

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego  
w Poznaniu

lek.med. Anna Wache

**PRZYDATNOŚĆ OCENY HISTOLOGICZNEJ SZPIKU  
W DIAGNOSTYCE PACJENTÓW Z ROZPOZNANIEM OSTREJ BIAŁACZKI  
SZPIKOWEJ**

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. med. Mieczysław Komarnicki

Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku  
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Panu Profesorowi dr hab. med. Mieczysławowi Komarnickiemu

składam serdeczne podziękowania  
za opiekę naukową, wsparcie, cenne rady,  
wrozumiałość i wszechstronną pomoc.

1. Wstęp .....	11
1.1 Epidemiologia, etiologia i mechanizm powstania ostrej białaczki szpikowej.....	11
1.2. Kryteria rozpoznania AML.....	13
1.3 Postępowanie terapeutyczne w ostrej białaczce szpikowej .....	17
1.3.1. Indukcja remisji.....	17
1.3.2 Leczenie poindukcyjne.....	22
1.3.3 Terapia wspomagająca .....	25
1.3.4 Czynniki wpływające na wynik leczenia AML .....	27
1.4 Zastosowanie oceny histologicznej w diagnostyce AML.....	33
1.5 Znaczenie badań immunohistochemicznych w materiale bioptycznym.....	36
1.5.1 Antygen CD34 .....	39
1.5.2 Antygen CD117 .....	41
1.5.3 Białko Ki67 .....	46
1.6 Angiogeneza .....	49
1.7 Włóknienie.....	53
1.8 Uzasadnienie celu pracy .....	55
2. Cel pracy:.....	60
3. Materiał i metody .....	61
3.1 Pacjenci.....	61
3.1.1 Charakterystyka parametrów laboratoryjnych ocenianych przy rozpoznaniu ostrej białaczki szpikowej .....	64
3.2 Metodyka badań.....	66
4. Wyniki badań.....	69
4.1. Charakterystyka parametrów laboratoryjnych w chwili rozpoznania ostrej białaczki szpikowej oraz w 7-10 dobie po zakończeniu chemioterapii indukującej remisję.....	69
4.1.1. Ocena rozmazu krwi .....	69

4.1.2. Badanie cytologiczne szpiku .....	69
4.1.3. Ocena szpiku techniką cytometrii przepływowej .....	70
4.1.4. Ocena histologii szpiku .....	70
4.1.4.1. Komórkowość szpiku .....	70
4.1.4.2. Analiza zawartości komórek blastycznych .....	73
4.1.4.3. Ocena włóknienia .....	76
4.1.4.4. Ocena nasilenia proliferacji komórkowej .....	77
4.1.4.5. Analiza zawartości komórek o fenotypie CD34+ .....	80
4.1.4.6. Analiza zawartości komórek o fenotypie CD117+ .....	82
4.1.4.7. Ocena angiogenezy .....	85
4.2 Ocena wyników leczenia w analizowanej grupie chorych .....	88
4.3 Analiza wpływu pojedynczych czynników na uzyskanie CR .....	90
4.3.1 Analiza czynników predykcyjnych osiągnięcia remisji całkowitej po I kuracji indukującej remisję u chorych z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej.....	90
4.3.2 Analiza krzywych ROC .....	91
5. Omówienie wyników badań .....	98
6. Wnioski.....	112
7. Spis tabel i wykresów .....	113
8. Spis rycin i fotografii.....	116
9. Piśmiennictwo .....	117
10. Streszczenie w języku polskim.....	126
10.1 Streszczenie w języku angielskim.....	130
11. Aneks .....	134

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- „3+7” - schemat chemioterapii indukującej remisję w ostrej białaczce szpikowej
- ADE - schemat chemioterapii (arabinozyd cytozyny + daunorubicyna + etopozyd)
- ADLs - (ang. Activity Of Daily Living) - skala pomiaru aktywności codziennego życia
- AML - (ang. Acute Myeloid Leukemia) - ostra białaczka szpikowa
- AraC - arabinozyd cytozyny
- ASXL1 - mutacja somatyczna występująca w ostrej białaczce szpikowej
- ALL - (ang. Acute Lymphoblastic Leukemia) - ostra białaczka limfoblastyczna
- AUC - (ang. Area Under Curve) - pole pod krzywą
- BA - (ang. Aspiration Biopsy) - biopsja aspiracyjna
- BAC - biopsja aspiracyjna cienkoigłowa
- BAALC* - (ang. Brain And Acute Leukemia Cytoplasmic)- gen zaangażowany w powstanie m.in. ostrej białaczki szpikowej , zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 8. (8q22.3)
- BCR-ABL* - (ang. Breakpoint Cluster Regionz) gen fuzyjny zgenem mysiej białaczki Abelsona odpowiadający za produkcję nieprawidłowego białka (kinazy tyrozynowej bcr-abl), gen zaangażowany w powstanie białaczek
- BFU-E - (ang. Burst Forming Units-Erythroid) - jednostka wzbudzająca kolonie erytroidalne
- BIH - badanie immunohistochemiczne
- CALGB - ang. Cancer and Leukemia Group B
- CBFB- MYH11*- gen fuzyjny występujący w ostrej białaczce szpikowej inv(16)(p13.1q22)
- CD - (ang. Cluster of Differentiation)- antygeny zróżnicowania liniowego na komórkach
- CCI - (ang. Charlson Comorbidity Index) - indeks chorób współistniejących wg Charlsona

CEBPA - mutacja somatyczna występująca w ostrej białaczce szpikowej

CI - (ang. Confidence Interval) - przedział ufności

CIn - (ang. Comorbidity Index) - indeks chorób współistniejących

CMV - wirus cytomegalii

CR - (ang. complete remission) - całkowita remisja

*DEK-NUP214* - gen fuzyjny występujący w ostrej białaczce szpikowej (wg WHO 2008)t(6;9)(p23;q34)

DFC - (ang. Dense Fibillary Component) - gęsty składnik fibrylarny

DFS - (ang. Disease Free Survival) - przeżycie wolne od choroby

*DNMT3A* - (ang. DNA Methyltransferase 3 Alpha), gen zaangażowany w powstanie ostrej białaczki szpikowej

ECOG - ang. Eastern Cooperative Oncology Group

EFS - (ang. Event Free Survival) - przeżycie wolne od zdarzeń

EGF - (ang. Epidermal Growth Factor) - nabłonkowy czynnik wzrostu

ELN - ang. European Leukemia Net

EORTC - ang. European Organisation for Research and Treatment of Cancer

FAB - (ang. French-American-British) - francusko-amerykańsko-brytyjska klasyfikacja ostrych białaczek szpikowych

FISH - (ang. Fluorescence In Situ Hybridization) - fluorescencyjna hybrydyzacja in situ

FL - (ang. follicular lymphoma) - chłoniak grudkowy

FLAG-Ida - schemat chemioterapii AML (fludarabina, idarubicyna, G-CSF)

FLT3-ITD - mutacja somatyczna występująca w ostrej białaczce szpikowej

*GATA2* - gen zaangażowany w powstaniu AML, jeden z rodziny genów *GATA*, biorących udział w krwiotworzeniu

G-CSF - (ang. Granulocyte Colony-Stimulating Factor) - czynnik stymulujący powstawanie kolonii granulocytarnych

GIST - (ang. Gastrointestinal Stromal Tumor) - nowotwór podścieliska przewodu pokarmowego

GM-CSF - (ang. Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) - czynnik stymulujący powstawanie kolonii granulocytarno-

- makrofagowych
- GTG - klasyczne badanie cytogenetyczne
- HCTI-CI (ang. Hematopoietic Cell Transplantation-Comorbidity Index) - indeks chorób współistniejących obliczany przy kwalifikacji do transplantacji komórek krwiotwórczych
- HL - (ang. Hodgkin Lymphoma) - chłoniak Hodgkina
- HLA - (ang. Human Leukocyte Antigens) - główny układ zgodności tkankowej
- HSC - (ang. Hematopoietic Stem Cell) - hematopoetyczna komórka macierzysta
- HSCT - (ang. Hematopoietic Stem Cell Transplantation) - transplantacja komórek krwiotwórczych
- HSV - (ang. Herpes Simplex Virus)- wirus opryszczki pospolitej
- HUVECs - (ang. Human Umbilical Vein Endothelial Cells) - ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej
- IADLs - (ang. instrumental activity of daily living) - skala pomiaru instrumentalnej aktywności codziennego życia
- IDH1, IDH2* - (ang. Isocitrate Dehydrogenase 1/ Isocitrate Dehydrogenase 2)- geny dehydrogenazy izocytrynianowej, zaangażowane w powstanie m.in. ostrej białaczki szpikowej
- IH -(ang. Immunohistochemistry)- immunohistochemia
- IL -interleukina
- JAK2 - cytoplazmatyczna kinaza tyrozynowa
- kDa - kilodalton
- KKCz - koncentrat krwinek czerwonych
- KKP - koncentrat krwinek płytkowych
- K-RAS* -(ang. Kirsten Rat Sarcoma)-protoonkogen zaangażowany w powstanie ostrej białaczki szpikowej
- LI - (ang. Labelling Index) - indeks podziału
- LSC - (ang. Leukemic Stem Cell) - białaczkowe komórki macierzyste
- LRP - (ang. Lung Resistance - Related Protein) - białko związane z opornością na leki

m.cz - masa cząsteczkowa

MCL - (ang. Mantle Cell Lymphoma) - chłoniak z komórek płaszcza

M-CSF - (ang. Macrophage Colony - Stimulating Factor) - czynnik wzrostu makrofagów

MDS - (ang. Myelodysplastic Syndrome) - zespół mielodysplastyczny

*MECOM* - gen zaangażowany w powstanie ostrej białaczki szpikowej, zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 3. (3q26.2)

MFI - (ang. Mean Fluorescence Intensity) - średnia intensywność fluorescencji

MGUS - (ang. Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance) - gammopatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu

*MLLT3-MLL* - gen fuzyjny występujący w ostrej białaczce szpikowej

MM - (ang. Multiple Myeloma) - szpiczak plazmocytowy

MN1 - mutacja somatyczna występująca w ostrej białaczce szpikowej

MRD - (ang. Minimal Residual Disease) - choroba resztkowa

MRP - (ang. Multidrug Resistance Protein) - białko oporności wielolekowej

MVD - (ang. Mean Vessel Density) - średnia gęstość naczyń

MZL - (ang. Marginal Zone Lymphoma) - chłoniak strefy brzeżnej

NCCN - ang. National Comprehensive Cancer Network

nested-PCR - wewnętrzny PCR, metoda o wyższej czułości niż technika klasyczna

NHL - (ang. Non - Hodgkin Lymphoma) - chłoniak nieziarniczny

NPM1 - mutacja somatyczna występująca w ostrej białaczce szpikowej

*N-RAS* - gen z rodziny genów RAS zaangażowany w powstanie ostrej białaczki szpikowej

OR - (ang. Odds Ratio) - iloraz szans

OS - (ang. Overall Survival) - całkowite przeżycie

OUN - ośrodkowy układ nerwowy

PCR - (ang. Polymerase Chain Reaction)- łańcuchowa reakcja polimerazy

PDGF - (ang. Platelet -Derived Growth Factor)- płytkopochodny czynnik



wzrostu

PFS - (ang. Progression Free Survival) - przeżycie wolne od progresji

PI - (ang. Proliferation Index) - indeks proliferacyjny

PL - punkcja lędźwiowa

*PML-RARA* - gen fuzyjny występujący w ostrej białaczce szpikowej

PLT - płytki krwi

PMR - płyn mózgowo-rdzeniowy

RT-PCR - (ang. Real Time Polymerase Chain Reaction) - reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

*RUNX1-* - gen fuzyjny występujący w ostrej białaczce szpikowej,  
*RUNX1T1* t(8;21)

SPPB (ang. Short Physical Performance Battery) - protokół oceny aktywności fizycznej, narzędzie przesiewowe dla identyfikacji osób zagrożonych niepełnosprawnością

SWOG - ang. The Southwest Oncology Group

TEL-

PDGFRbeta - białko hybrydowe występujące w ostrej białaczce szpikowej

*TET2* -(ang.Ten-Eleven Translocation-2), mutacja genu zaangażowanego w powstanie ostrej białaczki szpikowej

TB - (ang. Trephine Biopsy) - trepanobiopsja

TF - (ang. Tissue Factor) - czynnik tkankowy

TGF-β - (ang. Transforming Growth Factor β) - transformujący czynnik wzrostu beta

SCF - (ang. Stem Cell Factor) - czynnik komórek macierzystych

TBI - (ang. Total Body Irradiation) - napromieniowanie całego ciała

VAS - (ang. Visual Analogue Scale) - Skala wzrokowo-analogowa bólu  
 - (ang. Vascular Cell Adhesion Molecule – 1) - białko,

VCAM-1 śródbłonkowy ligand dla VLA4

VEGF - (ang. Vascular Endothelial Growth Factor) - czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego

VLA4 - (ang. Very Late Antigen 4) - integryna

WHO - (ang. World Health Organization) - Światowa Organizacja

Zdrowia

Wsp. -współautorzy

*WT1* - (ang. Wilms tumor)-gen zaangażowany w powstanie ostrej  
białaczki szpikowej

## 1. Wstęp

Ostra białaczka szpikowa (AML - ang. Acute Myeloid Leukemia) to heterogenna, zarówno pod względem etiologii, jak i obrazu klinicznego, grupa złośliwych nowotworów układu krwiotwórczego. U podłoża choroby leżą złożone zaburzenia genetyczne, a sam proces transformacji nowotworowej zachodzi wieloetapowo. Ostatecznie, w jego wyniku, dochodzi do klonalnego wzrostu zmienionej patologicznie komórki hematopoetycznej. Współczesny model transformacji białaczkowej opisuje najdokładniej teoria “dwóch uderzeń”. Zakłada ona, że transformacja białaczkowa jest wynikiem współistnienia mutacji związanych z procesem transkrypcji i mutacji aktywujących szlaki przekazywania sygnałów. Te pierwsze prowadzą do zaburzenia różnicowania i dojrzewania komórek, drugie natomiast odpowiadają za ich niekontrolowaną proliferację. Postuluje się również obecność “trzeciego uderzenia”, którymi są zaburzenia metylacji genów. [1-3] Ostra białaczka szpikowa jest chorobą bardzo zróżnicowaną pod względem stwierdzanych zmian cytogenetycznych i molekularnych. Wykrycie tych zaburzeń pozwoliło dokładniej poznać biologię choroby, choć pozostaje w tej kwestii jeszcze wiele niewiadomych.

Obraz kliniczny ostrej białaczki szpikowej wynika głównie z wyparcia prawidłowej hematopoezy przez klon nieprawidłowych komórek (blastów białaczkowych). U większości pacjentów z AML w badaniach laboratoryjnych dominują zaburzenia liczby leukocytów z towarzyszącą niedokrwistością i/lub małopłytkowością; często stwierdzone są także zaburzenia układu krzepnięcia. Do najczęstszych objawów klinicznych choroby należą: podatność na infekcje, postępujące osłabienie i/lub wykładniki skazy krwotocznej. Niekiedy komórki białaczkowe naciekają również narządy - najczęściej wątrobę, śledzionę, skórę, dziąsła, ośrodkowy układ nerwowy i kości. [4-6]

### 1.1 Epidemiologia, etiologia i mechanizm powstania ostrej białaczki szpikowej

Ostra białaczka szpikowa jest najczęstszą białaczką występującą u osób powyżej 18 roku życia. Po chłoniakach, stanowi drugą pod względem częstości rozpoznawania chorobę hematologiczną w populacji pacjentów dorosłych. Największa zachorowalność na AML notowana jest w krajach Europy Zachodniej, Stanach Zjednoczonych oraz Oceanii, i wynosi średnio 3,5/100.000 osób/rok. Zachorowalność zwiększa się wraz z wiekiem – z 1/100.000 osób/rok w przedziale 30-35 roku życia (r.ż.), poprzez 10/100.000 osób/rok

powyżej 65 r.ż. do 25/100.000 osób/rok po 80 r.ż. Rokowanie w AML jest poważne, ponieważ choroba obarczona jest blisko 50% śmiertelnością. Średnia wieku w chwili rozpoznania wynosi 68 lat, 54% osób ma więcej niż 65 lat, a 30% chorych liczy ponad 75 lat. [4-8]

W Polsce od 2003 roku istnieje utworzony w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie „Rejestr Zachorowań na Ostre Białaczki Osób Dorosłych”, w którym gromadzone i analizowane są krajowe dane epidemiologiczne. Według raportu w latach 2004-2010 „surowy współczynnik zachorowalności” (liczba zgłaszanych po raz pierwszy zachorowań w danym roku kalendarzowym) na AML wyniósł 2,1/100.000 mieszkańców powyżej 18 roku życia i wykazuje stałą tendencję wzrostową. Rocznie w ośrodkach hematologicznych w Polsce diagnozuje się średnio 538 nowych zachorowań na ostre białaczki (mediana 558), z czego AML stanowią 80% wszystkich zgłoszeń. Średnia wieku zachorowania na AML w populacji polskiej znajduje się w przedziale 53-59 lat, z medianą 55-62 lata. Podobnie jak w Europie i w Stanach Zjednoczonych, w Polsce również nieco częściej chorują mężczyźni – w proporcji 3:2 w odniesieniu do liczby chorych kobiet. Zachorowalność wzrasta wraz z wiekiem - średnio do 60 r.ż. stwierdza się rocznie 232 nowe przypadki, a po 60 r.ż. liczba ta wzrasta do 313. Systematycznie zwiększa się również odsetek pacjentów, u których AML rozpoznawana jest po 70 r.ż. [5,8,9]

Przyczyny powstania ostrych białaczek szpikowych nie są ostatecznie poznane i stanowią one cały czas przedmiot intensywnych badań. Dotychczas zidentyfikowane czynniki ryzyka zachorowania na AML podzielić można na dwie grupy: czynniki środowiskowe oraz czynniki genetyczne. [4,7] Pierwsza z nich obejmuje przede wszystkim narażenie na promieniowanie jonizujące oraz na substancje chemiczne, takie jak pestycydy czy związki powstałe przy przeróbce ropy naftowej (benzen, toluen, aceton, tlenek etylenu, fenol). Około 20% zachorowań na AML wiąże się z uprzednio zastosowanym leczeniem przeciwnowotworowym. Osoby, które w dzieciństwie otrzymywały leczenie onkologiczne, obarczone są większym ryzykiem wystąpienia AML w wieku dorosłym. W grupie kobiet, które były leczone z powodu raka piersi lub raka jajnika, ryzyko rozwoju wtórnej białaczki jest ponad trzykrotnie wyższe niż w populacji nieleczonej. Cytostatyki o udowodnionym potencjale wywoływania wtórnej białaczki, to przede wszystkim środki alkilujące (cyklofosfamid, melfalan), inhibitory topoizomerazy (etozpozyd, doksorubicyna,

mitoksantron) i antymetabolity (analog purynowy - fludarabina). Podobnie, znacznym ryzykiem wystąpienia wtórnej białaczki obciążeni są chorzy poddani radioterapii, szczególnie mieloablacyjnej (TBI - ang. Total Body Irradiation) przed przeszczepieniem komórek hematopoetycznych (HSCT - ang. Hematopoietic Stem Cell Transplantation). [7,9-13] W wyniku działania wymienionych wyżej czynników dochodzi do uszkodzenia struktury DNA, a powstałe w ten sposób spontaniczne mutacje nie zawsze są sprawnie likwidowane przez systemy naprawcze DNA organizmu. Czynniki genetyczne, zwłaszcza zaburzenia w zakresie liczby i struktury chromosomów mają udowodniony bezpośredni wpływ na wzrost zachorowań na AML. Ryzyko zachorowania na ostrą białaczkę jest ponad 20-krotnie wyższe w grupie pacjentów z zespołem Downa, a kilkakrotnie wyższe u osób z zespołami: Klinefeltera, Turnera, Blooma, Shwachmana-Diamonda, Blackfana-Diamonda, w dyskeratozie wrodzonej, agranulocytozie Kostmana i w przypadku niedokrwistości Fanconiego. [14-16]

## **1.2. Kryteria rozpoznania AML**

Zasadniczym kryterium rozpoznania ostrej białaczki szpikowej jest stwierdzenie występowania co najmniej 20% komórek blastycznych w szpiku lub krwi obwodowej. Nie dotyczy to białaczki z powtarzalnymi aberracjami cytogenetycznymi, takimi jak t(8; 21), inv(16), t(16; 16) lub t(15; 17), w których już ich obecność jest wystarczającym warunkiem do rozpoznania choroby, niezależnie od liczby blastów w szpiku bądź krwi. [4]

Klasyfikacja AML na przestrzeni kolejnych lat ulegała modyfikacjom. Pierwszym podziałem opartym na analizie obrazu cytologicznego szpiku uzupełnionego o badania cytochemiczne była klasyfikacja FAB (The French-American-British) ( **tabela 1**).

	<b>Klasyfikacja AML wg FAB</b>
<b>Typ wg FAB</b>	<b>Nazwa</b>
<b>M0</b>	Ostra białaczka szpikowa o bardzo niskim stopniu zróżnicowania
<b>M1</b>	Ostra białaczka mieloblastyczna bez cech dojrzewania
<b>M2</b>	Ostra białaczka mieloblastyczna z cechami dojrzewania
<b>M3</b>	Ostra białaczka promielocytowa
<b>M4</b>	Ostra białaczka mielomonocytowa
<b>M5</b>	Ostra białaczka monoblastyczna (monocytowa słabo zróżnicowana)
<b>M5a</b>	Ostra białaczka monocytowa (monocytowa dobrze zróżnicowana)
<b>M6</b>	Erytoroleukemia
<b>M7</b>	Ostra białaczka megakariocytowa

Tabela 1. Klasyfikacja ostrych białaczek szpikowych wg FAB

Obecnie obowiązujący podział to klasyfikacja według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, World Health Organization) z 2008 roku z uzupełnieniem z 2016 roku, uwzględniająca nie tylko cechy morfologiczne komórek białaczkowych, ale także ich charakterystykę genetyczną, immunofenotypową oraz wspólne dla poszczególnych podtypów cechy kliniczne (**tabela 2**).

<b>OSTRA BIAŁACZKA SZPIKOWA Z POWTARZALNYMI ABERRACJAMI CYTOGENETYCZNYMI</b>
-ostra białaczka z t(8,21)(q22;q22);( <i>RUNX1:RUNX1T1</i> ) -ostra białaczka z nieprawidłowymi eozynofilami w szpiku z inv(16)(p13:1q22) lub t(16:16)(p13.1;q22);( <i>CBFB-MYH11</i> ) -ostra białaczka promielocytowa z t(15:17)(q22;q12);( <i>PML-RAR alfa</i> ) -ostra białaczka ze zmianami 11q23( <i>MLL</i> ); t(9:11)(p22;q23);( <i>MLLT3-KMT2A</i> ) -ostra białaczka z t(6: 9)(q23;q34);( <i>DEK-NUP214</i> ) -ostra białaczka z inv (3)(q21;q26.2) lub t(3:3)(q21q26.2);( <i>GATA2, MECOM</i> ) -ostra białaczka megakarioblastyczna z t(1:22)(p13;q13);( <i>RBM15-MKL1</i> ) - ostra białaczka z <i>BCR-ABL1</i> -ostra białaczka z mutacją <i>NMP1</i> -ostra białaczka z bialleliczną mutacją <i>CEBPA</i> - ostra białaczka z mutacją <i>RUNX1</i>
<b>OSTRA BIAŁACZKA SZPIKOWA Z CECHAMI ZALEŻNYMI OD MIELODYSPLAZJI</b>
-wtórna do zespołów mielodysplastycznych i mielodysplastyczno/mieloproliferacyjnych -postać bez poprzedzającego zespołu mielodysplastycznego
<b>OSTRA BIAŁACZKA SZPIKOWA ZALEŻNA OD TERAPII</b>
<b>OSTRA BIAŁACZKA SZPIKOWA NIESKLASYFIKOWANA-NOS</b>
-ostra białaczka szpikowa niskozróżnicowana (wg FAB M0) -ostra białaczka szpikowa bez cech dojrzewania (wg FAB M1) -ostra białaczka szpikowa z dojrzewaniem (wg FAB M2) -ostra białaczka mielomonocytowa (wg FAB M4) -ostra białaczka monocytowa (wg FAB M5) -ostra białaczka erytroblastyczna (wg FAB M6) -ostra białaczka megakarioblastyczna (wg FAB M7) -ostra białaczka bazofilowa -ostra panmieloza z mielofibrozą
<b>MIĘSAK SZPIKOWY</b>
<b>ROZROSTY MIELOIDALNE ZWIĄZANE Z ZESPOŁEM DOWNA</b>
Przemijająca nieprawidłowa mielopoieza ( <i>transient abnormal myelopoiesis</i> ) Białaczka szpikowa związana z zespołem Downa

Tabela 2. Klasyfikacja ostrych białaczek szpikowych wg WHO z 2008 roku z poprawkami z 2016 roku.

W morfologii krwi obwodowej u chorych na ostrą białaczkę szpikową liczba białych krwinek jest zwykle podwyższona, jednakże u 40-50% chorych obserwuje się prawidłową lub obniżoną ich liczbę. Ponadto, często w morfologii krwi obwodowej

stwierdza się zmniejszenie liczby krwinek czerwonych, stężenia hemoglobiny i obniżoną wartość hematokrytu oraz najczęściej różnego stopnia małopłytkowość. Obecnie, zgodnie z ustaleniami WHO i European Leukemia Net (ELN) z 2010 roku, niezbędny zakres badań diagnostycznych w AML obejmuje:

1. Ocenę morfologii wraz z rozmazem krwi obwodowej z analizą co najmniej 200 komórek jądrowych.
2. Badanie cytologiczne szpiku z oceną co najmniej 500 komórek jądrowych wraz z oszacowaniem stopnia dysplazji w linii erytroidalnej, mieloidalnej i płytkotwórczej.
3. Trepanobiopsję - zalecaną w rekomendacji WHO z 2008 r.
4. Określenie immunofenotypu komórek jądrowych szpiku/krwi, obejmujących oznaczenia antygenów:
  - CD34, CD38, CD117, CD133, HLA-DR (komórki prekursorowe)
  - CD13, C15, CD16, CD33, CD65, cMPO (komórki linii granulocytarnej)
  - CD11c, CD14, CD64, CD4, CD11b, CD36, NG2 homolog, lizozym (komórki linii monocytoidalnej)
  - CD41 (gpIIb/IIIa), CD61(gpIIIa), CD42(gp1b) (komórki układu płytkotwórczego)
  - CD235a (GfA) (komórki linii erytroidalnej)
5. Oznaczenia cytogenetyczne:
  - a. wykonywane techniką klasyczną - GTG (analiza chromosomów w stadium metafazy, uzyskanych w hodowli komórek in vitro)
  - b. przeprowadzane przy użyciu technik molekularnych np. FISH (ang. Fluorescence In Situ Hybridization) - obejmująca analizę jąder komórkowych w stadium interfazy, z zastosowaniem sond swoistych dla określonej sekwencji DNA
6. Badanie molekularne - PCR, RT-PCR, nested PCR, sekwencjonowania DNA obejmujące oznaczenie genów fuzyjnych *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*,



*PML-RARA, MLLT3-MLL ( MLLT3-KMT2A- wg nowej nomenklatury), DEK-NUP214 oraz mutacje FLT3-ITD, NPM1, CEBPA.* [4,17]

### 1.3 Postępowanie terapeutyczne w ostrej białaczce szpikowej

Celem leczenia AML jest całkowita eliminacja klonu białaczkowego. Terapia składa się z kilku etapów. Pierwszy z nich, to indukcja remisji, natomiast dalsze postępowanie uzależnione jest od jej wyniku. Na przestrzeni ostatnich czterdziestu lat znacząco zwiększyła się przeżywalność chorych z rozpoznaną ostrą białaczką szpikową. W latach 70-tych i 80-tych XX wieku śmiertelność w grupie pacjentów w ciągu pierwszego miesiąca leczenia kształtowała się na poziomie 16-18%, aktualnie dla tego samego przedziału czasowego wynosi ona od 3 do 5%. [11]

#### 1.3.1. Indukcja remisji

Schemat leczenia indukującego remisję („3+7”) pozostaje - mniej więcej - stały od 25 lat. Oparty jest on na antybiotyku antracyklinowym (podawanym przez 3 dni) oraz na arabinozydzie cytozyny stosowanym we wlewie ciągłym przez 7 dni. Dawki stosowanych leków mogą podlegać pewnym modyfikacjom; najczęściej stosowane schematy (wg NCCN - National Comprehensive Cancer Network) przedstawiono w **tabeli 3.**

daunorubicyna 45 mg/m <sup>2</sup> (3 dni) +cytarabina 100 mg/m <sup>2</sup> (7 dni)
daunorubicyna 60 mg/m <sup>2</sup> (3 dni) +cytarabina 100 mg/m <sup>2</sup> (7 dni)
daunorubicyna 60 mg/m <sup>2</sup> (3 dni) +cytarabina 200 mg/m <sup>2</sup> (7 dni)
daunorubicyna 90 mg/m <sup>2</sup> (3 dni) +cytarabina 100 mg/m <sup>2</sup> (7 dni)
daunorubicyna 50mg/m <sup>2</sup> (3 dni) + cytarabina 200 mg/m <sup>2</sup> (7 dni)
idarubicyna 12mg/m <sup>2</sup> (3 dni) + cytarabina 200 mg/m <sup>2</sup> (7 dni)
idarubicyna 12mg/m <sup>2</sup> (3 dni) + cytarabina 200 mg/m <sup>2</sup> (7 dni)

Tabela 3. Stosowane schematy terapii „3+7” w leczeniu AML (wg NCCN)

Po pierwszym kursie chemioterapii od 2/3 do 3/4 chorych uzyskuje całkowitą remisję (CR - ang. Complete Remission). Protokoły terapeutyczne nie faworyzują żadnej ze stosowanych antracyklin (daunorubicyna, idarubicyna, doksorubicyna). W badaniach

randomizowanych porównywano równoważne dawki idarubicyny ( $12 \text{ mg/m}^2$ ) i daunorubicyny ( $50 \text{ mg/m}^2$ ) nie stwierdzając różnic w liczbie chorych osiągających CR i 5-letnie całkowite przeżycie (OS - ang. Overall Survival). Większa częstość zakażeń, wstrząsów septycznych i zgonów w czasie pierwszych 60 dni towarzyszyła jednak leczeniu idarubicyną. W badaniach randomizowanych wykazano ponadto, że eskalacja dawek daunorubicyny ( $60$  lub  $90 \text{ mg/m}^2$  vs  $45 \text{ mg/m}^2$ ) pozwalała osiągnąć lepsze efekty terapii, ocenione odsetkiem CR i OS, bez wzrostu liczby powikłań toksycznych. Dotychczas jednak brakuje badań randomizowanych porównujących daunorubicynę w dawce  $60$  i  $90 \text{ mg/m}^2$ . [4,18-20]

Celem poprawy skuteczności leczenia AML, podejmowane są próby dołączenia kolejnych leków do schematu bazowego kuracji. Polska Grupa Białaczkowa zaproponowała wprowadzenie do niego kladrybiny w dawce  $5 \text{ mg/m}^2$  w ciągu pierwszych 5 dni terapii. Skutkowało to poprawą wyników leczenia mierzoną odsetkiem uzyskiwanych CR i 3-letnim OS - odpowiednio  $56$  vs  $68\%$  i  $33$  vs  $45\%$ . Natomiast badania z dołączeniem fludarabiny, etopozydu, tioguaniny, topotekanu i mitoksantronu nie potwierdziły wyższości tych wielolekowych schematów nad klasyczną kuracją „3+7”. [21,22]

W randomizowanym badaniu porównania skuteczności chemioterapii „3+7”, ADE oraz FLAG-Ida, stwierdzono ich zbliżoną wartość terapeutyczną w odniesieniu do odsetka pacjentów osiągających CR. Jednakże, zastosowanie schematów ADE oraz FLAG-Ida wiązało się z występowaniem zdecydowanie wyższego odsetka toksycznych powikłań.

Podobne dane, w zakresie oceny skuteczności terapeutycznej i ryzyka wystąpienia działań niepożądanych uzyskano w analizie porównawczej wyników leczenia wysokimi dawkami AraC. W zakresie od  $5$  do  $36 \text{ g/m}^2$  sumarycznej dawki cytostatyku podanego w trakcie jednej kuracji, przy zastosowaniu średnio od  $8$  do  $12$  infuzji chemioterapeutyku, ze średnią dawką  $1 - 3 \text{ g/m}^2$  przypadającej na pojedynczy wlew leku. [20]

Jak wskazują doświadczenia grupy australijskiej i amerykańskiej (SWOG, the Southwest Oncology Group) zastosowanie wysokich dawek AraC wiązało się ze szczególnie dużym ryzykiem wystąpienia zaburzeń neurologicznych (drgawki, śpiączka, zaburzenia osobowości) i powikłań w układzie moczowym (zapalenie pęcherza moczowego). Schemat ten znajduje zastosowanie w grupie osób, u których nie można

stosować antracyklin. Podkreślić należy, że połączenie antracykliny i AraC w dawce standardowej pozostaje, jak dotąd, najlepszą opcją terapeutyczną w indukcji remisji u chorych na AML. [18]

Rokowanie w grupie pacjentów z niekorzystnym profilem ryzyka cytogenetyczno-molekularnego jest zdecydowanie złe, bowiem odsetek uzyskiwanych remisji jest niski i wynosi 40-50%. Prowadzane są kliniczne badania z wykorzystaniem nowych leków (m.in. inhibitory FLT3), być może ich zastosowanie przyniesie korzyść w postaci zwiększonego odsetka CR i OS. [21] W zaleceniach amerykańskich (NCCN) proponowane jest włączenie chorych do badań klinicznych, wykonanie typowania w zakresie układu HLA i poszukiwanie zgodnego dawcy, w celu przeprowadzenia procedury transplantacji komórek krwiotwórczych. [23]

Leczenie pacjentów z AML powyżej 60 r.ż. jest znacznie trudniejsze i mniej skuteczne niż młodszych chorych. W analizach statystycznych wykazano, że w tej grupie pacjentów brak remisji po zastosowanej indukcji stwierdza się u 40-60% chorych. Problemy terapeutyczne mają charakter wieloczynnikowy i wynikają przede wszystkim z zaawansowanego wieku, gorszego stanu ogólnego, chorób współistniejących oraz z wyższego odsetka występowania niekorzystnych zmian cytogenetycznych. W tej grupie pacjentów częściej stwierdza się wielolekową oporność, co skutkuje niższym odsetkiem CR i krótszym czasem jej trwania. [5,24]

U ponad połowy chorych powyżej 60 roku życia nie jest wdrażane intensywne leczenie. W latach 90-tych XX wieku wykazano, że średni czas przeżycia starszych chorych na AML wynosił 2 miesiące, po 85 r.ż. 1 miesiąc, natomiast 2-letnie OS kształtowało się na poziomie 6%. Jedynie u 30% osób wdrażano chemioterapię i w tej grupie pacjenci żyli dłużej - średnio 7 miesięcy. Zbliżone wnioski pochodzą ze szwedzkich danych, w których wykazano, że w grupie pacjentów poddanych terapii, śmiertelność w okresie pierwszych 30 dni wynosiła 16%, natomiast u chorych leczonych paliatywnie współczynnik ten kształtował się na poziomie 35%. [25] U osób starszych należy dokonać wnikliwej oceny stanu ogólnego, wyodrębniając chorych kwalifikujących się do leczenia intensywną chemioterapią, celem uzyskania lepszego i trwalszego efektu terapeutycznego, porównywalnego z osiąganym w grupie młodszych chorych. [5,23-25]

U pacjentów w dobrym stanie ogólnym z ECOG 0-2 i znajdujących się w przedziałach wiekowych 56-65, 66-75 i 76-89 lat OS kształtowało się odpowiednio na

poziomie 18, 14 i 6 miesięcy. W zakresie zmian cytogenetycznych najgorzej rokuje osoby z zaburzeniami chromosomu 5 i 7, obecnością złożonego kariotypu i/lub mutacjami FLT3, ASXL1, DNMT3A, MN1, BAALC oraz WT1. [25] W opracowaniu German Acute Myeloid Leukemia Study na podstawie analizy parametrów takich jak wiek, masa ciała, wyniki badań laboratoryjnych, cytogenetycznych i molekularnych obliczono szansę powodzenia leczenia indukującego remisję. [134] W tym względzie, dane cytogenetyczne i molekularne wydają się mieć kluczowe znaczenie w przeprowadzonych analizach - przy ich wykorzystaniu trafność przewidywań kształtuje się na poziomie 91%, a przy ich braku wartość predykcyjna znacząco maleje. Podkreślić należy, że nadal poszukiwane są kolejne markery rokownicze. Wielowariantowa analiza (AML96) oprócz wieku, kariotypu, liczby leukocytów, stężenia LDH, ekspresji antygenu CD34 i obecności mutacji genu *NPM1* uwzględnia również stan ogólny, białaczkę wtórną i powstałą na podłożu wcześniejszych zmian hematologicznych, a także ekspresję glikoproteiny P1 - odpowiedzialnej za wielolekową oporność. Celem leczenia, podobnie jak u młodszych chorych, jest osiągnięcie CR, co bezpośrednio przekłada się na lepszą jakość życia chorych, wynikającą ze zmniejszenia odpowiednio liczby hospitalizacji, ryzyka infekcji oraz konieczności przetaczania krwi bądź preparatów krwiopochodnych. W poszukiwaniu optymalnych metod terapeutycznych dokonano także porównania dwóch głównych strategii leczenia chorych powyżej 65 r.ż. obejmujących aktywną chemioterapię (daunorubicyna + winkrystyna + cytarabina) ze strategią wyczekiwania - "watch and wait", opartą na leczeniu wspomagającym i cytoredukcyjnym. W obu grupach pacjentów liczba dni hospitalizacji była zbliżona, natomiast w grupie leczonych aktywnie, czas przeżycia był dłuższy. Z kolei strategia wyczekiwania i obserwacji wydaje się być dobrym wyborem u chorych, u których przebieg AML jest powolny („tłący”). [5,6,13,25-29]

Aktywna chemioterapia w leczeniu indukującym remisję, podobnie jak w grupie młodszych chorych, oparta jest na antybiotyku antracyklinowym w połączeniu z cytarabiną (**tabela 4**). Wyższe dawki antracyklin (daunorubicyna 90 vs 45 mg/m<sup>2</sup>) powodują częstsze CR, natomiast pozostają bez wpływu na OS, EFS (ang. Event Free Survival - przeżycie wolne od zdarzeń) i DFS (ang. Disease Free Survival - przeżycie wolne od choroby).

daunorubicyna 60 mg/m <sup>2</sup> (3 dni) +mitoksantron 12 mg/m <sup>2</sup> (7 dni)
daunorubicyna 90 mg/m <sup>2</sup> (3 dni) +mitoksantron 12 mg/m <sup>2</sup> (7 dni)
idarubicyna 12mg/m <sup>2</sup> (3 dni) + cytarabina 100 mg/m <sup>2</sup> (7 dni)
idarubicyna 12mg/m <sup>2</sup> (3 dni) + cytarabina 200 mg/m <sup>2</sup> (7 dni)
Chemioterapię o mniejszej intensywności (azacytydyna, decytabina lub mniejsza dawka cytarabiny ewentualnie w skojarzeniu z klofarabiną)

Tabela 4. Stosowane schematy terapii indukującej w leczeniu AML u osób powyżej 60 r.ż. (wg NCCN)

Udokumentowano także korzystny wpływ zwiększenia dawki antracyklin w grupie chorych między 60-65 r.ż., natomiast dla pacjentów z wyższych przedziałów wiekowych takiej zależności nie potwierdzono. Z kolei wykorzystanie mitoksantronu, spowodowało uzyskanie wyższego odsetka CR, natomiast nie wpłynęło na czas trwania remisji, jak również na OS. Podejmowane są także próby zastosowania nowych leków takich jak klofarabina, lenalidomid, bortezomib czy worinostat. [21,30,36] U pacjentów, którzy nie mogli otrzymywać antracyklin, a posiadali niekorzystne czynniki ryzyka, zastosowanie klofarabiny skutkowało uzyskaniem wyższego odsetka CR, natomiast nie wpłynęło na 2-letnie przeżycia. NCCN proponuje, podobnie jak u młodszych chorych, wczesną oceną rozmazu szpiku po chemioterapii, a następnie podejmowanie dalszych decyzji terapeutycznych w oparciu o jej wynik. [30]

W terapii AML istotny wpływ na jej ostateczny wynik ma konsekwencja w prowadzeniu leczenia. Udokumentowano, że po zaprzestaniu terapii po osiągnięciu CR po leczeniu indukującym, średnio po 4-8 miesiącach dochodzi do wznowy choroby. Wśród dostępnych opcji leczenia konsolidującego należy wymienić chemioterapię, transplantację komórek hematopoetycznych i prowadzenie leczenia wspomagającego. O ile transplantacja komórek krwiotwórczych jest preferowaną opcją w grupie młodszych chorych, to dla osób powyżej 60 r.ż., w związku z nieakceptowalną toksycznością, proponuje się użycie niemieloablacyjnych schematów terapeutycznych. W latach 1995-2005 w grupie chorych między 40-79 r.ż., w której zastosowano leczenie niemieloablacyjne lub o zredukowanej intensywności, ostateczny wynik terapii pozostawał niezależny od

wieku, natomiast korelował ze stanem ogólnym, ewentualną niezgodnością w układzie HLA i obecnością niekorzystnych zmian cytogenetycznych. Należy podkreślić, że procedury transplantacyjne z podanymi wyżej zastrzeżeniami stwarzają szansę osiągnięcia lepszych wyników leczenia w grupie osób powyżej 60 r.ż., określanych dłuższym czasem trwania CR, DFS i zmniejszeniem ryzyka wznowy. [9,11,31]

### **1.3.2 Leczenie poindukcyjne**

W algorytmie postępowania, coraz częściej zalecane jest wykonywanie wczesnej oceny odpowiedzi na zastosowane leczenie. Kryterium czasowe jej wykonania zazwyczaj obejmuje okres od 7 do 10 dni po zakończeniu indukcji. NCCN postuluje wykonywanie rozmazu i oceny cytologicznej szpiku. W zależności od uzyskanych wyników proponuje się - po stwierdzeniu choroby resztkowej (5-10% blastów) podanie drugiej indukcji z zastosowaniem dużych dawek AraC bądź standardowych dawek AraC z dodatkiem antracykliny przy wyższym odsetku komórek niedojrzałych - jako opcja leczenia pomostowego przed transplantacją komórek hematopoetycznych. W przypadku, gdy liczba nieprawidłowych komórek w szpiku wynosi mniej niż 5%, proponuje się ponowne wdrożenie schematu indukującego. W sytuacji stwierdzenia hipoplazji szpiku (definiowanej jako komórkowość poniżej 10-20%) zaleca się postawę wyczekującą do czasu jego regeneracji i powtórne wykonanie kompleksowej oceny, obejmującej rozmaz szpiku, oznaczenia molekularne i cytogenetyczne. Dodatkowo, można wykonać badania immunofenotypu komórek, jednak brak w tym zakresie wystarczających danych literaturowych co do ich rutynowego stosowania. U pacjentów, którzy otrzymali wysokie dawki AraC, przeprowadzenie oceny postulowane jest między 7-14 dniem po leczeniu. Przy stwierdzeniu powyżej 5-10% blastów proponuje się zakwalifikowanie chorego do alotransplantacji komórek hematopoetycznych, zastosowanie leczenia pomostowego, bądź przy wyczerpaniu innych możliwości terapeutycznych, postępowanie wspomagające i zachowawcze. Pozostałe zalecenia zasadniczo są tożsame z opisanymi wcześniej - przy hipoplazji szpiku i przy znaczącej cytoredukcji blastów zaleca się oczekiwanie do czasu regeneracji szpiku, a następnie przeprowadzenie ponownej jego oceny. [32,33]

W przypadku stwierdzenia CR po terapii indukującej, należy zastosować leczenie poremisyjne, obejmujące: chemioterapię konsolidującą, terapię wysokodawkową wspomaganą przeszczepieniem komórek krwiotwórczych (zarówno w układzie alo - jak

i autologicznym), leczenie podtrzymujące lub w przypadku wyczerpania innych możliwości terapeutycznych, włączenie chorego do badania klinicznego z zastosowaniem nowych leków. Wybór sposobu postępowania zależy od klasyfikacji pacjenta do odpowiedniej grupy ryzyka cytogenetyczno-molekularnego. Dla chorych z grupy dobrego rokowania proponowane są wysokie dawki AraC ( $3 \text{ g/m}^2$  co 12 godz.; 1, 3 i 5 dzień), podawane jako 3 bądź 4 cykle lub 2 cykle z następową transplantacją autologicznych komórek krwiotwórczych. Wybór opcji transplantacyjnej zależy od wieku, stanu ogólnego i chorób współistniejących. U pacjentów z grupy ryzyka pośredniego proponowana jest AraC w wysokich dawkach lub kwalifikacja i przeprowadzenie procedury transplantacji komórek hematopoetycznych od w pełni zgodnego dawcy rodzinnego lub dawcy niespokrewnionego. W grupie chorych o niekorzystnym profilu ryzyka cytogenetyczno-molekularnego zalecana jest kwalifikacja do procedury transplantacji komórek krwiotwórczych od w pełni zgodnego dawcy. [32,33]

W leczeniu konsolidacyjnym pozycja AraC została potwierdzona badaniem z 1994 roku przeprowadzonym przez CALGB (ang. Cancer And Leukemia Group B). Ważną kwestią biorąc pod uwagę skuteczność tego leku, jest dobór odpowiednich jego dawek. Zastosowanie dawek pośrednich w badaniu HAVON/SAKK ( $1 \text{ g/m}^2$  co 12 h przez 6 dni) pozwalało na uzyskanie podobnych wyników, jak w przypadku wysokich dawek AraC (CR 80% vs 82%, 5-letni OS 40 vs 42% i 5-letni EFS 34% vs 35%). [18,19] Kwalifikacja do procedury transplantacji komórek krwiotwórczych wymaga szczegółowej oceny pacjenta. Bardziej intensywne schematy leczenia zakończone autoHSCT, dedykowane są chorym z dodatkowymi czynnikami ryzyka niepowodzenia terapii – takimi jak leukocytoza początkowa powyżej  $50 \text{ G/l}$  i/lub wymagającymi więcej niż jednego cyklu indukującego. Natomiast chorzy z niekorzystnymi zmianami cytogenetycznymi (mutacja genu *c-KIT*) według aktualnych wskazań wymagają aHSCT. [10,34]

Po zakończeniu leczenia konsolidującego zalecane jest monitorowanie morfologii krwi z rozmazem co 1-3 miesiące przez pierwsze dwa lata, a następnie 2-4 razy w ciągu roku przez kolejnych 5 lat. Biopsja szpiku zalecana jest tylko w przypadku stwierdzenia nieprawidłowości w rozmazie krwi obwodowej lub wystąpienia cytopenii. W razie stwierdzenia wczesnej lub późnej wznowy AML (odpowiednio poniżej i powyżej 12 miesięcy od zakończenia leczenia) należy dążyć do przeprowadzenia transplantacji komórek hematopoetycznych od w pełni zgodnego dawcy. [5,35,36]

W przypadku podjęcia decyzji o kontynuacji leczenia cytostatykami w grupie pacjentów powyżej 60 r.ż. w terapii poremisyjnej proponuje się wybór pomiędzy azacytydyną, decytabiną, małymi dawkami AraC lub hydroksymocznikiem. [5,24,31] Po zakończeniu konsolidacji monitorowanie chorych przeprowadza się podobnie jak u chorych z młodszego przedziału wiekowego.

W sytuacji stwierdzenia wznowy wczesnej bądź późnej zaleca się zakwalifikowanie pacjenta do badania klinicznego, podanie chemioterapii ratunkowej z następczą kwalifikacją do transplantacji komórek hematopoetycznych lub postępowanie ograniczone do leczenia wspomagającego. [9,20,23,29,37,38]

Kryteria odpowiedzi na leczenie w ostrej białaczce szpikowej wg zaleceń ELN przedstawiono w **tabeli 5**. [4]



<b>Definicja</b>	<b>Kryteria</b>
Remisja całkowita	Odsetek blastów w szpiku <5%, brak blastów z pałeczkami Auera, brak objawów choroby pozaszpikowej, neutrofile>1,0 G/l, PLT>100 G/l, brak wskazań do przetaczania KKCz
Remisja całkowita z niepełną regeneracją (CRi)	Wszystkie kryteria CR z przetrwałą neutropenią (<1,0 G/l) lub małopłytkowością (<100 G/l)
Stan morfologiczny wolny od białaczki	Odsetek blastów<5%, brak blastów z pałeczkami Auera, bez objawów białaczki pozaszpikowej, pełna regeneracja hematologiczna niekonieczna
Remisja częściowa	Dotyczy badań klinicznych I i II fazy, wszystkie hematologiczne kryteria CR, zmniejszenie liczby blastów w szpiku do 5-25% i ich odsetka w szpiku przynajmniej o 50%
Całkowita remisja cytogenetyczna (CRc)	Powrót do prawidłowego kariotypu u chorych z CRm lub CRi w przypadku anomalii cytogenetycznych stwierdzonych podczas rozpoznania na podstawie oceny 20 metafaz w komórkach szpiku
Choroba oporna (RD)	Brak CR, CRi lub PR u chorych przeżywających 7 dni lub dłużej od zakończenia chemioterapii, z cechami przetrwałej białaczki ( krew lub szpik)
Zgon w aplazji	Zgon po 7 dniach lub później od zakończenia leczenia indukującego, z cytopenią i aplastycznym lub hipoplastycznym szpikiem, bez przetrwałej białaczki
Zgon z nieustalonej przyczyny	Zgon przed zakończeniem indukcji lub <7 dni od jej zakończenia lub > 7 dni od zakończenia indukcji bez blastów we krwi lecz bez badania szpiku
Wznowa	Odsetek blastów w szpiku >5% lub ponowne pojawienie się blastów we krwi lub rozwój białaczki pozaszpikowej

**Tabela 5.** Kryteria odpowiedzi na leczenie AML (wg ELN, 2008)

### 1.3.3 Terapia wspomagająca

#### 1.3.3.1. Przetaczanie krwi i preparatów krwiopochodnych

Wszyscy pacjenci z rozpoznaniem AML wymagają na różnych etapach leczenia przetaczania krwi i preparatów krwiopochodnych. Zaleca się utrzymywanie stężenia hemoglobiny w granicach 8-10 g/dl; wyższych wartości mogą wymagać pacjenci z objawową chorobą niedokrwinną serca. Koncentrat krwinek płytkowych (KKP) należy przetaczać przy spadku liczby krwinek płytkowych poniżej 10 G/l, a także w przypadku wyższej wartości przy współistniejących objawach skazy krwotocznej lub obecności

dodatkowych czynników ryzyka krwawienia, takich jak zaburzenia hemostazy lub powikłania infekcyjne. Przetaczane preparaty krwi powinny być odpowiednio przygotowane - ubogoleukocytarne i napromieniowane, a w przypadku planowanej transplantacji komórek krwiotwórczych, dodatkowo filtrowane. Pacjenci CMV - ujemni powinni otrzymywać preparaty od dawców seronegatywnych w zakresie wirusa cytomegalii. [4,11,39]

### **1.3.3.2 Zapobieganie infekcjom**

U pacjentów z rozpoznaniem AML – w związku z upośledzeniem układu odpornościowego, znacząco wzrasta ryzyko infekcji (w tym także reaktywacji zakażeń) bakteryjnych, wirusowych i grzybiczych. Zapobieganie infekcjom obejmuje zarówno profilaktykę farmakologiczną, jak również działania sanitarno-epidemiologiczne. Ryzyko wystąpienia powikłań grzybiczych (aspergillozy) maleje przy profilaktyce prowadzonej przy zastosowaniu flukonazolu, worykonazolu, itrakonazolu, pozakonazolu lub amfoterycyny B. NCCN w tym względzie zaleca pozakonazol, jako lek skuteczniejszy w porównaniu pozostałymi z azolami. W profilaktyce przeciwbakteryjnej zalecane jest stosowanie chinolonów, tym niemniej każdorazowo powinna ona uwzględniać lokalną sytuację epidemiologiczną i stosownie do niej odpowiednią terapię. Przy indukcji remisji u osób HSV-dodatnich należy wdrożyć profilaktykę acyklowirem. [40,41]

Istotne pozostają również działania pozafarmakologiczne takie jak ograniczenie odwiedzin, dezynfekcja rąk osób odwiedzających, zastosowanie filtrów hepa w salach chorych, zakaz palenia papierosów, a także odpowiednie zalecenia dietetyczne. [42]

### **1.3.3.3 Stosowanie czynników wzrostu granulocytów (G/GM-CSF)**

Czynniki wzrostu granulocytów (G/GM-CSF-ang.Granulocyte/Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor - czynnik stymulujący powstawanie kolonii granulocytarnych/granulocytarno-makrofagowych) nie są rutynowo stosowane u chorych z rozpoznaniem AML. Istnieje obawa, że ich zastosowanie potencjalnie może doprowadzić

do pobudzenia wzrostu komórek białaczkowych posiadających receptory dla tych czynników. Z drugiej strony, doniesienia literaturowe wskazują, że G-CSF może powodować zmniejszenie przylegania mieloblastów do podścieliska szpiku i w ten sposób zwiększać skuteczność chemioterapii, w wyniku zwiększenia liczby komórek białaczkowych we krwi obwodowej. Przeprowadzone analizy stosowania GM-CSF wleczaniu AML wykazały, że czynniki wzrostu nie zmniejszają w znaczący sposób czasu trwania neutropenii i częstości zakażeń zarówno w grupie młodszych jak i starszych pacjentów. Obecny stan wiedzy nie pozwala na zalecanie G-CSF lub GM-CSF w terapii chorych otrzymujących leczenie indukujące remisję. W wytycznych NCCN zwrócono uwagę na konieczności zachowania odpowiedniego odstępu czasowego od zastosowania czynników wzrostu do wykonania oceny szpiku, której wynik mógłby być trudny do jednoznacznej interpretacji. [43,44]

### **1.3.4 Czynniki wpływające na wynik leczenia AML**

#### **1.3.4.1 Czynniki związane z charakterystyką klonu białaczkowego**

Aktualnie obowiązujące kryteria klasyfikacji AML wymagają przeprowadzenia kompleksowej diagnostyki cytogenetyczno-molekularnej. Wynik tej oceny w decydujący sposób wpływa na podejmowane decyzje terapeutyczne, bowiem jest on predyktorem zarówno przebiegu klinicznego choroby, jak i jej rokowania, a także pozwala w optymalny sposób monitorować występowanie choroby resztkowej. [4]

Ocena nieprawidłowości genetycznych klonu białaczkowego za pomocą klasycznej cytogenetyki i techniki molekularnej stanowi bardzo istotny element diagnostyki. Zaburzenia cytogenetyczne występują u około 50-60% chorych na AML, a zmiany w obrębie kariotypu klonu białaczkowego stanowią jeden z najważniejszych czynników prognostycznych i są podstawą do indywidualnej oceny ryzyka cytogenetyczno-molekularnego oraz identyfikacji pacjentów z wysokim ryzykiem wystąpienia niekorzystnych zdarzeń. [3,10,45-48] W tym celu, przeprowadza się oznaczenia cytogenetyczne klasyczną metodą prążkową (GTG), analizując co najmniej 20 metafaz. Zaburzenia cytogenetyczne w AML najczęściej dotyczą zmian chromosomalnych, zarówno w zakresie struktury jak i liczby (trisomia, monosomia) oraz kariotypu jako całości. Kryterium klonalności jest spełnione, gdy obecność nieprawidłowości stwierdza

się w co najmniej trzech metafazach w przypadku monosomii oraz w przynajmniej dwóch metafazach dla trisomii i zaburzeń strukturalnych. Dodatkowo, wykorzystuje się technikę molekularną (metoda FISH), stanowiącą uzupełnienie GTG. Pozwala ona identyfikować: abberacje liczbowe, powtarzalne abberacje genetyczne, partnerskie geny fuzyjne, delecje chromosomów 5 i 7, chromosomy markerowe, translokacje złożone oraz translokacje ukryte.

Przed rozpoczęciem leczenia AML, ELN zaleca zabezpieczenie szpiku i krwi pacjenta, celem wykonania oznaczeń molekularnych. Badanie RT-PCR (ang. Real Time Polymerase Chain Reaction) stanowi ważny element diagnostyki AML i powinno zawierać następujące oznaczenia molekularne: geny fuzyjne (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *PML-RARA*, *MLLT3-MLL* wg nowej nomenklatury *MLLT3-KMT2A*, *DEK-NUP214*) oraz mutacje somatyczne (*FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA*, *c-KIT*). Obecnie, kontynuowane są badania dotyczące innych zaburzeń genetycznych, a także poszukiwane są metody pozwalające na dokładniejsze obrazowanie zmian zachodzących na poziomie komórkowym. Podejmowane są próby badania profilu ekspresji genów oraz mikro-RNA. Na podstawie analizy wspólnie występujących zaburzeń cytogenetyczno-molekularnych, ELN zaproponował podział pacjentów z AML na trzy grupy rokownicze - korzystne, pośrednie i niekorzystne. [10,47,49] Występowanie zmian cytogenetyczno-molekularnych i związane z nimi rokowanie przedstawiono w **tabeli nr 6**.

<b>Rokowanie</b>	<b>Zaburzenia cytogenetyczno-molekularne</b>
<b>Korzystne</b>	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1 q22); <i>CBFb-MYH11</i> NPM1(mut)/FLT3-ITD (prawidłowy kariotyp) CEBPA (mut) (prawidłowy kariotyp)
<b>Pośrednie I</b>	NPM1(mut)/FLT3-ITD+ wtNPM1(mut)/FLT3-ITD+ wtNPM1(mut)/FLT3-ITD- Pozostałe białaczki z prawidłowym kariotypem, z wyłączeniem sklasyfikowanych w grupie korzystnego rokowania
<b>Pośrednie II</b>	t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i> Zaburzenia cytogenetyczne niesklasyfikowane jako korzystne lub niekorzystne
<b>Niekorzystne</b>	inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVII</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP2 14</i> t(v;11)(v;q23); rearanżacje MLL -5/del(5q) -7/bel(17p) Złożony kariotyp

Tabela 6. Cytogenetyczno-molekularna stratyfikacja ryzyka u chorych z AML (wg ELN, 2008)

#### 1.3.4.2 Czynniki związane z osobą pacjenta

Do tej grupy czynników aktualnie zaliczane są wiek, choroby współistniejące oraz stan ogólny chorego. W przypadku pacjenta z rozpoznaniem AML bardzo istotnym czynnikiem predykcyjnym jest jego wiek, bowiem wyniki leczenia pacjentów powyżej 60 r.ż. odbiegają znacząco od tych w młodszej populacji chorych. Osoby powyżej 60 r.ż. rzadziej osiągają CR, krótszy jest też u nich DFS. Wraz z wiekiem zmniejsza się również zdolność regeneracji szpiku, co przekłada się na dłuższą cytopenię i związane z tym wyższe ryzyko wystąpienia powikłań infekcyjnych, a także konieczność częstszych substytucji preparatów krwiopochodnych. W bardziej szczegółowych analizach wykazano, że w grupie pacjentów poniżej 60 r.ż. wyniki leczenia ściśle korelują z wiekiem chorego. W przedziale między 25-39 r.ż. 5-letnie całkowite przeżycie OS wynosiło około 49%, a w grupie chorych w wieku 40-59 lat było niższe i wynosiło 33%. Podobne spostrzeżenia dotyczą również okresu wolnego od zdarzeń (EFS ang. Event Free Survival). [5,9,25,50]

Kolejnym istotnym czynnikiem predykcyjnym są schorzenia współistniejące, w tym względnie choroby układu sercowo-naczyniowego, płuc, wątroby, nerek oraz cukrzyca istotnie pogarszają rokowanie, powodując wzrost toksyczności stosowanej chemioterapii. [6]

Dla obliczenia prawdopodobieństwa uzyskania CR, jak również określenia ryzyka wczesnego zgonu i całkowitego przeżycia, opracowano wskaźnik uwzględniający choroby współistniejące - CCI (ang. Charlson Comorbidity Index), natomiast, dla pacjentów kwalifikowanych do transplantacji - HCT-CI (ang. Hematopoietic Cell Transplantation Specific Comorbidity Index). W grupie osób powyżej 70 r.ż. wykazano, że przy wartości CCI wyższej niż 1, zmniejsza się szansa uzyskania CR. Odnotowano również trend zwiększenia 8-tygodniowej śmiertelności i niższy wskaźnik 2-letni OS. Wskaźnik HCT-CI pierwotnie opracowano dla młodych chorych kwalifikowanych do procedury transplantacji, ale znajduje on również zastosowanie w grupie starszych pacjentów. Większość dostępnych danych pozwala wykorzystać HCT-CI jako użyteczne narzędzie, którego wartość koreluje prawdopodobnie z OS i wczesną śmiertelnością chorych, choć sformułowanie ostatecznych wniosków wymaga dalszych badań. [9,12,50,51]

W wielu retrospektywnych analizach potwierdzono ścisłą zależność pomiędzy stanem ogólnym chorego (ocenianym w skali ECOG- ang. Eastern Cooperative Oncology Group, **tabela 7**), a wynikami leczenia i jego wpływem na wczesną śmiertelność. W badaniu przeprowadzonym przez SWOG śmiertelność w okresie pierwszego miesiąca leczenia w grupie chorych poniżej 55 r.ż. wynosiła średnio 2-3%. Ta sama analiza rozszerzona o ocenę stanu ogólnego w oparciu o skalę ECOG, wskazuje na istotne różnice w zakresie przeżycia. W grupie pacjentów pomiędzy 55-65 r.ż. dla ECOG 0-1, 2 i 3 śmiertelność w okresie pierwszych 30 dni wynosiła odpowiednio 5-18%, 18% i 29-82%. Wraz z wiekiem wzrasta również odsetek chorych w gorszym stanie ogólnym- w grupie poniżej 55 r.ż. ECOG powyżej 2 dotyczył 15% chorych, natomiast powyżej 75 roku życia odsetek ten wzrósł do 32%.

<b>Stopień sprawności</b>	<b>Definicja</b>
<b>0</b>	sprawność prawidłowa, zdolność do samodzielnego wykonywania codziennych czynności
<b>1</b>	obecność objawów choroby, możliwość chodzenia i wykonywania lekkiej pracy
<b>2</b>	zdolność do wykonywania czynności osobistych, niezdolność do pracy, spędza w łóżku około połowy dnia
<b>3</b>	ograniczona zdolność wykonywania czynności osobistych, spędza w łóżku ponad połowę dnia
<b>4</b>	konieczność opieki osoby drugiej, spędza w łóżku cały dzień
<b>5</b>	zgon

Tabela 7. Skala sprawności wg ECOG/WHO

Zaawansowany wiek i zły stan ogólny chorych to dotychczas główne postulowane czynniki wczesnej śmiertelności w ciągu pierwszych 4 tygodni leczenia. Dane statystyczne

są dość jednoznaczne w tej kwestii - dla chorych poniżej 50 r.ż. z ECOG 0-2, ryzyko zgonu w ciągu pierwszych 28 dni wynosiło 5%, a w grupie powyżej 69 r.ż. z ECOG 3 i 4 kształtowało się na poziomie 57%. [25,29,52]

Coraz więcej danych literaturowych wskazuje na konieczność zastosowania dodatkowych narzędzi pomiarowych dla dokładniejszej oceny stanu chorych powyżej 60 r.ż. Bardzo pomocne w tym względzie są skale geriatryczne - umożliwiające pomiar aktywności życia codziennego (ADLs – ang. Activity Of Daily Living) oraz instrumentalnej aktywności życia codziennego (IADLs – ang. Instrumental Activity Of Daily Living). Na ich podstawie uzyskuje się cenne informacje dotyczące stanu pacjenta. Wykazano, że w grupie chorych powyżej 65 r.ż. z wartością ECOG 0-2 (ograniczenie podstawowych czynności życiowych), dotyczyło 9% badanej populacji, natomiast pomiar instrumentalnej aktywności życia codziennego był obniżony u 38% osób, a upośledzenie to skojarzone było z niższym OS, niezależnie od wieku i od oceny sprawności. Dodatkowo, stosując kwestionariusz oceny jakości życia EORTC QLQC-C30 (ang. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Quality of Life Questionnaire) wykazano, że u chorych na AML, u których występowały problemy z intensywnym wysiłkiem fizycznym ryzyko zgonu wzrastało dwukrotnie, w porównaniu z pacjentami z wyższą wydolnością fizyczną. Co więcej, uzyskane wyniki pozostawały niezależne od oceny w skali ECOG, dynamiki choroby, występowania chorób współistniejących oraz zastosowanego schematu postępowania terapeutycznego. [25,29,37,52,53]

W oparciu o ocenę aktywności fizycznej wg protokołu SPPB (ang. Short Physical Performance Battery) wykazano, że u osób z liczbą punktów poniżej 9 (mierny stan ogólny) w 12 stopniowej skali, uzyskiwano gorsze wyniki leczenia. Wyniki badania prospektywnego sugerują także, że SPPB posiada wartość prognostyczną przy ocenie pacjentów starszych z dobrym ECOG przed rozpoczęciem terapii. [51]

U chorych w wieku podeszłym, postulowane jest przeprowadzenie dokładnej oceny stanu psychicznego i funkcji poznawczych. U osób powyżej 60 r.ż. statystycznie częściej występuje depresja, obniżenie i zaburzenia nastroju oraz problemy z pamięcią i koncentracją. Nieprawidłowości w tym zakresie mogą wpływać na gorsze wyniki leczenia spowodowane brakiem odpowiedniej współpracy pomiędzy pacjentem a personelem zaangażowanym w proces terapeutyczny, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu ryzyka wystąpienia powikłań po zastosowanej chemioterapii. [37,50,52,53]



Analizę występowania zmęczenia i bólu u chorych z rozpoznaniem AML dokumentują jedynie nieliczne dane literaturowe. Tym niemniej, udowodniono, że występowanie bólu jest niezależnym czynnikiem gorszego rokowania i śmierci, natomiast wysoki poziom zmęczenia - mierzony obiektywnymi skalami - przekłada się na niższy OS. [25,37,39,46,50,52,54]

Zalecenia NCCN rekomendują kompleksową ocenę chorego z rozpoznaniem AML, uwzględniającą wskaźniki ADL, IADL, ocenę funkcji poznawczych, zmęczenia i bólu (przy użyciu np. skali VAS - Visual Analogue Scale, analogowo-wzrokowa skala bólu) u wszystkich pacjentów i przeprowadzenie oceny SPPB u chorych w dobrym stanie ogólnym. Uzupełnieniem tych badań może być wykorzystanie dodatkowo wskaźników CCI i HCT-CI. Wytyczne europejskie (ELN) zalecają natomiast ocenę stanu ogólnego w oparciu o skalę ECOG/WHO oraz wykorzystanie wskaźnika HCT-CI. [6,9,39,55]

#### **1.3.4.3 Wywiad**

Do czynników niekorzystnie wpływających na rokowanie w AML zaliczane jest wcześniejsze przebycie innych schorzeń hematologicznych, szczególnie zespołu mielodysplastycznego, przewlekłych nowotworów mieloproliferacyjnych oraz leczenie cytostatykami i/lub radioterapia w przeszłości. Ponadto, nie bez wpływu pozostają również czynniki zwiększające ryzyko aloimmunizacji, takie jak wcześniejsze przetoczenia krwi i preparatów krwiopochodnych, a u kobiet - dodatkowo - przebyte ciążę. [4,7,46,54]

### **1.4 Zastosowanie oceny histologicznej w diagnostyce AML**

Badanie histologiczne szpiku posiada uznaną wartość w diagnostyce hematologicznej. Pozwala ono ocenić w sposób kompleksowy komórkowość szpiku, podścielisko tkankowe, obecność i stopień włóknienia, rozmieszczenie poszczególnych typów komórek, ich wzajemne relacje, strukturę i ewentualną przebudowę tkanki kostnej. Korzyści uzyskiwane z oceny materiału pozyskiwanego w biopsji aspiracyjnej i TB przedstawiono w **tabeli 8**. [56,57]

Szpik z biopsją aspiracyjną	Trepanobiopat
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪Liczba blastów</li> <li>▪Proporcja M:E</li> <li>▪Mielogram</li> <li>▪Ocena zaburzeń jakościowych komórek</li> <li>▪Cytochemiczna charakterystyka komórek</li> <li>▪Charakterystyka immunofenotypu</li> <li>▪Określenie zmian cytogenetycznych</li> <li>▪Ocena techniką genetyki molekularnej</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪Komórkowość szpiku, obecność poszczególnych linii komórkowych</li> <li>▪Utkanie i architektonika szpiku</li> <li>▪Włóknienie</li> <li>▪Ocena podścieliska</li> <li>▪Immunohistochemia</li> <li>▪Zaburzenia linii płytkotwórczej</li> <li>▪Rzeczywista liczba blastów</li> <li>▪Pozyskanie mikroskrawków</li> </ul>

Tabela 8. Porównanie parametrów ocenianych w materiale pozyskanym techniką biopsji aspiracyjnej z szpiku oraz trepanobiopsji (wg Orazi A.)

Trepanobiopsja należy do badań inwazyjnych. Zabieg ten wykonuje się najczęściej igłą Yamshidi z modyfikacją wg Islama. Bardzo rzadko zabieg pozyskania fragmentu kostnego przeprowadza się za pomocą osteotomu. Materiał do oceny pobierany jest zazwyczaj z kolca biodrowego tylnego górnego, znacznie rzadziej z innych lokalizacji, między innymi z grzebienia lub z talerza kości biodrowej (2 cm poniżej oraz 2 cm ku tyłowi od kolca biodrowego przedniego górnego) i z kolca biodrowego przedniego. Opis techniki wykonania zabiegu przedstawiono w aneksie.

Wartość praktyczna badania TB znacznie wzrosła dzięki zastosowaniu nowych technik badawczych- szczególnie badań immunohistochemicznych (BIH) i cytogenetyczno-molekularnych. Materiał pozyskany w TB pozwala na wykonanie dodatkowych reakcji umożliwiających również ocenę włóknienia i/lub potwierdzenia obecności komórek patologicznych. [57-59]

W ostatnich latach wskazania do wykonania oceny TB podlegały zmianom, wynikającym z zastosowania nowych technik diagnostycznych m.in. BIH, FISH bądź

PCR. Aktualne wskazania do przeprowadzenia oceny histologicznej szpiku przedstawiają się następująco:

- brak materiału z biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej („puste biopsje”)
- diagnostyka cytopenii
- podejrzenie włóknienia szpiku
- diagnostyka chłoniaków (ziarniczych , nieziarniczych i szpiczaka plazmocytozowego)
- diagnostyka ostrej białaczki szpikowej (wskazanie wg ELN 2008)
- diagnostyka ostrej białaczki limfoblastycznej
- diagnostyka przewlekłych nowotworów mieloproliferacyjnych
- diagnostyka mastocytozy
- podejrzenie przerzutów nowotworowych do szpiku
- podejrzenie choroby spichrzeniowej
- ustalenie stopnia aplazji lub hipoplazji szpiku
- monitorowanie odpowiedzi na leczenie
- ocena obecności choroby resztkowej [58,60,61]

W ostrej białaczce szpikowej od 2008 roku rekomendowane jest wykonywanie trepanobiopsji. W niektórych okolicznościach AML może stanowić poważny problem diagnostyczny. Dotyczy to nie tylko sytuacji, w których nie udaje się pobrać materiału z biopsji aspiracyjnej szpiku. Zdarza się, że uzyskany aspirat nie jest w wystarczającym stopniu reprezentatywny do ustalenia rozpoznania. Z tego powodu, ocena trepanobioptatu jest lepszym narzędziem diagnostycznym, służącym również ocenie występowania choroby resztkowej na dalszych etapach terapii, zwłaszcza przy wykorzystaniu oznaczeń immunohistochemicznych. [59,62]

Na przestrzeni ostatnich lat wykorzystywano trepanobiopsję w ocenie aktywności AML na różnych etapach terapii. Badanie to uzupełnione o oznaczenia immunohistochemiczne, jest wiarygodne, zwłaszcza w odniesieniu do oceny komórkowości szpiku i potwierdzenia występowania komórek blastycznych. Ponadto,

materiał z aspiracji szpiku bywa w mniejszym lub większym stopniu zanieczyszczony krwią obwodową i z tego powodu uzyskany preparat jest nie w pełni reprezentatywny. Analiza retrospektywna autorów brazylijskich, obejmująca lata 1978-2009 wskazuje, że wyniki oceny materiału z biopsji aspiracyjnej i TB korelują ze sobą w stopniu pozwalającym na wykorzystanie tych technik do równoległej oceny. [63] W grupie prawie 650 pacjentów z AML zgodność oceny cytologicznej i histologicznej szpiku szacowano na 92,8%. Ponadto, zastosowanie materiału uzyskanego z TB zmieniło rokowanie i stratyfikację ryzyka związanego z chorobą, odpowiednio u 5,2% pacjentów na etapie wczesnej oceny (14-21 doba), 3,7% po zakończeniu terapii indukującej oraz u 2,4% na innych etapach leczenia. Czulość wykrywania choroby resztkowej z zastosowaniem biopsji aspiracyjnej wyniosła odpowiednio 86,8%, 82,3%, 82,5% i 94,2% w kolejnych etapach postępowania diagnostyczno-terapeutycznego. Saini i wsp. podkreślają, że czulość metody BAC (biopsja aspiracyjna cienkoigłowa) szczególnie w odniesieniu do oceny po indukcji remisji może zwiększać liczbę pacjentów, u których stwierdzana jest remisja całkowita, co stanowi ważną implikację kliniczną i terapeutyczną. Sformułowano także tezę, że badanie z materiału pozyskanego w trepanobiopsji dostarcza wielu klinicznie ważnych informacji i cechuje się wyższą czulością aniżeli badanie cytologiczne szpiku, dlatego ICSH (ang. International Committee of Standardization in Hematology) zaleca jednoczesowe ich stosowanie i wspólną interpretację. [56,64-69]

### **1.5 Znaczenie badań immunohistochemicznych w materiale bioptycznym**

Badania immunohistochemiczne posiadają ugruntowane miejsce w diagnostyce nowotworów, a na przestrzeni ostatnich dwudziestu lat istotnie wzrosła liczba ocenianych antygenów z linii limfo - i mieloidalnej (**tabela 9**).

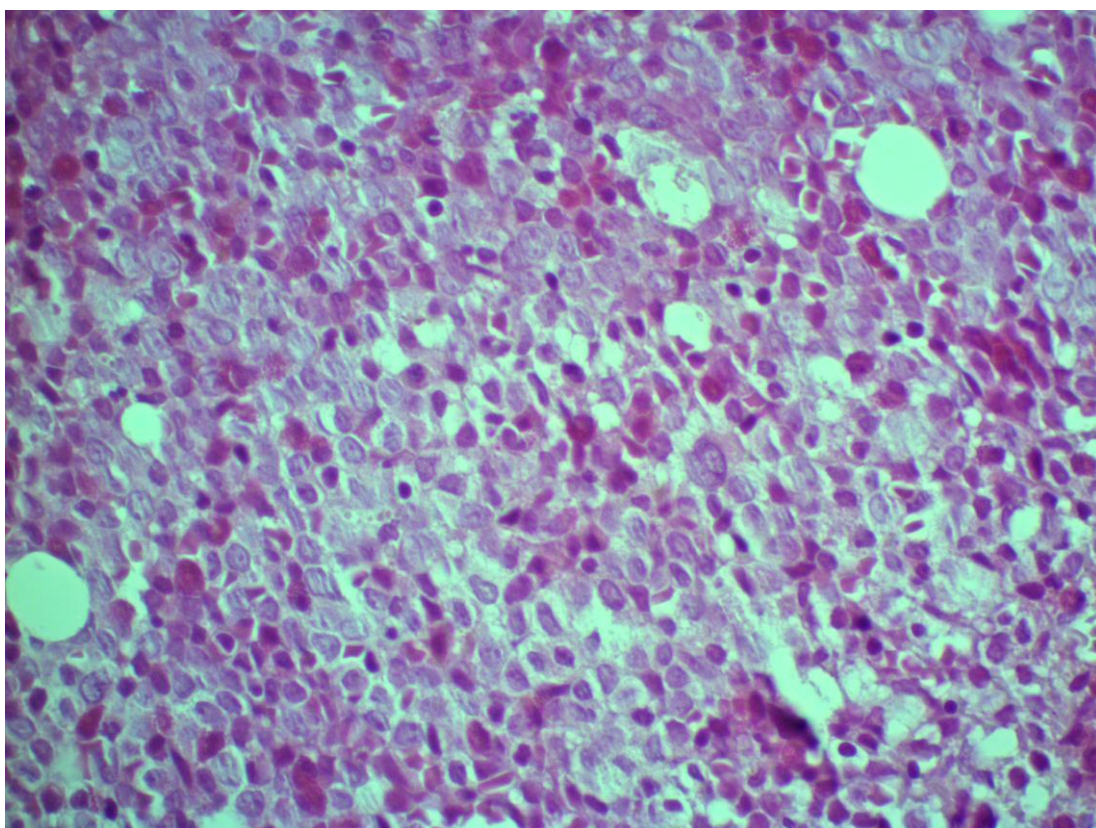
<p><b>AML</b></p> <p><b>CD34, CD103, MPO, HEM, CD61, CD42b, CD68R, CD163, lizozym, CD56</b></p> <p><b>ALL</b></p> <p>CD34, TdT, CD10, CD79a, PAX5, CD20, CD3, CD7, CD2, CD5, CD7, CD4, CD8, CD1a</p>
<p><b>AML</b> – ostra białaczka szpikowa; <b>ALL</b> – ostra białaczka limfoblastyczna; <b>HEM</b> – hemoglobina; <b>MPO</b> – Mieloperoksydaza.</p> <p><sup>1</sup>AML z specyficznymi nieprawidłowościami cytogenetycznymi PAX5, CD79a [ t (8,21)], NPM cyto + (kariotyp prawidłowy)</p>

Tabela 9. Immunohistochemiczne odróżnienie AML od ALL (wg Orazi A.)

Postęp w technice badań immunohistochemicznych spowodował skrócenie czasu przygotowania preparatów do oceny, co istotnie wpływa na podejmowanie wczesnych decyzji terapeutycznych. W ostrych białaczkach ocena TB uzupełniona o badania immunohistochemiczne antygenu CD34, CD117 i HLA, pozwala na określenie liczby białaczkowych komórek prekursorowych. Wartość diagnostyczna trepanobiopatu szczególnie wzrasta, gdy współczynnik M:E (liczba komórek z linii mieloidalnej do linii erytroidalnej) jest niski. Ponadto, badanie to pozwala na całościową ocenę szpiku, a jego wysoka wartość diagnostyczna związana jest z precyzyjniejszym doszacowaniem liczby komórek obecnych w szpiku, w tym także w trudno dostępnych dla aspiracji miejscach, takich jak okolice okołobezelczkowe. W szczególnych sytuacjach klinicznych - np. w ostrej białaczce megakarioblastycznej czy w ostrym zwłóknieniu szpiku, ocena materiału z trepanobiopsji pozostaje podstawową metodą identyfikacji chorób proliferacyjnych układu krwiotwórczego, gdyż pozyskanie reprezentatywnej próbki materiału drogą aspiracji jest praktycznie niemożliwe. Wartość diagnostyczna trepanobiopatów w ocenie zespołów mielodysplastycznych i wtórnych AML jest niepodważalna, gdyż pozwala na

wykluczenie występowania zmian reaktywnych, które mogą towarzyszyć dyshematopoezie. Ważnych informacji klinicznych dostarczają wyniki badań immunohistochemicznych, szczególnie w zespołach mielodysplastycznych z towarzyszącym włóknieniem oraz ubogokomórkowym szpikiem. W obu przypadkach, występowanie włókien retikulinowych lub stłuszczenia pozwala doprecyzować rozpoznanie, szczególnie, gdy wynik badania szpiku z biopsji aspiracyjnej jest trudny do interpretacji. [56,58,64]

Według części autorów, ocena liczby komórek blastycznych w badaniu histologicznym szpiku jest bardziej wiarygodna aniżeli oznaczenia wykonane z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Chociaż liczba komórek określana w cytometrze jest znacznie wyższa niż w badaniu histologicznym szpiku, to jednak istnieje duże prawdopodobieństwo rozcieńczenia ocenianego materiału krwią obwodową, co z kolei obniża wiarygodność otrzymanego wyniku. [70]

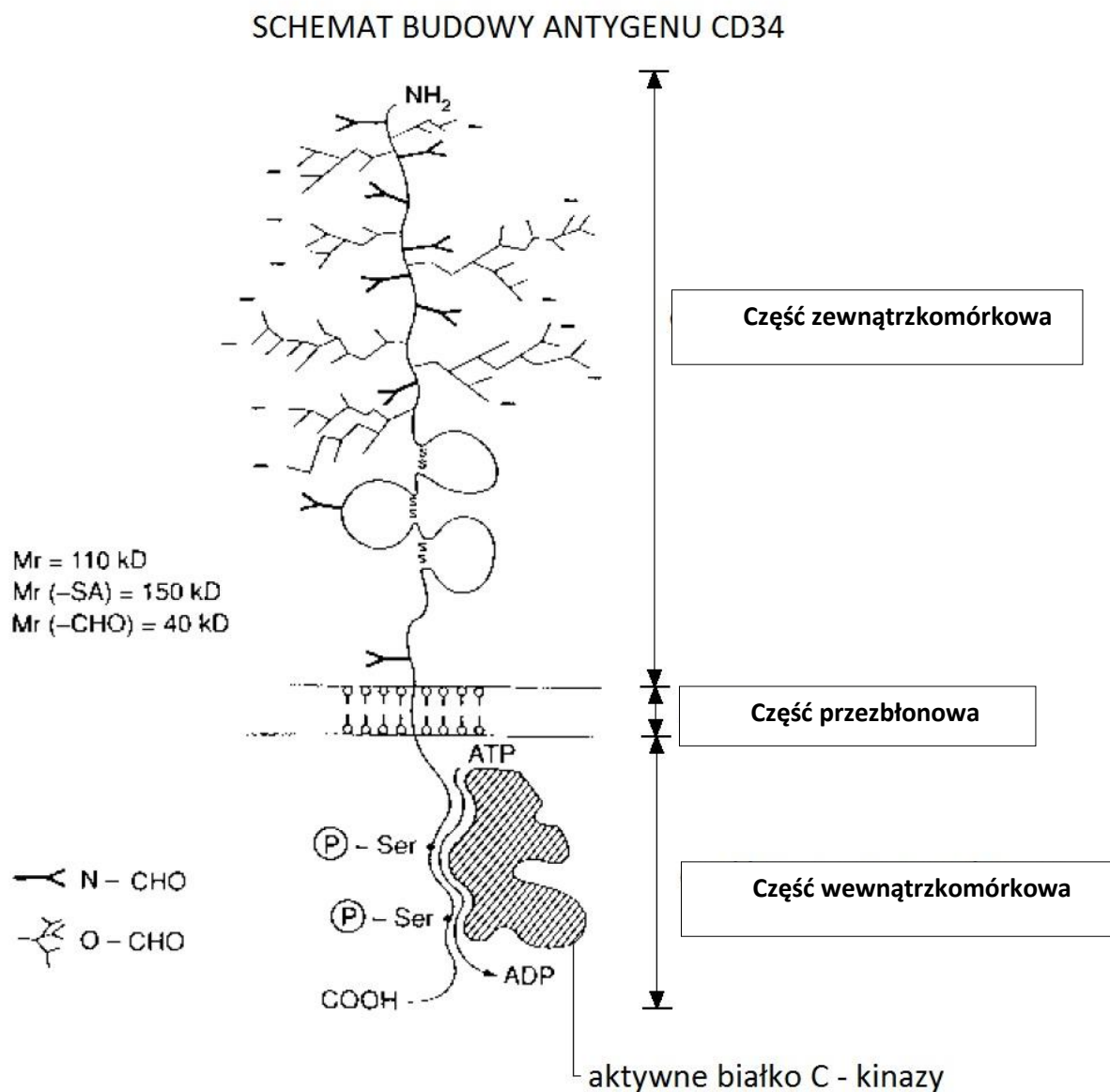


Fot. 1. Trepanobiopsja – barwienie H+E (powiększenie x400)

autor zdjęcia prof. M. Komarnicki

### 1.5.1 Antygen CD34

Cząsteczka CD34 to białko przezbłonowe, należące do grupy sialomucyn, występujące powszechnie u ssaków. (rycina 1)[71-73]



Rycina 1. Schematyczne przedstawienie struktury CD34 (wg Lanza i wsp.,)

U człowieka antygen CD34 występuje w postaci kilku izoform. Krótsza forma CD34 o masie cząsteczkowej 100 kDa, składa się z 323 aminokwasów (aa), a jej domena

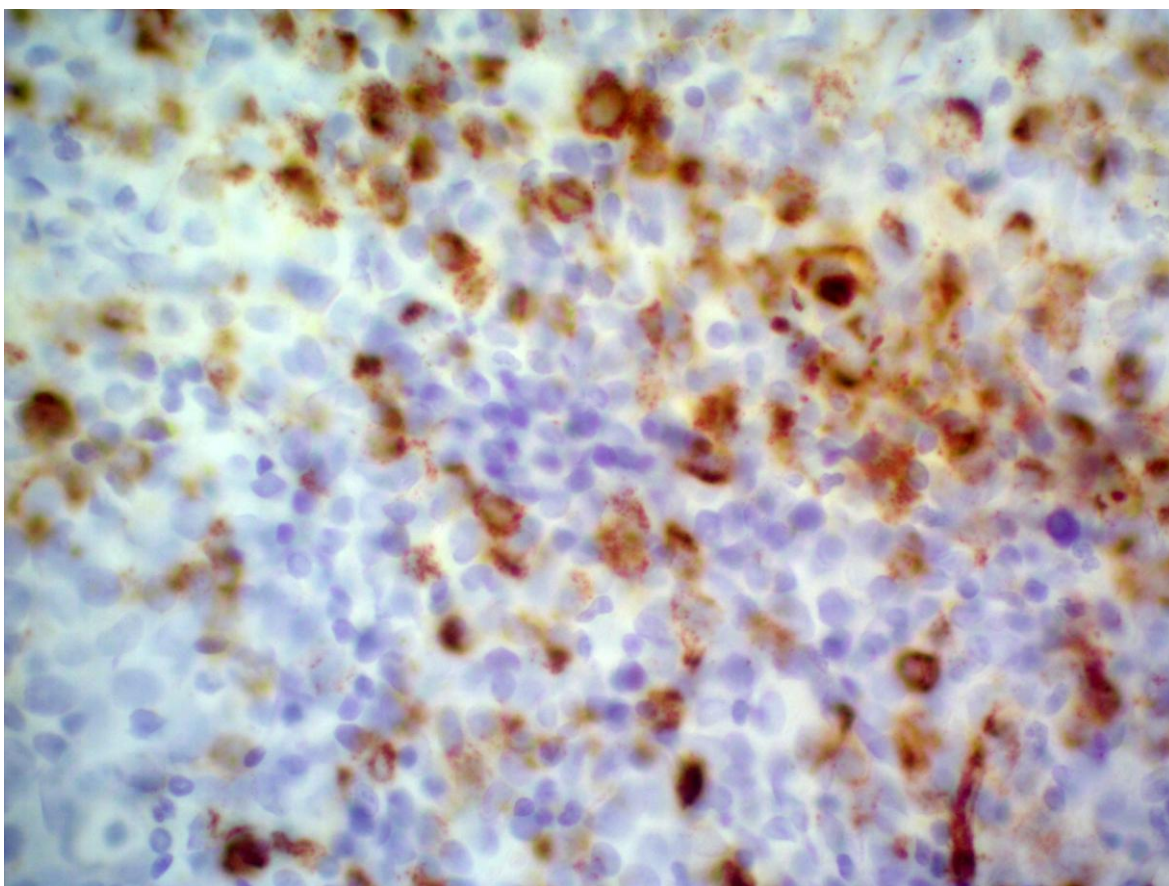
wewnątrzkomórkowa zbudowana jest z 16, a w formie dłuższej, z 73 aa. Częsteczka CD34 zbudowana jest z 385 aa, kodowanych przez gen na chromosomie 1 (1q32), obok genów kodujących cząsteczki odpowiedzialne za przyleganie do podścieliska i aktywację kaskady wiążącej układ dopełniacza (laminina B<sub>2</sub>, E-selektyna i L-selektyna). W związku z bliskim sąsiedztwem, wysuwane są hipotezy sugerujące związek ekspresji CD34 z funkcjami regulatorowymi. [74-77]

Ekspresję cząsteczki CD34 wykazano przede wszystkim na komórkach macierzystych i komórkach progenitorowych oraz na niektórych dojrzałych komórkach układu krwiotwórczego (mastocyty). Ocenia się, że 2-4% leukocytów szpiku wykazuje ekspresję CD34, we krwi odsetek ten jest niższy i wynosi odpowiednio 0,01-0,9% komórek. Obecność antygeny CD34 wykazano również na komórkach śródbłonna naczyniowego, fibroblastach, fibrocytach, niektórych komórkach nowotworowych (np. rak okrężnicy), nowotworach pochodzenia mezenchymalnego (śluzowe, naczyniakowłókniki), na komórkach układu nerwowego, komórkach tłuszczowych, dendrytycznych, tkanki łącznej, , a także w miejscu stanu zapalnego. [77-79]

W komórkach pochodzenia szpikowego antygen CD34 występuje zarówno w cytoplazmie jak i na błonie komórkowej. Jego ekspresja na komórkach śródbłonna nie jest jednak powszechna, głównie występuje on na mikroosmkach. W chorobach hematologicznych ekspresję antygeny CD34 wykazano u ok. 40% pacjentów z rozpoznaniem AML, u 65% chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną pre-B i u 4-5% pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną T-komórkową. W przewlekłej białaczce limfocytowej oraz chłoniakach ekspresja antygeny CD34 jest spotykana bardzo rzadko. [78,80]

Mimo trzech dekad od odkrycia cząsteczki CD34, jej funkcja w odniesieniu do hematopoezy nie została w pełni poznana. Udowodniono, że prawidłowe wartości ekspresji antygeny CD34 są niezbędne do podziału i różnicowania komórek progenitorowych. Podkreśla się także związek tego antygeny z aktywacją i mobilizacją HSC. [78] Częsteczka CD34 bierze również udział w procesie adhezji leukocytów do śródbłonna naczyń. Część autorów uważa, że CD34 jest także zaangażowane w przekazywaniu sygnałów międzykomórkowych oraz proces adhezji komórek. Tym niemniej, bogata w mucynę domena wewnątrzcytoplazmatyczna blokuje adhezję i ułatwia komórkom prekursorowym migrację do miejsca przeznaczenia. [78,81]



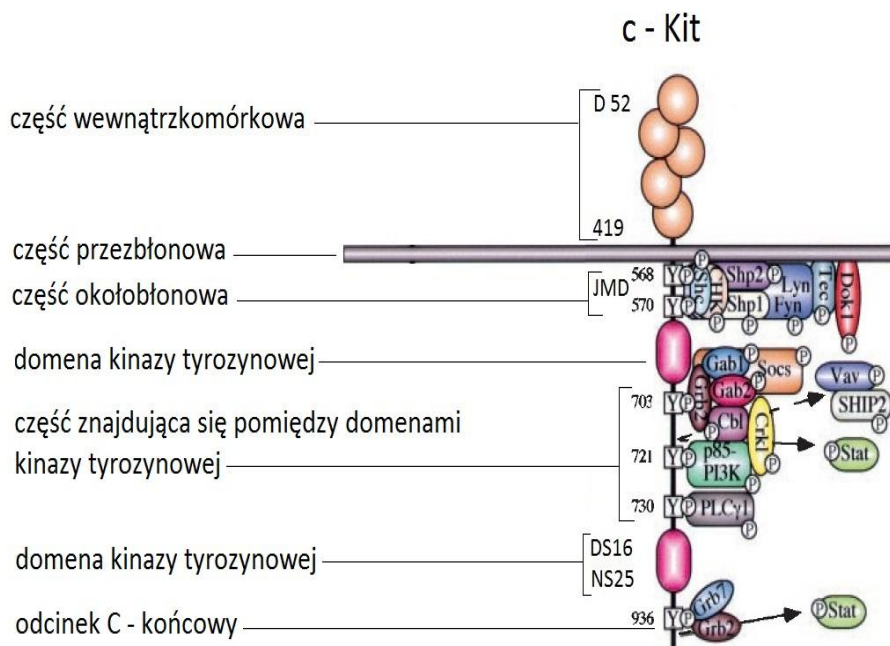


Fot. 2. Trepanobiopsja-ocena IH CD34+(powiększenie x 400),

autor zdjęcia prof. M. Komarnicki

### 1.5.2 Antygen CD117

C-Kit (CD117) to protoonkogen kodujący przezbłonowy receptor kinazy tyrozynowej o m.cz 145 kD. CD117 należy do typu III receptorów kinazy tyrozynowej. Wykazuje podobieństwo strukturalne i funkcjonalne do PDGF (ang. Platelet - Derived Growth Factor - płytkopochodny czynnik wzrostu), M-CSF (ang. Macrophage Colony Stimulating Factor - czynnik wzrostu makrofagów) i liganda FLT3. Posiada 3 części: zewnątrzkomórkową, przezbłonową i wewnątrzkomórkową; budowę tej cząsteczki przedstawiono na **rycinie 2**. [82-86]



Rycina 2. Schemat budowy antygenu CD117 wg Tsao.

Gen dla c-Kit zlokalizowany jest na chromosomie 4. W warunkach prawidłowych aktywacja c-Kit zachodzi przy udziale liganda, którym jest czynnik wzrostu komórek macierzystych (SCF- ang. Stem Cell Factor).

Po połączeniu receptora z ligandem, dochodzi do utworzenia dimeru i aktywacji wewnętrznej kinazy tyrozynowej. Zasadniczym momentem dla procesu aktywacji jest fosforylacja, uruchamiająca w sposób kaskadowy kolejne reakcje, prowadzące do aktywacji czynników transkrypcji komórek docelowych. Ostatecznie przekłada się to na regulację aktywności kluczowych procesów zachodzących w komórkach takich jak: apoptoza, różnicowanie, podziały, przyleganie oraz chemotaksję. Częstka CD117 bierze udział w proliferacji mastocytów, melanocytów, komórek nabłonka w przydatkach, komórek Cajala w przewodzie pokarmowym, komórek germinalnych, neuronów, a także komórek hematopoetycznych. [82,87]

Mimo, że od odkrycia antygenu CD117 upłynęło już ponad 25 lat, stanowi on nadal przedmiot wielu badań. Szczególną uwagę zwraca się na mutacje genu c-Kit. Mutacje te

mogą dotyczyć zarówno centrum aktywnego kinazy, jak również mogą być związane z regulacją jego ekspresji. Udowodniono również związek występowania mutacji aktywującej w protoonkogenie c-Kit z transformacją nowotworową. [88,90]

Obecność mutacji aktywującej (nabycia funkcji) CD117 stwierdzana jest w licznych chorobach nowotworowych, między innymi w :

- guzach podścieliska przewodu pokarmowego GIST (gastrointestinal stromal tumor)
- mięsakach (mięsak Ewinga)
- nasieniakach
- nowotworach pochodzenia embrionalnego
- raku drobnokomórkowym płuc
- raku jasnokomórkowym nerki
- niektórych typach raka jajnika
- niektórych typach raka piersi
- grasiczaku [83,87,88,91,92]

Wartość prognostyczna ekspresji CD117 na komórkach nowotworowych nie została jednoznacznie potwierdzona. Metaanaliza badań wpływu ekspresji CD117 na OS i DFS w wyżej wymienionych jednostkach chorobowych nie daje jednoznacznych odpowiedzi. Związek między ekspresją CD117 a OS i DFS potwierdzono w niektórych badaniach u pacjentów z kostniakomięsakiem i rakiem nerki (szczególnie u tych leczonych operacyjnie). Sformułowanie wiążących wniosków wymaga jednak dalszych badań. [87,93]

Receptor c-Kit i jego ligand SCF, odgrywają kluczową rolę w hematopoezie. W warunkach fizjologicznych ekspresję CD117 wykazuje około 4% komórek progenitorowych szpiku, około 70% z nich wykazuje koekspresję CD34. Śladową aktywność CD117 lub jej brak stwierdzono we wczesnych stadiach rozwoju limfocytów, w tymocytach oraz komórkach NK. [88,94,95]

Prawidłowa aktywność kinazy tyrozynowej c-Kit jest warunkiem prawidłowego przebiegu procesu krwiotworzenia w szpiku. Ligand c-Kit zwiększa działanie czynników wzrostu komórek hematopoetycznych (GM-CSF, G-CSF), interleukin (m.in 3 i 6), a wraz z erytropoetyną zwiększa liczbę komórek prekursorowych BFU-E (ang. Burst Forming

Unit-Erythroid - jednostka wytwarzająca kolonie erytroidalne). Ekspresja CD117 znacząco wzrasta w komórkach białaczkowych pochodzenia mieloidalnego, erytroidalnego lub megakariocytarnego. Rzadziej wykrywa się go na komórkach szpiczaka, chłoniaka Hodgkina i chłoniaka anaplastycznego. Identyfikacji antygenu CD117 można dokonać w badaniach immunohistochemicznych w trepanobiopsatach, bądź przy pomocy techniki cytometrii przepływowej oraz metod biologii molekularnej (reakcja PCR lub Northern blot). [85,91,94,96]

Zgodnie z przyjętym poglądem, obecność CD117 na komórkach białaczkowych, to rzeczywisty wskaźnik różnicowania mieloidalnego, który - zwłaszcza w korelacji z ekspresją CD13 i CD33 - charakteryzuje się wysoką swoistością. Nie udowodniono jednak zależności między ekspresją CD117, a podtypem ostrej białaczki szpikowej wg FAB, chociaż w przypadku białaczki typu M5b nie stwierdzono jego ekspresji. [97]

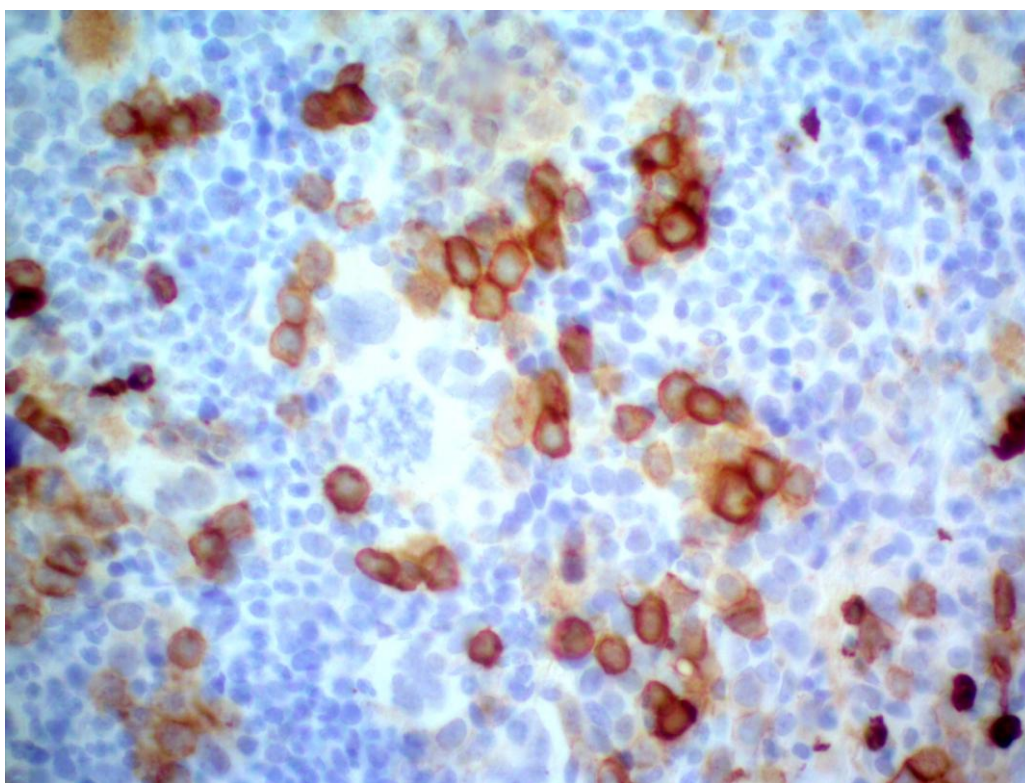
Częsta ekspresja CD117 na komórkach białaczkowych pochodzenia mieloidalnego i brak tej obecności na limfoblastach, zwiększa wartość diagnostyczną w różnicowaniu tych rodzajów białaczek. Tym niemniej u 1/3 pacjentów z AML nie można wykryć ekspresji CD117, stąd wynika potrzeba zastosowania innych badań diagnostycznych. [84,90]

Według niektórych autorów, współwystępowanie CD117 i CD13, CD34, CD7 pozwala ze 100% czułością i ok. 94% swoistością przewidzieć obecność mutacji FLT3. Dane z populacji azjatyckiej wskazują, że ekspresja CD117 częściej występuje u chorych ze stwierdzaną translokacją t(8;21), inv(16) lub z t(15;17). [84]

Produkt c-Kit jest zaangażowany w proliferację komórek blastycznych AML. Badania in vitro na liniach komórkowych wskazują, że wzrost fosforylacji tyrozyny z c-Kit koreluje z nasileniem podziałów komórek białaczkowych. Bardzo prawdopodobne wydaje się, że ekspresja CD117 jest związana z charakterystyką choroby i wpływa na końcowy wynik leczenia chorych na ostrą białaczkę szpikową. [84]

Podejmowane są próby pomiaru cytometrycznego nie tylko obecności, ale również gęstości receptora c-Kit na komórkach białaczkowych. Sygnały przekazywane przez CD117 są odpowiedzialne za interakcje międzykomórkowe i za zatrzymywanie komórek hematopoetycznych w obrębie szpiku. W warunkach fizjologicznych przyleganie to

odbywa się poprzez ścieżkę VLA-4/VCAM (ang. Very Late Antigen-4/Vascular Cell Adhesion Molecule-1 - integryna/endotelialny ligand dla integryny), a komórki podlegające migracji wykazują mniejszą gęstość receptora c-Kit. W grupie pacjentów z rozpoznaną AML stwierdzono, że istnieje korelacja między niską ekspresją CD117 na mieloblastach we krwi obwodowej i wysoką leukocytozą. Wysoka gęstość c-Kit (który jest receptorem dla SCF) prawdopodobnie powoduje silne przyleganie mieloblastów do podścieliska szpiku, co w konsekwencji hamuje apoptozę i zwiększa przeżycie komórek białaczkowych. Różnice w gęstości CD117 stwierdzane między blastami obecnymi we krwi obwodowej oraz szpiku potwierdzają te obserwacje. Nieznaczna leukocytoza u chorych z AML, zazwyczaj koreluje z wysoką gęstością i intensywnością ekspresji CD117 na komórkach blastycznych, co wskazuje, że CD117 zabezpiecza komórki blastyczne w szpiku, poprzez hamowanie ich przechodzenia do krwi obwodowej. [84,90,98]



Fot. 3. Trepanobiopsja- ocena IH CD117 (powiększenie x 400)

autor zdjęcia prof. M.Komarnicki

### 1.5.3 Białko Ki67

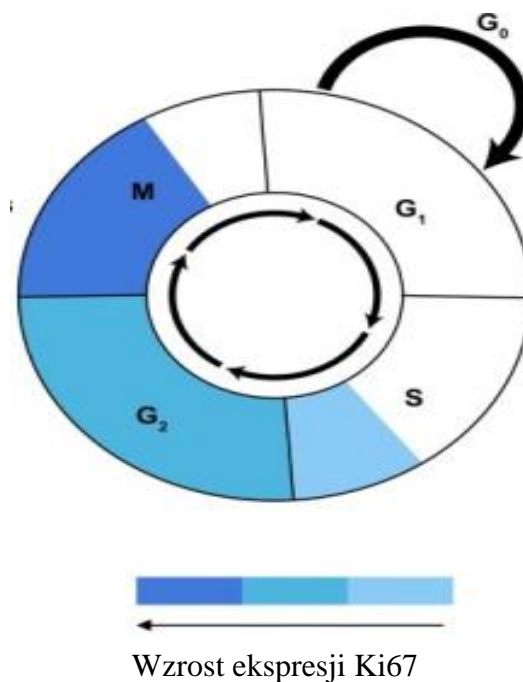
Ki67, niehistonowe białko jądrowe, jest uznanym w patofizjologii wskaźnikiem proliferacji komórkowej. Jednak dotychczas, jego funkcja pozostaje nie w pełni wyjaśniona i wiele zagadnień pozostaje w sferze hipotezy. [99-101]

Ki67, w odróżnieniu od innych białek związanych z cyklem komórkowym, nie jest obecne, bądź obecne tylko w śladowej ilości w komórkach nie dzielących się lub podlegających procesom naprawczym. Ta unikalna cecha sprawiła, że oznaczenie antygeny Ki67 wykorzystano do wyliczania tzw. indeksu Ki67 (labeling index - LI), określającego wielkość frakcji wzrostowej nowotworów i w konsekwencji, do prognozowania czasu przeżycia pacjentów. [99,102]

Ki67 występuje w dwóch izoformach: krótkiej i długiej, o masie cząsteczkowej odpowiednio 345 i 395 kD. Gen kodujący Ki67 znajduje się na długim ramieniu chromosomu 10 (10q25). Pierwszorzędowa struktura białka Ki67 nie wykazuje podobieństwa z żadną ze znanych sekwencji. W analizie budowy kodującej nici DNA (cDNA), wyróżniono następujące części: koniec 5' składający się z eksonu 1 i eksonu 7, najbardziej zróżnicowaną część centralną oraz koniec 3' - zawierający miejsce wiązania ATP/GTP i kodon STOP. [100-102]

Ki67 występuje w jądrze komórkowym we wszystkich fazach cyklu związanego z podziałem komórki (G1, S, G2, M), jest nieobecne natomiast w fazie spoczynkowej (G0) oraz w czasie procesów naprawczych. Półokres trwania Ki67 wynosi 60-90 minut. Ilościowa ekspresja Ki67 oznaczona techniką cytometrii przepływową wskazuje na szczególnie dużą zmienność w fazie G1 oraz tendencję do stopniowego jej narastania w kolejnych częściach cyklu komórkowego (S i G2). W czasie mitozy, białko ulega procesom fosforylacji, defosforylacji, a także działaniu enzymów proteolitycznych. Lokalizacja i stopień koncentracji Ki67 w czasie podziału komórki ulega zmianie, osiągając największą gęstość w anafazie. Jak wskazują badania przeprowadzone przy użyciu mikroskopu elektronowego białko Ki67 związane jest z tzw. gęstym składnikiem fibrylarnym jąderka (DFC – ang. Dense Fibrillary Component). Ilość Ki67 jest ściśle regulowana przez złożony układ regulacyjny oparty na procesach syntezy i degradacji przebiegający z udziałem proteasomów. [99,103] Lokalizacja Ki67 w czasie cyklu komórkowego - **rycina 3**. [99]





- G – faza spoczynkowa
- G1 – faza duplikacji
- G2 – faza naprawcza
- M – mitozą
- S – faza syntezy

Rycina 3. Lokalizacja Ki67 w cyklu komórkowym wg Sysseł

Ekspresję antygenu Ki67 oznacza się przy użyciu metod immunohistochemicznych lub cytometrii przepływowej. O ile budowa Ki67 poznana jest dość dokładnie, o tyle znaczenie Ki67 w komórce podczas cyklu komórkowego poznane jest w znacznie mniejszym stopniu. W dostępnym piśmiennictwie dość dobrze udokumentowano przydatność oceny Ki67 w diagnostyce nowotworów litych - w czerniaku, w zmianach nabłonka szyjki macicy, w raku piersi, w raku prostaty, raku z komórek podstawnych i trichoepitelioma. Natomiast nie udowodniono, aby wysoka aktywność Ki67 w chorobach nowotworowych miała wpływ na pojawianie się zmian o charakterze przerzutów. [103] Wartość diagnostyczną Ki67 w onkologii przedstawiono w **tabeli 10**.

1. Diagnostyka czerniaka Ocena ekspresji pKi67 w melanocytach
2. Diagnostyka różnicowa zmiany w obrębie nabłonka szyjki macicy
3. Diagnostyka i ocena stopnia dysplazji we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego
4. Diagnostyka różnicowa raka prostaty i hiperplazji komórkowej
5. Diagnostyka różnicowa nowotworów skóry
6. Diagnostyka raka sutka

Tabela 10. Wartość diagnostyczna Ki67 w onkologii

Oznaczanie Ki67 posiada także duże znaczenie diagnostyczne oraz badawcze w hematoonkologii, jest bowiem czynnikiem zarówno prognostycznym jak i predykcyjnym. [104-106] Analiza jego ekspresji w komórkach krwi obwodowej osób zdrowych wskazuje na obecność tego antygenu w populacji komórek dzielących się. Proliferacja dotyczy średnio ok. 2,7% limfocytów i 2,1% mononuklearów krwi obwodowej, co w wartościach bezwzględnych przekłada się na  $0,079 \times 10^9$  komórek. Wśród limfocytów Ki67 pozytywnych 41% stanowią limfocyty T, 11,4% to limfocyty B. Ekspresji Ki67 nie wykazano w monocytach. W szpiku osób zdrowych ekspresja Ki67 oznaczona metodą immunohistochemiczną wynosi średnio 7,4%; w komórkach erytroidalnych - 2%, linii granulocytarnej - 2,2%. Natomiast w materiale z TB odsetek komórek Ki67 pozytywnych wynosi średnio 1%. [107]

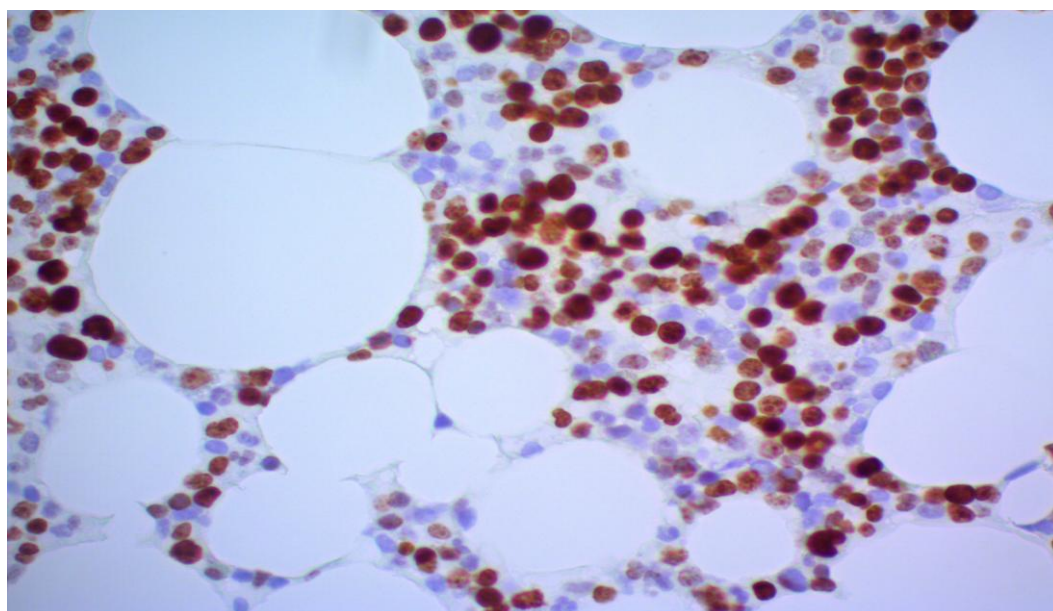
W nowotworach układu chłonnego stwierdza się wysoką wartość indeksu Ki67 powiązaną się ze zmniejszonym odsetkiem przeżycia u chorych z chłoniakiem z komórek płaszczka (MCL – ang. Mantle Cell Lymphoma). Określanie stopnia ekspresji Ki67 przydatne jest w chłoniakach nieziarnicznych (NHL – ang. Non-Hodgkin Lymphoma), zwłaszcza w przypadku transformacji do chłoniaka o agresywniejszym przebiegu. Wysoki indeks proliferacyjny - bliski 100% charakteryzuje bardzo aktywne nowotwory - np.



chłoniaka Burkitta. Oznaczenie Ki67 jest pomocne w NHL, w których proliferujących komórek jest dużo, lecz wykazują znaczne rozproszenie (np. T-cell rich B-cell, chłoniak angioimmunoblastyczny). Ki67 badano także w materiale z biopsji węzłów chłonnych w przerście grudkowym, chorobie Castelmana, chłoniaku grudkowym (FL – ang. Follicular Lymphoma), chłoniaku strefy brzeżnej (MZL – ang. Marginal Zone Lymphoma) i mieszanej hiperplazji, co pozwala odróżnić reaktywny przerost grudkowy od FL. [108,109]

W odniesieniu do szpiczaka (MM –ang. Multiple Myeloma) i MGUS (ang. Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance - gammapatia monoklonalna o nieustalonym znaczeniu) indeks proliferacyjny określony w limfocytach krążących był istotnie wyższy u chorych na MM w porównaniu z pacjentami z MGUS, a także osób z grupy kontrolnej. [104]

Badania aktywności Ki67 prowadzone są również w odniesieniu do wielu zagadnień, takich jak - gojenie się ran, starzenie organizmu, nowotworzenie oraz biologia rozwoju.



Fot. 4. Trepanobiopsja- ocena Ki67, (powiększenie x 400)  
autor zdjęcia prof. M.Komarnicki

## 1.6 Angiogeneza

Angiogeneza to proces wytwarzania nowych naczyń krwionośnych, zachodzi on w życiu zarodkowym i w okresie pozazarodkowym; ma ona miejsce zarówno w stanach fizjologicznych jak i w patologii. Fizjologicznie, w życiu pozazarodkowym angiogeneza pojawia się w przypadku gojenia ran, wzrostu kości, u kobiet podczas cyklu menstruacyjnego (faza lutealna) oraz w ciąży przy tworzeniu łożyska. [110]

W stanach patologii nasilona angiogeneza towarzyszy przede wszystkim procesom nowotworowym. Zjawisko to poznano w biologii guzów litych przy tworzeniu się nowych naczyń. Angiogeneza jest wynikiem występowania mutacji w obrębie genów supresorowych lub onkogenów. Dotychczas zdefiniowano szereg substancji działających na komórki śródbłonna, posiadających wpływ na przebieg powstawania nowych naczyń krwionośnych. Czynniki te mogą być wydzielane w sposób auto-, endo- lub parakryny. Najważniejsze czynniki proangiogenne to naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF – ang. Vascular Endothelial Growth Factor) oraz czynnik tkankowy (TF – ang. Tissue Factor). W wyniku procesów związanych z miejscową aktywacją układu krzepnięcia, zwiększeniem przepuszczalności naczyń, lokalnym niedotlenieniem i wydzielaniem enzymów (metaloproteinaza), dochodzi do rozwoju nowych naczyń krwionośnych. Tak powstałe naczynia, charakteryzują się szeregiem patologii w zakresie struktury i funkcji; najczęściej posiadają nierówne światło, liczne rozgałęzienia i kręty przebieg, co wynika z nieprawidłowości dotyczących poszczególnych części ściany naczyniowej. Te nieprawidłowości dotyczą błony podstawnej z zaburzeniami proporcji białkowo-lipidowych, śródbłonna (komórki wykazują chaotyczne ułożenie) oraz przydanki, w której dochodzi do zmniejszenia liczby perycytów. Przepływ krwi w zmienionym naczyniu jest nieskoordynowany i bezładny, zmienny czasowo i przestrzennie. [110-112]

Angiogeneza towarzyszy również nowotworom hematologicznym. Najlepiej poznana jest ona w pierwotnej mielofibrozie. Do rozwoju nowych naczyń krwionośnych w szpiku dochodzi również w przebiegu ostrych białaczek, zespołów mielodysplastycznych, dyskrazji plazmocytowych i przewlekłych chorób mieloproliferacyjnych. [68,112]

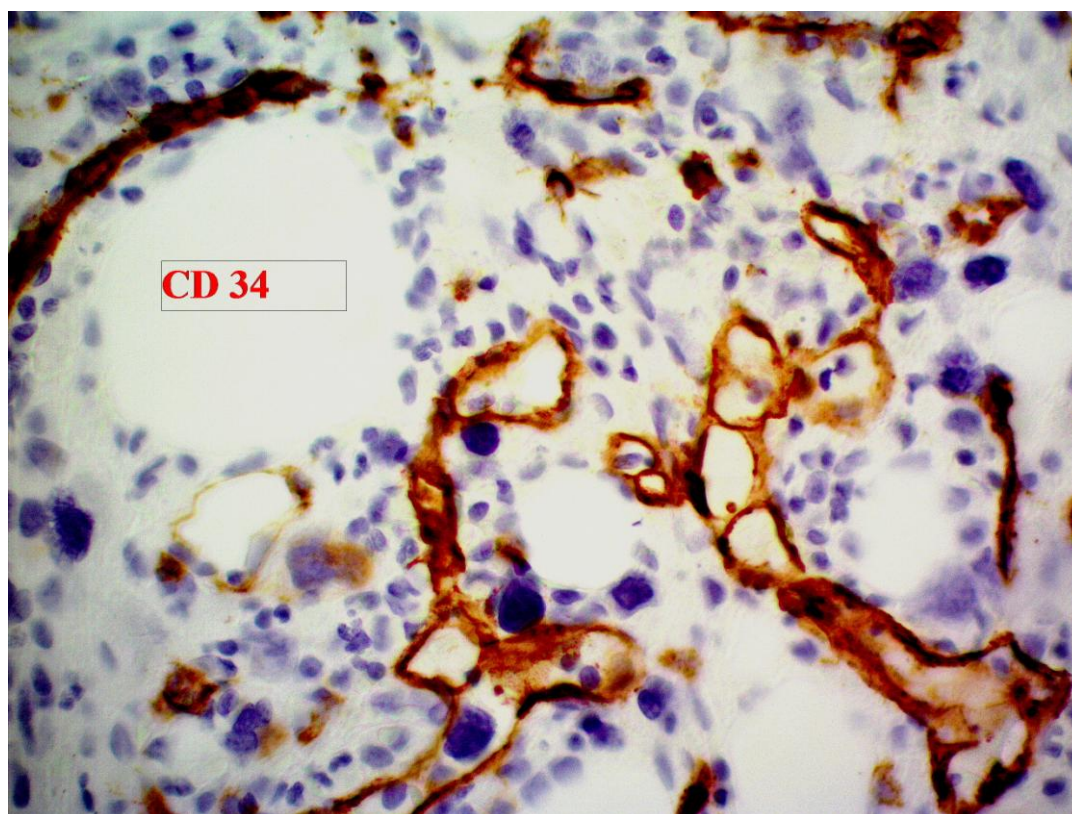
Angiogeneza związana jest z reakcją komórek podścieliska szpiku i stanowi odpowiedź na działanie cytokin, przede wszystkim TGF- $\beta$  (ang. Transforming Growth Factor  $\beta$  - transformujący czynnik wzrostu  $\beta$ ) i nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF – ang. Epidermal Growth Factor). Szacunkowo, nasilenie angiogenezy określa się miarą koncentracji naczyń krwionośnych i wyraża się jako średnią gęstość naczyń krwionośnych - MVD (ang. Mean Vessel Density). Chociaż miejsce oceny angiogenezy, jako narzędzia prognostycznego w AML nie zostało jednoznacznie ustalone, najnowsze doniesienia wskazują, że u chorych z rozpoznaniem AML, w trepanobiopsji MVD jest znacznie większa niż w grupie osób zdrowych. Duża gęstość naczyń jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym. Sugeruje się, że interakcje pomiędzy naczyniami krwionośnymi a komórkami białaczkowymi mogą odpowiadać za oporność choroby na stosowane leczenie. [112-114]. Podkreślane są także inne aspekty angiogenezy w przebiegu AML:

1. Komórki śródbłonna mogą wspomagać komórki białaczkowe poprzez wydzielanie określonych czynników.
2. Komórki białaczkowe mogą oddziaływać na komórki śródbłonna.
3. Poszukuje się „brakujących ogniw” cząsteczek adhezyjnych takich, jak komórki śródbłonna zatok, biorących udział w migracji komórek do i ze szpiku.
4. Komórki białaczkowe mogą wykazywać koekspresję komórek śródbłonna.
5. Nisze naczyniowe w szpiku mogą zawierać inne typy komórek, w tym pericyty okołonaczyniowe i interkalowane megakariocyty. [68,112,115]

W ostatnim czasie wzrasta liczba dowodów wskazujących na bardzo ważną rolę mikrośrodowiska szpiku w regulacji hematopoezy. W odniesieniu do chorób hematologicznych, w tym AML, mikrośrodowisko cechuje znaczna aktywność. [111,115,116] Komórki nowotworowe oddziałują z podścieliskiem w wielu mechanizmach, przede wszystkim w celu zapewnienia możliwości wzrostu, podziału i przeżycia. Typowa nisza białaczkowa znajduje się wewnątrz mikrośrodowiska szpiku, choć komórki białaczkowe posiadają również zdolność migracji do innych tkanek, przede wszystkim do wątroby i śledziony, część blastów przekracza barierę krew-mózg penetrując do ośrodkowego układu nerwowego. Chociaż nie do końca poznany został model funkcjonowania mikrośrodowiska szpiku i zachodzących w nim procesów, wyróżniono w nim trzy przedziały:

1. Nisza śródkostna - zawiera uśpione komórki macierzyste
2. Nisza naczyniowa - reguluje migrację komórek do i ze szpiku
3. Obszar centralny - wypełniony licznymi komórkami progenitorowymi w fazie różnicowania. [115]

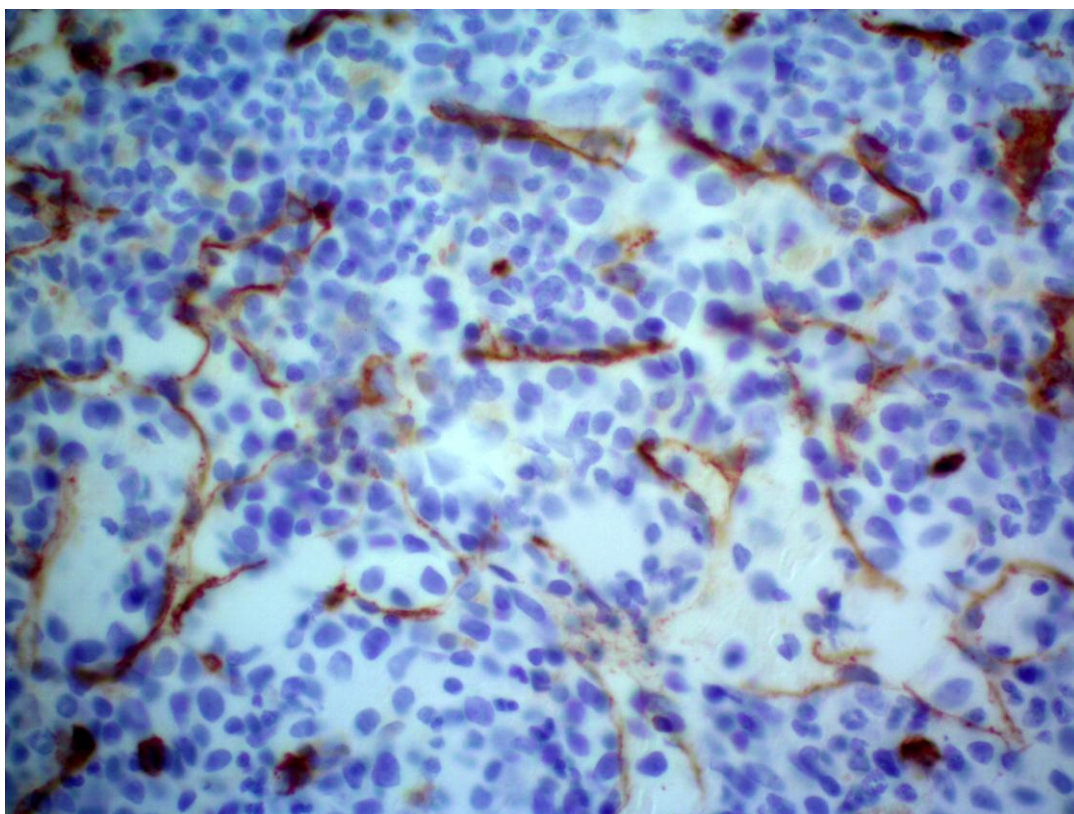
U chorych na AML wykazano wzrost ekspresji VEGF i jego receptorów: VEGFR1 (ang. Vascular Endothelial Growth Factor - czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego) i jego receptorów VEGFR2. VEGF pobudza HUVECs (ang. Human Umbilical Vein Endothelial Cells - ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej) do sekrecji GM-CSF, co z kolei powoduje wzrost komórek blastycznych AML. Taki układ zależności jednoznacznie wskazuje, że komórki AML wykorzystują sygnały angiogeniczne do autokrynej stymulacji i pobudzają komórki endotelialne do wydzielania czynników probiałaczkowych, niezbędnych do przeżycia i proliferacji blastów. [110-114]



Fot.5a Trepanobiopsja- ocena angiogenezy (powiększenie x400)

k8autor zdjęcia prof. M.Komarnicki





Fot. 5b Trepanobiopsja- ocena angiogenezy (powiększenie x400)  
autor zdjęcia prof. M.Komarnicki

### 1.7 Włóknienie

Wzrost zawartości włókien retikuliny lub kolagenowych w szpiku określa się mianem włóknienia. Zjawisko to najlepiej poznano w mielofibrozie, tym niemniej włóknienie obecne jest również w innych chorobach hematologicznych - w pozostających przewlekłych nowotworach mieloproliferacyjnych (przewlekła białaczka szpikowa, nadpłytkowość samoistna, czerwienica prawdziwa), w ostrej białaczce szpikowej - zwłaszcza megakariocytowej, zespołach mielodysplastycznych, chłoniakach, szpiczaku plazmocytowym, niekiedy włóknienie szpiku jest obecne w przerzutach nowotworowych guzów litych (np. rak jelita grubego, rak prostaty). Dane kliniczne dość jednoznacznie wskazują, że pojawienie się włóknienia jest zawsze niekorzystnym czynnikiem prognostycznym. [56,66] Mechanizm i potencjalne czynniki wpływające na pojawienie się włóknienia podzielono na kilka grup:

1. Zmiany reaktywne w przebiegu chorób autoimmunologicznych, np. toczenia układowego, twardziny.
2. Zmiany powstałe pod wpływem działania substancji toksycznych, np. benzenu, promieniowania jonizującego.
3. Zmiany wynikające z zaburzeń osteopatycznych takich jak: niedobór witaminy D, osteopetroza, niedoczynność tarczycy, osteodystrofia nerkowa.
4. Zmiany rozwijające się w przebiegu niektórych infekcji, np. sarkoidozy, gruźlicy, AIDS.
5. Zmiany związane z procesem nowotworowym: chłoniaki ziarnicze i niezziarnicze, przewlekłe nowotwory mieloproliferacyjne, ostre białaczki szpikowe. [65,66,117-119]

Termin zwłóknienia szpiku odnosi się do występowania włókien retikuliny lub kolagenowych w szpiku, niezależnie od podłoża chorobowego. Włóknienie może wykazywać postać od rozproszonej do wysoce zwłókniałej.

Włókna retikuliny wykrywane są przy zastosowaniu techniki barwienia srebrem (metoda Gomoriego), a kolagen przy użyciu barwienia Mallory'ego lub Massona. Włóknienie stwierdzane jest także w populacji osób zdrowych, jednak u nich nie stwierdza się zwłóknienia o bardzo wysokim stopniu. Do oceny stosuje się skalę Bauermeistera. [66]

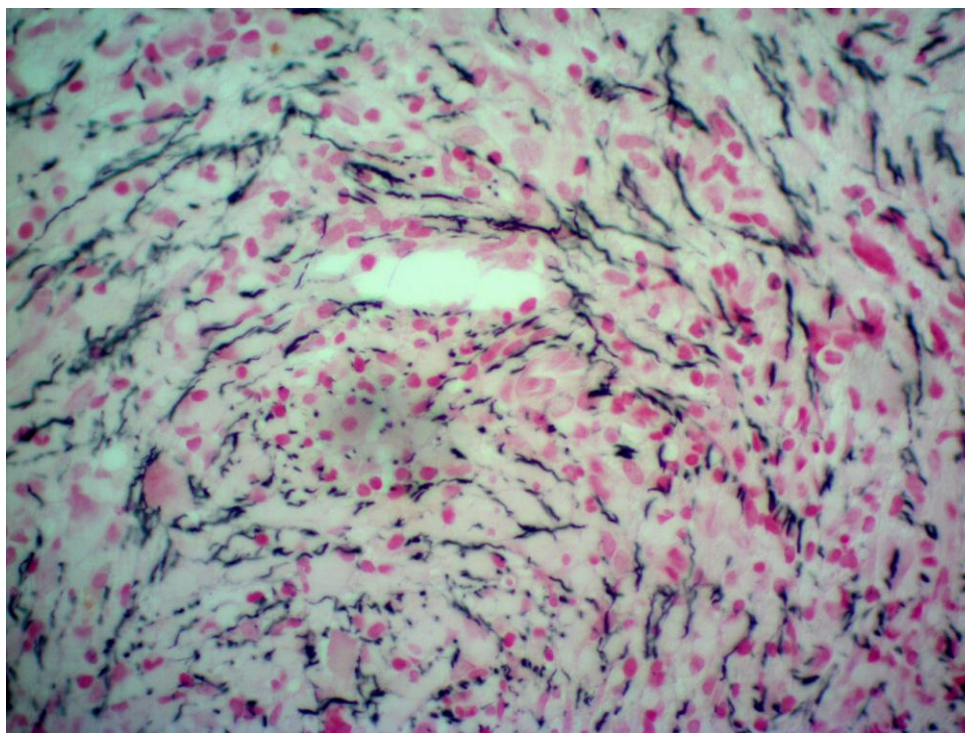
Aktualnie, oceny zwłóknienia w szpiku przeprowadzane są przy zastosowaniu metody półilościowej, opracowanej jako konsensus grupy europejskich ekspertów. W klasyfikacji tej uwzględniono cztery stopnie zwłóknienia:

Stopień 0: rozproszone zwłóknienie retikuliny, bez skrzyżowań w odniesieniu do normalnego szpiku.

Stopień 1: luźna sieć włókien retikuliny z wieloma skrzyżowaniami, zwłaszcza w obszarach okołonaczyniowych.

Stopień 2: rozsiana i gęsta sieć włókien retikuliny z obszernymi skrzyżowaniami, mogą występować tylko lokalne, ogniskowe skupiska włókien kolagenowych albo ogniska osteosklerotyczne.

Stopień 3: rozszkana i gęsta sieć włókien retikuliny, lokalne pakiety kolagenowe lub ogniska osteosklerozy. [65,66]



Fot. 6. Trepanobiopsja- ocena włóknienia (powiększenie x 400)

autor zdjęcia prof. M.Komarnicki

### 1.8 Uzasadnienie celu pracy

Na przestrzeni ostatnich czterdziestu lat znacząco zwiększyła się przeżywalność chorych z rozpoznaną AML. W latach 70-tych i 80-tych XX wieku śmiertelność w grupie pacjentów otrzymujących kurację "3+7" w ciągu pierwszego miesiąca leczenia kształtowała się na poziomie 16- 18%, aktualnie dla tego samego przedziału czasowego wynosi szacunkowo od 3 do 5%.

Na zmniejszenie śmiertelności wpłynęły w dużej mierze działania podejmowane w okresie około chemioterapii - profilaktyka zakażeń, wysokie standardy higieniczne, nowe leki przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze i przeciwwirusowe. [4,32]

Standardowy schemat terapii "3+7" to jeden z najstarszych schematów terapeutycznych, który na przestrzeni dekad ulegał relatywnie niewielu zmianom- pozostając w swoim trzonie dość konserwatywnym - w odniesieniu do antracyklin modyfikowano rodzaj antracykliny i ich dawki. [120,121] Niektórzy autorzy postulują dodanie kolejnego chemioterapeutyku do istniejącego schematu, co przekłada się na zwiększenie skuteczności leczenia. [21]

Wyniki leczenia pacjentów z AML nie są jeszcze w pełni satysfakcjonujące, a poprawę w tym zakresie upatruje się w indywidualizacji chemioterapii – w odniesieniu do dawki i zastosowanych leków. Z zagadnieniem tym wiąże się wczesna ocena skuteczności leczenia i podjęcie dalszych decyzji terapeutycznych.

Idea wczesnej oceny po leczeniu indukującym ma ponad 30 lat i na co dzień z powodzeniem stosowana jest w praktyce pediatrycznej - u dzieci z rozpoznaniem ALL. Ten model stał się inspiracją zastosowania wczesnej oceny w populacji osób dorosłych. [122]

Leczenie dobrane indywidualnie do sytuacji chorego wydaje się być najwłaściwszym i najskuteczniejszym sposobem terapii. Kluczowym zagadnieniem pozostaje wybór optymalnych narzędzi diagnostycznych, ustalenie ram czasowych oceny skuteczności indukcji oraz kryteriów oceny remisji.

W dostępnej literaturze zagadnieniu wczesnej oceny aktywności choroby u dorosłych poświęca się coraz więcej uwagi.

Zdecydowanie najwięcej danych literaturowych w zakresie wczesnej oceny dotyczy:

- oceny krwi obwodowej (rozmaz, cytometria)
  - oceny szpiku (biopsja aspiracyjna, cytometria, trepanobiopsja)
  - badań z użyciem technik biologii molekularnej – znajdują one zastosowanie głównie w grupie chorych z ostrą białaczką promielocytową, w przypadku pozostałych pacjentów ograniczona przydatność metody wynika z faktu, że u około połowy chorych z rozpoznaną AML nie występuje żadna ze znanych aberracji, a FLT3 i NPM1 są stwierdzane u około 25% osób z AML. [123]
- Czułość poszczególnych metod przedstawiono w **tabeli nr 11**.



<b>Metoda oceny minimalnej choroby resztkowej w AML</b>	<b>Czułość</b>
Ocena cytologiczna szpiku	1:20
Cytogenetyka (metafazy)	1:20
Cytogenetyka (interfazy)	1:100
Trepanobiopsja	1:1000
Cytometria przepływowa	1:10.000
Biologia molekularna (PCR)	1:10.000

Tabela 11. Czułość metod oceny minimalnej choroby resztkowej (MRD) w AML

Pediatriczny model wczesnej oceny skuteczności leczenia oparty na analizie rozmazu krwi obwodowej okazał się niewystarczający w odniesieniu do populacji osób dorosłych (Arellano i wsp). [124]

W większości aktualnie dostępnych prac ocena cytologiczna szpiku była podstawą do przeprowadzenia analiz i okazała się przydatna zwłaszcza w korelacji z dodatkowymi informacjami uzyskanymi z oznaczeń cytogenetycznych (grupa niemiecka i GOELAMS). [125]

Pojedynczy autorzy posilkowali się trepanobiopsją. W tych ostatnich pracach ilość uzyskanych informacji była - szczególnie po uzupełnieniu badania o BIH - najpełniejsza i najbardziej wiarygodna, zwłaszcza w kontekście oceny komórkowości szpiku i ewentualnego występowania komórek blastycznych. W porównaniu do TB – szpik z aspiracji często bywa zanieczyszczony krwią obwodową i jest najczęściej ubogokomórkowy w tej fazie leczenia. [63] Grupa badaczy kanadyjskich dokonała retrospektywnej analizy w grupie prawie 650 pacjentów z AML. Porównując dane

uzyskane z oceny cytologicznej szpiku z informacjami zebranymi na podstawie TB ich zgodność oszacowano na 92,8%. TB zmieniła rokowanie i stratyfikację ryzyka odpowiednio u 5,2% pacjentów na etapie wczesnej oceny (14-21 doba), 3,7% po zakończeniu indukcji i 2,4% na innych etapach procesu terapeutycznego. Czulość wykrycia choroby resztkowej dla biopsji aspiracyjnej wyniosła odpowiednio 86,8%-82,3%, 82,5% i 94,2% dla wspomnianych wyżej przedziałów czasowych. Saini i wsp. podkreślają, że czulość metody BAC szczególnie w odniesieniu do momentu oceny po indukcji może zawyżać ilość pacjentów u których stwierdzana jest remisja całkowita, a to z kolei niesie ze sobą ważne implikacje kliniczne i terapeutyczne. Autorzy pracy formułują tezę, że TB dostarcza wielu dodatkowych i ważnych ze względów klinicznych informacji i w porównaniu do BAC cechuje się większą czulością. [69] Zalecenia ICSH wskazują, że BAC i TB powinny być wykonywane równocześnie i interpretowane wspólnie. [126]

Jednym z ważkich zagadnień, które pozostaje tematem badań jest czas przeprowadzenia oceny. Większość autorów postuluje jako optymalny czas oceny 12- 14 dzień kuracji indukującej remisję (+5 do +7 doba po kuracji "3+7" ). Taki model został również przyjęty przez NCCN i ELN. Standardy tych organizacji, postulują wykonanie oceny w oparciu o analizę szpiku w okresie od 7 do 10 doby po zakończeniu chemioterpii indukującej remisję. [32,33]

Uzasadnienie takiego wyboru w zakresie czasu oceny wynika z biologii komórek białaczkowych- blasty wrażliwe na chemioterapię powinny zostać już zniszczone, a komórki prekursorowe odradzającego się szpiku na tym etapie terapii pozostają niewykrywalne. Wczesna odpowiedź na terapię wynika z jednej strony z indywidualnych predyspozycji pacjenta do metabolizowania leków, z drugiej zaś z biologii komórek białaczkowych.

Redukcja liczby blastów jest dobrym prognostykiem odpowiedzi na leczenie, choć kryteria wczesnej oceny przedstawiają się bardzo niejednolicie. Najczęściej punkt odcięcia oscyluje wokół liczby 5%-10% blastów. Skupiska komórek blastycznych są jednoznacznym dowodem na przetrwałą chorobę, problem interpretacyjny pojawia się w przypadku pojedynczych komórek blastycznych w ubogokomórkowym szpiku. [127-131]

Ważnym zagadnieniem pozostaje aspekt klinicznej przydatności wczesnej oceny szpiku po kuracji indukującej remisję u pacjentów z AML.

Potencjalnie największymi beneficjentami wczesnej oceny są pacjenci z pośrednim ryzykiem cytogenetycznym. Dane z dostępnych rejestrów są jednak dość niespójne. [132,133] Potrzebne są dodatkowe prospektywne randomizowane badania na dużej grupie chorych.

Wczesna ocena skuteczności leczenia to możliwość wcześniejszego zastosowania dodatkowej terapii u chorych z opornością choroby, z drugiej strony może pomóc w zidentyfikowaniu tych pacjentów, u których leczenie może być mniej intensywne (i mniej toksyczne). Podejmowane są próby opracowania modeli matematycznych, które pozwolą w uporządkowany sposób przewidzieć wynik remisji. [134,135]

## **2. Cel pracy:**

1. Ocena potencjału diagnostycznego trepanobiopsji we wczesnej fazie odpowiedzi na zastosowane leczenie cytotoksyczne u pacjentów z AML.
2. Ocena wartości oznaczeń CD34, CD117, Ki67 oraz włóknienia i angiogenezy w materiale trepanobiopcyjnym u pacjentów z AML.
3. Analiza korelacji ilościowych progów oznaczeń ekspresji CD34, CD117 i Ki67 w prognozowaniu całkowitej remisji po leczeniu indukującym remisję u pacjentów z AML.
4. Porównanie wartości diagnostycznej badania cytologicznego i histologicznego szpiku w grupie pacjentów z rozpoznaniem AML.

### 3. Materiał i metody

#### 3.1 Pacjenci

Początkowo, grupę badaną stanowiło 64 pacjentów, z ustalonym rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej, leczonych w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku w Poznaniu w latach 2007-2014. Ostatecznie, ocenie poddano 56 pacjentów (**tabela 12**) - 30 kobiet i 26 mężczyzn - w wieku od 18 do 63 lat; ze średnią wieku  $47,9 \pm 11,8$  lat. Dla kobiet wynosiła ona  $48,6 \pm 11,7$  lat a  $47,1 \pm 12,0$  lat dla mężczyzn. (**tabela 13**) Z końcowej analizy wyłączono 8 osób, które zmarły w okresie do +21 doby. Okres ten uznawany jest jako niezbędny do regeneracji szpiku i podjęcia przez niego funkcji krwiotwórczej po zastosowanej chemioterapii indukującej remisję.

Płeć	n	%
Kobiety	30	53,6
mężczyźni	26	46,4

Tabela 12. Podział pacjentów ze względu na płeć

Wiek [lata]	n	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	Odch. std.	Z	p
Kobiety	30	48,6	51,0	18	63	11,7	0,61	0,54288
mężczyźni	26	47,1	49,0	20	68	12,0		
Ogółem	56	47,9	49,5	18	68	11,8		

Tabela 13. Wiek pacjentów

Obserwacje badanych pacjentów prowadzono przez średnio  $21,0 \pm 22,5$  miesięcy, od 1,3 do 76,3 miesięcy (mediana 11,3 miesiąca).

Pacjentów z rozpoznaniem AML klasyfikowano według kryteriów WHO z 2016 roku. Ze względów praktycznych – celem wyodrębnienia jednolitych grup – posłużono się klasyfikacją FAB, która jest nadal stosowana w praktyce klinicznej (**tabela 1**). W grupie ocenianych osób - zarówno u kobiet jak i u mężczyzn - dominował typ M<sub>2</sub> - Ten typ białaczki rozpoznano łącznie u 30 osób, w tym u 15 kobiet oraz 15 mężczyzn. Z niższą częstością – u 11 osób – obserwowano typ M<sub>1</sub>, w tym u 4 kobiet i 7 mężczyzn. Natomiast typ M<sub>4</sub> rozpoznano u 6 kobiet i u 2 mężczyzn. (**tabela 14**)

Rozpoznanie wg FAB	Kobiety	mężczyźni	Ogółem
	n (%)	n (%)	n (%)
M0	1 (3,3)	0 (0,0)	1 (1,8)
M1	4 (13,3)	7 (26,9)	11 (19,6)
M2	15 (50,0)	15 (57,7)	30 (53,6)
M4	6 (20,0)	2 (7,7)	8 (14,3)
M5	2 (6,7)	1 (3,8)	3 (5,4)
M6	2 (6,7)	1 (3,8)	3 (5,4)

Tabela 14. Rozpoznanie wg FAB

Pacjenci objęci badaniami, wg definicji ELN, wykazywali różny profil ryzyka cytogenetyczno-molekularnego, u 4 osób stwierdzono profil korzystny, a u 12 pośredni-1. Największą grupę pacjentów stanowiły osoby ze stopniem pośrednim-2 – 19 i z niekorzystnym - 21 osób (**tabela 15**).

Profil ryzyka cytogenetyczno-molekularnego	Kobiety	mężczyźni	Ogółem
	n (%)	n (%)	n (%)
korzystny	4 (13,3)	0 (0,0)	4 (7,2)
pośredni-1	7 (23,3)	5 (19,2)	12 (21,4)
pośredni-2	11 (36,7)	8 (30,8)	19 (33,9)
niekorzystny	8 (26,7)	13 (50,0)	21 (37,5)

Tabela 15. Profil ryzyka cytogenetyczno-molekularnego

Stan ogólny i jakość życia pacjentów z ostrą białaczką szpikową (wg skali ECOG-WHO; **tabela 7**) były zróżnicowane; u żadnej z badanych osób nie stwierdzono pełnej sprawności (stopień „0” w sześciostopniowej skali). Dominowało niewielkie i średnie upośledzenie zdolności codziennego funkcjonowania, odpowiadające 1-szemu oraz 2-giemu stopniowi odpowiednio u 36 i 15 pacjentów. Wysoki - 3 i 4 stopień wykazano łącznie pięciu u osób (**tabela 16**).

WHO/ECOG przy przyjęciu	Kobiety	mężczyźni	Ogółem
	n (%)	n (%)	n (%)
1.	19 (63,3)	17 (65,4)	36 (64,3)
2.	8 (26,7)	7 (26,9)	15 (26,8)
3.	1 (3,3)	2 (7,7)	3 (5,4)
4.	2 (6,7)	0 (0,0)	2 (3,6)

Tabela 16. Ocena stanu ogólnego i jakości życia pacjentów wg skali WHO/ECOG (przy przyjęciu)

### **3.1.1 Charakterystyka parametrów laboratoryjnych ocenianych przy rozpoznaniu ostrej białaczki szpikowej**

Przy przyjęciu pacjentów do Kliniki stwierdzano istotne odchylenia w odniesieniu do wyników oznaczeń stężenia hemoglobiny, liczby leukocytów oraz liczby płytek krwi, w porównaniu z wartościami referencyjnymi. Nieprawidłowości odnotowywano również w globalnych testach krzepnięcia krwi (APTT, PT, INR oraz stężenia fibrynogenu, FDP i D-dimerów), a także w rutynowych oznaczeniach biochemicznych (dehydrogenaza mleczanowa, kwas moczowy i białko CRP). U nielicznych pacjentów stwierdzano zaburzenia elektrolitowe oraz podwyższone stężenia kreatyniny (**tabela 17**).



Parametr laboratoryjny	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	Odch.std.	Z	P
Hgb	5,92	5,67	4,20	12,00	1,24	4,55	0,00001
	5,65	4,88	3,73	31,00	4,24		
Leu;2	35,340	7,630	1,100	291,000	66,119	6,44	0,00000
	0,600	0,548	0,013	2,520	0,455		
Neut	5,696	1,145	0,029	51,410	11,176	5,78	0,00000
	0,110	0,023	0,000	1,420	0,251		
PLT	74,0	56,5	12,0	313,0	60,5	5,78	0,00000
	25,3	22,0	6,9	76,3	15,2		
APTT	30,5	30,7	22,0	43,9	4,4	4,35	0,00001
	33,8	32,2	24,7	48,2	5,8		
PT	21,9	11,9	10,2	97,2	26,1	0,13	0,89494
	21,2	12,1	10,1	96,5	24,1		
DD	5405	1036	119	60058	11329	0,50	0,61646
	3836	1134	116	80000	11931		
Fibrynogen	372,6	359,0	220,0	736,0	117,0	0,08	0,93926
	364,3	345,0	219,0	686,0	102,1		
INR	1,15	1,10	0,90	1,80	0,17	1,33	0,18298
	1,20	1,17	0,90	2,50	0,25		
LDH	603,6	359,0	141,0	4295,0	698,8	5,78	0,00000
	221,9	150,0	70,0	1414,0	241,7		
Kwas moczowy	260,9	245,0	119,0	471,0	79,5	5,62	0,00000
	165,4	143,0	76,0	593,0	85,8		
CRP	42,9	12,1	1,1	278,3	66,5	2,92	0,00345
	70,2	39,6	0,4	252,1	66,7		

Tabela 17. Parametry badań laboratoryjnych

### 3.2 Metodyka badań

Integralną częścią analizy hematologicznej w momencie diagnozy była ocena rozmazu krwi obwodowej, cytologii szpiku i trepanobioptatów. Badanie rozmazu krwi obwodowej po wybarwieniu preparatu odczynnikami Maya-Grunwalda i Giemsy (MGG) obejmowało: ocenę wielkości, kształtu, barwliwości i kształtu erytrocytów, ocenę morfologii elementów jądrowych oraz określenie liczby komórek blastycznych. Rutynowo, zgodnie z zaleceniami ELN analizowano >200 komórek jądrowych.

Dla potrzeb diagnostycznych, u badanych pacjentów wykonywano rutynowo biopsję aspiracyjną szpiku oraz trepanobiopsję (opis technik wykonania zabiegu - aneks). Pozyskany trepanobioptat - cylindryczny fragment kostny o wymiarach ok. 2-3 mm x 18-30 mm wypychano mandrynem na przygotowane szkiełko zegarkowe lub bezpośrednio do naczynia transportowego zawierającego 10% roztwór formaliny. Opisany materiał przekazywano w ciągu 12 h do Zakładu Patologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii celem przeprowadzenia jego oceny. Badanie trepanobioptatu przeprowadzano według przyjętych zaleceń ICSH.[126] Z materiału uzyskiwanego z biopsji aspiracyjnej szpiku przeprowadzano badanie cytologiczne po zabarwieniu preparatów szpiku techniką MGG z oceną komórkowości, proporcji komórek układu erytroidalnego i granulocytarnego, opisem ich morfologii oraz określeniem występujących zmian jakościowych, odsetka komórek blastycznych i obecności megakariocytów.

Przeprowadzano również badania cytometryczne (Cytometr Przepływowy Canto, Beckton-Dickinson, z zastosowaniem przeciwciał anty CD34, CD117, CD13, CD33, CD11b, CD11c, CD14, CD64, HLA-DR, MPO, CD79 $\alpha$ , CD235a, CD41, CD61) i cytogenetyczne - prowadzone techniką klasyczną oraz FISH. Natomiast badania molekularne (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *PML-RARA*, *MLLT3-MLL*, mutacje FLT3-ITD, NPM1, CEBPA) wykonywano z krwi.

Wykonywane badania cytogenetyczne i molekularne standaryzowano według wytycznych międzynarodowych. Na ich podstawie, dla każdego pacjenta dokonano indywidualnej stratyfikacji ryzyka cytogenetyczno-molekularnego według zaleceń ELN. [136,137]

Ocenę morfologiczną komórek szpiku dokonywano w oparciu o zalecenia ELN, przyjmując dla rozmazów szpiku odpowiednio analizę > 500 komórek jądrowych.

Badanie trepanobiopatu obejmowało analizę: komórkowości szpiku, odsetka komórek blastycznych, stopnia włóknienia, nasilenia angiogenezy. W badaniach immunohistochemicznych zastosowano oznaczenia pozwalające na rozpoznanie ostrej białaczki szpikowej (CD34, CD117) oraz służące ocenie intensywności proliferacji klonu białaczkowego (Ki67). [56,138]

Po ustaleniu ostatecznego rozpoznania ostrej białaczki szpikowej podejmowano decyzję terapeutyczną. Wszyscy pacjenci leczeni byli wg jednolitego programu, który składał się z arabinozydu cytozyny w dawce 200 mg/m<sup>2</sup> przez 7 dni (1-7) i daunorubicyny w dawce 60 mg/m<sup>2</sup> podawanej przez 3 dni (1-3). Pomiędzy 7 a 10 dobą od zakończenia chemioterapii indukującej remisję wg powyższego schematu przeprowadzano następujące badania: ocenę rozmazu krwi obwodowej i szpiku oraz trepanobiopatu, ponadto oceniano morfologię krwi, przeprowadzano globalne testy układu krzepnięcia (APTT, PT, INR) oraz badania biochemiczne obejmujące ocenę aktywności LDH, białka, CRP i stężenia kwasu moczowego.

Czas obserwacji obejmował okres od rozpoznania choroby do zakończenia procesu terapeutycznego. Za datę diagnozy przyjęto datę oceny pierwszego mielogramu, natomiast zakończenie procesu terapeutycznego to data zakończenia obserwacji, przyjęta umownie na 30.06.2015 lub data zgonu pacjenta. Wyniki leczenia oceniano na podstawie kryteriów ELN 2008, według definicji zawartych w **tabeli nr 5**.

Pacjenci, którzy uzyskali remisję, otrzymywali 2 lub 3 kursy konsolidacji wysokimi dawkami arabinozydu cytozyny (3 g/m<sup>2</sup> co 12 godzin 1,3 i 5 dnia). Po tym leczeniu, chorzy z grupy pośredniego i wysokiego ryzyka kwalifikowani byli do leczenia z zastosowaniem wyskodawkowej chemioterapii wspomaganą przeszczepieniem komórek hematopoetycznych. Pacjenci, którzy nie spełniali kryteriów remisji otrzymywali leczenie reindukujące, według schematu pierwotnej indukcji, wysokimi dawkami arabinozydu cytozyny lub stosownie do protokołu FLAG-Ida (fludarabina 30 mg/m<sup>2</sup>, arabinozyd cytozyny 2 g/m<sup>2</sup> 1- 5.dzień, idarubicyna 10 mg/m<sup>2</sup> 1.- 3. dzień, czynnik wzrostu granulocytów 5 µg/kg od -1. do 4. dnia kuracji).

Wyniki badań poddano ocenie statystycznej z wykorzystaniem pakietu statystycznego STATISTICA 10 PL. Za statystycznie istotne przyjęto te wyniki, dla których poziom istotności p był ≤ 0,05. W analizie wykorzystano nieparametryczny test Manna-Whitneya, dla prób niepowiązanych; miarą tendencji centralnej dla tego testu jest

nie średnia jak w przypadków testów t, a mediana. Do porównania parametrów badanych zmiennych ilościowych zastosowano nieparametryczny testu kolejności par Wilcoxon.

W celu określenia różnic zmiennych mierzalnych posłużono się nieparametrycznym testem Manna-Whitneya. Do sprawdzenia zależności pomiędzy zmiennymi jakościowymi w postaci tabeli kontyngencji 2x2 użyto testu chi-kwadrat z poprawką Yatesa oraz dokładnego testu Fishera. Natomiast, w odniesieniu do zmiennych jakościowych zależnych dla tabeli kontyngencji 2x2 użyto testu McNemara. Wyniki regresji logistycznej przedstawiono w postaci ilorazu szans (OR –ang. Odds Ratio) z 95% zakresem ufności (CI –ang. Confidence Interval) oraz statystyki chi-kwadrat Walda i poziomu p. W ocenie OS, EFS i RFS wykorzystano analizę przeżycia, a wyniki przedstawiono w formie wykresów prawdopodobieństwa przeżycia Kaplana-Meiera.

Analizę jednoczynnikową i wieloczynnikową czynników predykcyjnych wpływających na czas przeżycia całkowitego przeprowadzono w oparciu o model regresji proporcjonalnego hazardu Coxa. Uzyskane w ten sposób wyniki przedstawiono jako współczynnik ryzyka (HR - ang. Hazard Ratio) z 95% zakresem ufności (CI) oraz statystyki Walda (W) i poziomu p. Za istotną statystycznie przyjęto wartość  $p < 0,05$ .

Krzywą ROC (ang. Receiver Operating Characteristic) wykorzystywano jako narzędzie do oceny i porównania między sobą modeli klasyfikacyjnych. Wyniki porównania dwóch krzywych ROC opisano za pomocą wskaźnika AUC (ang. Area Under Curve - pole pod krzywą) wraz z odchyleniem standardowym przy 95% przedziale ufności oraz statystyki Z i poziomu p.

Obliczenia statystyczne wykonano przy użyciu pakietu STATISTICA 10PL. Poprawność użytych testów zweryfikował dr inż. Krzysztof Talaga (biuro STATIS).

Badania laboratoryjne wykonywano w Laboratorium nr 2 Szpitala Klinicznego Przemienienia Pańskiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Preparaty do oceny rozmazu krwi obwodowej i szpiku, przygotowywano w Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej Kliniki Hematologii i Transplantacji Szpiku w Poznaniu. Ich oceny dokonywała autorka pracy. Badania cytogenetyczne i molekularne przeprowadzono w Pracowni Cytogenetycznej i Biologii Molekularnej Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej Szpitala Klinicznego Przemienienia Pańskiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Materiał uzyskany podczas trepanobiopsji opracowywano

w Zakładzie Patologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu (kierownik: prof. dr hab. n. med. Andrzej Marszałek), natomiast ocenę morfologiczną i immunohistochemiczną trepanobiopsatów przeprowadził prof. dr hab. n. med. Mieczysław Komarnicki.

Badanie uzyskało aprobatę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr 207/13 z dnia 07 marca 2013 roku). Wszyscy pacjenci zostali poinformowani o celu badania i wyrazili pisemną zgodę na ich przeprowadzenie.

#### **4. Wyniki badań**

##### **4.1. Charakterystyka parametrów laboratoryjnych w chwili rozpoznania ostrej białaczki szpikowej oraz w 7-10 dobie po zakończeniu chemioterapii indukującej remisję**

###### **4.1.1. Ocena rozmazu krwi**

We wstępnym postępowaniu diagnostycznym ocenie poddawano rozmazy krwi. W analizowanych preparatach liczba komórek blastycznych wyniosła od 0 do 100%, ze średnią wartością 56,13% i medianą 66%.

W okresie od 7 do 10 doby po zakończeniu chemioterapii indukującej remisję ocenie ponownie poddano rozmazy krwi. U 61 pacjentów (94,6%) analizowane preparaty były skrajnie ubogokomórkowe w zakresie obecności komórek jądrowych. U pozostałych 3 osób (5,4%) występowały wyłącznie komórki blastyczne (o morfologii mieloblasta).

###### **4.1.2. Badanie cytologiczne szpiku**

W przeprowadzanej rutynowo w diagnostyce wstępnej ocenie cytologicznej szpiku stwierdzano średnio  $62,89 \pm 27,6\%$  komórek blastycznych z medianą 69,75%. W przeprowadzonej ocenie cytologicznej szpiku na wczesnym etapie po zakończeniu chemioterapii (+7 do +10 doba po leczeniu) preparaty u 48 pacjentów (83,3%) były ubogokomórkowe i znajdowano w nich pojedyncze komórki jądrowe. U pozostałych

8 osób (16,6%) szpik sklasyfikowano jak normalno- lub bogatokomórkowy, ze średnią liczbą mieloblastów 21% (mediana 21%).

#### **4.1.3. Ocena szpiku techniką cytometrii przepływowej**

W ocenie cytometrycznej szpiku na etapie diagnostyki wstępnej, odsetek komórek blastycznych (CD34+) był zbliżony do stwierdzanego w badaniu cytologicznym szpiku, średnia liczba mieloblastów wynosiła odpowiednio  $59,97 \pm 27,49\%$  vs.  $62,89 \pm 27,99\%$  (mediana 61,5 vs. 69,8).

#### **4.1.4. Ocena histologii szpiku**

##### **4.1.4.1 Komórkowość szpiku**

W ocenie histologicznej w okresie przed zastosowaniem chemioterapii szpik większości pacjentów (89%) określono jako bogatokomórkowy, ze średnią wartością tego parametru  $91,3\% \pm 18,5\%$  (mediana 100) (**tabela 18**).

Płeć	<sup>1</sup> Komórkowość preparatu						
	<sup>2</sup> czas oceny	n	Średnia (%)	Mediana	Min.	Maks.	<sup>3</sup> SD
Kobiety	t=0	30	85,8	100,0	5,0	100,0	22,4
mężczyźni	t=0	26	97,7	100,0	50,0	100,0	9,9
Ogółem	t=0	56	91,3	100,0	5,0	100,0	18,5

<sup>1</sup>komórkowość szpiku oceniana w preparacie histologicznym

<sup>2</sup>t=0 – ocena przy rozpoznaniu

<sup>3</sup> odchylenie standardowe

Tabela 18. Komórkowość szpiku przy rozpoznaniu ostrej białaczki szpikowej określana w materiale trepanobiopcyjnym

W analizie trepanobiopciatów przeprowadzonej od +7 do + 10 doby po leczeniu, u 26 (46%) pacjentów szpik sklasyfikowano jako ubogokomórkowy, natomiast u pozostałych 30 (54%) chorych jako normalno lub bogatokomórkowy. Komórkowość szpiku wyniosła średnio 34,1%±38,1% (mediana 6,0). W porównaniu z oznaczeniami przeprowadzonymi w momencie ustalania rozpoznania były to wartości niższe, a różnica ta była istotna statystycznie ( $p < 0,05$ ). (tabela 19)

Płeć	<sup>1</sup> Komórkowość preparatu						
	<sup>2</sup> czas oceny	n	Średnia (%)	Mediana	Min.	Maks.	<sup>3</sup> SD
Kobiety	t=1	30	28,2	5,0	5,0	100,0	34,4
Mężczyźni	t=1	26	41,0	10,0	2,0	100,0	41,6
Ogółem	t=1	56	34,1	6,0	2,0	100,0	38,1

<sup>1</sup>komórkowość szpiku oceniana w preparacie histologicznym

<sup>2</sup>t=1 - czas przeprowadzenia oceny przypadającej pomiędzy 7 a 10 dobą po zakończeniu terapii indukującej remisję

<sup>3</sup> odchylenie standardowe

Tabela 19. Komórkowość szpiku określana w materiale trepanobiopcyjnym u chorych na ostrą białaczkę szpikową w 7 - 10 dobie po zakończeniu chemioterapii indukującej remisję

W analizie częstości osiągnięcia remisji po I indukcji w zależności od komórkowości szpiku ocenionej w okresie od +7 do + 10 doby po terapii wykazano, że u chorych ze stwierdzoną opornością komórkowość wyniosła średnio 45,5%±41,5% (mediana 30%), a u pacjentów osiągających CR 26,8±34,3% (mediana 5%), różnica ta była istotna statystycznie ( $p < 0,05$ ). (**tabela 20**)



Ocena po zastosowaniu po I indukcji	K o m ó r k o w o ść s z p i k u w b a d a n i u h i s t o l o g i c z n y m							
	n	Średnia (%)	Mediana	Min.	Maks.	<sup>1</sup> SD	<sup>2</sup> Z.	<sup>3</sup> p
Oporność	22	45,5	30,0	5,0	100,0	41,5	<b>1,91</b>	<b>0,05049</b>
Remisja całkowita	34	26,8	5,0	2,0	100,0	34,4		

<sup>1</sup> odchylenie standardowe

<sup>2</sup>testManna-Whitneya

<sup>3</sup>prawdopodobieństwo

Tabela 20. Komórkowość szpiku w materiale trepanobiopcyjnym u chorych na ostrą białaczkę szpikową ze stwierdzoną opornością oraz osiągających remisję całkowitą po zastosowaniu I indukcji.

#### 4.1.4.2 Analiza zawartości komórek blastycznych

W analizie trepanobiopciatów w zakresie oceny odsetka komórek z poszczególnych linii komórkowych w momencie diagnozy wykazano dominację komórek układu granulocytarnego - związaną z masywnym nacieczeniem homogeną populacją mieloblastów- średnią liczbę młodych komórek oszacowano na 73,2%±25,4%, (mediana 80%) (**tabela 21**).

Płeć	<sup>1</sup> Liczba blastów						
	<sup>2</sup> czas oceny	n	Średnia (%)	Mediana	Min.	Maks.	<sup>3</sup> SD
Kobiety	t=0	30	70,0	75,0	30,0	100,0	24,8
mężczyźni	t=0	26	76,9	85,0	20,0	100,0	26,1
Ogółem	t=0	56	73,2	80,0	20,0	100,0	25,4

<sup>1</sup> względna liczba blastów w szpiku określana w preparacie histologicznym

<sup>2</sup> t=0 – ocena przy rozpoznaniu

<sup>3</sup> odchylenie standardowe

Tabela 21. Względna liczba komórek blastycznych szpiku przy rozpoznaniu ostrej białaczki szpikowej przed leczeniem określana w materiale trepanobiopcyjnym

W analizie trepanobiopciatów w zakresie oceny odsetka komórek blastycznych wykazano, że we wczesnym okresie po chemioterapii (+7 do +10 doba po leczeniu) średnia liczba niedojrzałych komórek wynosiła  $23,3 \pm 36,9\%$ , (mediana 0). W porównaniu do okresu sprzed leczenia wartości te były niższe i wykazywały istotną statystycznie różnicę ( $p < 0.05$ ) (tabela 22).

Płeć	<sup>1</sup> Liczba blastów						
	<sup>2</sup> czas oceny	n	Średnia (%)	Mediana	Min.	Maks.	<sup>3</sup> SD
Kobiety	t=1	30	16,3	0,0	0,0	100,0	33,4
mężczyźni	t=1	26	31,4	6,5	0,0	100,0	39,5
Ogółem	t=1	56	23,3	0,0	0,0	100,0	36,9

<sup>1</sup> względna liczba blastów w szpiku określana w preparacie histologicznym

<sup>2</sup> t=1 - czas przeprowadzenia oceny przypadającej pomiędzy 7 a 10 dobą po zakończeniu terapii indukującej remisję

<sup>3</sup> odchylenie standardowe

Tabela 22. Względna liczba komórek blastycznych szpiku u chorych na ostrą białaczkę szpikową w 7 - 10 dobie po zakończeniu chemioterapii indukującej remisję

W grupie 34 chorych z CR po I indukcji u 29 pacjentów (85,3%) pacjentów liczba blastów w ocenie przeprowadzonej od +7 do +10 doby po kuracji indukującej była niższa niż 5%; natomiast u pozostałych 4 osób (14,7%) była ona wyższa. U 22 osób z opornością po pierwszej terapii "3+7" liczbę blastów >5% stwierdzono u 15 pacjentów (68,2%), natomiast u 7 osób (31,8%) odsetek ten był niższy (**tabela 23**). W momencie wczesnej oceny (+7 do +10 doba po chemioterapii indukującej remisję) wyższy odsetek komórek blastycznych (powyżej 5%) częściej obserwowano u pacjentów z opornością po I indukcji niż u osób osiągających remisję całkowitą ( $p < 0,05$ ).

Liczba komórek blastycznych w <sup>1</sup> t=1	Oporność po leczeniu n=22	Remisja całkowita po leczeniu n=34	Test chi-kwadrat z poprawką Yatesa <sup>2</sup>		
	n (%)	n (%)	chi <sup>2</sup>	<sup>3</sup> df	p
do 5%	7 (31,8)	29 (85,3)	14,39	1	0,00015
powyżej 5%	15 (68,2)	5 (14,7)			

<sup>1</sup> t=1 - czas przeprowadzenia oceny przypadającej pomiędzy 7 a 10 dobą po zakończeniu terapii indukującej remisję

<sup>2</sup> Test chi-kwadrat z poprawką Yatesa, stosowano ze względu na niską liczebność grup; pozwala na bardziej „ostrożną ocenę”

<sup>3</sup>df – stopień swobodywartość obliczana ze wzoru:  $df=k-p-1$  (k- ilość klas wziętych do obliczeń, p- ilość parametrów szacowanych z próby)

Tabela 23. Ocena zależności pomiędzy liczbą blastów w czasie t=1, a wynikiem leczenia po zastosowaniu I indukacji remisji

#### 4.1.4.3 Ocena włóknienia

Nasilenie włóknienia ocenianego w trepanobiopsji w momencie postawienia diagnozy i w czasie wczesnej oceny po chemioterpii (+7 do +10 doba po leczeniu) wykazało, że spośród 38 pacjentów (67,9%) u których przed leczeniem nie stwierdzono włóknienia, pojawiło się ono u 4 osób (7,1%) po zastosowaniu leczenia. W grupie 18 chorych (32,1%) z włóknieniem szpiku przed leczeniem, u 4 pacjentów (7,1%) po zastosowanej terapii występowało ono nadal, natomiast u 14 chorych (25%) nie stwierdzono włóknienia ( $p<0,05$ ). (tabela 24)

Włóknienie						
Przed leczeniem		7-10 doba po terapii		Test McNemara		
		bez włóknienia	z włóknieniem	<sup>2</sup> chi <sup>2</sup>	<sup>3</sup> df.	<sup>3</sup> p
bez włóknienia	<sup>1</sup> 38	34	4	4,50	1	<b>0,03389</b>
z włóknieniem	18	14	4			

<sup>1</sup>liczba pacjentów

<sup>2</sup>test chi<sup>2</sup>

<sup>3</sup>df- stopień swobody

Tabela 24. Ocena występowania włóknienia określanego w materiale trepanobiopcyjnym od chorych na ostrą białaczkę szpikową po zastosowaniu terapii indukującej rtemisję.

#### 4.1.4.4 Ocena nasilenia proliferacji komórkowej

Do określenia nasilenia proliferacji komórkowej w grupie ocenianych pacjentów wykorzystano oznaczenia antygenu Ki67. Jego ekspresję stwierdzano średnio w 39,2±27,9% ocenianych komórek (mediana 40) (**tabela 25**).

Płeć	<sup>1</sup> Antygen Ki67						
	<sup>2</sup> czas oceny	n	Średnia (%)	Mediana	Min.	Maks.	<sup>3</sup> SD
Kobiety	t=0	30	40,0	40,0	0,0	90,0	27,6
mężczyźni	t=0	26	38,3	40,0	5,0	85,0	28,8
Ogółem	t=0	56	39,2	40,0	0,0	90,0	27,9

<sup>1</sup> określany w preparacie histologicznym szpiku barwionym immunohistochemicznie

<sup>2</sup> t=0 – ocena przy rozpoznaniu

<sup>3</sup> odchylenie standardowe

Tabela 25. Ocena występowania antygeny Ki67 szpiku przy rozpoznaniu ostrej białaczki szpikowej przeprowadzona w materiale trepanobiopcyjnym

W okresie wczesnej oceny po chemioterapii (+7 do + 10 doba po leczeniu) ekspresję antygeny Ki67 stwierdzano średnio w 21,8±25,3% ocenianych komórek (mediana 10). W porównaniu ekspresji Ki67 w dwóch przedziałach czasowych przyjętych w pracy - w okresie po chemioterapii - stwierdzono istotnie niższe wartości w porównaniu z okresem sprzed leczenia ( $p < 0,05$ ) (tabela 26).

Płeć	<sup>1</sup> Antygen Ki67						
	<sup>2</sup> czas oceny	N	Średnia (%)	Mediana	Min.	Maks.	<sup>3</sup> SD
Kobiety	t=1	30	20,5	5,0	0,0	90,0	26,8
mężczyźni	t=1	26	23,3	20,0	0,0	80,0	23,9
Ogółem	t=1	56	21,8	10,0	0,0	90,0	25,3

<sup>1</sup> określany w preparacie histologicznym szpiku barwionym immunohistochemicznie

<sup>2</sup> t=1 - czas przeprowadzenia oceny przypadającej pomiędzy 7 a 10 dobą po zakończeniu terapii indukującej remisję

<sup>3</sup> odchylenie standardowe

Tabela 26. Ocena występowania antygeny Ki67 w 7 - 10 dobie po zakończeniu chemioterapii indukującej remisję w materiale trepanobiopcyjnym od chorych na ostrą białaczkę szpikową

Szczegółowa ocena częstości osiągnięcia remisji w zależności od nasilenia proliferacji, określanej wartością ekspresji Ki67 w trepanobiopsatach w okresie od +7 do +10 doby po chemioterapii indukującej remisję wykazała, że w grupie 34 chorych z CR po I indukcji u 30 pacjentów (88,2%) uzyskana wartość była niższa niż 30%, a u pozostałych 4 osób, odsetek niedojrzałych komórek był wyższy od przyjętej granicznej wartości 30%, natomiast u 22 osób z opornością po terapii „3+7” ekspresja Ki67 dla wartości powyżej i poniżej 30% dotyczyła po 11 osób (50%) w każdym z wyznaczonych przedziałów. W momencie wczesnej oceny wyższy wskaźnik proliferacji komórkowej (powyżej 30%) częściej obserwowano u pacjentów z opornością po I indukcji niż u osób osiągających remisję całkowitą, a stwierdzona różnica była istotna statystycznie ( $p < 0,05$ ) (**tabela 27**).

Liczba komórek Ki67 dodatnich <sup>1</sup> t=1	Oporność po leczeniu n=22	Remisja całkowita po leczeniu n=34	Test chi-kwadrat z poprawką Yatesa <sup>2</sup>		
	n (%)	n (%)	chi <sup>2</sup>	<sup>3</sup> df	P
do 30%	11 (50,0)	30 (88,2)	8,10	1	0,00442
Powyżej 30%	11 (50,0)	4 (11,8)			

<sup>1</sup> t=1 - czas przeprowadzenia oceny przypadającej pomiędzy 7 a 10 dobą po zakończeniu terapii indukującej remisję

<sup>2</sup> Test chi-kwadrat z poprawką Yatesa, stosowano ze względu na niską liczebność grup; pozwala na bardziej „ostrożną ocenę”

<sup>3</sup>df – stopień swobodywartość obliczana ze wzoru:  $df = k - p - 1$  (k- ilość klas wziętych do obliczeń, p- ilość parametrów szacowanych z próby)

Tabela 27. Ocena zależności pomiędzy liczbą komórek o fenotypie Ki67 w czasie t=1, a wynikiem leczenia po zastosowaniu I indukcji remisji

#### 4.1.4.5 Analiza zawartości komórek o fenotypie CD34<sup>+</sup>

W przeprowadzonych badaniach określano także zawartość komórek o fenotypie CD34<sup>+</sup>. Średnia wartość w chwili postawienia rozpoznania wynosiła 33,9±32,6% (mediana 25%) (tabela 28).

Płeć	<sup>1</sup> Antygen CD34						
	<sup>2</sup> czas oceny	N	Średnia (%)	Mediana	Min.	Maks.	<sup>3</sup> SD
Kobiety	t=0	30	33,6	22,5	0,0	90,0	34,9
;mężczyźni	t=0	26	34,1	35,0	0,0	90,0	30,5
Ogółem	t=0	56	33,9	25,0	0,0	90,0	32,6

<sup>1</sup> określany w preparacie histologicznym szpiku barwionym immunohistochemicznie

<sup>2</sup> t=0 – ocena przy rozpoznaniu

<sup>3</sup> odchylenie standardowe

Tabela 28. Ocena występowania komórek z antygenem CD34 przy rozpoznaniu ostrej białaczki szpikowej przeprowadzona w materiale trepanobiopcyjnym

Odsetek komórek z antygenem CD34<sup>+</sup> w okresie od 7 do 10 doby po chemioterapii wyniósł średnio 18±29% (mediana 2%). W porównaniu z okresem ustalania rozpoznania ostrej białaczki szpikowej, wartości te były niższe (p<0,05) (tabela 29).



Płeć	<sup>1</sup> Antygen CD34						
	<sup>2</sup> czas oceny	n	Średnia (%)	Mediana	Min.	Maks.	<sup>3</sup> SD
Kobiety	t=1	30	20,9	1,0	0,0	100,0	35,0
Mężczyźni	t=1	26	14,7	6,0	0,0	75,0	20,2
Ogółem	t=1	56	18,0	2,0	0,0	100,0	29,0

<sup>1</sup> określany w preparacie histologicznym barwionym immunohistochemicznie

<sup>2</sup>t=1 - czas przeprowadzenia oceny przypadającej pomiędzy 7 a 10 dobą po zakończeniu terapii indukującej remisję

<sup>3</sup> odchylenie standardowe

Tabela 29. Ocena występowania antygenu CD34 w czasie od 7 do 10 doby po zakończeniu chemioterapii indukującej remisję w materiale trepanobiopcyjnym od chorych na ostrą białaczkę szpikową

Ocena częstości osiągnięcia remisji w zależności od odsetka komórek CD34<sup>+</sup> stwierdzanych w ocenie trepanobiopciatów w okresie od +7 do +10 doby po chemioterapii wykazała, że w grupie 34 chorych z CR po I indukcji u 28 pacjentów liczba komórek CD34<sup>+</sup> była niższa niż 5%, a u pozostałych 6 osób odsetek ten był >5%. U 22 osób z opornością po terapii „3+7” liczbę komórek CD34<sup>+</sup> powyżej 5% w ocenianym przedziale czasowym, stwierdzono u 16 pacjentów (72,7%), a u 6 osób (27,3%) odsetek ten był niższy. W momencie przeprowadzania wczesnej oceny (+7 do +10 doba po leczeniu), wyższy niż 5% odsetek komórek CD34<sup>+</sup> częściej obserwowano u pacjentów z opornością po I indukcji niż u osób osiągających remisję całkowitą; a stwierdzone różnice były istotne statystycznie (p<0,05) (**tabela 30**).

Liczba komórek blastycznych o fenotypie CD34 <sup>+</sup> w <sup>1</sup> t=1	Oporność po leczeniu n=22	Remisja całkowita po leczeniu n=34	Test chi-kwadrat z poprawką Yatesa <sup>2</sup>		
	n (%)	n (%)	chi <sup>2</sup>	<sup>3</sup> df	p
do 5%	6 (27,3)	28 (88,4)	14,76	1	0,00012
Powyżej 5%	16 (72,7)	6 (17,6)			

<sup>1</sup> t=1 - czas przeprowadzenia oceny przypadającej pomiędzy 7 a 10 dobą po zakończeniu terapii indukującej remisję

<sup>2</sup> Test chi-kwadrat z poprawką Yatesa, stosowano ze względu na niską liczebność grup; pozwala na bardziej „ostrożną ocenę”

<sup>3</sup>df – stopień swobodywartość obliczana ze wzoru:  $df=k-p-1$  (k- ilość klas wziętych do obliczeń, p- ilość parametrów szacowanych z próby)

Tabela 30. Ocena zależności pomiędzy liczbą komórek o fenotypie CD34<sup>+</sup> w czasie t=1, a wynikiem leczenia po zastosowaniu I indukcji remisji

#### 4.1.4.6 Analiza zawartości komórek o fenotypie CD117<sup>+</sup>

W badanym materiale trepanobiopiatycznym w okresie przedleczeniem stwierdzono występowanie 47,5±32,8% (mediana 40%) komórek o fenotypie CD117<sup>+</sup>(tabela 31).

Płeć	<sup>1</sup> Antygen CD117						
	<sup>2</sup> czas oceny	N	Średnia (%)	Mediana	Min.	Maks.	<sup>3</sup> SD
Kobiety	t=0	30	42,2	37,5	0,0	90,0	33,6
mężczyźni	t=0	26	53,7	45,0	0,0	100,0	31,3
Ogółem	t=0	56	47,5	40,0	0,0	100,0	32,8

<sup>1</sup> określany w preparacie histologicznym szpiku barwionym immunohistochemicznie

<sup>2</sup> t=0 – ocena przy rozpoznaniu

<sup>3</sup> odchylenie standardowe

Tabela 31. Ocena występowania komórek z antygenem CD117 przy rozpoznaniu ostrej białaczki szpikowej przeprowadzona w materiale trepanobiopcyjnym

W analizie liczby komórek o fenotypie CD117<sup>+</sup>, we wczesnym okresie po terapii stwierdzano średnio 20,1±31,1% (mediana 3) tych komórek. W porównaniu z okresem sprzed leczenia wartości te były niższe, a różnice te wykazywały znamienność statystyczną (p<0,05) (**tabela 32**).

Płeć	<sup>1</sup> Antygen CD117						
	<sup>2</sup> czas oceny	N	Średnia (%)	Mediana	Min.	Maks.	<sup>3</sup> SD
Kobiety	t=1	30	19,7	2,0	0,0	100,0	34,0
mężczyźni	t=1	26	20,6	5,0	0,0	80,0	28,0
Ogółem	t=1	56	20,1	3,0	0,0	100,0	31,1

<sup>1</sup> określany w preparacie histologicznym szpiku barwionym immunohistochemicznie

<sup>2</sup>t=1 - czas przeprowadzenia oceny przypadającej pomiędzy 7 a 10 dobą po zakończeniu terapii indukującej remisję

<sup>3</sup> odchylenie standardowe

Tabela 32. Ocena występowania komórek z antygenem CD117 w 7 - 10 dobie po zakończeniu chemioterapii indukującej remisję w materiale trepanobioptycznym od chorych na ostrą białaczkę szpikową

Ocena częstości osiągnięcia remisji w zależności od odsetka komórek CD117<sup>+</sup> stwierdzanych w ocenie trepanobioptatów w okresie od +7 do + 10 doby po chemioterapii indukującej remisję wskazała, że w grupie 34 chorych z CR po I indukcji u 27 pacjentów liczba komórek CD117<sup>+</sup> była niższa niż 5%, a u pozostałych 7 osób była wyższa (p<0,05). U 22 osób z opornością po terapii „3+7” liczbę komórek CD117<sup>+</sup> powyżej 5% stwierdzono u 14 pacjentów, a u 8 osób odsetek ten był niższy niż 5%. W momencie wczesnej oceny zwiększony odsetek komórek CD117<sup>+</sup> (powyżej 5%) częściej obserwowano u pacjentów z opornością po I indukcji aniżeli u osób osiągających remisję całkowitą (p<0,05) (**tabela 33**).

Liczba komórek blastycznych o fenotypie CD117 <sup>+</sup> w <sup>1</sup> t=1	Oporność po leczeniu n=22	Remisja całkowita po leczeniu n=34	Test chi-kwadrat z poprawką Yatesa <sup>2</sup>		
	n (%)	n (%)	chi <sup>2</sup>	<sup>3</sup> df	p
do 5%	8 (36,4)	27 (79,4)	8,8	1	0,0031
Powyżej 5%	14 (63,3)	7 (20,6)			

<sup>1</sup> t=1 - czas przeprowadzenia oceny przypadającej pomiędzy 7 a 10 dobą po zakończeniu terapii indukującej remisję

<sup>2</sup> Test chi-kwadrat z poprawką Yatesa, stosowano ze względu na niską liczebność grup; pozwala na bardziej „ostrożną ocenę”

<sup>3</sup>df – stopień swobodywartość obliczana ze wzoru:  $df=k-p-1$

gdzie:

k - ilość klas wziętych do obliczeń,

p - ilość parametrów szacowanych z próby

(jeżeli badamy zgodność rozkładu z rozkładem normalnym, wtedy rozkład możemy wyestymować z dwóch parametrów: średniej i odchylenia standardowego).

Tabela 33. Ocena zależności pomiędzy liczbą komórek o fenotypie CD117<sup>+</sup> w czasie t=1, a wynikiem leczenia po zastosowaniu I indukcji remisji

#### 4.1.4.7 Ocena angiogenezy

W ocenie angiogenezy określanej liczbą naczyń na milimetr kwadrat w preparatach histologicznych szpiku w momencie diagnozy ostrej białaczki wykazano średnie wartości analizowanego parametru  $16,5 \pm 23,4$  (mediana 9,50) (**tabela 34**)

Płeć	<sup>1</sup> Angiogeneza						
	<sup>2</sup> czas oceny	n	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	<sup>3</sup> SD
Kobiety	t=0	30	18,30	8,50	0,00	95,00	26,49
mężczyźni	t=0	26	14,42	10,00	0,00	95,00	19,66
Ogółem	t=0	56	16,5	9,5	0,0	95,0	23,4

<sup>1</sup> określana w preparacie histologicznym szpiku na podstawie analizy obecności antygenu CD34

<sup>2</sup> t=0 – ocena przy rozpoznaniu

<sup>3</sup> odchylenie standardowe

Tabela 34. Ocena angiogenezy szpiku przy rozpoznaniu ostrej białaczki szpikowej przeprowadzona w materiale trepanobiopcyjnym

W ocenie angiogenezy w trepanobiopciach we wczesnym okresie po chemioterapii (+7 do +10 doba po leczeniu) średnia wartość analizowanego parametru wyniosła  $11,5 \pm 17,2$ . Nasilenie angiogenezy u wszystkich pacjentów było wyższe w momencie rozpoznania AML niż po zastosowanej chemioterapii - różnica ta była istotna statystycznie ( $p < 0,05$ ) (tabela 35).

Płeć	<sup>1</sup> Angiogeneza						
	<sup>2</sup> czas oceny	n	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	<sup>3</sup> SD
Kobiety	t=1	30	12,37	6,00	0,00	77,00	18,45
mężczyźni	t=1	26	10,50	4,00	0,00	65,00	15,92
Ogółem	t=1	56	11,5	5,5	0,0	77,0	17,2

<sup>1</sup>określana w preparacie histologicznym szpiku na podstawie analizy obecności antygenu CD34

<sup>2</sup>t=1 - czas przeprowadzenia oceny przypadającej pomiędzy 7 a 10 dobą po zakończeniu terapii indukującej remisję

<sup>3</sup> odchylenie standardowe

Tabela 35. Ocena angiogenezy szpiku u chorych na ostrą białaczkę szpikową w 7 - 10 dobie po zakończeniu chemioterapii indukującej remisję

W grupie 34 pacjentów z remisją całkowitą po I indukcji, nasilenie angiogenezy wynosiło średnio 11,1±18,5 (mediana 0,0), a u chorych z opornością kształtowało się na poziomie 12,2±15,4 (mediana 8,0). Poziom nasilenia angiogenezy był wyższy u pacjentów ze stwierdzoną opornością niż u pacjentów osiągających remisję całkowitą, jednakże różnica ta nie była istotna statystycznie ( $p>0,05$ ) (tabela 36).

Ocena po zastosowaniu po I indukcji	Angiogeneza							
	N	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	<sup>1</sup> SD	<sup>2</sup> Z.	<sup>3</sup> p
Oporność	22	12,25	8,0	0,0	60,0	15,4	1,42	0,15561
Remisja całkowita	34	11,1	0,0	0,0	77,0	18,5		

<sup>1</sup> odchylenie standardowe

<sup>2</sup> test Manna-Whitneya

<sup>3</sup> prawdopodobieństwo

Tabela 36. Ocena nasilenia angiogenezy w materiale trepanobiopcyjnym u chorych na ostrą białaczkę szpikową ze stwierdzoną opornością oraz osiągających remisję całkowitą po zastosowaniu I indukcji.

## 4.2 Ocena wyników leczenia w analizowanej grupie chorych

Po leczeniu indukującym remisję całkowitą stwierdzono u 46 osób co stanowi, 82,14% analizowanych chorych (**tabela 37**).

<b>Remisja całkowita</b>	<b>kobiety</b>	<b>mężczyźni</b>	<b>Ogółem</b>
	n (%)	n (%)	n (%)
tak, po I indukcji	19 (63,3)	15 (57,7)	34 (60,7)
tak, po II indukcji	5 (16,7)	7 (26,9)	12 (21,4)

Tabela 37. Liczba pacjentów z remisją całkowitą po zastosowaniu I i II indukcji.

Po pierwszej kuracji „3+7” remisję całkowitą stwierdzono u 34 osób (u 19 kobiet i u 15 mężczyzn), kolejne 12 osób (5 kobiet i 7 mężczyzn) uzyskało CR po II indukcji. U 10 chorych (17,86%) wystąpiła oporność na zastosowaną terapię (**tabela 38, 39**).

<b>Ocena wyników leczenia</b>	<b>kobiety</b>	<b>mężczyźni</b>	<b>Ogółem</b>
	n (%)	n (%)	n (%)
CR <sup>1</sup>	19 (63,3)	15 (57,7)	34 (60,8)
PR <sup>2</sup>	3 (10,0)	1 (3,8)	4 (7,1)
Oporność	8 (26,7)	10 (38,5)	18 (32,1)

<sup>1</sup>CR – remisja całkowita

<sup>2</sup>PR – remisja częściowa

Tabela 38. Ocena wyników leczenia po zastosowaniu I indukcji remisji



<b>Ocena wyników leczenia</b>	<b>kobiety</b>	<b>mężczyźni</b>	<b>Ogółem</b>
	n (%)	n (%)	n (%)
Oporność	8 (26,7)	10 (38,5)	18 (32,1)

Tabela 39. Oporność na zastosowaną terapię „3+7” w leczeniu indukującym remisję

W oparciu o przeprowadzoną przed leczeniem analizę profilu ryzyka cytogenetyczno-molekularnego większość pacjentów (71,43%) została wstępnie zakwalifikowana do przeprowadzenia w przyszłości wysokodawkowej chemioterapii wspomaganą przeszczepieniem komórek krwiotwórczych. Podjęcie takiej formy terapii planowano u 40 osób (19 kobiet i 21 mężczyzn) (**tabela 40**).

<b>Kwalifikacja do transplantacji komórek hematopoetycznych</b>	<b>kobiety</b>	<b>mężczyźni</b>	<b>Ogółem</b>
	n (%)	n (%)	n (%)
Nie	11 (36,7)	5 (19,2)	16 (28,6)
Tak	19 (63,3)	21 (80,8)	40 (71,4)

Tabela 40. Pacjenci kwalifikowani do transplantacji komórek krwiotwórczych

### 4.3 Analiza wpływu pojedynczych czynników na uzyskanie CR

#### 4.3.1 Analiza czynników predykcyjnych osiągnięcia remisji całkowitej po I kuracji indukującej remisję u chorych z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej

Stwierdzono, że każdy z ocenianych czynników - liczba komórek blastycznych, a w zakresie oznaczeń immunohistochemicznych: odsetek komórek CD34<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup> i Ki67 - są istotnymi statystycznie ( $p < 0,05$ ) (**tabela 41**) czynnikami predykcyjnymi osiągnięcia remisji całkowitej. Ponadto, stwierdzono, że u pacjentów z wyższym odsetkiem mieloblastów, prawdopodobieństwo niepowodzenia terapii było ponad 12-krotnie większe niż u chorych z niższą niż 5% liczbą niedojrzałych komórek. Natomiast w odniesieniu do wysokiego odsetka komórek CD117<sup>+</sup>, prawdopodobieństwo niepowodzenia terapii zwiększało się prawie 7-krotnie (6,7 razy), a wysoki indeks Ki67 zmniejszał szansę uzyskania remisji całkowitej około 7,5-krotnie.

Czynnik	<sup>1</sup> OR	<sup>2</sup> -95% CI	+95% CI	chi <sup>2</sup> Walda <sup>3</sup>	P
CD117	6,75	1,97	23,09	9,69	0,00186
CD34	12,44	3,33	46,45	14,73	0,00012
Ki67	7,50	1,91	29,44	8,73	0,00314
Blasty	12,43	3,27	47,28	14,30	0,00016

<sup>1</sup> OR - (ang. Odds Ratio)- iloraz szans (stosunek szansy wystąpienia danego zdarzenia w danej grupie do wystąpienia tego samego zdarzenia w innej porównywanej grupie)

<sup>2</sup> ±95% CI – 95% przedział ufności

<sup>3</sup>chi<sup>2</sup>Walda – test chi- kwadrat Walda (test sprawdzający istotność statystyczną współczynnika regresji dla modeli nieliniowych)

Tabela 41. Analiza jednoczynnikowa w odniesieniu do liczby komórek z antygenem CD117<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, Ki67<sup>+</sup> oraz ogólnej liczby blastów a szansa uzyskania remisji całkowitej

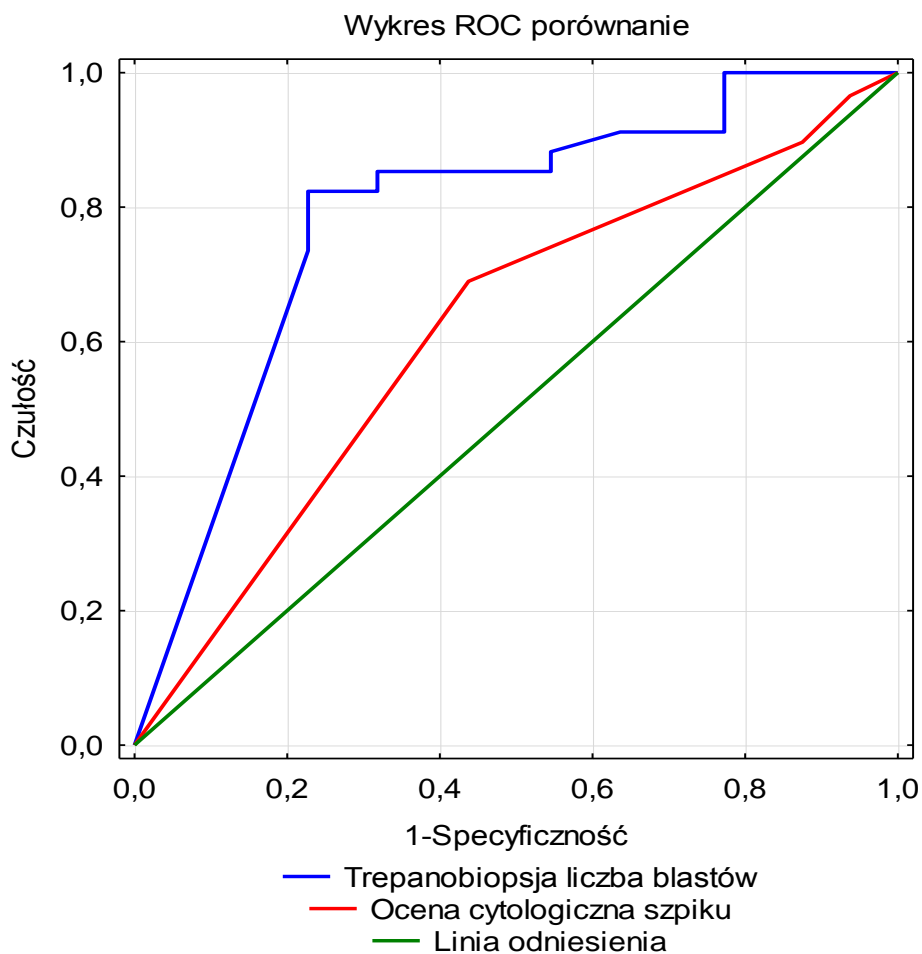
### 4.3.2 Analiza krzywych ROC

Krzywa ROC wykorzystywana jest jako narzędzie do oceny i porównania modeli klasyfikacyjnych. Miarą trafności danego modelu, obok kształtu i przebiegu krzywej ROC, jest wskaźnik AUC wyznaczający pole pod wykresem krzywej ROC. Wyniki porównania dwóch krzywych ROC opisano za pomocą wskaźnika AUC wraz z odchyleniem standardowym i 95% przedziałem ufności oraz statystyki Z i poziomu p, za istotną statystycznie przyjęto wartość  $p < 0,05$ .

Przeprowadzono analizę porównania wyników trepanobiopsji i oceny cytologicznej szpiku w zakresie parametru: „liczba blastów” - wyznaczone wielkości pól AUC są większe dla trepanobiopsji niż dla oceny cytologicznej szpiku (0,785 vs 0,617),  $p < 0,05$ . (**Tabela 42, wykres 1**).

Liczba blastów	AUC	Odch. std.	Ufność - 95%	Ufność + 95%	Z	p
Trepanobiopsja	0,785	0,066	0,656	0,915	-2,74	0,006 1
Ocena cytologiczna szpiku	0,617	0,089	0,444	0,791		

Tabela 42. Wyniki krzywej ROC dla oceny liczby blastów

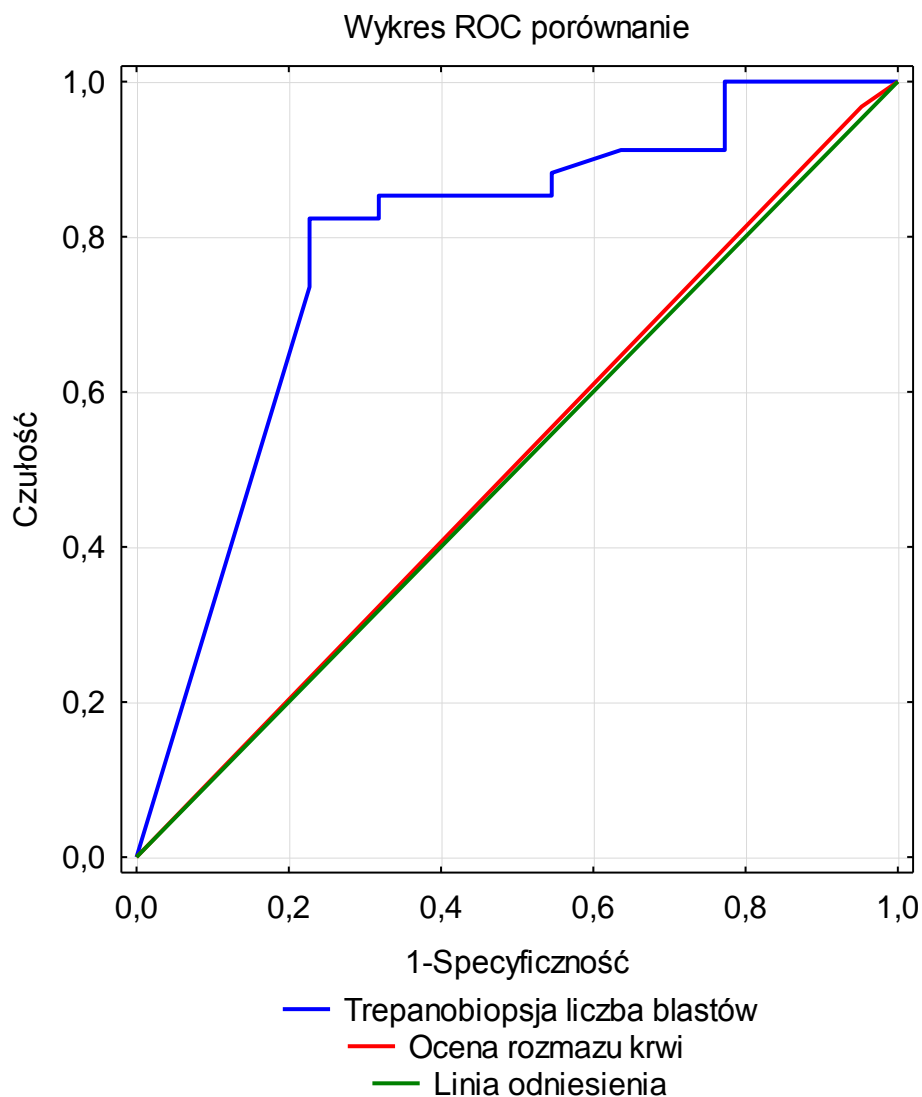


Wykres 1. Krzywe ROC – parametr „liczba blastów” - porównanie trepanobiopsji i oceny cytologicznej szpiku

Przeprowadzono również analizę porównania trepanobiopsji i rozmazu krwi w zakresie parametru: „liczba blastów” - wyznaczone wielkości pól AUC są większe dla trepanobiopsji niż dla rozmazu krwi (0,785 vs 0,508), ( $p < 0,05$ ) (**Tabela 43, wykres 2**).

Liczba blastów	AUC	Odch. std.	Ufność - 95%	Ufność + 95%	Z	p
Trepanobiopsja	0,785	0,066	0,656	0,915	-4,82	0,0000
Rozmaz krwi	0,508	0,083	0,346	0,670		

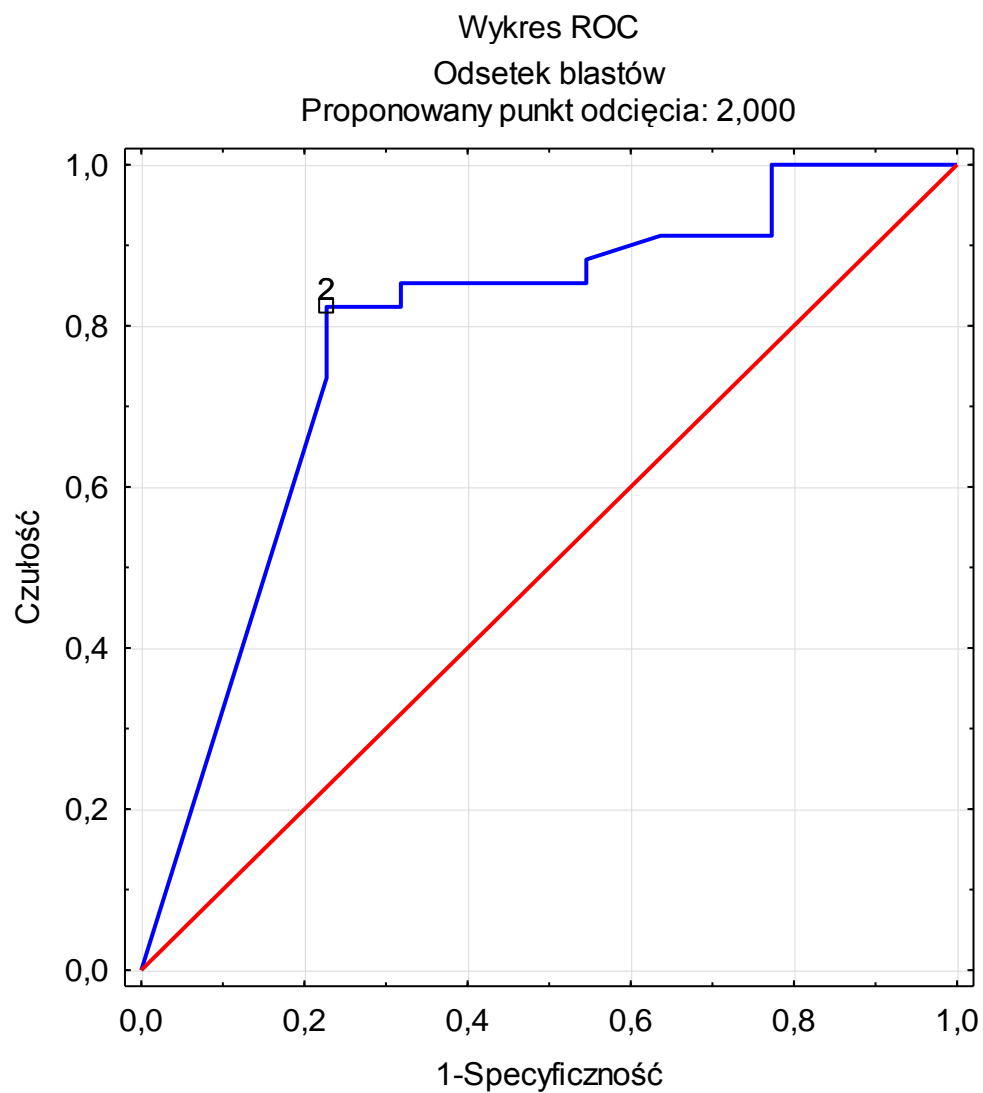
Tabela 43. Wyniki krzywej ROC dla parametru „liczba blastów” dla trepanobiopsji i rozmazu krwi



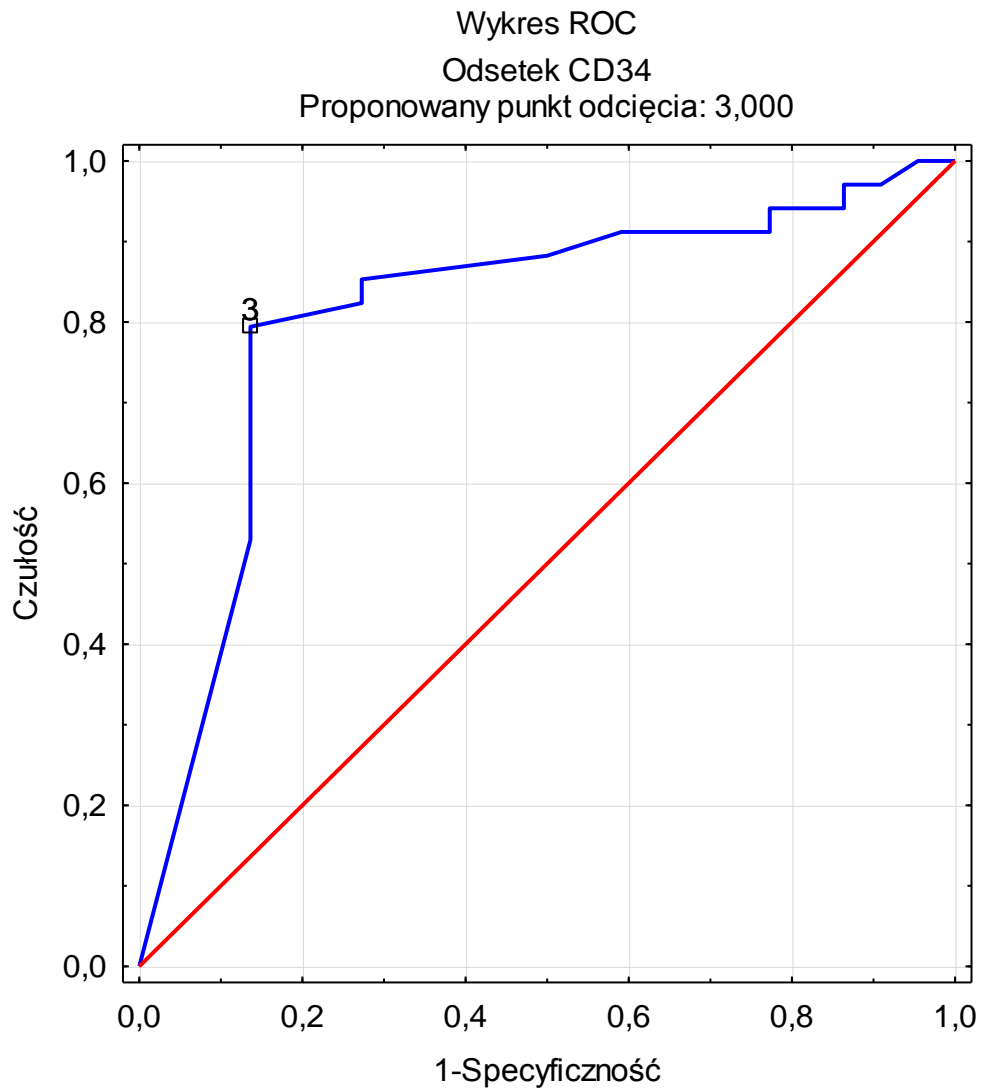
Wykres 2. Krzywe ROC – parametr „liczba blastów” - porównanie trepanobiopsji i oceny rozmazu krwi.

Analiza krzywej ROC pozwoliła na wyznaczenie optymalnych punktów odcięcia dla poszczególnych ocenianych zmiennych – liczby blastów, komórek CD34<sup>+</sup>, Ki67<sup>+</sup> i CD117<sup>+</sup>. Punkty te, zdefiniowano jako wartość dzielącą badanych chorych na dwie grupy – z remisją i bez remisji po zastosowanej kuracji indukującej remisję. Wyznaczone graniczne wartości dla czasu t=1 (7-10 dni po zakończeniu terapii) przy poziomie istotności  $\alpha=0,05$  wynosiły odpowiednio 2% dla odsetka blastów, 3% dla komórek ofenotypie CD34<sup>+</sup> i 15% dla Ki67<sup>+</sup>. Czulość oznaczeń przy progu 5% - dla blastów wyniosła 0,853, dla CD34<sup>+</sup> 0,824, natomiast dla wartości 30% komórek Ki67<sup>+</sup> - 0,882. W punktach wyznaczonych krzywą ROC, czulość dla blastów przy liczbie 2% wyniosła

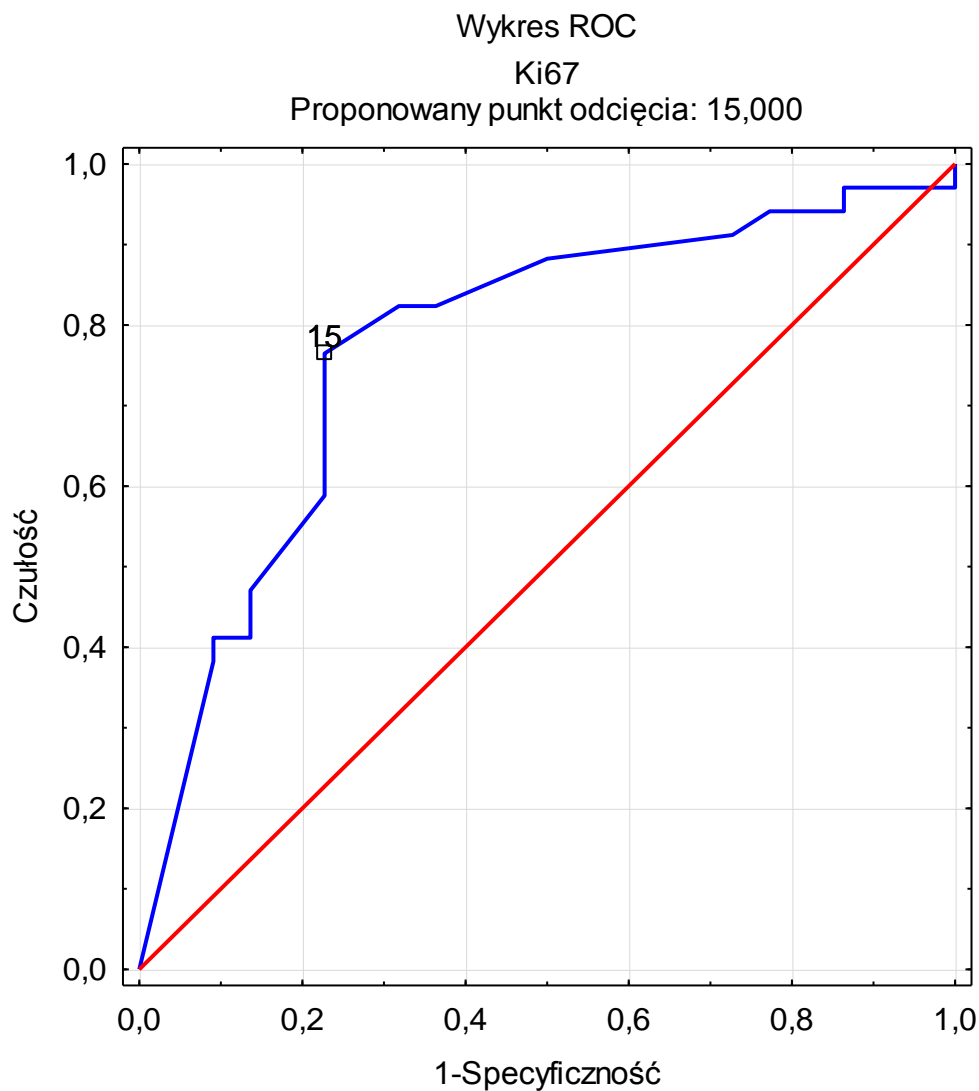
0,824, dla 3% CD34<sup>+</sup> 0,794, a dla 15% komórek Ki 67<sup>+</sup> - 0,765. (wykres 3, wykres 5, wykres 6).



Wykres 3. Krzywa ROC wraz z wyznaczonym punktem odniesienia dla odsetka blastów.



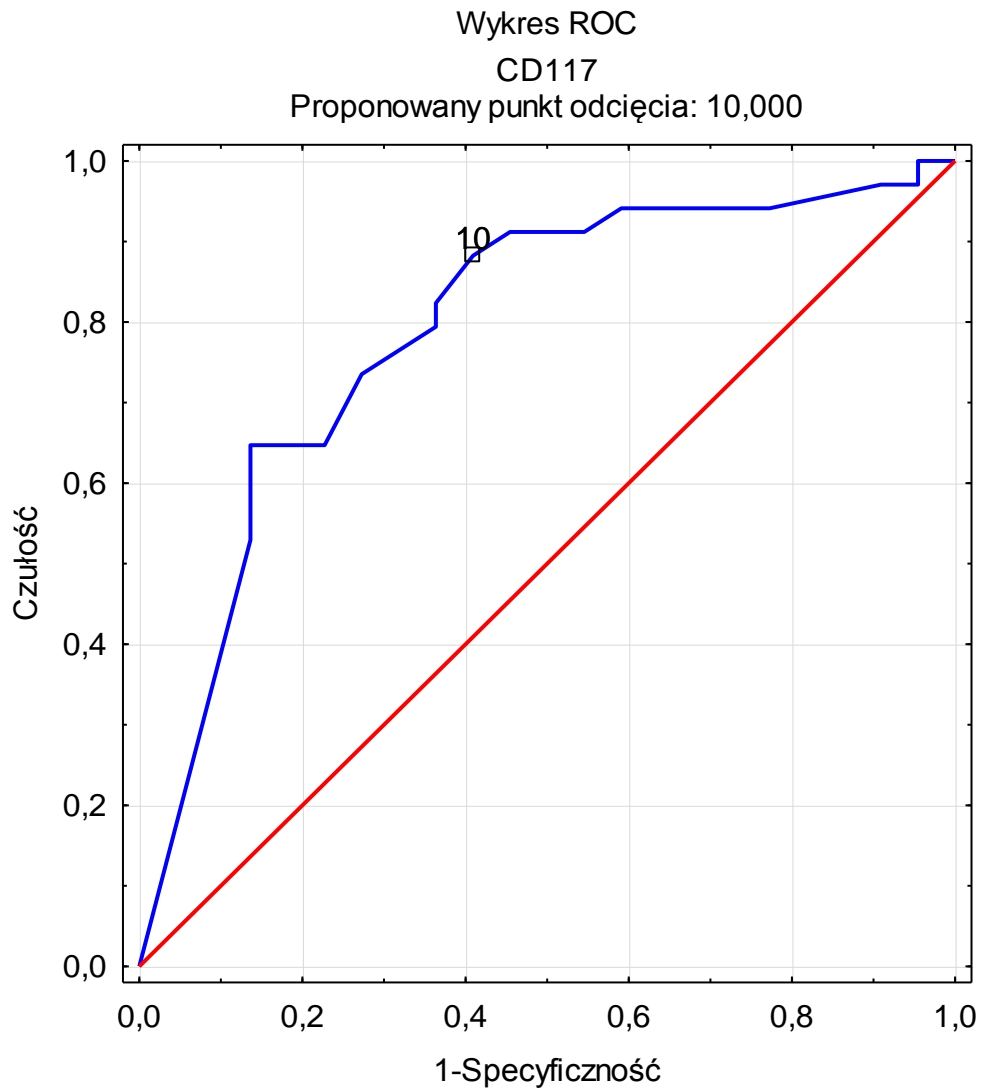
Wykres 5. Krzywa ROC wraz z wyznaczonym punktem odniesienia dla odsetka CD34.



Wykres 6. Krzywa ROC wraz z wyznaczonym punktem odniesienia dla odsetka Ki67

W przypadku antygenu CD117 wyznaczony próg wyniósł 10%, co oznacza, że zastosowane w pracy wartości 5% charakteryzowały się mniejszą czułością (0,794 vs 0,882), natomiast pozostały porównywalne między sobą pod względem swoistości. (wykres 4)





Wykres 4. Krzywa ROC wraz z wyznaczonym punktem odniesienia dla odsetka CD117.

## 5. Omówienie wyników badań

Ostra białaczka szpikowa charakteryzuje się dużą śmiertelnością i chociaż jest chorobą wyleczalną, to proces terapeutyczny należy do długotrwałych i obciążonych ryzykiem wystąpienia wielu potencjalnie zagrażających życiu powikłań.

Rozpoznanie AML u większości chorych nie sprawia trudności – najczęściej już sam obraz kliniczny wsparty tylko rozmazem krwi obwodowej zazwyczaj wystarcza do postawienia właściwej diagnozy. [131] Tym niemniej, wg danych literaturowych, nawet u ok. 75% chorych z rozpoznaniem AML nie towarzyszy leukocytoza, a liczba białychkrwinek pozostaje w przedziale wartości prawidłowych lub niskich. W tej grupie pacjentów rozpoznanie przysparza największych trudności, a związane jest to głównie z relatywnie niespecyficznym obrazem klinicznym. [131,139]

Od wielu lat próbuje się ustalić jednolite standardy w zakresie optymalnego sposobu diagnostyki. Podkreśla się, że zwłaszcza w przypadku istnienia rozbieżności oceny morfologicznej krwi i szpiku, to wątpliwości te można rozstrzygnąć badaniem trepanobiopcyjnym. [69] Rola TB wzrasta na dalszych etapach terapii AML, zwłaszcza w kontekście jednoznacznych zaleceń towarzystw naukowych rekomendujących wykonywanie oceny aktywności choroby na wczesnym etapie po zakończeniu terapii. Okres ten, laboratoryjnie charakteryzuje się zazwyczaj pancytopenią, stąd potrzeba zastosowania odpowiedniego narzędzia diagnostycznego. [69] Pullarkat i Aldoss podjęli się przeglądu systematycznego metod diagnostycznych i postępowania terapeutycznego u chorych z AML na wczesnym etapie po kuracji indukującej remisję. Przeprowadzona analiza stosowanych narzędzi diagnostycznych dość jednoznacznie wskazuje na TB jako na badanie dostarczające najwięcej i najbardziej kompleksowych oraz wiarygodnych informacji. [132]

W niniejszej pracy podjęto próbę określenia znaczenia oceny materiału pozyskanego drogą TB w diagnostyce ostrych białaczek szpikowych.

Analizowana grupa pacjentów prezentowała liczne odchylenia w badaniach laboratoryjnych. Stwierdzone nieprawidłowości są dość charakterystycznym obrazem zaburzeń występujących u chorych z ostrą białaczką szpikową. Do rutynowo wykonywanych oznaczeń laboratoryjnych w AML należą - LDH, kwas moczowy,

kreatynina, elektrolity, białko C, które służą do oceny bieżącego stanu metabolicznego pacjenta.

Komórkowość szpiku w grupie analizowanych chorych zmieniała się w czasie – zmniejszała się po chemioterapii w porównaniu do czasu diagnozy. Zjawisko supresji szpiku kostnego po zastosowaniu cytostatyków jest powszechnie znane zarówno w hematologii jak i w onkologii. W odniesieniu do chorych z rozpoznaniem AML nadir w zakresie parametrów morfologii krwi występuje zazwyczaj około 7 doby po zakończeniu chemioterapii i utrzymuje się zazwyczaj przez kolejnych 7 dni. Istnieje grupa czynników, które potencjalnie mogą wydłużyć okres cytopenii- należą do nich między innymi infekcje (wirusowe, bakteryjne lub grzybicze) oraz niektóre leki. Morfologicznym wykładnikiem zmniejszenia komórkowości szpiku są nieprawidłowości stwierdzane w badaniach laboratoryjnych – niedokrwistość, małopłytkowość i neutropenia. Za okres regeneracji szpiku po chemioterapii przyjmuje się czas około trzech tygodni, choć już od około 14 dnia po zastosowaniu cytostatyków odnotowano niewielki wzrost w zakresie parametrów laboratoryjnych z towarzyszącym obrazem zmian regeneracyjnych w ocenie histologicznej szpiku. [65,140]

Analiza liczby komórek blastycznych należy do podstawowych badań wykonywanych w diagnostyce i monitorowaniu leczenia ostrej białaczki szpikowej. W momencie diagnozy choroby każda z dostępnych metod jest równie dobra - rozmaz krwi, badanie cytologiczne szpiku, cytometria i ocena trepanobiopatyka- wszystkie one dostarczają zbliżonych informacji, choć powinny być analizowane wspólnie. [131] Preferencje co do wyboru metody w momencie wczesnej oceny po kuracji indukującej wskazują na trepanobiopsję jako metodę dostarczającą precyzyjniejszych informacji w porównaniu do oceny cytologicznej szpiku (krzywa ROC). [69] Chociaż w dostępnym piśmiennictwie autorzy zgodnie podkreślają konieczność wczesnej oceny i w oparciu o jej wynik podejmowaniu dalszych decyzji terapeutycznych, to z drugiej strony brakuje jasnych standardów zarówno co do proponowanego czasu jak i materiału i metod oceny. [139,132,133] Najczęściej proponuje się wykonywanie oceny około 7-10 doby po kuracji indukującej, a większość autorów przyjmuje za kryterium remisji odsetek 5% mieloblastów. Znaczna redukcja w zakresie liczby młodych komórek świadczy o zamierzonym efekcie terapii i jest dobrym prognostykiem uzyskania remisji, redukcja ilości mieloblastów w niewielkim stopniu albo brak tejże redukcji to dowód na chorobę

oporną lub przetrwałą. W przypadku stwierdzenia hipoplazji szpiku postuluje się strategię aktywnej obserwacji. [132,141]

Włóknienie jest wynikiem złożonych reakcji cytokinowych i oddziaływań międzykomórkowych. Na przykładach modeli zwierzęcych u myszy wykazano znaczący związek, pomiędzy wzrostem liczby megakariocytów, a pojawieniem się zmian typowych dla mielofibrozy w macierzy szpiku. Etiologia wynikająca z różnic fenotypowych wymaga lepszego zrozumienia poprzez zależności pomiędzy czynnikami wzrostu (przede wszystkim PDGF, TGF $\beta$ 1), megakariocytami, enzymami (oksydaza lizylova), a innymi komponentami niszy szpikowej. [117,118,142] U pacjentów zrozpoznaniem AML włóknienie najczęściej retkulinowe i o niewielkim stopniu nasilenia w momencie postawienia diagnozy może występować nawet 1/3 chorych. Postuluje się istnienie związku pomiędzy wystąpieniem włóknienia w odpowiedzi komórek mikrośrodowiska szpiku na cytokiny wydzielane przez megakariocyty i płytki krwi. W grupie chorych z ostrą białaczką megakariocytową włóknienie szpiku należy do bardzo charakterystycznego obrazu choroby, w przypadku innych podtypów AML spotykane jest rzadziej. Kliniczne znaczenie włóknienia nie jest do końca poznane. [116, 119]

W dostępnych danych literaturowych podkreśla się, że włóknienie – stwierdzone w rozmaitych jednostkach hematologicznych (między innymi w zespołach mielodysplastycznych, przewlekłych nowotworach mieloproliferacyjnych) pogarsza rokowanie – śmiertelność w grupie pacjentów z włóknieniem szpiku jest wyższa niż w grupie bez włóknienia. Już 30 lat temu badając pacjentów z AML Islam i wsp. opisywali redukcję włóknienia u pacjentów po skutecznym leczeniu ostrej białaczki. Tym niemniej proces ustępowania zmian zwłóknieniowych w szpiku wymaga odpowiednio długiego czasu – zachodzi stopniowo i powoli. U większości pacjentów z AML dopiero po zakończeniu leczenia konsolidującego odnotowano istotne zmiany w zakresie redukcji włóknienia. Te wnioski korespondują z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy.

W analizowanej grupie pacjentów u zdecydowanej większości nie odnotowano zmian w ocenie włóknienia, tym niemniej u części chorych osiągających CR parametr ten uległ zmniejszeniu. Natomiast wszyscy chorzy z progresją w zakresie włóknienia zmarli. Mimo wykazania istotności statystycznej w zakresie zmiany włóknienia przed rozpoczęciem leczenia i w czasie wczesnej oceny po chemioterapii, do wyniku należy

podejść w sposób krytyczny w związku z niewielką liczebnością grupy pacjentów u których włóknienie uległo zmianie.

Od wielu lat postuluje się istnienie związku pomiędzy nasileniem angiogenezy a odpowiedzią na zastosowane leczenie u chorych z ostrą białaczką szpikową. [113,116,143] W badaniach własnych nie udowodniono tej zależności. Przeprowadzona analiza nie wykazała istotności statystycznej w zakresie oceny angiogenezy u chorych z AML osiągających remisję, jak i tych, którzy doświadczyli niepowodzenia leczenia. W pracy angiogenezę oceniano w TB uzyskanych przed rozpoczęciem leczenia i w okresie od +7 do +10 doby po podaniu kuracji indukującej wg schematu „3+7”.

Dane dostępne w piśmiennictwie są dość skąpe, ale jednoznaczne – wykazują istnienie związku pomiędzy powstawaniem sieci naczyń w szpiku a aktywnością chorób hematologicznych. [111,115,144]

Do oceny średniej gęstości naczyń postuluje się użycie TB, tomografii komputerowej lub badania jądrowego rezonansu magnetycznego kości. [68,110,111] Ocena angiogenezy w TB, przy użyciu badań immunohistochemicznych (oznaczenie CD34) została przedstawiona w rozdziale 1.6 i 4.1.4.7.

Wg badań przeprowadzonych przez Padro, w grupie chorych z rozpoznaną ostrą białaczką szpikową, gęstość naczyń przed rozpoczęciem leczenia była większa niż w grupie kontrolnej. Tym niemniej, naczynia te charakteryzowały się nieprawidłową morfologią (brak światła, chaotyczny układ komórek). Nie udowodniono związku pomiędzy gęstości naczyń a płcią, wiekiem i wyjściowo stwierdzaną liczbą blastów. Ponadto stwierdzono, że w 16 dobie po włączeniu indukcji ocena angiogenezy zasadniczo różniła się w grupie chorych osiągających CR i tych, którzy doświadczyli niepowodzenia terapii. W tym pierwszym przypadku angiogeneza nie różniła się od wartości stwierdzanych w grupie kontrolnej. Zwiększona angiogeneza w przypadku choroby przetrwałej wynika najprawdopodobniej ze stymulacji tworzenia nowych naczyń przez blasty, z drugiej zaś z mniejszego efektu antyangiogenego chemioterapii. Wykazano równocześnie, że gęstość naczyń oceniona przed leczeniem nie ma związku z CR po leczeniu- nie znaleziono statystycznej istotności między tymi parametrami. [111]

Cały czas podejmowane są kolejne próby ustalenia przydatności wykorzystania angiogenezy jako narzędzia prognostycznego. Badania prowadzone wśród chorych (dorosłych i dzieci) z rozpoznaniem ostrej białaczki wskazują, że w momencie rozpoznania choroby gęstość naczyń w TB u chorych z ALL jest większa niż w grupie z AML, choć różnice te nie są znamienne statystycznie. [110,113,114] Ponadto u dorosłych gęstość naczyń średnio jest 2-3-krotnie większa niż u dzieci- przyczyny tego zjawiska również nie są znane. MVD i indeks proliferacyjny (PI - ang. Proliferation Index) przed rozpoczęciem leczenia wykazuje wyższe wartości w grupie pacjentów z rozpoznaniem białaczki niż w grupie kontrolnej. Nie wykazano związku między MVD i PI w grupach chorych osiągających remisję, z tymi, którzy doświadczyli niepowodzenia leczenia. Fenotyp ostrej białaczki nie miał wpływu na MVD i PI. W odniesieniu do pojedynczego parametru ocena w 28 dobie wykazała redukcję MVD (pacjenci z CR), przeciwny wynik dotyczył PI- nie wykazywał trendu spadkowego i miał wyższą wartość niż w grupie kontrolnej. [110] Naczynia oceniane w okresie CR morfologicznie charakteryzują się szerszym i pustym światłem oraz redukcją komórek endotelialnych. Niektórzy autorzy podkreślają związek angiogenezy z liczbą blastów, zwłóknieniem szpiku, nasileniem niedokrwistości i liczbą PLT. Inni autorzy negują te zależności. [110,114]

Komórki endotelium wpływają na proliferację komórek białaczkowych, które wywierają zwrotny efekt na komórki śródbłonna i ich podziały. W tym oddziaływaniu biorą udział: VEGF, angiopoetyna, GM-CSF, CXCL8 (Il-8) i Il-6. Pomędzy komórkami śródbłonna z blastami AML istnieje pozytywna pętla sprzężenia zwrotnego, co klinicznie przekłada się na oporność lub wznowę choroby. Wzrastający poziom krążących czynników angiogennych koreluje ze wzrostem angiogenezy w szpiku i z wczesną wznową choroby, jak również z wczesną śmiertelnością. [110,116,143,144] W badaniach in vitro wykazano, że współhodowla komórek blastycznych AML z HUVECs powoduje szybszą proliferację blastów i zmniejsza ich wrażliwość na cytostatyki, przede wszystkim na cytarabinę, co stanowi dowód na fakt, że komórki śródbłonna chroniące komórki białaczkowe mogą odpowiadać za niepowodzenie leczenia. [111,115,144] Z dużym prawdopodobieństwem założyć można, że istnieją również pętli autokrynne. Postuluje się obecność co najmniej dwóch takich pętli: jedna dotyczy wydzielania VEGF przez komórki białaczkowe posiadające na swojej powierzchni receptor VEGFR2. Inne możliwe oddziaływanie

stanowią interakcje wykazane w badaniach in vitro współzależności angiopoetyny i receptora Tie2. [112,114,115]

Angiogeneza to wypadkowa złożonych zależności między czynnikami wydzielanymi przez blasty jak i przez komórki towarzyszące (limfocyty, mastocyty, makrofagi). W tym skomplikowanym procesie podkreśla się również ogromną rolę mikrośrodowiska szpiku i stresu wywołanego hipoksją, hipoglikemią i niskim pH. Środowisko szpiku jest wysoce dynamiczne w AML. Trudno uzyskać takie warunki w laboratorium. Stąd duże rozbieżności – i tak w badaniach uzyskanych w TB potwierdzono zwiększoną ilość VEGF-1, VEGF-2 i FGF, w warunkach ex vivo nie potwierdzono tej zależności. VEGF pobudza HUVECs do wydzielania GM-CSF, który z kolei oddziałuje na komórki AML. Układ stymulacji autokrynej z jednej strony, a komórek endotelialnych z drugiej zapewnia komórkom białaczki czynniki potrzebne do przeżycia i proliferacji. W niektórych pracach udowodniono, że wzrastający poziom krążących czynników proangiogennych ( w tym angiopoetyny i VEGF) związany jest z ryzykiem niepowodzenia leczenia i wczesnej śmierci. Badane są kolejne potencjalne pętle autokryjne (Tie-2) jak również wzajemne oddziaływania pomiędzy komórkami białaczki a komórkami endotelium. [115,116,144] Postuluje się w przyszłości zastosowanie substancji działających antyangiogennie w terapii chorób hematologicznych. [114,143,144]

W pracy wykazano, że w grupie chorych z AML uzyskujących remisję, odsetek komórek CD34+ oznaczonych we wczesnym okresie po chemioterapii (+7 do +10 doba po leczeniu) był istotnie statystycznie mniejszy niż wśród pacjentów nie uzyskujących remisji.

Spośród wszystkich parametrów analizowanych w pracy cząsteczka CD34 jest zdecydowanie najlepiej przebadana. Od wielu lat prowadzone są badania celem określenia przydatności CD34 w prognozowaniu i leczeniu chorób hematologicznych. Na podstawie analiz dostępnych w piśmiennictwie CD34 wydaje się dobrym narzędziem do stratyfikacji ryzyka u chorych z AML - względnie łatwo dostępnym i odpowiednio czułym. [78,146] Zainteresowanie antygenem CD34 wynika z faktu, że powszechnie obecny jest na niskozróżnicowanych komórkach hematopoetycznych (macierzyste i progenitorowe). Ważnym zagadnieniem pozostaje odróżnienie hematopoetycznych komórek macierzystych CD34+ od białaczkowych komórek macierzystych CD34+ (LSC, ang. Leukemic Stem

Cell). To zagadnienie wydaje się kluczowe przy określaniu minimalnej choroby resztkowej (MRD - Minimal Residual Disease). [80,147]

W ogromnej większości prac CD34 oznaczono metodą cytometrii przepływowej. Ustalano arbitralnie różne punkty odcięcia, stąd wynikają duże rozbieżności w uzyskiwanych wynikach. CD34 ma wartość prognostyczną, jednak im wyżej postawiony jest punkt odcięcia, tym wartość CD34 jako markera prognostycznego maleje. Szczegółowo przebadano te dyskrepancje i ostatecznie uznano, że wartość  $CD34 > 1,04\%$  oznaczona w cytometrii świadczy o dodatniej chorobie resztkowej. [147]

Z ekspresją CD34 wiąże się zjawisko oporności na zastosowane leczenie. Zagadnienie ma charakter wieloczynnikowy. Z jednej strony może wynikać z oporności na apoptozę (np. poprzez wpływ na zwiększoną ekspresję białka bcl-2), z drugiej zaś związane jest z ekspresją białek odpowiedzialnych za transport leków (MRP – ang. Multidrug Resistance Protein i LRP - ang. Lung Resistance Protein). [80,148] Cały czas pojawiają się nowe doniesienia (m.in. ekspresja kinaz aurora i ich rola we wzroście i proliferacji nowotworów hematologicznych). [75] Wykazano, że ekspresja CD34 jest mniejsza u chorych z mutacją NPM1.

W badaniach *in vitro* wykazano, że wybrane cytokiny mogą zmniejszyć odsetek komórek białaczkowych CD34+. [149] Potencjalne nowe opcje terapeutyczne związane są również z zahamowaniem białek antyapoptotycznych bcl-2 prowadzone są badania kliniczne celem potwierdzenia skuteczności i bezpieczeństwa tej grupy leków. [71]

Badania własne trepanobiopłatów mają charakter unikalny- w dostępnym piśmiennictwie medycznym bardzo niewiele danych literaturowych odnosi się do analizy wczesnej (+7 do + 10 doba po chemioterapii indukującej) oceny u chorych z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej w oparciu o TB. Tym niemniej w swoim ostatecznym wniosku są zbieżne z dostępnymi źródłami- wyższy odsetek komórek CD34+ związany był z niepowodzeniem leczenia.

Mimo podobnego czasu odkrycia (lata 80-te XX wieku) Ki67 i CD117, danych literaturowych odnoszących się do tego ostatniego jest zdecydowanie więcej. Taki stan rzeczy wynika z faktu, że rola CD117 w procesie hematopoezy jest lepiej poznana i udokumentowana i niezmiennie od lat stanowi punkt zainteresowania naukowców. [85,86,90,96]



Badania własne potwierdziły zależność między wartością CD117 (punkt odcięcia 5%) oznaczonego immunohistochemicznie w trepanobiopsji w okresie od +7 do +10 doby po zakończeniu chemioterapii „3+7” a wynikiem leczenia w grupie pacjentów z rozpoznaną ostrą białaczką szpikową. Większy odsetek CD117 statystycznie częściej występował u chorych, którzy nie uzyskali remisji.

CD117 występuje w znaczącym odsetku na komórkach blastycznych u chorych z AML- dane literaturowe są bardzo spójne w tej kwestii. Według różnych autorów ekspresja CD117 w analizowanej grupie jest wysoka- mieści się w przedziałach 65-90% i 30-100%. [94,96] Produkt onkogenu c-Kit jest odpowiedzialny za nadmierny rozrost i zaburzenie różnicowania ludzkich komórek białaczkowych. W badaniach in vivo potwierdzono związek poziomu fosforylacji kinazy tyrozynowej z potencjałem proliferacyjnym komórek białaczkowych. [90,93,95]

Biorąc pod uwagę ten potencjał nowotworzenia przypuszcza się, że ekspresja c-Kit związana jest ze szczególną charakterystyką choroby i rokowaniem chorych z AML. Od ponad 20 lat wiadomo, że poziom rozpuszczalnego c-Kit spada po chemioterapii. [150]

Większość dostępnych publikacji na temat ekspresji CD117 w ostrych białaczkach to prace oparte na ocenach cytometrycznych. Ekspresja protoonkogenu c-Kit na komórkach blastycznych w AML nie ulega wątpliwości- jednoznacznie potwierdzono ją w licznych badaniach. [151]

Analiza CD117 w oparciu o oznaczenia immunohistochemiczne materiału pobranego w czasie trepanobiopsji ma charakter unikalny. Natomiast oznaczanie immunohistochemiczne CD117 z powodzeniem od wielu lat wykorzystuje się w diagnostyce wybranych guzów litych. [91]

W badaniach przeprowadzonych w populacji azjatyckiej oznaczono cytometrycznie CD117 w populacji chorych z AML. Ekspresja c-Kit wzrastała wraz z wiekiem, obecnością zaburzeń cytogenetycznych (del 5, del 7) oraz była większa wśród chorych z rozpoznaniem AML M1 i M2 wg FAB. Nie wykazano związku ekspresji CD117 z płcią i z pochodzeniem etnicznym. W analizie jednowariantowej chorzy c-Kit dodatni rzadziej uzyskiwali CR. Analiza wielowariantowa wskazywała na odmienną zależność – wyższa wartość c-Kit miała związek z wyższą CR, choć ostatecznie wartość c-Kit nie miała

wpływu na DFS. Tym niemniej, trudno o jednolite konkluzje- badana grupa chorych była bardzo różnorodna, również pod względem zastosowanego leczenia. [93]

Danych literaturowych jest dość dużo. Głównym problemem pozostają jednak duże rozbieżności w zakresie dostępnych wiadomości. Niektórzy autorzy wykazują zależność ekspresji CD117 z wynikiem leczenia chorych z rozpoznaną AML, inni autorzy negują te związki. Wg Tsao i wsp. wysoka ekspresja CD117 jest niezależnym czynnikiem prognostycznym niższego odsetka CR w ALL i wyższego odsetka CR w AML. Biorąc pod uwagę wpływ długoterminowy- przeżycie wolne od choroby (DFS) - nie odnotowano wpływu c-kit na ten parametr. [94] Potrzebne są dodatkowe analizy w celu określenia rzeczywistego wpływu CD117 na rokowanie w grupie pacjentów z ostrą białaczką. [90,94] Źródła tych różnic wynikają z jednej strony z różnorodności badanej populacji, część trudności interpretacyjnych wynika natomiast ściśle z kwestii technicznych - braku standaryzacji metod oznaczania CD117, odmiennej czułości przeciwciał i z różnego poziomu ekspresji CD117. [88,91]

Autorzy włoscy zwracają uwagę, że cytometrycznie lepiej używać pojęć ilościowych CD117- według tej grupy badaczy najlepiej sprawdza się MFI (ang. Mean Fluorescence Intensity - średnia intensywność fluorescencji). Wykazali oni, że ekspresja c-Kit w AML jest niezależnym czynnikiem prognostycznym krótszego PFS i OS. [151]

Gorsze rokowanie u chorych z wysoką ekspresją c-Kit prawdopodobnie wynika z większego potencjału proliferacyjnego. Część badaczy zwraca również uwagę na wpływ c-Kit na apoptozę – wyższa wartość c-Kit wpływa hamująco na białka proapoptotyczne (m.in. bax/bcl2) - ostatecznie skutkuje to niższym OS i DFS w tej grupie pacjentów. Ponadto postuluje się związek ekspresji c-Kit z kinetyką leku w komórce- zwiększona ekspresja c-Kit wpływa na proces dystrybucji leku w komórce i szybszy odpływ leku z miejsca docelowego. Wydaje się również, że istnieje korelacja między wyższą ekspresją c-Kit w mniej zróżnicowanych podtypach AML. [98,151]

Rola c-Kit w rozwoju ostrych białaczek szpikowych jest jednoznacznie udokumentowana w literaturze. Prowadzone są badania z zastosowaniem leków z grupy inhibitorów kinazy tyrozynowej w terapii chorych z AML. Modele teoretyczne wskazują na duży potencjał terapeutyczny tej grupy leków. Badania własne potwierdzają zwiększoną ekspresję CD117 na komórkach białaczkowych u chorych z niepowodzeniem leczenia.

Wczesna ocena aktywności choroby w tej grupie pacjentów może w przyszłości skutkować zmianą lub modyfikacją leczenia na tym etapie terapii. [98]

Przeprowadzona analiza własna wykazała, że oznaczenie immunohistochemiczne Ki67 wykonane w trepanobiopsji w okresie od +7 do +10 doby po zakończeniu leczenia indukującego remisję, koreluje z wynikiem leczenia i jest statystycznie większe u chorych, którzy nieosiągnęli remisji całkowitej.

O ile budowa Ki67 poznana jest stosunkowo dobrze, o tyle rola Ki67 w komórce podczas cyklu komórkowego poznana jest w zdecydowanie mniejszym stopniu. [91,102,107] Immunohistochemiczne oznaczenie Ki67 w chłoniakach nieziarniczych jest uznanym elementem diagnostycznym. Jak wykazały analizy danych klinicznych, istnieje znamieny statystycznie związek między niskim (<20%) indeksem Ki67 i niskim stopniem złośliwości histologicznej. W grupie nowo rozpoznanych NHL szczególnie korzystne rokowniczo (mierzone OS) jest Ki67 < 5%. Odmiennie przedstawiają się analizy pacjentów z NHL o wysokim stopniu złośliwości, z wyjściowym Ki67 < 80%, którzy w wyniku przeprowadzonego leczenia osiągnęli remisję całkowitą bądź częściową, u których statystycznie częściej dochodzi do wznowy choroby. [103,106,108]

Jedna z bardziej szczegółowych opracowań dotyczy chorych z rozpoznaniem chłoniaka z komórek płaszczka. W grupie tych pacjentów wykazano, że wysoka wartość białka Ki67 to niekorzystny czynnik prognostycznym związany z wyższą śmiertelnością. [105,109] Jak wskazują dostępne analizy, Ki67 jest bardzo użytecznym narzędziem w diagnostyce chłoniaka z komórek B bogatego w limfocyty T, chłoniaka Hodgkina i angioimmunoblastycznych chłoniaków T- komórkowych. [108] Prognostyczne znaczenie ekspresji Ki67 wykazano również w kolejnych badaniach. Na podstawie analizy cytometrycznej komórek jednojądrzastych krwi obwodowej w grupie 155 pacjentów z przewlekłymi chorobami limfoproliferacyjnymi wykazano, że w chorobach wywodzących się z limfocytów T ekspresja Ki67 jest znacząco silniej zaznaczona niż w chorobach z linii B, co bezpośrednio przekłada się na czas przeżycia pacjentów. [108] W linii B-komórkowej największą wartość Ki67 wykazano na komórkach chłoniaka limfocytarnego ulegającego konwersji w formę bardziej agresywną, najmniejszą natomiast w fazie przewlekłej białaczki limfocytowej. Oznaczenie Ki67, według części autorów, może służyć także do monitorowania pacjentów zagrożonych progresją choroby. [105]

Wykorzystanie Ki67 jako czynnika prognostycznego w MM i MGUS stanowi również przedmiot zainteresowania badaczy. Na podstawie przeprowadzonych analiz klinicznych, wykazano, że odsetek Ki67 dodatnich komórek plazmatycznych jest zwiększony w nieleczonym dotychczas szpiczaku i gammapatii monoklonalnej (odpowiednio MM 9,5%, MGUS 1,6%), w stosunku do wyników grupy kontrolnej. Czas przeżycia chorych na MM wykazujących powyżej 10% plazmocytów Ki67 pozytywnych był krótszy. Zwiększenie ekspresji Ki67 korelowało z postępem choroby i nieznacznie wyprzedzało niepowodzenie terapeutyczne. [104]

Przydatność oznaczeń Ki67 w odniesieniu do nowotworów limfo – i mieloproliferacyjnych jest niezaprzeczalna, stąd potrzeba sprawdzenia tych danych w odniesieniu do innych jednostek hematologicznych, w tym do grupy chorych z AML. [152]

W dostępnym piśmiennictwie dane odnośnie analizy wartości Ki67 w przypadku pacjentów z rozpoznaną ostrą białaczką szpikową są bardzo skąpe. Większość z prac wykorzystuje oznaczenia cytometryczne. Oznaczenia immunohistochemiczne i ocena preparatu trepanobiopsji w tym kontekście mają więc charakter unikalny. Oznaczenie indeksu Ki67 w ALL jest niezależnym czynnikiem prognostycznym, korelującym w populacji dziecięcej z czasem trwania remisji. Jak wykazano w badaniu retrospektywnym przeprowadzonym w grupie dzieci z nowo rozpoznaną ALL, zmniejszona (lub brak) ekspresji antygenu Ki67 w populacji blastów, jest niekorzystne rokowniczo (zmniejsza OS), zwłaszcza w skojarzeniu z dwoma lub więcej czynnikami prognostycznymi (wg Polish Paediatric Lymphoma/Leukemia Study Group). Powyższe obserwacje tłumaczone są brakiem wrażliwość komórek będących w fazie spoczynku (G0) na zastosowane leczenie (chemioterapia). [153]

Jak wykazano w badaniach przeprowadzonych u dzieci, indeks Ki67 jest znamienne statystycznie większy w ALL niż w AML i wynosi średnio 18,8%. W piśmiennictwie analizy dotyczące osób dorosłych są niezwykle skąpe, tym niemniej u pacjentów powyżej 18 rż z nowo rozpoznaną ALL, aktywność Ki67 kształtowała się na poziomie 24,9% (vs 2,4% w AML), co jest wartością zbliżoną do obserwowanej w grupie młodszych chorych. [153] Zbieżne z przedstawionymi są wyniki uzyskane w oparciu o oznaczenie Ki67 w grupie chorych z rozpoznaną białaczką- największą ekspresję Ki67 stwierdzono w grupie chorych odpowiednio z przewlekłą białaczką szpikową, ostrą

białaczka szpikową i ostrą białaczką limfoblastyczną. Również w grupie zdrowych ochotników aktywność Ki67 przedstawiała się zdecydowanie silniej niż u pacjentów z rozpoznana przewlekłą białaczką limfocytową. [152]

Znaczenie rokownicze Ki67 w AML nie jest tak jednoznaczne jak w ALL. W badaniach przeprowadzonych w populacji dziecięcej przed wdrożeniem leczenia, wykazano ekspresję Ki67 w 100% komórek blastycznych, co wskazuje na potencjalnie dużą pierwotną wrażliwość komórek na chemioterapię. Oznaczenie powtórzono podczas leczenia indukującego remisję. W grupie pacjentów wysokiego ryzyka stwierdzenie braku lub niskiej ekspresji Ki67 w 15 dniu po rozpoczęciu leczenia znamienne statystycznie częściej kończyło się niepowodzeniem terapii. Wykazano występowanie różnic w ekspresji Ki67 w zależności od podtypu AML. Udowodniono również, że niektóre komórki blastyczne o długim czasie trwania fazy S nie reagują z Ki67. W grupie dorosłych pacjentów z AML aktywność proliferacyjna zmierzona odsetkiem Ki67 w trepanobiopsatach szpiku kostnego u nowo rozpoznanych chorych wyniosła 2,4% vs 7,6% we wznowie procesu chorobowego. Wyjaśnienie tego zagadnienia wymaga dodatkowych badań.

Ki67 wykorzystuje się również jako narzędzie badawcze - na modelach zwierzęcych wykazano przydatność immunohistochemicznej oceny Ki67 w ocenie wrażliwości na leki. Ki67 ma zdolność wiązania i rozrywania DNA- w ten sposób - indukując apoptozę, może być punktem uchwytu dla nowych leków. [154]

W ciągu ostatnich lat zmieniło się rokowanie i leczenie pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej. Tym niemniej wyniki mierzone OS nie są jeszcze satysfakcjonujące. Poszukiwane są nowe narzędzia diagnostyczne i terapeutyczne. Odkrywany jest potencjał diagnostyczny w uznanych badaniach. Podsumowując należy stwierdzić, że trepanobiopsja to dobre narzędzie diagnostyczne do oceny pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej. Podstawowa zaleta TB to dostarczenie informacji, których nie można uzyskać w inny sposób (architektura szpiku, komórkowość, zwłóknienie, angiogeneza). U kilkunastu procent chorych na różnych etapach terapii stwierdza się istotne dyskrepancje w ocenie szpiku przy użyciu różnych metod – rozbieżności dotyczą przede wszystkim oceny cytologicznej i cytometrycznej. W tym odniesieniu TB wnosi niezaprzeczalną wartość poznawczą i rozstrzygającą wątpliwe sytuacje kliniczne. Zaletą badania pozostaje również trwałość preparatu, fakt

zarchiwizowania w laboratorium i w związku z tym możliwość zastosowania dodatkowych oznaczeń. Podstawową wadą TB jest stosunkowo długi (zazwyczaj kilkudniowy) czas opracowania materiału.

Dane literaturowe odnoszące się do zastosowania TB w AML są niezwykle skąpe. Praca jest pierwszym tego typu podsumowaniem dokonanej kompleksowej oceny parametrów - analizowano liczbę blastów, stopień włóknienia, komórkowość, angiogenezę, Ki67, CD34, CD117. Parametry te – każdy z osobna - mają uznaną wartość diagnostyczną w diagnostyce chorób nowotworowych. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano ich przydatność w odniesieniu do pacjentów z rozpoznaniem AML. Wykazano również, co podkreśla się coraz częściej, że wczesna ocena aktywności choroby u pacjentów z rozpoznaną ostrą białaczką szpikową wnosi niezwykle cenne informacje mające implikacje kliniczne. Wykrycie choroby resztkowej pozwoli w przyszłości zoptymalizować terapię – postulowana jest modyfikacja terapii (dodatkowe dawki leków, zmiana sposobu leczenia, nowe terapie). W ostatecznym efekcie przełoży się to na większą skuteczność leczenia.

Na podstawie uzyskanych wyników krzywej ROC możemy stwierdzić, że trepanobiopsja w zakresie oceny odsetka mieloblastów jest bardziej precyzyjna do monitorowania aktywności choroby na wczesnym etapie po leczeniu (od +7 do + 10 doby po chemioterapii) niż analiza cytologiczna szpiku ( $p=0,0061$ ).

Podobnie przedstawia się sytuacja w odniesieniu do porównania krzywych ROC TB i rozmazu krwi w zakresie oceny odsetka mieloblastów - na wczesnym etapie po terapii (+7 do +10 doba po kuracji indukującej remisję) badanie histologiczne szpiku jest bardziej precyzyjne w tym zakresie ( $p=0,0000$ ).

Dotychczas, nie ustalono jednolitych standardów dotyczących interpretacji wyników badań trepanobioptycznych wykonywanych przy wczesnej ocenie, po zastosowanej kuracji indukującej. Stosowane zasady mają charakter uznaniowy i są nadal przedmiotem badań. W niniejszej pracy, kryteria wczesnej oceny oparto o dane zaczerpnięte z wytycznych ELN, w zakresie liczby blastów występujących po leczeniu indukującym, przyjmując wartość graniczną 5%, co odpowiada liczbie tych komórek u osób zdrowych. W odniesieniu do antygenu Ki67, za punkt odcięcia, przyjęto wartość 30%. Uzyskane wyniki świadczą o odpowiednio dobranej czułości zastosowanych metod

do oceny występowania choroby resztkowej. Czułość testu dla 5% blastów oraz komórek CD34<sup>+</sup> i 30% odsetka Ki67 była wyższa niż ta wyznaczona dla nowych progów (punktów odniesienia) na podstawie krzywej ROC. Zwiększenie czułości zmniejsza odsetek wyników fałszywie ujemnych. Wyznaczone w modelu matematycznym nowe wartości – pod względem czułości są bardzo zbliżone. Wynika stąd, że zastosowanie w pracy odsetek (progów) dla blastów, komórek CD34<sup>+</sup> i Ki67 (odpowiednio 5%, 5% i 30%) pod względem czułości było prawidłowe.

Dla CD117<sup>+</sup> nowy wyznaczony próg charakteryzował się mniejszą czułością, lecz nieznacznie wyższą swoistością - uzyskane w ten sposób wyniki minimalizują ryzyko uzyskania wyników fałszywie dodatnich dla tej zmiennej.

## 6. Wnioski

1. Ocena histologii szpiku, przeprowadzona przed leczeniem oraz w + 7 do + 10 dobie po zakończeniu chemioterapii indukującej, jest użytecznym narzędziem diagnostycznym pozwalającym z dużym prawdopodobieństwem przewidzieć uzyskanie całkowitej remisji u chorych na ostrą białaczkę szpikową.
2. Ocena liczby blastów białaczkowych, komórek CD34+, komórek CD117+, aktywności proliferacyjnej Ki67 oraz ocena włóknienia we wczesnej fazie odpowiedzi na leczenie ma duży potencjał prognostyczny i aplikacyjny w klinice ostrej białaczki szpikowej.
3. Nie stwierdzono prognostycznego potencjału angiogenezy w poindukcyjnej ocenie odpowiedzi klinicznej na leczenie cytotoksyczne u pacjentów z AML.
4. Immunohistochemiczna ocena ekspresji CD34+, CD117+ i Ki67+ pozwala określić progi ilościowe badanych populacji, umożliwiające prognozowanie całkowitej remisji po kuracji indukującej
5. Wczesna ocena materiału pobranego w trakcie trepanobiopsji posiada większą wartość diagnostyczną w porównaniu z oceną cytologiczną szpiku pozyskanego z BAC u pacjentów z AML poddanych leczeniu cytoredukcyjnemu.



## **7. Spis tabel i wykresów**

Tabela 1. Klasyfikacja ostrych białaczek szpikowych wg FAB. str. 14

Tabela 2. Klasyfikacja ostrych białaczek szpikowych wg WHO z 2008 roku z poprawkami z 2016 roku. str.15

Tabela 3. Stosowane schematy terapii „3+7” w leczeniu AML (wg NCCN). str. 17

Tabela 4. Stosowane schematy terapii indukującej w leczeniu AML u osób powyżej 60 r.ż. (wg NCCN). str. 21

Tabela 5. Kryteria odpowiedzi na leczenie AML (wg ELN, 2008). str. 25

Tabela 6. Cytogenetyczno-molekularna stratyfikacja ryzyka u chorych z AML (wg ELN, 2008 str. 29

Tabela 7. Skala sprawności wg ECOG/WHO. str. 31

Tabela 8. Porównanie parametrów ocenianych w materiale pozyskanym techniką biopsji aspiracyjnej z szpiku oraz trepanobiopsji (wg Orazi A.). str. 34

Tabela 9. Immunohistochemiczne odróżnienie AML od ALL (wg Orazi A.). str. 37

Tabela 10. Wartość diagnostyczna Ki67 w onkologii. str. 48

Tabela 11. Czulość metod oceny minimalnej choroby resztkowej (MRD) w AML. str. 57

Tabela 12. Podział pacjentów ze względu na płeć. str. 61

Tabela 13. Wiek pacjentów. str. 61

Tabela 14. Rozpoznanie wg FAB. str. 62

Tabela 15. Profil ryzyka cytogenetyczno-molekularnego. str. 63

Tabela 16. Ocena stanu ogólnego i jakości życia pacjentów wg skali WHO/ECOG (przy przyjęciu). str. 65

Tabela 17. Parametry badań laboratoryjnych. str. 65

Tabela 18. Komórkowość szpiku przy rozpoznaniu ostrej białaczki szpikowej określana w materiale trepanobioptycznym. str. 71

Tabela 19. Komórkowość szpiku określana w materiale trepanobioptycznym u chorych na ostrą białaczkę szpikową w 7 - 10 dobie po zakończeniu chemioterapii indukującej remisję. str. 72

Tabela 20. Komórkowość szpiku w materiale trepanobioptycznym u chorych na ostrą białaczkę szpikową ze stwierdzoną opornością oraz osiągających remisję całkowitą po zastosowaniu I indukcji. str. 73

Tabela 21. Względna liczba komórek blastycznych szpiku przy rozpoznaniu ostrej białaczki szpikowej przed leczeniem określana w materiale trepanobioptycznym. str. 74

Tabela 22. Względna liczba komórek blastycznych szpiku u chorych na ostrą białaczkę szpikową w 7 - 10 dobie po zakończeniu chemioterapii indukującej remisję. str. 75

Tabela 23. Ocena zależności pomiędzy liczbą blastów w czasie  $t=1$ , a wynikiem leczenia po zastosowaniu I indukcji remisji. str. 76

Tabela 24. Ocena występowania włóknienia określanego w materiale trepanobioptycznym od chorych na ostrą białaczkę szpikową po zastosowaniu terapii indukującej remisję. str. 77

Tabela 25. Ocena występowania antygenu Ki67 szpiku przy rozpoznaniu ostrej białaczki szpikowej przeprowadzona w materiale trepanobioptycznym. str. 78

Tabela 26. Ocena występowania antygenu Ki67 w 7 - 10 dobie po zakończeniu chemioterapii indukującej remisję w materiale trepanobioptycznym od chorych na ostrą białaczkę szpikową. str. 78

Tabela 27. Ocena zależności pomiędzy liczbą komórek o fenotypie Ki67 w czasie  $t=1$ , a wynikiem leczenia po zastosowaniu I indukcji remisji. str. 79

Tabela 28. Ocena występowania komórek z antygenem CD34 przy rozpoznaniu ostrej białaczki szpikowej przeprowadzona w materiale trepanobioptycznym. str. 80

Tabela 29. Ocena występowania antygenu CD34 w 7 - 10 dobie po zakończeniu chemioterapii indukującej remisję w materiale trepanobioptycznym od chorych na ostrą białaczkę szpikową. str. 81

Tabela 30. Ocena zależności pomiędzy liczbą komórek o fenotypie CD34<sup>+</sup> w czasie t=1, a wynikiem leczenia po zastosowaniu I indukcji remisji. str. 82

Tabela 31. Ocena występowania komórek z antygenem CD117 przy rozpoznaniu ostrej białaczki szpikowej przeprowadzona w materiale trepanobiopcyjnym. str. 83

Tabela 32. Ocena występowania komórek z antygenem CD117 w 7 - 10 dobie po zakończeniu chemioterapii indukującej remisję w materiale trepanobiopcyjnym od chorych na ostrą białaczkę szpikową. str. 84

Tabela 33. Ocena zależności pomiędzy liczbą komórek o fenotypie CD117<sup>+</sup> w czasie t=1, a wynikiem leczenia po zastosowaniu I indukcji remisji. str. 85

Tabela 34. Ocena angiogenezy szpiku przy rozpoznaniu ostrej białaczki szpikowej przeprowadzona w materiale trepanobiopcyjnym. str. 86

Tabela 35. Ocena angiogenezy szpiku u chorych na ostrą białaczkę szpikową w 7 - 10 dobie po zakończeniu chemioterapii indukującej remisję. str. 87

Tabela 36. Ocena nasilenia angiogenezy w materiale trepanobiopcyjnym u chorych na ostrą białaczkę szpikową ze stwierdzoną opornością oraz osiągających remisję całkowitą po zastosowaniu I indukcji. str. 87

Tabela 37. Liczba pacjentów z remisją całkowitą po zastosowaniu I i II indukcji. str. 88

Tabela 38. Ocena wyników leczenia po zastosowaniu I indukcji remisji. str. 88

Tabela 39. Oporność na zastosowaną terapię „3+7” w leczeniu indukującym remisję. str. 89

Tabela 40. Pacjenci kwalifikowani do transplantacji komórek krwiotwórczych. str. 89

Tabela 41. Analiza jednoczynnikowa w odniesieniu do liczby komórek z antygenem CD117<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, Ki67<sup>+</sup> oraz ogólnej liczby blastów a szansa uzyskania remisji całkowitej. str. 90

Tabela 42. Wyniki krzywej ROC dla oceny liczby blastów. str. 91

Tabela 43. Wyniki krzywej ROC dla parametru „liczba blastów” dla trepanobiopsji i rozmazu krwi. str. 92

Wykres 1. Krzywe ROC – parametr „liczba blastów” - porównanie trepanobiopsji i oceny cytologicznej szpiku. str. 92

Wykres 2. Krzywe ROC – parametr „liczba blastów” - porównanie trepanobiopsji i oceny rozmazu krwi. str. 93

Wykres 3. Krzywa ROC wraz z wyznaczonym punktem odniesienia dla odsetka blastów. str. 94

Wykres 4. Krzywa ROC wraz z wyznaczonym punktem odniesienia dla odsetka CD117. str.97

Wykres 5. Krzywa ROC wraz z wyznaczonym punktem odniesienia dla odsetka CD34. str. 95

Wykres 6. Krzywa ROC wraz z wyznaczonym punktem odniesienia dla odsetka Ki67. str. 96

## **8. Spis rycin i fotografii**

Rycina 1. str. 39

Rycina 2. str. 42

Rycina 3. str. 47

Fotografia 1. str. 38

Fotografia 2. str. 41

Fotografia 3. str. 45

Fotografia 4. str. 49

Fotografia 5a. str. 52

Fotografia 5b. str. 53

Fotografia 6. str. 55

## 9. Piśmiennictwo

1. Scholl, C., D.G. Gilliland, and S. Frohling, *Deregulation of signaling pathways in acute myeloid leukemia*. *Semin Oncol*, 2008. **35**(4): p. 336-45.
2. Kvinlaug, B.T., et al., *Common and overlapping oncogenic pathways contribute to the evolution of acute myeloid leukemias*. *Cancer Res*, 2011. **71**(12): p. 4117-29.
3. Khwaja, A., et al., *Acute myeloid leukaemia*. *Nat Rev Dis Primers*, 2016. **2**: p. 16010.
4. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet*. *Blood*, 2010. **115**(3): p. 453-74.
5. Appelbaum, F.R., et al., *Age and acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2006. **107**(9): p. 3481-5.
6. Djunic, I., et al., *Pretreatment risk factors and importance of comorbidity for overall survival, complete remission, and early death in patients with acute myeloid leukemia*. *Hematology*, 2012. **17**(2): p. 53-8.
7. Larson, R.A., *Etiology and management of therapy-related myeloid leukemia*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2007: p. 453-9.
8. Siegel, R., et al., *Cancer statistics, 2014*. *CA Cancer J Clin*, 2014. **64**(1): p. 9-29.
9. Schiffer, C.A., *"I am older, not elderly," said the patient with acute myeloid leukemia*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(4): p. 521-3.
10. Rollig, C., et al., *Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk classification of the European LeukemiaNet recommendations: evaluation of the proposed reporting system*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(20): p. 2758-65.
11. Rowe, J.M. and M.S. Tallman, *How I treat acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2010. **116**(17): p. 3147-56.
12. Wahlin, A., et al., *Prognostic significance of risk group stratification in elderly patients with acute myeloid leukaemia*. *Br J Haematol*, 2001. **115**(1): p. 25-33.
13. Bello, C., et al., *Outcomes after induction chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia arising from myelodysplastic syndrome*. *Cancer*, 2011. **117**(7): p. 1463-9.
14. Xavier, A.C., Y. Ge, and J.W. Taub, *Down syndrome and malignancies: a unique clinical relationship: a paper from the 2008 william beaumont hospital symposium on molecular pathology*. *J Mol Diagn*, 2009. **11**(5): p. 371-80.
15. Jalbut, M.M., et al., *Acute myeloid leukemia in a patient with constitutional 47,XXY karyotype*. *Leuk Res Rep*, 2015. **4**(1): p. 28-30.
16. Mehta, P.A., et al., *Numerical chromosomal changes and risk of development of myelodysplastic syndrome--acute myeloid leukemia in patients with Fanconi anemia*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010. **203**(2): p. 180-6.
17. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. *Blood*, 2016. **127**(20): p. 2391-405.
18. Bishop, J.F., et al., *A randomized study of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia*. *Blood*, 1996. **87**(5): p. 1710-7.
19. Lowenberg, B., et al., *Cytarabine dose for acute myeloid leukemia*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(11): p. 1027-36.

20. Vey, N., et al., *The benefit of induction chemotherapy in patients age > or = 75 years*. *Cancer*, 2004. **101**(2): p. 325-31.
21. Holowiecki, J., et al., *Cladribine, but not fludarabine, added to daunorubicin and cytarabine during induction prolongs survival of patients with acute myeloid leukemia: a multicenter, randomized phase III study*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(20): p. 2441-8.
22. Amadori, S., et al., *Sequential combination of gemtuzumab ozogamicin and standard chemotherapy in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: results of a randomized phase III trial by the EORTC and GIMEMA consortium (AML-17)*. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(35): p. 4424-30.
23. Wallen, H., et al., *Ablative allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults 60 years of age and older*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(15): p. 3439-46.
24. Burnett, A.K., *The Challenge of AML in Older Patients*. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2013. **5**(1): p. e2013038.
25. Juliusson, G., et al., *Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry*. *Blood*, 2009. **113**(18): p. 4179-87.
26. Estey, E., et al., *Prospective feasibility analysis of reduced-intensity conditioning (RIC) regimens for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in elderly patients with acute myeloid leukemia (AML) and high-risk myelodysplastic syndrome (MDS)*. *Blood*, 2007. **109**(4): p. 1395-400.
27. Ferrara, F., et al., *Therapeutic options and treatment results for patients over 75 years of age with acute myeloid leukemia*. *Haematologica*, 1998. **83**(2): p. 126-31.
28. Gardin, C., et al., *Postremission treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia in first complete remission after intensive induction chemotherapy: results of the multicenter randomized Acute Leukemia French Association (ALFA) 9803 trial*. *Blood*, 2007. **109**(12): p. 5129-35.
29. Leith, C.P., et al., *Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study*. *Blood*, 1997. **89**(9): p. 3323-9.
30. Lowenberg, B., et al., *Therapeutic value of clofarabine in younger and middle aged (18 - 65 yrs) adults with newly diagnosed AML*. *Blood*, 2017.
31. Ma, E., et al., *An Evaluation of Treatment Patterns and Outcomes in Elderly Patients Newly Diagnosed With Acute Myeloid Leukemia: A Retrospective Analysis of Electronic Medical Records From US Community Oncology Practices*. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2016. **16**(11): p. 625-636 e3.
32. O'Donnell, M.R., et al., *Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*. *J Natl Compr Canc Netw*, 2017. **15**(7): p. 926-957.
33. O'Donnell, M.R., et al., *Acute myeloid leukemia, version 2.2013*. *J Natl Compr Canc Netw*, 2013. **11**(9): p. 1047-55.
34. Lacayo, N.J., et al., *Gene expression profiles at diagnosis in de novo childhood AML patients identify FLT3 mutations with good clinical outcomes*. *Blood*, 2004. **104**(9): p. 2646-54.
35. Burnett, A.K., *Optimal induction and post-remission therapy for acute myeloid leukemia*. *Leuk Suppl*, 2012. **1**(Suppl 2): p. S14-5.
36. Burnett, A.K., *New induction and postinduction strategies in acute myeloid leukemia*. *Curr Opin Hematol*, 2012. **19**(2): p. 76-81.

37. Klepin, H.D., et al., *The feasibility of inpatient geriatric assessment for older adults receiving induction chemotherapy for acute myelogenous leukemia*. J Am Geriatr Soc, 2011. **59**(10): p. 1837-46.
38. Sudan, N., et al., *Treatment of acute myelogenous leukemia with outpatient azacitidine*. Cancer, 2006. **107**(8): p. 1839-43.
39. Kantarjian, H., et al., *Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: predictive prognostic models for outcome*. Cancer, 2006. **106**(5): p. 1090-8.
40. McCarthy, M.W. and T.J. Walsh, *Prophylactic Measures During Induction for Acute Myeloid Leukemia*. Curr Oncol Rep, 2017. **19**(3): p. 18.
41. Pechlivanoglou, P., et al., *Mixed treatment comparison of prophylaxis against invasive fungal infections in neutropenic patients receiving therapy for haematological malignancies: a systematic review*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(1): p. 1-11.
42. Gardner, A., et al., *Randomized comparison of cooked and noncooked diets in patients undergoing remission induction therapy for acute myeloid leukemia*. J Clin Oncol, 2008. **26**(35): p. 5684-8.
43. Lowenberg, B., et al., *Effect of priming with granulocyte colony-stimulating factor on the outcome of chemotherapy for acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2003. **349**(8): p. 743-52.
44. Wang, L., et al., *The impact of primary prophylaxis with granulocyte colony-stimulating factors on febrile neutropenia during chemotherapy: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. Support Care Cancer, 2015. **23**(11): p. 3131-40.
45. Breems, D.A., et al., *Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype*. J Clin Oncol, 2008. **26**(29): p. 4791-7.
46. Bienz, M., et al., *Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(4): p. 1416-24.
47. Cairoli, R., et al., *Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3463-8.
48. Slovak, M.L., et al., *Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4075-83.
49. Bacher, U., et al., *Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters--an analysis of 3082 patients*. Blood, 2008. **111**(5): p. 2527-37.
50. Mohamedali, H., et al., *Older age is associated with similar quality of life and physical function compared to younger age during intensive chemotherapy for acute myeloid leukemia*. Leuk Res, 2012. **36**(10): p. 1241-8.
51. Volpato, S., et al., *Predictive value of the Short Physical Performance Battery following hospitalization in older patients*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2011. **66**(1): p. 89-96.
52. Klepin, H.D., et al., *Geriatric assessment predicts survival for older adults receiving induction chemotherapy for acute myelogenous leukemia*. Blood, 2013. **121**(21): p. 4287-94.
53. Giles, F.J., et al., *The haematopoietic cell transplantation comorbidity index score is predictive of early death and survival in patients over 60 years of age receiving*

- induction therapy for acute myeloid leukaemia.* Br J Haematol, 2007. **136**(4): p. 624-7.
54. Estey, E., *Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in older patients.* J Clin Oncol, 2007. **25**(14): p. 1908-15.
  55. Burnett, A.K., *Treatment of acute myeloid leukaemia.* Clin Med (Lond), 2013. **13 Suppl 6**: p. s58-61.
  56. Orazi, A., *Histopathology in the diagnosis and classification of acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, and myelodysplastic/myeloproliferative diseases.* Pathobiology, 2007. **74**(2): p. 97-114.
  57. Chandra, S. and H. Chandra, *Comparison of bone marrow aspirate cytology, touch imprint cytology and trephine biopsy for bone marrow evaluation.* Hematol Rep, 2011. **3**(3): p. e22.
  58. Fend, F., et al., *Modern techniques for the diagnostic evaluation of the trephine bone marrow biopsy: methodological aspects and applications.* Prog Histochem Cytochem, 2008. **42**(4): p. 203-52.
  59. Subashchandrabose, P., L. Ramiah Madanagopaal, and T.M. Subba Rao, *Diagnosis and Classification of Acute Leukemia in Bone Marrow Trephine Biopsies, Utility of a Selected Panel of Minimal Immunohistochemical Markers.* Int J Hematol Oncol Stem Cell Res, 2016. **10**(3): p. 138-46.
  60. Ngo, N., I.A. Lampert, and K.N. Naresh, *Bone marrow trephine findings in acute myeloid leukaemia with multilineage dysplasia.* Br J Haematol, 2008. **140**(3): p. 279-86.
  61. Ngo, N.T., I.A. Lampert, and K.N. Naresh, *Bone marrow trephine morphology and immunohistochemical findings in chronic myelomonocytic leukaemia.* Br J Haematol, 2008. **141**(6): p. 771-81.
  62. Yu, Y., et al., *Clustered precursors in bone marrow sections predict early relapse in patients with acute myeloid leukemia within hematologic remission.* J Transl Med, 2014. **12**: p. 18.
  63. Souto Filho, J.T., et al., *Evaluation of bone marrow aspirates in patients with acute myeloid leukemia at day 14 of induction therapy.* Diagn Pathol, 2015. **10**: p. 122.
  64. Dirnhofer, S., P. Went, and A. Tichelli, *Diagnostic problems in follow-up bone marrow biopsies of patients treated for acute and chronic leukaemias and MDS.* Pathobiology, 2007. **74**(2): p. 115-20.
  65. Thiele, J., et al., *European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity.* Haematologica, 2005. **90**(8): p. 1128-32.
  66. Thiele, J. and H.M. Kvasnicka, *Myelofibrosis--what's in a name? Consensus on definition and EUMNET grading.* Pathobiology, 2007. **74**(2): p. 89-96.
  67. Thiele, J., H.M. Kvasnicka, and V. Diehl, *Bone marrow features of diagnostic impact in erythrocytosis.* Ann Hematol, 2005. **84**(6): p. 362-7.
  68. Boveri, E., et al., *Bone marrow microvessel density in chronic myeloproliferative disorders: a study of 115 patients with clinicopathological and molecular correlations.* Br J Haematol, 2008. **140**(2): p. 162-8.
  69. Saini, L., et al., *Incremental value of the bone marrow trephine biopsy in detecting residual leukemia following treatment for Acute Myeloid Leukemia.* Leuk Res, 2016. **45**: p. 47-52.
  70. Joshi, R., et al., *Bone marrow trephine combined with immunohistochemistry is superior to bone marrow aspirate in follow-up of myeloma patients.* J Clin Pathol, 2008. **61**(2): p. 213-6.



71. Rao, J., et al., *BH3 mimetic ABT-737 induces apoptosis in CD34 acute myeloid leukemia cells and shows synergistic effect with conventional chemotherapeutic drugs*. Asia Pac J Clin Oncol, 2015.
72. Dybko, J., et al., *CD117 (c-kit) expression on CD34+ cells participates in the cytogenetic response to imatinib in patients with chronic myeloid leukemia in the first chronic phase*. Acta Haematol, 2014. **132**(2): p. 166-71.
73. Lanza, F., L. Healy, and D.R. Sutherland, *Structural and functional features of the CD34 antigen: an update*. J Biol Regul Homeost Agents, 2001. **15**(1): p. 1-13.
74. Tian, C., et al., *MicroRNA-9 promotes proliferation of leukemia cells in adult CD34-positive acute myeloid leukemia with normal karyotype by downregulation of Hes1*. Tumour Biol, 2015.
75. Ye, D., et al., *Analysis of Aurora kinase A expression in CD34(+) blast cells isolated from patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia*. J Hematop, 2009. **2**(1): p. 2-8.
76. Taussig, D.C., et al., *Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction*. Blood, 2010. **115**(10): p. 1976-84.
77. Matsui, W.H., et al., *Quantitative analysis of bone marrow CD34 cells in aplastic anemia and hypoplastic myelodysplastic syndromes*. Leukemia, 2006. **20**(3): p. 458-62.
78. Furness, S.G. and K. McNagny, *Beyond mere markers: functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis*. Immunol Res, 2006. **34**(1): p. 13-32.
79. Stella, C.C., et al., *CD34-positive cells: biology and clinical relevance*. Haematologica, 1995. **80**(4): p. 367-87.
80. Suarez, L., et al., *CD34+ cells from acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, and normal bone marrow display different apoptosis and drug resistance-associated phenotypes*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(22): p. 7599-606.
81. O'Donnell, P.V., et al., *CD34+ stem cell augmentation of elutriated allogeneic bone marrow grafts: results of a phase II clinical trial of engraftment and graft-versus-host disease prophylaxis in high-risk hematologic malignancies*. Bone Marrow Transplant, 1998. **22**(10): p. 947-55.
82. Reilly, J.T., *Receptor tyrosine kinases in normal and malignant haematopoiesis*. Blood Rev, 2003. **17**(4): p. 241-8.
83. Dirnhofer, S. et al., *[The diagnostic and predictive role of kit (CD117)] Ther Umsch*, 2006. **63**(4): p. 273-8
84. Ahmadi, A., et al., *Diagnostic value of CD117 in differential diagnosis of acute leukemias*. Tumour Biol, 2014. **35**(7): p. 6763-8.
85. Scheijen, B. and J.D. Griffin, *Tyrosine kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease*. Oncogene, 2002. **21**(21): p. 3314-33.
86. Edling, C.E. and B. Hallberg, *c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(11): p. 1995-8.
87. Tay, C.M., et al., *KIT gene mutation analysis in solid tumours: biology, clinical applications and trends in diagnostic reporting*. Pathology, 2013. **45**(2): p. 127-37.
88. Escribano, L., et al., *Expression of the c-kit (CD117) molecule in normal and malignant hematopoiesis*. Leuk Lymphoma, 1998. **30**(5-6): p. 459-66.
89. Sharawat, S.K., et al., *Increased coexpression of c-KIT and FLT3 receptors on myeloblasts: independent predictor of poor outcome in pediatric acute myeloid leukemia*. Cytometry B Clin Cytom, 2013. **84**(6): p. 390-7.

90. Wozniak, J. and J. Kopec-Szlezak, *c-Kit receptor (CD117) expression on myeloblasts and white blood cell counts in acute myeloid leukemia*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2004. **58**(1): p. 9-16.
91. Hornick, J.L. and C.D. Fletcher, *Validating immunohistochemical staining for KIT (CD117)*. *Am J Clin Pathol*, 2003. **119**(3): p. 325-7.
92. Hornick, J.L. and C.D. Fletcher, *Immunohistochemical staining for KIT (CD117) in soft tissue sarcomas is very limited in distribution*. *Am J Clin Pathol*, 2002. **117**(2): p. 188-93.
93. Auewarakul, C.U., et al., *C-kit receptor tyrosine kinase (CD117) expression and its positive predictive value for the diagnosis of Thai adult acute myeloid leukemia*. *Ann Hematol*, 2006. **85**(2): p. 108-12.
94. Tsao, A.S., et al., *C-kit receptor expression in acute leukemias-association with patient and disease characteristics and with outcome*. *Leuk Res*, 2004. **28**(4): p. 373-8.
95. Uckan, D., et al., *CD34/CD117 co-expression in childhood acute leukemia*. *Leuk Res*, 2000. **24**(3): p. 201-6.
96. Sperling, C., et al., *Expression of the stem cell factor receptor C-KIT (CD117) in acute leukemias*. *Haematologica*, 1997. **82**(5): p. 617-21.
97. Cascavilla, N., et al., *CD117 (c-kit) is a restricted antigen of acute myeloid leukemia and characterizes early differentiative levels of M5 FAB subtype*. *Haematologica*, 1998. **83**(5): p. 392-7.
98. Advani, A.S., *Targeting the c-kit receptor in the treatment of acute myelogenous leukemia*. *Curr Hematol Malig Rep*, 2006. **1**(2): p. 101-7.
99. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. *J Cell Physiol*, 2000. **182**(3): p. 311-22.
100. Schluter, C., et al., *The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins*. *J Cell Biol*, 1993. **123**(3): p. 513-22.
101. Endl, E. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function*. *Exp Cell Res*, 2000. **257**(2): p. 231-7.
102. Kreitz, S., et al., *The proliferation-specific human Ki-67 protein is a constituent of compact chromatin*. *Exp Cell Res*, 2000. **261**(1): p. 284-92.
103. Brown, D.C. and K.C. Gatter, *Ki67 protein: the immaculate deception?* *Histopathology*, 2002. **40**(1): p. 2-11.
104. Miguel-Garcia, A., et al., *Circulating Ki67 positive lymphocytes in multiple myeloma and benign monoclonal gammopathy*. *J Clin Pathol*, 1995. **48**(9): p. 835-9.
105. Raty, R., et al., *Ki-67 expression level, histological subtype, and the International Prognostic Index as outcome predictors in mantle cell lymphoma*. *Eur J Haematol*, 2002. **69**(1): p. 11-20.
106. Jalava, P., et al., *Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index*. *Histopathology*, 2006. **48**(6): p. 674-82.
107. Cordone, I., E. Matutes, and D. Catovsky, *Characterisation of normal peripheral blood cells in cycle identified by monoclonal antibody Ki-67*. *J Clin Pathol*, 1992. **45**(3): p. 201-5.

108. Bryant, R.J., P.M. Banks, and D.P. O'Malley, *Ki67 staining pattern as a diagnostic tool in the evaluation of lymphoproliferative disorders*. *Histopathology*, 2006. **48**(5): p. 505-15.
109. Katzenberger, T., et al., *The Ki67 proliferation index is a quantitative indicator of clinical risk in mantle cell lymphoma*. *Blood*, 2006. **107**(8): p. 3407.
110. Jothilingam, P., D. Basu, and T.K. Dutta, *Angiogenesis and proliferation index in patients with acute leukemia: a prospective study*. *Bone Marrow Res*, 2014. **2014**: p. 634874.
111. Padro, T., et al., *Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2000. **95**(8): p. 2637-44.
112. Aguayo, A., et al., *Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes*. *Blood*, 2000. **96**(6): p. 2240-5.
113. Hussong, J.W., G.M. Rodgers, and P.J. Shami, *Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2000. **95**(1): p. 309-13.
114. Trujillo, A., C. McGee, and C.R. Cogle, *Angiogenesis in acute myeloid leukemia and opportunities for novel therapies*. *J Oncol*, 2012. **2012**: p. 128608.
115. Keith, T., et al., *Regulation of angiogenesis in the bone marrow of myelodysplastic syndromes transforming to overt leukaemia*. *Br J Haematol*, 2007. **137**(3): p. 206-15.
116. Litwin, C., et al., *Role of the microenvironment in promoting angiogenesis in acute myeloid leukemia*. *Am J Hematol*, 2002. **70**(1): p. 22-30.
117. Martyre, M.C., *Critical review of pathogenetic mechanisms in myelofibrosis with myeloid metaplasia*. *Curr Hematol Rep*, 2003. **2**(3): p. 257-63.
118. Steunou, V., et al., *Altered transcription of the stem cell leukemia gene in myelofibrosis with myeloid metaplasia*. *Leukemia*, 2003. **17**(10): p. 1998-2006.
119. Martyre, M.C., et al., *Lack of alteration in GATA-1 expression in CD34+ hematopoietic progenitors from patients with idiopathic myelofibrosis*. *Blood*, 2003. **101**(12): p. 5087-8; author reply 5088-9.
120. Metzeler, K.H., et al., *DNMT3A mutations and response to the hypomethylating agent decitabine in acute myeloid leukemia*. *Leukemia*, 2012. **26**(5): p. 1106-7.
121. Ley, T.J., et al., *DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(25): p. 2424-33.
122. Helgestad, J., et al., *Bone marrow aspiration technique may have an impact on therapy stratification in children with acute lymphoblastic leukaemia*. *Pediatr Blood Cancer*, 2011. **57**(2): p. 224-6.
123. Stone, R.M., *Should the presence of minimal residual disease (MRD) in morphologic complete remission alter post-remission strategy in AML?* *Best Pract Res Clin Haematol*, 2011. **24**(4): p. 509-14.
124. Arellano, M., et al., *Early clearance of peripheral blood blasts predicts response to induction chemotherapy in acute myeloid leukemia*. *Cancer*, 2012. **118**(21): p. 5278-82.
125. Bertoli, S., et al., *Prognostic impact of day 15 blast clearance in risk-adapted remission induction chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: long-term results of the multicenter prospective LAM-2001 trial by the GOELAMS study group*. *Haematologica*, 2014. **99**(1): p. 46-53.
126. Lee, S.H., et al., *ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports*. *Int J Lab Hematol*, 2008. **30**(5): p. 349-64.

127. Liso, V., et al., *Bone marrow aspirate on the 14th day of induction treatment as a prognostic tool in de novo adult acute myeloid leukemia*. *Haematologica*, 2000. **85**(12): p. 1285-90.
128. Hussein, K., et al., *Day 14 bone marrow biopsy in predicting complete remission and survival in acute myeloid leukemia*. *Am J Hematol*, 2008. **83**(6): p. 446-50.
129. Luger, S.M., *Is a nadir bone marrow required and, if so, what to do with residual disease?* *Best Pract Res Clin Haematol*, 2011. **24**(4): p. 527-32.
130. Mattison, R.J., S.M. Luger, and H.M. Lazarus, *New strategies for the evaluation of the nadir bone marrow following induction in acute myeloid leukemia*. *Curr Opin Hematol*, 2013. **20**(2): p. 93-9.
131. Percival, M.E., et al., *Bone marrow evaluation for diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia*. *Blood Rev*, 2017.
132. Pullarkat, V. and I. Aldoss, *Prognostic and therapeutic implications of early treatment response assessment in acute myeloid leukemia*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2015. **95**(1): p. 38-45.
133. Campuzano-Zuluaga, G., et al., *Routine interim disease assessment in patients undergoing induction chemotherapy for acute myeloid leukemia: Can we do better?* *Am J Hematol*, 2016. **91**(3): p. 277-82.
134. Haferlach, T., et al., *A new prognostic score for patients with acute myeloid leukemia based on cytogenetics and early blast clearance in trials of the German AML Cooperative Group*. *Haematologica*, 2004. **89**(4): p. 408-18.
135. Morris, T.A., et al., *Re-induction therapy decisions based on day 14 bone marrow biopsy in acute myeloid leukemia*. *Leuk Res*, 2013. **37**(1): p. 28-31.
136. Mrozek, K., et al., *Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(36): p. 4515-23.
137. Brothman, A.R., D.L. Persons, and L.G. Shaffer, *Nomenclature evolution: Changes in the ISCN from the 2005 to the 2009 edition*. *Cytogenet Genome Res*, 2009. **127**(1): p. 1-4.
138. Torlakovic, E.E., et al., *ICSH guidelines for the standardization of bone marrow immunohistochemistry*. *Int J Lab Hematol*, 2015. **37**(4): p. 431-49.
139. Arellano, M., et al., *Prognostic significance of leukopenia at the time of diagnosis in acute myeloid leukemia*. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2011. **11**(5): p. 427-32.
140. Khalil, F., et al., *The criteria for bone marrow recovery post-myelosuppressive therapy for acute myelogenous leukemia: a quantitative study*. *Arch Pathol Lab Med*, 2007. **131**(8): p. 1281-9.
141. Norkin, M., et al., *A new model to predict remission status in AML patients based on day 14 bone marrow biopsy*. *Leuk Res*, 2016. **46**: p. 69-73.
142. Ciurea, S.O., et al., *Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis*. *Blood*, 2007. **110**(3): p. 986-93.
143. Madlambayan, G.J., et al., *Leukemia regression by vascular disruption and antiangiogenic therapy*. *Blood*, 2010. **116**(9): p. 1539-47.
144. Reale, A., et al., *Functional and Biological Role of Endothelial Precursor Cells in Tumour Progression: A New Potential Therapeutic Target in Haematological Malignancies*. *Stem Cells Int*, 2016. **2016**: p. 7954580.
145. Hou, H.A., et al., *Changes in magnetic resonance bone marrow angiogenesis on day 7 after induction chemotherapy can predict outcome of acute myeloid leukemia*. *Haematologica*, 2010. **95**(8): p. 1420-4.

146. Terwijn, M., 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**(31): p. 3889-97.
147. Zeijlemaker, W., et al., *Absence of leukaemic CD34 cells in acute myeloid leukaemia is of high prognostic value: a longstanding controversy deciphered.* Br J Haematol, 2015.
148. Jain, S., M. Mahapatra, and H.P. Pati, *CD34 immunohistochemistry in bone marrow biopsies for early response assessment in acute myeloid leukemia.* Int J Lab Hematol, 2015. **37**(6): p. 746-51.
149. Braun, S., H.H. Gerhartz, and H.M. Schmetzer, *Cytokines can reduce clonal, CD34-positive cells in acute myeloid leukemia in vitro.* Ann Hematol, 2000. **79**(7): p. 363-73.
150. Kawakita, M., et al., *Soluble c-kit molecule in serum from healthy individuals and patients with haemopoietic disorders.* Br J Haematol, 1995. **91**(1): p. 23-9.
151. Advani, A.S., et al., *Increased C-kit intensity is a poor prognostic factor for progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed AML.* Leuk Res, 2008. **32**(6): p. 913-8.
152. Jaroslav, P., et al., *Expression of cyclins D1, D2, and D3 and Ki-67 in Leukemia.* Leuk Lymphoma, 2005. **46**(11): p. 1605-1612.
153. Nowicki, M., D. Ostalska-Nowicka, and B. Miskowiak, *Prognostic significance of Ki67-negative blast cell clone in the high risk group of children treated for acute myeloid leukaemia.* Folia Histochem Cytobiol, 2006. **44**(1): p. 49-52.
154. Sun, Y., et al., *Robust Ki67 detection in human blood by flow cytometry for clinical studies.* Bioanalysis, 2016. **8**(23): p. 2399-2413.

## 10. Streszczenie

Ostra białaczka szpikowa (AML ang. Acute Myeloid Leukemia,) to jeden z najczęstszych nowotworów układu krwiotwórczego w populacji osób dorosłych. Istota choroby sprowadza się do klonalnego, niekontrolowanego wzrostu zmienionej nowotworowo komórki hematopoetycznej. Poszukując metod optymalizacji leczenia chorych na AML powrócono do idei wczesnej oceny wyników terapii. Indywidualna ocena sytuacji chorego już na wczesnym etapie leczenia stała się standardem uznanym przez międzynarodowe towarzystwa naukowe – NCCN - (ang. National Comprehensive Cancer Network) i ELN (ang. European Leukemia Net.) Wybór optymalnego czasu i sposobu oceny to zagadnienie od kilku lat niezwykle szeroko komentowane. W literaturze brak jednolitych standardów postępowania w tym zakresie. Badanie cytologiczne szpiku i ocena redukcji liczby blastów to narzędzie diagnostyczne wykorzystane w większości opracowań. Ocena cytologiczna u znacznego odsetka chorych - w związku z ubogokomórkowym szpikiem na tym etapie terapii - nie zawsze przynosi rozstrzygające informacje. Biorąc pod uwagę powyższe zastrzeżenia w niniejszej pracy postanowiono wykorzystać trepanobiopsję (TB) - badanie cechujące się większą czułością niż biopsja aspiracyjna cienkoigłowa (BAC) - jako narzędzie wczesnej oceny efektów terapii. Zgodnie z modelami przyjętymi przez NCCN i ELN za czas wykonania oceny przyjęto okres od +7 do +10 doby po kuracji indukującej remisję.

Celem pracy była analiza przydatności zastosowania TB dla wczesnej oceny odpowiedzi na zastosowane leczenie i przewidywanie uzyskania CR. Dla tego samego przedziału czasowego porównano również wartość diagnostyczną oceny cytologicznej szpiku i badania histopatologicznego. Analizowano również przydatność wykorzystania wybranych oznaczeń IH (CD34, Ki67, CD117), ocenę włóknienia oraz angiogenezy w TB w czasie od +7 do +10 doby po zastosowaniu kuracji indukującej. Ponadto, określono progi ilościowe wybranych oznaczeń immunohistochemicznych (CD34, Ki67, CD117) w TB wykonanej czasie wczesnej oceny dla prognozowania uzyskania CR.

Ocenie poddano 56 pacjentów z ustalonym rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej, leczonych w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku w Poznaniu

w latach 2007-2014 (30 kobiet i 26 mężczyzn w wieku od 18 do 63 lat; ze średnią wieku  $47,9 \pm 11,8$  lat). Rozpoznanie choroby ustalano na podstawie kryteriów morfologiczno - cytochemicznych, zgodnie z klasyfikacją FAB. W grupie ocenianych osób dominował typ  $M_2$  (30 osób). Profil ryzyka cytogenetyczno - molekularnego określano wg definicji ELN - najliczniejszą grupę pacjentów stanowiły osoby z profilem niekorzystnym (21 osób) i pośrednim - 2 (19 osób). W momencie diagnozy oceniano kompleksowo rozmaz krwi obwodowej, cytologię, cytometrię szpiku, trepanobioptat oraz wykonywano badania cytogenetyczne i molekularne wg zaleceń ELN. Badanie trepanobioptatu przeprowadzano według przyjętych zaleceń ICSH. Wszyscy pacjenci leczeni byli według jednolitego programu, który składał się z arabinozydu cytozyny w dawce  $200 \text{ mg/m}^2$  przez 7 dni (1-7) i daunorubicyny w dawce  $60 \text{ mg/m}^2$  podawanej przez 3 dni (1-3). W okresie od +7 do +10 doby od zakończenia chemioterapii indukującej remisję oceniano odpowiedź na zastosowaną terapię, w tym celu ponawiano ocenę rozmazu krwi obwodowej i szpiku oraz pobierano materiał do badania histopatologicznego.

Wyniki badań poddano ocenie statystycznej z wykorzystaniem pakietu statystycznego STATISTICA 10 PL. Za statystycznie istotne przyjęto te wyniki, dla których poziom istotności  $p$  był poniżej 0,05.

Po leczeniu indukującym remisję całkowitą stwierdzono u 60,8% pacjentów (34 osoby). W okresie od +7 do +10 doby po terapii wykazano, że u chorych ze stwierdzoną opornością komórkowość wyniosła średnio  $45,5\% \pm 41,5\%$  (mediana 30%), a u pacjentów osiągających CR  $26,8 \pm 34,3\%$  (mediana 5%), różnica ta była istotna statystycznie ( $p < 0,05$ ). W okresie przed włączeniem chemioterapii i we wczesnym okresie po chemioterapii średnie liczby niedojrzałych komórek w TB wyniosły odpowiednio  $73,2 \pm 25,4\%$  i  $23,3 \pm 36,9$  ( $p < 0,05$ ). Ponadto, w momencie wczesnej oceny wyższy odsetek komórek blastycznych (powyżej 5%) częściej obserwowano u pacjentów z opornością po I indukcji niż u osób osiągających remisję całkowitą ( $p < 0,05$ ). Analiza oznaczeń immunohistochemicznych CD34+, CD117 i Ki67 wykazała, że w porównaniu do okresu sprzed leczenia w momencie wczesnej oceny średnie wartości wymienionych parametrów wynosiły odpowiednio  $33,9 \pm 32,6\%$  vs  $18,0 \pm 29,0\%$ ,  $47,5 \pm 32,8\%$  vs  $20,1 \pm 31,1\%$  oraz  $39,2 \pm 27,9$  vs  $21,8 \pm 25,3\%$ , w każdej

z analizowanych zależności różnice były znamienne statystycznie ( $p < 0,05$ ). W momencie przeprowadzania wczesnej oceny (+7 do +10 doba po leczeniu), wyższy niż 5% odsetek komórek CD34<sup>+</sup> i CD117 oraz wyższy niż 30% odsetek Ki67 częściej obserwowano u pacjentów z opornością po I indukcji niż u osób osiągających remisję całkowitą ( $p < 0,05$ ). Włóknienie oceniano w trepanobiopsji w momencie postawienia diagnozy i w czasie wczesnej oceny po chemioterapii – w analizowanej grupie u 38 osób (67,9%) pozostało na stałym poziomie. Nasilenie angiogenezy u wszystkich pacjentów było wyższe w momencie rozpoznania AML niż po zastosowanej chemioterapii - różnica ta była istotna statystycznie ( $p < 0,05$ ). W grupie 34 pacjentów z remisją całkowitą po I indukcji, nasilenie angiogenezy wynosiło średnio  $11,1 \pm 18,5$  naczyń /  $\text{mm}^2$  (mediana 0,0), a u chorych z opornością kształtowało się na poziomie  $12,2 \pm 15,4$  naczyń /  $\text{mm}^2$  (mediana 8,0). Poziom nasilenia angiogenezy był wyższy u pacjentów ze stwierdzoną opornością niż u pacjentów osiągających remisję całkowitą, jednakże różnica ta nie była istotna statystycznie ( $p > 0,05$ ). Analizowane czynniki - liczba komórek blastycznych, a w zakresie oznaczeń immunohistochemicznych: odsetek komórek CD34<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup> i Ki67 – okazały się istotnymi statystycznie ( $p < 0,05$ ) czynnikami predykcyjnymi osiągnięcia remisji całkowitej. Analiza porównawcza wyników trepanobiopsji i oceny cytologicznej szpiku w zakresie parametru: „liczba blastów” wykazała, że wyznaczone wielkości pól AUC były większe dla trepanobiopsji niż dla oceny cytologicznej szpiku ( 0,785 vs 0,617),  $p < 0,05$ . Analiza krzywej ROC pozwoliła na wyznaczenie optymalnych punktów odcięcia dla poszczególnych ocenianych zmiennych. – liczby blastów, komórek CD34<sup>+</sup>, Ki67<sup>+</sup> i CD117<sup>+</sup>.

Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie tezy, że ocena histologii szpiku wsparta badaniami immunohistochemicznymi, przeprowadzona w + 7 do + 10 dobie po zakończeniu chemioterapii indukującej remisję, jest użytecznym narzędziem diagnostycznym pozwalającym z dużym prawdopodobieństwem przewidzieć uzyskanie remisji u chorych na ostrą białaczkę szpikową. Pacjenci, u których stwierdzono remisję całkowitą mieli znamienne statystycznie dłuższy całkowity czas przeżycia. Nie wykazano przydatności prognostycznej oceny angiogenezy. Stwierdzono ponadto, że w momencie wczesnej oceny (+7 do + 10 doba po kuracji



indukującej remisję) materiał pobrany w trakcie TB posiada większą wartość diagnostyczną w porównaniu do;2 oceny cytologicznej szpiku pozyskanego z biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej.

## 10.1 Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is one of the most common hematopoietic disease in the population of adult patients. The essence of the disease lies in the clonal, uncontrolled growth of the cancer-transformed hematopoietic cell. Looking for methods of optimizing treatment of patients with AML, the idea of early assessment of treatment results was returned. Individual assessment of the patient's status at an early stage of treatment has become a standard considered by international scientific societies – NCCN- (National Comprehensive Cancer Network) and ELN (European Leukemia Net). Optimal assessment of disease activity is a widely discussed topic. In the literature, there are no uniform standards of proceedings in this issue. In most of the studies cytological examination of the bone marrow and assessment of the reduction in the number of blasts is a diagnostic tool. Cytologic evaluation in a significant percentage of patients - in relation to the low cellularity of bone marrow at this stage of therapy - does not always yield conclusive information. Considering the above-mentioned reservations, in this paper we decided to use trephine biopsy - a test characterized by greater sensitivity than a needle aspiration biopsy - as a tool for early assessment of the effects of therapy. According to the models adopted by NCCN and ELN, the period from +7 to +10 days after the remission-inducing treatment was accepted as the time of the assessment.

The aim of the study was to analyze the utility of trephine biopsy for early assessment of response to treatment and prediction of complete remission. For the same time interval, the diagnostic value of the marrow cytology assessment and histopathological examination was also compared. The utility of selected immunohistochemical assays (CD34, Ki67, CD117), assessment of fibrosis and angiogenesis in trephine biopsy from +7 to +10 days after induction treatment was also analyzed. In addition, quantitative thresholds for selected immunohistochemical determinations (CD34, Ki67, CD117) in trephine biopsy were made at the early assessment time for predicting occurrence of complete remission.

The evaluation included 56 patients with the diagnosis of acute myeloid leukemia, treated in the Department of Hematology and Marrow Transplant in Poznań in 2007-2014 (30 women and 26 men aged 18 to 63 years, with an average age of  $47.9 \pm 11.8$  years). Diagnosis of the disease was based on morphological and cytochemical criteria, according to the FAB classification. The M2 type was dominated in the group of assessed persons (30 people). The cytogenetic and molecular risk profile was determined according to the ELN definition - the majority of patients belonged to the with unfavorable profile - 21 people and intermediate-2 - 19. At the time of diagnosis, peripheral blood smear, cytology, bone marrow cytometry, trepanobiopsy were assessed comprehensively and cytogenetic and molecular tests were performed due to ELN recommendations. The trephine biopsy study was carried out according to the adopted ICSH recommendations. All patients were treated according to a homogeneous program that consisted of arabinoside cytosine at a dose of 200 mg / m<sup>2</sup> for 7 days (1-7) and daunorubicin at a dose of 60 mg / m<sup>2</sup> administered for 3 days (1-3). In the period from +7 to +10 days from the end of remission-inducing chemotherapy, the response to the applied therapy was evaluated, for this purpose the evaluation of peripheral blood and marrow smears was repeated and the trephine biopsy was taken

The results of the study were statistically evaluated using the statistical package STATISTICA 10 PL. Statistically significant were those results for which the significance level  $p$  was  $\leq 0.05$ . After the induction of total remission, 60.8% of patients (34 people) were diagnosed. In the period from +7 to +10 days after therapy, it was shown that in patients with confirmed resistance, the average cellular disease was  $45.5\% \pm 41.5\%$  (median 30%), and in patients achieving complete remission  $26.8 \pm 34.3\%$  (median 5%), this difference was statistically significant ( $p < 0.05$ ). In the pre-chemotherapy period and in the early post-chemotherapy period, the mean number of immature cells in trephine biopsy was  $73.2 \pm 25.4\%$  and  $23.3 \pm 36.9$ , respectively ( $p < 0.05$ ). In addition, at the time of early assessment, a higher percentage of blasts (more than 5%) was more frequently observed in patients with resistance after

induction than in those achieving total remission ( $p < 0.05$ ). The analysis of immunohistochemical assays of CD34 +, CD117 and Ki67 showed that compared to the pre-treatment period at the time of early assessment, mean values of these parameters were  $33.9 \pm 32.6\%$  vs  $18.0 \pm 29.0\%$ ,  $47.5 \pm 32$ , respectively. ,  $8\%$  vs  $20.1 \pm 31.1\%$  and  $39.2 \pm 27.9$  vs.  $21.8 \pm 25.3\%$ , in each of the analyzed relationships  $p < 0.05$ . At the time of the early assessment (+7 to +10 days after treatment), higher than 5% of CD34 + and CD117 cells and more than 30% of Ki67 were more frequently observed in patients with resistance after induction than in those achieving total remission ( $p < 0.05$ ). Fibrosis was assessed in trephine biopsy at the time of the diagnosis and during the early post-chemotherapy assessment - in the analyzed group, 38 patients (67.9%) remained stable ( $p < 0.05$ ). The severity of angiogenesis in all patients was higher at the time of diagnosis of AML than after chemotherapy - the difference was statistically significant ( $p < 0.05$ ). In the group of 34 patients with total remission after the first induction, the intensity of angiogenesis was on average  $11.1 \pm 18.5$  vessels / mm<sup>2</sup> (median 0.0), and in patients with resistance was  $12.2 \pm 15.4$  vessels / mm<sup>2</sup> (median 8.0). The level of angiogenesis was higher in patients with established resistance than in patients achieving total remission, however, this difference was not statistically significant ( $p > 0.05$ ).

The analyzed factors - the number of blastic cells, and immunohistochemical tests: the percentage of CD34 + cells, CD117 + and Ki67 - turned out to be statistically significant ( $p < 0.05$ ) predictive factors for achieving complete remission. A comparative analysis of the trephine biopsy results and cytological assessment of the bone marrow in the scope of the "blasts number" parameter showed that the determined half AUC values were greater for trephine biopsy than for the marrow cytology assessment (0.785 vs. 0.617),  $p < 0.05$ . The analysis of the ROC curve allowed to determine the optimal cut-off points for individual assessed variables. - number of blasts, CD34+ cells, Ki67+ and CD117+. The obtained results allowed to formulate the thesis that the assessment of marrow histology supported by immunohistochemical

studies, carried out on the 7th to 10th day after the end of remission-inducing chemotherapy, is a useful diagnostic tool allowing to predict remission in patients with acute myeloid leukemia with high probability. Patients who had complete remission had statistically significantly longer OS. The prognostic assessment of angiogenesis and the level of bone marrow fibrosis has not been demonstrated. It was also found that at the time of the early assessment (+7 to + 10 a day after the remission-inducing treatment) the material collected during trephine biopsy has a higher diagnostic value compared to the cytological assessment of the bone marrow derived from a fine-needle aspiration biopsy.

## **Aneks**

### **Technika wykonania badania**

Do zabiegu trepanobiopsji szpiku chorego układa się na boku lub na brzuchu. Po odpowiednim ułożeniu pacjenta, należy odszukać kolec biodrowy tylny górny. Następnie skóra nad planowanym miejscem zabiegu przemywana jest i wyjaławiana 70% etanolem lub 0,5% chlorheksydyną. Kolejny etap zabiegu stanowi znieczulenie miejscowe skóry, tkanki podskórnej i okostnej roztworem 2% lignokainy. Zazwyczaj po ok. 10–15 minutach igła do TB wprowadzana jest prostopadle do powierzchni ciała. Po przebicciu okostnej i warstwy korowej kości usuwany jest mandryn, a igła wprowadzana jest dalej ruchem półobrotowym na głębokość od 2 do 3 cm. Kolejny etap stanowi użycie elementu chwytanego, który przytrzyma i ustabilizuje fragment kostny i zapobiegnie jego przesunięciu. Zabieg kończy usunięcie igły ruchem obrotowym z kości. Miejsce interwencji należy zdezynfekować i założyć opatrunek uciskowy na 48 godzin.

Pozyskany fragment szpiku wypycha się mandrynem, wkładając go do kolca dystalnego igły. Pobrany trepanobiopiat posiada kształt cylindra o wymiarach ok. 2-3 mm x 18-30 mm.

Powikłania po trepanobiopsji występują rzadko, do najczęstszych należą ból i krwawienie.

Pobrany fragment materiału powinien mieć długość co najmniej 1 cm, u chorych na chłoniaki część autorów zaleca pobranie co najmniej 2 cm fragmentu kostnego lub biopsję z obydwu koleców biodrowych. Długość fragmentu kostnego koreluje pozytywnie z potwierdzeniem naczenia szpiku w przypadku chłoniakówziarniczych i nieziarniczych.

Uzyskany materiał poddawany jest procesowi obróbki, celem uzyskania preparatu histopatologicznego gotowego do bezpośredniej oceny pod mikroskopem.

Kolejne etapy opracowywania materiału uzyskanego z TB to:

- Utrwalanie
- Płukanie
- Odwadnianie
- Przeprowadzenie przez płyny pośrednie
- Zatapanie w parafinie
- Skrawanie na mikrotomie
- Odparafinowanie skrawków
- Barwienie skrawków