

Aleksandra Bogucka-Fedorczuk

**Wpływ wybranych parametrów klinicznych  
i molekularnych na efektywność mobilizacji  
komórek macierzystych szpiku**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji  
Szpiku, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Promotor: prof. dr hab. Tomasz Wróbel

Wrocław, 2023

Składam serdeczne podziękowania Panu Promotorowi prof. dr hab. Tomaszowi Wróblowi za opiekę naukową, cenne uwagi oraz motywację.

Wyrazy wdzięczności kieruję w stronę mojej Rodziny, w szczególności Męża i Syna, za inspirację, cierpliwość i wsparcie okazane w trakcie powstawania niniejszej pracy.

*Aleksandra Bogucka- Fedorczyk*

## SPIS TREŚCI

1. WSTĘP.....	8
1.1. Nowotwory układu chłonnego.....	8
1.2. AutoHSCT.....	12
1.3. Mobilizacja HSC.....	14
1.3.1. Znaczenie mobilizacji HSC.....	14
1.3.2. Molekularne podłoże mobilizacji HSC.....	14
1.3.3. Procedura mobilizacji HSC.....	16
1.3.4. Separacja HSC i skuteczność mobilizacji.....	17
1.4. MikroRNA.....	18
1.4.1. Ogólna charakterystyka mikroRNA.....	18
1.4.2. MiR w hematopoezie.....	20
2. CELE I ZAŁOŻENIA.....	22
3. MATERIAŁ I METODY.....	23
3.1. Grupa badana.....	23
3.2. Mobilizacja HSC.....	25
3.2.1. Przebieg mobilizacji HSC.....	25
3.2.2. Badania kontrolne i ocena powikłań mobilizacji HSC.....	26
3.2.3. Pobieranie materiału i ocena stężenia komórek HSC.....	27
3.2. Pobieranie materiału i ocena ekspresji miR.....	28
3.3. Metody statystyczne.....	29
4. WYNIKI.....	31
4.1. Skuteczność mobilizacji HSC.....	31
4.1.1. Ogólna skuteczność mobilizacji HSC.....	31
4.1.2. Skuteczność mobilizacji a parametry kliniczne.....	32
4.1.3. Skuteczność mobilizacji a parametry laboratoryjne.....	37
4.1.4. Toksyczność narządowa i hematologiczna.....	38
4.1.5. Skuteczność mobilizacji a stężenie miR.....	38
4.2. Zależność pomiędzy stężeniem badanych miR a czynnikami wpływającymi na mobilizację HSC.....	41
4.2.1. Stężenie miR a parametry kliniczne.....	42
4.2.2. Stężenie miR a parametry laboratoryjne.....	43

5. DYSKUSJA .....	45
6. WNIOSKI.....	58
7. STRESZCZENIE .....	59
8. ABSTRACT .....	62
9. BIBLIOGRAFIA.....	65
10. SPIS TABEL.....	74
11. SPIS RYCIN .....	74

## WYKAZ SKRÓTÓW

<b>ABC</b>	aktywowane komórki B (ang. activated B-cell)
<b>Ago</b>	białko Argonaut (ang. Argonaut protein)
<b>Angptl4</b>	białko angiopoetynopodobne 4 (ang. angiopoietin-like protein 4)
<b>Ara-C</b>	arabinozy cytozyny (ang. cytosine arabinoside)
<b>AutoHSCT</b>	autologiczne przeszczepienie krwiotwórczych komórek macierzystych (ang. autologous hematopoietic cells transplantation)
<b>BCR</b>	receptor limfocyta B (ang. B-cell receptor)
<b>BIC</b>	klaster integracji limfocytów B (ang. B-cell integration cluster)
<b>BMI</b>	wskaźnik masy ciała (ang. body mass index)
<b>CAR-T</b>	limfocyty T z chimerowym receptorem antygenowym (ang. chimeric antigen receptor T cells)
<b>CIBMTR</b>	Centrum Międzynarodowych Badań Naukowych nad Transplantacją Krwi i Szpiku (ang. Center for International Blood and Marrow Transplant Research)
<b>CLL</b>	przewlekła białaczka limfocytowa (ang. chronic lymphocytic leukemia)
<b>CPD</b>	cyklofosfamid (ang. cyclophosphamide)
<b>CR</b>	całkowita remisja (ang. complete remission)
<b>CRP</b>	białko C-reaktywne (ang. C-reactive protein)
<b>CTCAE v6.0</b>	powszechne kryteria terminologii dla zdarzeń niepożądanych wersja 6.0 (ang. Common Terminology Criteria for Adverse Events Version 6.0)
<b>CXCL12</b>	receptor chemokinowy o motywie CXC (ang. C-X-C motif chemokine 12)
<b>DdPCR</b>	kropelkowo-emulsyjna reakcja łańcuchowej polimerazy, (ang. droplet digital PCR).
<b>DEPTOR</b>	białko zawierające domenę DEP oddziałujące z mTOR (ang. DEP domain-containing mTOR-interacting protein)
<b>DLBCL</b>	chłoniak rozlany z dużych limfocytów B (ang. diffuse large B-cell lymphoma)
<b>EBMT</b>	Europejskie Towarzystwo ds. Przeszczepiania Krwi i Szpiku (ang. European Society for Blood and Marrow Transplantation)

<b>FL</b>	chłoniak grudkowy (ang. follicular lymphoma)
<b>FN</b>	gorączka neutropeniczna (ang. febrile neutropenia)
<b>G-CSF</b>	czynnik wzrostu kolonii granulocytów (ang. granulocyte colony stimulating factor)
<b>HGB</b>	hemoglobina (ang. hemoglobin)
<b>HGBL</b>	chłoniak o wysokim stopniu złośliwości z komórek B (ang. high-grade B-cell lymphoma)
<b>HIV</b>	ludzki wirus upośledzenia odporności (ang. human immunodeficiency virus)
<b>HIV</b>	ludzki wirus upośledzenia odporności (ang. human immunodeficiency virus).
<b>HL</b>	chłoniak Hodgkina (ang. Hodgkin lymphoma)
<b>HSCs</b>	krwiotwórcze komórki macierzyste (ang. hematopoietic stem cells)
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	interferon $\gamma$ (ang. interefrone $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )
<b>IGFBP-2</b>	insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. insuline like growth factor binding protein)
<b>IL</b>	Interleukina (ang. interleukin)
<b>ILSG</b>	Międzynarodowa Grupa Badawcza Chłoniaków (ang. International Lymphoma Study Group)
<b>IMGW</b>	Międzynarodowa Grupa Robocza ds. Szpiczaka (ang. International Myeloma Working Group)
<b>KKCz</b>	koncentrat krwinek czerwonych
<b>KKP</b>	koncentrat krwinek płytkowych
<b>LPS</b>	lipopolisacharydy (ang. lipopolysacharides)
<b>MCL</b>	chłoniak z komórek płaszczka (ang. mantle cell lymphoma)
<b>miR</b>	mikroRNA (ang. micro RNA)
<b>MM</b>	szpiczak plazmocytowy (ang. multiple myeloma)
<b>mRNA</b>	informacyjny RNA (ang. messengerRNA )
<b>mTOR</b>	ssaczy cel rapamycyny (ang. mammalian target of rapamycin)
<b>NEUT</b>	neutrofile (ang. nutrophils)

<b>NHL</b>	chłoniak nie-Hodgkin (ang. non-Hodgkin lymphoma)
<b>PLT</b>	płytki krwi (ang. platelets)
<b>PM</b>	pacjenci, u których mobilizacja była nieskuteczna (ang. poor mobilizers)
<b>PMBL</b>	pierwotny chłoniak śródpiersia z dużych komórek B (ang. primary mediastinal large B-cell lymphoma)
<b>PPAR<math>\delta</math></b>	receptor $\delta$ aktywowany przez proliferatory peroksysomów (ang., peroxisome proliferator-activated receptor $\delta$ )
<b>PR</b>	częściowa odpowiedź (ang. partial remission)
<b>pre-miR</b>	prekursorowy mikroRNA (ang. precursor-micro RNA )
<b>pri-miR</b>	pierwotny mikroRNA (ang. primary-microRNA)
<b>PTPN9</b>	niereceptorowa fosfataza białkowo-tyrozynowa typu 9 (ang. tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 9)
<b>PUFA</b>	wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. $\omega$ 3-polyunsaturated fatty acids)
<b>RS</b>	komórki Reed-Sternberga (ang. Reed-Sternberg cells)
<b>RT-qPCR</b>	reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (ang. reverse transcription quantitative polymerase chain reaction)
<b>SCF</b>	czynnik komórek macierzystych (ang. stem cell factor)
<b>SDF-1</b>	czynnik pochodzenia zrębowego-1 (ang. stromal cell derived factor 1)
<b>Th</b>	limfocyty pomocnicze (ang. T helper lymphocytes)
<b>TLR</b>	receptor toll-podobny (ang. toll-like receptor)
<b>TNFAIP3</b>	ang. tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	czynnik martwicy nowotworu $\alpha$ (ang. tumor necrosis factor $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )
<b>Treg</b>	limfocyty T regulatorowe (ang. regulatory T lymphocytes)
<b>VCAM-1</b>	naczyniowa cząsteczka adhezyjna (ang. vascular cell adhesion molecule)
<b>WBC</b>	leukocyty (ang. white blood cells)
<b>WHO</b>	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)

# 1. WSTĘP

## 1.1. Nowotwory układu chłonnego.

Nowotwory układu chłonnego to heterogenna grupa chorób, u podłoża których leży klonalny rozrost zmienionej nowotworowo komórki z szeregu rozwojowego limfocytów B, T lub komórek NK.

Próby ujednoczenia systematyzacji chorób limfoproliferacyjnych sięgają lat 90tych XX wieku, kiedy to Międzynarodowa Grupa Badawcza Chłoniaków (ang. International Lymphoma Study Group, ILSG) wprowadziła klasyfikację modyfikowaną w kolejnych dekadach przez Światową Organizację Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO). Edycja czwarta klasyfikacji WHO była obowiązującą od roku 2016. Wyróżnia ona ponad 80 jednostek podzielonych według pochodzenia na następujące główne grupy:

- nowotwory limfoidalne z prekursorowych komórek B/T/NK,
- nowotwory z dojrzałych komórek B
- nowotwory z dojrzałych komórek T/NK,
- potransplantacyjne choroby limfoproliferacyjne,
- nowotwory z komórek histiocytarnych i dendrytycznych,
- chłoniak Hodgkina (ang. Hodgkin lymphoma, HL).

Wytyczne klasyfikacji z 2016 roku dotyczące procesu diagnostycznego uwzględniają cechy morfologiczne komórki nowotworowej, jej immunofenotyp a niekiedy także charakterystyczne zmiany cytogenetyczne i molekularne. W zależności stopnia zróżnicowania komórki mamy do czynienia z nowotworami z komórek prekursorowych, czyli wywodzących się z pierwotnych narządów chłonnych (głównie ze szpiku kostnego), bądź dojrzałych pochodzących z obwodowych narządów chłonnych takich jak węzły chłonne czy śledziona. W drugiej grupie znajduje się m.in. szpiczak plazmocytowy (ang. multiple myeloma, MM), choroba, u podłoża której leżą zmiany nowotworowe dojrzałych komórek z linii B – plazmocytów. Ze względu na specyficzne cechy kliniczne MM, jednostka ta zazwyczaj jest analizowana oddzielnie <sup>1,2</sup>.

Chłoniaki ujęte jako nowotwory z prekursorowych komórek B, T lub NK oraz nowotwory z dojrzałych komórek B, T lub NK zaliczane są do tzw. chłoniaków nie-Hodgkin (ang. non-Hodgkin lymphoma, NHL), niegdyś nazywanych chłoniakami nieziarniczymi. Szczegółowy podział nowotworów z dojrzałych limfocytów B ujęto w Tabeli 1.



HL, natomiast, to choroba pochodzenia B-komórkowego, stanowiąca oddzielną grupę, podlegającą dalszemu podziałowi na postać klasyczną i postać guzkową z przewagą limfocytów. Ten typ chłoniaka wyróżnia obecność komórek Reed-Sternberga (RS) w stosunkowo niewielkim nacieku nowotworowym otoczonym komórkami odczynowymi <sup>2</sup>.

Chłoniaki są więc zbiorem dość różnorodnych jednostek różniących się między sobą cechami histologicznymi, przebiegiem, a także sposobem leczenia. W wielu badaniach naukowych stanowi to punkt wyjścia dla oddzielnego analizowania danych uzyskanych w kohortach NHL, HL i MM <sup>3</sup>.

W 2022 roku WHO zaproponowała nową klasyfikację będącą efektem rewizji i uaktualnienia poprzedniej wersji. Piąta edycja kładzie większy nacisk na aspekty molekularne i genetyczne w diagnostyce limfoproliferacji. Jednocześnie, uwzględniając zróżnicowanie możliwości poszczególnych krajów w zakresie zaawansowanej diagnostyki, WHO wyróżnia kryteria podstawowe, a więc niezbędne do rozpoznania kolejnych jednostek chorobowych, oraz kryteria pożądane. Ponadto wprowadzono hierarchizację rozpoznań uwzględniającą kategorię, rodzinę/klasę, typ i podtyp nowotworu. Wprowadzono nowe podtypy niektórych jednostek, jak np. EBV-dodatni i EBV-ujemny Chłonia Burkitta.<sup>4</sup>

**Tabela 1.** Ogólny podział nowotworów limfoproliferacyjnych ze szczegółowym podziałem nowotworów z dojrzałych komórek B - wg klasyfikacji WHO, edycja 4 <sup>2</sup>.

<b>Nowotwory limfoidalne z komórek prekursorowych</b>
<b>Chłoniaki z dojrzałych komórek B</b>
- przewlekła białaczka limfocytowa / chłoniak z małych limfocytów
- białaczka prolimfocytowa B-komórkowa
- śledzionowy chłoniak strefy brzeżnej
- białaczka włochato komórkowa
- śledzionowy B-komórkowy chłoniak/białaczka, nieklasyfikowany
- chłoniak limfoplazmocytowy / makroglobulinemia Waldenströma
- gammapatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu, IgM
- choroby łańcuchów ciężkich

- 
- 
- nowotwory z komórek plazmatycznych
- 
- 
- pozawęzłowy chłoniak strefy brzeżnej MALT
- 
- 
- węzłowy chłoniak strefy brzeżnej
- 
- 
- chłoniak grudkowy
- 
- 
- chłoniak z dużych komórek B z rearanżacją *IRF4*
- 
- 
- pierwotnie skórny chłoniak ośrodków rozmnażania
- 
- 
- chłoniak z komórek płaszczka
- 
- 
- chłoniak rozlany z dużych komórek B, nieokreślony
- 
- 
- chłoniak z dużych komórek B bogaty w komórki T/histiocyty
- 
- 
- pierwotny rozlany chłoniak z dużych komórek B ośrodkowego układu nerwowego
- 
- 
- pierwotnie skórny rozlany chłoniak z dużych komórek B typu kończynowego
- 
- 
- chłoniak rozlany z dużych komórek B, nieokreślony EBV+
- 
- 
- wrzód śluzówkowo-skórny EBV+
- 
- 
- chłoniak rozlany z dużych komórek B związany z przewlekłym stanem zapalnym
- 
- 
- chłoniak rozlany z dużych komórek związany z włóknikiem
- 
- 
- lymphomatoid granulomatosis
- 
- 
- chłoniak pierwotny śródpiersia z dużych komórek B
- 
- 
- chłoniak śródnaczyniowy z dużych komórek B
- 
- 
- chłoniak z dużych komórek B, ALK+
- 
- 
- chłoniak plazma blastyczny
- 
- 
- pierwotny chłoniak wysiękowy
- 
- 
- zespoły limfoproliferacyjne związane z HHV-8
- 
- 
- chłoniak Burkitta
- 
- 
- chłoniak podobny do chłoniaka Burkitta z aberracją 11q
- 
- 
- chłoniak z komórek B o wysokim stopniu złośliwości, z rearanżacjami *MYC* i *BCL2*
- 
- 
- chłoniak z komórek B o wysokim stopniu złośliwości, nieokreślony
- 
-

- 
- 
- chłoniak B-komórkowy nieklasyfikowalny, z cechami pośrednimi między chłoniak komórek B i klasycznym chłoniakiem Hodgkina
- 
- 

Nowotwory z dojrzałych komórek T i NK

---

---

Potransplantacyjne nowotwory limfoproliferacyjne

---

---

Nowotwory z komórek histiocytarnych i dendrytycznych

---

---

Chłoniak Hodgkina

---

---

Z punktu widzenia praktyki klinicznej istotny jest podział nowotworów na indolentne i agresywne, dokonywany na podstawie typowej dynamiki choroby. Nowotwory indolentne charakteryzują się powolnym, często wieloletnim przebiegiem i niejednokrotnie nie wymagają leczenia w chwili rozpoznania. Mają charakter choroby przewlekłej i nawrotowej. W tej grupie znajdują się m.in. przewlekła białaczka limfocytowa (ang. chronic lymphocytic leukemia, CLL) oraz chłoniak grudkowy (ang. follicular lymphoma, FL).

Chłoniaki agresywne, takie jak chłoniak rozlany z dużych limfocytów B (ang. diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL), pierwotny chłoniak śródpiersia z dużych komórek B (ang. primary mediastinal large B-cell lymphoma, PMBL) czy chłoniak o wysokim stopniu złośliwości z komórek B (ang. high-grade B-cell lymphoma, HGBL), cechuje dynamiczny przebieg. Ze względu na wysoką aktywność proliferacyjną komórek nowotworowych, chłoniaki agresywne w większości wykazują dużą wrażliwość na chemioterapię i w przypadku wielu z nich rokowanie co do uzyskania trwałej remisji po zastosowaniu pierwszej linii chemioterapii są dobre <sup>1</sup>. Specyficznym rodzajem chłoniaka agresywnego jest chłoniak z komórek płaszczu (ang. mantle cell lymphoma, MCL) łączący w sobie także cechy chłoniaków indolentnych, takie jak nawrotowy charakter.

Spodziewany przebieg procesu chorobowego w oczywisty sposób wpływa na wybór ścieżki terapeutycznej, w tym na decyzję o przeprowadzeniu bądź nie autologicznego przeszczepienia krwiotwórczych komórek macierzystych szpiku (ang. autologous hematopoietic stem cell transplantation, autoHSCT).

## 1.2. AutoHSCT.

AutoHSCT to procedura, która znalazła swoje zastosowanie w terapii wielu chemiowrażliwych nowotworów hematologicznych.

Dawki rutynowo stosowanej chemioterapii limitowane są przez jej działanie mielotoksyczne. Skuteczność terapeutyczna autoHSCT wynika z możliwości podania wysokodawkowej chemioterapii o dużym potencjale przeciwnowotworowym, która jednocześnie działa mieloablacyjnie, nieodwracalnie uszkadzając komórki szpiku kostnego. Do cytostatyków o takim działaniu należą m. in. melfalan i karmustyna. Celem umożliwienia rekonstrukcji układu hematopoetycznego po zastosowanej mega chemioterapii, pacjentowi podawane są hematopoetyczne komórki macierzyste (ang. hematopoietic stem cells HSC) w postaci infuzji dożylniej<sup>5</sup>. W przypadku autoHSCT, HSC pochodzą od samego chorego i pobierane są jeszcze przed przyjęciem do oddziału transplantacyjnego a następnie mrożone i przechowywane w ciekłym azocie do czasu przeszczepienia.

To właśnie opracowanie sposobów krioprezewacji komórek hematopoetycznych umożliwiło wykonanie ich pierwszego autologicznego przeszczepienia w 1976 roku. Wówczas był to przeszczep HSC pobranych ze szpiku kostnego pacjenta. Zaledwie 10 lat później po raz pierwszy przeprowadzono autoHSCT poprzedzony pobraniem komórek hematopoetycznych z krwi obwodowej – wówczas jeszcze bez użycia czynników stymulujących<sup>6</sup>. W kolejnych latach nastąpił szybki rozwój metod pozyskiwania i przeszczepiania HSC, a samo autoHSCT weszło do katalogu standardowo stosowanych metod terapeutycznych. Według rejestru Europejskiego Towarzystwa ds. Przeszczepiania Krwi i Szpiku (ang. European Society for Blood and Marrow Transplantation, EBMT), w 2019 roku w Europie 700 ośrodków raportowało przeprowadzenie łącznie 28 714 procedur autoPBSCT<sup>7</sup>.

Procedura autoHSCT najczęściej wykonywana jest u chorych na HL, NHL i MM. W ostatnich latach do wachlarza terapii hematoonkologicznych wprowadzono terapię limfocytami T z chimerowym receptorem antygenowym (ang. chimeric antigen receptor T cells, CAR-T), co zmieniło nieco miejsce HSCT w leczeniu niektórych grup pacjentów. W Polsce dostępność tej metody jest jednak ograniczona w stosunku do wielu krajów zachodnich. Ogólne wskazania do przeszczepienia w wybranych nowotworach limfoproliferacyjnych wg klasyfikacji EBMT z roku 2022 przedstawiono w Tabeli 2. W każdym przypadku należy jednak wziąć pod uwagę stan ogólny pacjenta oraz jego dodatkowe obciążenia.

**Tabela 2.** Ogólne wskazania do przeprowadzenia transplantacji w wybranych chorobach limfoproliferacyjnych, wg EBMT 2022 <sup>8</sup>.

sytuacja kliniczna		autoHSCT	alloHSCT	CAR-T
<b>FL</b>	- pierwsza remisja	N	N	N
	- oporność na leczenie	N	CO	CO
	- wznowa bez wcześniejszego autoHSCT	S	CO	N
	*	N	S	CO
	- wznowa po wcześniejszym autoHSCT *			
<b>DLBCL</b>	- pierwsza remisja	CO	N	N
	- oporność na leczenie	N	CO	S
	- chemiowrażliwa wczesna wznowa *	CO	CO	S
	- chemiowrażliwa późna wznowa *	S	CO	CO
	- chemiowrażliwa wznowa po autoHSCT	N	CO	S
	*	S	N	D
	- pierwotny chłoniak OUN			
<b>MCL</b>	- pierwsza remisja	S	N	N
	- oporność na leczenie	N	CO	S
	- wznowa bez wcześniejszego autoHSCT	CO	CO	S
	*	N	CO	S
	- wznowa po autoHSCT *			
<b>HL</b>	- pierwsza remisja	N	N	N
	- oporność na leczenie	CO	D	N
	- chemiowrażliwa wznowa po autoHSCT*	S	S	N
		CO	D/N	N
	-chemiowrażliwa wznowa bez wcześniejszego autoHSCT *			

*S – standard postępowania; CO – opcja kliniczna; N – nierekomendowane; D – wymaga dalszych badań; alloHCT – allogeniczny HSCT ogólnie (szczegółowe wskazania mogą się różnić dla poszczególnych typów alloHSCT); \* - po uzyskaniu remisji*

### **1.3. Mobilizacja HSC.**

#### **1.3.1. Znaczenie mobilizacji HSC.**

Potencjał HSC do formowania kolonii hematopoetycznych stwierdzono w latach 80-tych XX wieku w badaniach *in vitro* i potwierdzono w badaniach przeprowadzanych na letalnie naświetlonych pawianach, u których po podaniu HSC obserwowano odnowę układu krwiotwórczego<sup>9</sup>. Odkrycie to zapoczątkowało badania nad wykorzystaniem HSC u człowieka i, w konsekwencji, wprowadzenie ich transplantacji allogenicznych oraz autologicznych do repertuaru terapii hematologicznych. Podanie HSC po zastosowanej mielosupresyjnej megachemioterapii jest możliwe dzięki opracowaniu procedury ich wcześniejszego pozyskania – ze szpiku kostnego, krwi obwodowej lub pępowinowej. W przypadku gdy komórki posłużą do wykonania alloHSCT, pobierane są od dawcy spokrewnionego bądź niespokrewnionego. U pacjentów zakwalifikowanych do autoHSCT komórki pobierane są od samego chorego, najczęściej z krwi obwodowej. Proces umożliwiający separację HSC nazywany jest mobilizacją czyli ich przesunięciem ze szpiku kostnego na obwód. Preferencja pozyskiwania autologicznych HSC z krwi nad pobraniem ich bezpośrednio ze szpiku kostnego wynika z kilku powodów, m.in. łatwiejszego dostępu, mniejszej ilości potencjalnych powikłań, większego komfortu dawców, niższego kosztu procedury, ale też krótszego czasu rekonstytucji układu hematopoetycznego biorcy<sup>10</sup>.

#### **1.3.2. Molekularne podłoże mobilizacji HSC.**

W szpiku kostnym HSC ulokowane są w tzw. niszach hematopoetycznych – miejscach, gdzie dochodzi do ich samoodnowy i różnicowania przy obecności innych komórek i ich mediatorów regulujących powyższe procesy. Pod względem funkcjonowania nisze można umownie podzielić na część osteoblastyczną oraz naczyńniową, bowiem HSC podlegają procesom zachodzącym z udziałem mediatorów i komórek obecnych w otoczeniu śródbłonna naczyń zatokowych bądź okostnej wewnętrznej.

W otoczeniu naczyń włosowatych obecne są komórki mezenchymalne produkujące chemokinę 12 o motywie CXC (ang. C-X-C motif chemokine ligand 12, CXCL12) zwaną także czynnikiem pochodzenia zrębowego 1 (ang. stromal cell-derived factor 1, SDF1), ta zaś jest odpowiedzialna za kontrolę stanu spoczynkowego HSC. CXCL12 łącząc się z receptorem CXCR-4 obecnym na powierzchni HSC daje im sygnał do zasiedlania niszy szpikowej. Komórki siateczki regulują różnicowanie HSC za pomocą insulinopodobnego czynnika wzrostu (ang. insuline like growth factor binding protein, IGFBP-2)<sup>11,12</sup>. Śródbłonek naczyń zatokowych szpiku wykazuje także ekspresję cząsteczek adhezyjnych takich jak naczyniowa cząsteczka adhezyjna (VCAM-1, ang. vascular cell adhesion molecule-1), które powodują przyleganie HSC do komórek śródbłonka. Działanie odwrotne, proekspansywne, ma aktywacja kinazy serynowo-treoninowej Akt i szlaku sygnalizacyjnego Akt/mTOR (ssaczy cel rapamycyny, ang. mammalian target of rapamycin)<sup>13</sup>.

Osteoblasty produkują cząsteczki adhezyjne: integryny i kadheryny N. Ponadto w niszy osteoblastycznej dochodzi do regulacji proliferacji i migracji HSC z udziałem licznych cytokin takich jak czynnik komórek macierzystych (ang. stem cell factor, SCF), angiopoetyna-1 wiążąca się z receptorem Tie na powierzchni HSC i hamująca ich proliferację, czy wspomniany wyżej CXCL12<sup>11,12</sup>.

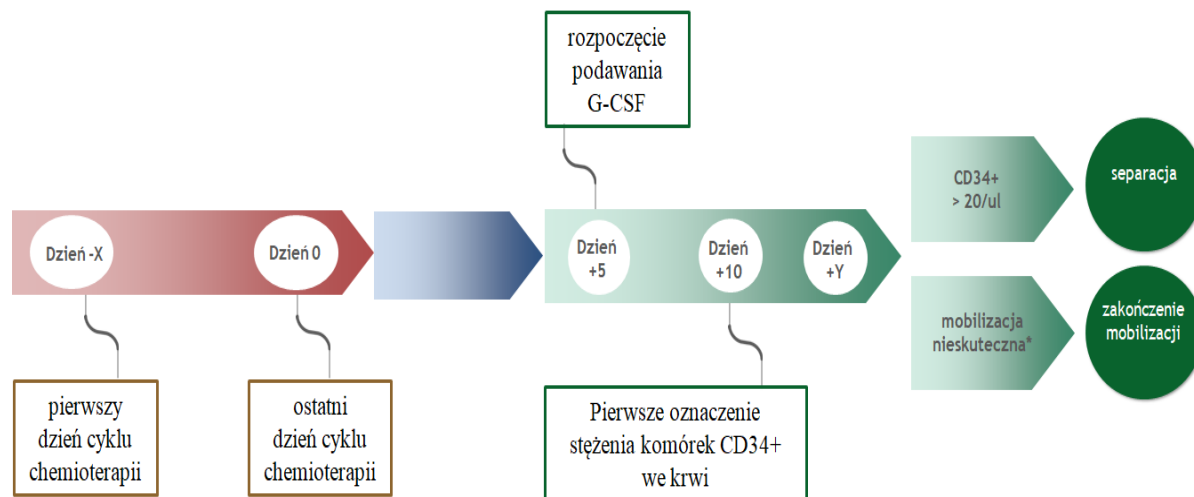
Celem mobilizacji HSC jest ich uwolnienie z niszy szpikowych i przesunięcie do krwi obwodowej. Jest to możliwe przy użyciu czynnika wzrostu kolonii granulocytów (ang. granulocyte colony stimulating factor, G-CSF). Fizjologicznie G-CSF jest produkowany m.in. przez komórki śródbłonka i fibroblasty szpiku kostnego, ale substancja jest dostępna także jako lek w postaci iniekcji podskórnych. Dokładny mechanizm działania cytokiny nie został jeszcze do końca poznany. Wiadomo jednak, że działa ona poprzez zmianę mikrośrodowiska niszy szpiku kostnego oraz hamowanie osteoblastów. Redukcja stężenia SDF-1 (CXCL12) powodowana przez G-CSF skutkuje zaburzeniem osi CXCL12-CXCR4 i ostatecznie wyrzutem HSC do krwioobiegu. Przypuszcza się także, że G-CSF zaburza działanie adhezyn osteoblastycznych oraz śródbłonkowych, w tym VCAM-1, a także pobudza różnicowanie HSC poprzez zmianę cytokin szpikowych powodowaną aktywacją granulocytów z towarzyszącym wyrzutem neutrofilowych metaloproteina<sup>14,15</sup>.

W badaniu I/II fazy wykazano, iż podawanie G-CSF przez 4 kolejne dni zwiększyło 100-krotnie ilość HSC we krwi obwodowej w stosunku do stanu sprzed wykonania pierwszej iniekcji leku<sup>16</sup>. Ich stężenie osiąga swoje maksimum około 5 dnia terapii i wtedy zazwyczaj rozpoczyna się monitorowanie skuteczności mobilizacji.

### 1.3.3. Procedura mobilizacji HSC.

Istnieje kilka uznanych schematów mobilizacji komórek krwiotwórczych. Opierają się one na podawaniu G-CSF w monoterapii lub w skojarzeniu z cytostatykami. Już u schyłku poprzedniego wieku zaobserwowano, że zastosowanie chemioterapii mielosupresyjnej poprzedzające włączenie G-CSF zwiększa ilość HSC uzyskanych we krwi obwodowej<sup>17</sup>. W niektórych przypadkach, głównie u chorych na NHL, do uzyskania powyższego efektu wykorzystuje się chemioterapię stosowaną w standardowym planie leczenia, taką jak protokół DHAP. W innych, najczęściej u chorych na MM, pacjentowi podaje się cytostatyk dedykowany specjalnie procedurze mobilizacji. W tej drugiej grupie najczęściej stosowanym lekiem jest cyklofosfamid (Cy). W piśmiennictwie wymienia się także etopozyd oraz Ara-C, którego przewagę nad Cy w zakresie skuteczności mobilizacji wykazano ostatnio w kilku badaniach<sup>18,19</sup>. Stosowany w Klinice Hematologii USK we Wrocławiu protokół mobilizacji schematycznie przedstawiono na Rycinie 1.

**Rycina 1.** Schemat mobilizacji HSC.



\*uzyskanie poniżej 20 komórek CD34+/uł we krwi obwodowej z jednoczesną tendencją spadkową CD34+ p.c. – powierzchnia ciała; m.c. - masa ciała; s.c. – podskórnice; i.v. – dożylnie

W ostatnich latach wprowadzono do leczenia plerixafor (AMD3100), który w połączeniu z G-CSF istotnie poprawia skuteczność mobilizacji. Plerixafor to antagonist receptoru CXCR-4, który poprzez uniemożliwienie przyłączenia się SDF-1 powoduje uwolnienie HSC do krwioobiegu<sup>20</sup>. Niestety koszt stosowania plerixaforu jest dość duży.



Ponadto lek ten podawany jest w infuzji dożylniej, co dodatkowo obciąża system szpitalny i samego pacjenta, jako że, w przeciwieństwie do G-CSF, nie może być podany samodzielnie w domu.

Aktualnie bada się kilkadziesiąt leków potencjalnie mogących w przyszłości usprawnić proces mobilizacji. Do roku 2021 przeprowadzono niemalże 100 takich badań. Obiecujące wydają się m.in. kombinacje meloxicamu, nowych antagonistów CXCR-4 czy oligosacharydów znanych pod nazwą EP80031 i EP80006 z G-CSF i/lub plerixaforem<sup>21</sup>.

#### **1.3.4. Separacja HSC i skuteczność mobilizacji.**

Separację HSC przeprowadza się zazwyczaj gdy ich stężenie we krwi pacjenta osiągnie min. 20 komórek/ul a według niektórych źródeł 10 komórek/ul - choć wówczas rośnie prawdopodobieństwo suboptymalnego lub niezadawalającego efektu separacji<sup>22</sup>. Donację pobiera się za pomocą automatycznych separatorów komórkowych i z dojścia dożylnego.

Stężenie HSC oznacza się za pomocą cytometrii przepływowej. Markerem charakterystycznym dla HSC u człowieka jest antygen CD34 będący glikofosfoproteiną zlokalizowaną na powierzchni błony komórkowej. Wykorzystanie przeciwciała anti-CD34 w 4-parametrowej cytometrii z następczym wieloparametrycznym bramkowaniem pozwala na ilościową ocenę zawartości HSC w produkcie mobilizacji - separacie.

Minimalna ilość komórek w separacie, niezbędna do rekonstrukcji układu krwiotwórczego po przeszczepieniu, to  $2 \times 10^6$  komórek CD34+/kg m.c. biorcy. Jednak za ilość optymalną, pozwalającą na szybszą odnowę hematopoetyczną oraz ewentualne przeszczepienie tandemowe, uznaje się  $3-4 \times 10^6$  komórek CD34+/kg m.c.

W niektórych przypadkach docelową ilość komórek udaje się zgromadzić po wykonaniu pojedynczej leukaferazy, czasem jednak wymagane jest wykonanie w kolejnych dniach dwóch lub więcej zabiegów<sup>5,23</sup>.

W zależności od źródeł, u ok. 20-40% pacjentów poddanych mobilizacji procedura kończy się niepowodzeniem pod postacią braku odpowiedniego wzrostu stężenia komórek CD34+ we krwi lub zbyt małej ilości HSC w produkcie leukaferazy. Istnieje kilka czynników uznawanych za potencjalnie negatywnie wpływające na skuteczność mobilizacji. Wymienia się rodzaj przebytej wcześniej chemioterapii (np. fludarabina, melfalan, lenalidomid), wyższy wiek chorego, NHL jako rozpoznanie podstawowe<sup>22,24,25</sup>.

W przypadku niepowodzenia mobilizacji zaleca się dodatkowe zastosowanie plerixaforu. Według wskazań rejestracyjnych leku możliwe jest też włączenie go u pacjentów,

u których na podstawie czynników ryzyka przewiduje się nieskuteczność strategii opartej na samym G-CSF oraz w przypadku suboptymalnego efektu mobilizacji.<sup>22</sup>

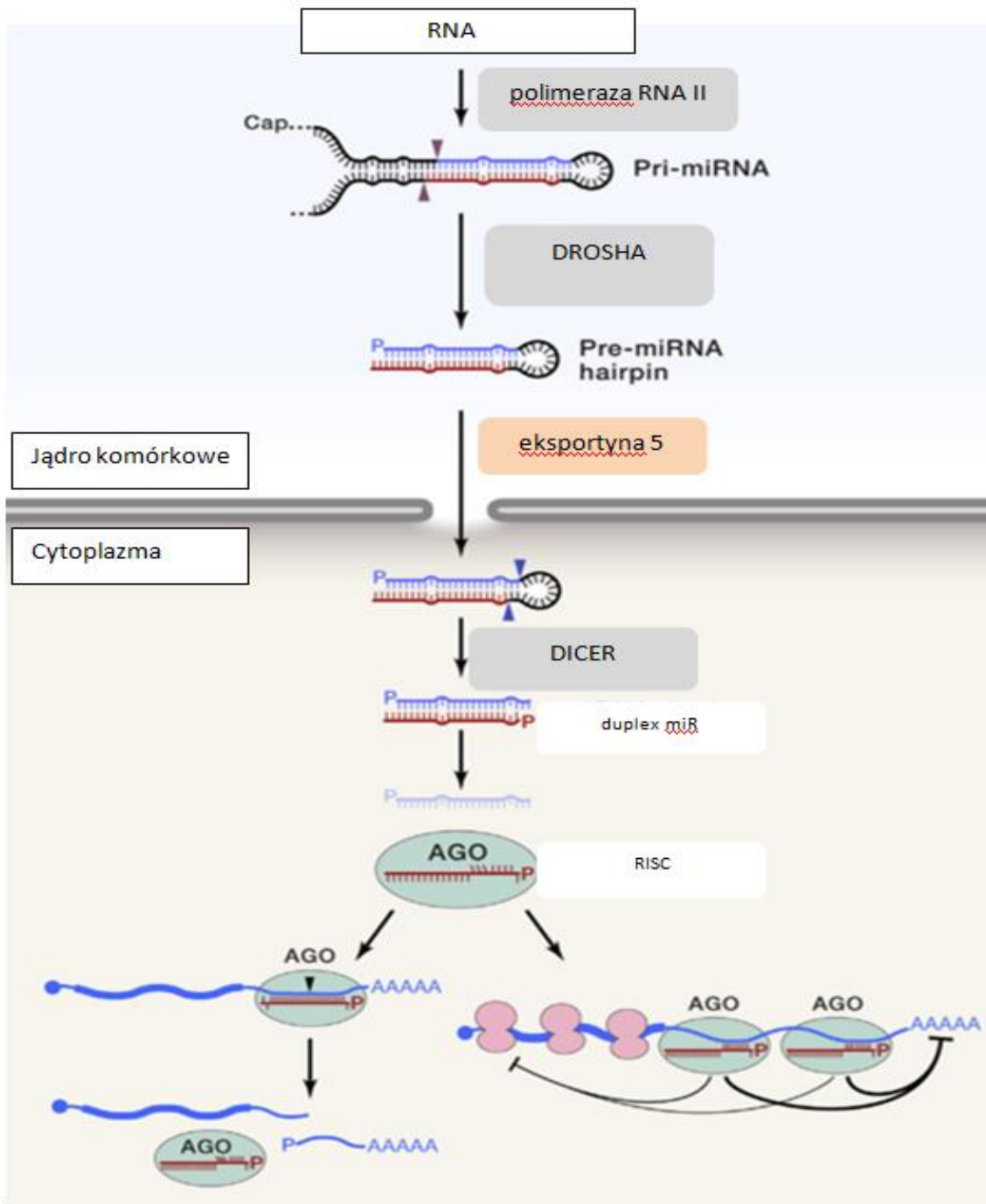
## **1.4. MikroRNA.**

### **1.4.1. Ogólna charakterystyka mikroRNA.**

MikroRNA (ang. microRNA, miR) to jednoniciowe, niekodujące cząsteczki RNA, złożone zazwyczaj z 21-23 nukleotydów. Ich funkcją jest potranskrypcyjna regulacja ekspresji genów w mechanizmie blokowania translacji, bądź przez promowanie degradacji targetowych fragmentów informacyjnego RNA (ang. messengerRNA, mRNA).

MiR, podobnie jak mRNA, podlegają transkrypcji z udziałem polimerazy RNA II, czego produktem jest pierwotny transkrypt - primary-miR (pri-miR). Liczące kilka tysięcy par zasad pri-miR, pod wpływem enzymu DROSHA należącego do grupy polimeraz RNA III, przekształcane jest do prekursorowego miR (ang. precursor-miR, pre-miR) o dwuramiennej strukturze tzw. spinki do włosów (ang. pre-miR hairpin). Oba ramiona pre-miR hairpin zawierają komplementarne do siebie sekwencje i mogą dać początek niemalże identycznym wersjom tego samego miR. Jednak ze względu na fakt, iż w praktyce wersje te mogą charakteryzować się zupełnie inną stabilnością i aktywnością biologiczną różni się produkt 3p- oraz 5p-, w zależności od ramienia, z jakiego powstały (np. miR-155-3p i 155-5p). W przypadku, gdy sekwencja kodująca dla danego miR znajduje się w intronie, proces powstania pre-miR zachodzi bez udziału DROSHA i jest związany z wycinaniem intronu (niekanoniczna ścieżka powstawania miR). Powstały, dwuniciowy produkt jest następnie transportowany z jądra komórkowego do cytoplazmy. W procesie transportu pre-miR kluczową rolę odgrywa eksportyna 5 pozyskująca energię z GTP powiązanego z białkiem RAN. W cytoplazmie kolejna polimeraza RNA III, DICER, doprowadza do fragmentacji pre-miR i następczego powstania dupleksów miR złożonych z nici wiodącej i pasażerskiej, które po rozdzieleniu tworzą dojrzałe, jednoniciowe cząsteczki miR. Do ostatecznego efektu regulatorowego dochodzi za sprawą kompleksu RISC (RNA-induced silencing complex) utworzonego przez połączenie dojrzałego miR z odpowiednim białkiem z rodziny Argonaute, głównie Argonaute 2 (Ago2)<sup>26,27</sup>.

Rycina 2. Biogeneza miR zależna od DROSHA i DICER wg Bartel et al. <sup>27</sup>.



Dotychczas poznano dwa podstawowe mechanizmy działania RISC. W pierwszym przypadku, przy całkowitej komplementarności miR z docelowym fragmentem mRNA, białko Ago2 doprowadza do degradacji mRNA. Drugi mechanizm, zachodzący częściej wśród zwierząt, polega na wyciszeniu ekspresji genów za pomocą blokowania translacji. W tym procesie nici nie muszą być całkowicie komplementarne a do blokowania dochodzi po przyłączeniu się kompleksu wyciszającego do końca 3'UTR targetowego mRNA<sup>27</sup>.

Historia badań nad miR sięga końca XX wieku, kiedy to odkryto, iż ekspresja genów warunkujących rozwój larwalny *Caenorhabditis elegans* podlega inhibicji przez krótkie, liczące po kilkadziesiąt zasad transkrypty *lin-4* oraz *let-7*. Wkrótce potem wykazano, że obie struktury stanowią element nowego, odrębnego mechanizmu regulacji genetycznej<sup>28</sup>. Od tego czasu, poza ustaleniem biogenezy i ogólnego sposobu działania miR, zidentyfikowano licznych przedstawicieli tej grupy biorących udział w procesach fizjologicznych oraz patologicznych u organizmów żywych, w tym u człowieka. Poznane dotychczas miR umieszczane są w dedykowanych bazach internetowych takich jak miRBase licząca ok. 40 000 rekordów dotyczących pre-miR oraz ok. 50 000 dotyczących dojrzałych miR. W przypadku miR zidentyfikowanych w genomie człowieka, w pełnym nazewnictwie stosowanym w bazach danych dodaje się prefiks 'hsa', np. *hsa-miR-223*, jednak w wielu publikacjach przedrostek ten jest pomijany.

Dane zawarte w bazie, w zależności od stanu wiedzy na temat konkretnego miR, obejmują sekwencję cząsteczki, odnośnik do informacji o potencjalnym genie targetowym oraz do dostępnych publikacji<sup>29</sup>. Część miR została dobrze poznana i powiązana z możliwym efektem biologicznym ich działania, niektóre jednak są w fazie badań. Zdecydowana większość doniesień naukowych dotyczy rezultatów doświadczeń przeprowadzanych na zwierzętach – głównie myszach, niepotwierdzonych jeszcze u człowieka.

#### **1.4.2. MiR w hematopoezie.**

Liczne badania wskazują na regulacyjną rolę miR w hematopoezie, w tym w różnicowaniu i proliferacji HSC. Większość z nich prowadzona była na zwierzętach lub liniach komórkowych. Dotychczas ukazały się tylko pojedyncze badania ukierunkowane na ocenę ekspresji miR w trakcie mobilizacji HSC u człowieka.

W kontekście hematopoezy często wymienia się miR-125. W odróżnieniu od wielu innych miR, oznaczenie te charakteryzuje nie jeden miR, lecz rodzinę, w skład której wchodzi miR-125a i miR-125b. Badania przeprowadzone na myszach oraz liniach komórkowych in vitro dowodzą wysokiej ekspresji obu członków rodziny miR-125 w szpiku kostnym a także jej dodatkowym pobudzeniu przez czynnik wzrostu kolonii granulocytów (ang. granulocyte colony stimulating factor, G-CSF) <sup>30-34</sup>. MiR-125 hamują apoptozę komórek poprzez wyciszanie genów związanych z programowaną śmiercią komórki promując tym samym przeżycie i proliferację HSC <sup>30,33,34</sup>. Nie zostało jednoznacznie ustalone w jaki sposób miR-125 wpływają na rozwój poszczególnych linii hematopoetycznych.

Kolejnym miR, którego związek z funkcjonowaniem HSC wykazano w badaniu in vitro na modelu zwierzęcym jest miR-126 <sup>35</sup>. MiR-126 wydaje się mieć wpływ na mobilizację HSC jako że jego zwiększona obecność w komórkach śródbłonna ma negatywny wpływ na ekspresję VCAM1 <sup>36,37</sup>. Dotychczas przeprowadzono jednak niewiele badań in vivo na temat roli miR-126 w hematopoezie indukowanej G-CSF, a wyniki opublikowanych badań: analizy osocznego stężenia miR u ludzi poddanych mobilizacji oraz stężenia miR w szpiku kostnym myszy przyjmujących G-CSF, są sprzeczne <sup>37,38</sup>.

Landgraf et al. zaprojektowali duże badanie, w którym analizowali ekspresję kilkudziesięciu miR w materiale pobranym z wielu ludzkich zdrowych oraz zmienionych chorobowo tkanek. W zakresie układu krwiotwórczego badano HSC pozyskane z krwi obwodowej zdrowych dawców po stymulacji G-CSF, szpik kostny oraz nacieki nowotworowe m.in. w węzłach chłonnych. Spośród wszystkich analizowanych, miR-155 i miR-223, a także miR-142, miR-144 i miR-150 wykazywały wysoką ekspresję w tkankach układu hematopoetycznego zachowując przy tym specyfikę dla tego układu <sup>39</sup>. MiR-155 wiąże się ponadto z mechanizmami zapalnymi i odpowiedzią immunologiczną komórek <sup>39</sup>, a także z oddziaływaniem na szlak CXCL12/CXCR4 <sup>40</sup> i cząsteczkę adhezyjną VCAM-1 <sup>41</sup>. MiR-223 oddziałuje z kolei na IGF-1. Ponadto przypisuje się mu rolę w regulacji stanu zapalnego w takich jednostkach jak reumatoidalne zapalenie stawów, zapalenia nieswoiste jelit, infekcje wirusowe. MiR-223 reguluje aktywność wielu cytokin prozapalnych i wydaje się być niezbędny do różnicowania granulocytów <sup>42-44</sup>.

MiR są więc obiecującym przedmiotem badań w hematopoezie i mobilizacji HSC, jako że istnieją przesłanki o ich istotnej roli w powyższym procesie.

## 2. CELE I ZAŁOŻENIA

Pobranie odpowiedniej ilości HSC chorego jest konieczne do przeprowadzenia autoHSCT, który w pewnych sytuacjach klinicznych stanowi najlepszą opcję terapeutyczną. Istnieje grupa pacjentów, u których nie udaje się przeprowadzić skutecznej mobilizacji HSC. Istotnym jest poznanie czynników klinicznych wpływających na efektywność procedury.

Mobilizacja HSC jest procesem angażującym liczne mechanizmy molekularne. W ostatnich latach ukazało się wiele doniesień sugerujących wpływ poszczególnych miR na hematopoezę. Większość badań przeprowadzono na zwierzętach i liniach komórkowych in vitro. Ekspresja miR, jako czynników potencjalnie regulujących hematopoezę człowieka może mieć wpływ na proliferację i uwalnianie do krwioobiegu HSC.

Celem pracy jest próba identyfikacji pacjentów, u których na podstawie danych klinicznych lub molekularnych, w tym ekspresji wybranych miR, przewidywana efektywność mobilizacji jest niska i u których można w związku z tym rozważyć dodatkowe metody wspomaganą mobilizacji, takie jak np. podanie plerixaforu.

### 3. MATERIAŁ I METODY

#### 3.1. Grupa badana.

Do badania zakwalifikowano pacjentów poddanych procedurze mobilizacji komórek macierzystych szpiku w Klinice Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu w latach 2018-2021, u których możliwe było pobranie krwi do badania w dwóch założonych punktach czasowych. Ze względu na heterogenność chorób hematologicznych oraz znaczące różnice w efektywności mobilizacji pomiędzy chorymi z HL i NHL, grupę zawężono do gorzej rokujących skuteczność mobilizacji chorych z rozpoznaniem NHL. U wszystkich chorych zdiagnozowano chorobę z grupy chłoniaków z dojrzałych komórek B. Dodatkowym kryterium włączenia do projektu było uzyskanie częściowej odpowiedzi (ang. partial remission, PR) lub całkowitej remisji (ang. complete remission, CR) przed rozpoczęciem mobilizacji. Celem ujednoczenia grupy, za kryterium wyłączenia przyjęto: niewydolności narządowe, choroby towarzyszące powyżej stopnia 2 wg CTCAEv5.0, stałe przyjmowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych, wywiad stosowania leków uznanych za czynnik ryzyka nieskutecznej mobilizacji (fludarabina, melafalan, lenalidomid), przebyte mobilizacje HSC w przeszłości, HSCT w wywiadzie, planowane zastosowanie plerixaforu w bieżącej mobilizacji. Wszyscy badani zostali poinformowani o zasadach udziału w projekcie oraz potencjalnych korzyściach i ryzyku z niego płynących, a także podpisali formularz świadomej zgody na udział w badaniu przed rozpoczęciem założonych procedur. Projekt realizowano zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej z 2013 roku oraz po uprzednim uzyskaniu zgody uczelnianej Komisji Bioetycznej.

Na podstawie dokumentacji medycznej zgromadzono dane pacjentów dotyczące wieku, płci, wagi, wskaźnika masy ciała (ang. body mass index, BMI), chorób współistniejących, rodzaju stosowanego poprzednio leczenia, ilości przebytych cykli chemioterapii, odpowiedzi na leczenie uzyskanej przed rozpoczęciem procedury mobilizacji oraz rodzaju chemioterapii mobilizacyjnej (Tabela 3). Chorych podzielono także na grupy w zależności od BMI, wg definicji WHO: waga normalna  $>18,5 \text{ kg/m}^2$  i  $<25 \text{ kg/m}^2$ , nadwaga  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$  i otyłość  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ . Odpowiedź na leczenie oceniano wg kryteriów z Lugano dla odpowiednich podtypów NHL.

Ponadto zebrano dane dotyczące przebiegu mobilizacji a więc informacje o powikłaniach w trakcie procedury, w tym infekcjach wymagających antybiotykoterapii

i przetoczeniach preparatów krwi. Zgromadzono wyniki badań laboratoryjnych standardowo wykonywanych w dniu separacji komórek macierzystych bądź decyzji o zaprzestaniu procedury mobilizacji. Wreszcie pozyskano dane opisujące skuteczność mobilizacji HSC a więc: stężenie komórek CD34+ we krwi obwodowej oraz w separacie u chorych skutecznie mobilizowanych. Wyniki tych ostatnich przedstawiono jako ilość komórek CD34+/kg m.c. dawcy.

Charakterystykę grupy badanej uwzględniającą dane demograficzne oraz przebyte leczenie zawarto w Tabeli 3.

**Tabela 3.** Charakterystyka grupy badanej.

	<b>liczba osób, n, (%)</b>	<b>mediana (min-max), średnia</b>
<b>wiek (lata)</b>		58 (44-62), 52,9
<b>Płeć</b>		
Męska	26 (58)	
Żeńska	19 (42)	
<b>Rozpoznanie</b>		
DLBCL	25` (56)	
FL	6 (13)	
MCL	10 (22)	
PMBL	2 (4,5)	
HGBL	2 (4,5)	
	<b>liczba osób n, (%)</b>	<b>mediana (min-max), średnia</b>



<b>ilość linii leczenia przed mobilizacją</b>	2 (1-3), 2
1	10 (22)
2	25 (66)
3	10 (22)
<b>odpowiedź przed mobilizacją</b>	
PR	18 (40)
CR	27 (60)
<b>schemat chemioterapii przed mobilizacją</b>	
R-DHAP	34 (75,5)
DHAP	1 (2)
R-BAC	1 (4,5)
R-IGEV	3 (6,7)
R-ICE	6 (8,8)

### 3.2. Mobilizacja HSC.

#### 3.2.1. Przebieg mobilizacji HSC.

U każdego z badanych zastosowano standardowy protokół mobilizacji: podano chemioterapię przeciwnowotworową a od dnia +5 po zakończonej chemioterapii, wykonywano podskórne iniekcje G-CSF w dawce ok. 5ug/kg masy ciała dwa razy dziennie. Wykorzystano filgrastym w dostępnych komercyjnie dawkach 0,3 mg/0,5ml oraz 0,48mg/0,5ml. Schematy chemioterapii stosowane u badanych pacjentów wymieniono w Tabeli 4.

Począwszy od piątego dnia podawania G-CSF, w ramach standardowego postępowania dokonywano codziennych pomiarów stężenia komórek CD34+ we krwi obwodowej chorych.

Stężenie  $\geq 20 \times 10^6$  komórek/uL uznawano za optymalne do wykonania separacji komórek macierzystych, jednak za graniczną wartość powyżej której podejmowano próbę separacji przyjęto  $10 \times 10^6$  cells/uL. Separację przeprowadzano przy użyciu aparatu Spectra Optia. Procedurę uznawano za skuteczną w przypadku uzyskania w separacie min.  $2 \times 10^6$  komórek CD34+/kg masy ciała pacjenta. W niektórych przypadkach aferezę wykonywano dwukrotnie - w dwóch kolejnych dniach. W przypadku niewystarczającej do separacji ilości komórek macierzystych we krwi obwodowej badanego lub nieuzyskania zadawalającej ich ilości w drodze aferezy, mobilizację uznawano za nieskuteczną.

Stężenie komórek CD34+ we krwi obwodowej pacjentów oraz w uzyskanym drogą aferezy separacie oceniano za pomocą cytometrii przepływowej w ramach standardowych procedur.

**Tabela 4.** Leczenie przeciwnowotworowe stosowane w cyklu mobilizacyjnym u pacjentów objętych badaniem.

schemat chemioterapii	Chemioterapeutyki	czas trwania leczenia (dni)
R-DHAP	rituximab, ara-c, cisplatyna, dexametazon	4
DHAP	ara-c, cisplatyna, deksametazon	4
R-IGEV	rituximab, ifosfamid, gemcytabina, winorelbina, prednizon	4
R-BAC	rituximab, ara-c, bendmustyna	4
R-ICE	rituximab, etopozyd, karboplatyna, ifosfamid	3

### 3.2.2. Badania kontrolne i ocena powikłań mobilizacji HSC.

W trakcie mobilizacji u pacjentów codziennie lub co drugi dzień wykonywano rutynowe badania kontrolne obejmujące morfologię krwi oraz parametry biochemiczne, co stanowi

standard opieki przyjęty w ośrodku. Pełna ocena dokonywana była w dniu aferezy z krwi pobranej rano, jeszcze przed kwalifikacją do procedury. Wydolność wątrobową monitorowano poprzez stężenie bilirubiny i aminotransferaz wątrobowych, zaś nerek poprzez stężenie kreatyniny w osoczu. Regularnie oznaczano stężenie białka c-reaktywnego (ang. c-reactive protein, CRP) w osoczu i dokonywano codziennej klinicznej oceny obecności cech infekcji. Wykonywano morfologię krwi obwodowej oceniając stężenie leukocytów (ang. white blood cells, WBC), neutrofilii (ang. neutrophil, NEUT), hemoglobiny (ang. hemoglobin, HGB) oraz płytek krwi (ang. platelets, PLT).

Pacjenci będący w grupie ryzyka zakażeń, przez cały czas trwania mobilizacji objęci byli rutynową antybiotykoterapią profilaktyczną pod postacią ciprofloksacyny i flukonazolu przyjmowanych doustnie. Do tej grupy należeli chorzy z neutropenią oraz powyżej 75 roku życia.

Transfuzje preparatów krwi wykonywano zgodnie z przyjętymi w ośrodku standardami: w przypadku spadku HGB poniżej 7 g/dl i/lub objawów anemii przetacza się pacjentom ubogoleukocytarny koncentrat krwinek czerwonych (KKCz) natomiast jeśli stężenie PLT spada poniżej 10 tys/ul i/lub stwierdza się aktywne krwawienie bądź skazę małopłytkową – napromieniany ubogoleukocytarny koncentrat krwinek płytkowych (KKP).

### **3.2.3. Pobieranie materiału i ocena stężenia komórek HSC.**

HSC charakteryzują się obecnością antygenu powierzchniowego CD34 (komórki CD34+), co wykorzystywane jest do oznaczania ich ilości w materiale biologicznym. Podczas procedury mobilizacji HSC ocena stężenia komórek CD34+ przeprowadzana jest we krwi obwodowej pacjenta celem kwalifikacji do wykonania separacji HSC oraz w separacie pobranym drogą leukaferazy będącym docelowym produktem mobilizacji. W obu przypadkach materiał do badania pobiera się w ilości minimum 2,5ml do monowety z EDTA i przechowuje w temperaturze pokojowej do czasu dostarczenia do laboratorium. Maksymalny czas przechowywania to 24 godziny, jednak w praktyce ośrodka oznaczeń dokonuje się tego samego dnia, w którym doszło do aferezy.

Badania wykonuje się w lokalnym laboratorium według procedury standardowo stosowanej w ośrodku. Do oznaczenia procentowego udziału komórek CD34+ wśród populacji WBC charakteryzujących się ekspresją CD45 wykorzystuje się 4 – parametrową cytometrię przepływową i wieloparametryczną strategię bramkowania.

Dostarczony materiał po rozcieńczeniu roztworem PBS (Aquamed) dodawany jest w ilości 50 ul do probówki z mieszaniną 2,5ml przeciwciała anty-CD45/FITC (Beckman Coulter) i 2,5 ml anty-IgG/PE (Beckman Coulter) oraz do probówki z mieszaniną 2,5ml przeciwciała anty-CD45/FITC i 2,5 ml przeciwciała anty-CD34/PE (Beckman Coulter). Probówki następnie są wzbogacane 250 ul OptiLyse C (Beckman Coulter) i 250 ul roztworu PBS oraz poddawane inkubacji w temperaturze pokojowej i bez dostępu światła. Po odwirowaniu probówek komórki zawieszają się w 1,5ml roztworu PBS i wczytuje na cytometry przepływowym FACS (DAKO Galaxy).

Następnie stosuje się bramkowanie według protokołu ISHAGE. Po odczytaniu danych wykorzystuje się poniższe wzory celem obliczenia ostatecznego wyniku:

1. Bezwzględna liczba komórek CD34+ w 1 ml materiału:

$(\text{liczba komórek CD34+}/\text{ml} : \text{liczba komórek CD45+}) - (\text{liczba komórek IgG}/\text{ml} : \text{liczba komórek CD45+}/\text{ml})$

2. Liczba komórek CD34+ w separacie na kg m.c. biorcy:

$(\text{objętość separatu (ml)} \times \text{WBC}/\text{ml separatu} \times \text{bezwzględna liczba komórek CD34+}/\text{ml separatu})$   
: waga biorcy (kg).

### **3.2. Pobieranie materiału i ocena ekspresji miR.**

Celem oceny badanych parametrów pobierano od chorych 5 ml krwi obwodowej w następujących punktach czasowych:

1. Doba poprzedzająca planowane włączenie G-SCF a więc czwarta doba po zakończonej chemioterapii.

2. Bezpośrednio przed rozpoczęciem pierwszej aferezy lub, w przypadku niewystarczającej ilości komórek CD34+ we krwi obwodowej badanych, w ostatnim dniu przyjmowania G-CSF.

Materiał pobierano do probówek PAX Gen Blood RNA Tubs (Qiagen). zapewniających natychmiastową stabilizację RNA a następnie przechowywano w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ . Pobieranie oraz dalsze postępowanie z materiałem odbywało się ściśle według zaleceń producenta probówek.

W materiale pobranym w obu punktach czasowych oceniono ekspresję miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-155, miR-223. Badanie łącznie 90 próbek prowadzono w laboratorium Katedry Histologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z zastosowaniem metody

ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (RT-qPCR, ang. Reverse Transcription Quantative Polymerase Chain Reaction) i kropelkowo-cyfrowej reakcji łańcuchowej polimerazy (ddPCR, ang. droplet digital PCR).

Izolacja materiału genetycznego została przeprowadzona z użyciem zestawu do izolacji RNA - PAXgene Blood RNA Kit IVD (Qiagen) oraz zestawu dedykowanego izolacji niskocząsteczkowego RNA - *mirVana*<sup>TM</sup> miRNA Isolation Kit (AMBION). Próbkki zostały poddane lizie i denaturacji rybonukleaz w specjalnie dedykowanym buforze, a następnie ekstrakcji fenolowo-chloroformowej. Po dodaniu etanolu przepuszczono je przez specjalny wkład filtrujący i eluowano niskojonowym roztworem. Procedury przeprowadzono ściśle według załączonych instrukcji producenta.

Po wyizolowaniu niskocząsteczkowego RNA zastosowano zestaw do odwrotnej transkrypcji - The TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Postępowano według załączonej instrukcji producenta. Do określenia poziomu ekspresji mikroRNA 126-3p, 125a-5p, 125b1-3p, 155-5p, 223-3p wykorzystano odpowiednie sondy TaqMan (Thermo Fisher Scientific Waltham). Mieszanina reakcyjna zawierała zalecane przez producenta następujące objętości: 1,33 µl produktu odwrotnej transkryptazy, 1 µl próbki dla specyficznego miRNA firmy TaqMan (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA), 7,67 µl wody molekularnej oraz 10 µl próbki 2X ddPCR MasterMix (Bio-Rad).

W kolejnym etapie wykorzystano QX100 Droplet Generator (Bio-Rad), w którym na płytce DG8 cartridge (Bio-Rad) umieszczono oddzielnie próbki dla każdego z analizowanych miR. Każda z próbek zawierała: 20 µl opisanej wyżej mieszaniny reakcyjnej przeprowadzonej z użyciem sondy dla danego miR oraz 70 µl oleju Droplet Generation (Bio-Rad). Następnie z płytki DG8 cartridge pobrano po 40 µl z każdej z próbek i umieszczono w 96-dółkowej płytce - ddPCR 96-well plate (Bio-Rad).

Płytkę ddPCR 96-well plate umieszczono w termocyklerze C1000 Touch Thermal. Procedurę amplifikacji, zgodnie z zaleceniami producenta, rozpoczęto w ciągu 30 minut od przeniesienia próbek na płytkę. Przeprowadzono ją stosując następujące warunki: 10 minut w temperaturze 95°C, następnie 40 cykli w temperaturze 95°C przez 3 sekundy i w 60°C przez 1 minutę, 1 cykl w temperaturze 98°C przez 10 minut, ostatecznie zmniejszając temperaturę do temperatury pokojowej. Odczyt z płytki wykonywano w czytniku Droplet Reader (Bio-Rad).

Do określenia liczby kopii mikroRNA w mikrolitrze mieszaniny stosowano dyskretny rozkład prawdopodobieństwa Poissona.

### **3.3. Metody statystyczne.**

Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu oprogramowania R 4.1.1 (the R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Zmienne jakościowe zostały przedstawione w tabelach jako licznosci wraz z wartością procentową, natomiast do opisu zmiennych ilościowych użyto statystyk opisowych, w tym: minimum, maksimum, mediany, średniej i odchylenia standardowego (SD). Normalność rozkładu danych ilościowych weryfikowano testem Shapiro-Wilka. Zależności pomiędzy zmiennymi kategorialnymi analizowano za pomocą dokładnego testu Fishera. Zależności zmiennych ilościowych (ciągłych), o rozkładzie danych innym niż normalny, badano korelacją Spearmana. W przypadku porównania między dwoma grupami zmiennych ciągłych lub zmiennych porządkowych, wykorzystano test U Manna Whitneya. Natomiast do porównań wielokrotnych zastosowano test ANOVA Kruskala-Wallisa, a następnie test post-hoc Dunna z poprawką Benjaminiego-Hochberga. P-wartość poniżej 0,05 była uważana za istotną statystycznie.

## 4. WYNIKI

### 4.1. Skuteczność mobilizacji HSC.

#### 4.1.1. Ogólna skuteczność mobilizacji HSC.

Mobilizacja była skuteczna u 37 chorych (82% całej grupy badanej), u 8 (18%) procedura zakończyła się niepowodzeniem. Żaden z pacjentów z drugiej grupy nie uzyskał wystarczającego stężenia komórek CD34+ we krwi obwodowej i, co za tym idzie, nie wykonywano u nich leukaferazy. Spośród pierwszej grupy u 16 badanych (43% skutecznych mobilizacji i 35% całej badanej populacji) konieczne było wykonanie 2 leukaferaz a u 21 (odpowiednio 57% i 47%) przeprowadzono jeden zabieg.

Średni czas przyjmowania G-CSF wynosił 7,44 dnia, mediana 7 dni (zakres: 4-24). W grupie, w której nie wykonano leukaferazy było to średnio 9,25 dnia, mediana 7 dni (zakres: 5-24). Chorzy, u których mobilizacja była skuteczna i zakończyła się leukaferazą stosowali G-CSF średnio przez 7 dni, mediana 7 dni (zakres: 4-15).

Średnia najwyższego zarejestrowanego stężenia komórek CD34+ ( $\times 10^6$  kom/ul) we krwi obwodowej u całej badanej populacji wynosiła 58,6, mediana 37,2 (zakres: 0,3-246,6). U chorych, u których mobilizacja była nieskuteczna, średnia wynosiła 3,4 zaś mediana 2,5 (zakres: 0,3-10). Spośród pacjentów, u których przeprowadzono leukaferazę średnia wynosiła 70,9, mediana 45 (zakres: 19,4 - 246,6). Większość chorych z drugiej grupy uzyskało stężenie komórek CD34+ we krwi powyżej optymalnej wartości  $20 \times 10^6$  kom/ul. W suboptymalnym zakresie  $10-20 \times 10^6$  kom/ul mieściły się wyniki u trzech pacjentów i były to wartości powyżej  $19 \times 10^6$  kom/ul. W każdym z tych trzech przypadków w drodze leukaferazy pozyskano komórki CD34+ w stężeniu plasującym się w przedziale  $2-4 \times 10^6$  kom/kg m.c.

Średnio w preparacie będącym produktem leukaferazy w całej grupie pacjentów po skutecznej mobilizacji uzyskano  $5,66 \times 10^6$  kom CD34+/kg m.c., mediana 5,9 (zakres: 2,2-11,85). Wartości w przedziale  $2-4 \times 10^6$  kom CD34+/kg m.c stwierdzono u 15 chorych (33% całej populacji, 40,5% grupy skutecznej mobilizacji). Najważniejsze dane podsumowano w Tabeli 5.

**Tabela 5.** Ogólna skuteczność mobilizacji.

	<b>nieskuteczna mobilizacja n = 8</b>	<b>skuteczna mobilizacja n = 37</b>	<b>P</b>
czas przyjmowania G-CSF (dni) - średnia, mediana (zakres)	9,25 7 (5-24)	7 7 (4-15)	> 0,05
stężenie HSC we krwi (x10 <sup>6</sup> kom/ul) - średnia, mediana (zakres)	3,4 2,5 (0,3-10)	70,9 45 (19,4-246,6)	0,02
stężenie HSC w separacie (x10 <sup>6</sup> kom/ul) - średnia, mediana (zakres)	-	5,66 5,9 (2,2-11,85)	-

#### 4.1.2. Skuteczność mobilizacji a parametry kliniczne.

Większość pacjentów (66%) przed mobilizacją zrealizowała dwie linie leczenia a 10 chorych - trzy lub więcej. Najczęściej stosowanym w mobilizacji protokołem chemioterapii był R-DHAP (blisko 76% chorych), Ara-C jako składową chemioterapii zastosowano łącznie u 82% pacjentów. Wszyscy chorzy przed mobilizacją uzyskali PR lub CR.

Spośród badanych 30 (67%) miało BMI powyżej normy (łącznie nadwaga i otyłość). W całej populacji mediana BMI to 26 (zakres: 18-33). Samą otyłość stwierdzono u 9 chorych (20% całej badanej grupy).

Choroby towarzyszące obecne były u 21 pacjentów (47%) i były to: nadciśnienie tętnicze, łagodna niedomykalność zastawki trójdzielnej lub przerost gruczołu krokowego. We wszystkich przypadkach choroby były zadawalająco kontrolowane farmaceutykami.

Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy skutecznością mobilizacji a schematem chemioterapii mobilizacyjnej (p=0,36), ilością zrealizowanych linii leczenia

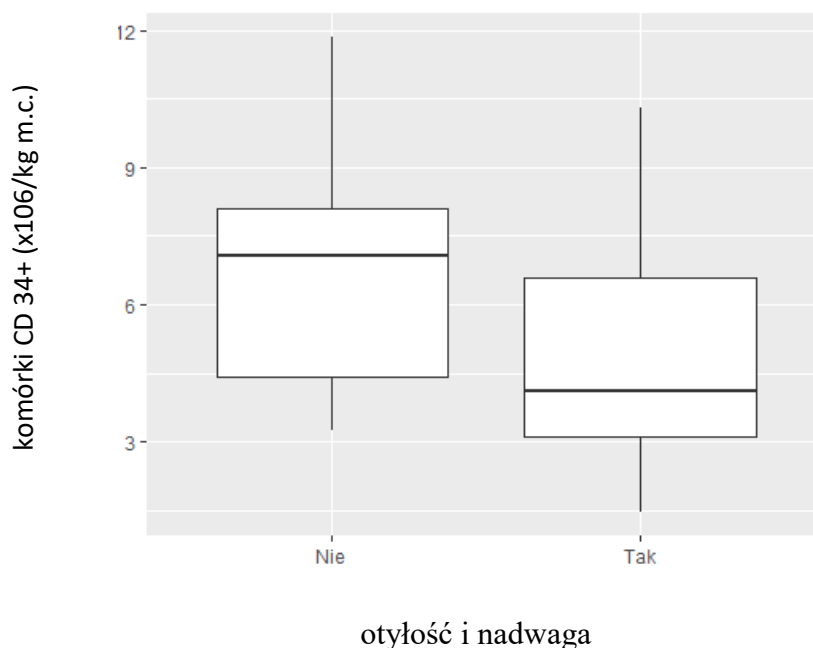


przeciwnowotworowego ( $p=0,17$ ), wiekiem ( $p=0,77$ ), BMI ( $p=0,8$ ). Zależność od płci miała wartość borderline ( $p=0,05$ ) na korzyść płci męskiej (procedura okazała się skuteczna u 92% mężczyzn i 68% kobiet).

U pacjentów, u których mobilizacja była skuteczna, a więc wykonano leukaferozę osiągając target stężenia komórek CD34+ w separacie, ilość pozyskanych komórek CD34+ nie wykazywała istotnej statystycznie zależności od rozpoznania ( $p=0,56$ ), płci ( $p=0,41$ ), wagi ( $p=0,75$ ), BMI ( $p=0,1$ ), wieku ( $p=0,23$ ), odpowiedzi na leczenie ( $p=0,35$ ), ilości zrealizowanych linii leczenia ( $p=0,82$ ) ani zastosowanej chemioterapii mobilizacyjnej ( $p=0,79$ ). W tej kohorcie nie było także istotnej zależności od ilości komórek CD34+ we krwi obwodowej mierzonej przed leukaferozą.

Po podziale pacjentów na grupę z BMI w normie oraz z BMI powyżej normy, a więc wskazującym na nadwagę lub otyłość, stwierdzono istotnie mniejszą ilość zebranych komórek CD34+ w przeliczeniu na kg masy ciała chorych w grupie drugiej ( $p = 0,04$ ). Zależności zobrazowano na Rycinie 3 oraz w Tabeli 6 i Tabeli 7.

**Rycina 3.** Komórki CD34+ a waga pacjenta.



**Tabela 6.** Wyniki statystyki opisowej dla ilości komórek CD34+ ( $\times 10^6/\text{kg m.c.}$ ) w separacie w zależności od grupy BMI.

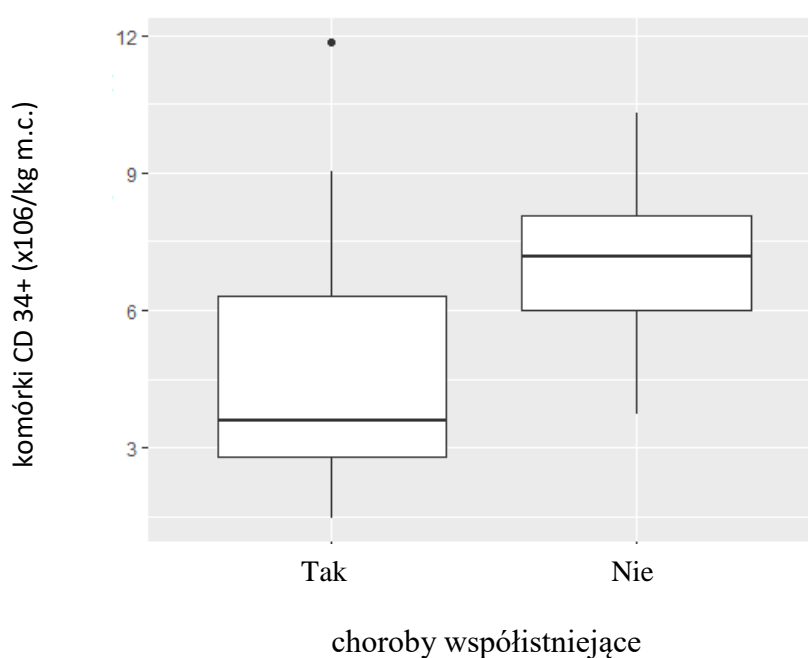
Otyłość lub nadwaga	Min.	Q 1.	Mediana	Średnia	Q 3.	Max.	SD
Nie	3,24	4,4	7,08	6,83	8,09	11,85	2.57
Tak	2,2	3,1	4,10	4,95	6,57	10,30	2.35

**Tabela 7.** Zależność skuteczności mobilizacji komórek CD34+ od grupy BMI.

	BMI			<i>p</i>
	norma n = 15	nadwaga n = 21	otyłość n = 9	
waga (kg), średnia, mediana (zakres)	69 70,5 (53-80)	76,1 76,5 (52-96)	101,3 99 (74-126)	
komórki CD34+ w separacie ( $\times 10^6/\text{kg m.c.}$ ): średnia, mediana	6,83 7,08	4,86 3,8	5,17 6 4,95 4,1	>0,05  0,04
ilość nieudanych mobilizacji w danej grupie BMI,	1 (7)	5 (24)	2 (22)	>0,05

Wykazano istotny statystycznie negatywny wpływ występowania chorób współistniejących na ilość pozyskanych HSC ( $p=0,0014$ ) – Rycina 4 i Tabela 8. Ich obecność nie wpływała natomiast na całkowite niepowodzenie mobilizacji pod postacią niezyskania stężenia komórek CD34+ we krwi minimalnego dla przeprowadzenia leukaferazy.

**Rycina 4.** Komórki CD34+ a choroby współistniejące.



**Tabela 8.** Wyniki statystyki opisowej dla ilości komórek CD34+ ( $\times 10^6/\text{kg m.c.}$ ) w separacie w zależności od występowania chorób współistniejących.

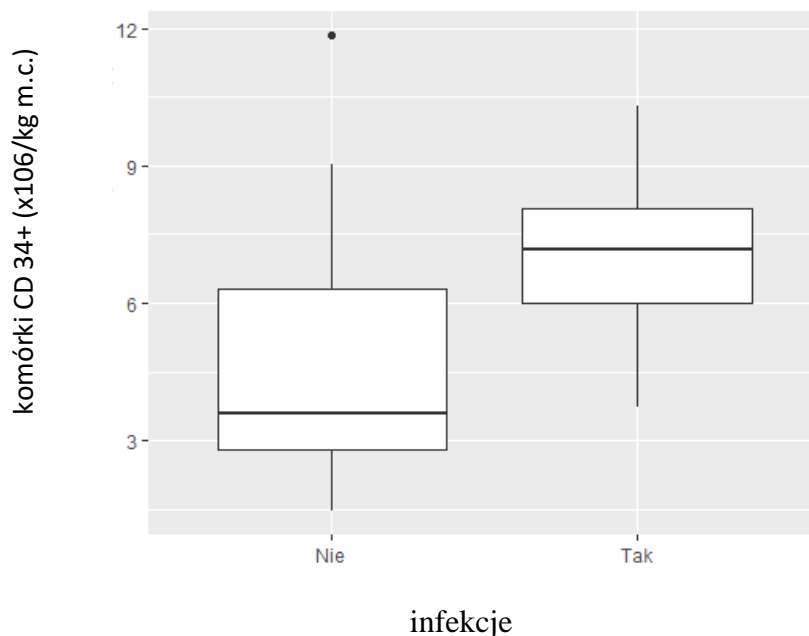
Choroby współistniejące	Min.	Q 1.	Mediana	Średnia	Q 3.	Max.	SD
Tak	2,2	2,78	3,60	4,64	6,30	11,85	2,59
Nie	3,74	6,00	7,16	6,87	8,07	10,30	2,02

U 7 pacjentów (16% badanych) w trakcie mobilizacji stwierdzono infekcje wymagające antybiotykoterapii, wszystkie w stopniu 2 wg CTCAE 5.0, wszystkie zakończone do dnia leukaferazy. Nie stwierdzono żadnej infekcji o etiologii wirusowej. U 4 chorych (9%) wykazano wzrost CRP w badaniach laboratoryjnych, jednak bez klinicznych cech infekcji.

Wystąpienie infekcji w trakcie mobilizacji pozytywnie korelowało z efektywnością procedury ( $p=0,03$ ) – Rycina 5 i Tabela 9. Rutynowo wykonywane posiewy bakteriologiczne próbek pobranego leukaferazą separatu HSC w każdym przypadku były ujemne.

Profilaktykę przeciwnieinfekcyjną stosowano u 16 pacjentów (36%). We wszystkich przypadkach stanowiła ją ciprofloksacyna i flukonazol. Infekcje pomimo profilaktyki przeciwbakteryjnych potwierdzono u 2 chorych. Łącznie 21 pacjentów (47%) przyjmowało w trakcie mobilizacji jakiegokolwiek antybiotyku. W leczeniu zakażeń podawano piperacylinę z tazobaktamem lub meropenem oraz flukonazol. Nie stwierdzono zależności pomiędzy przyjmowaniem jakiegokolwiek antybiotyku a skutecznością mobilizacji ani ilością zebranych komórek CD34+ u chorych po skutecznej mobilizacji.

**Rycina 5.** Komórki CD34+ a infekcje w trakcie mobilizacji.



**Tabela 9.** Wyniki statystyki opisowej dla ilości komórek CD34+ ( $\times 10^6/\text{kg m.c.}$ ) w separacie w zależności od występowania infekcji

Infekcje	Min.	Q 1.	Mediana	Średnia	Q3.	Max.	SD
Nie	2,2	3,47	5,00	5,26	6,84	10,30	2.40
Tak	4,10	6,79	7,54	7,77	8,66	11,85	2.58

#### 4.1.3. Skuteczność mobilizacji a parametry laboratoryjne.

U wszystkich pacjentów wykonywano rutynowo morfologię krwi obwodowej w dniach oznaczeń stężenia HSC w krwi obwodowej. Parametry oznaczone w ostatnim dniu przyjmowania G-CSF (drugi punkt czasowy) porównano ze skutecznością mobilizacji oraz jednocześnie ocenioną ekspresją badanych miR.

Średnio w całej grupie badanej stężenie WBC (tys/ul) wynosiło 18, NEUT (tys/ul) 13,6, HGB (g/dl) 10,4, PLT (tys/ul) 100,5. Różnice wyników dla poszczególnych grup nie wykazywały istotności statystycznej, przedstawiono je w Tabeli 10.

WBC przekraczające 40 tys/ul stwierdzono w drugim punkcie czasowym u 2 badanych, u nikogo nie stwierdzono WBC w przedziale 30-40 tys/ul. U 8 osób WBC nie osiągało dolnej granicy normy czyli 4 tys/ul. Spośród tych 8 osób u 2 mobilizacja zakończyła się niepowodzeniem.

**Tabela 10.** Parametry morfologii krwi obwodowej w grupie skutecznej i nieskutecznej mobilizacji w drugim punkcie czasowym.

	mobilizacja nieskuteczna	mobilizacja skuteczna
WBC ( $10^3/\mu\text{l}$ )		
średnia,	12,05	19,3
mediana (zakres)	10,29 (1,2-27,23)	18,0 (1,03-43,4)
NEUT ( $10^3/\mu\text{l}$ )		
średnia,	9,9	14,5
mediana (zakres)	8,12 (0,8-22,5)	14,5 (0,27-29,4)

HGB (g/dl)		
średnia,	9,1	10,7
mediana (zakres)	9,2 (7,6-10,2)	10,6 (7,8-14,3)
PLT ( $10^3/\mu\text{l}$ )		
średnia,	66,4	108
mediana (zakres)	66,4 (18-165)	99 (18-294)

Nie wykazano istotnego wpływu stężenia PLT ani NEUT mierzonego zarówno po podaniu chemioterapii, jak i w dniu separacji, na efektywność mobilizacji pod postacią ilości pozyskanych w drodze leukaferazy komórek CD34+.

#### 4.1.4. Toksyczność narządowa i hematologiczna.

Spośród parametrów uszkodzeń narządowych u wszystkich pacjentów rutynowo oznaczano stężenie kreatyniny i bilirubiny oraz aktywność aminotransferaz wątrobowych w osoczu. Obserwowano jedynie przejściowe laboratoryjne cechy uszkodzenia nerek bez konieczności stosowania dializoterapii (9% całej badanej grupy) i bez objawów klinicznych. Nie stwierdzono także żadnych innych toksyczności narządowych o demonstracji klinicznej.

W trakcie całej procedury 36% chorych wymagało przynajmniej jednorazowego przetoczenia koncentratu krwinek płytkowych (KKP) z powodu spadku stężenia PLT < 10 g/dl, a 22% substytucji koncentratem krwinek czerwonych (KKCz) ze względu na niedokrwistość z HGB < 7 g/dl. U żadnego z pacjentów nie obserwowano krwawień ani klinicznych objawów anemii. Nie obserwowano związku pomiędzy transfuzjami a skutecznością ani efektywnością mobilizacji.

#### 4.1.5. Skuteczność mobilizacji a stężenie miR.

Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy stężeniem żadnego z badanych miR mierzonego w pierwszym punkcie czasowym a skutecznością bądź nie mobilizacji ani ilością pozyskanych komórek CD34+ u chorych, u których mobilizacja była

skuteczna. Podobnie nie wykazano zależności pomiędzy stężeniem miR a czasem przyjmowania G-CSF ani ilością wykonanych leukaferez.

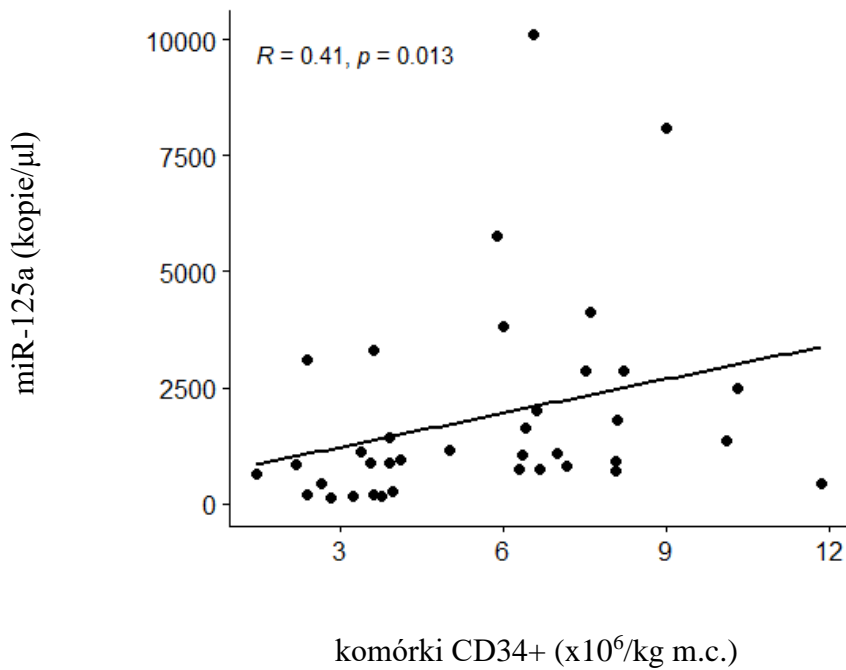
W całej grupie badanej nie wykazano istotnej statystycznie zależności pomiędzy stężeniem żadnego z badanych miR mierzonego w dniu separacji a jej skutecznością a więc osiągnięciem odpowiedniego stężenia komórek macierzystych w krwi obwodowej pacjenta i przeprowadzeniem leukaferazy, długością procesu mobilizacji wyrażoną ilością dni pobierania G-CSF ani ilością aferez koniecznych do uzyskania odpowiedniej ilości produktu.

Jednak w grupie chorych, u których mobilizacja była skuteczna, wykazano dodatnią korelację pomiędzy stężeniem komórek hematopoetycznych pobranych podczas leukaferazy a stężeniem miR-125a mierzonym w dniu leukaferazy przed jej wykonaniem ( $p=0,01$ ) i ujemną w przypadku miR-223 w tym samym punkcie czasowym ( $p=0,01$ ) – Rycina 6 i Rycina 7.

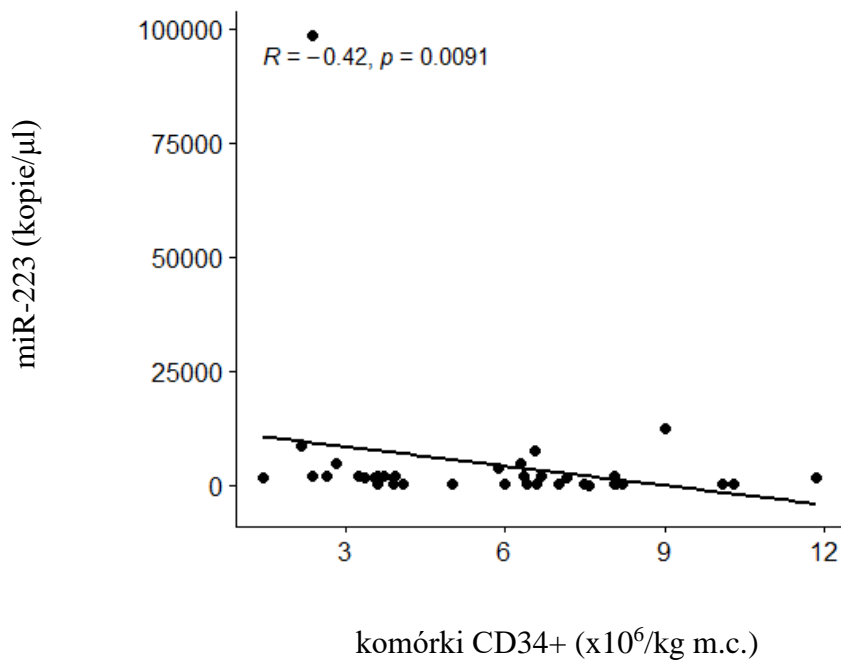
Stężenie komórek CD34+ we krwi obwodowej mierzona tuż przed leukaferazą także pozytywnie korelowało z ekspresją miR-125a mierzoną w tym samym czasie ( $p=0,0009$ ) – Rycina 8. Nie było istotnej zależności w przypadku pozostałych czterech miR.

Wykazano istotną zależność pomiędzy zmianą ekspresji miR-223 w trakcie mobilizacji a ilością uzyskanych w toku leukaferazy komórek CD34+ ( $p=0,16$ ). U wszystkich badanych ekspresja miR-223 w drugim punkcie czasowym była niższa niż wyjściowo a u chorych, u których różnica była bardziej nasiloną stwierdzono większe stężenie HSC w pobranym za pomocą leukaferazy separacie (Rycina 9).

**Rycina 6.** Komórki CD34+ w separacie ilościowo a ekspresja miR-125a.

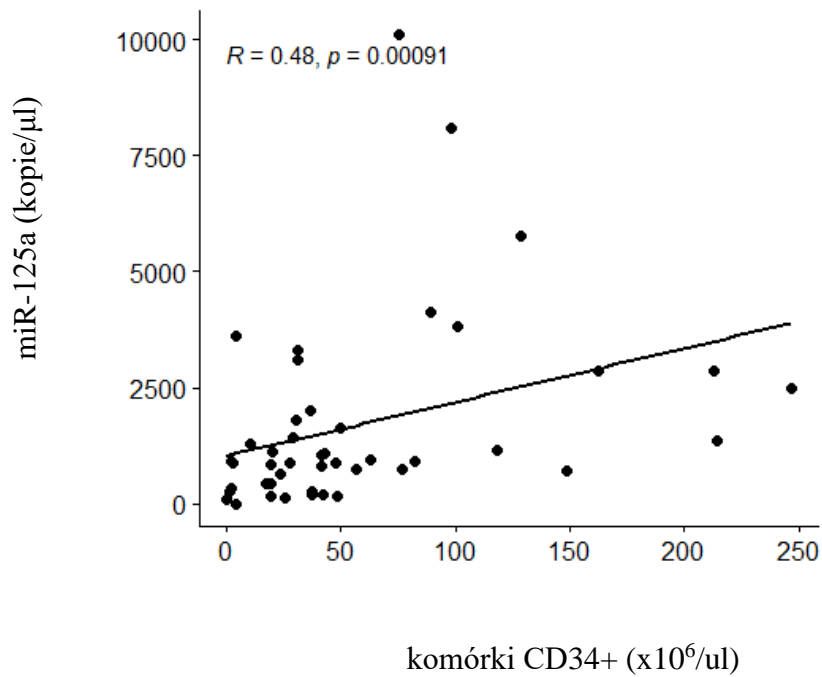


**Rycina 7.** Komórki CD34+ w separacie ilościowo a ekspresja miR-223.

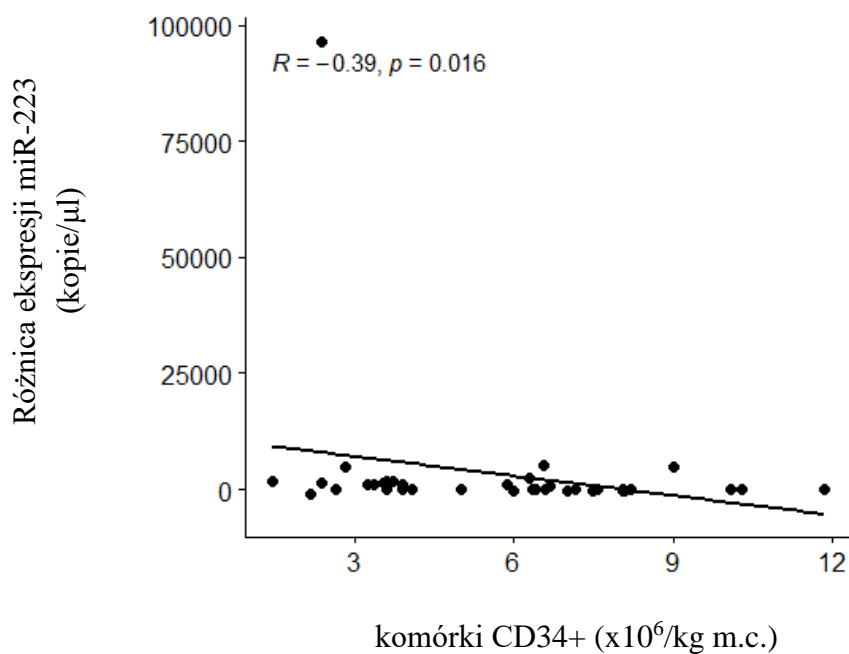


**Rycina 8.** Komórki CD34+ we krwi obwodowej ilościowo a ekspresja miR-125a.





**Rycina 9.** Komórki CD34+ w separacji ilościowo a zmiana ekspresji miR-223 w trakcie mobilizacji.



#### 4.2. Zależność pomiędzy stężeniem badanych miR a czynnikami wpływającymi na mobilizację HSC.

#### 4.2.1. Stężenie miR a parametry kliniczne.

Stężenia poszczególnych miR oznaczone w pierwszym punkcie czasowym, a więc jeszcze przed podaniem G-CSF, zestawiono z parametrami, które różniły badanych. Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy stężeniami poszczególnych miR a schematem chemioterapii zastosowanym w mobilizacji, ilości linii leczenia zrealizowanego uprzednio, rozpoznaniem ani płcią.

Wykazano istotną statystycznie ujemną korelację pomiędzy mierzonym w pierwszym punkcie czasowym stężeniem miR126 a wiekiem chorych ( $p=0,03$ ). Podobnie ujemna korelacja łączyła stężenie miR-155 i miR-223 i wagę badanych (odpowiednio  $p=0,04$  i  $p=0,02$ ). Stężenie miR-155 było znacząco niższe u chorych z całkowitą odpowiedzią na leczenie ( $p=0,04$ ). Mediana ilości kopii miR-155/ul dla osób z odpowiedzią CR wynosiła 12,85 (zakres: 3,58 – 123,75) zaś u badanych z odpowiedzią częściową wynosiła 61 (zakres: 18,4-220).

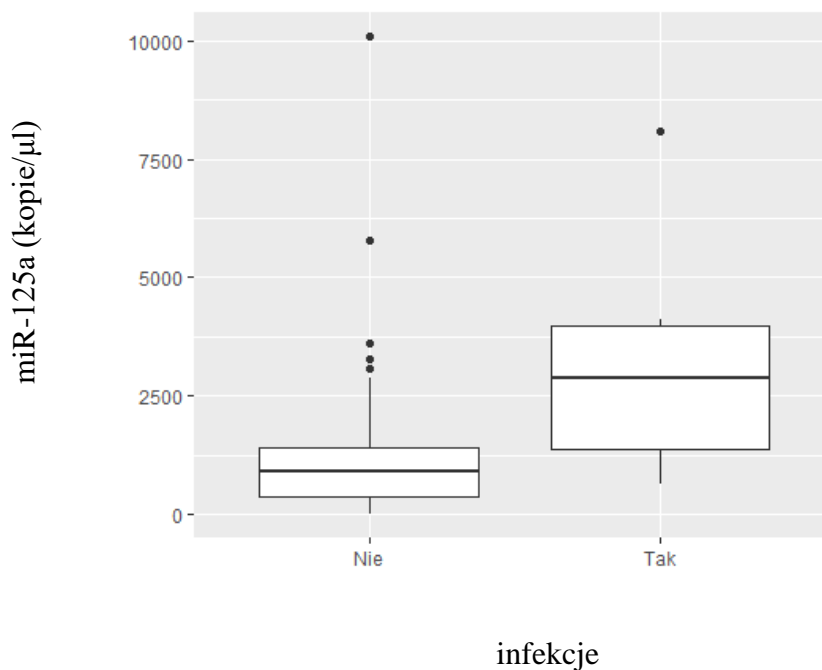
Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy stężeniem wszystkich badanych miR w drugim punkcie czasowym a schematem zastosowanym w mobilizacji, płcią badanych, wiekiem, rozpoznaniem, ilością linii wcześniej zrealizowanego leczenia ani odpowiedzią na leczenie.

Wykazano istotną statystycznie dodatnią zależność pomiędzy występowaniem powikłań separacji pod postacią infekcji w stopniu 2 wg CTCAE 5.0 i stężeniem miR-125a ( $p=0,04$ ) oraz miR-126 ( $p=0,04$ ) mierzonym w drugim punkcie czasowym. Dla pomiarów wykonanych przed podaniem G-CSF takiej zależności nie obserwowano.

Mediana stężenia miR-125a i miR-126 (kopie/ul) w drugim punkcie czasowym dla osób bez powikłań infekcyjnych wynosiła odpowiednio 892,5 i 799 (zakres: 366-1415,25 i 289,75–1749,5), zaś u osób z powikłaniami wynosiła odpowiednio 2860 i 1900 (zakres: 1374 – 3970 i 1215 - 5155) – Rycina 10.

Nie wykazano zależności pomiędzy przyjmowaniem antybiotyku a ekspresją żadnego z miR w drugim punkcie czasowym.

**Rycina 10.** Zależność pomiędzy obecnością infekcji a stężeniem miR-125a.

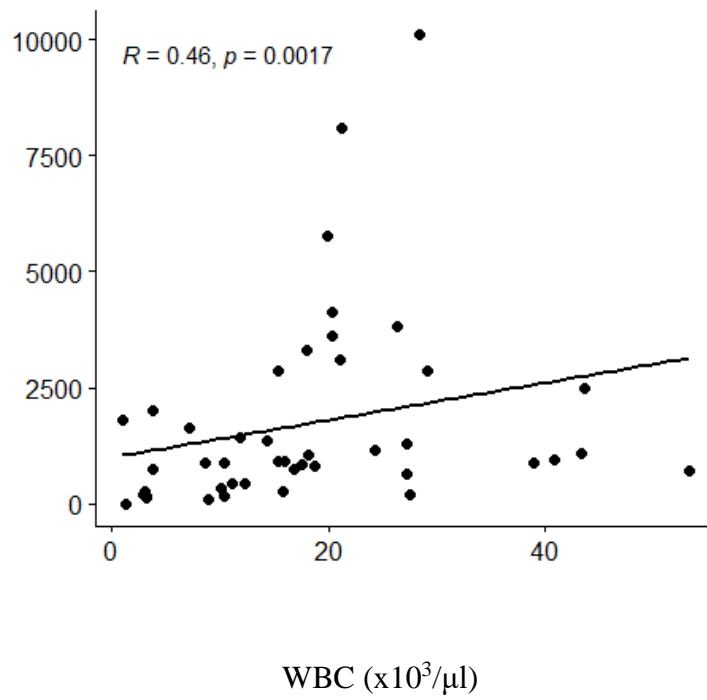


#### 4.2.2. Stężenie miR a parametry laboratoryjne.

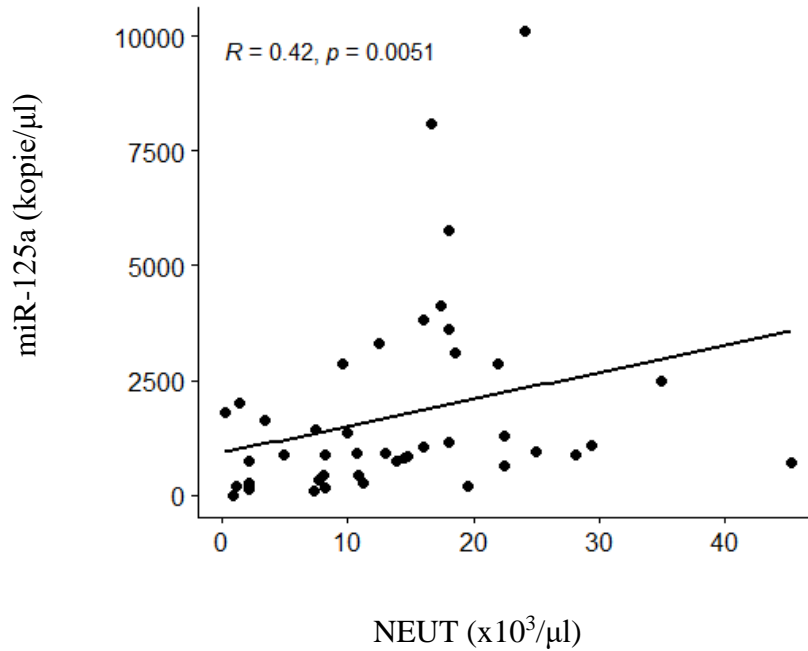
Zbadano zależność pomiędzy stężeniem poszczególnych parametrów morfologii w dniu separacji lub dniu odstąpienia od dalszej mobilizacji (z powodu jej nieefektywności) a stężeniem badanych miR. Wykazano istotną statystycznie korelację dodatnią pomiędzy stężeniem WBC oraz NEUT a stężeniem miR-125a (odpowiednio:  $p=0,002$  i  $p=0,001$ ). Nie było zależności pomiędzy stężeniem żadnego z badanych miR a stężeniem HGB ani monocytów. Istnieje natomiast związek między stężeniem PLT w dniu separacji bądź zakończenia mobilizacji a wartością miR-155 ( $p = 0,02$ ) oraz pomiędzy wzrostem stężenia miR-155 w toku separacji a stężeniem PLT we krwi obwodowej w dniu separacji bądź jej zaniechania ( $p=0,047$ ).

Nie było istotności pomiędzy zmianą ekspresji żadnego z badanych miR w toku mobilizacji a stężeniem WBC, NEUT, HGB ani monocytów w dniu separacji. Podobnie nie wykazano istotności w odniesieniu do ekspresji miR w pierwszym punkcie czasowym.

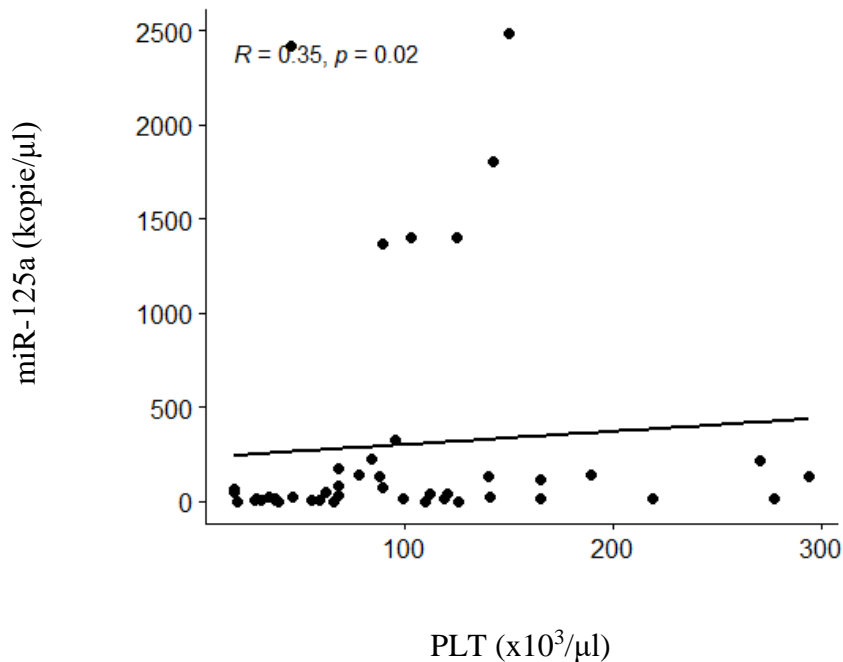
**Rycina 11.** Stężenie miR-125a w dniu separacji a WBC.



**Rycina 12.** Stężenie miR-125a w dniu separacji a NEUT.



**Rycina 13.** Wartość miR-155 a stężenie PLT w dniu separacji bądź zakończenia mobilizacji.



## 5. DYSKUSJA

W przeprowadzonym badaniu wykazałam, że mobilizację HSC w grupie chorych z rozpoznaniem NHL cechuje dość wysoka skuteczność, jednak istnieje pewna grupa pacjentów, u których procedura kończy się niepowodzeniem. W tej grupie parametry demograficzne okazały się nie mieć znaczenia w ocenie ryzyka nieskuteczności mobilizacji.

Najwięcej analiz dotyczących efektywności mobilizacji, jakie dotychczas opublikowano, przeprowadzono na zdrowych dawcach HSC. Kilku badaczy stwierdziło istotnie wyższe stężenie komórek CD34<sup>+</sup> we krwi u mężczyzn niż u kobiet, natomiast nie obserwowano zależności od wieku ani wagi dawców<sup>45,46</sup>. Inni wykazali wyższą skuteczność procedury u osób młodszych, przy czym badana populacja była zauważalnie młodsza od dawców autologicznych bowiem blisko połowa badanych znajdowała się w przedziale wiekowym 18-29 lat a jedynie ok. 10% miało co najmniej 50 lat<sup>47</sup>. Należy podkreślić, że zdrowi dawcy to grupa odmienna od pacjentów mobilizowanych przed autoHSCT nie tylko pod względem wieku, ale także obciążenia poważnymi schorzeniami oraz przebytego leczenia, zwłaszcza przeciwnowotworowego.

W dużej analizie retrospektywnej obejmującej dane 840 pacjentów z diagnozą MM lub NHL poddanych mobilizacji komórek macierzystych wykazano, że najsilniejszą korelację ze stężeniem komórek CD34+ uzyskanych w drodze leukaferazy wykazywało ich jednoczesne stężenie we krwi obwodowej pacjentów. Na podstawie literatury oraz własnych obserwacji, za tzw. 'poor mobilizers' czyli pacjentów, u których mobilizacja okazała się nieskuteczna uznano tych, u których stężenie komórek CD34+ we krwi osiągało wartość  $<20/\text{ul}$ . Jest to powszechnie uznana zależność, która przekłada się w wielu ośrodkach na standardowe wskazania do wykonania leukaferazy. Istotnym czynnikiem ryzyka niepowodzenia była także duża ilość przebytych cykli chemioterapii, nie stwierdzono natomiast powiązania z wiekiem, płcią, wagą ani stosowaniem w przeszłości radioterapii <sup>48</sup>. Znaczącym wydaje się jednak fakt, iż analizowana grupa nie była jednorodna pod względem rozpoznania a w wielu przypadkach w leczeniu choroby nowotworowej podawano leki uznane za wpływające negatywnie na skuteczność mobilizacji jak talidomid, lenalidomid oraz melfalan. Ponadto badano związek parametrów demograficznych z ilością komórek hematopoetycznych we krwi chorych, nie zaś w produkcji leukaferazy.

Podobnie heterogenną grupę pacjentów poddanych mobilizacji zbadał Donmez z zespołem stwierdzając, że prawdopodobieństwo nieudanej mobilizacji jest wyższe u badanych w zaawansowanym wieku, z rozpoznaniem NHL oraz nadwagą i otyłością. Nie określono natomiast granicy wieku uznanego za punkt odcięcia, zaś jego rozpiętość była dość szeroka i wynosiła 19-75 lat. Analizowana grupa obejmowała chorych z HL, NHL, MM a nawet ostrymi białaczkami. Co ciekawe, spośród wymienionych czynników ryzyka niepowodzenia, diagnoza NHL okazała się najbardziej istotnym z nich. Mobilizacja była nieskuteczna u 24,% pacjentów z rozpoznaniem NHL. Dla porównania, w grupie chorych na MM było to jedynie 9,6% badanych, w przypadku amyloidozy 14,3% a w kohorcie AML - 15,4% <sup>49</sup>.

Gorsze wyniki mobilizacji chorych na NHL potwierdzili także inni badacze <sup>50,51</sup>. W grupie obejmującej 65 pacjentów z rozpoznaniem HL i 141 z rozpoznaniem NHL mobilizacja była nieskuteczna u 14% wszystkich badanych a po szczegółowej analizie danych w kohorcie HL i NHL było to odpowiednio 5% oraz aż 18,4% badanych. Kryteria niepowodzenia Hosing z zespołem ustalili jako uzyskanie stężenia komórek CD34+ we krwi obwodowej  $<10$  komórek/ul lub w produkcji aferezy  $<2$  mln komórek/kg m.c. W przypadku chorych z diagnozą z grupy NHL wiek, płeć, ilość przebytych linii leczenia i schemat mobilizacji nie miały istotnego znaczenia dla skuteczności procedury. Jedynym czynnikiem ryzyka niepowodzenia w tej grupie była ilość płytek krwi we krwi obwodowej przed

rozpoczęciem mobilizacji < 150 tys/uł oraz komórkowość szpiku kostnego <30%. W przypadku całej badanej populacji, a więc bez wyłączenia pacjentów z HL, czynniki ryzyka obejmowały także wiek > 60 lat i schemat mobilizacji. Autorzy nie podejmują próby wytłumaczenia tego zjawiska, podkreślają jedynie, że te dwie grupy różniły się znacząco medianą wieku (33 lata w grupie HL i 55 lat w grupie NHL). Zwraca jednak uwagę dysproporcja ilości niepowodzeń pomiędzy kohortami, co mogło wpłynąć na rozbieżność wyników analizowanych w obu grupach łącznie i w każdej oddzielnie <sup>50</sup>.

W przedstawionych w niniejszej pracy wynikach nieskuteczność mobilizacji u chorych z NHL była niemalże identyczna jak w doniesieniu Hosinga i nieco niższa niż to zaprezentował Donmez, wystąpiła bowiem u 18% badanych. Mimo, że znakomita większość chorych pomyślnie zakończyła procedurę, co piąty badany musiał być kwalifikowany do ponownej mobilizacji, co mogło przesunąć czas wykonania autoHSC lub wręcz je uniemożliwić.

W prospektywnym i nieinterwencyjnym badaniu realizowanym pod kierownictwem Gorkom, obejmującym kilka ośrodków współpracujących w ramach EBMT, przeanalizowano dane niespełna 300 pacjentów z nawrotowym chłoniakiem poddanych mobilizacji HSC. U 96% chorych w mobilizacji zastosowano chemioterapię, jednak schematy bardzo różniły się w poszczególnych przypadkach. Podobnie jak w poprzedniej pracy, nie wykazano związku pomiędzy tzw. poor mobilizers (definiowanymi jako osoby uzyskujące < 10 komórek CD34+/uł krwi obwodowej) a schematem chemioterapii, ilością linii wcześniejszego leczenia, diagnozą, płcią ani wiekiem. Ciekawą obserwacją było statystycznie częstsze powodzenie mobilizacji po zastosowaniu schematu zawierającego platyny <sup>52</sup>.

W opisanym tu badaniu własnym uwzględniłam pacjentów z rozpoznaniem z grupy NHL jako wyróżniających się podstawowo gorszym rokowaniem skuteczności mobilizacji. Podobnie jak inni badacze analizujący przebieg procedury u pacjentów w tej kohorcie, nie stwierdziłam istotnego wpływu ilości przebytych linii leczenia, wagi ani wieku na skuteczność ani efektywność mobilizacji HSC. Średnia wieku badanych wynosiła 52 lata, zaś mediana 55 lat, a więc była zbliżona do opisanej w wyżej przytoczonych badaniach dotyczących chorych przed autoHSCT. Jednocześnie badani byli średnio starsi niż zdrowi dawcy HSC, u których wiek okazał się istotnym czynnikiem prognostycznym dla efektywności mobilizacji. Być może więc istotne różnice w wydajności procedury charakteryzują najmłodszych dorosłych.

Płeć wykazywała w prawdzie trend w kierunku lepszych efektów u mężczyzn, jednak graniczne  $p=0,05$  nie pozwala na uznanie istotności statystycznej wpływu tego parametru na skuteczność procedury.

Także rodzaj schematu chemioterapii stosowanej bezpośrednio przed mobilizacją nie wpływał na jej efekty, a więc nie potwierdziłam obserwacji Gorkom dotyczącej korzystnego wpływu platyny. Warto jednak zwrócić uwagę, iż znakomita większość pacjentów leczona była właśnie platyną wchodzącą w skład protokołu DHAP i R-DHAP, a więc rozkład badanych w grupie z platyną i bez niej był daleki od równomiernego.

Stwierdziłam także brak związku pomiędzy efektywnością mobilizacji HSC a wagą pacjentów, co jest zgodne z przytoczonymi wyżej doniesieniami. Wydaje się jednak, że sama waga, bez danych o wzroście badanego, nie jest miarodajnym parametrem, dlatego z praktycznego punktu widzenia istotniejszym wskaźnikiem wydaje się być BMI (ang. body mass index, BMI).

Kilka dużych badań skupionych wokół wpływu BMI na skuteczność mobilizacji dało sprzeczne wyniki. U ponad 500 pacjentów z rozpoznaniem MM, HL i NHL i poddanych mobilizacji HSC przed planowanym autoHSCT nie stwierdzono żadnego wpływu BMI na skuteczność procedury i ilość uzyskanych komórek ani na czas do odnowy hematopoetycznej po przeszczepieniu<sup>53</sup>. Wang i jego zespół przeprowadzili prospektywne badanie 309 zdrowych dawców dzieląc ich na grupy: chorzy z niedowagą, z wagą w normie, z nadwagą i otyłością. Wykazano, że ilość pozyskanych ostatecznie HSC/ul krwi obwodowej korelowała z BMI i była istotnie wyższa w trzeciej grupie. Autor zauważa jednak, że wynik ten może mieć związek z wyższą dawką G-CSF u osób z większą wagą, nie zaś z otyłością samą w sobie. Pozytywna korelacja występowała także pomiędzy skutecznością mobilizacji a stężeniem interferonu  $\gamma$  (ang. interefrone  $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ), czynnika martwicy nowotworu  $\alpha$  (ang. tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) i interleukiny 22 (ang. interleukin 22, IL-22) we krwi badanych. Nasuwa się więc przypuszczenie, że rezultaty w grupie charakteryzującej się wysokim BMI mogą być powiązane także z korzystnym wpływem czynników prozapalnych, jako że u osób z podwyższoną masą ciała występuje przewlekły stan zapalny o stosunkowo niskim nasileniu<sup>54</sup>. Otyłość zazwyczaj łączy się z hipercholesterolemią, zaś w badaniach na modelu zwierzęcym stwierdzono, że cholesterol LDL ma duży wpływ na mikrośrodowisko szpiku i zaburza funkcjonowanie osi SDF-1-CXCR-4 oraz zwiększa stężenie IL-17<sup>55,56</sup>. Farhadfar z zespołem przeanalizowali dane ponad 20 000 zdrowych dawców zgromadzone w rejestrze Centrum Międzynarodowych Badań Naukowych nad Transplantacją Krwi i Szpiku (ang. Center for International Blood and Marrow Transplant Research, CIBMTR). Badani przyjmowali G-CSF w dawce ok. 10 /kg m.c./dzień zaokrąglonej do najbardziej optymalnej dawki jaką można uzyskać stosując dostępne komercyjnie preparaty (300 i 480  $\mu$ g),. Całkowita dobowa dawka wahała się więc pomiędzy 600 i 1200  $\mu$ g. Zauważono istotny związek otyłości,



ale nie nadwagi, z wyższą ilością komórek CD34+/l krwi procedowanej w aferezie u zdrowych dawców. Podobnie jak poprzedni badacze, Farhadfar wiązał to z występującym u tych chorych stanem zapalnym. Nie uwzględniono dawców z niedowagą ze względu na ich niewielką liczbę. W tym przypadku przeprowadzono jednak analizę wieloczynnikową uwzględniającą większą dawkę G-CSF podawaną osobom otyłym. Okazało się, że BMI ostatecznie nie miało wpływu na skuteczność mobilizacji. Lepsze rezultaty powiązano także z płcią męską, choć należy zauważyć, że mężczyźni charakteryzowali się jednocześnie istotnie statystycznie większą wagą niż kobiety. Innymi czynnikami o pozytywnym wpływie był młodszy wiek, a także wyższe stężenie PLT i neutrofilii, zarówno przed mobilizacją, jak i w dniu aferezy<sup>47</sup>. W badaniu retrospektywnym na 463 niemieckich zdrowych dawcach za główny cel postawiono sobie ocenę wpływu polimorfizm CXCL-12 na mobilizację HSC. Okazało się, że badani zarówno z allelem CXCL-12A jak i CXCL-12G charakteryzowali się porównywalnym stężeniem komórek CD34+/l we krwi obwodowej oraz CD34/kg w produkcie aferezy. Jednak w analizie wieloczynnikowej okazało się, że jedynie płeć męska i wyższe BMI, nie wiek, korelowały pozytywnie z ilością CD34+/l we krwi obwodowej dawców przed aferezą<sup>57</sup>.

W przeciwieństwie do większości z wyżej wymienionych, wykazałam, że nadwaga i otyłość jest czynnikiem rokującym negatywnie dla skuteczności mobilizacji. Kluczowe jest natomiast to, że zarówno Wang, jak i Farhadfar posługiwali się w swoich obliczeniach ilością komórek CD34+/l krwi, nie zaś w przeliczeniu na wagę dawcy, co mogło mieć istotne znaczenie w przypadku dużych różnic w BMI. W związku z tym, że w opisywanym tu badaniu własnym analizowałam skuteczność mobilizacji u chorych przed planowanym autoHSCT, czyli będących jednocześnie dawcami i biorcami, do obliczeń posłużyłam się ilością HSC w separacie w przeliczeniu na kg m.c pacjenta. Z punktu widzenia praktyki klinicznej jest to bardziej przydatny sposób przedstawienia wyników. Ponadto zarówno oczekiwana ilość HSC w materiale pobranym podczas leukaferazy, jak i zalecana do przeszczepienia podczas autoHSCT, podawane są w oficjalnych wytycznych właśnie jako liczba komórek na kg m.c. dawcy. Ta zasadnicza różnica w przyjętych jednostkach może tłumaczyć rozbieżności w wynikach, jako że u osób otyłych bezwzględne stężenie HSC będzie w oczywisty sposób wyższe.

Otyłość jest stanem wpływającym na liczne szlaki sygnałowe w organizmie ludzkim i być może wysuwana przez Wang'a hipoteza stanu zapalnego jako stymulującego do mobilizacji HSC u osób z wysoką wagą nie uwzględnia całości procesów zachodzących *in vivo*. Ciekawe doniesienie opublikował Suzuki, który wraz z zespołem wykazał, że efekty mobilizacji HSC są lepsze u myszy żywionych dietą niskotłuszczową. Badacze podkreślają,

iz ekspresja receptora  $\delta$  aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (ang., peroxisome proliferator-activated receptor $\delta$ , PPAR $\delta$ ) jest nasilana w przypadku diety z wysoką zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (ang.  $\omega$ 3-polyunsaturated fatty acids, PUFA). Niskie stężenie PUFA prowadzi do zahamowania szlaku  $\omega$ 3-PUFA/PPAR $\delta$  skutkując zmniejszeniem aktywności białka angiopoietynopodobnego 4 (ang. angiopoietin-like protein 4, Angptl4), będącego negatywnym regulatorem wczesnej hematopoezy<sup>58</sup>. Inni badacze wykazali, że u myszy z otyłością wyidukowaną wysokotłuszczową dietą występuje zahamowanie proliferacji HSC przy wzmożeniu ich różnicowania. Efekt, w zależności od czasu jaki wystąpił od początku narastania otyłości, może obejmować stosunkowo wysoką leukocytozę przy zmniejszeniu ilości komórek progenitorowych w szpiku<sup>59</sup>.

Jednym z wniosków płynących z omawianego badania własnego jest pozytywny wpływ infekcji na ilość pozyskanych komórek CD34+. Ponadto występowanie infekcji wiązało się ze wzrostem ekspresji miR-125a, także dodatnio korelującego z efektywnością mobilizacji.

W przebiegu infekcji wytwarzana jest znaczna ilość cytokin a ich oddziaływanie na układ hematopoetyczny jest zróżnicowane. Jedną z tych cytokin jest G-CSF, którego obecność we krwi zwiększa się w odpowiedzi m.in. na interleukiny czy bakteryjne lipopolisacharydy (ang. lipopolysacharides, LPS). Dzieje się to już w ciągu 48 godzin od zaistnienia procesów zapalnych, prowadząc ostatecznie do proliferacji i różnicowania komórek progenitorowych granulocytów<sup>60-63</sup>. Ta odpowiedź immunologiczna mogłaby stanowić teoretyczne uzasadnienie poczynionej przez mnie obserwacji. Niewiele jest dostępnych doniesień opisujących wpływ infekcji na efektywność mobilizacji u pacjentów hematologicznych a większość z nich dotyczy ludzkiego wirusa upośledzenia odporności (ang. human immunodeficiency virus, HIV). W jednym z badań przeanalizowano skuteczność mobilizacji u chorych z chłoniakami NHL i współistniejącą infekcją HIV. Ryzyko niepowodzenia mobilizacji było większe jedynie u tych, których dodatkowo charakteryzowało niskie stężenie limfocytów CD4+ we krwi lub aktywna choroba nowotworowa. Nie wydaje się aby infekcja HIV sama w sobie miała istotny wpływ na skuteczność mobilizacji<sup>64</sup>. Należy zauważyć, że mechanizmy immunologiczne, zwłaszcza te dotyczące hematopoezy, mogą różnić się w zależności od tego czy zakażenie ma etiologię wirusową czy bakteryjną. Infekcje obserwowane przeze mnie w badaniu własnym były natomiast wyłącznie bakteryjne.

Spośród chorych z rozpoznaniem HL i NHL, którzy zostali uwzględnieni w badaniu zespołu Khouri, 24% doświadczyła gorączki neutropeniczej (ang. febr ile neutropenia, FN) w trakcie mobilizacji. Chorzy ci uzyskali istotnie mniejszą ilość komórek CD34+/kg m.c.

w separacie niż pacjenci bez gorączki. Wymagali też większej liczby aferez oraz dłuższej hospitalizacji<sup>65</sup>.

Prawidłowo zdefiniowana FN wg kryteriów CTCAE nie występuje w stopniu 1 ani stopniu 2 a jedynie w stopniach 3-5. Jest to więc grupa nieporównywalna z grupą włączoną przez mnie do badania własnego, jako że powikłania infekcyjne stwierdzone przez Khouri są poważniejsze niż obserwowane przez mnie infekcje w stopniu maksymalnie 2 wg CTCAE.

Z drugiej strony, ostry stan zapalny wydaje się stymulować proliferację i różnicowanie HSC poprzez działanie cytokin prozapalnych, osi LPS-TLR (ang. Toll like receptor, TLR) oraz zwiększenie stężenia krążącego CXCL-12, co wykazano w badaniach na chorych we wstrząsie septycznym<sup>66,67</sup>. Udział TLR w mechanizmie stymulacji HSC przez infekcję E.coli potwierdził także zespół Burberry. Stwierdzili oni istotną hipocelularność w szpiku kostnym myszy w 3 dniu od wprowadzenia bakterii do krwioobiegu i dynamiczny wzrost ilości HSC w szpiku, ale także we krwi obwodowej w dniu 9. Uznano to za potwierdzenie, że w infekcji bakteryjnej następuje pobudzenie proliferacji HSC jako mechanizm kompensujący początkowe wyczerpanie zasobów.<sup>68</sup> Nazywany wschodząca gwiazdą badań nad hematopoezą, NLRP3, będąc znacznikiem zmian w mikrośrodkowisku komórkowym, zwłaszcza tych zachodzących w warunkach stresu i aktywacji czynników prozapalnych, jest jednym z najlepiej przebadanych inflammasomów obecnych w środowisku komórek hematopoetycznych. Aktywacja NLRP3 odbywa się m.in. poprzez mechanizm zwany Sygnał 1, wymagający obecności LPS produkowanego przez bakterie Gram ujemne<sup>17</sup>. W badaniach na myszach poddanych mobilizacji z użyciem G-CSF wykazano istotną redukcję ilość komórek hematopoetycznych we krwi po zastosowaniu polimyksyny B oraz metronidazolu. Nie wykazano takiej zależności w przypadku ciprofloksacyny. Uzasadniano to faktem, iż ta ostatnia działa głównie na bakterie aerobowe w stolcu. Polimyksyna B ma zaś dużą zdolność wiązania endotoksyny. Około 90% Gram ujemnych bakterii jelitowych to bakterie anaerobowe, które są eliminowane przez metronidazol<sup>69</sup>. W innym badaniu na modelu mysim także powiązано migrację komórek hematopoetycznych do krwi obwodowej z nagłym zadziałaniem czynnika infekcyjnego i wykazano, że jest to spowodowane wpływem białka stymulującego dla genów IFN – STING, na nisze hematopoetyczne w szpiku kostnym.<sup>70</sup> Jednocześnie czynniki takie jak IFN-gamma i TNF alfa mogą promować apoptozę HSC a w przewlekłej stymulacji INF-alfa następuje pewne wyczerpanie zasobów szpikowych<sup>67</sup>. Przytoczone badania nasuwają więc wniosek, że nie ciężkość, lecz czas trwania infekcji ma znaczenie dla jej wpływu na różnicowanie komórek hematopoetycznych.

Darden et al. wychodząc z obserwacji, iż osoby starsze charakteryzuje wolniejsza odpowiedź układu hematopoetycznego na zaburzenia homeostazy a w konsekwencji gorsze rokowanie w przypadku ciężkich stanów klinicznych, przeanalizowali ekspresję wybranych miR powiązanych w literaturze z mobilizacją i różnicowaniem HSC u 27 chorych hospitalizowanych z powodu ciężkiego urazu. U badanych miR-125a, miR-125b i miR-126 osiągały znacznie niższe stężenie w szpiku kostnym niż u zdrowej grupy kontrolnej. Co ciekawe, u osób powyżej 55 roku życia różnica ta była znacznie bardziej nasiloną niż u młodszych<sup>71</sup>.

W porównaniu ze zdrową grupą kontrolną, pacjenci ze zdiagnozowaną ciężką posocznicą charakteryzowali się obniżoną ekspresją miR-125a. Ponadto niskie stężenie miR-125a korelowało z wystąpieniem uszkodzeń narządowych i ze śmiertelnością w sepsie<sup>72</sup>. Istnieje kilka doniesień ogniskujących się na roli miR-125 w procesie zapalnym, jednak najbardziej jednoznacznych danych dostarczają badania dotyczące makrofagów. MiR-125a wydaje się hamować aktywację makrofagów typu 1 indukowaną działaniem bakteryjnego LPS i promować aktywację działających przeciwzapalnie makrofagów typu 2<sup>73,74</sup>, co może tłumaczyć gorsze rokowanie wynikające z niewydolności wielonarządowej u chorych z niskim stężeniem miR opisane w przytoczonej wyżej pracy. Zaskakujący jest fakt, iż miR-125b wykazuje działanie odwrotne m.in. poprzez stymulację wydzielania cytokin takich jak interferon gamma oraz samo podlega ujemnej regulacji ze strony LPS.<sup>73</sup>

Na podstawie analizy komplementarności fragmentów kodujących można stwierdzić, że TNFAIP3 (ang. Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3) jest bezpośrednim celem miR-125a. Białko to z kolei bierze udział w regulacji NF-kappaB hamując jego działanie. NF kappaB na drodze zapoczątkowanej m.in. przez stymulację TLRs zostaje aktywowany w wielu sytuacjach stresowych, m.in. infekcji, urazach.<sup>75</sup>

Zou w swoim badaniu z 2020 roku przeprowadzonym na myszach nie dzielił grupy badanej na kohorty o różnej ciężkości przebiegu sepsy. Stwierdził, że w trakcie rozwijania się posocznicy ekspresja miR-126 rosła a po jej wzroście następowało różnicowanie limfocytów T w kierunku limfocytów T regulatorowych (ang. regulatory T lymphocytes, Treg) i spadała aktywność IL-10<sup>76</sup>. Ten sam autor wykazał na innym modelu mysim, iż po transferze cząsteczek RNA naśladujących miR-126 uszkodzenia narządowe w przebiegu sepsy były istotnie mniejsze. Powiązano to z hamowaniem różnicowania limfocytów T pomocniczych 17 (ang. helper T lymphocytes 17, Th17) i wzrostem Treg.<sup>77</sup>

Wydaje się więc, że ekspresja miR-126 i miR-125a rosnąc w przebiegu infekcji skutkuje ograniczeniem procesu zapalnego, a co za tym idzie, zmniejszeniem uszkodzeń narządowych.

Przebieg infekcji u osobników, u których ww. miR osiągają niskie wartości jest znacznie poważniejszy. U pacjentów objętych badaniem własnym diagnozowano infekcje maksymalnie w stopniu 2 a więc o niewielkim nasileniu. Nie stwierdzono uszkodzeń narządowych. Obserwowany wzrost ekspresji miR-125a i miR-126 u tych pacjentów jest więc zgodny z hipotezą o ochronnym działaniu tych markerów.

Jednocześnie w badaniu własnym będącym przedmiotem niniejszej rozprawy, wyższe stężenie miR-125a w dniu leukaferazy było pozytywnym predykatorem ilości komórek CD34+ pozyskanych u mobilizowanych chorych. Co więcej, korelowało także z ilością HSC we krwi obwodowej pacjentów. Wydaje się więc mieć bardzo silne powiązanie z procesem mobilizacji. Odwrotną korelację odnotowano w przypadku stężenia miR-223 oznaczonego w drugim punkcie czasowym a stężeniem HSC w separacie. Według mojej wiedzy dotychczas przeprowadzone badania dotyczące wpływu miR na mobilizację HSC uwzględniały model zwierzęcy, głównie myszy, a jedynie nieliczne obejmowały ludzi.

Guo et al. zaprojektowali eksperyment mając na celu określenie roli miR w dojrzewaniu i różnicowaniu HSC. Wykorzystano trzy populacje myszy: osobniki MxCre, u których za pomocą iniekcji immunostymulatora polyI:polyC (pIpC) w późniejszym etapie badania wyidukowano ablację obu alleli polimerazy RNA - Dicer w komórkach hematopoetycznych (Dicer<sup>lox/lox</sup>), jednego allela (Dicer<sup>lox/wt</sup>) oraz osobniki kontrolne (Dicer<sup>wt/wt</sup>). Po letalnym napromieniowaniu szpiku kostnego wszystkim myszom przeszczepiono zdrowe HSC. Wszystkie myszy charakteryzowała początkowa rekonstytucja 50% komórek o fenotypie biorcy i 50% o fenotypie dawcy, jednak w pierwszej grupie po podaniu pIpC szpik kostny biorcy został całkowicie wyparty przez komórki dawcy po ok. 20 tygodniach. Następnie wykonano w tej grupie kolejne przeszczepienie z zastosowaniem zdrowych komórek i obserwowano efekt jaki pojawił się w po pierwszym przeszczepie u myszy kontrolnych. Uznano to za dowód, iż miRNA jako zależne od Dicer są niezbędne do prawidłowej rekonstytucji układu hematopoetycznego. Co więcej, wykonano profilowanie genotypu zdrowych komórek HSC in vitro pod kątem obecności sekwencji potencjalnie istotnych miRNA i wykazano wysoką ekspresję miRNA-125a w różnicujących się HSC w porównaniu do innych linii komórkowych. Po dodaniu syntetycznego inhibitora miR-125a nie stwierdzono w prawdzie różnicy ilościowej ani jakościowej w pierwotnej hodowli, natomiast zaobserwowano znaczącą redukcję komórek w kolejnych koloniach replikacyjnych<sup>78</sup>. Zwiększona ekspresja miR-125a w szpiku kostnym okazała się kluczowa dla wzmożonej proliferacji i różnicowania HSC, a co za tym idzie dla szybkiej odnowy układu hematopoetycznego u myszy poddanych

transplantacji z zastosowaniem modyfikowanych HSC wykazujących nadekspresję miR-125a<sup>30</sup>.

Rodzina miR-125 poza miR-125a obejmuje również miR-125b. U myszy poddanych serii transplantacji szpiku ze zmodyfikowanymi genetycznie komórkami z nadekspresją obu członków rodziny miR-125 wykazano w prawdzie kompetycyjną przewagę HSC z nadekspresją miR-125a, jednak każdy z nich oddzielnie także powodował znaczący wzrost ilości potencjału proliferacyjnego *in vivo* komórek CAFC (ang. cobblestone area forming cells) - bardzo wczesnych komórek hematopoetycznych tworzących w hodowlach długoterminowych ogniska proliferacji<sup>33</sup>. Ponadto komórki macierzyste z mysiej linii komórkowej różnicujące się do granulocytów pod wpływem G-CSF charakteryzowała zwiększona ekspresja m.in. MiR-125b czy miR-223. Co istotne, spośród wszystkich miR wskazanych przez badaczy, jedynie miR-125b powodował zahamowanie dalszego różnicowania a ta swoista pętla zwrotna została powiązana przez z wpływem miR na kofaktory szlaku STAT3<sup>32</sup>.

W projekcie własnym nie stwierdziłam istotnej zależności pomiędzy ekspresją miR-125b a efektywnością mobilizacji HSC u pacjentów. Biorąc pod uwagę, iż taka zależność obejmowała miR-125a, może to wynikać z opisanej wyżej kompetycyjnej przewagi miR-125a. Istotny jest także fakt, iż większość badaczy przedstawia nadekspresję miR-125a jako czynnik związany ze wzrostem nie tylko proliferacji, ale też różnicowania się komórek hematopoetycznych<sup>30,78</sup>. Tymczasem miR-125b wydaje się hamować różnicowanie<sup>32</sup>. Mobilizacja komórek macierzystych w założeniu prowadzi do pozyskania HSC o potencjale do przyszłego różnicowania się a więc być może brak istotnego wzrostu miR-125b u pacjentów skutecznie mobilizowanych jest zjawiskiem oczekiwanym.

Jedno z nielicznych badań miR w mobilizacji u ludzi przeprowadzili naukowcy z ośrodka łódzkiego. Nowicki z zespołem początkowo analizowali związek ekspresji wybranych miRNA z czasem do regeneracji układu hematopoetycznego u 51 chorych z rozpoznaniem MM, HL lub NHL poddanych autoHSCT. Wykazano, że czas do rekonstytucji był znacząco dłuższy u pacjentów charakteryzujących się wysokim stężeniem osoczonego miR-126 i miR-223 odpowiednio w dniu 0 i 7 po zakończeniu kondycjonowania<sup>79</sup>. Wychodząc z obserwacji, że wybrane miR wydają się mieć istotne znaczenie w procesie hematopoezy, ci sami badacze zaprojektowali badanie w mobilizacji HSC u 50 pacjentów leczonych z powodu MM lub NHL. Oznaczano stężenie siedmiu miR w osoczu krwi obwodowej pobranej przed chemioterapią mobilizacyjną oraz w dniu aferezy. Protokoły chemioterapii były zróżnicowane i obejmowały CPD, Ara-C, DHAP, R-DHAP, ICE, R-ICE i DCEP. Spośród miR ujętych przez

mnie w badaniu własnym, Nowicki z zespołem uwzględnili stężenie miR-223, miR-155 i miR-126. Stężenia wszystkich trzech wykazywały tendencję spadkową w toku mobilizacji. Ekspresja miR-126 ponadto pozytywnie korelowała z ilością aferez, zaś miR-223 ze stężeniem WBC w dniu aferezy<sup>38</sup>. W opisywanym badaniu własnym nie stwierdziliśmy zależności pomiędzy WBC ani neutrofilami a stężeniem miR-223 ani jego zmianą w czasie, natomiast taka zależność występowała w przypadku miR-125a. Według polskich badaczy ekspresja miR-223 w dniu aferezy ujemnie korelowała z ilością komórek CD34+ uzyskaną w separacie, natomiast nie było istotnego statystycznie związku w przypadku miR-126 i miR-155. Jest to obserwacja w pełni zgodna z wynikającą z przedstawionego tu badania własnego. Nie wykazałam bowiem zależności pomiędzy ekspresją miR-126 ani miR-155 a efektywnością mobilizacji u pacjentów. W przypadku tego pierwszego dotychczasowe doniesienia są niezwykle spolaryzowane. W eksperymencie zaprojektowanym przez Salvucci et al. i wykonanym na myszach poddanych mobilizacji HSCs, stwierdzono zwiększoną ilość miR-126 w przestrzeni pozakomórkowej szpiku kostnego po podaniu G-CSF. Co więcej, u myszy pozbawionych genu dla miR-126, mobilizacja z użyciem G-CSF była wręcz zupełnie nieefektywna<sup>37</sup>. W opozycji są wyniki wykazane przez polskich badaczy. Nowicki z zespołem przeprowadzili analizę ekspresji miR u poddanych mobilizacji pacjentów z chorobami limfoproliferacyjnymi wykazując wyraźne zmniejszenie ekspresji miR-126 po podaniu G-CSF w porównaniu z punktem czasowym przed jego włączeniem. Okazało się to nie mieć istotnego statystycznie związku z ilością uzyskanych ostatecznie komórek CD34+, jednak sam trend wydaje się być zastanawiający<sup>38</sup>.

Ekspresja miR różni się w zależności od pochodzenia HSC i jest względnie podobna w krwi pępowinowej i szpiku kostnym natomiast istotnie inna w krwi obwodowej. Spośród ponad 200 miR za różnicujące uznano kilka z nich, z których uwzględnione w przeprowadzonym przez mnie badaniu są miR-125a i miR-126. Ekspresja obu jest istotnie podwyższona w krwi obwodowej<sup>80</sup>.

Badanie na HSC pozyskanych zarówno bezpośrednio ze szpiku kostnego, jak i z krwi obwodowej zdrowych dawców udowodniło, że obecność miR-155 charakteryzuje także komórki CD 34+ i jest dwukrotnie wyższe dla komórek szpiku kostnego niż mobilizowanych do krwioobiegu. Co ciekawe, po dodatkowej transdukcji pre-miR-155 do HSC obserwowano częściowe zahamowanie rozwoju linii mieloidalnej i erytroidalnej, a zatem miR-155, podobnie jak opisany wcześniej miR-125b, wydaje się być inhibitorem różnicowania HSC. W komórkach CD34+ stwierdzono także ekspresję miR-223, jednak w przeciwieństwie do poprzednika, jego stężenie było 4-krotnie wyższe w komórkach z krwi obwodowej niż szpiku kostnego. Za pomocą technik bioinformatycznych dopasowano miR do potencjalnego

targetowego mRNA i potencjalnego punktu działania w hematopoezie. MiR-223 prawdopodobnie bierze udział w różnicowaniu późniejszych stadiów hematopoezy, zwłaszcza granulopoezy<sup>81</sup>. Podobną rolę przypisuje mu kilku badaczy<sup>43,44</sup>. W opozycji stoją wnioski płynące z eksperymentu Trissal, bowiem ekspresja miR-223 w szpiku badanych myszy nie wpływała na liczbę neutrofilów we krwi obwodowej a wyciszenie obu alleli miR powodowało jedynie hipersensytywizację granulocytów. Autorka tłumaczy to potencjalnymi różnicami w mikrobiomie zwierząt<sup>82</sup>. Różnicowanie się prekursorów granulocytów do dojrzałych neutrofilów powoduje zwiększenie stężenia proteaz neutrofilowych takich jak metaloproteinaza-9 uwalnianych przez te drugie. Proteiny odgrywają zaś istotną rolę w degradacji cząsteczek adhezyjnych w niszach szpikowych<sup>15,83</sup>. Ponadto miR-223 reguluje oś PIK3CA/AKT1 i kontroluje przetrwanie komórki poprzez insulin-like growth factor 1 receptor IGF1R, co wydaje się mieć dodatkowe znaczenie w mobilizacji HSC<sup>43,84</sup>.

Angielscy badacze przeanalizowali retrospektywnie dane prawie 400 zdrowych dawców HSC. Nie wykazali związku między stężeniem WBC w krwi w dniu separacji a stężeniem komórek CD34+ w separacie, jednak po podzieleniu badanych na dwie grupy o wysokiej i niższej leukocytozie wykazano taką zależność na korzyść pierwszej grupy. Za wartość dzielącą grupy przyjęto 41,4 tys/ul czyli medianę stężenia WBC dla wszystkich badanych w dniu aferezy<sup>85</sup>. W podobnym doniesieniu za punkt odcięcia przyjęto natomiast leukocytozę > 50tys/ul w piątym dniu przyjmowania G-CSF<sup>86</sup>. W grupie, która brała udział w przeprowadzonym przez mnie badaniu nie wykazano wpływu stężenia WBC w dniu aferezy, ani w dniu po zakończeniu chemioterapii, na powodzenie mobilizacji lub ilość uzyskanych komórek krwiotwórczych. W odniesieniu do wyżej przytoczonych publikacji, istotnym jest fakt, że jedynie 2 osoby osiągnęły leukocytozę co najmniej 40 tys/ul w dniu aferezy a u pozostałych chorych stwierdzono WBC < 30 tys/ul.

W innym interesującym badaniu u 118 pacjentów poddanych mobilizacji przed autoPBSCT stężenie CD34+ w produkcie aferezy korelowała pozytywnie z leukocytozą, stężeniem PLT i ilością CD34+ we krwi obwodowej, zaś negatywnie ze stężeniem ferrytyny we krwi. Stężenie PLT i komórek CD34+ we krwi były silnymi predyktorami także w analizie wieloczynnikowej. Autorzy podkreślają, że PLT mogą być istotnym w praktyce klinicznej predyktorem MF (mobilization failure)<sup>51</sup>.

Z kolei inni badacze nie stwierdzili wpływu leukocytozy na efektywność mobilizacji, natomiast wykazali istotną korelację stężenie PLT i RBC w dniu separacji z ilością uzyskanych HSC<sup>47,87</sup>. W moim badaniu nie potwierdziłam tej obserwacji, jednak część pacjentów otrzymywała transfuzje KKCz lub KKP w trakcie mobilizacji, co z pewnością miało wpływ na



wymienione parametry. Ponadto przytoczone badania były prowadzone na zdrowych dawcach lub heterogennej grupie chorych obejmującej także pacjentów z MM. Chorzy z NHL są natomiast specyficzną kohortą, jako że już samo rozpoznanie pozwala prognozować wyższy odsetek niepowodzeń.

Spośród analizowanych przeze mnie miR, ekspresja miR-155 okazała się pozytywnie korelować ze stężeniem PLT w dniu separacji. Podobnie jak w przypadku samych PLT, miR-155 nie okazał się mieć natomiast związku ze skutecznością mobilizacji.

Rafiee et al. zaprojektowali w 2021r. badanie mające na celu ewaluację przydatności wybranych miR w przewidywaniu przebiegu rekonstrukcji płytek krwi i neutrofilów u chorych po autologicznym przeszczepieniu HSCs. Udowodniono, że proces rekonstrukcji przebiegał sprawniej u pacjentów z wyższym poziomem osoczowego miR-155 mierzonym po zastosowaniu kondycjonowania. Co ciekawe, wykazano, że parametrami o najwyższym potencjale predykcyjnym były wysokość stężenia miR-155 oraz ilość przeszczepionych HSCs, przy czym w przypadku gdy ten drugi czynnik przybierał wartość poniżej  $3,5 \times 10^6$  komórek CD34+/kg masy ciała biorcy, jedynym istotnym predykatorem pozostawał miR-155<sup>88</sup>. W przypadku mobilizacji, zarówno ja, jak i przytaczani już wcześniej badacze, nie stwierdziliśmy istotnej korelacji pomiędzy ekspresją miR-155 a skutecznością mobilizacji<sup>38</sup>.

Wnioski dotyczące zależności pomiędzy ekspresją opisanych wyżej miR a proliferacją i różnicowaniem HSC różnią się w zależności od badanej grupy. Nadal dysponujemy jednak stosunkowo niewielką ilością doniesień dotyczących ludzi, zwłaszcza chorych poddawanych mobilizacji HSC. W moim projekcie uwzględniłam pacjentów z rozpoznaniem NHL jako charakteryzujących się najmniejszą skutecznością procedury. Uzyskane przeze mnie wyniki mogą więc stanowić punkt wyjściowy do dalszych badań w innych populacjach, takich jak chorzy leczeni z powodu HL lub MM. Ponadto interesującym kierunkiem wydaje się poszerzenie badań o analizę związku pomiędzy ekspresją miR a przebiegiem rekonstrukcji układu hematopoetycznego u pacjentów po autoHSCT.

## 6. WNIOSKI

1. Mobilizacja HSC u chorych z rozpoznaniem NHL jest dość skuteczną procedurą, jednak istnieje grupa chorych, u których kończy się ona niepowodzeniem.
2. Nie udało się zidentyfikować grupy tzw. poor mobilizers na podstawie ekspresji badanych miR.
3. Spadek ekspresji miR-223 korelował z wyższym stężeniem komórek CD34+ w separacie. Dynamika zmian ekspresji miR-223 w badanych punktach czasowych może być więc predykatorem efektywności mobilizacji HSC.
4. Ekspresja miR-125a w dniu spodziewanej leukaferazy koreluje pozytywnie z ilością komórek CD34+/kg m.c. dawcy w krwi obwodowej oraz w separacie pobranym w drodze leukaferazy. Ekspresja miR-223 w dniu spodziewanej leukaferazy koreluje natomiast negatywnie z ilością komórek CD34+/kg m.c. dawcy separowanych w drodze leukaferazy. Oba miR wydają się mieć udział w procesach hematopoezy.
5. U pacjentów, którzy w trakcie mobilizacji przebyli infekcję w stopniu maksymalnie 2 wg CTCAE 5.0 ilość pobranych komórek CD34+ była znacząco wyższa niż u osób, które nie przechodziły infekcji. Wydaje się to świadczyć o pozytywnym wpływie krótkotrwałego stanu zapalnego na procesy hematopoezy.
6. Czynniki negatywnie rokującymi dla efektywności mobilizacji są: nadwaga i otyłość oraz występowanie chorób współistniejących. Pacjenci z nadwagą i otyłością uzyskali istotnie niższą ilość komórek CD34+/kg m.c. w separacie niż chorzy prawidłowym BMI, co może sugerować negatywny wpływ długotrwałego stanu zapalnego na hematopoezę. Podobnie mniej komórek pozyskano u pacjentów z chorobami współistniejącymi w porównaniu z nieobciążonymi badanymi. W tych grupach koniecznym może się okazać dodatkowe wspomaganie mobilizacji, np. poprzez zastosowanie plerixaforu.

## 7. STRESZCZENIE

Mobilizacja komórek macierzystych (HSC) to procedura mająca na celu pozyskanie HSC z krwi obwodowej pacjenta. Ma ona zastosowanie u zdrowych dawców oraz u pacjentów, u których wskazane jest przeprowadzenie autologicznego przeszczepienia komórek hematopoetycznych (autoHSCT), czyli podanie ich własnych HSC, celem umożliwienia odtworzenia układu krwiotwórczego po leczeniu wysokimi dawkami chemioterapii. W drugiej grupie znajdują się głównie chorzy z rozpoznaniem chłoniaków nieziarnicznych (NHL), chłoniaka Hodgkina (HL) oraz szpiczaka plazmocytozy (MM). Efektywność mobilizacji nie zawsze spełnia oczekiwania lekarza oraz pacjenta. Niepowodzenie procedury zazwyczaj wyraża się w uzyskaniu niewystarczającej do odnowy hematopoetycznej ilości HSC. Trwają próby określenia czynników złego rokowania dla skuteczności mobilizacji. Wymieniane są głównie aspekty kliniczne a jednym z najczęściej przytaczanych jest rozpoznanie NHL.

Stymulację powstawania i migracji do krwi obwodowej HSC, charakteryzujących się ekspresją antygenu powierzchniowego CD34+, uzyskuje się poprzez podawanie pacjentowi czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów (G-CSF). Molekularny mechanizm działania G-CSF, a także powstawania oraz dalszego różnicowania się komórek CD34+, nie został do końca poznany. Regulacja ekspresji genów odpowiedzialnych za procesy zachodzące w komórce na jej wczesnym stadium rozwoju odbywa się poprzez liczne zjawiska epigenetyczne, m.in. udział mikroRNA (miR).

MiR to jednoniciowe, niekodujące cząsteczki RNA, złożone zazwyczaj z 21-23 nukleotydów. Ich funkcją jest potranskrypcyjna regulacja ekspresji genów w mechanizmie blokowania translacji, bądź przez promowanie degradacji targetowych fragmentów informacyjnego RNA (mRNA). Wyniki badań przeprowadzonych na liniach komórkowych oraz modelu mysim wskazują na udział niektórych miR w proliferacji, migracji i różnicowaniu HSC.

W niniejszym badaniu podjęłam próbę określenia wpływu czynników molekularnych w postaci ekspresji wybranych miR, oraz czynników klinicznych, na skuteczność i efektywność mobilizacji HSC u pacjentów z chorobą limfoproliferacyjną. Badaną grupę stanowiło 45 chorych z rozpoznaniem z grupy NHL z dojrzałych komórek B, mobilizowanych w Klinice Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku we Wrocławiu w latach 2018-2021. Wszystkim chorym podano chemioterapię przeciwnowotworową a od dnia +5 po zakończonej chemioterapii, wykonywano podskórne iniekcje G-CSF w dawce ok. 5ug/kg masy ciała podawanej dwa razy dziennie. Poczynając od piątego dnia stosowania G-CSF, w ramach

standardowego postępowania, dokonywano codziennych pomiarów stężenia HSC we krwi obwodowej aż do uzyskania wartości odpowiednich dla wykonania leukaferazy lub decyzji o zakończeniu mobilizacji. Separację przeprowadzano przy użyciu aparatu Spectra Optia. Za pomocą cytometrii przepływowej w uzyskanym materiale oznaczano stężenie HSC czyli komórek CD34+. Wyniki odnoszono następnie do wagi pacjenta. Procedurę uznawano za skuteczną w przypadku uzyskania w separacie min.  $2 \times 10^6$  komórek CD34+/kg masy ciała. Dodatkowo dokonywano pomiaru ekspresji miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-155 i miR-223 w dobie poprzedzającej planowane włączenie G-CSF oraz przed rozpoczęciem pierwszej aferezy lub, w przypadku niewystarczającej ilości komórek CD34+ we krwi obwodowej badanych, w ostatnim dniu przyjmowania G-CSF. Krew do badań molekularnych mrożono w dedykowanych do tego próbkach PAX Gen Blood RNA Tubs (Qiagen) zapewniających natychmiastową stabilizację RNA, a następnie przechowywano w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ . Izolacja materiału genetycznego została przeprowadzona z użyciem zestawu RT-qPCR - Paxgene RNA Isolation Kit IVD (Qiagen) oraz ddPCR- *mirVana*<sup>TM</sup> miRNA Isolation Kit (AMBION). Po wyizolowaniu RNA zastosowano zestaw do odwrotnej transkryptazy - The TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Do określenia poziomu ekspresji miR wykorzystano odpowiednie sondy TaqMan (Thermo Fisher Scientific Waltham). Wszystkie procedury wykonywano według zaleceń producentów wymienionych zestawów. Ponadto, zebrano dane demograficzne oraz kliniczne dotyczące badanych, a także informacje o przebiegu mobilizacji takie jak przebyte infekcje i stosowana antybiotykoterapia.

Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu oprogramowania R 4.1.1 (the R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Mobilizacja była skuteczna u 37 chorych (82% całej grupy badanej), u 8 (18%) procedura zakończyła się niepowodzeniem. Żaden pacjent z drugiej grupy nie uzyskał zakładanego stężenia komórek CD34+ we krwi i co za tym idzie, nie wykonywano u nich leukaferazy. Wykazano istotny statystycznie negatywny wpływ występowania chorób współistniejących na ilość pozyskanych HSC ( $p = 0.0014$ ). Mediana ilości komórek CD34+/kg m.c. u osób u których mobilizacja była skuteczna i które mają choroby współistniejące wynosi 3.6 a dla osób bez chorób współistniejących wynosi 7.16. Wykazano także istotnie mniejszą ilość uzyskanych komórek CD34+ w przeliczeniu na kg masy ciała chorych w grupie z nadwagą i otyłością ( $p = 0.04$ ). Mediana ilości komórek u osób, u których mobilizacja była skuteczna i które mają otyłość lub nadwagę wynosiła 4.10, a dla osób z BMI w normie wynosiła 7.08. Nie stwierdzono zależności skuteczności mobilizacji od wagi, płci, wieku ani przebytego

wcześniej leczenia przeciwnowotworowego, odpowiedzi na nie czy chemioterapii stosowanej w mobilizacji.

Część pacjentów przebyła w trakcie mobilizacji infekcję w stopniu maksymalnie 2 wg CTCAE 5.0. Wszystkie infekcje zostały zakończone do dnia wykonania leukaferazy a próbka pobranego separatu rutynowo była poddawana badaniom mikrobiologicznym. Przebiecie infekcji wpływało pozytywnie na jej efektywność ( $p=0,03$ ), zaś stosowanie antybiotykoterapii, transfuzji koncentratu krwinek płytkowych lub czerwonych ani stężenie leukocytów, hemoglobiny czy płytek krwi w dniu leukaferazy nie wpływało na skuteczność ani efektywność mobilizacji.

Spośród badanych miR, ekspresja miR-223 w dniu leukaferazy negatywnie korelowała ze stężeniem HSC w separacie, natomiast ekspresja miR-125a w tym samym punkcie czasowym korelowała pozytywnie ze stężeniem HSC zarówno w separacie jak i we krwi obwodowej pacjentów. Wyższą ekspresję miR-125a powiązano także z wystąpieniem infekcji w trakcie mobilizacji. Wykazano także zależność pomiędzy spadkiem ekspresji miR-223 w trakcie mobilizacji a jej wyższą efektywnością.

Mobilizacja HSC w grupie chorych z rozpoznaniem NHL charakteryzuje się dość wysoką skutecznością, jednak nadal u pewnej liczby pacjentów kończy się niepowodzeniem. Czynniki pozwalającymi wstępnie zidentyfikować takich pacjentów są nadwaga i otyłość oraz występowanie chorób współistniejących. W takiej grupie koniecznym może się okazać dodatkowe wspomaganie mobilizacji, np. poprzez zastosowanie plerixaforu. W aspekcie teoretycznym wydaje się, że krótkotrwały stan zapalny spowodowany infekcją wpływa pozytywnie na mechanizmy hematopoezy, co może być powiązane ze wzrostem stężenia miR-125a. Ekspresja miR-223 zmniejsza się natomiast w miarę mobilizacji HSC a zatem jego dynamika może służyć do prognozowania efektywności procedury.

## 8. ABSTRACT

Mobilization of hematopoietic stem cells (HSC) is a procedure aimed at obtaining HSC from a patient's peripheral blood. It is used in healthy donors as well as in patients who require autologous hematopoietic stem cell transplantation (autoHSCT), which involves giving the patient their own HSC to enable the regeneration of the hematopoietic system after high-dose chemotherapy. The second group mainly consists of patients diagnosed with non-Hodgkin lymphoma (NHL), Hodgkin's lymphoma (HL), and multiple myeloma (MM). The effectiveness of mobilization does not always meet the expectations of the physician or the patient. The failure of the procedure is usually expressed by obtaining an insufficient amount of HSC for hematopoietic renewal. Attempts are being made to identify poor prognostic factors for the effectiveness of mobilization, mainly clinical aspects, and NHL diagnosis is one of the most frequently cited factors.

Stimulation of HSC production and migration to peripheral blood, characterized by expression of the CD34+ surface antigen, is achieved by administering the patient a granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). The molecular mechanism of action of G-CSF, as well as the formation and further differentiation of CD34+ cells, has not been fully understood. The regulation of gene expression responsible for processes occurring in the cell at its early developmental stage occurs through numerous epigenetic phenomena, including the involvement of microRNAs (miR).

MiR is a single-stranded, non-coding RNA molecule typically composed of 21-23 nucleotides. Their function is post-transcriptional regulation of gene expression by blocking translation mechanisms or by promoting degradation of target fragments of mRNA. Research conducted on cell lines and a mouse model indicates the involvement of some miRs in HSC proliferation, migration, and differentiation.

In this study, I attempted to determine the influence of molecular factors in the form of the expression of selected miRs, as well as clinical factors, on the effectiveness and efficiency of HSC mobilization in patients with lymphoproliferative disease. The study group consisted of 45 patients diagnosed with NHL with mature B cells, mobilized at the Hematology, Blood Neoplasms, and Bone Marrow Transplantation Clinic in Wrocław between 2018 and 2021. All patients received anticancer chemotherapy, and from day +5 after chemotherapy, subcutaneous injections of G-CSF were administered at a dose of approximately 5ug/kg body weight twice daily. Starting from the fifth day of G-CSF use, daily measurements of HSC concentration in peripheral blood were performed until values appropriate for

leukapheresis were obtained or the decision was made to terminate mobilization. Separation was performed using the Spectra Optia apparatus. The concentration of HSC, i.e., CD34+ cells, was determined in the obtained material using flow cytometry, and the results were then related to the patient's weight. The procedure was considered effective if at least  $2 \times 10^6$  CD34+/kg body weight cells were obtained in the separation. Additionally, the expression of miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-155, and miR-223 was measured the day before the planned administration of G-CSF and before the start of the first apheresis or, in the case of an insufficient number of CD34+ cells in peripheral blood of the patients, on the last day of G-CSF administration. Blood samples for molecular analysis were collected in dedicated PAX Gen Blood RNA Tubes (Qiagen) providing immediate RNA stabilization and then stored at  $-70^\circ\text{C}$ . Genetic material was isolated using the RT-qPCR kit - Paxgene RNA Isolation Kit IVD (Qiagen) and the dedicated low molecular weight RNA isolation kit for ddPCR- mirVana<sup>TM</sup> miRNA Isolation Kit (AMBION). After RNA isolation, the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) was used for reverse transcription. The expression levels of miRs were determined using specific TaqMan probes (Thermo Fisher Scientific Waltham). All procedures were strictly performed according to the manufacturers' recommendations for the mentioned kits. Additionally, demographic and clinical data of the patients were collected, as well as information on the mobilization process such as infections, and antibiotic therapy. Statistical analysis was performed using R software 4.1.1 (the R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Mobilization was successful in 37 patients (82% of the entire study group), while in 8 patients (18%) the procedure was unsuccessful. None of the patients in the second group achieved the expected CD34+ cell concentration in the blood, and as a result, leukapheresis was not performed on them. A statistically significant negative impact of comorbidities on the number of HSCs obtained was demonstrated ( $p = 0.0014$ ). The median number of CD34+ cells/kg body weight in patients with successful mobilization and comorbidities was 3.6, while in patients without comorbidities, it was 7.16. A significantly lower number of CD34+ cells was also found in overweight and obese patients ( $p = 0.04$ ). The median number of cells in patients with successful mobilization and obesity or overweight was 4.10, while in patients with a normal BMI, it was 7.08. There was no relationship between the effectiveness of mobilization and weight, sex, age, or previous anti-cancer treatment, response to it, or chemotherapy used in mobilization. Some patients experienced an infection during mobilization, up to grade 2 according to CTCAE 5.0. All infections were resolved by the day of leukapheresis, and a sample of the obtained concentrate was routinely subjected to microbiological tests. The occurrence of an infection positively

influenced its effectiveness ( $p=0.03$ ), while the use of antibiotic therapy, transfusion of platelet or red blood cell concentrates, or the concentration of leukocytes, hemoglobin, or platelets in the blood on the day of leukapheresis did not affect the effectiveness or efficiency of mobilization. Among the studied miRs, the expression of miR-223 on the day of leukapheresis negatively correlated with the concentration of HSCs in the concentrate, while the expression of miR-125a at the same time point positively correlated with the concentration of HSCs in both the concentrate and peripheral blood. Higher expression of miR-125a has also been associated with the occurrence of infection during mobilization. A relationship has also been shown between the decrease in miR-223 expression during mobilization and its higher efficiency.

Mobilization of HSCs in patients with NHL is characterized by fairly high effectiveness, but it still fails in some patients. Factors that can help identify such patients are overweight and obesity, as well as the presence of comorbidities. In such a group, additional support for mobilization may be necessary, such as the use of plerixafor. Theoretically, a short-term inflammatory state caused by infection appears to positively influence hematopoietic mechanisms, which may be related to an increase in miR-125a levels. The expression of miR-223 decreases during HSC mobilization, so its dynamics may serve to predict the effectiveness of the procedure.



## 9. BIBLIOGRAFIA

- 1 Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016; **127**: 2375–90.
- 2 Prochorec-Sobieszek M. 2.2. Klasyfikacja i kryteria diagnostyczne nowotworów układu chłonnego. Zalec. postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych. 2020; : 171–89.
- 3 Menendez-Gonzalez JB, Hoggatt J. Hematopoietic Stem Cell Mobilization: Current Collection Approaches, Stem Cell Heterogeneity, and a Proposed New Method for Stem Cell Transplant Conditioning. *Stem cell Rev reports* 2021; **17**: 1939.
- 4 Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*. 2022; **36**: 1720–48.
- 5 Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N. The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies [Internet]. *EBMT Handb Hematop Stem Cell Transplant Cell Ther* 2019; : 1–702.
- 6 Gorin NC. History and Development of Autologous Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia. *Clin Hematol Int* 2021; **3**: 83.
- 7 Passweg JR, Baldomero H, Chabannon C, *et al.* Hematopoietic cell transplantation and cellular therapy survey of the EBMT: monitoring of activities and trends over 30 years. *Bone Marrow Transplant* 2021; **56**: 1651–64.
- 8 Snowden JA, Sánchez-Ortega I, Corbacioglu S, *et al.* Indications for haematopoietic cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2022. *Bone Marrow Transplant* 2022; **57**: 1217–39.
- 9 Berenson RJ, Andrews RG, Bensinger WI, *et al.* Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest* 1988; **81**: 951–5.
- 10 Körbling M, Freireich EJ. Twenty-five years of peripheral blood stem cell transplantation. *Blood*. 2011; **117**: 6411–6.

- 11 Raaijmakers MHGP. Regulating traffic in the hematopoietic stem cell niche. *Haematologica* 2010; **95**: 1439–41.
- 12 Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 2014; **505**: 327.
- 13 Kobayashi H, Butler JM, O'Donnell R, *et al.* Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol* 2010 1211 2010; **12**: 1046–56.
- 14 Christopher MJ, Liu F, Hilton MJ, Long F, Link DC. Suppression of CXCL12 production by bone marrow osteoblasts is a common and critical pathway for cytokine-induced mobilization. *Blood* 2009; **114**: 1331–9.
- 15 Vagima Y, Avigdor A, Goichberg P, *et al.* MT1-MMP and RECK are involved in human CD34+ progenitor cell retention, egress, and mobilization. *J Clin Invest* 2009; **119**: 492.
- 16 Duhrsen U, Villeval JL, Boyd J, Kannourakis G, Morstyn G, Metcalf D. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 1988; **72**: 2074–81.
- 17 Narayanasami U, Kanteti R, Morelli J, *et al.* Randomized trial of filgrastim versus chemotherapy and filgrastim mobilization of hematopoietic progenitor cells for rescue in autologous transplantation. *Blood* 2001; **98**: 2059–64.
- 18 Luo C, Wu G, Huang X, *et al.* Efficacy of hematopoietic stem cell mobilization regimens in patients with hematological malignancies: a systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials. *Stem Cell Res Ther* 2022; **13**: 123.
- 19 Bogucka-Fedorczuk A, Czyz A, Kalicińska E, *et al.* Higher efficacy of intermediate dose cytarabine + G-CSF compared to cyclophosphamide + G-CSF in hematopoietic stem cell mobilization in patients with multiple myeloma. *J Clin Apher* 2020; **35**: 246–54.
- 20 Hopman RK, DiPersio JF. Advances in stem cell mobilization. *Blood Rev* 2014; **28**:

- 31–40.
- 21 Luo C, Wang L, Wu G, *et al.* Comparison of the efficacy of hematopoietic stem cell mobilization regimens: a systematic review and network meta-analysis of preclinical studies. *Stem Cell Res Ther* 2021 121 2021; **12**: 1–19.
  - 22 Basak GW, Hałaburda K, Jędrzejczak WW. The current opinion on the place of plerixafor in hematopoietic stem cell mobilization. *Acta Haematol Pol* 2012; **43**: 317–25.
  - 23 Giralt S, Costa L, Schriber J, *et al.* Optimizing autologous stem cell mobilization strategies to improve patient outcomes: Consensus guidelines and recommendations. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2014; **20**: 295–308.
  - 24 Mohty M, Hübel K, Kröger N, *et al.* Autologous haematopoietic stem cell mobilisation in multiple myeloma and lymphoma patients: A position statement from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2014; **49**: 865–72.
  - 25 Kurnaz F, Kaynar L. Peripheral blood stem cell mobilization failure. *Transfus Apher Sci* 2015; **53**: 3–7.
  - 26 Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004; **116**: 281–97.
  - 27 Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell.* 2018; **173**: 20–51.
  - 28 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (80- )* 2001; **294**: 853–8.
  - 29 Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* 2018; **47**: 155–62.
  - 30 Luinburg DG, Dinitzen AB, Flohr Svendsen A, *et al.* Persistent expression of microRNA-125a targets is required to induce murine hematopoietic stem cell repopulating activity. *Exp Hematol* 2021; **94**: 47–59.e5.
  - 31 Ooi AGL, Sahoo D, Adorno M, Wang Y, Weissman IL, Park CY. MicroRNA-125b

- expands hematopoietic stem cells and enriches for the lymphoid-balanced and lymphoid-biased subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 21505–10.
- 32 Surdziel E, Cabanski M, Dallmann I, *et al.* Enforced expression of miR-125b affects myelopoiesis by targeting multiple signaling pathways. *Blood* 2011; **117**: 4338–48.
- 33 Wojtowicz EE, Walasek MA, Broekhuis MJC, *et al.* MicroRNA-125 family members exert a similar role in the regulation of murine hematopoiesis. *Exp Hematol* 2014; **42**: 909–918.e1.
- 34 Shaham L, Binder V, Gefen N, Borkhardt A, Izraeli S. MiR-125 in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia*. 2012; **26**: 2011–8.
- 35 Shen W-F, Hu Y-L, Uttarwar L, Passegue E, Largman C. MicroRNA-126 Regulates HOXA9 by Binding to the Homeobox. *Mol Cell Biol* 2008; **28**: 4609–19.
- 36 Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 1516.
- 37 Salvucci O, Jiang K, Gasperini P, *et al.* MicroRNA126 contributes to granulocyte colony-stimulating factor-induced hematopoietic progenitor cell mobilization by reducing the expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Haematologica* 2012; **97**: 818–26.
- 38 Nowicki M, Szemraj J, Wierzbowska A, *et al.* Alterations in microrna expression during hematopoietic stem cell mobilization. *Biology (Basel)* 2021; **10**. DOI:10.3390/biology10070668.
- 39 Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, *et al.* A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell* 2007; **129**: 1401–14.
- 40 Itkin T, Kumari A, Schneider E, *et al.* MicroRNA-155 promotes G-CSF-induced mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells via propagation of CXCL12 signaling. *Leukemia* 2017; **31**: 1247–50.
- 41 He K, Chen Z, Zhao J, *et al.* The role of microRNA-155 in glomerular endothelial cell injury induced by high glucose. *Mol Biol Rep* 2022; **49**: 2915–24.

- 42 Yuan S, Wu Q, Wang Z, *et al.* miR-223: An Immune Regulator in Infectious Disorders. *Front Immunol* 2021; **12**. DOI:10.3389/FIMMU.2021.781815.
- 43 Haneklaus M, Gerlic M, O'Neill LAJ, Masters SL. MiR-223: Infection, inflammation and cancer. *J. Intern. Med.* 2013; **274**: 215–26.
- 44 Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, *et al.* Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature* 2008; **451**: 1125–9.
- 45 Platzbecker U, Bornhäuser M, Zimmer K, *et al.* Second donation of granulocyte–colony-stimulating factor–mobilized peripheral blood progenitor cells: risk factors associated with a low yield of CD34+ cells. *Transfusion* 2005; **45**: 11–5.
- 46 Wang TF, Wen SH, Chen RL, *et al.* Factors Associated with Peripheral Blood Stem Cell Yield in Volunteer Donors Mobilized with Granulocyte Colony-Stimulating Factors: The Impact of Donor Characteristics and Procedural Settings. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; **14**: 1305–11.
- 47 Farhadfar N, Hsu JW, Logan BR, *et al.* Weighty choices: Selecting optimal G-CSF doses for stem cell mobilization to optimize yield. *Blood Adv* 2020; **4**: 706–16.
- 48 Wuchter P, Ran D, Bruckner T, *et al.* Poor Mobilization of Hematopoietic Stem Cells—Definitions, Incidence, Risk Factors, and Impact on Outcome of Autologous Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; **16**: 490–9.
- 49 Donmez A, Yilmaz F, Gokmen N, Tombuloglu M. Risk factors for a poor hematopoietic stem cell mobilization. *Transfus Apher Sci* 2013; **49**: 485–8.
- 50 Hosing C, Saliba RM, Ahlawat S, *et al.* Poor hematopoietic stem cell mobilizers: A single institution study of incidence and risk factors in patients with recurrent or relapsed lymphoma. *Am J Hematol* 2009; **84**: 335–7.
- 51 Özkurt ZN, Yeğin ZA, Suyani E, *et al.* Factors affecting stem cell mobilization for autologous hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Apher* 2010; **25**: 280–6.
- 52 van Gorkom G, Finel H, Giebel S, *et al.* Prospective noninterventional study on peripheral blood stem cell mobilization in patients with relapsed lymphomas. *J Clin Apher* 2017; **32**: 295–301.

- 53 Khouri J, Rybicki L, Majhail NS, *et al.* Body mass index does not impact hematopoietic progenitor cell mobilization for autologous hematopoietic cell transplantation. *J Clin Apher* 2019; **34**: 638–45.
- 54 Wang TF, Liou YS, Chang HH, *et al.* Correlation of Body Mass Index and Proinflammatory Cytokine Levels with Hematopoietic Stem Cell Mobilization. *J Clin Med* 2022; **11**. DOI:10.3390/JCM11144169.
- 55 Gomes AL, Carvalho T, Serpa J, Torre C, Dias S. Hypercholesterolemia promotes bone marrow cell mobilization by perturbing the SDF-1:CXCR4 axis. *Blood* 2010; **115**: 3886–94.
- 56 Cimato TR, Palka BA, Lang JK, Young RF. LDL Cholesterol Modulates Human CD34+ HSPCs through Effects on Proliferation and the IL-17 G-CSF Axis. *PLoS One* 2013; **8**. DOI:10.1371/journal.pone.0073861.
- 57 Lenk J, Bornhauser M, Kramer M, *et al.* Sex and body mass index but not CXCL12 801G/A polymorphism determine the efficacy of hematopoietic cell mobilization: A study in healthy volunteer donors. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013; **19**: 1517–21.
- 58 Suzuki T, Ishii S, Shinohara M, *et al.* Mobilization efficiency is critically regulated by fat via marrow PPAR $\delta$ . *Haematologica* 2021; **106**: 1671.
- 59 Van Den Berg SM, PSeijkens TT, HKusters PJ, *et al.* Diet-induced obesity in mice diminishes hematopoietic stem and progenitor cells in the bone marrow. *FASEB J* 2016; **30**: 1779–88.
- 60 Gregory AD, Hogue LA, Ferkol TW, Link DC. Regulation of systemic and local neutrophil responses by G-CSF during pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Blood* 2007; **109**: 3235–43.
- 61 Jahandideh B, Derakhshani M, Abbaszadeh H, *et al.* The pro-Inflammatory cytokines effects on mobilization, self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells. *Hum Immunol* 2020; **81**: 206–17.
- 62 Bleuzé M, Auger JP, Lavagna A, Gisch N, Gottschalk M, Segura M. In vitro characterization of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) production by

- dendritic cells and macrophages during *Streptococcus suis* infection. *Immunobiology* 2020; **225**. DOI:10.1016/J.IMBIO.2020.151979.
- 63 Li H, Wang Z, Li X. G-CSF as a potential early biomarker for diagnosis of bloodstream infection. *J Clin Lab Anal* 2021; **35**. DOI:10.1002/JCLA.23592.
- 64 Re A, Cattaneo C, Skert C, *et al.* Stem cell mobilization in HIV seropositive patients with lymphoma. *Haematologica* 2013; **98**: 1762–8.
- 65 Khouri J, Rybicki L, Majhail N, *et al.* Neutropenic fever during peripheral blood progenitor cell mobilization is associated with decreased CD34+ cell collection and increased apheresis collection days. *J Clin Apher* 2018; **33**: 303–9.
- 66 Kelly LS, Darden DB, Fenner BP, Efron PA, Mohr AM. The Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Response to Hemorrhage, Injury, and Sepsis: A Review of Pathophysiology. *Shock* 2021; **56**: 30–41.
- 67 Skirecki T, Mikaszewska-Sokolewicz M, Godlewska M, *et al.* Mobilization of Stem and Progenitor Cells in Septic Shock Patients. *Sci Rep* 2019; **9**. DOI:10.1038/s41598-019-39772-4.
- 68 Burberry A, Zeng MY, Ding L, *et al.* Infection Mobilizes Hematopoietic Stem Cells through Cooperative NOD-like Receptor and Toll-like Receptor Signaling. *Cell Host Microbe* 2014; **15**: 779.
- 69 Velders GA, Van Os R, Hagoort H, *et al.* Reduced stem cell mobilization in mice receiving antibiotic modulation of the intestinal flora: involvement of endotoxins as cofactors in mobilization. *Blood* 2004; **103**: 340–6.
- 70 Kobayashi H, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, *et al.* Bacterial c-di-GMP affects hematopoietic Stem/progenitors and their niches through STING. *Cell Rep* 2015; **11**: 71–84.
- 71 Darden DB, Stortz JA, Hollen MK, *et al.* Identification of Unique mRNA and miRNA Expression Patterns in Bone Marrow Hematopoietic Stem and Progenitor Cells After Trauma in Older Adults. *Front Immunol* 2020; **11**: 1289.
- 72 Gui F, Peng H, Liu Y. Elevated circulating lnc-ANRIL/miR-125a axis level predicts

- higher risk, more severe disease condition, and worse prognosis of sepsis. *J Clin Lab Anal* 2019; **33**: 33.
- 73 Lee HM, Kim TS, Jo EK. MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and inflammation. *BMB Rep.* 2016; **49**: 311–8.
- 74 Banerjee S, Cui H, Xie N, *et al.* miR-125a-5p Regulates Differential Activation of Macrophages and Inflammation \*. 2013. DOI:10.1074/jbc.M112.426866.
- 75 Kim SW, Ramasamy K, Bouamar H, Lin AP, Jiang D, Aguiar RCT. MicroRNAs miR-125a and miR-125b constitutively activate the NF- $\kappa$ B pathway by targeting the tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**: 7865–70.
- 76 Zou Q, Yang M, Yu M, Liu C. Influences of Regulation of miR-126 on Inflammation, Th17/Treg Subpopulation Differentiation, and Lymphocyte Apoptosis through Caspase Signaling Pathway in Sepsis. *Inflamm 2020 436* 2020; **43**: 2287–300.
- 77 Zou Q, Liu C, Hu N, Wang W, Wang H. miR-126 ameliorates multiple organ dysfunction in septic rats by regulating the differentiation of Th17/Treg. *Mol Biol Rep* 2022; **49**: 2985.
- 78 Guo S, Lu J, Schlanger R, *et al.* MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 14229–34.
- 79 Nowicki M, Szemraj J, Wierzbowska A, *et al.* Slower Engraftment in Patients with High Expression of miRNA-15a, miRNA-16, miRNA-126, miRNA-146a, miRNA-223 Prior to Autologous Stem Cell Transplantation and at Early Time after Transplantation. *Blood* 2016; **128**: 5717.
- 80 Báez A, Martín-Antonio B, Piruat JI, *et al.* Gene and miRNA Expression Profiles of Hematopoietic Progenitor Cells Vary Depending on Their Origin. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; **20**: 630–9.
- 81 Georgantas RW, Hildreth R, Morisot S, *et al.* CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: A circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 2750.



- 82 Trissal MC, DeMoya RA, Schmidt AP, Link DC. MicroRNA-223 Regulates Granulopoiesis but Is Not Required for HSC Maintenance in Mice. *PLoS One* 2015; **10**. DOI:10.1371/JOURNAL.PONE.0119304.
- 83 Heissig B, Hattori K, Dias S, *et al.* Recruitment of Stem and Progenitor Cells from the Bone Marrow Niche Requires MMP-9 Mediated Release of Kit-Ligand. *Cell* 2002; **109**: 625.
- 84 Han J, Zhao F, Zhang J, *et al.* MiR-223 reverses the resistance of EGFR-TKIs through IGF1R/PI3K/Akt signaling pathway. *Int J Oncol* 2016; **48**: 1855–67.
- 85 Ings SJ, Balsa C, Leverett D, Mackinnon S, Linch DC, Watts MJ. Peripheral blood stem cell yield in 400 normal donors mobilised with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): Impact of age, sex, donor weight and type of G-CSF used. *Br J Haematol* 2006; **134**: 517–25.
- 86 Chen SH, Yang SH, Chu SC, *et al.* The role of donor characteristics and post-granulocyte colony-stimulating factor white blood cell counts in predicting the adverse events and yields of stem cell mobilization. *Int J Hematol* 2011 935 2011; **93**: 652–9.
- 87 Fürst D, Hauber D, Reinhardt P, *et al.* Gender, cholinesterase, platelet count and red cell count are main predictors of peripheral blood stem cell mobilization in healthy donors. *Vox Sang* 2019; **114**: 275–82.
- 88 Rafiee M, Farsani MA, Amiri V, Hajifathali A, Gharehbaghian A, Mohammadi MH. Circulatory miR-155 correlation with platelet and neutrophil recovery after autologous hematopoietic stem cell transplantation, a multivariate analysis. *Int J Hematol* 2021 1142 2021; **114**: 235–45.

## 10. SPIS TABEL

Tabela 1. Ogólny podział nowotworów limfoproliferacyjnych ze szczegółowym podziałem nowotworów z dojrzałych komórek B - wg klasyfikacji WHO, edycja 4 .	9
Tabela 2. Ogólne wskazania do przeprowadzenia transplantacji w wybranych chorobach limfoproliferacyjnych, wg EBMT 2022	13
Tabela 3. Charakterystyka grupy badanej.	24
Tabela 4. Leczenie przeciwnowotworowe stosowane w cyklu mobilizacyjnym u pacjentów objętych badaniem.	26
Tabela 5. Ogólna skuteczność mobilizacji.	32
Tabela 6. Wyniki statystyki opisowej dla ilości komórek CD34+ ( $\times 10^6/\text{kg m.c.}$ ) w separacie w zależności od grupy BMI.	34
Tabela 7. Zależność skuteczności mobilizacji komórek CD34+ od grupy BMI	34
Tabela 8. Wyniki statystyki opisowej dla ilości komórek CD34+ ( $\times 10^6/\text{kg m.c.}$ ) w separacie w zależności od występowania chorób współistniejących.	35
Tabela 9. Wyniki statystyki opisowej dla ilości komórek CD34+ ( $\times 10^6/\text{kg m.c.}$ ) w separacie w zależności od występowania infekcji.	35
Tabela 10. Parametry morfologii krwi obwodowej w grupie skutecznej i nieskutecznej mobilizacji w drugim punkcie czasowym.	37

## 11. SPIS RYCIN

Rycina 1. Schemat mobilizacji HSC.	16
Rycina 2. Biogeneza miR zależna od DROSHA i DICER.	19
Rycina 3. Komórki CD34+ a waga pacjenta.	33
Rycina 4. Komórki CD34+ a choroby współistniejące.	35
Rycina 5. Komórki CD34+ a infekcje w trakcie mobilizacji.	36
Rycina 6. Komórki CD34+ w separacie ilościowo a ekspresja miR-125a.	39
Rycina 7. Komórki CD34+ w separacie ilościowo a ekspresja miR-223.	40
Rycina 8. Komórki CD34+ we krwi obwodowej ilościowo a ekspresja miR-125a.	40

Rycina 9. Komórki CD34+ w separacie ilościowo a zmiana ekspresji miR-223 w trakcie mobilizacji.....	41
Rycina 10. Zależność pomiędzy obecnością infekcji a stężeniem miR-125a.....	42
Rycina 11. Stężenie miR-125a w dniu separacji a WBC.....	43
Rycina 12. Stężenie miR-125a w dniu separacji a neutrofile.....	44
Rycina 13. Wartość miR-155 a stężenie PLT w dniu separacji bądź zakończenia mobilizacji. .....	45