ziarnistości komórek				Rang	Spearm
	N	Q25	Mediana	Q75	R	p
Liczba badań	5	0,26	0,27	0,40	-0,65	0,0119
1 badanie	5	-0,09	0,27	0,50		
2 badanie	3	-1,88	-0,31	0,10		
3 badanie	1	-1,72	-1,72	-1,72		



Rycina 64. Ziarnistość komórek u pacjentów z AML-CR w trakcie kolejnych badań kontrolnych

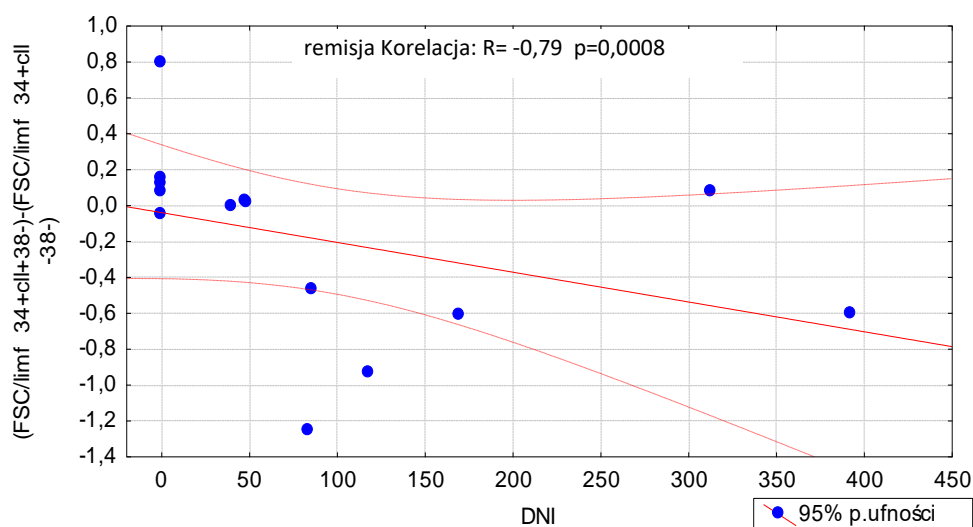
Wniosek: współczynnik korelacji rang Spearmana wyniósł -0,65 co oznacza, że komórki stawały się mniej ziarniste w trakcie kolejnych badań kontrolnych szpiku kostnego (p = 0,0119).

- **Wielkość komórek CD34+CD38-CLL-1+ względem CD34+CD38-CLL-1-, w AML-CR**

W celu oceny różnicy wielkości komórek u pacjentów z AML-CR, w trakcie kolejnych badań kontrolnych, obliczono współczynnik korelacji rang Spearmana. Tabela 80, Rycina 65 przedstawiają uzyskane w badaniu wyniki.

Tabela 80. Wielkość komórek u pacjentów AML-CR w trakcie kolejnych badań kontrolnych

Nr bad	Różnica wielkości komórek			Rang	Spearm	
	N	Q25	Mediana	Q75	R	p
Liczba badań	5	0,07	0,11	0,15	-0,79	0,0008
1 badanie	5	-0,01	0,02	0,02		
2 badanie	3	-1,26	-0,61	-0,48		
3 badanie	1	-0,94	-0,94	-0,94		



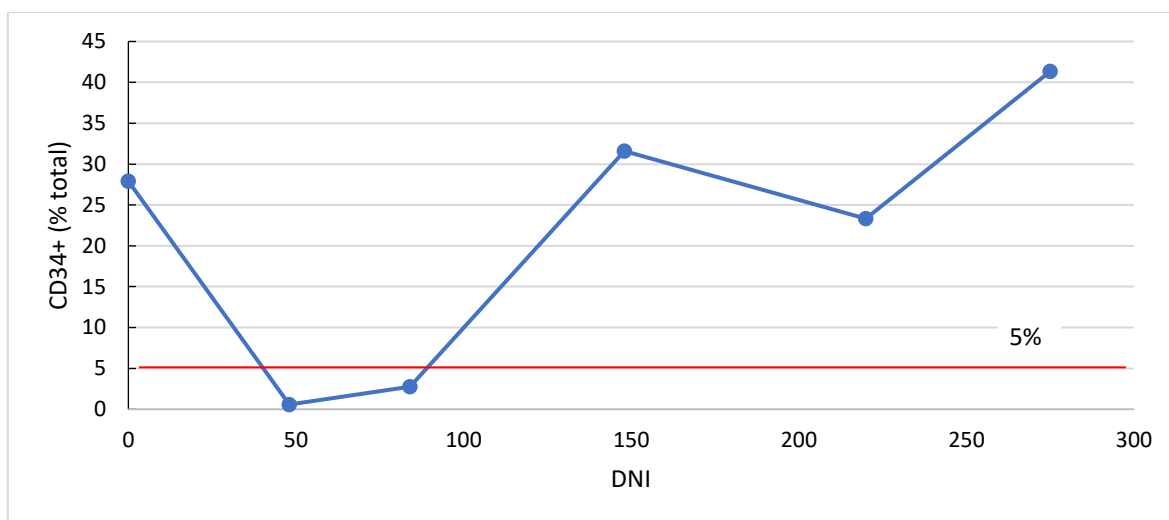
Rycina 65. Wielkość komórek u pacjentów z AML-CR w trakcie kolejnych badań kontrolnych

Wniosek: współczynnik korelacji rang Spearmana wyniósł -0,79, co oznacza że komórki stawały się mniejsze w trakcie kolejnych badań kontrolnych szpiku kostnego (p = 0,0008).

4.14 Korelacja parametrów cytometrycznych w diagnostyce prezentowanych przypadków

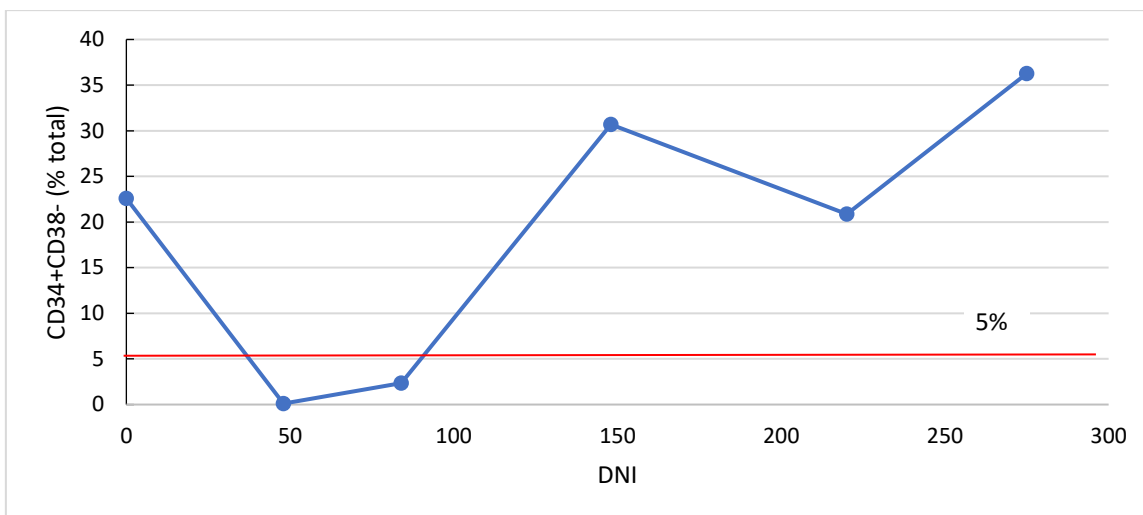
4.14.1 PRZYPADEK 1

W celu prezentacji praktycznego wykorzystania poszczególnych parametrów cytometrycznych do oceny nawrotu choroby posłużył przypadek z grupy badanej 71 letniego pacjenta z rozpoznaną AML z nieprawidłowościami cytogenetycznymi AML t(8,21) (q21;q22,1), o niekorzystnym rokowaniu. Dysponowano sześcioma próbkami szpiku kostnego pobranymi w okresie od kwietnia 2018 r. do stycznia 2019 r. w Klinice Hematologii Dorosłych z Oddziałem Transplantacji Szpiku PUM w Szczecinie, celem monitorowania rozwoju choroby. Wszystkie próby szpiku kostnego przebadano w Zakładzie Patomorfologii SPSK1 pod kątem obecności komórek złośliwych CD34+CD38-CLL-1+. Na Rycinach od 66 do 72 przedstawiono poziom ekspresji analizowanych parametrów. Oś X przedstawia analizowany parametr, oś Y czas w którym wykonano badanie szpiku kostnego. Pierwsze badanie szpiku kostnego, w którym rozpoznano AMLg uznano za punkt zero, każdy kolejny punkt oznacza liczbę dni, do kolejnego badania. Na Rycinach tj. 66, 67, 70 naniesiono czerwoną linię, odcinającą odsetek blastów poniżej 5%, co oznacza remisję morfologiczną.



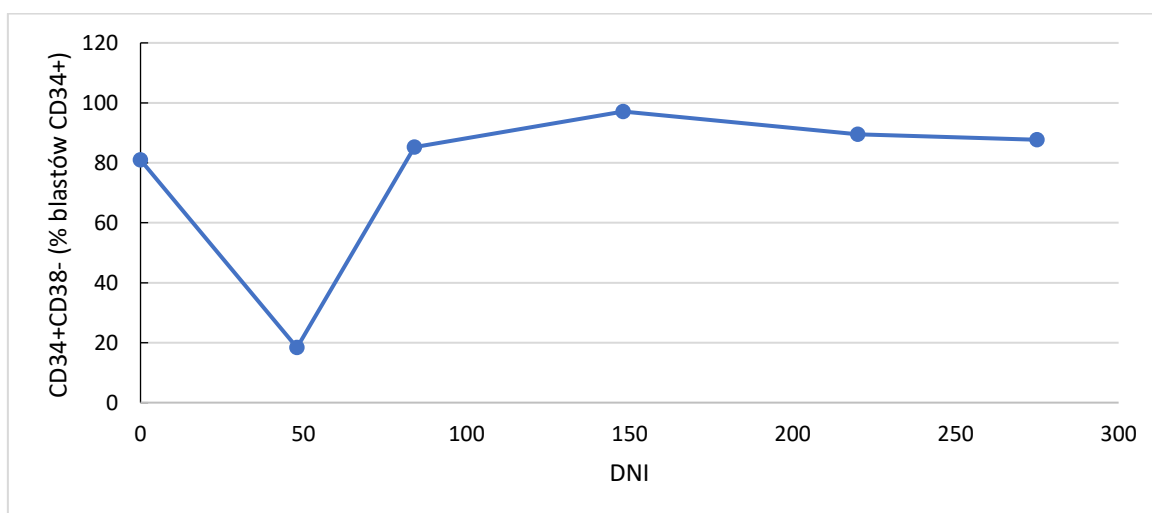
Rycina 66. Odsetek blastów CD34+ (% total) u pacjenta z AML w trakcie kolejnych badań

Wniosek: odsetek blastów CD34+, w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego, w pierwszym badaniu wskazał na rozpoznanie AML (odsetek blastów powyżej 20%). Drugie i trzecie badanie sugeruje remisję morfologiczną (odsetek blastów poniżej 5%). Pozostałe badania wskazały wysokie wartości CD34+ (% total) oznaczające wznowę AML.



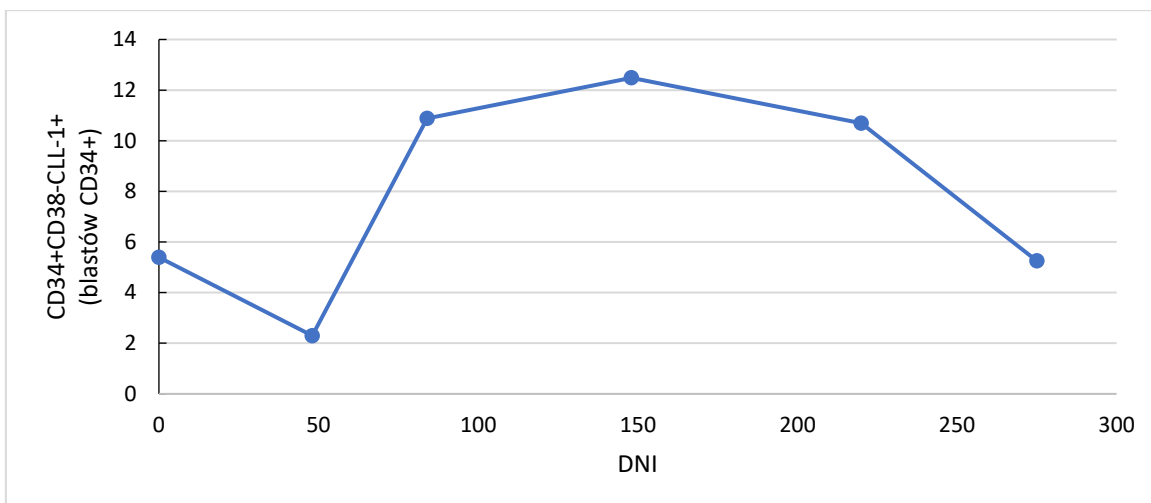
Rycina 67. Odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38- (% total) u pacjenta z AML w trakcie kolejnych badań

Wniosek: odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38-, w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego, w pierwszym badaniu pozwolił rozpoznać AML (odsetek blastów powyżej 20%). Drugie i trzecie badanie sugeruje remisję morfologiczną (odsetek blastów poniżej 5%), pozostałe badania wskazały wysokie wartości CD34+CD38- (% total) oznaczające wznowę choroby.



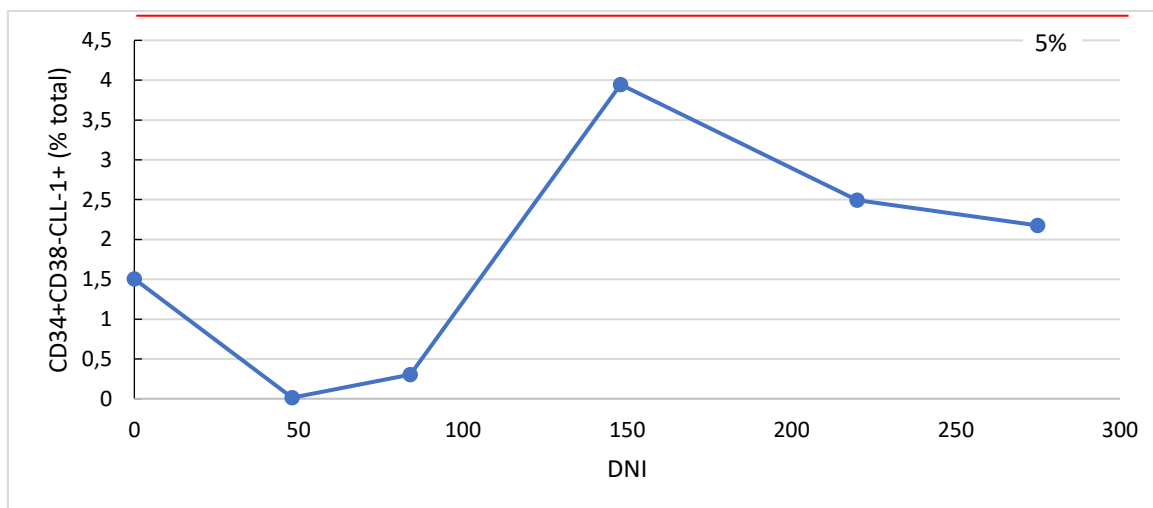
Rycina 68. Poziom ekspresji komórek niszy szpikowej CD34+CD38- (% blastów CD34+) u pacjenta z AML w trakcie kolejnych badań

Wniosek: podczas rozpoznania AMLg (w pierwszym badaniu) odnotowano wysoki odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38-, w odniesieniu do blastów wykazujących ekspresję CD34+. W drugim badaniu (uznanym za morfologiczną remisję) nastąpił znaczny spadek odsetka analizowanych komórek. Kolejne badania szpiku kostnego sugerują wzrost odsetka analizowanych komórek, powyżej poziomu z rozpoznania, co sugeruje wznowę AML.



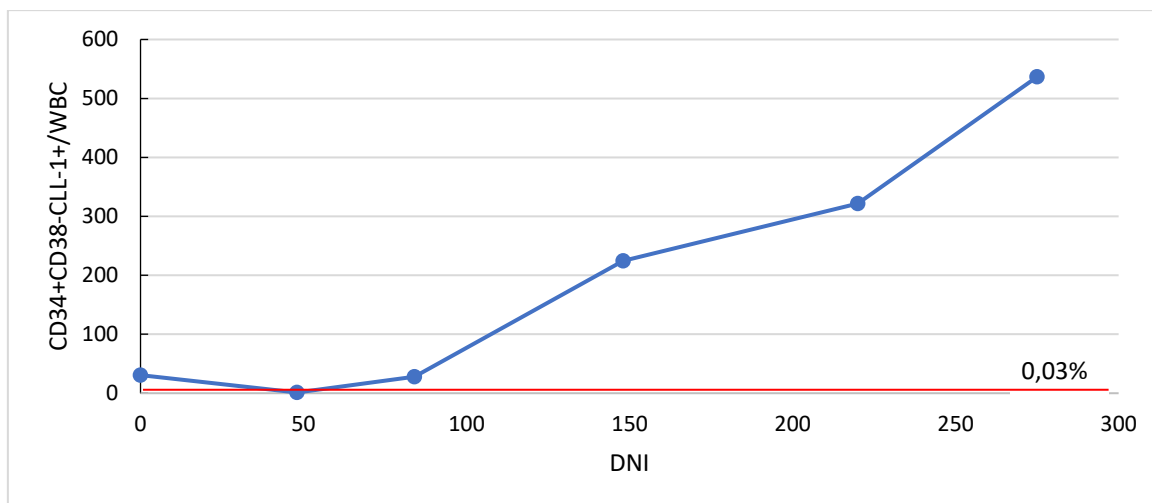
Rycina 69. Poziom ekspresji komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) u pacjenta z AML w trakcie kolejnych badań

Wniosek: odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+, w odniesieniu do blastów wykazujących ekspresję CD34+, w momencie rozpoznania AML wyniósł ~5%. Podczas drugiego badania (uznanym za morfologiczną remisję), odnotowano dwukrotnie niższy odsetek analizowanych komórek. W trzecim, czwartym i piątym badaniu odnotowano dwukrotnie wyższy poziom komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) niż w momencie rozpoznania, co sugeruje wznowę AML.



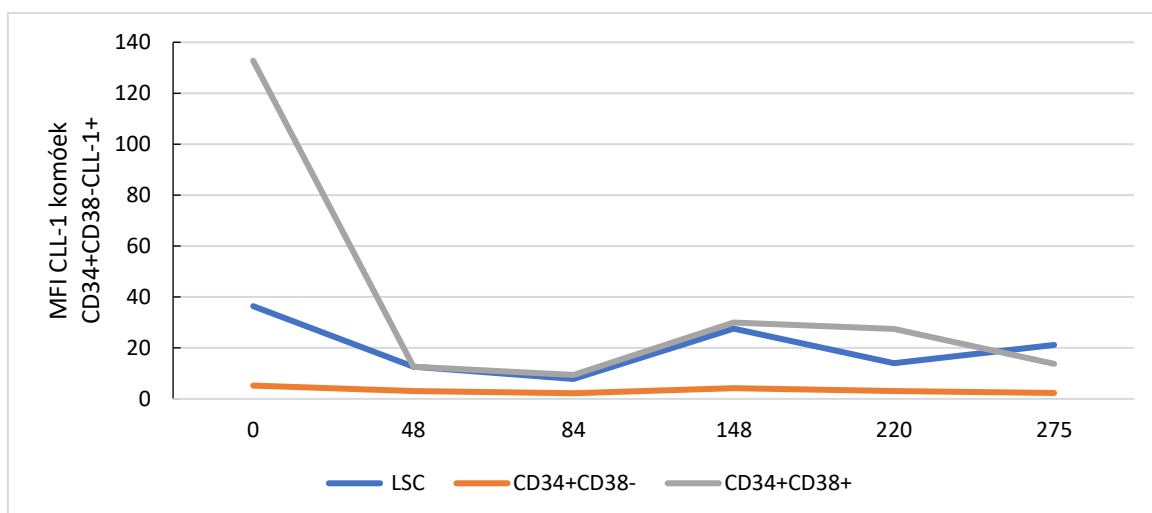
Rycina 70. Poziom ekspresji komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) u pacjenta z AML w trakcie kolejnych badań

Wniosek: wszystkie badania szpiku kostnego tego pacjenta potwierdziły obecność komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total), których odsetek znajdował się poniżej 5%, co wskazuje na ich niską wartość diagnostyczną w ocenie remisji przy progu odcięcia blastów wynoszącym 5%.



Rycina 71. Poziom ekspresji komórek CD34+CD38-CLL-1+/WBC u pacjenta z AML w trakcie kolejnych badań

Wniosek: liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L szpiku kostnego, wyrażona jako parametr CD34+CD38-CLL-1+/WBC, w pierwszym badaniu wynosiła ~30 komórek/1 μ L. W drugim badaniu (uznanym za remisję morfologiczną) spadła do poziomu 1 komórki/1 μ L. Trzecie badanie (również uznane za remisję morfologiczną) wskazało ponowny wzrost liczby analizowanych komórek do poziomu zbliżonego rozpoznaniu ~28 komórek/1 μ L, co sugerowało wznowę AML. Każde kolejne badanie wskazało wysokie wartości analizowanego parametru, tym samym brak remisji.



Rycina 72. Poziom MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ u pacjenta z AML w trakcie kolejnych badań

Wniosek: wartości MFI CLL-1 komórek CD34+CD38-CLL-1+ są na podobnym poziomie intensywności jak komórki CD34+CD38+, co sugeruje stabilność antygenu CLL-1 na każdym etapie badania.

- **Omówienie przypadku 1**

Pacjent z AMLg, po chemioterapii osiągnął morfologiczną remisję z odsetkiem blastów CD34+, w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total) poniżej progu 5%, w drugim i trzecim badaniu. W każdym kolejnym badaniu szpiku kostnego odsetek komórek CD34+ (% total) przekroczył próg 5%, co świadczyło o wznowie choroby. Odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38- (% total) był równoległy do populacji CD34+ (% total) we wszystkich dostępnych badaniach szpiku kostnego.

W badaniu własnym skupiono szczególną uwagę na drugim i trzecim badaniu szpiku kostnego, w którym rozpoznano remisję morfologiczną. W momencie trzeciego badania oznaczono również molekularnie MRD na poziomie 0,01% co potwierdziło całkowitą remisję, mimo to, po okresie miesiąca nastąpiła wznowa choroby.

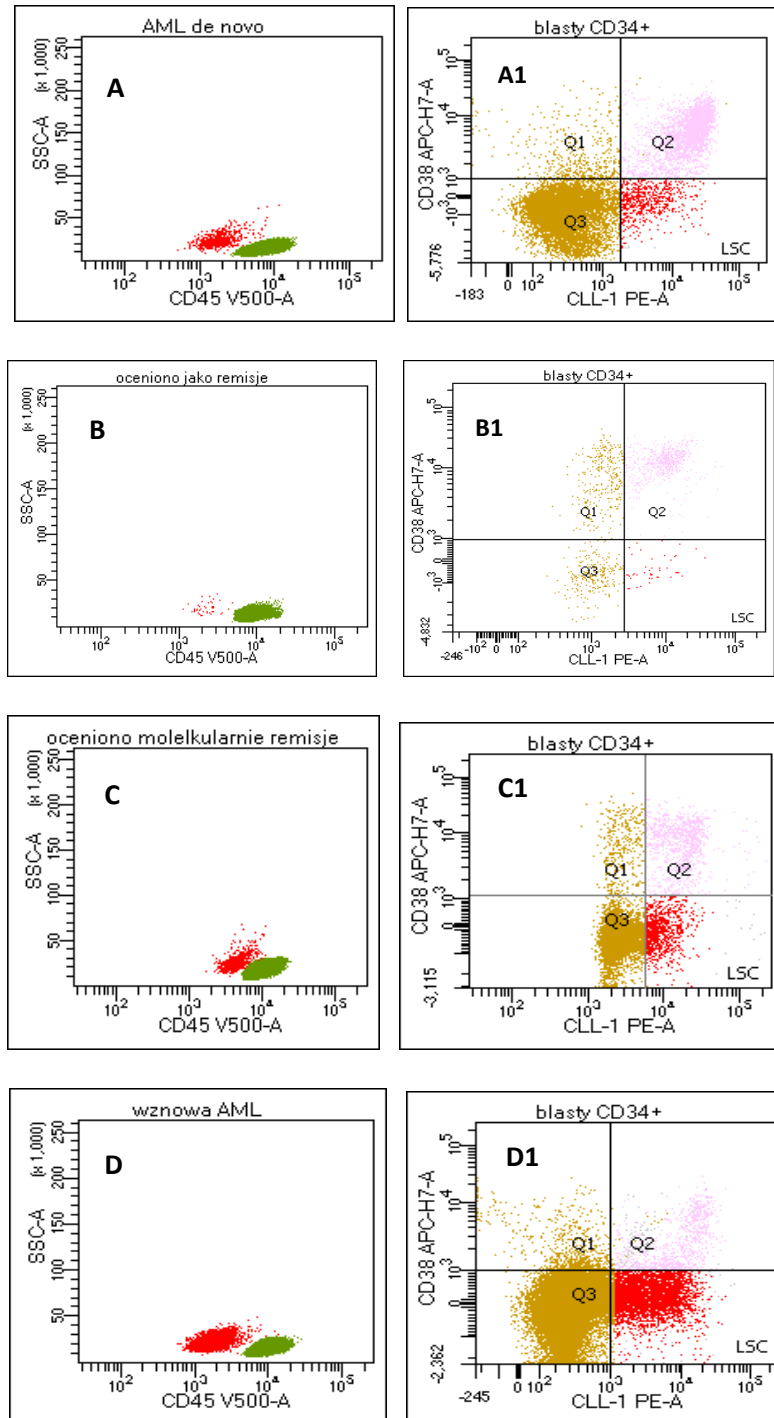
W trzecim badaniu kontrolnym odsetek komórek niszy szpikowej o immunofenotypie CD34+CD38-, w odniesieniu do odsetka blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+) wzrósł czterokrotnie względem badania drugiego i osiągnął poziom zbliżony do rozpoznania AMLg co oznacza, że znacznie wzrósł poziom komórek niszy szpikowej. Podobnie, odsetek komórek LSC określony jako CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+) w trzecim badaniu wzrósł zauważalnie w porównaniu do odsetka tych komórek w momencie rozpoznania. Pozwala to zaobserwować wzrost odsetka komórek nowotworowych CD34+CD38-CLL-1+ w badaniu trzecim – uznanym w badaniu molekularnym za całkowitą remisję.

Komórki LSC stanowią znikomą populację w badaniach MRD, interpretacja populacji CD34+CD38-CLL-1+, w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total) biorąc pod uwagę próg 5% (morfologicznej remisji) jest utrudniona. W trzecim badaniu szpiku kostnego odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ (% total) nie przekroczył progu morfologicznej remisji, zatem nie wskazał jednoznacznie na wznowę.

Dopiero poziom LSC wyrażony jako liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L szpiku kostnego przy przyjętym progu odcięcia 0,03% ukazuje, iż w trzecim pobraniu szpiku kostnego (uznanym za remisję) liczba komórek LSC osiągnęła poziom sprzed rozpoznania. Oznacza to, że liczba komórek złośliwych wzrosła do momentu rozpoznania AML, co wskazuje na złe rokowanie choroby mimo braku objawów morfologicznych. W kolejnych badaniach (badanie 4, 5, 6) nie udało się wyeliminować złośliwych komórek, LSC były nadal obecne.

Średnia intensywność fluorescencji cząsteczki CLL-1 komórek LSC, we wszystkich badaniach szpiku kostnego była podobna do MFI cząsteczki CLL-1 komórek progenitorowych CD34+CD38+ i utrzymywała się na względnie stabilnym poziomie co sugeruje stabilność antygeny CLL-1 (85,92,100) na wszystkich etapach choroby.

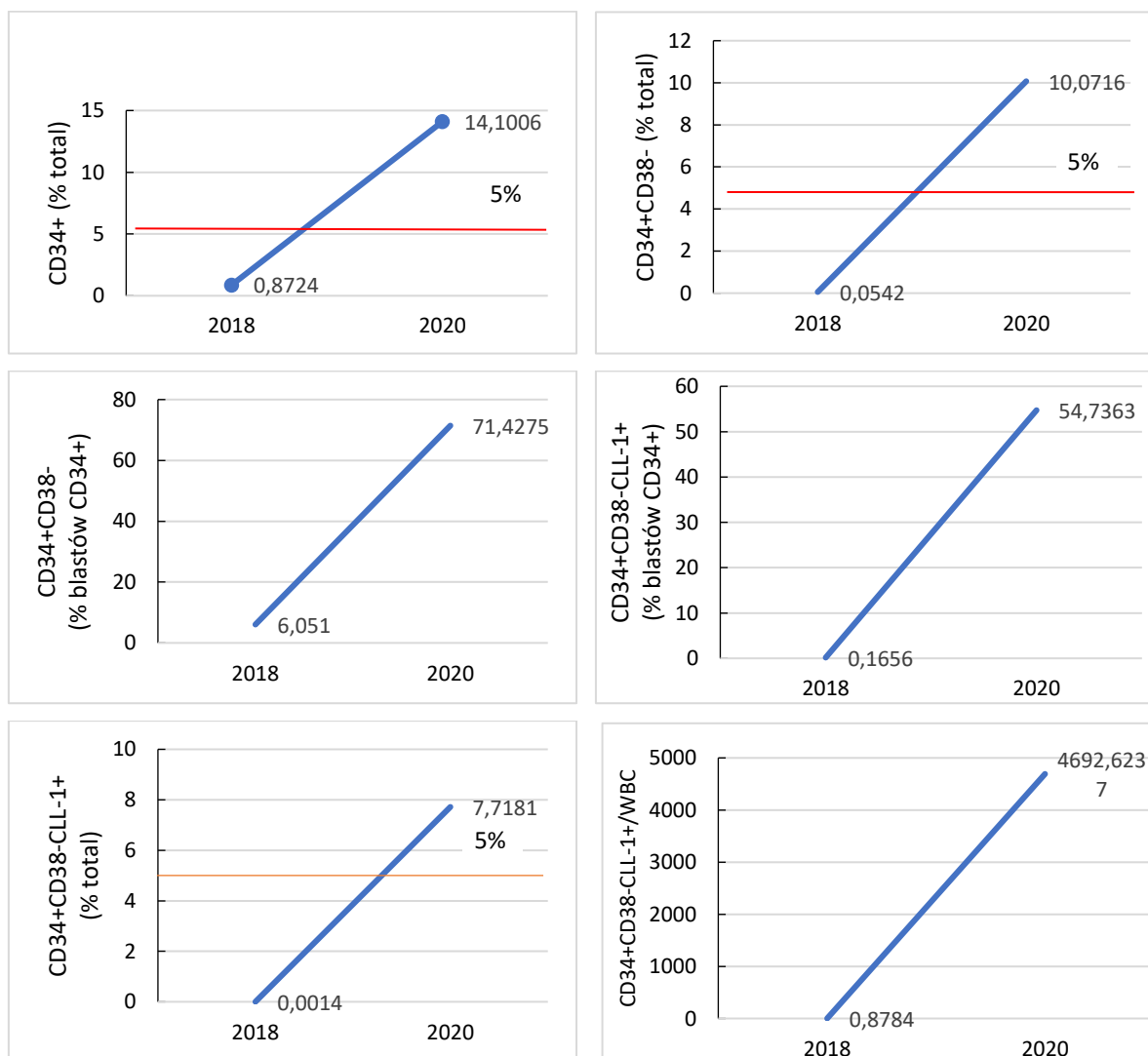
Cytometryczny wzór ekspresji komórek CD34+CD38-CLL-1+ na różnych etapach choroby opisywanego pacjenta AMLg, u którego nastąpiła remisja choroby, a następnie wznowa AMLg, przedstawiono na Rycinie 73.



Rycina 73. Wzór ekspresji blastów CD34+ na różnych etapach choroby AML pacjenta ze wznową. Prawy dolny kwadrant (kolor czerwony) stanowią komórki CD34+CD38-CLL-1+. **A. A1** diagnoza AML, **B.B1** remisja morfologiczna, **C. C1** remisja molekularna, **D. D1** wznowa AML. Na wszystkich etapach choroby widoczne są komórki CD34+CD38-CLL-1+

4.14.2 PRZYPADK 2

W celu sprawdzenia jak kształtują się poszczególne parametry cytometryczne w trakcie kolejnych pobrań szpiku kostnego u 63 letniego pacjenta z grupy badanej z rozpoznaniem MPN, u którego po okresie dwóch lat, rozwinęła się AML, przeanalizowano dwie próbki szpiku kostnego pobrane w okresie od lipca 2018 r. do września 2019 r. w Klinice Hematologii Dorosłych z Oddziałem Transplantacji Szpiku PUM w Szczecinie, celem monitorowania rozwoju choroby. Próby przebadano pod kątem obecności komórek złośliwych CD34+CD38-CLL-1+ w Zakładzie Patomorfologii SPSK1 PUM w Szczecinie. Rycina 74 przedstawia uzyskane w badaniu wyniki. Oś X przedstawia analizowany parametr, oś Y rok w którym wykonano badanie szpiku kostnego. Na wykresach odnoszących się do całości leukocytów wartości poniżej czerwonej linii oznaczają remisję morfologiczną.

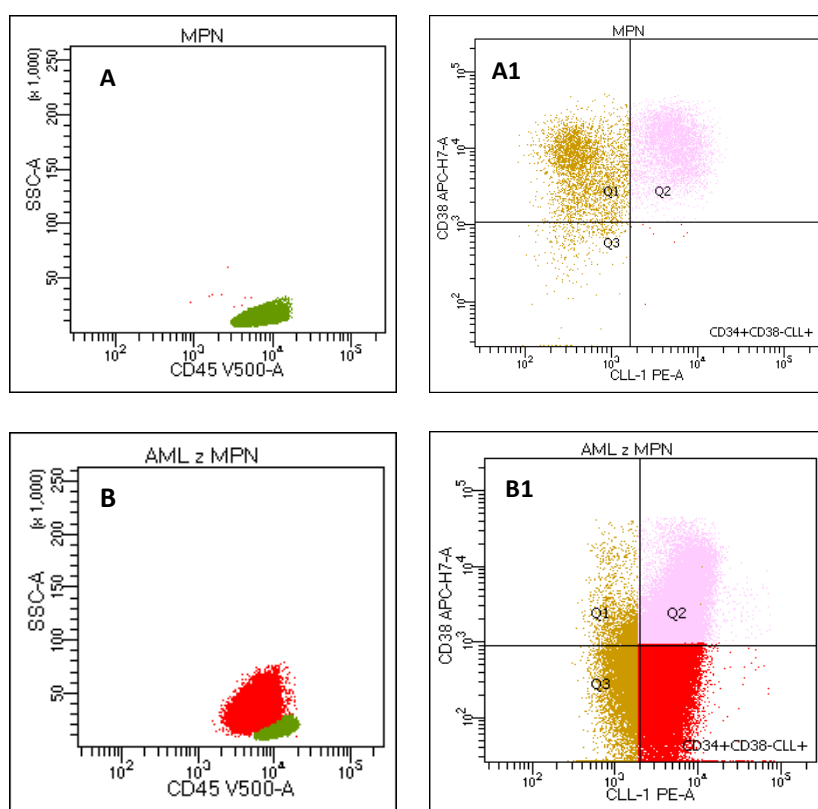


Rycina 74. Wartości: CD34+ (% total), CD34+CD38- (% total), CD34+CD38- (% blastów CD34+), CD34+CD38-CLL-1+ (% total), CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+), CD34+CD38-CLL-1+/WBC u pacjenta z MPN.

Wniosek:

Odsetek blastów CD34+ oraz odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38-, w stosunku do wszystkich komórek szpiku kostnego, oraz komórki niszy szpikowej CD34+CD38-, w stosunku do komórek wykazujących ekspresję CD34+, wyraźnie wzrósł między rozpoznaniem MPN a AML. Podobnie, odnotowano znaczny wzrost odsetka komórek złośliwych CD34+CD38-CLL-1+, w stosunku do: wszystkich komórek szpiku kostnego, komórek wykazujących ekspresję CD34+ oraz liczby komórek LSC w 1 μ L szpiku kostnego, w momencie AML.

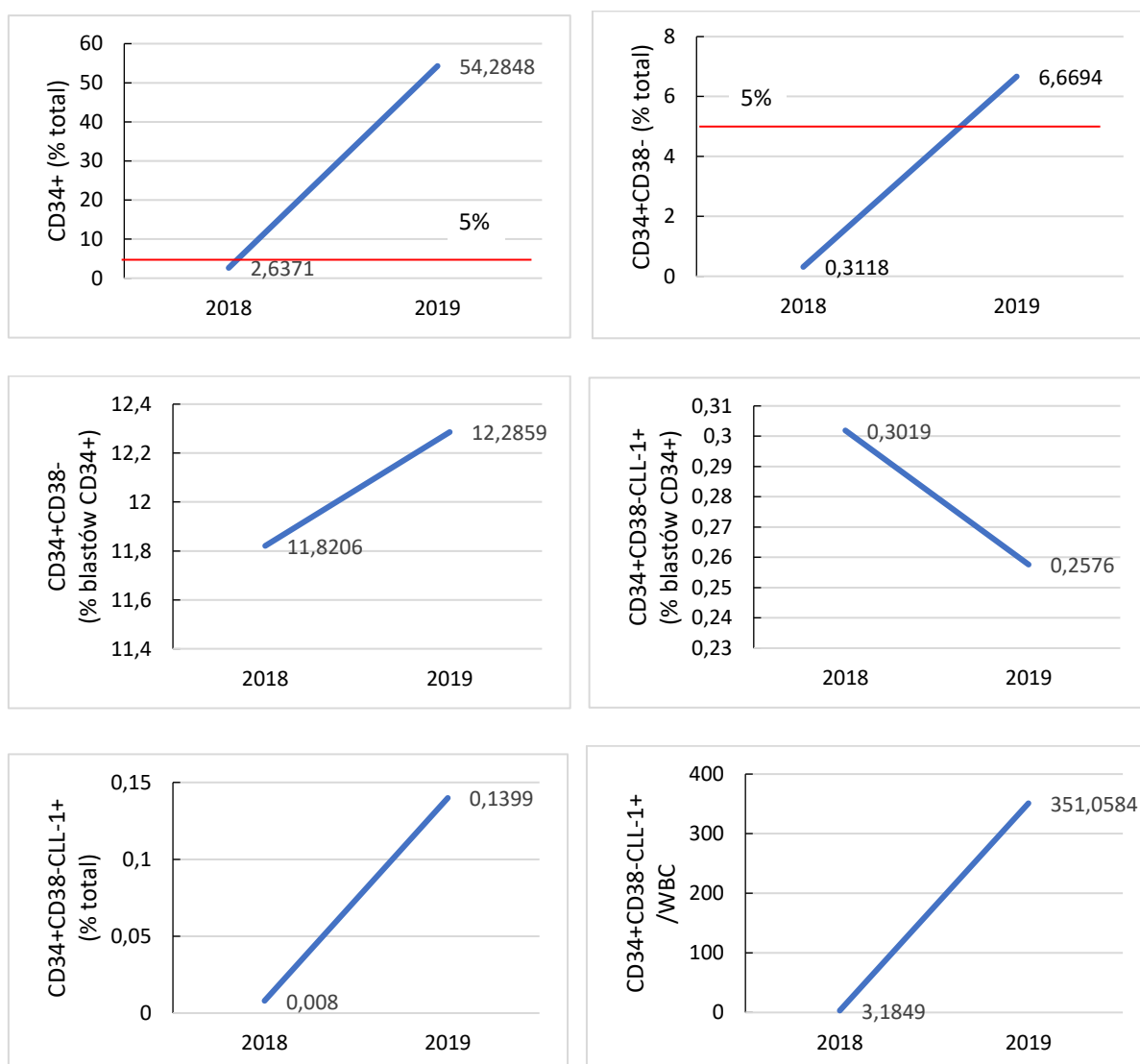
Cytometryczny wzór ekspresji komórek CD34+CD38-CLL-1+ na różnych etapach choroby pacjenta z MPN, u którego rozwinęło się AML przedstawiono na Rycinie 75.



Rycina 75. Wzór ekspresji blastów CD34+ na różnych etapach choroby, pacjenta z MPN. Prawy dolny kwadrant (kolor czerwony) stanowią komórki CD34+CD38-CLL-1+. **A, A1** rozpoznanie MPN, **B, B1** rozpoznanie AML (po dwóch latach).

4.14.3 PRZYPADEK 3

W celu sprawdzenia jak kształtują się poszczególne parametry cytometryczne w trakcie kolejnych pobrań szpiku kostnego u 71 letniego pacjenta z grupy badanej z rozpoznaniem MDS-RS, z progresją do AML, po jedenastu miesiącach przeanalizowano dwie próbki szpiku kostnego pobranymi w okresie od sierpnia 2018 r. do lipca 2019 r. w Klinice Hematologii Dorosłych z Oddziałem Transplantacji Szpiku PUM w Szczecinie, celem monitorowania rozwoju choroby. Próby przebadano pod kątem obecności komórek złośliwych CD34+CD38-CLL-1+ w Zakładzie Patomorfologii SPSK1 PUM w Szczecinie. Rycina 76 przedstawia uzyskane w badaniu wyniki. Oś X przedstawia analizowany parametr, oś Y rok, w którym wykonano badanie szpiku kostnego. Na wykresach odnoszących się do całości leukocytów (% total) wartości poniżej czerwonej linii oznaczają remisję morfologiczną.

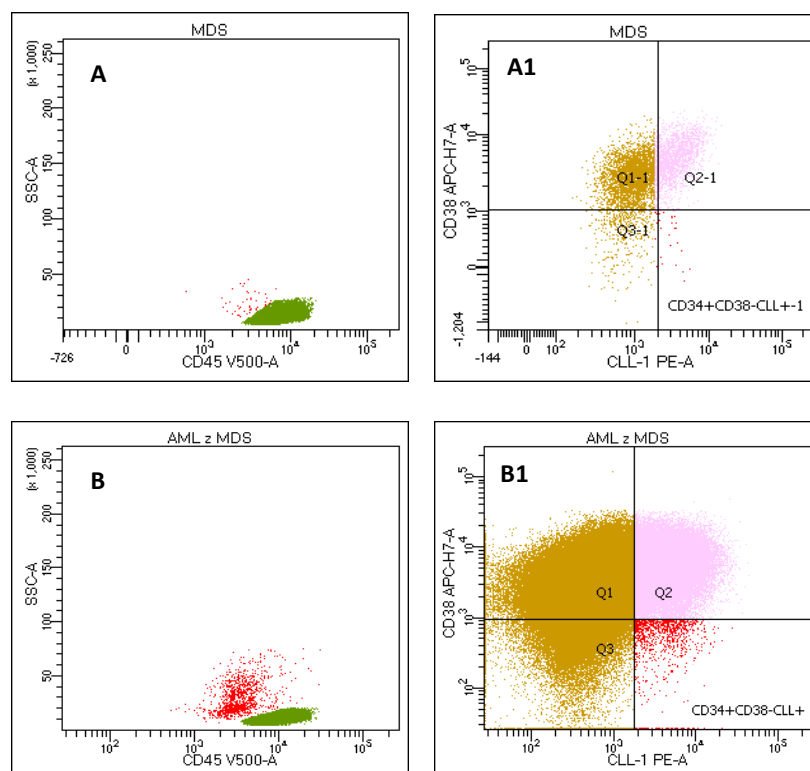


Rycina 76. Wartości: CD34+ (% total), CD34+CD38- (% total), CD34+CD38- (% blastów CD34+), CD34+CD38-CLL-1+ (% total), CD34+CD38-CLL-1+ (% blastów CD34+), CD34+CD38-CLL-1+/WBC u pacjenta z MDS-RS.

Wniosek:

Odsetek blastów CD34+ oraz odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38-, wyraźnie wzrósł między rozpoznaniem MDS a AML, w stosunku do wszystkich komórek szpiku kostnego. Odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38- także wzrósł, w stosunku do komórek wykazujących ekspresję CD34+. Odnotowano wzrost odsetka komórek złośliwych CD34+CD38-CLL-1+, w stosunku do: wszystkich komórek szpiku kostnego oraz rzeczywistej liczby komórek LSC w 1 μ L szpiku kostnego, w MDS zanim rozwinęła się postać AML. Jedynie odsetek CD34+CD38-CLL-1+, w stosunku do komórek wykazujących ekspresję CD34+, nieznacznie obniżył się w AML względem MDS.

Cytometryczny wzór ekspresji komórek CD34+CD38-CLL-1+ na różnych etapach choroby opisywanego pacjenta z MDS-RS z progresją do AML przedstawiono na Rycinie 77.



Rycina 77. Wzór ekspresji blastów CD34+ u pacjenta z MDS-RS. Prawy dolny kwadrant (kolor czerwony) stanowią komórki CD34+CD38-CLL-1+. **A. A1** rozpoznanie MDS-RS, **B. B1** rozpoznanie AML.

5 PODSUMOWANIE WYNIKÓW

A. Stwierdzono następujące związki między parametrami morfologiczno – klinicznymi a badanymi komórkami CD34+CD38-CLL-1+:

1. Wysokość odsetka komórek o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1+ nie ma związku z wiekiem, zarówno u pacjentów z AML jak i z MDS.
2. Wysokość odsetka komórek o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1+ nie ma związku z płcią ani liczbą WBC, zarówno u pacjentów z AML jak i z MDS.
3. Komórki o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1+ w AML i MDS są względnie większe i bardziej ziarniste aniżeli komórki CD34+CD38-CLL-1-. Ponadto, komórki CD34+CD38-CLL-1+ występujące u pacjentów z AML są większe i bardziej ziarniste niż u pacjentów z MDS.

B. Ocena związku komórek o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1+ z rokowaniem:

1. Pacjenci z AML o korzystnym rokowaniu wykazali niższy odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38-, w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), niż pacjenci o rokowaniu pośrednim i niekorzystnym. Grupy rokownicze w AML nie wykazały różnic co do odsetka: komórek niszy szpikowej CD34+CD38-, wśród populacji blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+) oraz komórek niszy szpikowej w populacji CD34+ w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego CD34+CD38-/CD34+ (% total). Odsetek tych komórek nie ma też związku z rokowaniem u pacjentów z MDS.
2. Odsetek komórek LSC tj. CD34+CD38-CLL-1+ w odniesieniu do: całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), liczby badanych komórek w 1 μ L szpiku kostnego oraz wartości średniej intensywności fluorescencji CLL-1 w komórkach CD34+CD38-CLL-1+, nie ma związku z rokowaniem w AML i w MDS. Zaobserwowano jednak tendencję wzrostową, to znaczy, im wyższy jest odsetek tych komórek tym gorsze rokowanie.

C. Identyfikacja komórek o immunofenotypie CD34+CD38-CLL-1+ metodą MFC w całej grupie badanej:

1. Odsetek komórek o immunofenotypie CD34+CLL-1+, w odniesieniu do blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), jest wyższy we wszystkich podgrupach grupy badanej niż w grupie kontrolnej. Odsetek tych komórek nie różni się między podgrupami AML i MDS.
2. Odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38-, w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), jest wyższy w AML niż u pacjentów z MDS, AML-CR i w grupie kontrolnej.
3. Odsetek komórek LSC CD34+CD38-CLL-1+ w odniesieniu do: całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), liczby badanych

komórek w 1 μ L szpiku kostnego oraz wartości średniej intensywności fluorescencji CLL-1 w komórkach CD34+CD38-CLL-1+, jest wyższy w podgrupie AML i MDS niż w podgrupie AML-CR i grupie kontrolnej. Pacjenci z AML cechują się wyższym odsetkiem badanych komórek niż pacjenci z MDS.

4. Odsetek komórek progenitorowych CD34+CD38+CLL-1+, w odniesieniu do blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), nie różni się między pacjentami z AML i z MDS. Odsetek tych komórek nie różni się również między pacjentami z AML a grupą kontrolną.

D. Identyfikacja komórek CD34+CD38-CLL-1+ metodą MFC w podgrupie pacjentów AML

1. Odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38-, w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), jest wyższy w każdej z podgrup grupy badanej AML, w porównaniu z pacjentami z AML-CR czy grupą kontrolną.

2. Odsetek komórek LSC tj. CD34+CD38-CLL-1+ w odniesieniu do: całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), liczby badanych komórek w 1 μ L szpiku kostnego oraz wartości średniej intensywności fluorescencji CLL-1 w komórkach CD34+CD38-CLL-1+, są wyższe we wszystkich podgrupach grupy badanej w porównaniu do grupy kontrolnej. Pacjenci z AMLmpn mają wyższy odsetek LSC niż pacjenci z AMLnos w odniesieniu do: wszystkich komórek szpiku kostnego (% total) oraz blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+).

E. Identyfikacja komórek CD34+CD38-CLL-1+ metodą MFC w podgrupie pacjentów MDS

1. Odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38-, w odniesieniu do wszystkich komórek szpiku kostnego (% total), jest wyższy u pacjentów z MDS-RS niż w grupie kontrolnej.

2. Odsetek komórek LSC tj. CD34+CD38-CLL-1+ w odniesieniu do: całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), liczby badanych komórek w 1 μ L szpiku kostnego oraz wartości średniej intensywności fluorescencji CLL-1 w komórkach CD34+CD38-CLL-1+, jest wyższy we wszystkich podgrupach grupy badanej niż w grupie kontrolnej. Pacjenci z MDS-EB2 mają więcej komórek LSC w przeliczeniu na 1 μ L szpiku kostnego niż pacjenci z MDSu.

F. Analiza przypadku 1 obejmującego: rozpoznanie AML, remisję i nawrót, pozwoliła stwierdzić:

- Odsetek blastów CD34+ oraz odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38-, w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), na etapie remisji morfologicznej (CR) jest poniżej progu 5%, natomiast na etapie wznowy AML, poziom badanych komórek jest wyższy niż w momencie rozpoznania.

- Odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38- w odniesieniu do blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), w jednym z badań szpiku kostnego podczas CR wzrasta do poziomu z okresu pierwotnego rozpoznania AML, natomiast na etapie wznowy AML obecny jest stale utrzymujący się wysoki poziom badanych komórek.
- Odsetek komórek LSC CD34+CD38-CLL-1+ w odniesieniu do blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), w jednym z badań szpiku kostnego podczas CR wzrasta do poziomu dwukrotnie wyższego w porównaniu do poziomu pierwotnego rozpoznania AML, natomiast na etapie wznowy AML obecny jest stale utrzymujący się wysoki poziom badanych komórek.
- Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ w stosunku do wszystkich komórek szpiku kostnego (% total), na etapie CR jest na poziomie niższym, niż w momencie rozpoznania, zaś na etapie wznowy AML wyższym.
- Liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L badanego materiału, w jednym z badań kontrolnych szpiku kostnego podczas CR jest na poziomie z czasu rozpoznania AML, natomiast na etapie wznowy rośnie.

G. Analiza przypadków 2,3 obejmujących rozpoznanie AML poprzedzone MPN lub MDS, pozwoliła stwierdzić:

- Odsetek blastów CD34+ w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), na etapie rozpoznania AML jest powyżej progu 5% blastów.
- Odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38- w odniesieniu do: całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), na etapie rozpoznania AML jest znacznie powyżej wartości obecnych podczas rozpoznania pierwotnego.
- Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ w stosunku do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total) oraz liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L szpiku kostnego, jest znacznie powyżej wartości obecnych w momencie progresji do AML.

H. W grupie pacjentów AML, którzy osiągnęli AML-CR, w trakcie kolejno występujących po sobie badań szpiku kostnego, stwierdzono następujące związki:

- Spadek odsetka blastów CD34+, w stosunku do całej populacji komórek szpiku kostnego (% total).
- Spadek odsetka komórek niszy szpikowej CD34+CD38-, w stosunku do: całej populacji komórek szpiku kostnego (% total) oraz komórek wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+).
- Spadek odsetka komórek LSC tj. CD34+CD38-CLL-1+ do całkowitego ich zaniku, w stosunku do: całej populacji komórek szpiku kostnego (% total), blastów wykazujących ekspresję CD34+ (% blastów CD34+), liczby badanych komórek w 1 μ L szpiku kostnego oraz wartości średniej intensywności fluorescencji CLL-1 w komórkach CD34+CD38-CLL-1+.

-Mniejszą względną ziarnistość i wielkość komórek o fenotypie CD34+CD38-CLL-1 względem komórek o fenotypie CD34+CD38-CLL-1-.

6 Dyskusja

Różnice morfologiczne komórek białaczkowych u pacjentów z AML nasuwają przypuszczenie o ich heterogenności. Już ponad 50 lat temu w eksperymencie *in vivo* z trytowaną tymidyną zidentyfikowano istnienie rzadkiej populacji komórek, która wykazywała rozległą zdolność proliferacyjną oraz oporność na terapię antyproliferacyjną (101). Wbrew oczekiwaniom, komórki AML nie rozmnażały się intensywniej od prawidłowych komórek krwiotwórczych i można było wyodrębnić spójną populację komórek spoczynkowych. Dalsze badania dowiodły, iż AML zachowuje pozory normalnej hematopoetycznej struktury hierarchicznej, gdzie rzadkie komórki białaczkowe zdolne są do samoodnawiania się i dają początek częściowo zróżnicowanemu potomstwu, które stanowi większość komórek populacji nowotworowej (102,103,104). Podstawą wzrostu klonalnego w AML są komórki LSC, które odpowiadają za rozprzestrzenianie się białaczkowych blastów, ostatecznie utrzymując populację komórek białaczkowych (34,64,105).

W 1994 roku Lapidot i wsp. wykryli zdolność komórek CD34+CD38- do indukcji białaczki po przeszczepie u myszy z obniżoną odpornością jako złoty standard w identyfikacji LSC (106). Badania Kreso i Dick w 2014 roku potwierdziły, że praktycznie wszystkie LSC znajdują się we frakcji CD34+CD38- (107,108). Inni badacze jednak odkryli, że komórki AML o fenotypach CD34+CD38+ lub CD34- również są zdolne do wszczepienia się u myszy z obniżoną odpornością, nawet w obrębie tego samego osobnika (37,60,109,110).

Fenotyp LSC może świadczyć o stopniu zróżnicowania krwiotwórczego, w którym rozwija się mutacja białaczkowa. Ekspresja mechanizmów oporności (m.in enzymy detoksykujące) spada wraz z różnicowaniem komórek w kierunku bardziej dojrzałego fenotypu, zatem najbardziej odporne na czynniki zewnętrzne (np. leki) będą komórki najmniej dojrzałe (47,103,111,112). Według literatury, najmniej korzystne rokowniczo AML mają fenotyp CD34+CD38- i wywodzą się z prymitywnych HSC, podczas gdy najkorzystniejsze rokowniczo AML wywodzą się z wyżej zróżnicowanych prekursorów (CD34-) (35,57,111). Pacjenci z komórkami AML o fenotypie CD34+CD38- wykazują niższe wskaźniki całkowitej remisji oraz gorsze przeżycie w zestawieniu z pacjentami, u których najbardziej prymitywne komórki AML cechują bardziej dojrzałe fenotypy (107). Ważną obserwację poczynili Terwijn i wsp. (18), którzy porównali wpływ prognostyczny atypowych komórek AML w przedziałach: CD34+CD38-, CD34+CD38+, CD34- podczas diagnozy i udowodnili brak wpływu prognostycznego populacji CD34+CD38+, CD34- w przypadku obecności komórek CD34+CD38-. Uzasadnionym wydaje się więc skupić uwagę na najmniej dojrzałym fenotypie komórek białaczkowych CD34+CD38-, jako na najgorzej rokującym (18,113,114). Komórki z ekspresją CD34+CD38-, u których doszło do nagromadzenia odpowiedniej liczby mutacji leukemicznych uważane są za frakcję o największej zdolności leukemogennej i największej oporności na leczenie (34,65,115).

Badania własne dotyczące komórek o fenotypie CD34+CD38- w AML potwierdzają, iż odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38-, w odniesieniu do wszystkich komórek szpiku kostnego, u pacjentów z rokowaniem korzystnym jest statystycznie istotnie niższy niż u pacjentów z rokowaniem pośrednim ($p=0,0273$) i niekorzystnym ($p=0,0446$). W niniejszej pracy, co jest zgodne z literaturą (119), u pacjentów z AML odnotowano wyższy procent badanych komórek we wszystkich podgrupach AML, tj. AML_{NOS} ($p=0,0063$), AML_{MDS} ($p=0,0000$), AML_{MPN} ($p=0,0014$) w porównaniu z grupą kontrolną.

Mając na uwadze fakt, iż MDS jest chorobą predysponującą do rozwoju w AML, należy przypuszczać, iż u części chorych na MDS obecne będą komórki o potencjale złośliwym w przedziale komórek o fenotypie CD34+CD38-. W badaniu własnym nie odnotowano różnic w zakresie rokowania w grupie chorych z MDS, a jedynie tendencję wzrostową liczebności komórek CD34+CD38- do wszystkich komórek szpiku kostnego, tj. im wyższy odsetek badanych komórek tym gorsze rokowanie. Porównując podtypy chorych z MDS, odnotowano istotnie więcej komórek CD34+CD38- w grupie MDS_{RS} ($p=0,0426$) oraz w grupie MDS_{EB2} ($p=0,0546$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Analizując MDS_{EB1} oraz MDS_U nie uzyskano istotności w zakresie badanego parametru, co może zgodnie z literaturą wynikać ze stosunkowo niskiej liczebności tych podgrup. Uzyskano natomiast istotnie wyższy odsetek komórek CD34+CD38- w AML w porównaniu z MDS ($p=0,0000$) i grupą kontrolną ($p=0,0000$).

Wiadomo, iż nie wszystkie komórki w przedziale niszy szpikowej CD34+CD38- to blasty białaczkowe dlatego, wzorując się na pracy Hwangi i wsp (116), w badaniu własnym porównano proporcję komórek CD34+CD38- do wszystkich blastów CD34+ (CD34+CD38-/CD34+), aby pośrednio odzwierciedlić liczbę komórek LSC. Mediana odsetka analizowanych komórek wśród chorych na AML (0,138) jest wyższa niż w AML-CR (0,060) czy MDS (0,109). Wyniki te są podobne do uzyskanych przez Hwang i wsp. (116), którzy porównali grupy AML i stwierdzili, że odsetek LSC był niższy w grupie AML-CR. Autorom tym nie udało się znaleźć zależności między większym odsetkiem komórek CD34+CD38- w porównaniu do wszystkich blastów CD34+, a grupami ryzyka w AML. W niniejszej pracy zmienna ta również nie uzyskała istotności statystycznej w zakresie grup ryzyka, jednak u chorych AML odnotowano wyższy odsetek badanych komórek wraz z pogarszającym się rokowaniem. Przeglądając się poszczególnym podgrupom AML, stwierdzono istotnie większy odsetek proporcji komórek niszy szpikowej CD34+CD38- w stosunku do wszystkich blastów CD34+ u pacjentów z AML_{mDS} ($p=0,0440$) i AML_{MPN} ($p=0,0424$) w porównaniu z pacjentami AML_{NOS}.

W badaniach własnych podjęto próbę sprawdzenia obecności komórek niszy szpikowej CD34+CD38- w obrębie populacji blastów CD34+ (CD34+CD38-/CD34+) wśród chorych na MDS. Analizując grupy rokownicze w MDS, nie uzyskano jednak ani istotności statystycznej, ani nie zauważono tendencji wzrostowej. Odsetek komórek CD34+CD38-/CD34+ u pacjentów z MDS o rokowaniu korzystnym

(mediana 0,093) oraz niekorzystnym (mediana 0,098) kształtuje się mniej więcej na tym samym poziomie, przy czym pacjenci z MDS o rokowaniu pośrednim wykazują wyższy odsetek badanych komórek (mediana 0,138). Wyjaśnieniem tego może być wysoka różnorodność chorych na MDS. Badane grupy pacjentów z MDS również nie różnią się między sobą istotnie pod względem tego parametru.

W celu prawidłowej identyfikacji LSC, ustalenia ich prognostycznego znaczenia oraz precyzyjnego określenia odsetka tych komórek w momencie rozpoznania i w trakcie monitorowania leczenia, niezwykle ważne jest aby dokładnie zidentyfikować cechy odróżniające LSC od HSC. Celem wykrycia komórek LSC w przedstawionej pracy posłużono się przeciwciałem przeciw białku CLL-1. Białko CLL-1 jest nieobecne na HSC oraz w regenerującym szpiku kostnym po chemioterapii. Ta właściwość jest bardzo przydatna w identyfikowaniu komórek MRD za pomocą tego pojedynczego markera.

W grupie kontrolnej CLL-1 wykazało ekspresję na komórkach CD34+, w odniesieniu do blastów z ekspresją CD34+, średnio 26,43% (mediana 23,74), w AML średnia ekspresja wynosiła 55,31% (mediana 66,68) zaś w MDS 42,57% (mediana 43,59). Ekspresja komórek o fenotypie CD34+CLL-1+ różni się między grupą kontrolną, a AML ($p=0,0418$) czy MDS ($p=0,0014$) co nie zmienia faktu, że CLL-1 obecne jest we wszystkich badanych grupach. Podobne spostrzeżenia mieli inni autorzy (92), którzy porównali poziom ekspresji CLL-1 między blastami CD34+ u pacjentów z AML, a blastami CD34+ grupy kontrolnej i stwierdzili znacznie wyższy poziom ekspresji CLL-1 na blastach CD34+ wśród pacjentów z AML. W świetle tego, iż AML rozwija się blisko u 40% pacjentów z MDS (87,131), nie dziwi fakt, że w badaniu własnym ekspresja CLL-1 na blastach CD34+, nie różni się między pacjentami AML a MDS ($p=0,1494$).

W dalszych rozważaniach wzięto pod uwagę poziom rozkładu ekspresji CLL-1 w grupach komórek CD34+CD38+ oraz CD34+CD38-, w porównaniu do blastów wykazujących ekspresję CD34+. W populacji komórek CD34+CD38+ ekspresja CLL-1 w AML kształtowała się średnio na poziomie 47,02% (mediana=56,08) i nie różniła się względem grupy kontrolnej ($p=0,1028$). W MDS natomiast poziom ekspresji CLL-1 wynosił średnio 41,55% (mediana 42,00) i tu różnił się istotnie statystycznie względem kontroli ($p=0,0015$). Nie wykazano znaczących różnic w odsetku komórek CD34+CD38+CLL-1+ między pacjentami z AML a MDS ($p=0,6056$). Dla porównania, w populacji CD34+CD38- ekspresja CLL-1 w AML wynosiła średnio 8,30 (mediana 0,95) różniąc się istotnie względem grupy kontrolnej ($p=0,0000$), zaś w MDS poziom ekspresji wynosił 0,72 (mediana 0,16), co również istotnie różniło MDS od grupy kontrolnej ($p=0,0001$). Odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ w AML był istotnie statystycznie wyższy aniżeli w MDS ($p=0,0158$). Oznacza to, że pacjenci z AML cechują się znacznie wyższym odsetkiem badanych komórek niż pacjenci z MDS. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi i potwierdzają fakt, że komórki z ekspresją CLL-1 nie występują w przedziale

CD34+CD38- u osób zdrowych natomiast są obecne u tych osób w przedziale CD34+CD38+. W tym względzie należy wspomnieć, iż analizy ekspresji CLL-1 nie można stosować do wykrywania MRD „całego podmuchu CD34+”, ponieważ CLL-1 występuje w części prawidłowego przedziału progenitorowego CD34+CD38+ (18,50).

Obecność komórek CLL-1 w przedziale CD34+CD38- zidentyfikowano w 25/27 przypadkach AML (92%) z ogólną medianą ekspresji 33,4% (wartości te dotyczą liczb badanych komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L szpiku kostnego) we wszystkich badanych podtypach AML, co odpowiada danym uzyskanym przez Linde i wsp. (37,39,54,75) przy ogólnej medianie 790 zdarzeń. Wszystkie badane podgrupy pacjentów z AML wykazały istotnie większą ilość komórek CD34+CD38-CLL-1+ w porównaniu do grupy kontrolnej, w zakresie wszystkich analizowanych parametrów.

Przeprowadzone badania wskazują, że pacjenci z AML_{MPN} charakteryzują się istotnie wyższym odsetkiem komórek CD34+CD38-CLL-1+ (w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego) aniżeli pacjenci z AML_{MDS}, czy AML_{NOS}. Dane te pokrywają się z danymi Han i wsp. (119), którzy wskazują podgrupę AML_{MPN} jako grupę o bardziej agresywnym przebiegu choroby. Podobnie do Toft-Peterson i wsp. (96), wykazano obecność komórek CD34+CD38-CLL-1+ u pacjentów z MDS we wszystkich grupach ryzyka, jednak o znacznie niższej medianie zdarzeń niż w AML (96). Zgodnie z przewidywaniami, nie znaleziono ekspresji CLL-1 na komórkach CD34+CD38- w AML ujemnej pod kątem ekspresji CD34 (n=2) ani w grupach chorych na inne schorzenia niż AML czy MDS (39,57,117). Mediana liczby zdarzeń komórek o fenotypie CD34+CD38-CLL-1+, co dotyczy rzeczywistej liczby komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L badanego materiału, w grupie kontrolnej oraz w grupie AML-CR wyniosła zero.

W niniejszej pracy, podobnie jak w badaniu Wang i wsp. (118), nie wykazano istotnego związku między obecnością rzeczywistej liczby komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L szpiku kostnego a płcią, zarówno u pacjentów z AML (p=0,1742), jak i MDS (p=0,5340). Nie znaleziono zależności między obecnością LSC a wiekiem u pacjentów z AML (p=0,3760) oraz MDS (p=0,7752) chociaż zaobserwowano, iż pacjenci z AML i MDS byli starsi od pacjentów z AML-CR czy grupy kontrolnej. Nie odnotowano zależności występowania komórek LSC tj. CD34+CD38-CLL-1+ od wartości WBC zarówno wśród pacjentów z AML (p=0,1949), jak i MDS (p=0,4070).

W niniejszym badaniu jako jeden ze sposobów identyfikacji komórek LSC metodą wieloparametrowej cytometrii przepływowej (MFC) w obszarze komórek niszy szpikowej CD34+CD38- porównano właściwości rozpraszania światła względem komórek o dodatniej i ujemnej ekspresji CLL-1. Uzyskane dane nawiązują do wyników Terwijn i wsp. 2014 (18), którzy oznaczyli (metodą FISH) komórki ze znanymi mutacjami leukenogennymi i porównali ich wielkość i ziarnistość (metodą MFC) względem komórek ujemnych. Podobnie jak w badaniu Terwijn i wsp. (18) zidentyfikowane w badaniach własnych atypowe komórki zarówno u pacjentów z AML, jak i z MDS

charakteryzują się silniejszym rozproszeniem światła tzn. są względnie większe i bardziej ziarniste od populacji negatywnej względem CLL-1.

Van Rhenen i wsp. (39,60,64), za pomocą techniki FISH, wykazali istotne zaburzenia cytogenetyczne w posortowanych komórkach CD34+CD38-CLL-1+, podczas gdy komórki CD34+CD38-CLL-1- nie wykazały nieprawidłowości cytogenetycznych specyficznych dla AML. Podobnie Toft-Peterson i wsp. (96) opisali, iż komórki CD34+CD38-CLL-1+ są w 100% atypowe, gdy są oceniane techniką FISH pod kątem znanych nieprawidłowości cytogenetycznych w MDS.

W badaniach własnych nie wykazano związku ekspresji komórek CD34+CD38-CLL-1+ z pogarszającym się rokowaniem w AML. Zaobserwowano jedynie tendencję wzrostową ich odsetka w przypadku gdy porównywano je do wszystkich komórek szpiku kostnego czy też tylko do blastów wykazujących ekspresję CD34+, co można pośrednio interpretować jako wzrost liczby tych komórek wraz z pogarszającym się rokowaniem. Co ciekawe, rzeczywista liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L szpiku kostnego oraz wartość średniej intensywności fluorescencji CLL-1 w komórkach CD34+CD38-CLL-1+, u pacjentów z AML o średnim rokowaniu posiada wyższą wartość niż wśród pacjentów AML o rokowaniu niekorzystnym. Może to sugerować potrzebę dokładniejszej stratyfikacji grup ryzyka w AML. Wyniki leczenia pacjentów AML z pośredniej grupy ryzyka są bardzo zróżnicowane (48), zatem istnieje zapotrzebowanie na dodatkowe czynniki prognostyczne, np. takie które obejmą czynniki związane z leczeniem (MRD) (48).

Kiedy analizowano obecność komórek CD34+CD38-CLL-1+ pod względem rokowania w MDS, stwierdzono podobnie do Toft-Petersen i wsp. (96), że są one obecne we wszystkich badanych podgrupach, a zatem nie są ograniczone jedynie do przypadków wysokiego ryzyka. W przypadku parametrów odnoszących się do blastów wykazujących ekspresję CD34+ lub liczby komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L szpiku kostnego, zaobserwowano tendencję wzrostową, tj. wzrost odsetka badanych komórek wraz z gorszym rokowaniem. Odnotowano istotnie wyższy odsetek komórek CD34+CD38-CLL-1+ we wszystkich podgrupach MDS w porównaniu z grupą kontrolną. Wśród pacjentów z MDS_{EB2} stwierdzono istotnie więcej komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L szpiku kostnego względem MDS_U ($p=0,0245$), wskazując jednoznacznie MDS_{EB2} jako bardziej agresywny typ MDS.

Rola białka CLL-1 w MDS nie jest w pełni wyjaśniona. W jednym z badań dotyczącym identyfikacji komórek CLL-1 w przedziale CD34+CD38- u pacjentów z MDS, stwierdzono ich obecność w 71% we wszystkich podtypach MDS i we wszystkich grupach ryzyka IPSS-R (96). Wyniki długotrwałych testów komórkowych inicjujących kolonię w badaniu tym wykazały, że komórki CD34+CD38-CLL-1+ wprawdzie miały zdolność do samoodnowy i były atypowe, jednak analiza ekspresji CLL-1 nie pomogła odróżnić HSC od złośliwych komórek macierzystych, ponieważ nieprawidłowości klonalne związane z MDS wykryto również w subpopulacji CD34+CD38-CLL-1-. Różnice między MDS a AML dotyczące identyfikacji komórek LSC przy wykorzystaniu białka CLL-1

w grupie komórek CD34+CD38-, mogą wynikać z różnic w biologii tych dwóch jednostek chorobowych. Woll i wsp. (120) wykazali, iż MDS pochodzi z najwcześniejszej komórki macierzystej (Lin-CD34+CD38-CD90+), co również opisywali inni badacze (120,121,122). Tymczasem ostatnie dowody sugerują, że większość przypadków z AML pochodzi z bardziej dojrzałych komórek progenitorowych (123,124), które nabyły zdolności do samoodnowy. W innym badaniu przeprowadzonym przez Morsink i wsp. (75) ogólna ekspresja CLL-1 na komórkach CD34+CD38- wśród chorych na MDS EB₁/EB₂ nie różniła się w stosunku do grupy kontrolnej (p=0,50). Co ciekawe, ekspresja CLL-1 na komórkach CD34+CD38- była podobna w przypadku MDS wysokiego ryzyka i przypadków MDS niskiego ryzyka. Dane te wskazują, że CLL-1 jako marker diagnostyczny jest mniej przydatny w analizie MDS niż w AML i w większości przypadków MDS nie jest istotny w odróżnianiu prawidłowych od nieprawidłowych komórek CD34+CD38-. Przepuszczalnie komórki CD34+CD38-CLL-1+ w MDS mogą reprezentować proliferacyjny subklon w puli komórek złośliwych, a teoretyczne celowanie lekami w komórki CD34+CD38-CLL-1+ w MDS nie wyeliminowałoby wszystkich złośliwych klonów a jedynie bardziej agresywny klon (96). W badaniu własnym zidentyfikowano pacjenta z MDS, u którego obecne były pojedyncze komórki CD34+CD38-CLL-1+ i u którego rozwinęła się postać AML po upływie około roku. Monitorowanie obecności komórek CD34+CD38-CLL-1+ u takich pacjentów mogłoby ułatwić podjęcie decyzji o odpowiedniej strategii leczenia. Stratyfikacja ryzyka oparta na obecności komórek CD34+CD38-CLL-1+ mogłaby okazać się szczególnie przydatna do zidentyfikowania pacjentów z grupy wysokiego ryzyka progresji choroby.

Obecność w populacji LSC unikalnego markera CLL-1 w grupie komórek CD34+CD38- przy braku jego obecności na HSC wzbudził ogromny entuzjazm w dziedzinie hematologii i onkologii. Wysiłek wielu badaczy został skierowany na stworzenie leku, którego celem są komórki CLL-1 dodatnie. Obecnie najbardziej zaawansowane prace nad bispecyficznymi przeciwciałami MCLA-117 oraz komórkami T-CAR, są na etapie wczesnych badań klinicznych (75,76,125). Nowatorskie terapie są szansą dla pacjentów z bardzo złym rokowaniem, które prawdopodobnie źle tolerują leczenie (kondycjonowanie) wysokodawkowe. Komórki CLL-1 CART można potencjalnie zastosować jako schemat konsolidacji po chemioterapii w celu wyeliminowania MRD przed przeszczepem all-HSCT (80) lub jako dodatek do chemioterapii (88). Niezwykle ważne jest, aby wyselekcjonować pacjentów, którzy mogą osiągnąć korzyść z tego typu leczenia. Wielu autorów (39,85,113,126) donosi iż w przypadku terapii ukierunkowanej na CLL-1, może być konieczna selekcja pacjentów CLL-1 dodatnich (51,127).

Wielu badaczy potwierdziło użyteczność przeciwciała CLL-1 do wykrywania komórek LSC w AML zarówno w czasie diagnozy, jak i w trakcie leczenia (18,33,54,92). Identyfikacja komórek CD34+CD38-CLL-1+ metodą MFC w badaniach własnych wykazała wysoką czułość i dokładność porównywalną do techniki PCR. Analiza przypadku AML obejmującego diagnozę, remisję i nawrót

metodą MFC ujawniła obecność komórek LSC na etapie całkowitej remisji, potwierdzonej badaniami PCR. Podczas gdy badania molekularne nie potwierdziły obecności komórek LSC, metoda MFC okazała się być wystarczająca. Wykazano, że komórki CD34+CD38-CLL-1+ są rzeczywiście agresywne i pozwalają przewidzieć wznowę choroby w fazie remisji. Niniejsze badania podobnie jak inne doniesienia (66) wykazują, iż komórki CD34+CD38-CLL-1+ u pacjentów z AML mogą służyć jako biomarker do przewidywania agresywności choroby. Ekspresja CLL-1 obecna na komórkach AML bez znaczących różnic w gęstości antygenu, kwalifikuje CLL-1 jako stabilny marker do monitorowania choroby (39,118). Głównym ograniczeniem obecnych badań jest niezadawalająca liczba przypadków badanych. Uzyskane dane nawiązują jednak do danych literaturowych, co pozwala wzorem innych wysunąć przypuszczenie, iż obecność CLL-1 na blastach białaczkowych dostarcza informacji prognostycznych niezależnych od innych markerów takich jak: wiek, WBC, zmiany cytogenetyczne czy status mutacji (33,70,100). Zgodnie z zaleceniami ELN AML MRD 2018 (33,70), CLL-1 jest odpowiednim markerem diagnostycznym do monitorowania i prognozowania ryzyka w leczeniu AML.

Zgodnie z raportami innych grup, wyniki badań własnych jednoznacznie wskazują, iż brak komórek CLL-1 w grupie CD34+CD38- u pacjentów z AML, którzy osiągnęli remisję a posiadali wcześniej pozytywny status komórek CD34+CD38-CLL-1+ prognozuje dobry wynik leczenia, tj. całkowitą remisję. W badaniach własnych przeanalizowano obecność komórek LSC u pacjentów, którzy ostatecznie osiągnęli całkowitą remisję i współczynnik korelacji rang Spearmana wyniósł -0,59, co oznacza, że istnieje silna ujemna zależność między tymi zmiennymi. Obserwacje potwierdziły tę zależność, gdyż wykazano, że zmienna LSC istotnie statystycznie zmalała ($p=0,0276$) w trakcie kolejnych badań. Analizując parametry dotyczące fenotypu komórek LSC, czyli CD34+CD38-CLL-1+ w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego, wartości średniej intensywności fluorescencji CLL-1 w komórkach CD34+CD38-CLL-1, lub też liczby komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L szpiku kostnego, wszystkie wykazały istotny spadek w trakcie kolejnych badań. Rzeczywista liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+ w 1 μ L szpiku kostnego okazała się najlepszym z badanych parametrów (współczynnik korelacji rang Spearmana -0,74, $p=0,0023$). Podobnie do wyników Therwij i wsp. (18,128,129), którzy wskazali różnice względnej wielkości i ziarnistości komórek LSC w grupie CD34+CD38- w porównaniu do HSC, komórki w badaniach własnych (pacjenci którzy uzyskali AML-CR) charakteryzowały się również spadkiem względnej ziarnistości (współczynnik rang Spearmana -0,65, $p=0,0119$) i wielkości (współczynnik rang Spearmana -0,79, $p=0,0008$) w trakcie kolejnych badań. Odsetek blastów CD34+, w porównaniu do wszystkich komórek szpiku kostnego, oraz odsetek komórek niszy szpikowej CD34+CD38-, w odniesieniu do całej populacji komórek szpiku kostnego, wykazał istotny spadek w czasie leczenia. Jedynie parametry CD34+CD38- oraz CD34+CD38-CLL-1+ dotyczące odsetka badanych komórek w odniesieniu do blastów wykazujących ekspresję CD34+,

okazały się mniej przydatne, tj. wykazały tendencję spadkową lecz nie osiągnęły istotności statystycznej mieszcząc się w tzw. trendzie.

Wiedza na temat biologii nowotworów nieustannie się rozwija zmieniając podejście nie tylko do diagnostyki tych chorób, ale przede wszystkim do ich leczenia. Ścisła współpraca między hematologami, patologami, onkologami, biologami molekularnymi i farmakologami sprawia, że pacjenci z chorobami hematologicznymi mogą liczyć na coraz lepsze metody diagnozowania i leczenia tych schorzeń. Celem niniejszej pracy była ocena w warunkach ściśle diagnostycznych poziomu ekspresji białka CLL-1 na komórkach niszy szpikowej CD34+CD38- w AML i w MDS w momencie diagnozy i w trakcie monitorowania choroby oraz przeanalizowanie ich obecności w różnych grupach ryzyka. Badanie objęło stosunkowo nieliczną populację pacjentów przy dużym zróżnicowaniu na podgrupy. Obiektem zainteresowania była unikalna populacja komórek białaczkowych (LSC), której szacowana częstotliwość wynosi 1 na milion (83,130). Przy tak nielicznej populacji badanej należy zmierzyć maksymalnie dużo komórek badanego szpiku kostnego. Należy podkreślić, że do badań wykorzystywano nadmiar szpiku kostnego, który pozostał po rutynowej ocenie immunofenotypu – zatem nie zawsze dysponowano zadowalającą liczbą komórek. Wpływ na badanie miała też jakość otrzymanej próbki lub obecność hemodylucji, której nie można wykluczyć. Mimo napotkanych trudności, uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z danymi z piśmiennictwa, co potwierdza wysoką jakość techniczną wykonywanych badań oraz ich użyteczność diagnostyczną. Uzyskane wyniki uzupełniają dane literaturowe pod kątem przydatności oceny ekspresji CLL-1 w monitorowaniu pacjentów z AML lub MDS ukazując, że jest to bardzo obiecujący marker cytometryczny. Dodanie CLL-1 do standardowego panelu diagnostycznego oraz monitorowanie jego ekspresji w trakcie leczenia mogłoby zwiększyć dokładność diagnostyczną oraz prawdopodobieństwo identyfikacji MRD w przedziale komórek CD34+CD38-.

7 WNIOSKI

1. Białko CLL-1 jest pomocne w odróżnieniu komórek LSC, w przedziale komórek o fenotypie CD34+CD38-, od prawidłowych hematopoetycznych komórek macierzystych (HSC), co może służyć wyeliminowaniu wyników fałszywie ujemnych podczas monitorowania MRD w AML.
2. Ocena odsetka złośliwych komórek CD34+CD38-CLL-1+ w szpiku kostnym powinna zostać włączona do rutynowej diagnostyki AML/lub MDS. W przypadku AML ma to znaczenie w definiowaniu jakości remisji i przewidywaniu ryzyka nawrotu, zaś w MDS w ocenie ryzyka wystąpienia AML.
3. Rzeczywista liczba komórek CD34+CD38-CLL-1+ w przeliczeniu na WBC w 1 μ L szpiku kostnego (CD34+CD38-CLL+/WBC) okazuje się najbardziej czułym parametrem do monitorowania obecności komórek CD34+CD38-CLL-1+ w szpiku kostnym.
4. Nie wykazano związku występowania komórek CD34+CD38-CLL-1+ z wiekiem, płcią czy WBC oraz typem morfologicznym AML czy w MDS. W zakresie rokowania w obu jednostkach chorobowych zaobserwowano trend wzrostowy.

8 STRESZCZENIE

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. Próbkę 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 FACSDiva™ Software.

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. AML_{NOS}, AML_{MDS}, AML_{MPN} 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 AML_{MPN} jako bardziej agresywny typ niż AML_{NOS}. Analogicznie do AML, wszystkie podtypy MDS tj. MDS_{EB1}, MDS_{EB2}, MDS_{RS}, MDS_U 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 MDS_{EB2} ma bardziej agresywny charakter niż MDS_U.

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 tendencje wzrostową. Badania własne nie wykazały istotnego związku

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.

9 SUMMARY

In recent years, there has been evidence of a small percentage of leukemia stem cells (LSCs) involved in the development of diseases such as AML and MDS. Like their normal counterpart, hematopoietic stem cells (HSCs), LSCs have the ability to self-renew, proliferate and differentiate into more mature daughter cells. The LSC cells with the immunophenotype CD34+CD38- are believed to be the most resistant to chemotherapy, and therefore responsible for treatment failure and relapse. Among the CD34+CD38- cells are both LSC and HSC cells. Therefore, it is extremely important to accurately identify the features that distinguish these two populations. The CLL-1 marker, which is permanently absent on HSC cells, was used to discriminate between LSC and HSC in the cell compartment with the CD34+CD38- phenotype by flow cytometry. The flow cytometry method used also allowed to identify the differences in light scattering (ie FSC and SSC) of malignant cells compared to HSC cells.

The aim of the study was to assess the percentage of CD34+CD38-CLL-1+ cells in the bone marrow in patients diagnosed with AML or MDS before treatment and during treatment monitoring, and to assess the relationship between the above-mentioned percentage cells compared with prognosis, morphological type and age. This project also aims to find the best parameter for monitoring CD34+CD38-CLL-1+ cells by flow cytometry.

The study group consisted of 27 patients with newly diagnosed AML, 5 patients in the stage of AML – complete remission, and 20 patients with MDS. The control group included patients who were excluded from MDS and AML with a CD34+ cell population greater than 1%.

1 ml of bone marrow collected in a test tube with EDTA anticoagulant was used for the study. Bone marrow samples were collected as an excess of material used as the diagnostic process at the Department of Pathomorphology of the SPSK1, after obtaining the patient's informed consent to participate in the project. The resulting bone marrow was stained with fluorochrome labeled antibodies to label CD34+CD38-CLL-1+ cells and then analyzed on a FASC Canto II flow cytometer in the BD FACSDiva™ Software software.

The performed tests confirmed the presence of CD34+CD38-CLL-1+ cells in AML and MDS patients, 92% and 80% respectively. Higher expression of LSC cells in AML than in MDS was identified. Patients with AML whose treatment led to disease remission were characterized by a constant decrease of these cells, down to the level of zero, in the course of subsequent bone marrow samples. There is a negative correlation between the presence of CD34+CD38-CLL-1+ cells and AML remission. As assumed, the presence of the LSCs under study was not identified in the control group.

The analysis of the presence of CD34+CD38-CLL-1+ cells in the context of the presented case 1, including the diagnosis of AML, remission and relapse, turned out to be a sensitive indicator

monitoring the course of the disease. All bone marrow tests from this patient had these cells at a threshold of 0,03%. CD34+CD38-CLL-1+ cells, in relations to CD34+ expressing blasts (% of CD34+ blasts) of the number of CD34+CD38-CLL-1+ cells in 1 μ L bone marrow, predicted disease recurrence during morphological and molecular remission. The most transparent and sensitive parameter for monitoring the persence of CD34+CD38-CLL-1+ cells was the numer of CD34+CD38-CLL-1+ cells in 1 μ L bone marrow. In the phase of complete remission, the described variable indicated a level of malignant cells close to that of malignant cells at the time of diagnosis. These data can eliminate false negatives during treatment control and predict recurrence. The mean fluorescence intensity of the CLL-1 molecule of LSC cells in all the marrow harvested samples was stable, suggesting the stability of the antygen as a marker helpful in the identification of LSC cells in the CD34+CD38- cell compartment. The analysis of single MDS and MPN cases from which AML developed proves that even a negligible percentage of CD34+CD38-CLL-1+ cells may precede the development of the disease in AML.

A comparative analysis of the presence of CD34+CD38-CLL-1+ cells within individual AML and MDS subtypes was performer. All LSC – determining parameters used, ie for the whole population of bone marrow cells (% total), for blasts expressing CD34+ (% of CD34+ blasts) numer of CD34+CD48-CLL-1+ cells in 1 μ L of bone marrow and the value of the mean fluorecence intensity of the CLL-1 molecule in CD34+CD38-CLL-1+ cells, showed a significantly higher presence of the tested cells in particular types of AML, ie AML_{NOS}, AML_{MDS}, AML_{MPN} as compared to the control. The percentage of LSCcells, relative to the total bone marrow cell population (% total) and relative to CD34+ expressing blasts (% of CD34+ blasts), showed AML_{MPN} to be a more aggressive type than AML_{NOS}. Similarly to AML, all MDS subtypes, ie MDS_{EB1}, MDS_{EB2}, MDS_{RS}, MDS_U showed significantly more CD34+CD38-CLL-1+ cells compared to the control, which also applies to all variables. The actual numer of CD34+CD38-CLL-1+ cells in 1 μ L bone marrow showed that MDS_{EB2} was more aggressive than MDS_U.

There was no correlation between the presence of CD34+CD38-CLL-1+ cells and prognosis in both AML and MDS. In the case of the percentage of LSC cells, in relations to the total population of bone marrow cells and in relations to the blasts expressing CD34+, only an upward trend was observed in AML. Similarly, in MDS, the percentage of LSCs versus blasts expressing CD34+ and the numer of CD34+CD38-CLL-1+ cells in 1 μ L of bone marrow showed only an upward trend. Our own studies did not show any significant relationship between age and the presence of CD34+CD38-CLL-1+ cells in AML and MDS. However, it was observed that patients with AML or MDS were older than patients who achieved complete remission.

Assessment of the percentage of malignant CD34+CD38-CLL-1+ cells in bone marrow plays an important role in the routine diagnosis of AML of MDS. In the case of AML, this is important in defining the quality of remission and predicting the risk of recurrence, and in MDS, in assessing the

risk of AML. The presence of CD34+CD38-CLL-1+ cells can help to eliminate false negatives when monitoring MRD.

10 PIŚMIENICTWO

1. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Sarkin E., Pileri J.S, Stein H., and Thiele J. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Wyd.4 popr. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2017. Print. World Health Organization Classification of Tumours.
2. Khoury J. D., Solary E., Abla O., Akkari Y., Alaggio R., Apperley J.F., et al.: The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. *Leukemia* 2022; 36:1703-1719.
3. Prochorec-Sobieszek M.: 1.2. Klasyfikacja i kryteria diagnostyczne nowotworów układu krwiotwórczego. *Onkologia w Praktyce Klinicznej – Edukacja*. 2020; 6(Supl. A):19-37.
4. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M.J., Le Beau M.M., et al.: The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127(20):2391-2405.
5. Grove C.S., Vassiliou G.S. Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? *Dis Model Mech* 2014; 7(8):941-951.
6. Pandolfi A., Barreyro L., Steidl U. Concise review: preleukemic stem cells: molecular biology and clinical implications of the precursors to leukemia stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2013; 2(2):143-150.
7. Rothenberg-Thurley M., Amler S., Goerlich D., Köhnke T., Konstandin N.P., Schneider S., et al.: Persistence of pre-leukemic clones during first remission and risk of relapse in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2018; 32:1598–1608.
8. Wierzbowska A.: Ostra białaczka szpikowa. W: Robak T.: *Hematologia*. Gdańsk: Via Medica; 2016. s. 759-779. ISBN 978-83-65476-41-8.
9. Hołowiecki J., Hołowiecka A. Leczenie celowane w ostrych białaczkach szpikowych. *Acta Haem Pol* 2013; 44:85-92.
10. A Oraz, L.M Weiss, K Foucar, D.M Knowles. *Knowles neoplastic hematopathology - third edition*. Lippincott, Williams and Wilkins, Wolters Kluwer 41, 2014; 1030-1057.
11. V Grossmann, S Schnittger, A Kohlman et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. *Blood* 2012; 120(15):2963-2972.
12. Seferyńska I., Warzocha K., Raport z rejestru zachorowań na ostre białaczki u osób dorosłych w Polsce w latach 2004-2010 prowadzonego przez Instytut Hematologii i Transfuzjologii w imieniu Polskiej grupy ds. leczenia Białaczek u Dorosłych (PALG). *Hematologia* 2014; 5(2):162-172.
13. Budziszewska B.K., Więckowska B., Lech-Marańda E., Mikołajczyk T., Dagie J., Jędrzejczak W.W. Zachorowalność i chorobowość na nowotwory układu krwiotwórczego w Polsce (2009–2015)

- określone na podstawie analizy danych Narodowego Funduszu Zdrowia wykorzystanych w projekcie „Mapy potrzeb zdrowotnych — baza analiz systemowych i wdrożeniowych”. *Hematol.* 2017; 8(2):89–104.
14. Leong S.R., Sukumaran S., Hristopoulos M., Totpal K., Stainton S., Lu E., et al.: An anti-CD3/anti-CLL-1 bispecific antibody for the treatment of acute myeloid leukemia. *Blood* 2017; 129(5):609-618.
 15. R.E Gąsiorowski, G.J Clark, K Bradstock, D.N.J Hart. Antibody therapy for acute myeloid leukaemia. *Brit J Haematol* 2014; 164:481-495.
 16. P. M Le, M Andreeff, V.L Battula. Osteogenic niche in the regulation of normal hematopoiesis and leukemogenesis. *Haematol* 2018; 103(12):1945-1955.
 17. Gerber J.M., Smith B.D., Ngwang B., Zhang H., Vala m.S., Morsberger L., et al.: A clinically relevant population of leukemic CD34+CD38- cells in acute myeloid leukemia. *Blood* 2012; 119(15):3571-3577.
 18. Terwijn M., Zeijlemaker W., Kelder A., Rutten A.PL., Snel A.N., Scholten W.J., et al.: leukemic stem cell frequency: a strong biomarker for clinical outcome in acute myeloid leukemia. *PLoS One* 2014; 9(9):1-14.
 19. J.P Patel, M Gőnen, M.E Figueroa et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Eng J Med* 2012; 366:1079-1089.
 20. S Khaled, M Al Malki, G Mqrcucci. Acute myeloid leukemia: biologic, prognostic, and therapeutic insights. *Oncology (Williston Park)* 2016; 30(4):318-329.
 21. Moarii M., Papaemmanuil E.: Classification and risk assessment in AML: integrating cytogenetics and molecular profiling. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2017 (1):37-44
 22. Juliusson G., Jadersten M., Deneberg S., Lehmann S., Mollg ard L., Wennstrom L., et al.: The prognostic impact of FLT3-ITD and NPM1 mutation in adult AML is age-dependent in the population-based setting. *Blood adv* 2020; 4(6):1094-1101.
 23. Juliusson G, Hagberg O, Lazarevic VL, et al. Improved survival of men 50 to 75 years old with acute myeloid leukemia over a 20-year period. *Blood* 2019; 134(18):1558-1561.
 24. D hner H., Estey E., Grimwade D., Amadori S., Appelbaum F.R., Büchner T., et al.: Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017; 129(4):244-447.
 25. Bejar R., Steensma D.P. Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2014; 124(18):2793-2803
 26. Gorczyca W.: Flow cytometry in neoplastic hematology: morphologic-immunophenotypic correlation. Wyd. 3. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group; 2017. ISBN 978-1-4987-7502-1.

27. Gorczyca W.: Flow cytometry in neoplastic hematology: morphologic-immunophenotypic correlation. Wyd.2. Colchester: informa healthcare; 2017. ISBN 978-1-841-84702-3.
28. Dwilewicz-Trojaczek J.: Zespoły mielodysplastyczne. W: Robak T.: Hematologia. Gdańsk: Via Medica; 2016. s. 744-758. ISBN 978-83-65476-41-8.
29. Drozd-Sokołowska J.E, Mądry K., Waszczuk-Gajda A., Żóftak T., Sikorska A., Mital A., et al. Are myelodysplastic syndromes underdiagnosed in Poland? A report by the Polish Adult Leukaemia Group. *Eur J Haematol.* 2017; 98(2):154-159.
30. Montalban-Bravo G., Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2018; 93:129–147.
31. Greenberg P.L., Tuechler H., Schanz J., Sanz G., Garcia-Manero G., Sole F., et al.: Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood.*2012; 120(12):2454–2465.
32. Schanz J., Tuchler H., Sole F., Mallo S., Luno E., Cervera J., et al.: New Comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol* 2012; 30(8):820-829.
33. Zeijlemaker W., Kelder A., Oussoren-Brockhoff Y.J.M., Scholten W.J., Snel A.N., Veldhuizen D., et al.: A simple one-tube assay for immunophenotypical quantification of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2016; 30,439–446
34. Kreso A., Dick J.E. Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell.* 2014;275-291.
35. Zeijlemaker W., Kelder A., Wouters R., Valk P.J.M., Witte B.I., Cloos J., et al.: Absence of leukaemic CD34+ cells in acute myeloid leukaemia is of high prognostic value: a longstanding controversy deciphered. *Brit J Haematol* 2015; 171:227–238.
36. Leong S.R., Sukumaran S., Hristopoulos S., Totpal K., Stainton S., Lu E., et al.: An anti-CD3/anti-CLL-1 bispecific antibody for the treatment of acute myeloid leukemia. *Blood* 2017; 129(5):609-618.
37. Bakker A.B.H., van den Oudenrijn S., Bakker A.Q., Feller N., van Meijer M., Bia J.A., et al.: C-type lectin-like molecule-1: a novel myeloid cell surface marker associated with Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Res.* 2004; 64,8443–8450.
38. Freeman S.D., Virgo P., Couzens S., Grimwade D., Russell N., Hills R.K., et al.: Prognostic relevance of treatment response measured by Flow cytometric residual disease detection in older patients with Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2013; 31(32):4123-4132.
39. van Rhenen A., van Dongen G.A.M.S., Kelder A., Rombouts E.J., Feller N., Moshaver B., et al.: The novel AML stem cell-associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood* 2007; 110(7):2659-2666.

40. Pelosi E., Castelli G., Testa U. Targeting LSCs through membrane antigens selectively or preferentially expressed on these cells. *Blood Cells Mol Dis* 2015; 55:336-346.
41. Gasiorowski R.E., Clark G.J., Bradstock K., Hart D.N.J. Antibody therapy for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2014; 164:481–495.
42. Marshall A.S.J., Willment J.A., Lin H.H., Williams D.L., Gordon S., Brown G.D. Identification and characterization of a novel human myeloid inhibitory C-type lectin-like Receptor (M1CL) that is predominantly expressed on granulocytes and monocytes. *J. Biol Chem* 2004; 279,15:14792–14802.
43. Chen Ch-H., Floyd H., Olson N.E., Magaletti D., Li Ch., Draves K., et al.: Dendritic-cell-associated C-type lectin 2 (DCAL-2) alters dendritic-cell maturation and cytokine production. *Blood* 2006; 107(4):1459–1467.
44. Lahoud M.H., Proietto A.I., Ahmet F., Kitsoulis S., Eidsmo L., Wu L., et al.: The C-type lectin Clec12A present on mouse and human dendritic cells can serve as a target for antigen delivery and enhancement of antibody responses. *J Immunol* 2009; 182:7587-7594.
45. Buccisano F., Hourigan Ch.S., Walter R.B. The prognostic significance of measurable (“minimal”) residual disease in acute myeloid leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 2017; 12:547–555.
46. Bachas C., Schuurhuis G.J., Assaraf Y.G., Kwidama Z.J., Kelder A., Wouters F., et al.: The role of minor subpopulations within the leukemic blast compartment of AML patients at initial diagnosis in the development of relapse. *Leukemia* 2012; 26,1313-1320.
47. Kersten B., Valkering M., Wouters R., van Amerongen R., Hanekamp D., Kwidama Z., et al.: CD45RA, a specific marker for leukaemia stem cell sub-populations in acute myeloid leukaemia. *Brit J Haematol* 2016; 173,219–235.
48. Terwijn M., van Putten W.L.J., Kelder A., van der Velden V.H.J., Brooimans R.A., et al.: High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: Data From the HOVON/SAKK AML 42A study. *J Clin Oncol* 2013; 31:3889-3897.
49. Zeijlemaker W., Kelder A., Cloos J., Schuurhuis G.J., et al.: Immunophenotypic detection of measurable residual (stem cell) disease using LAIP approach in acute myeloid leukemia. *Curr Protoc Cytometr* 2019; 91, e66.
50. van Rhenen A., Moshaver B., Kelder A., Feller N., Nieuwint A.W.M., Zweegman S., Ossenkoppele G.J., Schuurhuis G.J., et al.: Aberrant marker expression patterns on the CD34⁺ CD38⁺ stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the normal stem cell compartment both at diagnosis and in remission. *Leukemia*. 2007; 21:1700–1707.
51. Bruserud Q., Aasebø E., Hernandez-Valladares M., Tsykunova G., Reikvam H. Therapeutic targeting of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia – the biological background for possible strategies. 2017; *Exp Opin Drug Disc* 2017; 12(10):1053-1065.

52. Dix C., Lo T-H., Clark G., Abadir E. Measurable residual disease in acute myeloid leukemia using flow cytometry: a review of where we are and where we are going. *J Clin Med* 2020; 9:1714.
53. Appelbaum FR. Hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia with minimal residual disease. *Best Pract Res Clin Haematol* 2015; 28(2–3):133–140.
54. Roug A.S., Larsen H.Ø., Nederby L., Just T., Brown G., Nyvold Ch.G., et al.: hMICL and CD123 in combination with a CD45/CD34/CD117 backbone – a universal marker combination for the detection of minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2014; 164:212–222.
55. W. Zeijlemaker W., Gratama J.W., Schuurhuis G.J. Tumor heterogeneity makes AML a “moving target” for detection of residual disease. *Cytometry Part B* 2014; 86B:3-14.
56. Ivey A., Hills R.K., Simpson M. A., Jovanovic, J.V., Gilkes A., Grech, Y., et al.: Assessment of minimal residual disease in standard-risk AML. *N Engl Med* 2016; 374(5):422–433.
57. Zeijlemaker W., Grob T., Meijer R., Hanekamp D., Kelder A., Carbaat-Ham J.C.C., et al.: CD34+CD38– leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2019; 33:1102-1112.
58. Shumilova E., Flach J., Kohlmann A., Banzd Y., Bonadies N., Fiedler M., et al.: Current status and trends in the diagnostics of AML and MDS. *Blood Rev* 2018; 32:508-519.
59. Al-Mawali A., Gillis D., Hissaria P., Lewis I.: Incidence, sensitivity, and specificity of leukemia associated phenotypes in acute myeloid leukemia using specific five-color multiparameter flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 2008; 129:934-945.
60. Hanekamp D., Cloos, J., Schuurhuis G. J. Leukemic stem cells: Identification and clinical application. *Int J Hematol* 2017; 105:549–557.
61. Baer M.R., Stewart C.C., Dodge R.K., Leget G., Sule´ N., Mrózek K., et al.: High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukaemia at relapse: Implications for residual disease detection (Cancer and Leukaemia Group B Study 8361). *Blood* 2001; 97:3574–3580.
62. Paietta, E.: Consensus on MRD in AML? *Blood* 2018; 131:1265–1266.
63. Turksen K., red.: Stem cell niche: methods and protocols. New York: 2013. Springer Protocols. methods in molecular biology. 1035. ISBN 978-1-62703-507-1.
64. Yanagisawa B., Ghiaur G., Smith B.D, Jones R.J.: Translating leukemia stem cells into the clinic: harmonizing the heterogeneity. *Exp Hematol* 2016; 44(12):1130-1137.
65. Joshi K., Zhang L., Breslin P.S.J., Zhang J. Leukemia stem cells in the pathogenesis, progression, and treatment of acute myeloid leukemia. *Adv Exp Med Biol* 2019; 1143:95-128.
66. Darwish N.H.E., Sudha T., Godugu K., Elbaz O., Abdelghaffar H.A., Hassan E.E.A., et al.: Acute myeloid leukemia stem cell markers in prognosis and targeted therapy: potential impact of BMI-1, TIM-3 and CLL-1. *Oncotarget* 2016; 7(36):57811-57820.

67. Jongen-Lavrencic M., Grob T., Hanekamp D., Kavelaars F.G., al Hinai A., Zeilemaker A., et al.: Molecular minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2018; 378:1189-99.
68. Getta B.M., Devlin S.M., Levine R.S., Arcila M.E., Mohanty A.S., Zehir A., et al.: Multicolor flow cytometry and multigene next-generation sequencing are complementary and highly predictive for relapse in acute myeloid leukemia after allogeneic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017; 23:1064-1071.
69. Adriano Venditti A., Piciocchi A., Candoni A., Melillo L., Calafiore V., Cairoli R., et al.: GIMEMA AML1310 trial of risk-adapted, MRD-directed therapy for young adults with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Blood* 2019; 134(12):935-945.
70. Schuurhuis G.J., Heuser M., Freeman S., Ben´ e M-Ch., Buccisano F., Cloos J., et al.: Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood* 2018; 131(12):1275-1291.
71. Moshavera B., Wouters R.F., Kelder A., Ossenkoppele G.J. , Westraa G.A.H., Kwidama Z., et al.: Relationship between CD34/CD38 and side population (SP) defined leukemia stem cell compartments in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2019; 81:27-34.
72. Wang X., Huang S., Chen J-L. Understanding of leukemic stem cells and their clinical implications. *Molecular Cancer* 2017; 16:2.
73. Zhao X., Singh S., Pardoux C., Zhao j., Hsi E.D., Abo A. et al.: Targeting C-type lectin-like molecule-1 for antibody-mediated immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Haematol* 2010; 95(1):71-78.
74. Lu H., Zhou Q., Deshmukh V., Phull H., Ma J., Tardif V., et al.: Targeting human c-type lectin-like molecule-1 (CLL1) with a bispecific antibody for acute myeloid leukemia immunotherapy. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014; 53(37):9841-9845.
75. Morsink L.M., Walter R.B., Ossenkoppelea G.J. Prognostic and therapeutic role of CLEC12A in acute myeloid leukemia. *Blood Rev* 2019; 34:26-33.
76. Morsink L.M., Walter R.B. Novel monoclonal antibody-based therapies for acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2019; 32:116-126.
77. Hutten T.J.A., Thordardottir S., Fredrix H., Janssen L., Woestenenk R., Tel J.,et al.: CLEC12A-mediated antigen uptake and cross-presentation by human dendritic cell subsets efficiently boost tumor-reactive T cell responses. *J Immunol* 2016; 197:2715-2725.
78. Jiang Y-P., Liu B.Y., Zheng Q., Panuganti S., Chen R., Zhu J., et al.: CLT030, a leukemic stem cell–targeting CLL1 antibody-drug conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. *Blood Adv* 2018; 2(14):1738-1749.

79. Tashiro H., Sauer T., Shum T., Parikh K., Mamonkin M., Omer B., et al.: Treatment of acute myeloid leukemia with T cells expressing chimeric antigen receptors directed to C-type lectin-like molecule 1. *Mol Therapy* 2017; 25(9):2202-2213.
80. Kenderian S.S., Ruella M., Shestova O., Kim MY., Klichinsky M., Chen F., et al. Leukemia stem cells are characterized by CLEC12A expression and chemotherapy refractoriness that can be overcome by targeting with chimeric antigen receptor T cells. *Blood* 2016; 128(22):766
81. Laborda L., Mazagova M., Shao S., Wang X., Quirino H., Woods A.K., et al.: Development of a chimeric antigen receptor targeting C-type lectin-like molecule-1 for human acute myeloid leukemia. *Int J. Mol. Sci.* 2017; 18:2259.
82. Wang J., Chen S., Xiao W., Li W., Wang L., Yang S., et al.: CAR-T cells targeting CLL-1 as an approach to treat acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncology* 2018; 11:7.
83. Zhou J., Chng W-O. Identification and targeting leukemia stem cells: The path to the cure for acute myeloid leukemia. *World j Stem Cells* 2014; 6(24):473-484.
84. Yabushita T., Satake H., Maruoka H., Morita M., Katoh D., Shimomura Y., et al.: Expression of multiple leukemic stem cell markers is associated with poor prognosis in de novo acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2018; 59(9):2144-2151.
85. Haubner S., Perna F., Köhnke T., Schmidt C., Berman S., Augsberger C., et al.: Coexpression profile of leukemic stem cell markers for combinatorial targeted therapy in AML. *Leukemia* 2019; 33(64):64-74.
86. Yang X., Wang G-X., Zhou J-f. CAR T cell therapy for hematological malignancies. *Curr Med. Science* 2019; 39(6):874-882.
87. Nagy A., Neubauer A. Acute myeloid leukemia with myelodysplasia related changes. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2017; 21:404-408.
88. Businesswire.com. iCell gene therapeutics presents first-in-human Data of CLL1-CD33 compound CAR T in refractory acute myeloid leukemia. iCell Gene Therapeutics, LLC. December 05, 2018 07:12. Przeglądany 15 grudnia 2021}. Dostępny w: <https://www.businesswire.com/news/home/20181205005890/en/iCell-Gene-Therapeutics-Presents-First-in-Human-Data-of-CLL1-CD33-Compound-CAR-T-in-Refractory-Acute-Myeloid-Leukemia>
89. Cloos J., Harris J.R., Janssen J.J.W.M., Kelder A., Huang F., Sijm G., et al.: Comprehensive protocol to sample and process bone marrow for measuring measurable residual disease and leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Jove* 2018; 133(e56386):1-11.
90. Kalina T., Flores-Montero J., van der Velden VHJ., Martin-Ayuso M , Bottcher S., Ritgen M., Almeida J., et al.: EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 2012; 26:1986–2010.

91. Lacombe F., Durrieu F., Briais A., Dumain P., Belloc F., Bascans E., et al.: Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997; 11:1878-1886.
92. Larsen H.Q., Roug A.S., Just T., Brown G.D., Hokland P. Expression of the hMICL in Acute Myeloid Leukemia—A Highly Reliable Disease Marker at Diagnosis and During Follow-Up. *Cytometry Part B* 2012; 82B:3-8.
93. Van der Pol M.A., Broxterman H.J., Westra G., Ossenkoppele G.J., Schuurhuis G.J. Novel Multiparameter Flow Cytometry Assay Using Syto16 for the Simultaneous Detection of Early Apoptosis and Apoptosis-Corrected P-Glycoprotein Function in Clinical Samples. *Cytometry Part B* 2003; 55B:14-21.
94. Sunami K., Suzuki K., Ri3 M., Matsumoto M., Shimazaki Ch., Asaoku h., et al.: Isatuximab monotherapy in relapsed/refractory multiple myeloma: A Japanese, multicenter, phase 1/2, safety and efficacy study. *Cancer Sci* 2020; 111(12):4526-4539.
95. Hosen N. Multiple myeloma-initiating cells. *Int J Hematol* 2013; 97(3):306-12.
96. Toft-Petersen M., Nederby L., Kjeldsen E., Kerndrup G.B., Brown G.D., Hokland P., et al.: Unravelling the relevance of CLEC12A as a cancer stem cell marker in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2016; 175(3):393-401.
97. Al-Mawali a., Gillis D., Lewis I. Immunoprofiling of leukemic stem cells CD34+/CD38-/CD123+ delineate FLT3/ITD-positive clones. *J Hematol Oncol* 2016; 9:61.
98. Sutherland D.R., Anderson L., Keeney M., Nayar R., Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *J Hematotherapy* 1996; 5:213-226.
99. Plesa A., Dumontet Ch., Mattei E., Tagoug I., Hayette S., Sujober P., et al.: High frequency of CD34+CD38-/low immature leukemia cells is correlated with unfavorable prognosis in acute myeloid leukemia. *World J Stem Cells* 2017; 9(12):227-234.
100. Coustan-Smith E., Song G., Shurtleff S., Eng-Juh Yeoh A., Chng W.J., Chen S.P., et al.: Universal monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *JCI Insight* 2018; 3:9.
101. Clarkson B.D.: Review of recent studies of cellular proliferation in acute leukemia. W: Perry S., red.: Human tumor cell kinetics: lecture series. Washington: Bethesda, Md. : U.S. Dept. of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, National Cancer Institute; 1969.
102. Thomas D., Majeti R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood* 2017; 129(12):1577-1585.
103. Costello R.T., Mallet F., Gaugler B., Sainty D., Arnoulet Ch., Gastaut j.a., et al.: Human acute myeloid leukemia CD34+/CD38- progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. *Cancer Res* 2000; 60(16):4403-4411.

104. Ran D., Schuberta M., Tauberta I., Ecksteina V., Bellosa F., Jauch A., et al.: Heterogeneity of leukemia stem cell candidates at diagnosis of acute myeloid leukemia and their clinical significance. *Exp Hematol* 2012; 40:155-165.
105. Döhner H., Weisdorf D.J., Bloomfield C.D. Acute myeloid leukemia. *N Eng J Med* 2015; 373(12):1136-1152.
106. Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Careres-Cortes J., et al.: A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367(6464):645-648.
107. Birbrair A., red.: Stem cells heterogeneity in cancer. Belo Horizonte: 2019. Springer. *Advances in Exp Med. and Biol.* 136. ISBN 978-3-030-14365-7.
108. Bonnet D., Dick J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3(7):730-737.
109. Sarry J.E., Murphy K., Perry R., Sanchez P.V., Secreto A., Keefer C., et al.: Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2R γ -deficient mice. *J Clin Investig* 2011 (1):384-395.
110. Ng S.W.K., Mitchell A., Kennedy J.A., Chen W.C., McLeod J., Ibrahimova N., et al.: A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature* 2016; 540:433-7.
111. Gerber J.M., Zeidner J.F., Morse S., Blackford A.L., Perkins B., Yanagisawa B., Zhang H., et al.: Association of acute myeloid leukemia's most immature phenotype with risk groups and outcomes. *Haematol* 2016; 101(5):607-615.
112. Raaijmakers M.H.G.P., Emst L., Witte T., Mensink E., Raymakers R.A.P. Quantitative assessment of gene expression in highly purified hematopoietic cells using real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Exp Hematol* 2002; 30:481-487.
113. Khan N., Freeman S.D., Virgo P., Couzens S., Richardson P., Thomas I., et al.: An immunophenotypic pre-treatment predictor for poor response to induction chemotherapy in older acute myeloid leukaemia patients: blood frequency of CD34⁺ CD38^{low} blasts. *Br J Haematol.* 2015; 170(1):80-4.
114. Prognostic value of monitoring a candidate immunophenotypic leukaemic stem/progenitor cell population in patients allografted for acute myeloid leukaemia. *Leukemia.* 2015;29:977 – 998.
115. Shastri A., Will B., Steidl U., Verma A. Stem and progenitor cell alterations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2017; 129(12):1586-1594.
116. Hwang K., Park Ch.J., Jang S., Chi Ch.S., Kim D.Y., Lee J.H., et al.: Flow cytometric quantification and immunophenotyping of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2012; 91:1541-1546.

117. Schuurhuis G.J., Meel M.H., Wouters F., MinL.A., Terwijn M., Jonge N.A., et al.: Normal hematopoietic stem cells within the AML bone marrow have a distinct and higher ALDH activity level than co-existing leukemic stem cells. *PLoS One* 2013; 8:11.
118. Wang Y.Y., Chen W.L., WengXQ., Sheng Y., Wu J., Hao J., et al.: Low CLL-1 expression is a novel adverse predictor in 123 patients with de novo CD34+ acute myeloid leukemia. *Stem Cells Develop* 2017; 26(20):1460-1467.
119. Han H., Byun J.M., Shin D.Y., Yoon S.S., Koh Y., Hong J., et al.: Leukemic stem cell phenotype is associated with mutational profile in acute myeloid leukemia. *Korean J Int Med KJIM* 2020; 36(2):401-412.
120. Woll P.S., Kja U., Chowdhury O., Doolittle H., Wedge D.C., Thongjuea S., et al.: Myelodysplastic syndromes are propagated by rare and distinct human cancer stem cells in vivo. *Cancer Cell* 2014; 25:794–808.
121. Ostendorf B.N., Flenner E., Flörcken A., Westermann J. Phenotypic characterization of aberrant stem and progenitor cell populations in myelodysplastic syndromes. *PLOS ONE*. 2018; 13(5):1-12.
122. Wang W.X.X., Du W., Liu W., Qin X., Huang S. Detection of molecular targets on the surface of CD34+CD38- bone marrow cells in myelodysplastic syndromes. *Cytometry Part A* 2010; 77A: 840-848.
123. Cellular origin of prognostic chromosomal aberrations in AML patients. *Leukemia* 2015; 29:1785–1789.
124. Bill M., Kooten Niekerk P.B., Woll P.S., Herborg L.L., Roug A.S., Hokland P., et al.: Mapping the CLEC12A expression on myeloid progenitors in normal bone marrow; implications for understanding CLEC12A-related cancer stem cell biology. *J Cell Mol Med*. 2018; 22:2311–2318.
125. Ma H., Padmanabhan I.S., Parmar S., Gong Y. Targeting CLL-1 for acute myeloid leukemia therapy. *J Hematol Oncol* 2019; 12(1):41.
126. Wiersma V.R., de Bruyn M., Shi C., Gooden M.J.M., Wouters M.C.A., Samplonius D.F., et al.: C-type lectin-like molecule-1 (CLL1)-targeted TRAIL augments the tumoricidal activity of granulocytes and potentiates therapeutic antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. 2015; 7(2):321-330.
127. Bill M., Aggerholm A., Kjeldsen E., Roug A.S., Hokland P., Nederby L. Revisiting CLEC12A as leukaemic stem cell marker in AML: highlighting the necessity of precision diagnostics in patients eligible for targeted therapy. *Brit JHaematol* 2019; 184:769–781.
128. Terwijn M., Feller N., van Rhenen A., Kedler A., Westra G., Zweegman S., et al.: Interleukin-2 receptor alpha-chain (CD25) expression on leukemic blasts is predictive for outcome and level of residua disease in AML. *Eur J Cancer* 2009; 45(9):1692-1699.

129. Terwijn M., Rutten A.P., Kelder A., Snel A.N., Scholten W.J., Zweegman S. et al.: Accurate detection of residual leukemic stem cells in remission bone marrow predicts relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood*. 2010; 116(21):759.
130. Ho T.Ch., LaMere m., Stevens B.M., Ashton J.M., Myers J.R., O'Dwyer K.M., et al.: Evolution of acute myelogenous leukemia stem cell properties after treatment and progression. *Blood*. 2016; 128 (13):1671-1678.
131. Arber D.A., Erba H.P. Diagnosis and treatment of patient with acute myeloid leukemia with myelodysplasia – related changes. *Am J Clin Pathol*. 2020; 154:731-741.

11. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ



POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
W SZCZECINIE
KOMISJA BIOETYCZNA
70-204 Szczecin, ul. Rybacka 1
tel. +48 91 4800 773, fax +48 91 4800 842
e-mail: bioetyka@pum.edu.pl



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

**Uchwała nr KB-0012/158/17
Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego
w Szczecinie z dnia 18.12.2017 r.**

Na podstawie art. 29 ust. 1 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. z 05.11.2008 r. Nr 136, poz. 857) oraz § 6 rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480) uchwała się, co następuje:

§ 1

Komisja Bioetyczna Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie /obradująca i wydająca opinię zgodnie z zasadami GCP Good Clinical Practice oraz zasadami Deklaracji Helsińskiej/ w składzie według listy dołączonej do uchwały, po zapoznaniu się z dokumentacją projektu badawczego pt.:

„Ocena odsetka komórek CD34+/CD38-/CLL-1 w szpiku kostnym u pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej i/lub zespołu mielodysplastycznego przed leczeniem i w trakcie monitorowania choroby”

Główny Badacz:

- mgr Ewa Dobak - Zakład Patomorfologii PUM w Szczecinie

Promotor:

- prof. dr hab. n. med. Elżbieta Uraśńska

Współbadacze:

- prof. dr hab. n. med. Elżbieta Uraśńska,
- prof. dr hab. n. med. Barbara Zdziarska,
- dr hab. n. med. Katarzyna Karpińska,
- dr n. med. Renata Guzicka – Kazimierczak,
- mgr Mai Prokowska

Recenzent badania:

- dr hab. prof. nadzw. PUM Marek Myślak

Lista dokumentów załączonych do wniosku:

- Wniosek do Komisji Bioetycznej PUM w Szczecinie o wyrażenie opinii o projekcie badawczym,
- Opis projektu badawczego,
- Pisemna akceptacja prof. dr hab. n. med. Barbary Zdziarskiej kierownika Kliniki Hematologii i Transplantologii PUM w Szczecinie na przeprowadzenie badań,
- Pisemna akceptacja prof. dr hab. n. med. Elżbiety Uraśńskiej kierownika Zakładu Patomorfologii PUM w Szczecinie na przeprowadzenie badań,
- Karta informacyjna dla pacjenta będącego w grupie badanej,
- Formularz pisemnej zgody pacjenta,



POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
W SZCZECINIE
KOMISJA BIOETYCZNA
70-204 Szczecin, ul. Rybacka 1
tel. +48 91 4800 773, fax +48 91 4800 642
e-mail: bioetha@pum.edu.pl

stwierdza:

1. ośrodek, w którym ma być przeprowadzone badanie spełnia wymogi dla jego przeprowadzenia,
2. kwalifikacje zawodowe i naukowe kierownika badania gwarantują właściwe przeprowadzenie badania,
3. osoby poddane badaniu zostaną szczegółowo zapoznane z celami i zasadami przeprowadzenia doświadczenia, ze spodziewanymi dla nich korzyściami leczniczymi oraz o ryzyku związanym z poddaniem się eksperymentowi,
4. zagwarantowano w badaniu obowiązek uzyskania świadomej zgody od wszystkich badanych osób lub ich przedstawicieli ustawowych, ochronę danych osobowych uczestników badania oraz możliwości odstąpienia od udziału w eksperymencie w każdym jego stadium.

W związku z powyższym Komisja Bioetyczna PUM wyraża pozytywną opinię o zaprezentowanym badaniu.

§ 2

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku i przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja projektu badawczego wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, które mogłyby mieć wpływ na opinię Komisji, o ciężkich lub niespodziewanych zdarzeniach niepożądanych i nieprzewidzianych okolicznościach, o zakończeniu badania i o jego wynikach.















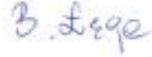
§ 3

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia i obowiązuje na okres badania.

PRZEWODNICZĄCY
Komisji Bioetycznej
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

prof. dr hab. n. med. Marek Drożdżik

**Lista obecności członków Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie
18 grudnia 2017 r.**

	Imię i nazwisko	Miejsce pracy	
1.	prof. dr hab. Marek Drożdżik (choroby wewnętrzne)	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 2 PUM w Szczecinie 70-111 Szczecin, al. Powstańców Wielkopolskich 72 Kierownik: Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej	
2.	mgr Gabriela Hofman położna	Szczecińska Izba Pielęgniarek i Położnych ul. Kusocińskiego 16LU1 70-237 Szczecin Przewodnicząca Rady Szczecińskiej Izby Pielęgniarek i Położnych	
3.	dr hab. Anita Chudecka – Głaz (ginekologia i położnictwo, ginekologia onkologiczna)	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 2 PUM w Szczecinie 70-111 Szczecin, al. Powstańców Wielkopolskich 72 Klinika Ginekologii Operacyjnej i Onkologii Ginekologicznej Dorosłych i Dziełuchwał	
4.	dr hab. prof. nadzw. PUM Marek Myślak Choroby wewnętrzne, nefrologia, transplantologia	Samodzielny Publiczny Wojewódzki Szpital Zespolony im. Marii Skłodowskiej – Curie 71-455 Szczecin, ul. Arkońska 4 Ordynator: Oddział Nefrologii i Transplantacji Nerek Stacja Dializ Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie 70-103 Szczecin, ul. gen. Dezyderyego Chłapowskiego 11 Kierownik: Zakład Interwencji Klinicznych i Medycyny Katastrof	
5.	dr Anita Horodnicka – Józwa specjalista pediatra, diabetolog, endokrynolog i diabetolog dziecięcy	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie im. prof. Tadeusza Sokołowskiego 71-252 Szczecin, ul. Unii Lubelskiej 1 Klinika Pediatrii, Endokrynologii, Diabetologii, Chorób Metabolicznych i Kardiologii Wzrostu i Rozwoju	
6.	dr Edyta Zagrodnik – Ulan anestezjologia i intensywne terapia	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie im. prof. Tadeusza Sokołowskiego w Szczecinie 72-010 Police, ul. Siedlecka 2 Oddział Kliniczny Anestezjologii i Intensywnej Terapii Dorosłych i Dzieci	
7.	prof. dr hab. Dariusz Bielicki choroby wewnętrzne, gastroenterologia	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie im. prof. Tadeusza Sokołowskiego 71-252 Szczecin, ul. Unii Lubelskiej 1 Pracownik: Katedra i Klinika Gastroenterologii	
8.	dr hab. prof. nadzw. PUM Andrzej Brodkiewicz pediatria, nefrologia dziecięca	Samodzielny Publiczny Specjalistyczny Zakład Opieki Zdrowotnej „Zdroje” 70-780 Szczecin, ul. Mączna 4 PUM w Szczecinie Kierownik: Oddział Kliniczny Pediatrii, Nefrologii Dziecięcej, Dializoterapii i Leczenia Ostrego Zatrucia	
9.	dr hab. Krystyna Lisiecka stomatologia zachowawcza	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 2 PUM w Szczecinie 70-111 Szczecin, al. Powstańców Wielkopolskich 72 Zakład Stomatologii Dziecięcej Emeryt	
10.	prof. dr hab. Piotr Prowans chirurgia ogólna specjalista chirurgii plastycznej	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie im. prof. Tadeusza Sokołowskiego 72-010 Police, ul. Siedlecka 2 Kierownik: Klinika Chirurgii Plastycznej, Endokrynologicznej i Ogólnej	
11.	prof. dr hab. Jacek Rudnicki pediatria, neonatologia	Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie 70-103 Szczecin, ul. gen. Dezyderyego Chłapowskiego 11 Kierownik: Zakład Nauk Humanistycznych w Medycynie	
12.	ks. dr Arkadiusz Wieczorek teologia moralna, bioetyka	Arcybiskupie Wyższe Seminarium Duchowne, ul. Papieża Pawła VI, 2, 71-459 Szczecin	
13.	ks. dr hab. prof. US Wiesław Dyk filozofia, filozofia przyrody	Uniwersytet Szczeciński Wydział Humanistyczny Instytut Filozofii, Szczecin, ul. Krakowska 71	
14.	mgr Witold Frankiewicz prawnik	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie im. prof. Tadeusza Sokołowskiego 71-252 Szczecin, ul. Unii Lubelskiej 1 Sekcja Organizacyjno - Prawna	
15.	mgr Bernadeta Łęga farmacja apteczna	Zachodniopomorskie Centrum Kształcenia Zawodowego i Ustawicznego w Szczecinie ul. Broniewskiego 9, 71-460 Szczecin Nauczyciel przedmiotów zawodowych (nauczyciel dyplomowany)	

UPOWAŻNIENIE
do przetwarzania danych osobowych
w Pomorskim Uniwersytecie Medycznym w Szczecinie
nr 381/2017

Na podstawie art. 37 ustawy z dnia 29 sierpnia 1997 r. o ochronie danych osobowych
(Dz. U. z 2016r. poz. 922), Rektor PUM upoważnia

Ewa Dobak
(Imię i Nazwisko)

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
(nazwa jednostki organizacyjnej)

do przetwarzania danych w zbiorze: **Dokumentacja związana z dydaktyką**, zgodnie z przepisami ustawy z dnia 29 sierpnia 1997 r. o ochronie danych osobowych, wydanych na jej podstawie aktów wykonawczych oraz obowiązujących przepisów wewnętrznych:

Upoważnienie wygasa z chwilą wykonywania przez Pani czynności na rzecz PUM lub z chwila jego odwołania.

Z up. REKTORA
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego
w Szczecinie

PROREKTOR
ds. Dydaktyki
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego
w Szczecinie

Dobak
.....
prof. dr hab. n. med. Barbara Dąbrowska
KIEROWNIK ZAKŁADU
PATOMORFOLOGII
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

U
prof. dr hab. n. med. Elżbieta Ugańska

Szczecin,
(data i podpis ABI)

ADMINISTRATOR
Bezpieczeństwa Informacji
M. Jankowska
mgr Magdalena Jankowska
28.07.17

Dobak Ewa

UPOWAŻNIENIE 7/2017
do przebywania w obszarze przetwarzania danych osobowych
w Pomorskim Uniwersytecie Medycznym w Szczecinie

Upoważniam

Ewę Dobak – młodszego specjalistę inżynierijno-technicznego Katedry i Zakładu Patomorfologii

do przebywania w obszarze ochrony danych osobowych w pomieszczeniach:

Katedry i Zakładu Patomorfologii przy ul. Unii Lubelskiej 1, 71-252 Szczecin

Upoważnienie wygasa z chwilą ustania Pani zatrudnienia w PUM lub z chwilą jego odwołania.

Z up. REKTORA
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego
w Szczecinie

PROREKTOR
ds. Dydaktyki
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego
w Szczecinie

[Signature]
... prof. dr hab. o. med. Barbara Dolegowska

WZNIK ZAKŁADU
PATOMORFOLOGII
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

[Signature]
prof. dr hab. n. med. Elżbieta Urasińska

[Signature]
Dobak Ewa

ADMINISTRATOR
Bezpieczeństwa Informacji

Szczecin,
(data i podpis ABI) *[Signature]* 28.09.17