



Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi
i Transplantacji Szpiku

Agnieszka Szeremet

**Ocena przydatności wybranych mikroRNA
w monitorowaniu wczesnej toksyczności
związanej z mega-chemioterapią
stosowaną przed autologiczną transplantacją komórek
hematopoetycznych u pacjentów z rozrostami B-komórkowymi**

Rozprawa doktorska

Pracę wykonano w Katedrze i Klinice Hematologii, Nowotworów Krwi
i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich
we Wrocławiu

Promotor:

Prof. dr hab. n. med. Tomasz Wróbel

Wrocław 2021

Z całego serca dziękuję tym wszystkim, którzy wspierali mnie, służąc radą i pomocą podczas pisania niniejszej pracy.

Szczególne podziękowania pragnę złożyć na ręce Promotora
Pana prof. dra hab. n. med. Tomasza Wróbla za opiekę naukową,
wieloletnią owocną współpracę, cenne uwagi i poświęcony czas w powstawaniu
niniejszej pracy.

Ponadto dziękuję:

Pani prof. dr hab. n. med. Annie Czyż za wszelką pomoc merytoryczną,
cierpliwość i życzliwość okazaną podczas powstawania tej pracy.

Poniższą pracę dedykuję:

*Rodzicom w podziękowaniu za wszystkie lekcje życia, które otrzymałam,
przede wszystkim za wpojenie zamiłowania do nauki i wytrwałej pracy;*

Siostrze Marcie za wsparcie w dobrych i trudnych chwilach;

Mężowi Pawłowi za cierpliwość i miłość;

Synom, Jankowi i Antkowi, za bycie źródłem ciągłej inspiracji.

Agnieszka Szeremet

Spis treści

Spis treści	3
Wykaz skrótów	5
Rozdział 1. Wprowadzenie	9
1.1. AutoPBSCT poprzedzone wysokodawkową chemioterapią	9
1.2. Klasyfikacja WHO 2016 nowotworów układu chłonnego wywodzących się z dojrzałych limfocytów B oraz czynniki prognostyczne	11
1.3. Wskazania do wysokodawkowej chemioterapii u chorych na chłoniaki wywodzące się z limfocytów B poddawanych autoPBSCT.....	13
1.4. Wskazania do wysokodawkowego melfalanu u chorych na szpiczaka plazmocytoowego poddawanych autoPBSCT	14
1.5. Ocena występowania chorób współistniejących przed autoPBSCT	15
1.6. Rodzaje toksyczności związanej z wysokodawkową chemioterapią poprzedzającą autoPBSCT	17
1.7. MikroRNA.....	18
Rozdział 2. Cele pracy	22
Rozdział 3. Materiały i metody	23
3.1. Ogólna charakterystyka badanych grup	23
3.2. Charakterystyka pacjentów z nowotworami układu chłonnego z dojrzałych limfocytów B	24
3.3. Charakterystyka pacjentów ze szpiczakiem plazmocytoowym	25
3.4. Pobranie materiału	27
3.5. Izolacja i ocena ekspresji mikroRNA	28
3.6. Metody statystyczne.....	29
Rozdział 4. Wyniki	30
4.1. Toksyczność wysokodawkowej chemioterapii BEAM u chorych na chłoniaki poddawanych autoPBSCT	30
4.2. Toksyczność wysokodawkowego melfalanu u chorych na szpiczaka plazmocytoowego poddawanych autoPBSCT	32
4.3. Wyjściowy stopień ekspresji wybranych mikroRNA u pacjentów z nowotworami układu chłonnego z dojrzałych limfocytów B lub ze szpiczakiem plazmocytoowym w porównaniu z grupą kontrolną.....	34

4.4. Biomarkery toksyczności.....	35
4.5. Korelacje między ekspresją mikroRNA a liczbą leukocytów i parametrami biochemicznymi	40
4.5.1. MikroRNA a liczba leukocytów	40
4.5.2. MikroRNA a parametry biochemiczne.....	41
4.5.3. MikroRNA a inne parametry	42
Rozdział 5. Omówienie wyników i dyskusja	43
Rozdział 6. Wnioski	52
Streszczenie	53
Abstract	56
Bibliografia	59
Wykaz tabel	64
Wykaz rycin	65

Wykaz skrótów

ABC	<i>Activated B-cell</i>	Aktywowane komórki B
AF	<i>Atrial Fibrillation</i>	Migotanie przedsionków
AGO2	<i>Argonaute 2</i>	–
alloHSCT	<i>Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation</i>	Allogeniczne przeszczepienie krwiotwórczych komórek macierzystych
ALT	–	Transaminaza alaninowa
autoPBSCT	<i>Autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation</i>	Autologiczne przeszczepienie krwiotwórczych komórek macierzystych z krwi obwodowej
AST	–	Transaminaza asparaginianowa
BEAM	–	Schemat chemioterapii: karmustyna, etopozyd, cytarabina, melfalan
BIC	<i>B-cell Integration Cluster</i>	–
BL	<i>Burkitt Lymphoma</i>	Chłoniak Burkitta
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>	Antygeny różnicowania
CHOP	–	Schemat chemioterapii: cyklofosfamid, doksorubicyna, winkrystyna, prednizon
CIRS	<i>Cumulative Illness Rating Scale</i>	Ilościowa Ocena Obciążenia Chorobami Współistniejącymi
CLL	<i>Chronic Lymphocytic Leukemia</i>	Przewlekła białaczka limfocytowa
CK-MB	<i>Creatine Kinase MB</i>	Kinaza kreatynowa MB
CR	<i>Complete Response</i>	Całkowita odpowiedź
CRI	<i>Catheter Related Infection</i>	Zakażenie związane z cewnikiem naczyniowym
CTCAE	<i>Common Toxicity Criteria for Adverse Events</i>	–
ddPCR	<i>droplet digital PCR</i>	–
DGCR8	<i>DiGeorge Syndrome Critical Region 8</i>	–
DHAP	–	Schemat chemioterapii: cisplatyna, cytarabina, deksametazon
DILI	<i>Drug Induced Liver Injury</i>	Polekowe uszkodzenie wątroby

DLBCL	<i>Diffuse Large B-cell Lymphoma</i>	Chłoniak z dużych rozlanych limfocytów B
EBMT	<i>European Society for Blood and Marrow Transplantation</i>	Europejskie Towarzystwo ds. Przeszczepiania Krwi i Szpiku
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>	–
ESMO	<i>European Society for Medical Oncology</i>	–
FFS	<i>Failure Free Survival</i>	Przeżycie wolne od niepowodzenia
FL	<i>Follicular Lymphoma</i>	Chłoniak grudkowy
FLIPI	<i>Follicular Lymphoma International Prognostic Index</i>	Międzynarodowy Wskaźnik Prognostyczny dla Chłoniaków Grudkowych
FN	<i>Febrile Neutropenia</i>	Gorączka neutropeniczna
G1-G5	<i>Grade 1-5</i>	Stopień ciężkości powikłań od 1 do 5 wg CTCAE
GCB	<i>Germinal Center B-cell Type</i>	Komórki B ośrodków rozmnażania grudek chłonnych
G-CSF	<i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>	Czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony Stimulated Factor</i>	Czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów i monocytów
HCT-CI	<i>Hematopoietic Stem Cell Transplantation Comorbidity Index</i>	Wskaźnik Chorób Współistniejących przy Przeszczepieniu Krwiotwórczych Komórek Macierzystych
HGBCL	<i>High Grade B-cell Lymphoma</i>	Chłoniak o wysokim stopniu złośliwości z komórek B
hICE	–	Schemat chemioterapii: ifosfamid, karboplatyna, etopozyd
HIF-2 α	<i>Hypoxia-inducible Factor</i>	–
HL	<i>Hodgkin Lymphoma</i>	Chłoniak Hodgkina
HSCs	<i>Hematopoietic Stem Cells</i>	Krwiotwórcze komórki macierzyste
IPI	<i>International Prognostic Index</i>	Międzynarodowy Wskaźnik Prognostyczny
ISS	<i>International Staging System</i>	Międzynarodowy Indeks Prognostyczny

LDH	<i>Lactate Dehydrogenase</i>	Dehydrogenaza mleczanowa
LEAM	–	Schemat chemioterapii: lomustyna, etopozyd, cytarabina, melfalan
MCL	<i>Mantle Cell Lymphoma</i>	Chłoniak z komórek płaszczka
MIPI	<i>Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index</i>	Międzynarodowy Wskaźnik Prognostyczny dla Chłoniaków z komórek płaszczka
miR	<i>microRNA</i>	MikroRNA
mRNA	<i>messenger RNA</i>	Przebieżnikowy RNA
NHL	<i>Non Hodgkin Lymphoma</i>	Chłoniaki nie-Hodgkina
NK Cells	<i>Natural Killer Cells</i>	Komórki naturalnej cytotoksyczności
NOS	<i>Not Otherwise Specified</i>	Bliżej nieokreślony
NRM	<i>Non Relapse Mortality</i>	Śmiertelność niezwiązana z nawrotem choroby
OS	<i>Overall Survival</i>	Całkowite przeżycie
PCM	<i>Plasma Cell Myeloma</i>	Szpiczak plazmocytowy
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>	łańcuchowa reakcja polimerazy
PET-CT	<i>Positron Emission Tomography – Computed Tomography</i>	Pozytonowa Tomografia Emisyjna
PFS	<i>Progression Free Survival</i>	Czas wolny od progresji
PR	<i>Partial Response</i>	Częściowa odpowiedź
R-IPI	<i>Revised IPI</i>	Zrewidowany Międzynarodowy Wskaźnik Prognostyczny
RISC	<i>microRNA Induce Silencing Complex</i>	–
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription Quantative Polymerase Chain Reaction</i>	Ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym
SD	<i>Stable Disease</i>	Stabilizacja choroby
sh-RNA	<i>short hairpin RNA</i>	–
TGF-β	<i>Tumor Grow Factor</i>	–
TRBP2	<i>Transactivator RNA Binding Protein 2</i>	–
TRM	<i>Treatment Related Mortality</i>	Śmiertelność związana z leczeniem
ULN	<i>Upper Limit Norm</i>	Górna granica normy

VGPR	<i>Very Good Partial Response</i>	Bardzo dobra częściowa odpowiedź
WBC	<i>White Blood Count</i>	Liczba białych krwinek
WHO	<i>World Health Organisation</i>	Światowa Organizacja Zdrowia

Rozdział 1. Wprowadzenie

1.1. AutoPBSCT poprzedzone wysokodawkową chemioterapią

Wysokodawkowana chemioterapia to sposób leczenia oparty na cytostatykach podawanych w dawkach, które wykazują duży potencjał przeciwnowotworowy. Niektóre substancje są aktywne w fazie spoczynkowej komórek, dlatego powodują uszkodzenie krwiotwórczych komórek macierzystych (HSCs, *Hematopoietic Stem Cells*) i podane w odpowiednio wysokich dawkach działają mieloablacyjnie, a więc powodują nieodwracalne uszkodzenie czynności krwiotwórczej szpiku. Do takich cytostatyków należy m.in. melfalan i karmustyna. Po zastosowaniu terapii ablacyjnej dla przywrócenia czynności krwiotwórczej szpiku niezbędne jest podanie w postaci dożylniej infuzji – pobranych wcześniej i poddanych krioprezerwacji – własnych komórek krwiotwórczych chorego. Całość tego postępowania nazywana jest przeszczepieniem autologicznych krwiotwórczych komórek macierzystych (autoPBSCT, *Autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation*). Już w 1962 roku Joan Goodman udowodnił, iż HSCs obecne są we krwi obwodowej. Od tego czasu trwały próby ich wykorzystania w terapii. Po raz pierwszy udane autoPBSCT przeprowadził Martin Körbling w Heidelbergu w 1986 roku u pacjentki z chłoniakiem Burkitta (BL, *Burkitt Lymphoma*)¹. Mobilizacja HSCs prowadzona była bez użycia czynników stymulujących hematopoezę, stąd mała ich liczba we krwi warunkowała konieczność przeprowadzenia aż siedmiu aferez. Uzyskany produkt miał dużą objętość. Co więcej, nie dysponowano wówczas narzędziami, które pozwoliłyby na oszacowanie liczby HSCs w uzyskanym preparacie. Przełom nastąpił w 1988 roku, kiedy równolegle w Bostonie i Melbourne opublikowano wyniki zastosowania odpowiednio czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów i monocytów (GM-CSF, *Granulocyte Macrophage Colony Stimulated Factor*) oraz czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów (G-CSF, *Granulocyte Colony Stimulating Factor*). Zastosowanie cytokin stymulujących granulopoezę zwiększyło 60-100 razy liczbę zebranych podczas aferezy HSCs. Odkrycie to spowodowało ogromny postęp w dziedzinie transplantologii². W 1976 roku Richaman zauważył, że po podaniu cytostatyków, w trakcie odnowy hematopoezy, dochodzi do zwiększenia liczby komórek

progenitorowych we krwi³. Obserwacja ta dała początek stosowaniu chemioterapii w celu mobilizacji komórek krwiotwórczych, czyli ich przesunięcia ze szpiku do krwi.

Według rekomendacji Europejskiego Towarzystwa ds. Przeszczepiania Krwi i Szpiku (EBMT, *European Society for Blood and Marrow Transplantation*) z roku 2014 proponowane są następujące schematy chemioterapii mobilizacyjnej HSCs:

1. W grupie pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym (PCM, *Plasma Cell Myeloma*) można zastosować G-CSF w monoterapii lub w skojarzeniu z cyklofosfamidem w dawce 1,5-4,0 g/m²⁴. Standardowa dawka G-CSF to 10 µg/kg masy ciała na dobę podawanego podskórnie przez 5-7 dni.
2. U pacjentów z chłoniakami często planuje się mobilizację HSCs po cyklu chemioterapii, który należy do planu leczenia choroby (zwłaszcza jeżeli schemat terapii zawiera etopozyd lub arabinozyd cytozyny)^{5,6}. W Polsce popularnym schematem mobilizacyjnym są pośrednie dawki arabinozydu cytozyny 1,6 g/m²⁷.

Przesunięcie komórek krwiotwórczych ze szpiku do krwi można ocenić laboratoryjnie, obliczając liczbę komórek z obecnością antygenu CD34 na ich powierzchni. Istotnym odkryciem prowadzącym do usprawnienia procesu mobilizacji i separacji HSCs było zastosowanie przeciwciała MY10, które łącząc się z białkiem CD34 na powierzchni HSCs, pozwalało za pomocą cytometrii przepływowej precyzyjnie oszacować ich liczbę w krwi obwodowej i w preparacie uzyskanym podczas aferezy. Separację komórek z krwi obwodowej rozpoczyna się zwykle w dniu, w którym liczba komórek CD34+, oznaczona za pomocą cytometrii przepływowej, przekracza 10-20 komórek/µl krwi. Liczba cytaferoz zależy od liczby pozyskanych komórek CD34+. Zwykle przeprowadza się od 1 do 3 leukaferoz, przyjmując za wartość minimalną niezbędną dla szybkiego uzyskania rekonstrukcji hematopoezy liczbę 2x10⁶ komórek CD34+/kg masy ciała biorcy.

Pobrane komórki zamraża się w oparach ciekłego azotu. W tym celu używa się związku krioprotekcyjnego jakim jest dwumetylosulfotlenek, który zapobiega uszkodzeniu komórek podczas ich zamrażania⁵. Od lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku wysokodawkowana chemioterapia wspomagana autoPBSCT stała się powszechnie stosowaną metodą leczenia nowotworów układu chłonnego.

1.2. Klasyfikacja WHO 2016 nowotworów układu chłonnego wywodzących się z dojrzałych limfocytów B oraz czynniki prognostyczne

Chłoniaki to niejednorodna grupa chorób wywodzących się z dojrzałych limfocytów lub ich komórek progenitorowych. Zgodnie z powszechnie stosowaną klasyfikacją Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organisation*) z 2016 roku chłoniaki dzielimy na chłoniaki Hodgkina (HL, *Hodgkin Lymphoma*) i chłoniaki nie-Hodgkina. Chłoniaki nie-Hodgkina to grupa nowotworów cechująca się klonalnym rozrostem komórek limfoidalnych (komórek linii dojrzewania limfocytów) odpowiadających różnym stadiom zróżnicowania limfocytów B, limfocytów T lub komórek naturalnej cytotoksyczności (NK Cells, *Natural Killer Cells*). Zgodnie z klasyfikacją WHO wśród chłoniaków nie-Hodgkina wywodzących się z dojrzałej komórki B wyróżnia się aż 44 jednostek. Do tej grupy należą także dyskrazje plazmocytowe, które jednak ze względu na specyficzny obraz kliniczny wyodrębnia się i analizuje oddzielnie⁸. Poza rodzajem linii komórkowej i stopniem dojrzałości z jakiej wywodzi się nowotwór, w klasyfikacji uwzględniono również cechy kliniczne, na przykład pierwotną lokalizację węzłową lub pozawęzłową. Natomiast w praktyce klinicznej bardzo istotna jest dynamika przebiegu choroby, która implikuje postępowanie terapeutyczne. W oparciu o przebieg kliniczny wyróżnia się chłoniaki o powolnym przebiegu, a wśród nich chłoniaka z dojrzałych limfocytów B – przewlekłą białaczkę limfocytową (CLL, *Chronic Lymphocytic Leukemia*) – oraz chłoniaka grudkowego (FL, *Follicular Lymphoma*), chłoniaki agresywne, przede wszystkim chłoniaka z dużych rozlanych limfocytów B (DLBCL, *Diffuse Large B-cell Lymphoma*) i chłoniaka z komórek płaszczka (MCL, *Mantle Cell Lymphoma*), a także chłoniaki bardzo agresywne, tj. chłoniaka Burkitta i chłoniaka limfoblastycznego. Według krajowego rejestru nowotworów do najczęściej rozpoznawanych w Polsce nowotworów hematologicznych należą CLL (26%), DLBCL (23%) oraz PCM (18%).

Rozpoznanie ustalane są w oparciu o barwienie immunohistochemiczne, badania immunofenotypowe oraz genetyczne materiału pobranego z węzłów chłonnych lub innych zajętych narządów i tkanek. Zaawansowanie kliniczne nowotworu oceniane jest

na podstawie badań obrazowych według klasyfikacji Ann Arbor, która w 2014 roku w Lugano uległa rozszerzeniu o ocenę za pomocą badania PET-CT (*Positron Emission Tomography – Computed Tomography*) i nazywana jest obecnie klasyfikacją z Lugano.

W 2016 roku w klasyfikacji WHO wyróżniono typ DLBCL bliżej nieokreślony (NOS, *Not Otherwise Specified*), z podtypami wywodzącymi się z komórek B ośrodków rozmnażania grudek chłonnych (GCB, *Germinal Center B-cells*) lub z aktywowanych komórek B (ABC, *Activated B-cell*). Ponadto klasyfikacja WHO wyróżnia jeszcze 12 innych chłoniaków DLBCL, m.in. pierwotny chłoniak ośrodkowego układu nerwowego, pierwotny chłoniak śródpiersia, pierwotny chłoniak skórny postać kończynowa.

Dodatkowo, w aktualizacji z 2016 roku, wyodrębniono również podgrupę chłoniaków o wysokim stopniu złośliwości z komórek B z rearanżacją genów *myc*, *bcl-2* i/lub *bcl-6* (HGBCL: *triple hit*, *double hit*, *High Grade B-cell Lymphoma*). Chłoniaki o morfologii blastoidnej lub pośredniej między DLBCL a BL, ale bez rearanżacji *myc*, *bcl-2* i/lub *bcl-6* ujęte są w kategorii chłoniaków o wysokim stopniu złośliwości z komórek B, bliżej nieokreślonych (HGBCL, NOS)⁹.

Chłoniak z komórek płaszczka, podobnie jak DLBCL, należy do agresywnych chłoniaków wywodzących się z dojrzałych limfocytów B. Cechuje go obecność translokacji $t(11;14)(q13;q32)$ i nadekspresja cykliny D1¹⁰.

Wśród dyskrazji plazmocytowych w klasyfikacji WHO poza szpiczakiem plazmocytowym wyróżniono gammapatię monoklonalną o nieustalonym znaczeniu IgM oraz IgG/IgA, szpiczaka odosobnionego kości, szpiczaka odosobnionego pozakostnego oraz chorobę dopozytową monoklonalnych immunoglobulin.

Poza oceną histopatologiczną i stopniem zaawansowania nowotworu, do oceny rokowania stosuje się powszechnie przyjęte skale pozwalające na oszacowanie przewidywanego przeżycia chorych. W DLBCL jest to Międzynarodowy Wskaźnik Progностyczny (IPI, *International Prognostic Index*). Został on opublikowany po raz pierwszy w 1994 roku przez Shipp i wsp. w *Blood*¹¹. Wartość IPI oblicza się w oparciu o następujące zmienne: wiek (< vs >60 lat), sprawność wyrażoną wartością ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) (< vs >2), stopień zaawansowania choroby (I/II vs III/IV) oraz aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH, *Lactate Dehydrogenase*) (prawidłowa vs podwyższona). Pacjenci, w zależności od liczby

uzyskanych punktów, przydzielani są do grup niskiego (0-1 punkt), pośredniego niskiego (2 punkty), pośredniego wysokiego (3 punkty) lub wysokiego (4-5 punktów) ryzyka. Badanie Shipp i wsp. prowadzone było wiele lat temu, przed erą immunoterapii i zostało ono ponownie zweryfikowane w erze rytuksymabu przez Ziepert i wsp., którzy wykazali, że IPI nie stracił na sile prognostycznej. Powstawały także kolejne modyfikacje wskaźnika. Najbardziej znaną jest zrewidowany wskaźnik IPI (R-IPI, *Revised International Prognostic Index*), który dodatkowo uwzględnia liczbę lokalizacji pozawęzłowych (0-1 vs >1)¹².

Podobne skale prognostyczne zostały także stworzone dla innych rodzajów chłoniaków, tj. Międzynarodowy Wskaźnik Prognostyczny dla Chłoniaków Grudkowych (FLIPI, *Follicular Lymphoma International Prognostic Index*) oraz Międzynarodowy Wskaźnik Prognostyczny dla Chłoniaków z komórek płaszczka (MIPI, *Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index*).

1.3. Wskazania do wysokodawkowej chemioterapii u chorych na chłoniaki wywodzące się z limfocytów B poddawanych autoPBSCT

Zgodnie ze stanowiskiem EBMT oraz rekomendacjami ESMO (*European Society for Medical Oncology*) wskazaniem do przeprowadzenia autoPBSCT w chłoniakach Hodgkina i chłoniakach nie-Hodgkina z dojrzałej komórki B jest chemiowrażliwy nawrót choroby lub oporność na terapię pierwszej linii, z zachowaną wrażliwością na chemioterapię. Wyjątkiem jest MCL, w którym autoPBSCT przeprowadza się w konsolidacji pierwszej remisji choroby.

Według rekomendacji EBMT wysokodawkowa chemioterapia z autoPBSCT stanowi opcję terapeutyczną w leczeniu chemiowrażliwego nawrotu chłoniaka lub w drugiej remisji. U pacjentów z chorobą oporną (zalecenia klasy I) można rozważyć jako opcję kliniczną w pierwszej remisji (klasa I zalecenia)¹³.

U chorych na DLBCL autoPBSCT nie przynosi korzyści w konsolidacji odpowiedzi na terapię pierwszej linii, co zostało wykazane w wieloośrodkowym randomizowanym badaniu III fazy. Grupa 179 chorych po zakończeniu immunochemioterapii pierwszej linii, w całkowitej remisji choroby, pozostawała w obserwacji bez dalszego leczenia.

Natomiast 150 chorych pacjentów w całkowitej remisji choroby poddanych było kondycjonowaniu według schematu BEAM (karmustyna, etopozyd, arabinozyd cytozyny, melfalan) wspomaganym autoPBSCT. Choć w grupie poddanej autotransplantacji przeżycie wolne od niepowodzenia (FFS, *Failure Free Survival*) było istotnie lepsze w porównaniu z chorymi leczonymi jedynie standardową immunochemioterapią (75% vs 65% po 2 latach), to jednak przeżycie całkowite (OS, *Overall Survival*) było identyczne w obu grupach i wyniosło 81% po 5 latach.

W chłoniaku Hodgkina po pierwszej linii leczenia w stadium I i II 5-letnie OS osiąga 90% pacjentów, a w stadium III i IV 75-90%. Wobec dobrego rokowania w tej grupie pacjentów, wysokodawkowa chemioterapia zarezerwowana jest także dla pacjentów z nawrotem choroby lub chorobą pierwotnie oporną. W 2002 roku niemiecka grupa przeprowadziła prospektywne badanie kliniczne HDR-1 u chorych z oporną chorobą, którego celem było porównanie wyników standardowego leczenia ratunkowego BEAM z wynikami leczenia autotransplantacją poprzedzoną podaniem wysokodawkowej chemioterapii. W grupie leczonej autoPBSCT wykazano znamienne lepsze PFS¹⁴. Według aktualnych wytycznych pacjenci z chemiowrażliwym nawrotem HL powinni być poddani autotransplantacji^{15,14}.

1.4. Wskazania do wysokodawkowego melfalanu u chorych na szpiczaka plazmocytozowego poddawanych autoPBSCT

Według zaleceń ESMO wysokodawkowy melfalan wspomagany autoPBSCT jest standardem postępowania jako etap konsolidujący odpowiedź na chemioterapię pierwszej linii u chorych na PCM w wieku poniżej 65 roku życia oraz w grupie osób pomiędzy 65-70 rokiem życia, bez istotnych chorób współistniejących. Standardowa dawka melfalanu stosowana w kondycjonowaniu wynosi 200 mg/m², choć rozpiętość dawek raportowanych w literaturze waha się między 100 a 220 mg/m². Uważa się, iż dawka 140-160 mg/m² jest także mielosupresyjna i może być stosowana u pacjentów obciążonych istotnymi chorobami współistniejącymi¹⁶. W erze nowych terapii wysokodawkowa chemioterapia nie straciła na znaczeniu¹⁷. Liczba chorych na PCM poddawanych autoPBSCT zwiększa się z każdym rokiem. W USA

przeanalizowano rejestr 13 949 pacjentów z PCM i wykazano, że w latach 1998-2002 wykonano autoPBSCT u 15,4% chorych, w latach 2008-2012 już u 23,9%, a aktualnie odsetek ten wynosi około 40%. Mediana OS u chorych leczonych autoPBSCT wyniosła 74,9 miesięcy (CI95%, 68-78). W pracy Rosenberga i wsp. wykazano poprawę całkowitego przeżycia (aHR 0,83; CI95%=0,75-0,92) chorych, u których podano wysokodawkowy melfalan wspomagany autoPBSCT, w porównaniu do pacjentów nie poddanych procedurze autotransplantacji. Znaczenie prognostyczne odgrywał czas od rozpoznania PCM do wykonania autoPBSCT, ponieważ gorzej rokowała grupa pacjentów, u których wykonano autoPBSCT ponad 12 miesięcy od rozpoznania (aHR 1,23; CI95%=1,16-1,51)¹⁸. Według danych opublikowanych w 2020 roku przez Rajkumara i wsp. mediana przeżycia u pacjentów poddanych wysokodawkowej chemioterapii z autoPBSCT wynosi obecnie 8 lat. Natomiast mediana przeżycia osób starszych, które nie były kandydatami do autotransplantacji, to jedynie 5 lat¹⁹.

Zgodnie z opublikowanymi danymi Poltransplantu w 2019 roku w Polsce przeprowadzono 1 162 autotransplantacji. Najczęstszym wskazaniem do autoPBSCT było leczenie konsolidujące pierwszej remisji u chorych na PCM. Leczenie to zastosowano u 634 chorych, co stanowiło 55% autotransplantacji wykonanych w kraju. Kolejno najliczniejszą grupę poddaną autoPBSCT stanowili chorzy na chłoniaki nie-Hodgkina (n=305; 26%) oraz pacjenci z HL (n=131; 11%) osób²⁰.

1.5. Ocena występowania chorób współistniejących przed autoPBSCT

Jednym z podstawowych warunków bezpiecznego przeprowadzenia procedury wysokodawkowej chemioterapii u chorych poddawanych autotransplantacji jest dobry stan kliniczny pacjenta oraz rzetelna ocena występowania dodatkowych chorób. Ma to istotne znaczenie przy podejmowaniu decyzji o rodzaju oraz intensywności kondycjonowania. W 2005 roku zespół pod kierownictwem Sorror opublikował w *Blood* wyniki pracy nad nowym narzędziem prognozującym przeżycie po przeszczepieniu allogenicznych komórek krwiotwórczych (alloHSCT, *Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*) oraz śmiertelność niezwiązaną z nawrotem choroby (NRM, *Non Relapse Mortality*). Ryzyko to określa Indeks Chorób Współistniejących przy Przeszczepieniu Krwiotwórczych Komórek Macierzystych

(HCT-CI, *Hematopoietic Stem Cell Transplantation Comorbidity Index*)²¹. Wskaźnik ten jest zmodyfikowaną wersją wskaźnika chorób towarzyszących zaproponowanego przez Charlson w 1987 roku. HCT-CI implementowano także do szacowania ryzyka związanego z autoPBSCT. Autorzy publikacji dotyczącej HCT-CI przedstawili wykaz chorób, które mają istotny wpływ na zwiększoną śmiertelność, wraz z ich wagą punktową. Pacjentów, na podstawie uzyskanych punktów, zakwalifikowano do trzech grup ryzyka, tj. niskiego (0-1 pkt), pośredniego (2 pkt) i wysokiego ryzyka (≥ 3 pkt). NRM, która po dwóch latach od transplantacji w grupie niskiego, pośredniego i wysokiego ryzyka wynosiła odpowiednio: 14%, 21% i 41%. Od czasu publikacji HCT-CI powstało wiele pokrewnych prac, w których poddano ocenie wpływ wieku oraz chorób współistniejących na wystąpienie wczesnych i późnych powikłań okołotransplantacyjnych i śmiertelność związaną z autoPBSCT, która u chorych na chłoniaki wynosi od 5,4% do 8,5%. Warto podkreślić wyniki Wildesa i wsp., którzy wykazali, iż to choroby współistniejące, a nie wiek determinują TRM²². Przydatną skalą stosowaną powszechnie przy kwalifikacji starszych chorych do leczenia onkologicznego jest Ilościowa Ocena Obciążenia Chorobami Współistniejącymi (CIRS, *Cumulative Illness Rating Scale*) zmodyfikowana przez Millera w 1992 roku. Arkusz tej oceny obejmuje łącznie 14 pytań, które różnicują ciężkość chorób współistniejących w zakresie narządów lub układów w skali od 0 do 4 (4 punkty wskazują na poważne uszkodzenie w zakresie danego układu), co pozwala uzyskać maksymalnie 54 punkty. Jeżeli chory uzyska łącznie sześć lub więcej punktów, albo w zakresie pojedynczego układu maksymalną liczbę czterech punktów, oceniany jest jako chory niekwalifikujący się do intensywnej chemioterapii, co implikuje zastosowanie mniej intensywnego leczenia²³.

Dzięki tym narzędziom służącym ocenie ryzyka okołotransplantacyjnego oraz postępowaniu w leczeniu wspomagającym współcześnie do autoPBSCT kwalifikowani są coraz starsi chorzy na PCM, a poszukiwanie i walidacja nowych biomarkerów toksyczności stają się przedmiotem prospektywnych badań.

1.6. Rodzaje toksyczności związanej z wysokodawkową chemioterapią poprzedzającą autoPBSCT

Toksyczność po wysokodawkowej chemioterapii poprzedzającej autotransplantację można podzielić na toksyczność związaną z infekcjami (bakteryjnymi, wirusowymi, grzybiczymi), toksyczność hematologiczną oraz toksyczność narządową. Toksyczność narządowa dotyczy m.in. uszkodzenia błon śluzowych przewodu pokarmowego, nerek, wątroby, układu sercowo-naczyniowego, płuc oraz układu nerwowego. W kilka dni po zakończeniu kondycjonowania obserwuje się toksyczność hematologiczną, która jest przewidzianym efektem działania wysokodawkowej chemioterapii. Większość pacjentów w okresie aplazji szpiku wywołanej kondycjonowaniem wymaga przetoczeń koncentratów krwinek czerwonych i płytek krwi. W celu skrócenia czasu występowania ciężkiej neutropenii podawany jest G-CSF. Istotnym powikłaniem hematologicznym jest gorączka neutropeniczna (FN, *Febrile Neutropenia*), którą rozpoznaje się u chorych z gorączką lub klinicznymi objawami posocznicy, u których bezwzględna liczba neutrofilii jest niższa od 500/ μ l lub od 1000/ μ l, ale przewiduje się dalszy spadek do 500/ μ l w kolejnych 48 godzinach. Do rozpoznania FN upoważnia jednorazowy wzrost temperatury do wartości równej lub wyższej 38,3°C (pomiar w jamie ustnej) lub utrzymywanie się temperatury 38,0°C lub wyższej przez co najmniej godzinę²⁴.

W celu ujednoczenia nomenklatury opracowane zostały kryteria toksyczności działań niepożądanych po chemioterapii (CTCAE, *Common Toxicity Criteria for Adverse Events*), które są systematycznie aktualizowane. Najnowsza wersja 5.0 opublikowana została w 2017 roku. Według CTCAE wyróżnia się 5 stopni toksyczności (G, *Grade*). G1 oznacza najmniejszą toksyczność, a G5 najcięższą, prowadzącą do śmierci. Toksyczność w stopniu G1 lub G2 traktowana jest jako łagodna, natomiast w stopniu G3 i G4 jako ciężka²⁵.

Najczęstsze reakcje niepożądane związane ze stosowaniem chemioterapii nowotworów układu chłonnego, wraz z klasyfikacją ich nasilenia, przedstawiono poniżej (Tabela 1).

Tabela 1. Toksyczność wg CTCAE v5.0

Toksyczność wg CTCAE v5.0	G1	G2	G3	G4	G5
Podwyższona aktywność AST	>ULN - 3,0 x ULN jeżeli wyjściowo w normie	>3,0 - 5,0 x ULN jeżeli wyjściowo w normie	>5,0 - 20,0 x ULN jeżeli wyjściowo w normie	>20,0 x ULN jeżeli wyjściowo w normie	-
Podwyższona aktywność ALT	>ULN - 3,0 x ULN jeżeli wyjściowo w normie	>3,0 - 5,0 x ULN jeżeli wyjściowo w normie	>5,0 - 20,0 x ULN jeżeli wyjściowo w normie	>20,0 x ULN jeżeli wyjściowo w normie	-
Podwyższone stężenie kreatyniny	>ULN - 1,5 x ULN jeżeli wyjściowo w normie	>1,5 - 3,0 x ULN jeżeli wyjściowo w normie	>3,0 - 6,0 x ULN jeżeli wyjściowo w normie	>6,0 x ULN jeżeli wyjściowo w normie	-
Zapalenie błony śluzowej jamy ustnej	Bezobjawowe lub łagodne objawy niewymagające interwencji	Występowanie umiarkowanego bólu lub nadżerek w zakresie jamy ustnej, które nie wpływają na przyjmowanie posiłków	Nasilony ból zaburza przyjmowanie pokarmów	Zagrażające życiu, wymagają pilnej interwencji	Śmierć
Biegunka	Wzrost liczby stolców <4 na dobę w porównaniu do liczby wyjściowej	Wzrost liczby stolców 4-6 na dobę w porównaniu do liczby wyjściowej	Wzrost liczby stolców ≥7 na dobę w porównaniu do liczby wyjściowej	Zagrażająca życiu biegunka, wymagająca pilnej interwencji	Śmierć

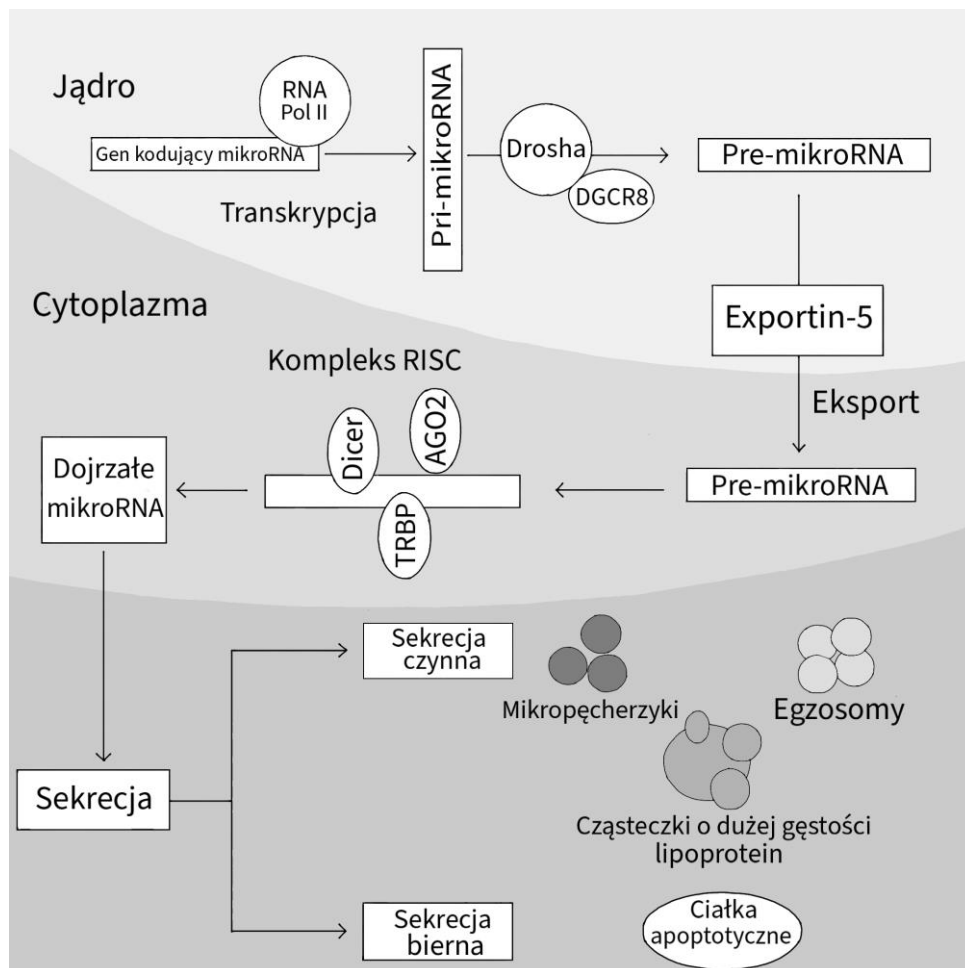
ULN – *Upper Limit Norm*, górna granica normy

Precyzyjne zdefiniowanie działań niepożądanych oraz przypisanie im stopnia ciężkości pozwala na unifikację języka naukowego i ułatwia interpretację wyników badań klinicznych.

1.7. MikroRNA

MikroRNA (miR, *microRNA*) to krótkie kilkunastonukleotydowe (średnio 22-nukleotydowe) fragmenty RNA, które regulują ekspresję genów, m.in. poprzez wpływ na transkrypcję przekąźnikowego RNA (mRNA, *messenger RNA*). W jądrze komórkowym zachodzi proces transkrypcji, podczas której polimeraza RNA drugiego typu skraca mikroRNA i powstaje pri-mikroRNA. Następnie cząsteczka ta formowana jest do pre-mikroRNA przez endonukleazę Drosha – jest to polimeraza RNA trzeciego stopnia, która do pełnej aktywności potrzebuje białkowego kofaktora DGCR8 (*DiGeorge Syndrome*

Critical Region 8). Pre-mikroRNA opuszcza jądro komórkowe za pomocą białka transportującego Exportin 5. W cytoplazmie pre-mikroRNA zostaje poddane działaniu kolejnej endonukleazy – RNAzy trzeciej generacji, zwanej białkiem Dicer, które w połączeniu z kofaktorem TRBP2 (*Transactivator RNA Binding Protein 2*) formuje ostateczną, dwuniciową cząsteczkę mikroRNA. Dwuniciowe mikroRNA, po połączeniu z białkiem stabilizującym *Argonaute 2* (AGO2), tworzy RISC (*microRNA Induce Silencing Complex*), który opuszcza komórkę. Wydzielanie mikroRNA może odbywać się aktywnie poprzez mikropęcherzyki, egzosomy lub cząsteczki lipoproteiny o wysokiej gęstości albo pasywnie jako element ciałek apoptotycznych²⁶. Biogenezę mikroRNA przedstawiono schematycznie na rycinie poniżej (Rycina 1).



Rycina 1. Biogeneza mikroRNA

[na podstawie Dumache R, Rogobete AF, Bedreag OH, et al. Use of miRNAs as Biomarkers In Sepsis. *Anal Cell Pathol.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/186716]

DGCR8 – *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*; Białko Dicer; kofaktor TRBP2 – *Transactivator RNA Binding Protein 2*; AGO2 – białko *Argonaute2*; RISC – *microRNA Induce Silencing Complex*

Po raz pierwszy cząsteczki mikroRNA zostały zidentyfikowane we krwi w 2008 roku²⁷. Od tego czasu rozpoczęła się era poszukiwania ich znaczenia oraz ocena wpływu na regulację innych przekaźników wewnątrzkomórkowych w organizmie ludzkim. W największej bazie danych – miRbase.org w wersji 22.1 (uaktualnionej w październiku 2018 roku) – zidentyfikowano łącznie 38 589 rodzajów mikroRNA, z czego 2 654 pochodzenia ludzkiego. Podejmowane są wysiłki, aby cząsteczki te zostały uporządkowane i powiązane z pełnioną funkcją czy genem²⁸. W tym celu często projektowane są badania na myszach z wyłączeniem genów odpowiedzialnych za produkcję specyficznych mikroRNA. Okazało się, iż ich brak skutkowało rozwojem odmiennych fenotypów, zaburzeniami w rozwoju szkieletu kostnego, mięśni, układu nerwowego, płuc czy hematopoezy²⁹. W ostatniej dekadzie ukazały się publikacje, w których mikroRNA pełni rolę biomarkerów nowotworowych i nienowotworowych. W publikacji na temat profilu mikroRNA w raku trzustki Lee słusznie zauważył, iż w licznych doniesieniach naukowych można wyodrębnić wspólne dla wielu nowotworów mikroRNA. Na przykład miR-221 opisywany jest jako biomarker w nowotworze trzustki, glejaku i raku tarczycy, a ekspresja miR-21 jest charakterystyczna w raku piersi, glejaku czy też w raku brodawkowatym tarczycy. Jednak poza wspólnie występującymi rodzajami mikroRNA, można także wyodrębnić cząsteczki specyficzne w danej chorobie. I tak w raku trzustki są to miR-301 i miR-376a³⁰. Natomiast podczas karcynogenezy stwierdzono znaczne obniżenie ekspresji mikroRNA let-7a-2. Rodzina let-7 odpowiada odwrotnie proporcjonalnie za regulację genu RAS. Zjawisko to powszechnie opisywane jest w nowotworach, m.in. w raku płuc³¹. W raku jelita ekspresja miR-133b i miR-145 jest obniżona, natomiast obserwuje się zwiększoną ekspresję miR-31, miR-96, miR-135b i miR-183³². MikroRNA może być potencjalnym, łatwo dostępnym biomarkerem w skryningu lub jako czynnik prognostyczny nowotworów, głównie dzięki ich dużej stabilności w osoczu. Zwiększona ekspresja miR-155 występuje w chłoniakach wywodzących się z limfocytów B (DLBCL, BL), ostrej białaczce limfoblastycznej oraz przewlekłej białaczce limfocytowej, gdzie zmutowany fragment części zmiennej łańcucha ciężkiego immunoglobulin korelował dodatkowo ze zwiększoną ekspresją miR-150, miR-29b, miR-29c i miR-223^{33,34}. MikroRNA może być także pomocne w wykrywaniu wczesnej wznowy DLBCL³⁵.

Dobrze udokumentowana jest także rola mikroRNA w zakażeniach. W artykule Wu i wsp. przeprowadzono eksperyment na myszach, u których wywoływano sepsę, m.in. poprzez dożylną wstrzyknięcie bakterii. Następnie badano ekspresję mikroRNA w krwi pełnej, surowicy i leukocytach po 4, 8 i 24 godzinach. Stwierdzono nadekspresję mikroRNA zarówno we krwi pełnej, jak i surowicy. Nie stwierdzono podwyższonej ekspresji mikroRNA w leukocytach. Po 8 godzinach od iniekcji *Staphylococcus aureus* nastąpił wzrost ekspresji następujących cząsteczek: miR-122, miR-133a, miR-133b, miR-205, miR-1899. Z kolei po ekspozycji na *Escherichia coli* obserwowano nadekspresję miR-16, miR-17, miR-20a, miR-26a, miR-26b, miR-106a, miR-106b oraz miR-451. W opisywanej pracy potwierdzono także, iż stabilność mikroRNA w krwi pełnej zapewnia kompleks stabilizujący mikroRNA z białkiem AGO2 lub opłaszczenie mikroRNA poprzez błonę egzosomów, co chroni przed aktywnością RNAzy, zmianą pH środowiska czy zamrażaniem³⁶.

Zmianę profilu ekspresji mikroRNA stwierdzono m.in. w zakażeniach wirusami zapalenia wątroby typu C (HCV), herpeswirusami, pikornawirusami czy cytomegalowirusem. W 2005 roku odkryto zależność między miR-122 a zakażeniem wirusem wątroby typu C. Okazało się, że integracja miR-122 z RNA wirusa uniemożliwia jego niszczenie przez endonukleazę w raku wątrobowokomórkowym. Mir-122 jest celem terapeutycznym w trwającym badaniu klinicznym u pacjentów zakażonych wirusem HCV^{37,38,39}.

Rozdział 2. Cele pracy

1. Analiza toksyczności wysokodawkowej chemioterapii wspomaganej transplantacją autologicznych krwiotwórczych komórek macierzystych u chorych na chłoniaki lub szpiczaka plazmocytozy.
2. Określenie wartości predykcyjnej wybranych mikroRNA w przewidywaniu toksyczności infekcyjnej i narządowej po wysokodawkowej chemioterapii wspomaganej transplantacją autologicznych krwiotwórczych komórek macierzystych.
3. Poszukiwanie zależności między ekspresją mikroRNA a wybranymi wskaźnikami upośledzenia czynności narządów w badanej grupie pacjentów.
4. Ocena korelacji ekspresji mikroRNA z wartością wybranych wskaźników chorób współistniejących takich jak HCT-CI i CIRS stosowanych przy kwalifikacji do transplantacji.

Rozdział 3. Materiały i metody

3.1. Ogólna charakterystyka badanych grup

Udział w badaniu zaproponowano 80 pacjentom, którzy wcześniej zostali zakwalifikowani do wysokodawkowej chemioterapii wspomaganej przeszczepieniem autologicznych krwiotwórczych komórek macierzystych w Katedrze i Klinice Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu w latach 2017-2020. Każdy pacjent przed przystąpieniem do badania podpisał formularz świadomej zgody na udział w badaniu. Badania wykonano po uprzednim uzyskaniu zgody uczelnianej Komisji Bioetycznej (nr uchwały 476/2017). Wszystkie procedury wykonane w projekcie zostały przeprowadzone zgodnie ze standardami etycznymi Deklaracji Helsińskiej z 2013 roku. Połowę badanej grupy stanowili pacjenci z chłoniakami wywodzącymi się z dojrzałych limfocytów B, pozostali to chorzy na szpiczaka plazmocytozy. Standardem postępowania przed zastosowaniem wysokodawkowej chemioterapii z autoPBSCT jest ocena zaawansowania nowotworu, ocena skuteczności dotychczasowego leczenia, a także ocena występowania chorób współistniejących według skali HCT-CI oraz CIRS. Powyższe dane zebrano na podstawie dostępnej dokumentacji medycznej oraz po przeprowadzeniu szczegółowego wywiadu z pacjentami.

Grupę kontrolną stanowiło 25 zdrowych ochotników, w tym 48% kobiet (12/25) oraz 52% mężczyzn (13/25). Wiek ochotników mieścił się w przedziale od 18 do 69 lat (mediana 50 lat). W grupie kontrolnej nie stwierdzono osób z chorobami nowotworowymi oraz poważnymi chorobami współistniejącymi.

Ocenę toksyczności narządowej, infekcyjnej oraz występowanie gorączki neutropenicznej analizowano w oparciu o dostępną dokumentację medyczną, opierając się na powszechnie stosowanej skali toksyczności CTCAE v5.0²⁵.

3.2. Charakterystyka pacjentów z nowotworami układu chłonnego z dojrzałych limfocytów B

W grupie pacjentów z nowotworami układu chłonnego z dojrzałych limfocytów B zastosowano kondycjonowanie według schematu BEAM w dawkach standardowych (karmustyna 300 mg/m² w -7 dobie, etopozyd 200 mg/m² w dniach -6 do -3, arabinozyd cytozyny co 12 godzin 200 mg/m² w dniach -6 do -3, melfalan 140 mg/m² w -2 dobie). Poniżej zamieszczono charakterystykę chorych na chłoniaki (Tabela 2)⁴⁰.

Tabela 2. Charakterystyka pacjentów z nowotworami układu chłonnego z dojrzałych limfocytów B

Cecha		Liczba osób	% lub mediana (min-max)
Wiek [lata]		-	49,25 (21-67)
Płeć	Kobiety	27	57,5
	Mężczyźni	13	42,5
ECOG	0	19	47,5
	1	21	52,5
	2-3	0	0
Rodzaj chłoniaka	MCL	11	27,5
	DLBCL	5	12,5
	HL	11	27,5
	FL	4	10
	Inne NHL z dojrzałych limfocytów B	9	22,5
Stopień zaawansowania klinicznego przy rozpoznaniu	I	1	2,5
	II	7	17,5
	III	3	7,5
	IV	29	72,5
Objawy ogólne przy rozpoznaniu	Tak	22	55
	Nie	18	45
Skale prognostyczne w zależności od rodzaju chłoniaka	Ryzyko niskie	6	15
	Ryzyko pośrednie	10	25
	Ryzyko wysokie	14	35
	Brak danych	10	25

Cecha		Liczba osób	% lub mediana (min-max)
Liczba linii leczenia przed autoPBSCT	I	13	32,5
	II	16	40
	III	7	17,5
	IV lub więcej	4	10
Mediana linii leczenia	-	40	2 (1-5)
Odpowiedź na leczenie przed autoPBSCT	CR	27	67,5
	PR	12	30
	SD	1	2,5
Liczba punktów w skali HCT-CI	Ryzyko niskie	33	82,5
	Ryzyko pośrednie	6	15
	Ryzyko wysokie	1	2,5
Liczba punktów CIRS	<6	36	90
	≥6	4	10
Stężenie kreatyniny przed autoPBSCT, stopień toksyczności wg CTCAE v.5	Stopień G1	7	17,5
	Stopień G2-G4	0	0
Aktywność transaminaz przed autoPBSCT, stopień toksyczności wg CTCAE v5.0	Stopień G1	4	10
	Stopień G2-G4	0	0

3.3. Charakterystyka pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym

Chorzy na PCM otrzymali w kondycjonowaniu melfalan w monoterapii w dawce 200 mg/m² lub 140 mg/m² w -2 dobie¹⁶. Poniżej przedstawiono charakterystykę pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym (Tabela 3).

Tabela 3. Charakterystyka pacjentów z PCM

Cecha		Liczba osób	% lub mediana (min-max)
Wiek [lata]		-	57,3 (37-67)
Płeć	Kobiety	18	45
	Mężczyźni	22	55
ECOG	0	24	60
	1	14	35
	2-3	2	5
Rozpoznanie choroby	PCM IgG	23	57,5
	PCM IgA	6	15
	PCM IgD	1	2,5
	Choroba łańcuchów lekkich	10	25
Rodzaj łańcucha lekkiego	Kappa	21	52,5
	Lambda	19	47,5
Stopień zaawansowania choroby wg klasyfikacji Salmons-Durie	IA	2	5
	IIA	10	25
	IIIA	24	60
	IIIB	4	10
Stadium choroby wg ISS	1	11	27,5
	2	10	25
	3	14	35
	Brak danych	5	12,5
Liczba linii leczenia przed autoPBSCT	I	23	57,5
	II	13	32,5
	III	3	7,5
	IV lub więcej	1	2,5
Mediana linii leczenia	-	40	1 (1-5)
Odpowiedź na leczenie przed autoPBSCT	CR	13	32,5
	VGPR	16	40
	PR	10	25
	SD	1	2,5
Dawka melfalanu [mg/m²]	140	11	27,5
	200	29	72,5

Cecha		Liczba osób	% lub mediana (min-max)
Liczba punktów w skali HCT-CI	Ryzyko niskie	32	80
	Ryzyko pośrednie	7	17,5
	Ryzyko wysokie	1	2,5
Liczba punktów w skali CIRS	<6	36	90
	≥6	4	10
Stężenie kreatyniny przed autoPBSCT, stopień toksyczności wg CTCAE v5.0	Stopień G1	2	5
	Stopień G2-G4	0	0
Stężenie transaminaz przed autoPBSCT, stopień toksyczności wg CTCAE v5.0	Stopień G1	2	5
	Stopień G2-G4	0	0

CR – Complete Response; PR – Partial Response; VGPR – Very Good Partial Response;
SD –Stable Disease; ISS – International Staging System

3.4. Pobranie materiału

Próbki krwi, celem oceny stopnia ekspresji mikroRNA i wykonania oznaczeń biochemicznych, pobierane były w następujących punktach czasowych: przed kondycjonowaniem oraz w +1 i +7 dobie po autoPBSCT. Oceniono stopień ekspresji następujących mikroRNA: hsa-miR-122-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-150-3p, hsa-miR-155-3p, hsa-miR-210-5p, hsa-miR423-5p. Ponadto w tych samych punktach czasowych badano morfologię, stężenie kreatyniny, BNP, troponiny I, CRP a także aktywność AST i ALT oraz frakcji mioglobiny kinazy kreatynowej (CK-MB, *Creatine Kinase MB*). Próbki krwi pobierane były do próbek dedykowanych do oznaczania mikroRNA PaxGene (Qiagen, Hilden, Niemcy). Po pobraniu materiału postępowano według instrukcji producenta. Badania biochemiczne i morfologia wykonywane były w Centralnym Laboratorium Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego, zgodnie z przyjętymi w szpitalu standardami.

3.5. Izolacja i ocena ekspresji mikroRNA

Badania prowadzone były w Katedrze Histologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. 265 próbek, przechowywanych w temperaturze -70°C , poddano izolacji oraz określono poziom ekspresji mikroRNA za pomocą metod RT-qPCR (*Reverse Transcription Quantative Polymerase Chain Reaction*) i ddPCR (*droplet digital PCR*). Po rozmrożeniu materiału przystąpiono do izolacji RNA przy pomocy zestawu Paxgene RNA Isolation Kit IVD (Qiagen). Wyizolowany materiał RNA posłużył do reakcji RT-qPCR z wykorzystaniem kitu do odwrotnej transkrypcji firmy Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) według załączonej instrukcji. Ilościowe oznaczanie mikroRNA przeprowadzono stosując metodę ddPCR. Najpierw wyizolowano mikroRNA za pomocą mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Waltham, MA, USA), zgodnie z załączoną instrukcją. Następnie zastosowano zestaw odwrotnej transkryptazy (*The TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit*, Applied Biosystems) oraz miRNA specyficzne primery (Applied Biosystems). 30 ng RNA z każdej próbki było poddanych odwrotnej transkrypcji za pomocą C1000 Touch Termocyklera (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Zastosowano następujące parametry termocyklera: 30 minut 16°C , 30 minut 42°C i 5 minut 85°C . Mieszanina ddPCR zawierała 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 i 10 μl próbki 2X ddPCR MasterMix (Bio-Rad). Następnie 20 μl opisanej wyżej mieszanki reakcyjnej zostało załadowane do plastikowego, specjalnie do tego dedykowanego pojemnika wraz z 70 μl oleju Droplet Generation (Bio-Rad) i umieszczone w QX100 Droplet Generatorze (Bio-Rad). Krople uzyskane z każdej próbki zostały przeniesione do 96-dołkowej płytki (Eppendorf, Hamburg, Germany). Amplifikacja PCR prowadzona była w termocyklerze C1000 Touch Termal w temperaturze 95°C przez 10 minut, następnie 40 cykli w temperaturze 95°C przez 3 sekundy i w 60°C przez 1 minutę, a kolejny 1 cykl w temperaturze 98°C przez 10 minut i zmniejszając temperaturę do pokojowej. Na końcu płytka 96-miejscowa umieszczana była w czytniku Droplet Reader (Bio-Rad) i automatycznie odczytywana. Bezwzględna liczba mikroRNA była odczytywana jako liczba zdarzeń z zastosowaniem metod statystycznych – dyskretnego rozkładu prawdopodobieństwa Poissona. MikroRNA w

mieszanie reakcji PCR przedstawione jest ostatecznie jako liczba kopii produktu w mikrolitrze.

3.6. Metody statystyczne

Analiza statystyczna materiału została wykonana w oparciu o pakiet statystyczny STATISTICA 13.3 dla systemu operacyjnego Windows. Część wykresów i tabel została przygotowana w programie Microsoft Office 2016. Zmienne kategoryjne przedstawiono jako ilości obserwacji wraz z wartością procentową. Zmienne ilościowe opisano za pomocą mediany z zakresem (minimum-maksimum) lub wartości średniej wraz z odchyleniem standardowym. Normalność rozkładu weryfikowano testem Shapiro-Wilka, a homogeniczność wariancji testem Levene'a. Porównanie między-grupowe zmiennych ciągłych przeprowadzono z zastosowaniem testu t lub analizy wariancji ANOVA wraz z testem post hoc HSD Tukeya. Zmienne ciągłe o rozkładzie innym niż normalny porównywano za pomocą testów Manna-Whitneya lub ANOVA Kruskala-Wallisa wraz z porównaniami wielokrotnymi. Zmienne korelowano testem rang Spearmana. Do analizy zależności zmiennych jakościowych wykorzystywano test χ^2 -Pearsona, natomiast gdy jego założenia nie były spełnione, korzystano z dokładnego testu Fishera. W analizach przyjęto graniczny poziom istotności $\alpha=0,05$. Wartość współczynnika r Spearmana poniżej 0,2 wskazywała na słabą korelację, w przedziale 0,2 do 0,4 oznaczała niską korelację, w przedziale 0,4 do 0,6 korelację umiarkowaną, w przedziale 0,6 do 0,8 korelację wysoką, w przedziale 0,8 do 0,9 korelację bardzo wysoką, natomiast powyżej 0,9 wskazywała na praktycznie pełną zależność.

Rozdział 4. Wyniki

4.1. Toksyczność wysokodawkowej chemioterapii BEAM u chorych na chłoniaki poddawanych autoPBSCT

Po kondycjonowaniu BEAM najczęściej obserwowanym powikłaniem były infekcje, które w stopniu G3-G4 i G2 stwierdzono odpowiednio u 30% (12/40) i 15% (6/40) chorych (Tabela 4). Wśród infekcji dominowała biegunka, zapalenie płuc, a także zakażenie związane z cewnikiem naczyniowym (Tabela 5). Gorączkę neutropeniczną odnotowano u 32,5% (13/40) pacjentów. Powikłania nieinfekcyjne wystąpiły łącznie u 27,5% (11/40) chorych, z czego u 15% (6/40) ciężkie, w stopniu G3. W grupie pacjentów z powikłaniami nieinfekcyjnymi u 20% (8/40) wystąpiło zapalenie błon śluzowych przewodu pokarmowego. U pojedynczych chorych stwierdzono hipotonię ortostatyczną, zakrzepicę żyły szyjnej oraz nasilenie choroby hemoroidalnej (Tabela 6). Nie obserwowano ciężkich powikłań ze strony nerek i wątroby. Laboratoryjne wykładniki czynności nerek i wątroby oceniano przed kondycjonowaniem oraz w dobach +1 i +7 po autoPBSCT. Przed rozpoczęciem kondycjonowania u 10% (4/40) badanych stwierdzono podwyższoną aktywność AST i ALT w stopniu G1. W pierwszej dobie po autoPBSCT odsetek badanych, u których obserwowano wzrost aktywności ALT podwoił się (8/40), a w odniesieniu do AST wzrósł do 12,5% (5/40), bez nasilenia ciężkości powikłania. W +7 dobie po autoPBSCT toksyczność wątrobowa ustąpiła u wszystkich chorych. Dodatkowo przed rozpoczęciem kondycjonowania u 17,5% (7/40) badanych stwierdzono podwyższone stężenie kreatyniny w stopniu G1. Po wysokodawkowej chemioterapii, w kolejnych dniach obserwacji, tj w dobie +1 i +7 po autoPBSCT, nie obserwowano nasilenia zaburzeń czynności nerek (Tabela 7). W badanej grupie nie obserwowano powikłań ze strony układu sercowo-naczyniowego, poza hipotonią ortostatyczną, która wystąpiła u 5% (2/40) chorych.

Tabela 4. Nasilenie powikłań infekcyjnych i nieinfekcyjnych według CTCAE v5.0 u pacjentów z chłoniakami po kondycjonowaniu BEAM

Toksyczność	n (%)
Gorączka neutropeniczna	13 (32,5)
Powikłania infekcyjne w stopniu G3-G4	12 (30)
Powikłania infekcyjne w stopniu G1-G2	6 (15)
Powikłania infekcyjne sumarycznie w stopniu G1-G4	18 (45)
Powikłania nieinfekcyjne w stopniu G3-G4	6 (15)
Powikłania nieinfekcyjne w stopniu G1-G2	5 (12,5)
Powikłania nieinfekcyjne sumarycznie w stopniu G1-G4	11 (27,5)

Tabela 5. Rodzaj powikłań infekcyjnych u pacjentów z chłoniakami po kondycjonowaniu BEAM

Stopień ciężkości	Rodzaj powikłania	n (%)
Stopień G4	Wstrząs septyczny	1 (2,5)
Stopień G3	Zakażenie związane z cewnikiem naczyniowym	2 (5)
	Biegunka	5 (12,5)
	Zapalenie płuc	3 (7,5)
	Zakażenie układu moczowego	1 (2,5)
Stopień G2	Biegunka	5 (12,5)
Stopień G1	-	-

Tabela 6. Rodzaj powikłań nieinfekcyjnych u pacjentów z chłoniakami po kondycjonowaniu BEAM

Stopień ciężkości	Rodzaj powikłania	n (%)
Stopień G4	-	-
Stopień G3	Hipotonia ortostatyczna	1 (2,5)
	Zapalenie błon śluzowych przewodu pokarmowego	4 (10)
	Zakrzepica żyły szyjnej wewnętrznej	1 (2,5)
Stopień G2	Zapalenie błon śluzowych przewodu pokarmowego	3 (7,5)
	Hipotonia ortostatyczna	1 (2,5)

Stopień ciężkości	Rodzaj powikłania	n (%)
Stopień G1	Zapalenie błon śluzowych przewodu pokarmowego	1 (2,5)
	Choroba hemoroidalna	1 (2,5)
	Reakcja anafilaktyczna	1 (2,5)

Tabela 7. Ocena aktywności transaminaz i stężenia kreatyniny u pacjentów z chłoniakami w okresie przed i po kondycjonowaniu BEAM

Parametr laboratoryjny oraz nasilenie zaburzeń wg CTCAE v5.0	Przed leczeniem	+1 doba po autoPBSCT	+7 doba po autoPBSCT
Stopień G1-G4	n (%)	n (%)	n (%)
AST G1	4 (10,0)	5 (12,5)	0
ALT G1	4 (10,0)	8 (20,0)	0
Kreatynina G1	7 (17,5)	7 (17,5)	4 (10)

4.2. Toksyczność wysokodawkowego melfalanu u chorych na szpiczaka plazmocytozowego poddawanych autoPBSCT

Najczęstszymi reakcjami niepożądanymi po kondycjonowaniu wysokodawkowym melfalanem były infekcje. Ciężkie infekcje w stopniu G3 występowały u 17,5% (7/40) pacjentów, a łagodne w stopniu G1-G2 u 25% (10/40) chorych (Tabela 8). Wśród infekcji, podobnie jak w grupie chorych na chłoniaki, dominowały biegunki, zapalenia płuc i oskrzeli, a także zakażenia związane z cewnikiem naczyniowym (Tabela 9). Odsetek pacjentów z gorączką neutropeniczną był dużo niższy niż w grupie chorych na chłoniaki, ponieważ wyniósł jedynie 7,5% (3/40). Powikłania nieinfekcyjne wystąpiły łącznie u 42,5% (17/40) chorych, z czego w stopniu G3-G4 u 10% (4/40). Wśród powikłań nieinfekcyjnych występowało zapalenie błon śluzowych przewodu pokarmowego 32,5% (13/40). U pojedynczych chorych obserwowano również incydent migotania przedsionków, inne arytmie nadkomorowe, zapalenia krążka międzykręgowego oraz krwawienie z przewodu pokarmowego (Tabela 10). Nie stwierdzono żadnych ciężkich powikłań narządowych ze strony nerek i wątroby. Przed rozpoczęciem kondycjonowania u 5% (2/40) badanych stwierdzono nieznacznie podwyższoną aktywność AST i ALT w stopniu G1, natomiast u 5% (2/40) wzrost stężenia

kreatyniny w stopniu G1. Nie obserwowano pogorszenia parametrów funkcji nerek i wątroby po kondycjonowaniu, w kolejnych dniach obserwacji (Tabela 11).

Tabela 8. Nasilenie powikłań infekcyjnych i nieinfekcyjnych według CTCAE v5.0 u chorych na szpiczaka plazmocytozowego po kondycjonowaniu wysokodawkowym melfalanem

Toksyczność	n (%)
Gorączka neutropeniczna	3 (7,5)
Powikłania infekcyjne w stopniu G3 i G4	7 (17,5)
Powikłania infekcyjne w stopniu G1 i G2	10 (25)
Powikłania infekcyjne sumarycznie w stopniu G1-G4	17 (42,5)
Powikłania nieinfekcyjne w stopniu G3 i G4	4 (10)
Powikłania nieinfekcyjne w stopniu G1 i G2	13 (32,5)
Powikłania nieinfekcyjne sumarycznie w stopniu G1-G4	17 (42,5)

Tabela 9. Rodzaj powikłań infekcyjnych u chorych na szpiczaka plazmocytozowego po kondycjonowaniu wysokodawkowym melfalanem

Stopień ciężkości	Rodzaj powikłania	n (%)
Stopień G4	-	-
Stopień G3	Zakażenie związane z cewnikiem naczyniowym	2 (5)
	Biegunka	3 (7,5)
	Zapalenie płuc	2 (5)
Stopień G2	Zakażenie związane z cewnikiem naczyniowym	2 (5)
	Biegunka	6 (15)
	Zapalenie oskrzeli	1 (2,5)
	Zapalenie mieszków włosowych	1 (2,5)
Stopień G1	-	-

Tabela 10. Rodzaj powikłań nieinfekcyjnych u chorych na szpiczaka plazmocytoowego po kondycjonowaniu wysokodawkowym melfalanem

Stopień ciężkości	Rodzaj powikłania	n (%)
Stopień G4	Zapalenie błon śluzowych przewodu pokarmowego	1 (2,5)
Stopień G3	Napad migotania przedsionków	1 (2,5)
	Zapalenie błon śluzowych przewodu pokarmowego	1 (2,5)
	Zapalenie krążka międzykręgowego	1 (2,5)
Stopień G2	Zapalenie błon śluzowych przewodu pokarmowego	11 (27,5)
	Krwawienie z przewodu pokarmowego	1 (2,5)
	Nadkomorowe zaburzenia rytmu serca	1 (2,5)
Stopień G1	-	-

Tabela 11. Ocena aktywności transaminaz i stężenia kreatyniny u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytoowym w okresie przed i po kondycjonowaniu wysokodawkowym melfalanem

Parametr laboratoryjny oraz nasilenie zaburzeń wg CTCAE v5.0	Przed leczeniem	+1 doba po autoPBSCT	+7 doba po autoPBSCT
Stopień G1-G4	n (%)	n (%)	n (%)
AST G1	2 (5)	1 (2,5)	1 (2,5)
ALT G1	2 (5)	0	1 (2,5)
Kreatynina G1	2 (5)	2 (5)	2 (5)

4.3. Wyjściowy stopień ekspresji wybranych mikroRNA u pacjentów z nowotworami układu chłonnego z dojrzałych limfocytów B lub ze szpiczakiem plazmocytoowym w porównaniu z grupą kontrolną

Oznaczono stopień ekspresji mikroRNA u pacjentów z nowotworami układu chłonnego z dojrzałych limfocytów B przed podaniem wysokodawkowej chemioterapii poprzedzającej autoPBSCT i porównano go z grupą kontrolną. Stwierdzono istotnie statystycznie wyższą ekspresję miR-150 i miR-155 w grupie kontrolnej w porównaniu z grupą chorych na chłoniaki i szpiczaka plazmocytoowego. Natomiast wyjściowo w całej grupie pacjentów, w porównaniu z grupą kontrolną, obserwowano istotnie wyższą ekspresję miR-146a oraz miR-210 (Tabela 12).

Jedyna istotna statystycznie różnica w ekspresji mikroRNA między grupą chorych na chłoniaki a grupą chorych na szpiczaka plazmocytoowego dotyczyła miR-122, którego ekspresja była wyższa w grupie chorych na chłoniaki ($p=0,011$).

Tabela 12. Wyjściowa ekspresja mikroRNA w grupie pacjentów z chłoniakami, szpiczakiem plazmocytoowym i w grupie kontrolnej

Rodzaj miR	Liczba kopii miR/ μ l w grupie chorych na chłoniaki mediana (zakres)	p*	Liczba kopii miR/ μ l w grupie chorych na szpiczaka plazmocytoowego mediana (zakres)	p**	Liczba kopii miR/ μ l w grupie kontrolnej mediana (zakres)
miR-122	3,1 (0,1-72,0)	$p>0,05$	1,4 (0,0-9,8)	$p>0,05$	1,2 (0,46-13,2)
miR-146a	237,5 (83,0-1743,0)	$p>0,05$	267,0 (48,0-1191,0)	$p<0,001$	19,3 (0,3-407,0)
miR-150	9,1 (3,4-67,0)	$p<0,001$	11,9 (1,5-36,8)	$p<0,001$	135,0 (58,0-215,0)
miR-155	76,5 (30,5-740,0)	$p<0,001$	93,0 (34,0-180,0)	$p<0,001$	358,0 (140,0-1216,0)
miR-210	578,0 (72,0-45400,0)	$p<0,001$	429,0 (126,0-1875,0)	$p=0,008$	261,0 (102,0-1720,0)

* poziom istotności statystycznej między grupą chorych na chłoniaki a grupą kontrolną;

** poziom istotności statystycznej między grupą chorych na szpiczaka plazmocytoowego a grupą kontrolną.

4.4. Biomarkery toksyczności

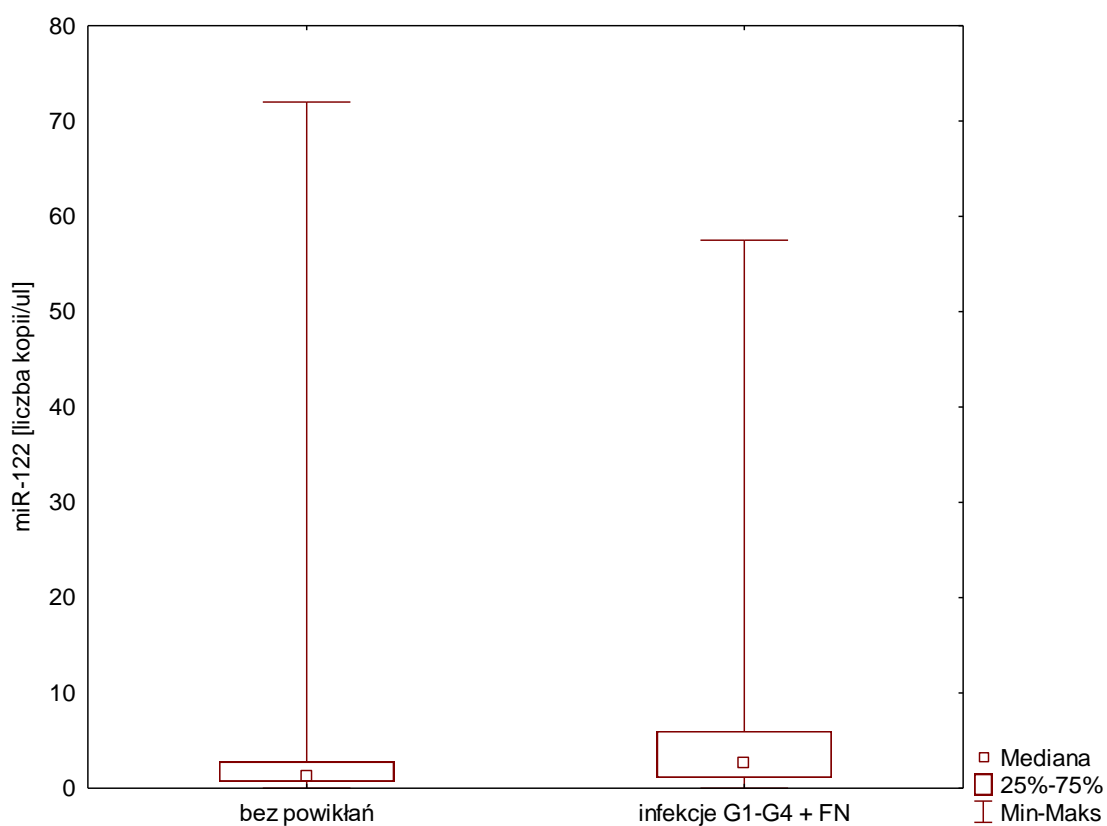
W celu określenia znaczenia mikroRNA w przewidywaniu wystąpienia powikłań związanych z wysokodawkową chemioterapią wspomaganą autoPBSCT porównywano ich wyjściową ekspresję przed rozpoczęciem kondycjonowania w grupie chorych z powikłaniami i bez powikłań.

W całej badanej grupie pacjentów, u których wystąpiły powikłania infekcyjne G1-G4 lub FN, obserwowano istotnie wyższą ekspresję miR-122 w porównaniu z grupą bez powikłań infekcyjnych i bez FN.

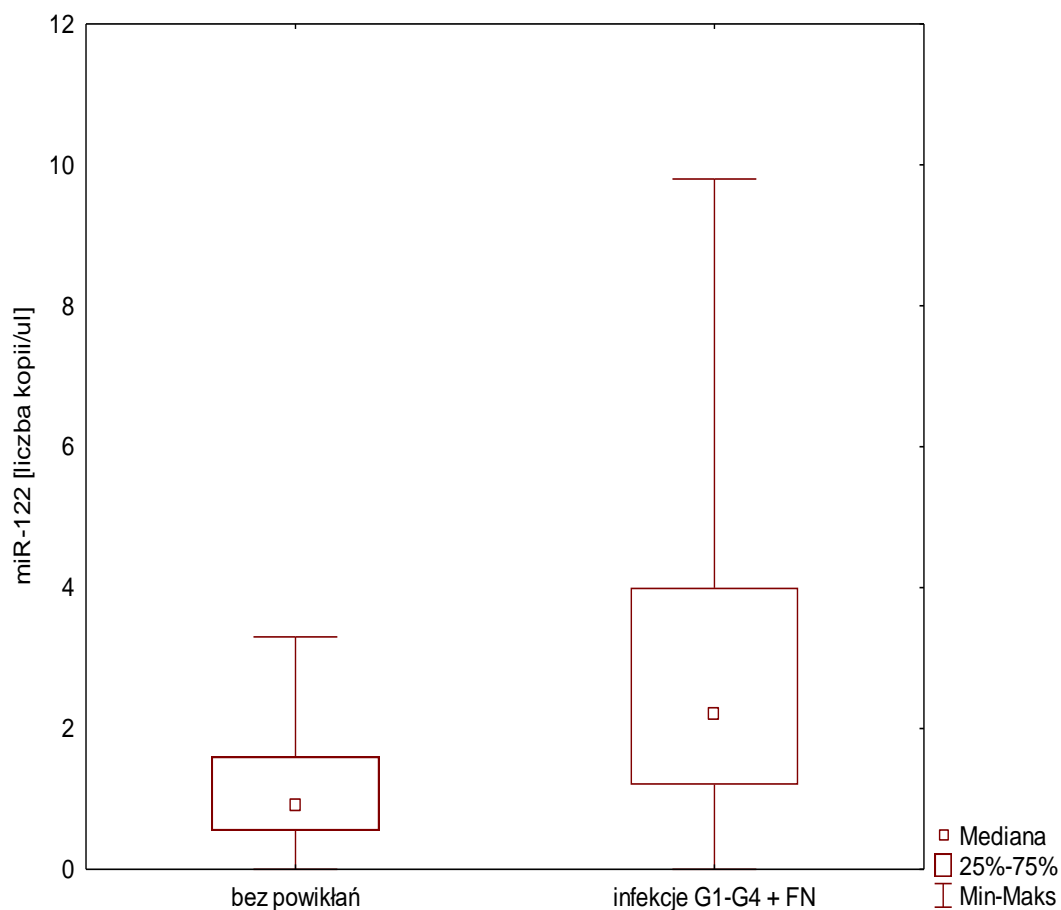
W grupie chorych na szpiczaka plazmocytoowego, analizowanej oddzielnie, różnica między grupą z powikłaniami i bez powikłań pozostała znamienna statystycznie. Natomiast w grupie chorych na chłoniaki, analizowanej oddzielnie, choć obserwowano wyższe wartości ekspresji miR-122 w grupie z powikłaniami w porównaniu do grupy bez powikłań, jednak różnica nie była znamienna statystycznie (Tabela 13).

Tabela 13. Porównanie ekspresji miR-122 w grupie pacjentów z powikłaniami infekcyjnymi G1-G4 lub FN i bez powikłań

	Mediana miR-122 w grupie z infekcjami G1-4 lub FN [liczba kopii miR/ μ l]	Mediana miR-122 w grupie bez infekcji i FN [liczba kopii miR/ μ l]	p
Cała badana grupa	2,7	1,2	p=0,01
Chorzy na szpiczaka plazmocytoowego	2,2	0,9	p=0,013
Chorzy na chłoniaki	3,2	2,9	p>0,05



Rycina 2. Wyjściowa ekspresja miR-122 w całej badanej grupie u pacjentów z infekcjami w stopniu G1-G4 lub FN i bez powikłań infekcyjnych i FN



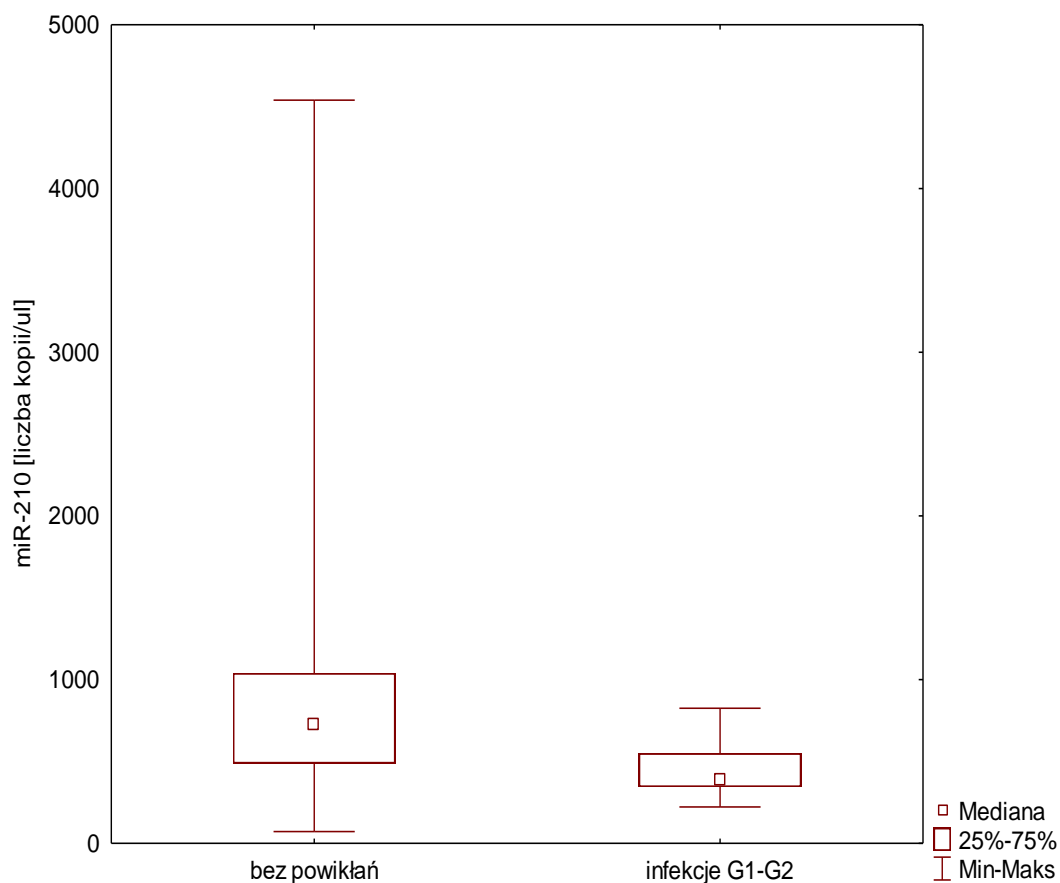
Rycina 3. Wyjściowa ekspresja miR-122 w grupie pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym i infekcjami w stopniu G1-G4 lub FN i bez powikłań infekcyjnych i FN

Obserwowano także istotnie obniżoną ekspresję miR-210 w następujących grupach:

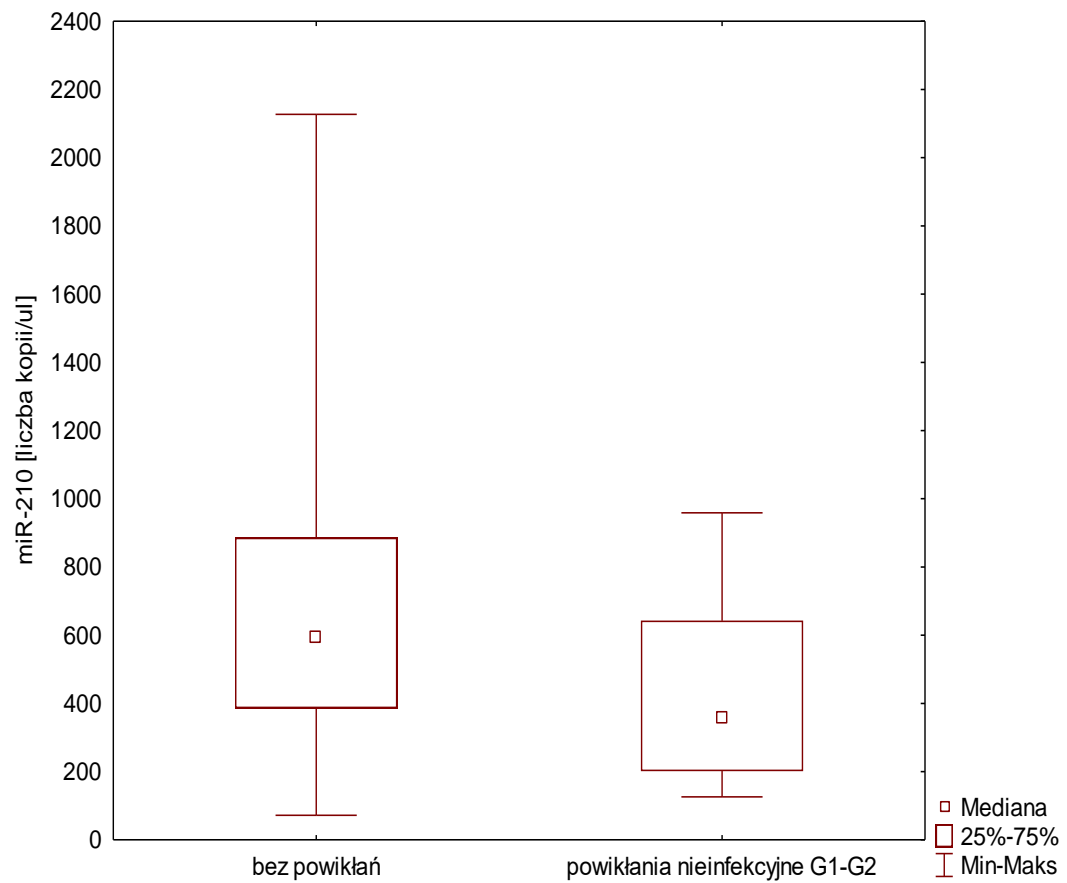
- w grupie pacjentów z chłoniakami i infekcjami w stopniu G1-G2 (Rycina 4),
- w całej badanej grupie z powikłaniami nieinfekcyjnymi G1-G2 (Rycina 5),
- w grupie pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym i powikłaniami nieinfekcyjnymi G1-G2 (Rycina 6).

Tabela 14. Mediana miR-210 w grupie pacjentów z i bez powikłań w stopniu G1-G2

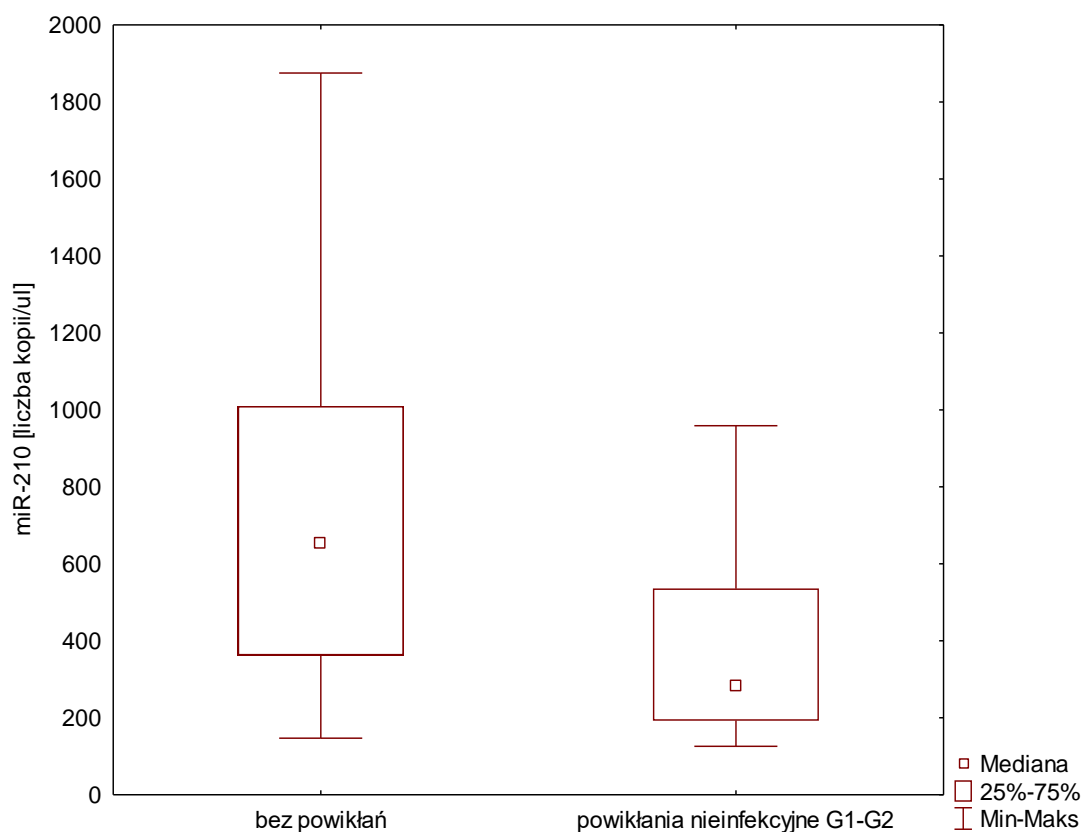
	Mediana miR-210 w grupie z powikłaniami [liczba kopii miR/ μ l]	Mediana miR-210 w grupie bez powikłań [liczba kopii miR/ μ l]	p
Pacjenci z chłoniakami a infekcje G1-G2	391,0	726,0	p=0,012
Cała badana grupa a powikłania nieinfekcyjne G1-G2	359,0	594,0	p=0,012
Pacjenci ze szpiczakiem plazmocytowym a powikłania nieinfekcyjne G1-G2	382,0	445,5	p=0,007



Rycina 4. Wyjściowa ekspresja miR-210 w grupie pacjentów z chłoniakami i powikłaniami infekcyjnymi w stopniu G1-G2 i bez powikłań infekcyjnych



Rycina 5. Wyjściowa ekspresja miR-210 w całej grupie badanej z powikłaniami nieinfekcyjnymi w stopniu G1-G2 i bez powikłań nieinfekcyjnych



Rycina 6. Wyjściowa ekspresja miR-210 w grupie pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym i powikłaniami nieinfekcyjnymi w stopniu G1-G2 i bez powikłań nieinfekcyjnych

4.5. Korelacje między ekspresją mikroRNA a liczbą leukocytów i parametrami biochemicznymi

4.5.1. MikroRNA a liczba leukocytów

W całej grupie badanej stwierdzono istotną korelację między miR-150 a liczbą leukocytów przed rozpoczęciem kondycjonowania. Opisywaną zależność potwierdzono w analizie ograniczonej do grupy chorych na szpiczaka plazmocytoowego, natomiast nie potwierdzono w grupie chorych na chłoniaki (Tabela 15). Poza tym nie stwierdzono korelacji między wyjściową liczbą leukocytów a miR-122, miR-146a, miR-155, miR-210.

Tabela 15. Korelacja liczby leukocytów z miR-150 przed kondycjonowaniem

Wyjściowa liczba WBC	Wyjściowa ekspresja miR-150	p
U wszystkich chorych	r=0,31	p=0,012
U chorych na chłoniaki	r=0,22	p>0,050
U chorych na szpiczaka plazmocytoowego	r=0,45	p=0,019

WBC – *White Blood Count*

4.5.2. MikroRNA a parametry biochemiczne

W analizie przeprowadzonej w całej badanej grupie wykazano istotną korelację pomiędzy wyjściową ekspresją miR-122 i wyjściową aktywnością transaminaz. Podobną zależność wykazano w analizie ograniczonej do grupy chorych na chłoniaki. Nie wykazano natomiast takiej zależności w analizie ograniczonej do grupy chorych na szpiczaka plazmocytoowego (Tabela 16).

U chorych na chłoniaki stwierdzono wyjściowo wyższą medianę aktywności AST w porównaniu do chorych na szpiczaka plazmocytoowego, odpowiednio 20 U/l (10-92) oraz 16 U/l (9-96), p=0,001 oraz analogicznie wyższą medianę aktywności ALT, odpowiednio 24 U/l (10-90) oraz 17 U/l (6-152), p=0,028.

Tabela 16. Korelacja między aktywnością AST i ALT a ekspresją miR-122 przed kondycjonowaniem

		Wyjściowa ekspresja miR-122	p
Wyjściowa aktywność AST	U wszystkich chorych	r=0,3	p=0,009
	U chorych na chłoniaki	r=0,34	p=0,041
	U chorych na szpiczaka plazmocytoowego	r=0,1	p>0,05
Wyjściowa aktywność ALT	U wszystkich chorych	r=0,39	p=0,001
	U chorych na chłoniaki	r=0,41	p=0,012
	U chorych na szpiczaka plazmocytoowego	r=0,29	p>0,05

4.5.3. MikroRNA a inne parametry

Stwierdzono istotną zależność między medianą miR-150, miR-155 i miR-210 w grupach pacjentów stratyfikowanych według wartości HCT-CI (Tabela 17). W całej grupie badanej i grupie chorych na chłoniaki z wysokim i pośrednim HCT-CI obserwowano znamienne wyższą ekspresję miR-155 w porównaniu do grupy z niskim HCT-CI. Analogicznie stwierdzono wyższą ekspresję miR-210 w grupie pacjentów z chłoniakami i pośrednim lub wysokim HCT-CI. Natomiast ekspresja miR-150 w grupie pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym i wysokim lub pośrednim HCT-CI była obniżona.

W analizie przeprowadzonej w całej grupie chorych oraz w grupie chorych na chłoniaki stratyfikowanych według wartości punktowej CIRS nie stwierdzono różnic w wyjściowej ekspresji mikroRNA. Jedynie w grupie chorych ze szpiczakiem plazmocytowym i CIRS ≥ 6 pkt ekspresja miR-150 była istotnie niższa niż w grupie z CIRS < 6 pkt ($p=0,023$).

Tabela 17. Wyjściowa ekspresja miR-150, miR-155 i miR-210 a grupy ryzyka według HCT-CI

Mediana miR [liczba kopii miR/ μ l]	Niski HCT-CI	Pośredni i wysoki HCT-CI	p
Mediana miR-155 w całej grupie badanej	76,5	161	$p=0,001$
Mediana miR-155 w grupie pacjentów z chłoniakami	70,5	201	$p<0,001$
Mediana miR-210 w grupie pacjentów z chłoniakami	544	1136,5	$p=0,018$
Mediana miR-150 w grupie pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym	14,8	4,6	$p<0,001$

Rozdział 5. Omówienie wyników i dyskusja

Wyniki powyższej pracy potwierdzają, iż po autoPBSCT zarówno u pacjentów z chłoniakami wywodzącymi się z dojrzałych limfocytów B poddanych kondycjonowaniu według schematu BEAM, jak i u chorych na szpiczaka plazmocytozowego po podaniu wysokodawkowanego melfalanu nie obserwuje się ciężkich powikłań narządowych we wczesnym okresie potransplantacyjnym. Spostrzeżenie to jest zgodne z wynikami innych podobnych prac, których autorzy jednomyślnie podkreślają, iż najczęstszymi powikłaniami po wysokodawkowej chemioterapii są infekcje oraz zapalenie błony śluzowej przewodu pokarmowego.

W historycznej publikacji, która ukazała się w czasopiśmie Bone Marrow Transplantation w 1997 roku, hiszpańscy naukowcy opublikowali dane na temat toksyczności chemioterapii BEAM. Hepatotoksyczność obserwowano u 32% pacjentów, z czego najcięższą w stopniu G3 obserwowano jedynie u 2% chorych. Nefrotoksyczność wystąpiła jedynie w stopniu G1 u 8% chorych. Z powikłań dominowało zapalenie błon śluzowych przewodu pokarmowego, które stwierdzono aż u 84% badanych, w tym w stopniu G3-G4 u 30% z nich. Biegunka wystąpiła u 69% chorych⁴⁰. Klika doniesień literaturowych w kolejnych latach dotyczyło porównania toksyczności kondycjonowania BEAM z innymi schematami chemioterapii. Esbah i wsp. porównywali toksyczność wysokodawkowych terapii BEAM i hICE (ifosfamid, karboplatyna i etopozyd). Odsetek pacjentów, u których po leczeniu BEAM wystąpiły powikłania hepatotoksyczne i nefrotoksyczne w stopniu G2-G4, wyniósł 2,7% w przypadku obu powikłań⁴¹. Biegunka oraz zapalenie błon śluzowych przewodu pokarmowego w stopniu G2-G4 wystąpiły odpowiednio u 59% i 8% chorych⁴¹. Natomiast Kothari porównywał toksyczność schematów BEAM i LEAM (lomustyna, etopozyd, cytarabina i melfalan). Hepatotoksyczność w stopniu G3-G4 wystąpiła u 6% chorych po chemioterapii BEAM. U żadnego z pacjentów nie obserwowano natomiast ciężkiej nefrotoksyczności. Najczęstszymi powikłaniami nieinfekcyjnymi było zapalenie błony śluzowej przewodu pokarmowego i biegunka, które w stopniu G3-G4 odnotowano odpowiednio u 30% i 50% chorych⁴².

Wysokodawkowy melfalan stosowany w monoterapii przed autotransplantacją u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym wykazuje jeszcze korzystniejszy profil toksyczności. Najczęstszym działaniem niepożądanym melfalanu, podobnie jak chemioterapii BEAM, jest toksyczność związana z uszkodzeniem błon śluzowych przewodu pokarmowego. W pracy o charakterze przeglądowym, w której podsumowano pięćdziesięcioletnią historię kondycjonowania melfalanem, powikłanie to w stopniu G3-G4 wystąpiło u 74% pacjentów, którzy otrzymali melfalan w dawce 200 mg/m², co wymagało stosowania narkotycznych leków przeciwbólowych u 5,5% chorych przez około 5 dni⁴³. Próby eskalacji dawki melfalanu dla uzyskania większej skuteczności autoPBSCT w PCM nie przyniosły pozytywnych rezultatów. Grupa francuska zastosowała melfalan w dawce 220 mg/m² u 27 chorych. Niestety toksyczne uszkodzenie błon śluzowych przewodu pokarmowego w stopniu G4 wystąpiło aż u 63% pacjentów. Ponadto obserwowano opóźnioną rekonstytucję megakariopoezy oraz zaburzenia rytmu serca pod postacią migotania przedsionków u 7% chorych, co ostatecznie przyczyniło się do zaniechania prób eskalacji dawki melfalanu powyżej 200 mg/m²⁴⁴. Z kolei redukcja dawki do 140 mg/m² ma miejsce zwykle u chorych po 70 roku życia, dializowanych oraz u tych, u których stężenie kreatyniny jest wyższe niż 2,0 mg/dl. W badaniu Aunera analizowano losy 1 964 pacjentów z PCM, którzy w latach 2008-2012 poddani byli autoPBSCT. Zastosowanie dawki 200 mg/m² lub zredukowanej do 140 mg/m² w wymienionych powyżej grupach chorych pozwoliło na utrzymanie niskiej NRM, która po roku od autotransplantacji wyniosła odpowiednio 1,3% po podaniu 140 mg/m² melfalanu oraz 0,9% po zastosowaniu standardowej dawki leku (200 mg/m²)⁴⁵. W pracy Aypar i wsp. ciężkie powikłania hepatotoksyczne i nefrotoksyczne wystąpiły odpowiednio u 0,9% i 1,2% pacjentów. Natomiast powikłania w stopniu G3-G4 w postaci infekcji, biegunek i zapalenie błony śluzowej przewodu pokarmowego były znacznie częstsze, ponieważ wystąpiły odpowiednio u 65%, 25% i 14% chorych⁴⁶.

W omawianym badaniu własnym gorączka neutropeniczna wystąpiła odpowiednio u 32,5% i 7,5% chorych na chłoniaki i szpiczaka plazmocytowego poddanych autoPBSCT w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu. Według danych literaturowych częstość FN po autotransplantacji zmniejsza się na przestrzeni lat, niezależnie od rodzaju

chemioterapii mieloablacyjnej. W 2008 roku Muchtar i wsp. przedstawili toksyczność i skuteczność autoPBSCT u pacjentów z PCM po 70 roku życia w porównaniu do wyników uzyskanych u młodszych chorych⁴⁷. Kohortę składającą się ze 144 pacjentów stanowiły osoby poddane autoPBSCT w dwóch przedziałach czasowych: w latach 1998-2006 oraz 2007-2015, po 72 osoby w każdej z grup wiekowych. FN wystąpiła łącznie u 70% badanych. Co istotne, częstość FN wyraźnie zmniejszyła się w latach 2007-2015, w porównaniu do kohorty leczonej w latach 1998-2006 (22,5% vs 48,2%, $p=0,001$) niezależnie od wieku badanych.

W omawianym badaniu własnym jednym z ważnych celów pracy było poszukiwanie związku między ekspresją wybranych miRNA a powikłaniami po autoPBSCT. U chorych, u których wystąpiły powikłania infekcyjne stwierdzono podwyższoną wyjściową ekspresję miR-122 już przed rozpoczęciem autoPBSCT. Opublikowane dotychczas badania dotyczące związku między ekspresją miR-122 a infekcjami dotyczyły zarówno modeli zwierzęcych, jak i ludzi. W badaniu prowadzonym na modelach zwierzęcych Wu i wsp. wykazali, iż po zakażeniu krwi u myszy o etiologii *Staphylococcus aureus* dochodziło do wzrostu ekspresji m.in. miR-122³⁶. Obserwacje te zostały także potwierdzone u chorych rozwijających sepsę w Oddziale Intensywnej Terapii. W badaniu prowadzonym przez grupę Wanga ekspresja miR-122 u pacjentów z sepsą zakończoną niepowodzeniem leczenia była trzykrotnie wyższa w porównaniu do chorych, u których leczenie było skuteczne i którzy przeżyli sepsę⁴⁸. W kolejnej pracy tego samego autora udowodniono, iż podwyższona wyjściowa ekspresja miR-122 może służyć jako wskaźnik śmiertelności w 28 dniu pobytu w Oddziale Intensywnej Terapii w grupie pacjentów z sepsą i ostrą niewydolnością oddechową⁴⁹.

W przedstawionej pracy własnej w grupie pacjentów z chłoniakami obserwowano istotną statystycznie korelację pomiędzy miR-122 a aktywnością AST i ALT. Ponadto wyjściowa ekspresja miR-122 i aktywność AST i ALT przed autoPBSCT były istotnie wyższe u chorych na chłoniaki w porównaniu do pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym. Można przypuszczać, że jest to skutkiem wcześniejszego stosowania bardziej hepatotoksycznej chemioterapii pierwszej i kolejnych linii u chorych na chłoniaki. Pomimo obserwowanej niskiej ogólnej toksyczności wątrobowej wydaje się, iż ocena ekspresji miR-122 jako wskaźnika uszkodzenia komórki wątrobowej może

mieć znaczenie predykcyjne wystąpienia hepatotoksyczności u pacjentów onkohematologicznych kwalifikowanych do chemioterapii obarczonych wysokim ryzykiem tego powikłania. Rola miR-122 jako biomarkera uszkodzenia komórki wątrobowej jest już względnie dobrze udokumentowana w literaturze naukowej. W hepatocytach ekspresja miR-122 jest kilka tysięcy razy wyższa niż w pozostałych tkankach. Należy podkreślić, że aż 72% całego ludzkiego miR-122 zgromadzone jest w wątrobie⁵⁰. W pracy Wang i wsp. przeprowadzono doświadczenie na zwierzętach, którym podano duże dawki acetaminofenu, wywołując w ten sposób niewydolność wątroby. Następnie oceniano aktywność transaminaz oraz określano, które z mikroRNA obecne są w surowicy i wykazują znaczenie predykcyjne w ocenie wczesnego uszkodzenia hepatocytów. Po ekspozycji na acetaminofen stwierdzono nadekspresję miR-122 w surowicy, przy malejącej ekspresji w tkance wątroby. Obserwowano też podwyższoną aktywność ALT, które dodatkowo korelowały z wysokością toksycznej dawki acetaminofenu⁵¹. Analogiczne wyniki przedstawił zespół kierowany przez Gill. Po ekspozycji na acetaminofen wzrost aktywności ALT opóźniony był o sześć godzin w stosunku do wzrostu ekspresji miR-122⁵². MiR-122 wpływa modulująco na aktywność enzymów w kompleksie cytochromu P450 i w ten sposób – zarówno w modelu mysim, jak i u ludzi – chroni komórki wątroby przed uszkodzeniem związanym z ekspozycją na acetaminofen⁵³.

W 2018 roku ukazała się ciekawa analiza Liu i wsp., w której porównano wyniki jedenastu badań z zastosowaniem miR-122 jako biomarkera toksyczności związanej z ekspozycją na leki (DILI, *Drug Induced Liver Injury*). Otóż stopień ekspresji miR-122 w DILI cechuje duża swoistość i czułość. Ekspresja miR-122 jest czulszym wskaźnikiem DILI niż aktywność transaminaz, fosfatazy alkalicznej czy stężenie bilirubiny. Wykazano także, iż na podstawie oceny ekspresji miR-122 można oszacować maksymalny wzrost aktywności ALT. W toku są prospektywne badania kliniczne, których celem jest ocena przydatności miR-122 jako biomarkera DILI⁵⁴.

Szczególnie ciekawe wydaje się doniesienie Roderburga, w którym udowodniono istotną różnicę w zwiększonej ekspresji miR-122 jako niezależnego od występowania infekcji czynnika rokowniczego uszkodzenia wątroby. Chcąc podsumować liczne dyskusje na temat podwyższonej ekspresji miR-122 w surowicy u pacjentów z infekcją oraz w grupie chorych z uszkodzeniem wątroby, przeanalizowano po raz kolejny profil

wydzielania miR-122 w modelach zwierzęcych i u ludzi. Potwierdzono korelację miR-122 z aktywnością AST i ALT, w obu modelach. W omawianej publikacji, w przeciwieństwie do wyników pracy Wanga na temat sepsy, nie stwierdzono zależności między ciężkością infekcji, śmiertelnością a ekspresją miR-122⁴⁹. Autorzy podkreślają także, iż dotychczas, poza hepatocytami, nie stwierdzono innego pochodzenia miR-122. Co więcej, na podstawie barwienia *in vitro* udowodniono przemieszczanie się miR-122 z uszkodzonych komórek wątrobowych do surowicy jako dowód na współistnienie uszkodzenia hepatocytów podczas ciężkiego zakażenia. Wyniki powyższych badań zaprzeczają pracom innych autorów, w których miR-122 przedstawiany jest jako biomarker infekcji⁵⁵. Teoria wydaje się też spójna z kolejnymi dwoma pracami Wanga. W pierwszej udowodniono zależność między podwyższoną ekspresją miR-122 a występowaniem zaburzeń krzepnięcia u pacjentów z sepsą przyjętych do Oddziału Intensywnej Terapii. Jednak równolegle potwierdzono istotną statystycznie dodatnią korelację między ekspresją miR-122 a aktywnością AST i ALT, czasem częściowej tromboplastyny po aktywacji i fibrynogenem oraz ujemną korelację z antytrombiną III. W dyskusji autorzy sugerują, iż zaburzenia krzepnięcia w sepsie mają związek m.in. z uszkodzeniem hepatocytów i zaburzeniami syntezy czynników krzepnięcia⁵⁶. Prawdopodobnie wysoka czułość i swoistość miR-122 przy uszkodzeniu hepatocytów stanowi początkowy element rozpoczynającej się niewydolności wielonarządowej. Stąd w licznych badaniach niezwiązanych bezpośrednio z uszkodzeniem komórki wątrobowej, ale prezentujących ekspresję mikroRNA u pacjentów w ciężkim stanie klinicznym, powielają się wyniki zwiększonej ekspresji miR-122.

Zgodnie z uzyskanymi wynikami w przedstawianej przeze mnie pracy, wyjściowe zwiększenie ekspresji miR-122 było znamienne wyższe w grupie wszystkich pacjentów, którzy rozwinęli infekcje. Obserwowano także korelację między ekspresją miR-122 a aktywnością ALT i AST, ale tylko w podgrupie pacjentów z chłoniakami. Prezentowane wyniki oraz opublikowane doniesienia naukowe wskazują, iż miR-122 może służyć jako wczesny predyktor uszkodzenia hepatocytów. Rola miR-122 jako biomarkera wystąpienia powikłań infekcyjnych wydaje się częściowo uzasadniona, niemniej wymaga dalszych badań, na przykład wnikliwej oceny, na ile synteza prozapalnych cytokin w wątrobie aktywuje równolegle te same szlaki przekaźników wewnątrzkomórkowych i w ten sposób wzrasta ekspresja miR-122, bez uszkodzenia hepatocytów. Co więcej funkcja

miR-122 jest dużo bardziej złożona. Nadekspresja tej cząsteczki jest istotna w rozpoznawaniu raka piersi, prostaty czy też płuc. W raku piersi wyniki przedstawione przez Li i wsp. sugerują, iż zwiększona ekspresja miR-122 w mikropęcherzykach surowicy predysponuje do przerzutów nowotworu. Badanie prowadzone było kilkunastu. W pierwszym etapie wyodrębniono 179 rodzajów mikroRNA, które stanowiły panel podstawowy zastosowany wśród kobiet z rakiem piersi oraz w grupie kontrolnej. Następnie, w poszczególnych podgrupach, analizowano ekspresję mikroRNA w mikromacierzach, oceniając która z konfiguracji w grupie pacjentek z nowotworem piersi, w stosunku do grupy kontrolnej, najbardziej różni się od siebie. W drugim etapie badania pobierano równocześnie surowicę i śródoperacyjnie materiał tkankowy z chorobowo zmienionych gruczołów piersiowych. W fazie przesiewowej badania zidentyfikowano 11 różnych rodzajów mikroRNA. Następnie podwojono liczbę uczestniczek badania. Ostatecznie, na podstawie dość licznej grupy (117 kobiet z rakiem piersi i tyle samo w grupie porównawczej), potwierdzono istotnie statystycznie zwiększoną ekspresję następujących mikroRNA: miR-122-5p, miR-146b-5p, miR-210-3p, miR-215-5p wśród pacjentek z nowotworem piersi. Natomiast ekspresja miR-7b-5p była istotnie obniżona. Co więcej, okazało się, że dodatkowo nadekspresja miR-122 może predysponować do przerzutów poprzez zmianę metabolizmu glukozy w potencjalnych niszach metastatycznych⁵⁷. Zwiększona ekspresja mikroRNA-122 była już wcześniej opisywana w przypadku przerzutów raka prostaty, okrężnicy czy niedrobnokomórkowego raka płuca⁵⁸.

W codziennej praktyce klinicznej, podczas kwalifikacji chorych do autoPBSCT, weryfikowane są wskazania do transplantacji oraz szacowane jest ryzyko wystąpienia powikłań okołoprzeszczepowych i NRM. Powszechnie uznanym narzędziem do oszacowania tego ryzyka jest wskaźnik chorób współistniejących HCT-CI, a u osób starszych także CIRSG. Sorrow, twórca HCT-CI, w 2018 roku opublikował dane na temat zależności między ekspresją wybranych mikroRNA, ocenianych wyjściowo przed allogenicznym przeszczepieniem krwiotwórczych komórek macierzystych, a wartością HCT-CI i śmiertelnością po transplantacji⁵⁹. Pośród badanych 654 rodzajów mikroRNA, osiem z nich (miR-374b, miR-454, miR-142-3p, miR-191, miR-424, miR-590-3p, miR-29c, miR-15b) charakteryzowało się istotną statystycznie korelacją z HCT-CI.

W prezentowanej pracy, u chorych na nowotwory układu chłonnego ekspresja miR-150, miR-155 i miR-210 wykazuje związek z liczbą i ciężkością chorób współistniejących. W publikacji Costineana miR-150 i miR-155 traktowane są jako kluczowe w rozwoju limfocytów B. MiR-150 ściśle powiązany jest z ekspresją białka c-Myc. Nadekspresja miR-150 zmniejsza jego ilość, co skutkuje zablokowaniem rozwoju limfocytów B na etapie pro-B. Z kolei delecja miR-150 powodowała ekspansję limfocytów typu B1 w otrzewnej oraz nadmierną produkcję immunoglobuliny IgA. Ekspresja miR-150 była wyższa w prawidłowych limfocytach B w porównaniu do pacjentów z chłoniakami³³. Powyższe obserwacje potwierdziły się także w prezentowanej pracy. W grupie kontrolnej wykazano istotnie statystycznie wyższą ekspresję miR-150, miR-155 w porównaniu do pacjentów z chłoniakami i ze szpiczakiem plazmocytowym. W przytoczonej publikacji miR-155, kodowany przez gen BIC (*B-cell Integration Cluster*), zaangażowany jest w dojrzewanie limfocytów B. Myszy, u których wyłączono gen BIC miały upośledzoną odporność humoralną i komórkową, która wyrażała się poprzez obniżoną liczbę limfocytów B w ośrodkach rozmnażania grudek chłonnych, obniżone stężenie immunoglobulin, upośledzoną prezentację antygeny przez komórki dendrytyczne, deficyt w zakresie aktywacji limfocytów T oraz produkcji komórek pamięci.

Nadekspresja miR-155 wiąże się z gorszym rokowaniem. Różnica w ekspresji miR-155 u pacjentów z DLBCL z podtypem ABC w porównaniu do podtypu GCB jest tak duża, iż autorzy sugerują oznaczanie miR-155 w celach diagnostycznych⁶⁰. W przewlekłej białaczce limfocytowej ekspresja miR-155 jest około pięć razy wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej³⁴.

W artykule pod przewodnictwem Lawrie porównywano wyjściową ekspresję miR-155, miR-210 i miR-21 u pacjentów z nowo rozpoznany chłoniakiem DLBCL. Okazało się wówczas, iż wyjściowo u chorych obserwuje się zwiększoną ekspresję powyższych trzech mikroRNA w porównaniu do zdrowych ochotników. Co więcej, miR-21 korelował z lepszym rokowaniem mierzonym czasem PFS⁶¹. Na podstawie moich wyników można przypuszczać, iż w trakcie indukcji chemioterapii następuje obniżenie ekspresji miR-155. Przed autoPBSCT w pobranych próbkach obserwowano niższą ekspresję miR-155 u chorych w porównaniu z grupą kontrolną. Niemniej wyraźnie w grupie gorzej rokującej, z wysokim HCT-CI, ponownie obserwowano wyższą ekspresję

miR-155. Poza nowotworami hematologicznymi, także nadekspresja miR-155 obserwowana u pacjentów z gruczolakorakiem płuc korelowała z krótszym czasem OS⁶².

W prezentowanej pracy w całej grupie badanej i grupie chorych na chłoniaki z wysokim i pośrednim HCT-CI obserwowano znamienne wyższą ekspresję miR-155 w porównaniu do grupy z niskim HCT-CI. Równocześnie nie stwierdzono różnicy w ekspresji mikroRNA w zależności od liczby wcześniejszych terapii czy odpowiedzi na leczenie uzyskanej przed kondycjonowaniem. W analizie Sorrora i wsp. dwuletnia NRM w grupie pośredniego i wysokiego ryzyka wynosiła od 21-41%, a w grupie niskiego ryzyka 14%²². Wynik uzyskany w prezentowanej pracy wymaga potwierdzenia w dalszej obserwacji OS wśród chorych poddanych wysokodawkowej chemioterapii i autoPBSCT w Klinice Hematologii we Wrocławiu.

Wśród pacjentów z Kliniki Hematologii stwierdzono wyższą ekspresję miR-210 w grupie pacjentów z chłoniakami i pośrednim lub wysokim HCT-CI. Nadekspresja miR-210 jest związana z niedotlenieniem komórki, koreluje z ekspresją czynnika HIF-alfa2 (HIF-2 α , *Hypoxia-inducible Factor*). MiR-210 okazał się przydatny jako biomarker w wielu nowotworach, m.in. w raku płaskonabłonkowym płuc.

W pracy Saby i wsp. zaprojektowano eksperyment na liniach komórkowych PCM. Za pomocą specyficznego sh-RNA (sh-RNA, *short hairpin RNA*) z wektorem lentiwirusowym w jednej grupie badanych wyłączono gen odpowiedzialny za produkcję HIF-1 α . Następnie materiał poddano izolacji za pomocą qRT-PCR, użyto sekwencji primerów celem amplifikacji m.in. następujących cząsteczek: HIF-1 α , miR-210, TGF- β (TGF- β , *Tumor Grow Factor*), interleukiny 6, Runx2, osteokalcyny i dehydrogenazy fosforanu gliceroaldehydu-3. MiR-210 zwany niekiedy hipoksymirem, związany jest z deplecją tlenu, przez co aktywuje liczne wewnątrzkomórkowe drogi sygnałowe. W warunkach normotlenowych oraz przy 5% stężeniu tlenu, nie obserwowano istotnie zwiększonej ekspresji miR-210. Natomiast przy obniżeniu stężenia tlenu do 1% obserwowano 10-krotny wzrost ekspresji miR-210 w porównaniu do grupy kontrolnej. Bardzo istotną obserwacją w opisywanej pracy jest zjawisko oporności na terapię melfalanem indukowane hipoksją oraz nadekspresją miR-210⁶³.

W innej pracy, Ren i wsp. udowodnili, iż zwiększona ekspresja miR-210 koreluje ze zwiększonym odsetkiem przerzutów do kości u chorych z rakiem prostaty poprzez stałą aktywację szlaku NFkappaB⁶⁴.

Co więcej, próby wykonywane na hodowlach tkankowych, w których „wyciszano” miR-210 sprawiały, iż dochodziło do zahamowania procesu różnicowania się tkanki nabłonkowej i mezenchymalnej podczas embriogenezy. W nowotworach proces ten sprzyja mobilności komórek, zmniejsza ich międzykomórkową adhezję i promuje procesy rozsiewu nowotworów litych¹³.

MiR-210 opisywany jest także jako biomarker wystąpienia ostrej niewydolności nerek. W 2011 roku Lorenzen opublikował wyniki badania, w których wśród 77 pacjentów z ostrą niewydolnością nerek, podwyższona ekspresja miR-210 w analizie wielowariantowej stanowiła niezależny czynnik śmiertelności w 28. dobie od incydentu wystąpienia ostrej niewydolności nerek⁶⁵. Zwiększoną ekspresję miR-210 stwierdzono u kobiet z rakiem piersi we wspomnianym wcześniej artykule Li i wsp.⁵⁷ Z kolei w doniesieniu Fongi potwierdzono, iż komórki nowotworowe wydzielają miR-210 i w ten sposób oddziałują na zmianę metabolizmu glukozy, co predysponuje do przerzutów w raku piersi⁶⁶. Podobne zjawisko związane z nadekspresją miR-210 w tkance kostnej, gdzie występowały przerzuty raka prostaty, potwierdził zespół pod kierownictwem Ren. Ekspresja miR-210 korelowała ze stężeniem antygenu gruczołu krokowego oraz zaawansowaniem raka prostaty⁶⁴.

Nadekspresja miR-210 w grupie pacjentów z wysokim i pośrednim HCT-CI stanowi atrakcyjny punkt wyjścia do dalszych badań.

Rozdział 6. Wnioski

1. U chorych na chłoniaki B komórkowe lub szpiczaka plazmocytozy poddanych wysokodawkowej chemioterapii wspomaganą autoPBSCT nie obserwuje się ciężkich powikłań narządowych we wczesnym okresie potransplantacyjnym, poza zapaleniem błony śluzowej przewodu pokarmowego. Częstym powikłaniem po autoPBSCT jest natomiast gorączka neutropeniczna i inne ciężkie powikłania infekcyjne, które występują u ponad połowy chorych na chłoniaki leczonych wysokodawkową chemioterapią według schematu BEAM oraz u około jednej czwartej chorych na szpiczaka plazmocytozy po podaniu wysokodawkowanego melfalanu.
2. Wysoka wyjściowa ekspresja miR-122 jest predyktorem wystąpienia powikłań infekcyjnych u chorych na nowotwory układu chłonnego po autoPBSCT.
3. Nasilenie ekspresji miR-122 wykazuje związek z laboratoryjnymi cechami uszkodzenia wątroby u chorych na nowotwory układu chłonnego.
4. U chorych na nowotwory układu chłonnego ekspresja miR-150, miR-155 i miR-210 wykazuje związek z chorobami współistniejącymi ocenianymi wskaźnikiem HCT-CI.

Streszczenie

MikroRNA to krótkie niekodujące fragmenty RNA, które wpływają na ekspresję genów po ich transkrypcji. Cząsteczki te zaangażowane są m.in. w apoptozę i metabolizm komórki, po uwolnieniu do krwi pozostają bardzo stabilne. Właściwość ta przyczyniła się do intensywnych badań nad mikroRNA jako biomarkerem infekcji, uszkodzenia komórki po ekspozycji na leki, w tym kardiotoxyczności, hepatotoksyczności i nefrotoksyczności.

W niniejszej analizie podjęto próbę określenia przydatności wybranych, krążących w krwi obwodowej mikroRNA w przewidywaniu powikłań infekcyjnych oraz toksyczności narządowej u pacjentów z nowotworami hematologicznymi, którzy otrzymali wysokodawkową chemioterapię wspomaganą przeszczepieniem autologicznych krwiotwórczych komórek macierzystych (autoPBSCT).

Grupę badaną stanowili chorzy, którzy otrzymali wysokodawkową chemioterapię wspomaganą autoPBSCT w latach 2017-2020 w Katedrze i Klinice Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu.

Do analizowanej grupy włączono 40 pacjentów z chłoniakami – w tym 13 mężczyzn, 27 kobiet, w wieku 21-67 (mediana 49) lat – oraz 40 chorych na szpiczaka plazmocytozy – w tym 22 mężczyzn, 18 kobiet, w wieku 37-67 (mediana 57) lat. Grupa porównawcza składała się z 25 ochotników, 13 mężczyzn, 12 kobiet, w wieku 18-69 (mediana 50) lat, bez chorób nowotworowych ani poważnych chorób współistniejących. U wszystkich włączonych do analizy chorych i ochotników pobrano próbki krwi do probówek RNAlater solution (Qiagen, Hilden, Germany) i przechowywano w -70°C celem wykonania badań RT-qPCR i ddPCR. Wyniki ekspresji mikroRNA porównywano między grupą chorych z i bez powikłań po wysokodawkowej chemioterapii. Dodatkowo, wynik ekspresji mikroRNA korelowano także z parametrami biochemicznymi i liczbą leukocytów rutynowo oznaczanymi podczas procedury autotransplantacji.

Pulę RNA izolowano z próbek krwi, używając zestawu Paxgene RNA Isolation Kit IVD (Qiagen). Następnie przeprowadzono łańcuchową reakcję polimerazy (PCR)

z wykorzystaniem kitu do odwrotnej transkrypcji firmy Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) zgodnie z instrukcją producenta. Zastosowano próbki dla specyficznego miRNA (hsa-miR-122-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-150-3p, hsa-miR-155-3p, hsa-miR-210-5p, hsa-miR423-5p, firmy TaqMan (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA). Ilościowe oznaczanie mikroRNA przeprowadzono, stosując metodę ddPCR firmy Bio-Rad zgodnie z załączoną instrukcją. Bezwzględna liczba mikroRNA była odczytywana jako liczba zdarzeń z zastosowaniem metod statystycznych – dyskretnego rozkładu prawdopodobieństwa Poissona. Ilościowa ocena mikroRNA w mieszaninie reakcji PCR przedstawiona jest ostatecznie jako liczba kopii produktu w mikrolitrze.

U chorych na chłoniaki, po kondycjonowaniu BEAM (karmustyna, etopozyd, cytarabina, melfalan) najczęściej obserwowanym powikłaniem były infekcje, które w stopniu G3-G4 i G2 stwierdzono odpowiednio u 30% (12/40) i 15% (6/40) chorych. Wśród infekcji dominowała biegunka, zapalenie płuc, a także zakażenie związane z cewnikiem naczyniowym. Gorączkę neutropeniczną odnotowano u 32,5% (13/40) pacjentów. Powikłania nieinfekcyjne wystąpiły łącznie u 27,5% (11/40) chorych, z czego 20% (8/40) stanowiło zapalenie błony śluzowej przewodu pokarmowego. U pacjentów ze szpiczakiem po podaniu wysokodawkowanego melfalanu dominował podobny profil powikłań, w niższym odsetku. Ciężkie infekcje w stopniu G3 występowały u 17,5% (7/40) pacjentów, a łagodne w stopniu G1-G2 u 25% (10/40) chorych. Odsetek pacjentów z gorączką neutropeniczną wyniósł jedynie 7,5% (3/40). Powikłania nieinfekcyjne wystąpiły łącznie u 42,5% (17/40) chorych, w tym 32,5% (13/40) stanowiło zapalenie błon śluzowych przewodu pokarmowego. Zarówno w grupie pacjentów z chłoniakami, jak i szpiczakiem plazmocytowym nie stwierdzono żadnych ciężkich powikłań narządowych ze strony nerek i wątroby.

W celu określenia znaczenia mikroRNA jako biomarkera wystąpienia powikłań związanych z wysokodawkową chemioterapią wspomaganą autoPBSCT, porównywano ich wyjściową ekspresję przed rozpoczęciem kondycjonowania w grupie chorych z powikłaniami i bez powikłań. W całej badanej grupie pacjentów oraz u chorych na szpiczaka plazmocytowego, u których wystąpiły powikłania infekcyjne G1-G4 lub gorączka neutropeniczna, obserwowano wyższą ekspresję miR-122 w porównaniu z grupą bez powikłań ($p=0,01$; $p=0,013$). W analizie przeprowadzonej w całej badanej grupie oraz u chorych na chłoniaki wykazano także korelację pomiędzy wyjściową

ekspresją miR-122 i wyjściową aktywnością transaminazy asparaginianowej ($p=0,009$ i $p=0,041$) i transaminazy alaninowej ($p=0,001$ i $p=0,012$).

Ponadto stwierdzono istotną statystycznie zależność między medianą miR-150, miR-155 i miR-210 w grupach pacjentów stratyfikowanych według HCT-CI. U pacjentów z wysokim i pośrednim HCT-CI stwierdzono wyższą ekspresję miR-155 ($p=0,001$), w grupie chorych na chłoniaki także podwyższoną ekspresję miR-210 ($p=0,018$), natomiast u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym obniżoną ekspresję miR-150 ($p<0,001$).

Podsumowując, po zastosowaniu wysokodawkowej chemioterapii wspomaganej autoPBSCT obserwowano niską toksyczność narządową. Przedstawione badania potwierdzają przydatność miR-122 jako biomarkera wystąpienia powikłań infekcyjnych w całej badanej grupie. Dodatkowo nasilenie ekspresji miR-122 wykazuje związek z parametrami uszkodzenia komórki wątrobowej po chemioterapii. Wyjściowa ekspresja miR-150, miR-155 i miR-210 korelowała natomiast z liczbą i ciężkością chorób współistniejących.

Abstract

Title:

Evaluation of the selected microRNA as biomarkers of early toxicity resulting from high dose chemotherapy followed by autoPBSCT in patients with B-cell lymphoproliferative disorders

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs that modulate the expression of genes at the posttranscriptional level. These molecules have been shown to be involved in apoptosis and cell metabolism. MicroRNAs are released into blood in a remarkably stable form. This feature led to a vigorous exploration of microRNA as infectious biomarkers, drug-induced toxicity including cardiotoxicity, hepatotoxicity and nephrotoxicity.

This analysis attempts to determine whether some selected microRNAs circulating in the blood are useful in predicting infectious complications and organ toxicity in patients with hematological malignancies who underwent high dose chemotherapy followed autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation (autoPBSCT).

The study group consisted of patients, who underwent high dose chemotherapy followed autoPBSCT in the years 2017-2020 in the Department of Hematology, Blood Neoplasms and Bone Marrow Transplantation of University Clinical Hospital in Wrocław. The study included 40 patients - 13 male, 27 female - diagnosed with a lymphoma; the age of patients with autoPBSCT between 21-67 (median 49) years and 40 patients with multiple myeloma - 22 males, 18 females - the age between 37-67 (median 57) years. The control group consisted of 25 volunteers - 13 males, 12 females - aged between 18-69 (median 50) years, without neoplasms and severe comorbidities.

In all of the patients and volunteers included in the analysis, blood samples were collected into RNAlater solution (Qiagen, Hilden, Germany) and stored at -70°C for RT-qPCR and ddPCR experiments. The results of microRNA expression were compared between patients who experienced side effects of high dose chemotherapy and the ones who did not. In addition, the correlation between the value of microRNA expression,

biochemical parameters and leucocytes count routinely taken during autotransplant procedures was assessed.

Total RNA was isolated from the blood samples with the use of the Paxgene RNA Isolation Kit IVD (Qiagen). Next, Polymerase Chain Reaction was performed (PCR) by means of the Reverse Transcriptase kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according in the manufacturer's protocol. The specific probes used in the experiment (hsa-miR-122-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-150-3p, hsa-miR-155-3p, hsa-miR-210-5p, hsa-miR423-5p) were also obtained from TaqMan (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA). MicroRNA was quantified using Droplet Digital PCR (ddPCR) (Bio-Rad) according with the manufacturer's protocol. Finally, the plate was loaded onto a Droplet Reader (Bio-Rad) and read automatically. The absolute quantification of each miRNA was calculated basing on the number of positive counts per panel by using the Poisson distribution. The quantification of the target miRNAs is presented as the number of copies/ μ l in the PCR reaction mixture.

The most frequent side effects in patients with lymphoma after BEAM (carmustine, etoposide, cytarabine, melphalan) conditioning were infections – G2 and G3-G3 were observed in 30% (12/40) and 15% (6/40) patients respectively. Diarrhoea, pneumonia as well as catheter related infections were predominant. Neutropenic fever occurred in 32,5% (13/40) of patients. Non- infectious side effects were present in 27,5% (11/40) of patients, with mucositis of digestive tract in 20% (8/40). In patients with multiple myeloma after high dose melphalan therapy the same type of side effects were observed with lower frequency. Severe infections G3 were present in 17,5% (7/40) and moderate G1-G2 in 25% (10/40) of patients. Only 7,5% (3/40) of patients suffered from neutropenic fever. From total of 42,5% (17/40) non-infectious side effect, mucositis of digestive tract was dominant 32,5% (13/40). Neither nephrotoxicity nor hepatotoxicity were observed in any analysed subjects.

To assess the efficacy of microRNA as a biomarker of side effects after high dose chemotherapy followed by autoPBSCT, we compared the expression of microRNA before conditioning between the group with or without complications. The expression of miR-122 was higher in all patients and subjects with multiple myeloma who demonstrated infections G1-G4 or neutropenic fever ($p=0,01$; $p=0,013$). In addition, In all subjects and in lymphoma patients the correlation between the expression of miR-

122 and the aspartate transaminase ($p=0,009$; $p=0,041$) as well as alanine transaminase ($p=0,001$; $p=0,012$) was sought.

Moreover, the statistically significant correlation was proven between the median expression of miR-150, miR-155, miR-210 and the patients stratified in accordance with to Hematopoetic Stem Cell Transplantation Comorbidity Index (HCT-CI). The subjects with high and intermediate HCT-CI presented higher expression of miR-155 ($p=0,001$); the lymphoma patients additionally displayed a higher expression of miR-210 ($p=0,018$) while in the multiple myelomas group a lower expression of miR-150 was proven ($p<0,001$).

In conclusion, the organ toxicity resulting from high dose of chemotherapy followed by autoPBSCT was low. The obtained results confirm the expediency of miR-122 as a biomarker of infectious complications in all of the study group. In addition, the relationship between the observed higher expression of miR-122 and transaminases levels was confirmed. The expression of miR-150, miR-155 and miR-210 before conditioning was related to quantity and severity of comorbidities.

Bibliografia

1. Korbling M, Dorken B, Ho AD, Pezzutto A, Hunstein W, Fliedner TM. Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood*. 1986;67(2):529-532. <https://ashpublications.org/blood/article/67/2/529/108565/Autologous-transplantation-of-bloodderived>.
2. Körbling M, Freireich EJ. Twenty-five years of peripheral blood stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117(24):6411-6416. doi:10.1182/blood-2010-12-322214.
3. Richman C, Weiner R, Yankee R. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood*. 1976;47(6):1031-1039. doi:10.1182/blood.V47.6.1031.1031.
4. Gertz MA, Kumar SK, Lacy MQ, et al. Comparison of high-dose CY and growth factor with growth factor alone for mobilization of stem cells for transplantation in patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*. 2009;43(8):619-625. doi:10.1038/bmt.2008.369.
5. 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(7):865-872. doi:10.1038/bmt.2014.39.
6. Pavone V, Gaudio F, Guarini A, et al. Mobilization of peripheral blood stem cells with high-dose cyclophosphamide or the DHAP regimen plus G-CSF in non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant*. 2002;29(4):285-290. doi:10.1038/sj.bmt.1703364.
7. Giebel S, Kruzel T, Czerw T, et al. Intermediate-dose Ara-C plus G-CSF for stem cell mobilization in patients with lymphoid malignancies, including predicted poor mobilizers. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(7):915-921. doi:10.1038/bmt.2012.269.
8. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-2390. doi:10.1182/blood-2016-01-643569.
9. Prochorec-Sobieszek M. Klasyfikacja WHO 2016 chłoniaków z komórek B – ważne zmiany. *Hematologia*. 2017;7(4):261-272. doi:10.5603/Hem.2016.0025.
10. Zucca E, Roggero E, Pinotti G, et al. Patterns of survival in mantle cell lymphoma. *Ann Oncol*. 1995;6(3):257-262. doi:10.1093/oxfordjournals.annonc.a059155.
11. Shipp M. Prognostic factors in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: who has "high-risk" disease? *Blood*. 1994;83(5):1165-1173. doi:10.1182/blood.V83.5.1165.1165.
12. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2007;109(5):1857-1861. doi:10.1182/blood-2006-08-038257.
13. Dufour C. *The EBMT Handbook*.; 2019. doi:10.1007/978-3-030-02278-5.
14. Schmitz N, Pfistner B, Sextro M, et al. Aggressive conventional chemotherapy compared with high-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stem-cell

- transplantation for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease: A randomised trial. *Lancet*. 2002;359(9323):2065-2071. doi:10.1016/S0140-6736(02)08938-9.
15. Sureda A, Bader P, Cesaro S, et al. Indications for allo- and auto-SCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: Current practice in Europe, 2015. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50(8):1037-1056. doi:10.1038/bmt.2015.6.
 16. Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017;28(April):iv52-iv61. doi:10.1093/annonc/mdx096.
 17. Kumar SK, Buadi FK, Vincent Rajkumar S. Pros and cons of frontline autologous transplant in multiple myeloma: The debate over timing. *Blood*. 2019;133(7):652-659. doi:10.1182/blood-2018-08-825349.
 18. Rosenberg AS, Brunson A, Jonas BA, Keegan THM, Wun T. Association between autologous stem cell transplant and survival among californians with multiple myeloma. *J Natl Cancer Inst*. 2019;111(1):78-85. doi:10.1093/jnci/djy073.
 19. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2020;95(5):548-567. doi:10.1002/ajh.25791.
 20. *Poltransplant*. Biuletyn Informacyjny Poltransplantu 1 (29) 2020. Vol 29.; 2020.
 21. Wildes TM, Augustin KM, Sempek D, et al. Comorbidities, Not Age, Impact Outcomes in Autologous Stem Cell Transplant for Relapsed Non-Hodgkin Lymphoma. 2008;846:840-846. doi:10.1016/j.bbmt.2008.05.002.
 22. Sorrow ML, Maris MB, Storb R, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood*. 2005;106(8):2912-2919. doi:10.1182/blood-2005-05-2004.
 23. Miller MD, Paradis CF, Houck PR, et al. Rating chronic medical illness burden in geropsychiatric practice and research: Application of the Cumulative Illness Rating Scale. *Psychiatry Res*. 1992;41(3):237-248. doi:10.1016/0165-1781(92)90005-N.
 24. Robak T, Warzocha K. *Hematologia*. Grupa Via Medica; 2016.
 25. Common Terminology Criteria for Adverse Events. Definitions. 2020. doi:10.32388/erjxiq.
 26. Dumache R, Rogobete AF, Bedreag OH, et al. Use of miRNAs as Biomarkers in Sepsis. *Anal Cell Pathol*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/186716.
 27. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(30):10513-10518. doi:10.1073/pnas.0804549105.
 28. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. MiRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D155-D162. doi:10.1093/nar/gky1141.
 29. Bartel DP. Review Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 2018;173(1):20-51. doi:10.1016/j.cell.2018.03.006.
 30. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, et al. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2006;120(5):1046-1054. doi:10.1002/ijc.22394.
 31. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005;120(5):635-647. doi:10.1016/j.cell.2005.01.014.
 32. Bandrés E, Cubedo E, Agirre X, et al. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer*. 2006;5:1-10. doi:10.1186/1476-4598-5-29.

33. Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in Eμ-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(18):7024-7029. doi:10.1073/pnas.0602266103.
34. Fulci V, Chiaretti S, Goldoni M, et al. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007;109(11):4944-4951. doi:10.1182/blood-2006-12-062398.
35. Khare D, Goldschmidt N, Bardugo A, Gur-Wahnon D, Ben-Dov IZ, Avni B. Plasma microRNA profiling: Exploring better biomarkers for lymphoma surveillance. *PLoS One*. 2017;12(11):1-18. doi:10.1371/journal.pone.0187722.
36. Wu SC, Yang JCS, Rau CS, et al. Profiling circulating microRNA expression in experimental sepsis using cecal ligation and puncture. *PLoS One*. 2013;8(10). doi:10.1371/journal.pone.0077936.
37. Krmpotic A, Ra B, Lisnic VJ. Degradation of Cellular miR-27 by a Novel , Highly Abundant Viral Transcript Is Important for Efficient Virus Replication In Vivo. 2012;8(2). doi:10.1371/journal.ppat.1002510.
38. Cazalla D, Yario T, Steitz JA. Down-Regulation of a Host MicroRNA by a Herpesvirus saimiri Noncoding RNA. 2010;328(5985):1563-1566.
39. Trobaugh DW, Klimstra WB. MicroRNA Regulation of RNA Virus Replication and Pathogenesis. *Trends Mol Med*. 2017;23(1):80-93. doi:10.1016/j.molmed.2016.11.003.
40. Va L, Vidriales B, Rocha E, et al. BEAM chemotherapy followed by autologous stem cell support in lymphoma patients: analysis of efficacy, toxicity and prognostic factors. 1997:451-458.
41. Esbah O, Tekgündüz E, Şirinoğlu Demiriz I, et al. Finding the Optimal Conditioning Regimen for Relapsed/Refractory Lymphoma Patients Undergoing Autologous Hematopoietic Cell Transplantation: A Retrospective Comparison of BEAM and High-Dose ICE. *Turkish J Hematol*. 2016;33(3):209-215. doi:10.4274/tjh.2014.0214.
42. Kothari J, Foley M, Peggs KS, et al. A retrospective comparison of toxicity and initial efficacy of two autologous stem cell transplant conditioning regimens for relapsed lymphoma: LEAM and BEAM. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51(10):1397-1399. doi:10.1038/bmt.2016.134.
43. Bayraktar UD, Bashir Q, Qazilbash M, Champlin RE, Ciurea SO. Fifty Years of Melphalan Use in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(3):344-356. doi:10.1016/j.bbmt.2012.08.011.
44. Moreau P, Milpied N, Mahé B, et al. Melphalan 220 mg/m² followed by peripheral blood stem cell transplantation in 27 patients with advanced multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*. 1999;23(10):1003-1006. doi:10.1038/sj.bmt.1701763.
45. Auner HW, Iacobelli S, Sbianchi G, et al. Melphalan 140 mg/m² or 200 mg/m² for autologous transplantation in myeloma: Results from the collaboration to collect autologous transplant outcomes in Lymphoma and Myeloma (CALM) study. A report by the EBMT chronic malignancies working party. *Haematologica*. 2018;103(3):514-521. doi:10.3324/haematol.2017.181339.
46. Aypar E, İzzettin FV, Akı ŞZ, Sancar M, Yeğin ZA, Türköz-Sucak G. Comparison of conditioning regimen toxicities among autologous stem cell transplantation eligible multiple myeloma patients: High-dose melphalan versus high-dose melphalan and

- bortezomib. *J Oncol Pharm Pract.* 2018;24(4):281-289. doi:10.1177/1078155217697486.
47. Muchtar E, Dingli D, Kumar S, et al. Autologous stem cell transplant for multiple myeloma patients 70 years or older. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(11):1449-1455. doi:10.1038/bmt.2016.174.
 48. Wang H, Zhang P, Chen W, Feng D, Jia Y, Xie L. Serum microRNA signatures identified by Solexa sequencing predict sepsis patients' mortality: A prospective observational study. *PLoS One.* 2012;7(6):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0038885.
 49. Wang H, Yu B, Deng J, Jin Y, Xie L. Serum miR-122 correlates with short-term mortality in sepsis patients. *Crit Care.* 2014;18(1):1-4. doi:10.1186/s13054-014-0704-9.
 50. Wang W, Shi Q, Mattes WB, Mendrick DL, Yang X. Translating extracellular microRNA into clinical biomarkers for drug-induced toxicity: From high-throughput profiling to validation. *Biomark Med.* 2015;9(11):1177-1188. doi:10.2217/bmm.15.86.
 51. Wang K, Zhang S, Marzolf B, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(11):4402-4407. doi:10.1073/pnas.0813371106.
 52. Gill P, Bhattacharyya S, McCullough S, et al. MicroRNA regulation of CYP 1A2, CYP3A4 and CYP2E1 expression in acetaminophen toxicity. *Sci Rep.* 2017;7(1):12331. doi:10.1038/s41598-017-11811-y.
 53. Chowdhary V, Teng K yu, Thakral S, et al. miRNA-122 Protects Mice and Human Hepatocytes from Acetaminophen Toxicity by Regulating Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 2 and Family 2 Subfamily E Member 1 Expression. *Am J Pathol.* 2017;187(12):2758-2774. doi:10.1016/j.ajpath.2017.08.026.
 54. Liu Y, Li P, Liu L, Zhang Y. The diagnostic role of miR-122 in drug-induced liver injury. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(49):e13478. doi:10.1097/ md.00000000000013478.
 55. Roderburg C, Benz F, Vargas Cardenas D, et al. Elevated miR-122 serum levels are an independent marker of liver injury in inflammatory diseases. *Liver Int.* 2015;35(4):1172-1184. doi:10.1111/liv.12627.
 56. Wang HJ, Deng J, Wang JY, et al. Serum miR-122 levels are related to coagulation disorders in sepsis patients. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(6):927-933. doi:10.1515/cclm-2013-0899.
 57. Li M, Zou X, Xia T, et al. A five-miRNA panel in plasma was identified for breast cancer diagnosis. *Cancer Med.* 2019;8(16):7006-7017. doi:10.1002/cam4.2572.
 58. Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2011;80(2):193-208. doi:10.1016/j.critrevonc.2010.11.004.
 59. Sorrow ML, Gooley TA, Maclean KH, et al. Pre-transplant expressions of microRNAs, comorbidities, and post-transplant mortality. *Bone Marrow Transplant.* 2019;54(7):973-979. doi:10.1038/s41409-018-0352-9.
 60. Rai D, Karanti S, Jung I, Dahia PLM, Aguiar RCT. Coordinated expression of microRNA-155 and predicted target genes in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008;181(1):8-15. doi:10.1016/ j.cancergencyto.2007.10.008.

61. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2008;141(5):672-675. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07.077.
62. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* 2006;9(3):189-198. doi:10.1016/j.ccr.2006.01.025.
63. Saba F, Soleimani M, Abroun S. New role of hypoxia in pathophysiology of multiple myeloma through miR-210. *EXCLI J.* 2018;17:647-662. doi:10.17179/excli2018-1109.
64. Ren D, Yang Q, Dai Y, et al. Oncogenic miR-210-3p promotes prostate cancer cell EMT and bone metastasis via NF-KB signaling pathway. *Mol Cancer.* 2017;16(1):1-16. doi:10.1186/s12943-017-0688-6.
65. Lorenzen JM, Kielstein JT, Hafer C, et al. Circulating miR-210 predicts survival in critically ill patients with acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6(7):1540-1546. doi:10.2215/CJN.00430111.
66. Fong MY, Zhou W, Liu L, et al. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat Cell Biol.* 2015;17(2):183-194. doi:10.1038/ncb3094.

Wykaz tabel

Tabela 1. Toksyczność wg CTCAE v5.0	18
Tabela 2. Charakterystyka pacjentów z nowotworami układu chłonnego z dojrzałych limfocytów B.....	24
Tabela 3. Charakterystyka pacjentów z PCM.....	26
Tabela 4. Nasilenie powikłań infekcyjnych i nieinfekcyjnych według CTCAE v5.0 u pacjentów z chłoniakami po kondycjonowaniu BEAM	31
Tabela 5. Rodzaj powikłań infekcyjnych u pacjentów z chłoniakami po kondycjonowaniu BEAM	31
Tabela 6. Rodzaj powikłań nieinfekcyjnych u pacjentów z chłoniakami po kondycjonowaniu BEAM	31
Tabela 7. Ocena aktywności transaminaz i stężenia kreatyniny u pacjentów z chłoniakami w okresie przed i po kondycjonowaniu BEAM.....	32
Tabela 8. Nasilenie powikłań infekcyjnych i nieinfekcyjnych według CTCAE v5.0 u chorych na szpiczaka plazmocytozowego po kondycjonowaniu wysokodawkowym melfalanem.....	33
Tabela 9. Rodzaj powikłań infekcyjnych u chorych na szpiczaka plazmocytozowego po kondycjonowaniu wysokodawkowym melfalanem	33
Tabela 10. Rodzaj powikłań nieinfekcyjnych u chorych na szpiczaka plazmocytozowego po kondycjonowaniu wysokodawkowym melfalanem	34
Tabela 11. Ocena aktywności transaminaz i stężenia kreatyniny u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytozowym w okresie przed i po kondycjonowaniu wysokodawkowym melfalanem.....	34
Tabela 12. Wyjściowa ekspresja mikroRNA w grupie pacjentów z chłoniakami, szpiczakiem plazmocytozowym i w grupie kontrolnej	35
Tabela 13. Porównanie ekspresji miR-122 w grupie pacjentów z powikłaniami infekcyjnymi G1-G4 lub FN i bez powikłań.....	36
Tabela 14. Mediana miR-210 w grupie pacjentów z i bez powikłań w stopniu G1-G2 ..	38
Tabela 15. Korelacja liczby leukocytów z miR-150 przed kondycjonowaniem	41
Tabela 16. Korelacja między aktywnością AST i ALT a ekspresją miR-122 przed kondycjonowaniem	41
Tabela 17. Wyjściowa ekspresja miR-150, miR-155 i miR-210 a grupy ryzyka według HCT-CI	42

Wykaz rycin

Rycina 1. Biogeneza mikroRNA	19
Rycina 2. Wyjściowa ekspresja miR-122 w całej badanej grupie u pacjentów z infekcjami w stopniu G1-G4 lub FN i bez powikłań infekcyjnych i FN	36
Rycina 3. Wyjściowa ekspresja miR-122 w grupie pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym i infekcjami w stopniu G1-G4 lub FN i bez powikłań infekcyjnych i FN.....	37
Rycina 4. Wyjściowa ekspresja miR-210 w grupie pacjentów z chłoniakami i powikłaniami infekcyjnymi w stopniu G1-G2 i bez powikłań infekcyjnych	38
Rycina 5. Wyjściowa ekspresja miR-210 w całej grupie badanej z powikłaniami nieinfekcyjnymi w stopniu G1-G2 i bez powikłań nieinfekcyjnych	39
Rycina 6. Wyjściowa ekspresja miR-210 w grupie pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym i powikłaniami nieinfekcyjnymi w stopniu G1-G2 i bez powikłań nieinfekcyjnych.....	40