

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Miglė Janeliūnienė

SERGANČIŲJŲ ŪMINE LEUKEMIJA ABERANTINIŲ FENOTIPŲ IR
DAUGINIO ATSPARUMO VAISTAMS NUSTATYMAS IR SVARBA
VERTINANT MINIMALIOS LIEKAMOSIOS LIGOS DINAMIKĄ

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, medicina (06 B)

Vilnius, 2012

Disertacija rengta 2004 – 2011 metais Vilniaus Universitete, Medicinos fakulteto Fiziologijos, biochemijos ir laboratorinės medicinos katedroje

Mokslinis vadovas:

Prof. habil. dr. Zita Aušrelė Kučinskienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

Mokslinis konsultantas:

Prof. dr. Laimonas Griškevičius (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

Turinys

Santrumpos.....	4
1. Įvadas.....	6
1.1. Problemos aktualumas.....	6
1.2. Darbo tikslas.....	13
1.3. Darbo uždaviniai.....	13
1.4. Ginamieji teiginiai	14
1.5. Darbo mokslinis naujumas.....	14
2. Literatūros apžvalga.....	15
2.1. Ūminės leukemijos: klinika, etiologija, patogenezė.....	15
2.2. Ūminių leukemijų diagnostikos raida.....	19
2.3. Tėkmės citometrija, jos taikymas tiriant ūmines leukemijas... 22	
2.3.1. Tėkmės citometrijos principai.....	22
2.3.2. Tėkmės citometrijos metodo taikymas tiriant ūmines leukemijas.....	25
2.4. Ūminių leukemijų eigos prognozavimas.....	26
2.4.1. ŪML prognoziniai veiksniai.....	26
2.4.2. ŪLL prognoziniai veiksniai.....	28
2.4.3. Tėkmės citometrinių tyrimų svarba, prognozuojant ūminių leukemijų eigą.....	29
2.4.3.1. Su leukemija susiję aberantiniai fenotipai..	30
2.4.3.2. Minimali liekamoji liga.....	34
2.4.3.3. Dauginis atsparumas vaistams.....	41
3. Tyrimo medžiaga ir metodai.....	47
3.1. Tyrimo sumanymas.....	47
3.2. Tiriamieji.....	48
3.3. Tyrimo metodai.....	49
3.3.1. Leukemijų diagnostika ir aberantinių fenotipų tyrimas	50
3.3.2. Minimalios liekamosios ligos tyrimas.....	54
3.3.3. Blastų dauginio atsparumo vaistams tyrimas.....	57

3.4. Statistinė analizė.....	60
4. Tyrimo rezultatai.....	60
4.1. Tiriamųjų charakteristikos.....	60
4.2. Su leukemija susijusių fenotipų paplitimas.....	61
4.3. Minimalios liekamosios ligos tyrimo optimizavimas.....	65
4.3.1. Žymenų derinių parinkimas.....	65
4.3.2. Mėginių paruošimo technikos parinkimas.....	67
4.3.3. Duomenų analizės sistema.....	70
4.3.4. Sveikų asmenų kaulų čiulpų tyrimas.....	74
4.3.5. Aberantinių fenotipų stabilumo tyrimas.....	78
4.4. Su leukemija susijusių fenotipų įtaka minimalios liekamosios ligos dinamikai.....	80
4.5. Dauginio atsparumo vaistams tyrimo optimizavimas.....	87
4.5.1. Sveikų asmenų DAV rodiklių tyrimas.....	87
4.5.2. Struktūrinių ir funkcinių DAV rodiklių koreliacija.....	90
4.5.3. Ūminės leukemijos potipių DAV rodiklių skirtumai...	91
4.6. Su leukemija susijusių fenotipų įtaka DAV rodikliams.....	93
4.7. DAV rodiklių ryšys su minimalios liekamosios ligos dinamika.....	94
5. Rezultatų aptarimas.....	95
5.1. Su leukemija susiję aberantiniai fenotipai.....	95
5.2. Minimali liekamoji liga.....	100
5.3. Dauginis atsparumas vaistams.....	105
6. Išvados.....	108
7. Praktinės rekomendacijos.....	109
8. Padėka.....	111
9. Disertacijos tema paskelbtų darbų sąrašas.....	112
10. Literatūros sąrašas.....	113

Santrumpos

APC – alofikocianinas

BCRP – krūties vėžio atsparumo baltymas (angl. *breast cancer resistance protein*)

B-ŪLL – ūminė B-limfoblastinė leukemija

CD – diferenciacijos grupė (angl. *cluster of differentiation*), tai ląstelių paviršiaus žymenys, atpažįstami specifinių monokloninių antikūnų ir naudojami ląstelėms identifikuoti, jų diferenciacijai ir aktyvumui vertinti

CNS – centrinė nervų sistema

DAV – dauginis atsparumas vaistams

DNR – deoksiribonukleo rūgštis

FAB klasifikacija – Prancūzijos, JAV ir Didžiosios Britanijos (angl. *French – American – British*) jungtinės mokslininkų grupės 1976 m. parengta ūminių leukemijų klasifikacija

FITC – fluoresceino izotiocianatas

LRP – plaučių atsparumo baltymas (angl. *lung resistance protein*)

LSAF – su leukemija susijęs aberantinis fenotipas

MDS – mielodisfazinis sindromas

MIC – ūminių leukemijų klasifikacija, paremta morfologinėmis, imunologinėmis ir citocheminėmis ląstelių savybėmis

MiLL – mišrios linijos leukemija

MLL – minimali liekamoji liga

MPO – mieloperoksidazė

MRP1 – su dauginiu atsparumu vaistams susijęs baltymas 1 (angl. *multidrug resistance protein 1*)

mRNR – matricinė RNR

NK ląstelės – limfocitai, suardantys svetimąs ląsteles be išankstinės sensibilizacijos (angl. *natural killer cells*)

PBS – fosfatinis buferinis tirpalas (angl. *phosphate buffered saline*)

PE - fikoeritrinas

PerCP – peridinino chlorofilo baltymas
p-gp – pralaidumo glikoproteinas (angl. *permeability glycoprotein*)
PGR – polimerazės grandininė reakcija
PSO – pasaulinė sveikatos organizacija
RNR – ribonukleo rūgštis
TdT – terminalinė deoksinukleotidil transferazė
T-ŪLL – ūminė T-limfoblastinė leukemija
ŪL – ūminė leukemija
ŪLL – ūminė limfoblastinė leukemija
ŪML – ūminė mielogeninė leukemija
ŪML/MD – ūminė mielogeninė leukemija su minimalia diferenciacija
ŪML/BB – ūminė mielogeninė leukemija be brendimo požymių
ŪML/SB – ūminė mielogeninė leukemija su brendimo požymiais
ŪMmoL – ūminė mielomonocitinė leukemija
ŪMoL – ūminė monoblastinė leukemia
ŪML/MDS – ūminė mielogeninė leukemija su mielodisplazijos požymiais
ŽLA – žmogaus leukocitų antigenai

1. Įvadas

Quod medicina aliis, aliis est acre venenum

Kas vienam vaistas, kitam yra nuodas
(Senovės romėnų patarlė)

1.1. Problemos aktualumas

Ūminė leukemija – tai kraujodaros sistemos neoplazma, pasireiškianti nekontroliuojamu jaunų kraujodaros ląstelių (blastų) dauginimusi kaulų čiulpuose ir kraujyje. Tai heterogeniška ligų grupė, kuriai būdinga ūmi ligos eiga ir normalios kraujodaros užslopinimo sukeliama klinikiniai požymiai. Ūminės leukemijos skirstomos į dvi pagrindines grupes - ūminės mielogeninės (ŪML) ir ūminės limfoblastinės leukemijas (ŪLL) [1, 2]. Remiantis JAV nacionalinio vėžio instituto duomenimis, ūmine mielogenine leukemija, kuri yra labiausiai paplitusi ūminės leukemijos forma suaugusiųjų populiacijoje, 2004 – 2008 m. kasmet susirgo 3,5 iš 100 000 JAV gyventojų. Mirštamumas nuo šios ligos siekė 2,8 iš 100 000. Bendras sergančiųjų penkerių metų išgyvenamumas (angl. *overall survival*) 2001 – 2007 m. buvo 22,6%. Sergamumas ūmine limfoblastine leukemija, labiausiai paplitusia vaikų piktybine liga, 2004 – 2008 m. buvo 1,7 iš 100 000, o mirštamumas – 0,5 iš 100 000 JAV gyventojų. Bendras sergančiųjų ŪLL penkerių metų išgyvenamumas 2001 – 2007 m. buvo 64,4%. Vaikų amžiuje šis rodiklis dar didesnis ir paprastai viršija 85% [3, 4].

Iki pat XX a. vidurio nebuvo jokio patogenezinio ūminių leukemijų gydymo. Ir tik 1940 m. pradėti naudoti pirmieji chemoterapiniai vaistai. 1948 m. S. Farber aprašė ūmine leukemija sirgusio vaiko, gydyto folio rūgšties antagonistu aminopterinu, laikiną remisiją [5]. Neilgai trukus buvo pastebėta, kad remisiją galima pasiekti ir skiriant steroidų preparatus [6]. Vis tik didžiausias proveržis gydant ūmines leukemijas, o ypač ŪLL, įvyko 1960 m., kuomet buvo pritaikyta kombinuota skirtingo veikimo mechanizmo vaistų

chemoterapija. Panaudojus vinkristiną, prednizoloną, L-asparaginazę gydymo indukcijai, o 6-merkaptopuriną ir metotreksatą palaikomajam gydymui, tapo įmanomas visiškas sergančiųjų ūminėmis leukemijomis pasveikimas [7]. Analogiškas gydymo modelis taikomas iki šiol. Vinkristino, kortikosteroidų preparatų ir asparaginazės, o kartais dar ir vieno iš antraciklinų derinys skiriamas gydymo pradžioje. Pasiekus klinikinę ir morfoliginę remisiją, gydymo konsolidacijai keletą mėnesių taikoma viena iš galimų gydymo schemų, į kurias įeina kryžminio atsparumo su indukcijai naudojamais vaistais neturintys medikamentai (citarabinas, metotreksatas, antraciklinai, alkilizuojantys preparatai, epipodofilotoksinai). Dar vėliau taikomas iki 36 mėnesių trunkantis mažiau intensyvus palaikomasis gydymas 6-merkaptopurinu ir metotreksatu. Neuroleukemijos prevencijai vaikams taikoma kraniospinalinė radioterapija ar intratekalinė chemoterapija. Visgi intensyvus ūminių leukemijų gydymas turi nemažai šalutinių reiškinių: ankstyvųjų, kylančių dėl greitai yrančių naviko ląstelių ir sparčiai besidalijančių odos, virškinamojo trakto epitelio, kasos, kaulų čiulpų ir kitų audinių ląstelių sunaikinimo ir vėlyvųjų, tokių, kaip nevaisingumas, kepenų, plaučių pakenkimas, osteoporozė ar net antriniai navikai. Taigi maksimaliai intensyvus gydymas dėl gausių chemoterapinių vaistų pašalinių reiškinių nėra taikytinas visiems ligoniams. Esant gana plačioms gydymo konsolidacijos galimybėms, pacientai skirstomi į rizikos grupes: mažos rizikos ligoniams taikomas ne toks intensyvus, o didelės rizikos – intensyvesnis gydymas. Nuo 1994 m. atsinaujinusiai ūminei limfoblastinei leukemijai gydyti taikoma ir alogeninė kamieninių kraujodaros ląstelių transplantacija [8-11].

Sergančiųjų ūmine mielogenine leukemija gydymas taip pat paremtas kombinuota chemoterapija, tačiau nėra toks sėkmingas kaip sergančiųjų ūmine limfoblastine leukemija. Paprastai gydymo indukcijai naudojamas pirimidino analogas citarabinas ir vienas iš antraciklinų grupės vaistų (dažniausiai daunorubicinas ar idarubicinas). Kai kuriems ligoniams prireikia dviejų indukcijos ciklų. Pasiekus remisiją, priklausomai nuo rizikos veiksnių skiriamas tolesnis keletą mėnesių trunkantis gydymas didelių dozių citarabinu

ar atliekama alogeninė kamieninių kraujodaros ląstelių transplantacija. Tam tikram ŪML potipiui – ūminei promielocitinei leukemijai – taikomas specifinis gydymas allo-trans-retinoine rūgštimi [12].

Pastarąjį dešimtmetį vis dažniau pradedamas taikyti ir visiškai individualizuotas gydymas, paremtas biologinėmis (imunologinėmis, molekulinėmis) kiekvieno ligonio piktybinių ląstelių savybėmis. Į gydymo schemas pradedami įtraukti ir medikamentai, tiesiogiai mažinantys dauginį atsparumą vaistams lemiančių ląstelės struktūrų aktyvumą, pvz., valsopodaras (PSC 833). Imunoterapija, kuomet gydymui taikomas vaistas, konjuguotas su antikūnu prieš ląstelės – taikinio antigenus, pvz., rituksimabas (anti-CD20) ar gemtuzumabas (anti-CD33), naudojama jau nuo devintojo dešimtmečio pabaigos. Pradedamos taikyti vėžio vakcinos, gaminamos iš individualaus ligonio vėžio ląstelių ir skirtos sustiprinti organizmo imuninės sistemos atsaką į jį. „Taikinio“ principu veikiantis gydymas nukreiptas į procesus, kurie veikia vėžio ląstelių augimą, dalijimąsi, plitimą ir natūralią mirtį. Pavyzdžiui, Imatinibas, kuris blokuoja vėžinių ląstelių augimo signalus, veikdamas prieš bcr-abl hibridinį baltymą, yra plačiai taikomas lėtinės mieloleukemijos gydymui, taip pat tiriamas galimas jo panaudojimas ir Ph⁺ ŪLL gydymui. Be to, kuriami eksperimentiniai vėžio gydymo būdai: diegiamos nanotechnologijos, kurių pagalba vaistai tiksliau ir selektyviau pasiekia vėžio ląsteles, onkolitinė viroterapija, PARP (poli-ADP-ribozės-polimerazės, kurią vėžio ląstelės naudoja DNR pažeidimui ištaisyti) inhibitoriai ar net genų inžinerija [13-15].

Optimaliausiam kiekvieno ligonio gydymo metodui parinkti reikalingi objektyvūs ir patikimi rodikliai, leidžiantys priskirti ligonį tam tikrai rizikos grupei ar skirti visiškai individualų gydymą. Pirmieji ūminių leukemijų prognoziniai rodikliai buvo pacientų amžius ir leukocitų skaičius kraujyje. 1985 m. ūminės limfoblastinės leukemijos suskirstytos į standartinės rizikos (vaikai iki 10 metų, kurių leukocitozė mažesnė nei 50000/μl) ir didelės rizikos (kūdikiai ir vyresni nei 10 metų ligoniai, kurių leukocitozė didesnė ar lygi 50000/μl) [16]. Vėliau atliktos studijos parodė ir galimą blastų

morfologinių savybių įtaką ligos prognozei. Pavyzdžiui, ligojai, kurių blastų morfologinės savybės buvo būdingos FAB ŪLL L3 potipiui pasižymėjo palankesne ligos eiga, o L2 potipio morfologija buvo siejama su prastesne prognoze [17, 18]. Keletas studijų įrodė, kad ŪML atveju Auerio lazdelių radimas ar lydinti eozinofilija yra geros prognozės morfologiniai požymiai [19, 20].

XX aštuntajame dešimtmetyje pradėti leukeminių blastų paviršiaus žymenų ekspresijos – imunofenotipo - tyrimai. Tėkmės citometrijos metodas yra pagrįstas ląstelių identifikavimu, remiantis antigenų ekspresija jų paviršiuje, citoplazmoje ar branduolyje, kuri nustatoma naudojant su jais besijungiančius fluorochromais žymėtus antikūnus. Skirtingi žymenys yra būdingi atskiriems kraujodaros kamienams ir kinta jų diferenciacijos, proliferacijos ar migracijos metu [21, 22]. Šiuolaikiniais tėkmės citometrais galima vertinti keletą ar net keliolikos fluorochromų švytėjimą vienu metu ir iširti itin daug ląstelės parametrų. Imunofenotipo savybės pradėtos taikyti ir skirstant ligojus į rizikos grupes. Buvo pastebėta, kad ūminėms B-limfoblastinėms leukemijoms būdinga palankesnė prognozė, nei ūminėms T-limfoblastinėms leukemijoms. Vėliau įrodyta, kad T-ŪLL blastai pasižymi mažesniu folilpoliglutamato sintetazės aktyvumu ir didesniu dihidrofolatreduktazės aktyvumu, nei B-ŪLL, todėl sintetina mažiau aktyvios metotreksato formos ir greičiau ją metabolizuoja. Nors intensyvinant gydymą pasiekiami beveik vienodi šių ligų gydymo rezultatai, daugelis ŪLL tyrėjų grupių iki šiol taiko skirtingas B-ŪLL ir T-ŪLL gydymo schemas. [23, 24].

Ūminės mielogeninės leukemijos atveju imunofenotipo analizė padeda išskirti specifinį ŪML potipį – ūminę promielocitinę leukemiją. Šios leukemijos blastuose aptinkama translokacija, apimanti retinoinės rūgšties alfa receptoriaus geną, dažniausiai t(15;17)(q24;q21). Pasiekiami geri šios ligos gydymo rezultatai allo trans retinoine rūgštimi [25].

Pastaruoju metu ūminių leukemijų prognozės vertinimas neatsiejamas nuo citogenetinių ir molekulinės genetikos radinių. Vieni jų lemia palankią, pvz., t(8;21), t(15;17), inv16 ŪML, t(12;21) ŪLL atveju, kiti

– agresyvesnę ligos eigą, pvz., t(9;22), t(4;11) ŪLL, del7, del5 ŪML atveju [26].

Dar daugiau, diagnozuojant leukemijas ir kitus piktybinius susirgimus ir prognozuojant jų eigą, pradedami taikyti genų ekspresijos profilio (DNR ir RNR mikrogardelių technologija) ir proteominiai (masių spektrofotometrija) tyrimai, padedantys identifikuoti naujus ūminių leukemijų biožymenis ir galimus terapinius taikinius [27, 28].

Atsirandant vis naujesniems ūminių leukemijų tyrimo metodams, kai kurie tradiciniai metodai praranda savo aktualumą. Nors morfologinių ir citocheminių blastų savybių tyrimas šviesiniu mikroskopu išlieka svarbus leukemijų diagnostikai, šiuo metu jis retai naudojamas ligos eigai prognozuoti. Tuo tarpu tėkmės citometrinių tyrimų svarba išlieka didelė ne tik nustatant ūminės leukemijos pobūdį, bet ir vertinant jos prognozę. Tėkmės citometrijos metodo privalumai yra tyrimo greitis (rezultatai gaunami per kelias valandas nuo mėginio paėmimo), ne itin aukšta, atsižvelgiant į pateikiamos informacijos svarbą, tyrimo kaina, didelis jautrumas (aptinkama 1 specifinio fenotipo ląstelė tarp 10 000 ar net 100 000 kitų), galimybė analizuoti keletą ar net keliolika ląstelės parametrų, kiekvieną ląstelę tiriant atskirai, galimybė vertinti ląstelių gyvybingumą. Tobulėjant tėkmės citometrijos technologijoms, didėja vienu metu galimų tirti ląstelės žymenų skaičius, kartu ir gaunamos informacijos apie ląstelę kiekis. Viena vertus, daugiaparametrė tėkmės citometrija šiuo metu leidžia nustatyti net labai mažus ląstelių kiekius, todėl gali būti taikoma „retų ląstelių“ (angl. „*rare events*“) tyrimui (minimali liekamoji liga, cirkuliuojančios plazminės, limfominės ir net solidinių navikų ląstelės). Kita vertus, tapo įmanomas naujų ląstelių subpopuliacijų aptikimas (blastų subpopuliacijos, leukeminės kamieninės ląstelės). Taip pat vis daugiau dėmesio skiriama ir normalių kraujodaros ląstelių brendimo kelių tyrimams ir jų pakitimams įvairių hematologinių ligų metu. Pastebėta, kad leukeminiai blastai nėra tiesiog sustingę tam tikrame brandos lygyje ir nekontroliuojamai pasidauginę normalios kraujodaros pirmtakai. Analizuojant ūminių leukemijų

imunofenotipas, daugumoje atvejų aptinkama nukrypimų nuo normalaus kraujodaros ląstelių diferenciacijos kelio, vadinamų aberacijomis. Blastų fenotipo pokyčiai, nustatomi ūminėmis leukemijomis sergantiems ligoniams, tačiau neaptinkami ar aptinkami labai mažais kiekiais sveikų asmenų kaulų čiulpuose, atvejais vadinami su leukemija susijusiais aberantiniais fenotipais (LSAF). Šių fenotipo pakitimų klinikinė reikšmė keleriopa: LSAF gali būti naudojami kaip ūminių leukemijų prognoziniai žymenys, kai kurie LSAF turi stiprų ryšį su aptinkamais pokyčiais molekuliniam lygyje, taip pat LSAF taikomi minimalios liekamosios ligos aptikimo žymenų deriniams konstruoti [29-31].

Minimali liekamoji liga – tai leukeminių blastų populiacija, išlikusi kaulų čiulpuose, pasiekus morfologinę remisiją (kai šviesiniu mikroskopu aptinkama <5% blastų). Šis dydis atspindi objektyvų leukemijos “masės” mažėjimą, kurį lemia leukeminių ląstelių ypatybių (imunofenotipas, kariotipas, genų persitvarkymai ir kt.) ir organizmo ypatybių (amžius, lytis, farmakodinamika) sintezė. Minimalios liekamosios ligos dydis yra nepriklausomas, daugelio studijų patvirtintas ūminių leukemijų prognozės veiksnys. Minimalios liekamosios ligos dydis koreliuoja su gydymo išėjimu, padeda suskirstyti ligonius į rizikos grupes ir parinkti jiems tikslingiausią gydymą [32-34].

Viena iš ūminių leukemijų gydymo nesėkmės priežasčių gali būti blastų atsparumas vaistams. Atsparumas dviems ar daugiau struktūriškai ir funkciškai skirtingų vaistų vadinamas dauginiu atsparumu vaistams (DAV). DAV patogenezės mechanizmai keli: jį gali lemti pakitę vaistų veikiami ląstelės „taikiniai“, sutrikęs apoptozės (natūralios ląstelių mirties) mechanizmas, padidėjęs membraninių nešiklių, išstumiančių vaistą iš ląstelės, aktyvumas ar pakitęs vaistų metabolizmas. Vienas esminių DAV mechanizmų, intensyviai tyrinėjamas ir sergančiųjų ūminėmis leukemijomis populiacijoje, yra nuo ATF priklausančio membraninio baltymo p-gp sukeltas citotoksinių vaistų šalinimas iš ląstelės. Tėkmės citometrijos metodas gali būti efektyviai taikomas, tiriant dauginį atsparumą vaistams.

Viena vertus, naudojant monokloninius antikūnus prieš ekstraceliulinius p-gp epitopus, galima ištirti jo ekspresiją leukeminių ląstelių paviršiuje. Taip pat tėkmės citometrijos metodu galima nustatyti, ar blastai *in vitro* išstumia švytinčius citotoksinių medžiagų analogus, t.y. ištirti jų funkcinį atsparumą vaistams. Nors DAV, kaip prognostinio ūminių leukemijų veiksnio, tyrimų nemažai, jie vis dar išlieka prieštaringi [35, 36]. Šiame darbe siekėme DAV rodiklius susieti su leukemijų imunofenotipo ypatybėmis – su leukemija susijusių aberantinių fenotipų aptikimu, o jų prognostinę reikšmę vertinti, nustatant minimalią liekamąją ligą įvairias gydymo etapais.

Lietuvoje ūminių leukemijų tėkmės citometrinių tyrimai pradėti 1997 m. Pradžioje dvispalviais ir trispalviais žymenų deriniais buvo siekiama identifikuoti blastų liniją ir diferenciacijos laipsnį. Pamažu tiriamų žymenų įvairovė didėjo. Nuo 2004 m. ūminių leukemijų fenotipas tiriamas keturspalviais žymenų deriniais, o nuo 2006 m. pradėti šešiaspalvės tėkmės citometrijos tyrimai. Mūsų šalyje paplitę ūminių ir lėtinių leukemijų imunofenotipai apibendrinti ir išsamiai aprašyti dr. Rėdos Matuzevičienės disertacijoje „Žmogaus ūminių ir lėtinių leukemijų imunofenotipai: diferenciacijos žymenų ekspresijos tyrimai“ [37]. Daugiaspalvės tėkmės citometrijos tyrimai, taikant plačius žymenų rinkinius, teikia daug informacijos apie leukemines ląsteles ir gali būti naudojami ne tik ūminių leukemijų diagnozės nustatymui, bet ir jos prognozei vertinti. Pavienių žymenų ekspresijos įtaka ligos prognozei tirta ir Lietuvoje, pvz. nustatyta CD7 žymens ekspresijos ŪML atveju reikšmė [38]. Dabartiniu tyrimu jau siekėme nustatyti visų esminių LSAF prognostinę reikšmę, t.y. jų aptikimo įtaką minimalios liekamosios ligos kitimui bei tėkmės citometru ištyrėme galimą blastų persistavimo mechanizmą – dauginį atsparumą vaistams.

1.2. Darbo tikslas

Nustatyti sergančiųjų ūminėmis leukemijomis blastų su leukemija susijusius aberantinius fenotipus ir dauginį atsparumą vaistams bei įvertinti jų įtaką minimalios liekamosios ligos dinamikai.

1.3. Darbo uždaviniai

- 1) Nustatyti su leukemija susijusių aberantinių fenotipų paplitimą sergančiųjų ūminėmis leukemijomis populiacijoje.
- 2) Optimizuoti tėkmės citometriniu minimalios liekamosios ligos tyrimo metodiką.
- 3) Įvertinti su leukemija susijusių aberantinių fenotipų įtaką minimalios liekamosios ligos dydžiui ankstyvajame ūminių leukemijų gydymo etape.
- 4) Optimizuoti tėkmės citimetrinį dauginio atsparumo vaistams tyrimą.
- 5) Nustatyti su leukemija susijusių aberantinių fenotipų įtaką dauginio atsparumo vaistams rodikliams.
- 6) Nustatyti dauginio atsparumo vaistams rodiklių koreliaciją su minimalios liekamosios ligos dydžiu ankstyvajame ūminių leukemijų gydymo etape.

1.4. Ginamieji darbo teiginiai

- 1) Ūminių leukemijų fenotipas nevisiškai atitinka sveikų tos pačios kraujodaros ląstelių linijos pirmtakų fenotipą, daugeliu atvejų aptinkama su leukemija susijusių aberantinių fenotipų.
- 2) Kai kurie su leukemija susiję aberantiniai fenotipai turi ryšį su dauginiu atsparumu vaistams ir per šį mechanizmą daro įtaką minimalios liekamosios ligos dydžiui, todėl gali būti naudojami ūminių leukemijų prognozei vertinti.

1.5. Darbo mokslinis naujumas ir svarba

Ištirtas su leukemija susijusių aberantinių fenotipų paplitimas Lietuvos ligonių, sergančių ūminėmis leukemijomis populiacijoje ir palygintas su literatūroje pateikiamais LSAF paplitimo duomenimis. Šis dydis svarbus vertinant tėkmės citometrijos metodo pritaikomumą tiriant minimalią liekamąją ligą – vieną svarbiausių ūminių leukemijų atsako į gydymą rodiklių.

Ištirta, kaip tam tikros blastų fenotipo ypatybės (su leukemija susiję aberantiniai fenotipai) siejasi su minimalios liekamosios ligos dinamika. Iki šiol LSAF prognostinė reikšmė vertinta, tiriant pacientų išgyvenamumo rodiklius, kuriems įtakos gali turėti ir kiti veiksniai (pvz., bendra paciento būklė, įvairių organų sistemų funkcionavimo ypatybės ir kt.).

Įdiegtas originalus standartizuotas minimalios liekamosios ligos tyrimo metodas: remiantis LSAF analize, parinkti žymenų deriniai B-ŪLL, T-ŪLL, ŪML minimaliai liekamajai ligai tirti, sukurta vieninga analizės sistema. Ištirti sveikų asmenų kaulų čiulpai, nustatyti normalių kraujodaros pirmtakų populiacijų fenotipai ir jų kiekis, taip pat LSAF turinčių ląstelių kiekis. Sveikų asmenų kaulų čiulpų tyrimai, siekiant išaiškinti normalios kraujodaros brendimo kelius, šiuo metu labai intensyviai atliekami visame pasaulyje.

Mūsų gauti duomenys papildo sparčiai kaupiamą informacijos apie įvairaus brandumo sveikų kaulų čiulpų ląstelių fenotipus bazę.

Leukemijų dauginio atsparumo vaistams tyrimai šiuo metu taip pat įgauna pagreitį. Tiriama įvairių baltymų, galinčių sukelti atsparumą vaistams, ekspresija ląstelių paviršiuje, jų funkcija ir genetinis pagrindas. Kai kurie tyrėjai bando sieti dauginį atsparumą vaistams su leukemijos brandumo lygiu (pvz., su CD34+ fenotipu ar leukeminių kamieninių ląstelių aptikimu). Tačiau mes pirmieji sistemiškai pabandėme susieti visų pagrindinių su leukemija susijusių fenotipų aptikimą su dauginiu atsparumu vaistams bei su atsaku į taikomą gydymą – minimalios liekamosios ligos dinamika. Nuosekliai tyrėme, ar su leukemija susiję aberantiniai fenotipai turi įtakos dauginio atsparumo vaistams rodikliams *in vitro*, ir kaip šios savybės pasireiškia *in vivo* – kaip efektyviai blastų skaičius kinta gydant.

Įrodžius LSAF sąsajas su minimalios liekamosios ligos dinamika, jau diagnozuojant ūminę leukemiją be didelių papildomų išlaidų būtų gauta vertingos prognoziškai reikšmingos informacijos apie ligos eigą. Minimalios liekamosios ligos standartizacija svarbi, norint užtikrinti objektyvų, nuo tyrėjo nepriklausomą vertinimą bei galimybę palyginti rezultatus tarp skirtingų institucijų. Dauginio atsparumo vaistams tyrimai galėtų paaiškinti tikslesnį blastų išlikimo, taikant intensyvią chemoterapiją, mechanizmą. Rinkoje atsirandant dauginį atsparumą vaistams mažinančių preparatų, šiais tyrimais galima būtų identifikuoti pacientų grupes, kuriems tikslinga juos skirti.

2. Literatūros apžvalga

2.1. Ūminės leukemijos: klinika, etiologija, patogenezė

Ūminė leukemija – piktybinė kraujodaros sistemos liga, kuomet kaulų čiulpuose proliferuoja kloniniai kraujodaros ląstelių pirmtakai. Leukeminiai blastai išstumia sveikas kraujodaros ląsteles, todėl sumažėja kraujo elementų gamyba ir pasireiškia įvairaus laipsnio anemija, trombocitopenija ir

neutropenija. Blastai gali plisti ir už kraujodaros sistemos ribų, pvz., į kepenis, blužnį, limfinius mazgus ar centrinę nervų sistemą. Ūminės leukemijos simptomai dažniausiai yra susiję su pancitopenijos sukeltomis komplikacijomis: greitas nuovargis, odos ir gleivinių blyškumas dėl išreikštos anemijos, dažnos infekcijos, karščiavimo epizodai dėl neutropenijos bei trombocitopenijos sukelti įvairių lokalizacijų kraujavimo reiškiniai. Sergantiesiems ŪLL dažnai aptinkama poliadenopatija, hepatomegalija ir splenomegalija [39, 40].

Nėra tiksliai žinoma, kokie veiksniai sukelia ūmines leukemijas. Ūminių leukemijų atsiradimas siejamas su aplinkos veiksniais: tam tikrų cheminių junginių (benzeno, alkilinančių chemoterapinių vaistų) poveikiu, jonizuojančia radiacija, kai kuriais virusais (pvz., HTLV-1), taip pat su įgimtomis genetinėmis anomalijomis (21-os chromosomos trisomija, Fanconi anemija, Bloomo sindromas, šeiminės RUNX1 mutacijos). Diskutuojama, ar nejonizuojanti radiacija (elektromagnetinių laukų poveikis) gali sukelti leukemiją. Nors keletas studijų (Alhobom, 2001, Draper, 2005) susiejo vaikų ūminių leukemijų atsiradimo dažnį su elektromagnetinio lauko stiprumu ar atstumu nuo aukštos įtampos linijų, kitos studijos šį ryšį paneigė (Didžiosios Britanijos vaikų vėžio tyrėjų grupė, 2000), o Pasaulinė sveikatos organizacija laikosi nuomonės, kad duomenys elektromagnetinę radiaciją laikyti leukemijų priežastimi nėra pakankami. Prieš išsivystant ūminei leukemijai, gali būti aptinkamos kitos gerybinės (aplazinė anemija, paroksizminė naktinė hemoglobinurija) ar piktybinės (mielodisplazinis sindromas, lėtiniai mieloproliferaciniai susirgimai) kraujodaros sistemos ligos [39-41].

Molekuliniame lygyje, leukemijos, kaip ir kiti piktybiniai susirgimai išsivysto dėl spontaninių mutacijų, kurioms įvykus protoonkogenai virsta veikliais onkogenais ar inaktyvuojami navikus supresuojantys genai. Šie pakitimai sutrikdo ląstelių diferenciacijos, dalijimosi ir natūralios mirties procesus [42].

Ūminių leukemijų patogenezė dažniai aiškinama pasitelkiant „dviejų smūgių“ teoriją, kuri teigia, kad leukemija išsivysto įvykus dviejų ar daugiau

genų, reguliuojančių kraujodaros ląstelių diferenciaciją ir proliferaciją, mutacijoms, kurių kiekviena atskirai leukemijos nesukelia. Kai kurie ūminės leukemijos potipiai akivaizdžiai iliustruoja šią teoriją. Viena dažniausių ūminėmis limfoblastėmis leukemijomis sergančių vaikų grupėje sutinkama genetinė anomalija – TEL ir AML1 genų susilieėjimas, įvykstantis dėl translokacijos t(12;21). Šis genetinis persitvarkymas greičiausiai įvyksta dar prenataliniu laikotarpiu: ji aptinkama identiškiems dvyniams ir tam tikrai daliai populiacijos, tiriant kraujo mėginius iš Guthrie kortelių. Vis tik ne visi vaikai, turintys „įgimtą“ translokaciją, susergera leukemija, tam reikalingas antrasis, jau po gimimo atsiradęs genų pakitimas. Be klasikinių leukemogenezės veiksnių (cheminės medžiagos, radiacija) minima ir pakitusio imuninio atsako į įprastas infekcijas reikšmė. „Aberantinė“ imuninė reakcija į infekcijas organizme, kuriame dėl nepakankamo kontakto su įprastais patogenais ankstyvoje vaikystėje nesusiformavo optimalus imuninės sistemos atsakas į juos, taip pat gali būti antruoju veiksniu, skatinančiu kraujodaros pirmtakų, jau turinčių pirminę genetinę patologiją, leukeminę transformaciją [43-44].

Pirmoji įvykusi mutacija vadinama „blokuojančia“, t.y. stabdančia kraujodaros pirmtakų diferenciaciją tam tikroje stadijoje, o antroji – „proliferacinė“, sukeliančia nekontroliuojamą šių ląstelių dauginimąsi. Remiantis šia prielaida, ląstelių lygyje galima teigti, jog leukeminiai blastai bent iš dalies atitinka tam tikros kilmės ir brandumo normalias kraujodaros ląsteles. Hemopoezės teorija teigia, kad kraujo ląstelės vystosi iš daugiagaliosios kraujodaros kamieninės ląstelės. Ji duoda pradžią kraujodaros kamienams, iš kurių vystosi vis labiau diferencijuotos ir galiausiai visiškai subrendusios ir funkcionuojančios kraujo ląstelės. Viena pagrindinių kamieninių kraujodaros ląstelių savybių – sugebėjimas atsinaujinti. Atsinaujinimas gali vykti simetriškai, kuomet generuojamos dvi lygiavertės kamieninės ląstelės, arba asimetriškai, kuomet atsiranda viena kamieninė ląstelė ir vienas atsinaujinti nebegalintis pirmtakas, iš kurio vystosi tolesni ląstelių hierarchijos elementai. Normalios kraujodaros palaikymui būtinas

subalansuotas simetrinis ir asimetrinis kamieninės ląstelės dalijimasis. Sutrikus atsinaujinimo ir diferenciacijos procesams, gali išsivystyti leukemija [45-47].

Klasikinė (scholastinė) navikų atsiradimo teorija teigia, kad navikai atsiranda iš vienos pakitusios ląstelės kloninės ekspansijos būdu, sutrikus proliferacijos kontrolės mechanizmams. Kiekviena vėžinė ląstelė turi vienodą, kad ir nedidelę tikimybę vykdyti ląstelės ciklą, dalintis ir plisti organizme. Šis modelis teigia, kad visos vėžio ląstelės yra vienodai tumorigeniškos ir pasižymi vienodomis savybėmis, kurias galima ištirti, tiriant bet kurią ląstelę iš naviko masės [48, 49]. Tačiau gana anksti buvo pastebėta, kad vėžinės ląstelės vis tik yra heterogeniškos: gali skirtis jų morfologija, imunofenotipas ir kariotipas [50]. Buvo iškelta nauja navikų išsivystymo teorija – vėžio kamieninės ląstelės teorija. Remiantis ja, naviko masėje egzistuoja nedidelė populiacija vėžio kamieninių ląstelių, pasižyminčių savybe atsinaujinti. Iš jų vystosi visos kitos, fenotipiškai skirtingos, labiau diferencijuotos ir mažesnes atsinaujinimo galimybes turinčios vėžio ląstelės. Teigiama, kad šie „palikuonys“ išsaugo tam tikras, tačiau ne visas jų atitikmenų sveikuose kaulų čiulpuose savybes [51, 52]. O kai kurie tyrėjai teigia, kad dėl gausių sudėtingų molekulinų persitvarkymų leukeminės ląstelės yra taip pakitusios, kad netgi sunku įžvelgti jų ryšį su sveikomis ląstelėmis [53].

Navikų kamieninės ląstelės teorija taikoma ir aiškinant leukemijų atsiradimą: genetiniai pokyčiai skatina atsirasti kamieninę leukemijos ląstelę, kuri sugeba atsinaujinti ir kuri yra likusių leukeminių ląstelių – blastų – pirmtakas [54, 55]. Remiantis prielaida, kad leukeminiai blastai nėra tiesiog „sustingusios“ tam tikrame diferenciacijos etape ir nekontroliuojamai pasidauginusios normalios kraujodaros ląstelės, skirtumai tikėtini ir jų genome, ir jo išraiškoje – ląstelės baltymų ekspresijoje.

2.2. Ūminių leukemijų diagnostikos raida

Nors „vėžio“ terminas buvo vartojamas jau Galeno (130 – 200 m.) laikais, piktybiniai kraujo susirgimai apibrėžti žymiai vėliau. Jų diagnostika glaudžiai siejasi su mikroskopo atsiradimu. 1665 m. Robertas Hookas paskelbė pirmąjį mikroskopijai skirtą darbą, o Antonas van Leeuwenhoekas 1674 m. sukonstravo pirmąjį mikroskopą ir aprašė raudonąsias kraujo ląsteles – eritrocitus [56, 57]. 1749 m. prancūzų anatomas Josephas Lieutaudas pirmasis apibūdino leukocitus („*globuli albicantes*“) [58]. Vis tik iki pat XIX a. vidurio vyravo nuostata, kad net žymus „baltųjų“ kraujo ląstelių pagausėjimas kraujyje yra tiesiog uždegimo lemiamas pūlingas procesas. Šią nuomonę iš esmės pakeitė Johno Hugheso Benetto 1845 m. Edinburgo medicinos ir chirurgijos žurnale išspausdintas straipsnis, kuriame jis teigė, kad ligonio, mirusio nuo kraujo „supūliavimo“, kraujo ląstelės yra pakitusios ir detaliam jas aprašė [59]. Tais pačiais metais Berlyno Charite ligoninės patologas Rudolfas Virchovas savo straipsnyje „Baltasis kraujas“ taip pat apibūdino mikroskopines „baltųjų“ kraujo ląstelių savybes bei pirmą kartą pavartojo terminą „leukemija“ [60]. Reikšmingu žingsniu leukemijos diagnostikoje tapo ir 1877 m. Paulo Erlichio atrastas kraujo tepinėlio dažymo metodas, nuo kurio prasidėjo morfologinių leukeminių ląstelių tyrimų era [61].

Pirmosios leukemijų klasifikacijos rėmėsi būtent morfologinėmis ląstelių savybėmis: dydžiu, forma, branduolio ypatumais, citoplazmoje aptinkamomis granulėmis ar vakuolėmis. Tikslesnę šios ligos klasifikaciją paskatino hematologijoje pradėtos naudoti citocheminės reakcijos – cheminės reakcijos, leidžiančios identifikuoti ląstelėse esančias medžiagas. 1964 m. F. Hayhoe su kolegomis panaudojo perjodinės rūgšties Schiffo reakciją glikogenui, Sudano juodžio reakciją lipidams bei benzidino reakciją peroksidazei ląstelėse aptikti [62].

Pirmąją vieningą, ląstelių morfologinėmis ir citocheminėmis savybėmis paremtą leukemijų klasifikaciją 1976 m. sukūrė grupė Prancūzijos, JAV ir Didžiosios Britanijos mokslininkų (FAB klasifikacija). Vėliau patobulinta ji buvo taikoma ilgiau nei du dešimtmečius. Ūminės leukemijos buvo suskirstytos į dvi esmines grupes: ūminės limfoblastines ir ūminės mieloblastines leukemijas [63].

Sparčiai besivystant kitai biomedicinos sričiai – imunologijai, leukemijoms diagnozuoti pradėti taikyti antigeno ir antikūno reakcija pagrįsti tyrimo metodai. Sukurta daugybė monokloninių antikūnų prieš skirtingus leukocitų paviršiaus antigenus (žymenis). Plečiantis šių antikūnų įvairovei, sudaryta jų nomenklatūra – CD (*cluster of differentiation*) sistema, pirmą kartą pasiūlyta 1982 m. Pirmajame tarptautiniame žmogaus leukocitų diferenciacijos antigenų seminare ir konferencijoje [64]. Leukemijų diagnostika tapo neatskiriama nuo blastų paviršiaus žymenų ir jų visumos – ląstelės fenotipo – tyrimo.

Organizmo audiniuose, pvz., kaulų čiulpų trepanobiotate, ląstelių žymenys pradėti tirti imunohistocheminiais metodais. Ląstelių fenotipui tirti skystose terpėse ieškota tikslesnių, greitesnių ir objektyvesnių antigeno – antikūno reakcijos vertinimo būdų. XX a. antrojoje pusėje buvo sukurti pirmieji tiesioginės imunofluorescencijos metodu paremti analizatoriai – tėkmės citometrai. Šių instrumentų pirmtaką – ICP 11 prietaisą – 1968 metais sukonstravo Wolfgangas Gohde. Neilgai trukus net keletas komercinių įmonių sukūrė ir pateikė rinkai savo analizatorius: 1971 m. – Cytofluorograph (Ortho Diagnostics), 1973 m. – PAS 8000 (Partec), 1974 m. – FACS (Becton Dickinson) [65].

1988 m. MIC (morfologinė, imunologinė ir citogenetinė) leukemijų klasifikacija, o taip pat 1990 m. pagal Nacionalinio vėžio instituto rekomendacijas pataisyta FAB klasifikacija jau tvirtai pripažino imunofenotipo svarbą [66, 67]. Daugėjant duomenų apie sergantiesiems ūminėmis leukemijomis aptinkamus kariotipo ir citogenetinius pakitimus ir su

jais susijusius leukemijų biologijos ypatumus, šiuos rodiklius imta naudoti ir leukemijų klasifikacijoje.

2001 m. priimta ir 2008 m peržiūrėta PSO piktybinių hematologinių susirgimų klasifikacija naudojama iki šiol. Ji grindžiama klinikinių duomenų, blastų morfologijos, imunofenotipo, genetinių pakitimų sinteze [68, 69]. Kaip ir anksčiau, išskiriamos mieloidinės ir limfoidinės kilmės ūminės leukemijos.

Šiuo metu naudojamoje PSO klasifikacijoje išskiriamos šios pagrindinės ŪML grupės [69]:

- 1) ŪML su pasikartojančiomis genetinėmis anomalijomis,
- 2) ŪML su mielodisplaziniais pakitimais,
- 3) su gydymu susiję ŪML ir MDS,
- 4) kitaip neklasifikuojama ŪML:
 - a. ŪML su minimalia diferenciacija,
 - b. ŪML be brendimo požymių,
 - c. ŪML su brendimo požymiais,
 - d. ūminė mielomonocitinė leukemija,
 - e. ūminė monoblastinė ir monocitinė leukemija,
 - f. ūminė eritroleukemija,
 - g. ūminė megakarioblastinė leukemija,
 - h. ūminė bazofilinė leukemija,
 - i. ūminė panmielozė su mielofibroze.
- 5) mieloidinė sarkoma,
- 6) su Dauno sindromu susijusi mieloidinė proliferacija,
- 7) blastinė plazmacitoidinių dendritinių ląstelių neoplazma.

Ūminių limfoblastinių leukemijų klasifikacija [69]:

- 1) kitaip neklasifikuojamos ūminės B- limfoblastinės leukemijos/limfomos,
- 2) B-limfoblastinės leukemijos/limfomos su pasikartojančiomis genetinėmis anomalijomis,
- 3) T limfoblastinės leukemijos/limfomos.

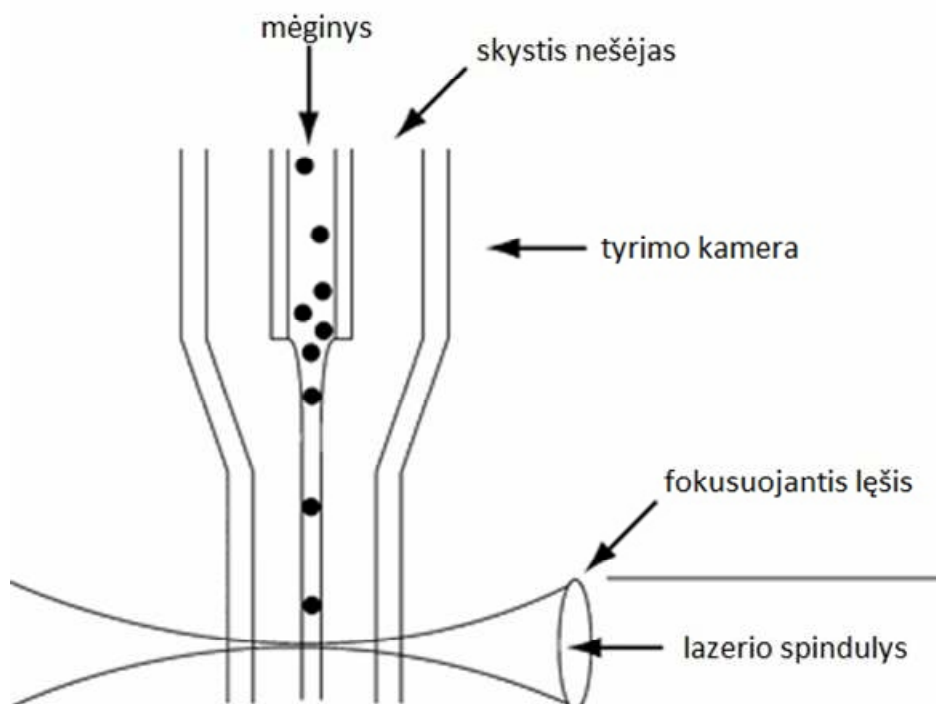
2.3. Tėkmės citometrija ir jos taikymas diagnozuojant ūmines leukemijas

2.3.1. Tėkmės citometrijos principai

Tėkmės citometrija – tai analizinės citologijos metodas ląstelėms tirti, grindžiamas sluoksninės skystio tėkmės, šviesos optinės sklaidos, imunoglobulinų biologijos bei fluorescentinių medžiagų chemijos principais [70].

Tėkmės citometrijos metodas yra paremtas ląstelių, žymėtų su specifiniais antikūnais prieš jų membranos, citoplazmos ar branduolio struktūras konjuguotais fluorescentiniais žymekliais, parametų nustatymu („matavimu“) srautinėje sistemoje, kurioje ląstelės išsidėsto po vieną. Ląstelei kertant šviesos šaltinio spindulį, registruojama dviem kryptimis išsklaidyta šviesa bei skirtingų bangos ilgių fluorescencija [71-73] (1 pav.).

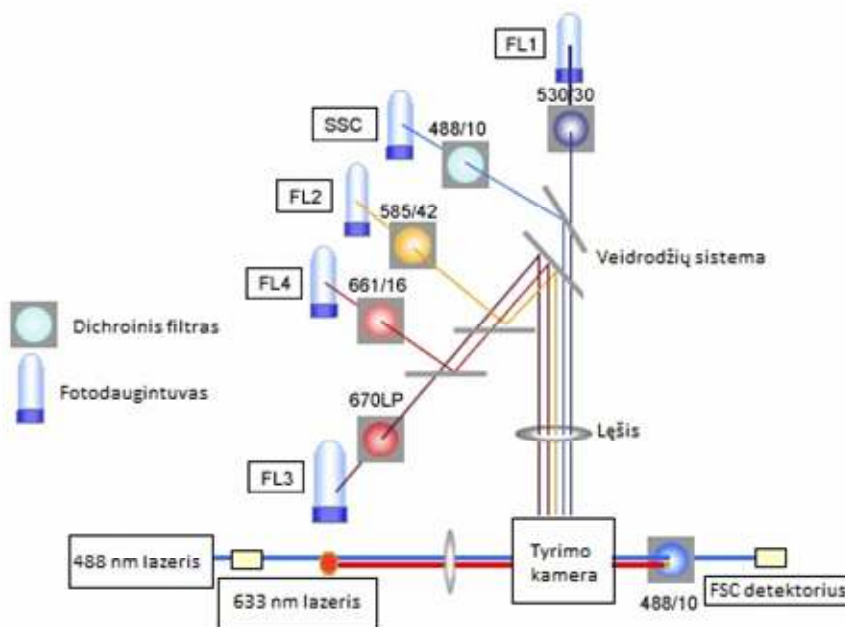
1 pav. Tėkmės citometro mėginių tyrimo dalies schema.



Tėkmės citometras sudarytas iš keleto pagrindinių blokų – skysčių, optinės ir informacijos apdorojimo sistemų. Mėginys yra hidrodinamiškai fokusuojamas - įsiurbiamas į laminarinės tėkmės nešančiojo skysčio srovę taip, kad ląstelės išsidėstytų srovės centre viena paskui kitą [71-73].

Šiuolaikiniuose citometruose dažniausiai naudojamas šviesos šaltinis yra lazeris, spinduliuojantis didelio intensyvumo monochrominę šviesą, kuri gali būti sufokusuojama į itin mažą plotą ir sužadinti pavienes ląsteles. Naujausi tėkmės citometrai turi ne po vieną, o po keletą skirtingų bangos ilgių lazerių. Plačiausiai paplitęs yra argono jonų lazeris, skleidžiantis mėlyno spektro 488 nm bangos ilgio šviesą, kuri sužadina pagrindinius fluorescentinius žymeklius FITC, PE, PerCP ir kai kuriuos kitus rečiau naudojamus žymeklius (PE-Cy5, PE-Cy7 ir kt.). Taip pat citometruose dažnai naudojami šie lazeriai: 633 nm „raudonas“ helio – neono (sužadinantis APC, APC-Cy7, Alexa Fluor 633 fluorochromus), 405 nm kietos fazės „violetinis“ (AmCyan, Pacific Blue), 325 nm „ultravioletinis“ helio – kadmio (Hoechst 33342, DAPI, Alexa Fluor 350). Ląstelei kertant maksimaliai sufokusuotą lazerio spindulį, priekinės sklaidos detektorius fiksuoja nedideliu kampu atspindėtą šviesą, o 90° kampu atspindėta šviesa, praėjusi koncentruojantį lęšį, kerta keletą dichroninių veidrodžių, selektyviai atspindinčių tik vieno bangos ilgio šviesą, o likusią dalį spindulio praleidžiančių toliau [71-73] (2 pav.).

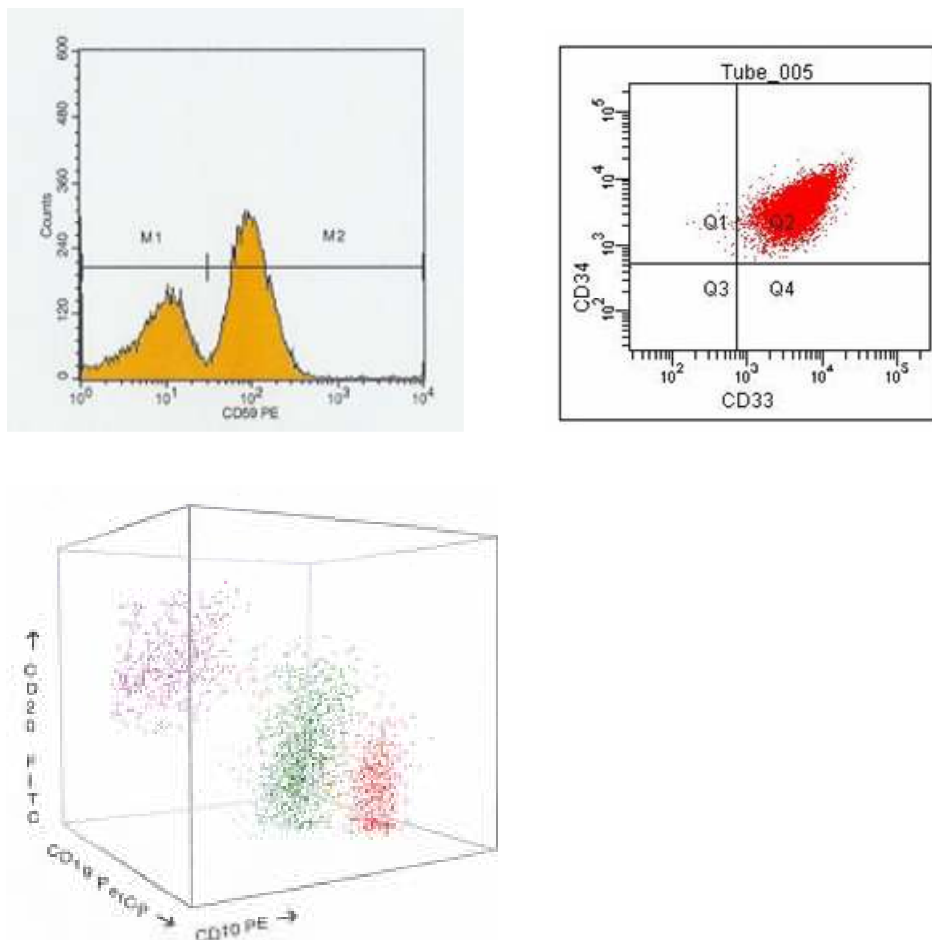
2 pav. Optinės tėkmės citometro dalies schema.



Analizinėje sistemos dalyje šviesos signalai detektorių paverčiami atitinkamo stiprumo elektros impulsais, kurie vėliau konvertuojami į skaitmeninius. Šiuolaikiniuose citometruose skaitmeniniai signalai generuojami labai ankstyvose detekcijos proceso stadijose, o vėliau vykdoma jų modifikacija. Taip gaunami tikslesni duomenys, be to, galima atlikti įvairių citometro parametrų skaitmeninę korekciją, jau surinkus duomenis [71-73].

Duomenys, gaunami tėkmės citometru, analizuojami keliais būdais. Vienparametrės histogramos viena ašis atspindi tam tikro žymens fluorescencijos intensyvumą, kita – tokiu fluorescencijos intensyvumu pasižyminčių ląstelių skaičių. Taškinės histogramos kiekvienas taškas žymi atskirą lazerio spindulį kirtusią ląstelę. Paprastai vienu metu analizuojami du fluorescencijos signalai (atitinkantys du žymenis). Kai kurios analizės programos leidžia matyti erdvinį vaizdą – analizuoti 3 fluorescencijos signalus vienu metu [71-73] (3 pav).

3 pav. Tėkmės citometrijos duomenų analizės būdai: vienparametrė histograma, taškinė histograma, erdvinė histograma.



2.3.2. Tėkmės citometrijos metodo taikymas tiriant ūmines leukemijas

Tėkmės citometriniai tyrimai užima svarbią vietą tiek įvairių sričių (imunologijos, onkologijos, hematologijos, mikrobiologijos) mokslinių tyrimų srityje, tiek ir klinikinėje praktikoje. Ypač platus šių tyrimų panaudojimas hematologijoje: tiriamas ūminių ir lėtinių leukemijų fenotipas, nustatant minimalios liekamosios ligos dydį stebimas gydymo efektas, tiriamos kitos kloninės kraujo ligos – mielodisplaziniai susirgimai, paroksizminė naktinė hemoblobinurija, plazminių ląstelių navikai [74, 75].

Tėkmės citometrijos metodu tiriant ūmines leukemijas, siekiama šių tikslų [74, 75]:

- 1) identifikuoti patologines ląsteles mėginyje, nustatyti jų skaičių,
- 2) nustatyti jų kilmę ir brandumo laipsnį,
- 3) įvertinti žymenų visumą – fenotipą ir, jei įmanoma, priskirti jį tam tikrai ligai ar jų grupei,
- 4) išskirti žymenų, kurie naudojami kaip gydymo taikiniai (CD20, CD33), ekspresijos ypatybes,
- 5) nustatyti prognozei reikšmingus tėkmės citometrinius rodiklius.

2.4. Ūminių leukemijų eigos prognozavimas

Kadangi ūminės leukemijos apima nemažą grupę piktybinių kraujodaros sistemos susirgimų, pacientų atsakas į gydymą ir išgyvenamumo rodikliai gali ženkliai skirtis. Nuolat ieškoma tiek nuo paciento, tiek ir nuo naviko ypatybių priklausančių veiksnių, padedančių prognozuoti ligos eigą.

2.4.1. Ūminės mielogeninės leukemijos prognoziniai veiksniai

Tradiciniai ŪML prognostiniai veiksniai klasifikuojami į kelias grupes:

1) Klinikiniai prognostiniai veiksniai:

- Amžius: vyresniems nei 50m asmenims remisija pasiekama rečiau, o išgyvenamumas be ligos trumpesnis. Net ir jaunesnių pacientų grupėje amžius turi įtakos išgyvenamumo be ligos rodikliui [76].
- Bendra būklė: sunkios būklės ligoniai (neretai su gretutinėmis širdies, inkstų ligomis ar infekcijomis) dažniau miršta ankstyvuojų gydymo etapu [77, 57].
- Anksčiau patirtas gydymas citotoksiniais vaistais ar radiacija: su gydymu susijusi ŪML išskiriama į atskirą

nozologinį vienetą PSO klasifikacijoje. Jos prognozė paprastai esti blogesnė [77-79].

- Anksčiau nustatyti kiti hematologiniai susirgimai: pažeista kraujodaros sistema dar prieš išsivystant ūminei leukemijai sukelia kraujo ląstelių trūkumą ar nefunkcionalumą, dėl kurio vystosi kraujavimas, infekcijos ir kiti reiškiniai, bloginantys paciento būklę [77-79].

2) Su ląstelių kariotipu susiję prognoziniai veiksniai:

- Chromosomų pokyčiai, susiję su palankia prognoze: t(8;21), inv(16), t(16;16), t(15;17).
- Chromosomų pokyčiai, susiję su bloga prognoze: del (5q), del (7q), 5-os ar 7-os chromosomos monosomija, inv(3), t(3;3), t(6;11), t(10;11), t(9;22), 17-os chromosomos pakitimai, 11q23 pakitimai, išskyrus t(9;11) ir t(11;19), 3q pakitimai, išskyrus (3;5).
- Chromosomų pokyčiai, nepriskiriami nei vienai šių grupių, yra siejami su vidutine prognoze. Visgi apie 40% pacientų chromosominių pakitimų neaptinkama visiškai [79-81].

3) Su molekuliniiais pakitimais (genų mutacijomis) susiję prognostiniai veiksniai:

- FLT3 yra transmembraninis tirozinkinazės receptorius. Įvykus geno mutacijai, jis gali būti aktyvuojamas nepriklausomai nuo ligando ir siųsti signalus ląstelių proliferacijai. Vaikų ir jaunų suaugusių, kuriems nustatoma tam tikra šios mutacijos forma, prognozė blogesnė [82-83].
- Nukleofosmino geno mutacijos, aptinkamos esant normaliam kariotipui ir neradus FLT3 mutacijų, yra geros prognozės rodiklis įvairių amžiaus grupių ligoniams [82, 84].
- c-KIT geno (kurio baltyminis ekvivalentas yra CD117 žymuo) mutacijos taip pat lemia nuo ligando nepriklausomą

tirozinkinazės aktyvaciją, kuri savo ruožtu „įjungia“ daugybinius signalo perdavimo kelius ląstelėje. KIT geno mutacijos gali rodyti blogesnę ligos eigą ligoniams, turintiems kitų geros prognozės rodiklių (pvz., inv16) [82, 85].

4) Su kitomis naviko ląstelių ypatybėmis susiję prognostiniai veiksniai:

- Dauginį atsparumą vaistams sukeliančių nuo ATF priklausančių siurblių (p-gp, MRP1, LRP ir kt.) hiperekspresija susijusi su blogesne ŪML prognoze, ypač vyresnio amžiaus ligoniams [86-88].
- Apoptozės inhibitorių (bcl-2, survivino) ar juos kostimuliuojančių molekulių (CD40, CD11a) hiperekspresija susijusi su sunkesne ligos eiga dėl sutrikusio natūralios ląstelių mirties procesų [89, 90].
- EVI1 geno hiperekspresija lemia DNR metiltransferazių, kurios atsakingos už epigenetinę genų ekspresijos kontrolę, aktyvumo padidėjimą. Vidutinės rizikos grupės ligoniams, aptikus šią mutaciją, nustatomas trumpesnis išgyvenamumas be recidyvo [91].

2.4.2. Ūminių limfoblastinių leukemijų prognostiniai veiksniai

ŪLL prognozei vertinti taip pat naudojami tiek su ligonio, tiek su piktybinių ląstelių savybėmis susiję veiksniai:

- Ligonų amžius. Kūdikiams iki 1 metų, sergantiems ŪLL, dažnai aptinkami MiLL geno persitvarkymai (translokacijos, apimančios 11q23). Jiems būdinga sunkesnė ligos eiga ir silpnesnis atsakas į standartinį gydymą. Agresyvesnė ligos eiga taip pat būdinga vyresniems negu 10 metų vaikams ir suaugusiems [92].

- Leukocitų skaičius. Sergantiesiems B-ŪLL, kurių kraujyje aptinkama $>50000/\mu\text{l}$ leukocitų, būdinga blogesnė prognozė [93].
- Citogenetiniai pakitimai:
 - hiperdiploidinis chromosomų rinkinys (50-67 chromosomos), t(12;21) translokacija siejami su palankia prognoze,
 - hipodiploidija, t(9;22) translokacija, MiLL persitvarkymai, 11p pakitimai ir 13q netekimas siejami su blogesne prognoze [94].
- Imunofenotipas: T-ŪLL ir subrendusio fenotipo B-ŪLL paprastai būdinga sunkesnė ligos eiga [95].
- Atsakas į gydymą: greitas blastų kiekio sumažėjimas gydant siejamas su palankia ligos eiga [96, 97]. Blastų skaičiaus mažėjimas vertinamas tiek morfologiniu metodu, t.y. šviesiniu mikroskopu, tiek ir moderniais metodais, leidžiančiais aptikti itin mažą šių ląstelių kiekį. Submikroskopinis leukeminių blastų skaičius, aptinkamas ligoniui esant remisijoje, vadinamas minimalia liekamąja liga [98, 99].

2.4.3. Tėkmės citometrijos metodo reikšmė, prognozuojant ūminių leukemijų eigą

Tėkmės citometrijos tyrimai gali būti vertingu diagnostiniu įrankiu, prognozuojant ūminių leukemijų eigą. Galima išskirti tris prognozinius šio metodo aspektus:

- 1) Diagnozuojant aptikti su leukemija susiję aberantiniai fenotipai, t.y. fenotipai, neaptinkami sveikuose atitinkamos kraujodaros ląstelių linijos pirmtakuose, gali turėti įtakos tolesnei ligos eigai:

- a. jie gali rodyti esant tam tikrą genetinę pažeidimą, pvz., ūminės mielogeninės leukemijos fenotipas CD19+CD56+ susijęs su t(8;21) aptikimu [126],
 - b. gali būti nepriklausomi prognoziniai veiksniai [134-139].
- 2) Tėkmės citometrinių tyrimai gali būti taikomi, vertinant atsaką į gydymą. Kaip minėta anksčiau, atsakas į gydymą yra reikšmingas tolesnės sergančiųjų ūminėmis leukemijomis prognozės veiksnys: ligoniams, kuriems pradėjus gydymą, blastų skaičius mažėja sparčiau ir efektyviau, paprastai pasiekiami geresni išgyvenamumo rodikliai [152-159]. Minimalios liekamosios ligos tyrimas tėkmės citometru įmanomas didžiąjai daliai sergančiųjų ūminėmis leukemijomis ir yra pakankamo jautrumo (bent 0,01% ŪLL ir 0,1% ŪML atveju) [160].
- 3) Dauginio atsparumo vaistams tyrimai tėkmės citometru gali padėti paaiškinti gydymo nesėkmės priežastį, ją numatyti iš anksto ir išskirti pacientų grupes, kuriems tikslinga šio reiškinio korekcija [175-179].

2.4.3.1. Su leukemija susiję aberantiniai fenotipai

Leukeminių blastų fenotipai, kurie neaptinkami ar aptinkami labai mažais kiekiais vykstant normaliai hemopoezei, vadinami su leukemija susijusiais aberantiniais fenotipais (LSAF) [100-103].

Su leukemija susiję aberantiniai fenotipai paprastai skirstomi į kelias grupes [100-103]:

- Linijai nebūdingų žymenų ekspresija (pavyzdžiui, limfoidinių žymenų ekspresija mieloidinės kilmės blastų populiacijoje),
- asinchroninė žymenų ekspresija, kai leukeminės ląstelės paviršiuje aptinkami du ar daugiau žymenų, kurie normalios hemopoezės atveju niekada nerandami kartu,

- žymenų hiperekspresija, kai tam tikro žymens molekulių ląstelės paviršiuje yra daugiau, nei bręstant normalioms ląstelėms,
- žymenų hipoekspresija ar jų nebuvimas,
- ektozinė žymenų ekspresija, kai tam tikras žymuo nustatomas kitoje, nei įprasta, lokalizacijoje (pavyzdžiui, CD1a ne čiobrialiaukėje, o kaulų čiulpuose),
- spindulio sklaidos pobūdžio pakitimai (pavyzdžiui, neįprastai didelės limfoidinės ląstelės).

Literatūroje pateikiamos gana plačios su leukemija susijusių aberantinių fenotipų paplitimo ribos. Štai ūminės B-pirmtakų limfoblastinės leukemijos atveju LSAF aptinkami 85 – 99 % [101, 102, 104, 105], o ūminės T-limfoblastinės leukemijos atveju – 95 – 100 % [101, 102, 106, 107]. Ūminės mielogeninės leukemijos atveju aberantiniai fenotipai randami 30 – 85 % atvejų, tačiau pastebima, kad tobulėjant technologinėms galimybėms, jų skaičius vis didėja [100, 108-114].

Su leukemija susijusių aberantinių fenotipų buvimas turi įtakos sergančiųjų ūmine leukemija ligos eigai ir prognozei. Viena anksčiausiai nustatytų ir iširtų blastų fenotipo aberacijų – CD10 žymens (anksčiau vadinto bendruoju ūminių limfoblastinių leukemijų antigenu) nebuvimas kai kuriais ūminių B-limfoblastinių leukemijų atvejais. Dažnai tokios leukemijoms būdinga ir mieloidinių žymenų CD15 ir CD65 koekspresija. Įrodyta, kad tokio fenotipo ūmine B-pirmtakų limfoblastine leukemija sergančių ligonių prognozė prastesnė: mažesnis remisijos dažnis ir išgyvenamumas be ligos [115, 116]. Vėliau nustatyta, kad CD10- fenotipas dažnai koreliuoja su tam tikrais chromosominiais pakitimais – translokacijomis, įtraukiančiomis mišrios linijos leukemijų geną (MiLL), esantį trumpajame 11-os chromosomos petyje (11q23). Įrodyta, kad šios translokacijos yra nepriklausomas blogos ŪL prognozės rodiklis [117, 118].

Kitas gerai žinomas ūminės B-limfoblastinės leukemijos eigą padedantis prognozuoti veiksnys – Filadelfijos chromosoma, susiformuojanti

dėl t(9;22) translokacijos, dėl kurios susijungia bcr ir abl genai ir sintetinamas tirozinkinazės aktyvumu pasižymintis hibridinis baltymas. Ji aptinkama 25 – 35% sergančių ūmine B-pirmtakų limfoblastine leukemija suaugusių ir ~5% vaikų ir siejama su bloga šios ligos prognoze. Šiems ligoniams indikuotina alogeninė kaulų čiulpų transplantacija. Nors bcr-abl genų junginys paprastai nustatomas polimerazės grandininės reakcijos su atvirkštine transkriptaze metodu, keletas studijų įrodė, kad Filadelfijos chromosomą turinčios ūminės B-pirmtakų limfoblastinės leukemijos pasižymi specifiniu fenotipu: jos visos ryškiai ekspresuoja CD10, CD19, CD34 žymenis, dažnai koekspresuoja mieloidinius žymenis CD66c, CD13, CD33, taip pat neretai aptinkama CD45 ir CD38 žymenų hipoekspresija ar nebuvimas [119-121].

Žymenų CD10 ir ŽLA-DR hiperekspresija, CD20 ir CD45 hipoekspresija, CD34 dalinė ekspresija ir mieloidinių žymenų koekspresija siejama su t(12;21) translokacija ir geresne prognoze [122].

Kalbant apie ūminę T-limfoblastinę leukemiją, galima teigti, kad tarp sergančiųjų šia liga labiausiai paplitusi su leukemija susijusių aberantinių fenotipų grupė yra ektopinė žymenų ekspresija. Įprastai T-limfocitų brendimas vyksta čiobrialiaukėje, taigi bet koks ankstyvųjų žymenų aptikimas T-limfocitų populiacijoje kraujyje ar kaulų čiulpuose gali būti laikomas aberacija. T-ŪLL atveju didžiausią prognostinę reikšmę turi šios leukemijos diferenciacijos laipsnis. Nustatyta, kad ankstyviausia šios ligos forma (pro T-ŪLL), kurios metu blastai ekspresuoja tik CD7, citoplazminį CD3 ir TdT žymenis pasižymi prastesne prognoze. Ankstyvajai T-ŪLL, ypač turinčiai CD2 žymenį, būdinga kiek geresnė, o vėlyvai ir kortikalinei formai, kuomet randama CD1a, paviršinė CD3 ir CD4 bei CD8 ekspresija – dar geresnė prognozė [123, 124]. Neseniai paskelbti duomenys rodo, kad pagal ląstelių fenotipą galima identifikuoti itin didelės rizikos grupę – labai ankstyvo diferenciacijos laipsnio („kamieninių“ T-ląstelių) leukemiją. Išskirtiniai šios leukemijos fenotipo bruožai yra CD1a ir CD8 nebuvimas, blanki CD5 ekspresija, ankstyvųjų žymenų CD34 ir ŽLA-DR ekspresija bei mieloidinių žymenų CD13, CD33, CD11b ir CD65 koekspresija. Sergančiųjų

šia ligos forma vaikų dešimties metų bendras išgyvenamumas (angl. *overall survival*) tesiekia 19 %, nors sergančiųjų kitomis formomis išgyvenamumas siekia 84 % [125].

Ūminės mielogeninės leukemijos atveju fenotipo aberacijos taip pat gali būti naudojamos prognozei vertinti. Dalis su leukemija susijusių aberantinių fenotipų gali rodyti esant tam tikrų citogenetinių pokyčių, turinčių pripažintą prognostinę reikšmę. Pavyzdžiui, geros prognozės ūminės mielogeninės leukemijos su t(8;21) atveju dažnai aptinkama CD34 žymens hiperekspresija ir CD19 ir CD56 žymenų koekspresija [126-128].

Ūminės promielocitinės leukemijos atveju tėkmės citometrijos metodu taip pat galima ne tik įtarti šią ligą, kuri patvirtinama aptikus t(15;17) translokaciją, bet ir prognozuoti jos eigą. Tipiškam ūminės promielocitinės leukemijos fenotipui būdingi teigiami mieloidiniai žymenys, heterogeniška CD13 ekspresija, neigiamas ŽLA-DR žymuo ir tam tikras CD34 ir CD15 žymenų ekspresijos pobūdis (abu žymenys neigiami arba vienas teigiamas, kitas neigiamas, bet niekada neekspresuojami kartu). CD56 žymens ekspresija šios ligos atveju yra blogos prognozės rodiklis, rodantis galimą allo-trans-retinoinės rūgšties neefektyvumą. Tuo tarpu T-limfoidinio žymens CD2 aptikimas siejamas su palankia ligos eiga [129-132].

CD2 žymens ekspresija taip pat reikšminga diagnozuojant ūminę mielogeninę leukemiją, kurios metu randama 16-os chromosomos inversija. Šiuo atveju ŽLA-DR ekspresija paprastai būna teigiama ir randamas padidėjęs eozinofilų skaičius. Šios ligos prognozė paprastai yra gera [133].

Taip pat tyrinėta ir sergančiųjų ūmine mielogenine leukemija pavienių žymenų ekspresijos prognostinė vertė. Mieloidinio žymens CD13, monocitų žymens CD14 bei ankstyvojo žymens CD34 žymenų ekspresija siejama su mažesniu remisijos dažniu ir trumpesniu ligonių išgyvenamumu. O ligoniams, kurių blastai turi CD15 žymenį, remisija pasiekama dažniau [134-139].

T limfocitų ir NK ląstelių žymuo CD7 aptinkamas iki 37% ūminių mielogeninių leukemijų. Kelios tyrėjų grupės net siūlė tokias leukemijas išskirti į atskirą klinikinę grupę. CD7 koekspresija dažniau sutinkama

jaunesnio amžiaus vyrams, jiems stebima didesnė hepatomegalijos ir neuroleukemijos tikimybė. Standartinė chemoterapija šiems ligoniams dažnai neveikli. Taip pat nustatyti ryšiai tarp CD7 ekspresijos ir citogenetinių pokyčių, pvz., 7-osios chromosomos delecijos [38, 140-142].

Terminalinė dezoksinukleotidil transferazė (TdT) randama limfodinių ląstelių pirmtakų ir piktybinių limfoblastų branduolyje. Taip pat ji aptinkama ~18 % ūminių mielogeninių leukemijų. TdT ekspresija siejama su gana dideliu remisijos dažniu, tačiau CD7 ir TdT koekspresija gali rodyti ir prastesnę ūminės mielogeninės leukemijos prognozę [143, 144].

Taip vadinamas “pan-mieloidinis” fenotipas, kuomet ekspresuojami visi pagrindiniai mieloidiniai žymenys (CD13, CD33, CD117, CD65 ir mieloperoksidazė) siejamas su didesniu remisijos dažniu ir ilgesniu išgyvenamumu [145].

Akivaizdu, kad su leukemija susiję aberantiniai fenotipai gali būti naudojami ūminių leukemijų prognozei vertinti, tačiau išsamių studijų, tiriančių ne pavienius LSAF, bet jų visumą sergančiųjų ūminėmis leukemijos populiacijoje, vis dar trūksta.

2.4.3.2. Minimali liekamoji liga

Taikant modernų gydymą, daugumai sergančiųjų ūminėmis leukemijomis pasiekama pilna klinikinė ir morfologinė remisija – šviesiniu mikroskopu kaulų čiulpuose aptinkama <5% blastų. Morfologinė remisija nustatoma remiantis Chesono ir kt. 1990 m. kriterijais: veniniame kraujyje neutrofilų daugiau kaip $1,5 \times 10^9/l$, trombocitų daugiau kaip $100 \times 10^9/l$, nerandama blastų, kaulų čiulpų ląstelingumas didesnis nei 20%, randama mažiau 5 % blastų ir stebimas visų kraujodaros linijų brendimas [146]. Visgi morfologinės remisijos metu visame ligonio kūne dar gali likti apie 10^{10} leukeminių ląstelių. Leukeminių ląstelių kiekis, aptinkamas pacientui esant morfologinėje remisijoje, vadinamas minimalia liekamąja liga (MLL) [32-34].

Minimali liekamoji liga yra vienas svarbiausių veiksnių, padedančių prognozuoti sergančiųjų ūminėmis leukemijomis išgyvenamumą ir kitus ligos eigos rodiklius. Nors atskiri klinikiniai (leukocitų skaičius, asmens amžius) ar biologiniai parametrai (blastų fenotipas, chromosomų pakitimai) vis dar plačiai naudojami tinkamo intensyvumo gydymui parinkti, jie nėra absoliučiai patikimi. Kai kuriems standartinės rizikos grupei priklausantiems pacientams dėl nepakankamai intensyvaus gydymo liga atsinaujina, tuo tarpu kiti galbūt gauna pernelyg intensyvų ir pernelyg toksišką gydymą. Atsakas į gydymą taip pat priklauso nuo vaisto farmakokinetinių ir individualių ligonių farmakogenetinių ypatybių. Leukeminių blastų skaičiaus mažėjimas gydant atspindi visų šių kintamųjų sumą ir turi svarią prognozinę reikšmę. Net paprastas morfologinis blastų kiekio vertinimas kraujyje ar kaulų čiulpuose gali padėti prognozuoti ligos eigą. Visgi šiuolaikiniai diagnostiniai metodai, tokie, kaip tėkmės citometrija ar polimerazės grandininė reakcija leidžia aptikti 100, 1000 ar net 10000 kartų mažesnius jų kiekius nei šviesos mikroskopu [32-34, 147].

Kadangi tiriant minimalią liekamąją ligą ieškoma itin mažų ląstelių populiacijų, pagrindiniai reikalavimai šiems tyrimams yra: galimybė diferencijuoti tarp leukeminių ir kitų (regeneruojančių, reakcinių) ląstelių (specifiškumas), pakankamas jautrumas (bent 0,1% - 0,01%) bei pritaikomumas klinikinėje laboratorijoje (standartizacija, greitis, kaina). Šiuo metu du pagrindiniai metodai atitinka minėtus reikalavimus: polimerazės grandininė reakcija ir daugiaparametrė tėkmės citometrija. Kiekvienas metodų turi savo privalumų ir trūkumų (1 lentelė) [148].

1 lentelė. Minimalios liekamosios ligos tyrimo metodų palyginimas.

	Tėkmės citometrija	PGR	
		Ig/TCR persitvarkymai	Hibridinių genų transkriptai
Pritaikomumas			
Vaikai			
ŪML	75-85%	<10%	25-30%
B-ŪLL	60-95%	>95%	30-35%
T-ŪLL	>95%	>95%	10-20%
Suaugę			
ŪML	75-85%	<10%	10-20%
B-ŪLL	80-90%	>90%	35-40%
T-ŪLL	>95%	>95%	10-20%
Jautrumas	$10^{-3} - 10^{-4}$	$10^{-4} - 10^{-5}$	$10^{-4} - 10^{-6}$
Privalumai	Greitas tyrimas	DNR stabilumas	Stabilus "taikinyš"
	Specifiškumas pacientui	Specifiškumas pacientui	Nėra normalių ląstelių "fono"
	Tiriamos ir normalios ląstelės		Santykinai nesudėtingas tyrimas
	Tiriama kiekviena ląstelė atskirai		Santykinai greitas tyrimas
	Galima įvertinti ląstelių gyvybingumą		
Trūkumai	Normalių ląstelių "fonas"	Persitvarkymų praradimas	RNR nestabilumas
	Fenotipo pokyčiai	Sudėtingas tyrimas	Įvairus ekspresijos lygis
	Leukeminiai "subklonai"	Normalių ląstelių "fonas"	Ligai specifiskas (užkrato galimybė)

Tėkmės citometriniis minimalios liktinės ligos tyrimas yra laikomas vienu iš efektyviausių dėl pakankamo jautrumo, greičio, santykinio paprastumo ir kainos, galimybės pateikti kiekybinius rezultatus, tirti tik gyvybingas ląsteles, tirti paviršinius ir citoplazminius žymenis vienu metu.

Pagrindinis tėkmės citometrijos metodo trūkumas tiriant minimalią liekamąją ligą – klaidingai neigiamo rezultato galimybė, pakitus blastų fenotipui. Žymenys, aptinkami didžiojoje dalyje blastų populiacijos, diagnozuojant ūminę leukemiją, gali skirtis nuo tų, kurie aptinkami leukeminėje kamieninėje ląstelėje. Atsinaujinusios leukeminės ląstelės jau gali turėti ir kiek pakitusį fenotipą. Jei diagnozuojant ūminę leukemiją aptinkama blastų populiacija nėra homogeniška, o sudaryta iš kiek ankstyvesnių, ir kiek brandesnių ląstelių, jų jautrumas chemoterapijai gali būti nevienodas, todėl gydymo eigoje vienos subpopuliacijos gali išnykti greičiau už kitas, taip imituodamos fenotipo pokyčius. Daugelyje gydymo schemų taikomi kortikosteroidai, veikdami genų transkripciją, taip pat gali sukelti baltymų ekspresijos ląstelių paviršiuje pokyčius. Taikant siaurą, labai individualizuotą žymenų rinkinį, likusių blastų galima neaptikti, o liga visgi gali atsinaujinti. Rečiau sutinkamas atvirkščias reiškinys: gydant išlieka aberantinį fenotipą, tačiau tik nedideles atsinaujinimo galimybes turinti leukeminių blastų subpopuliacija – minimali liekamoji liga kuri laiką nustatoma, tačiau recidyvas neišsivysto [149 - 151].

Žvelgiant iš klinikinės perspektyvos, įrodyta, kad imunologinis minimalios liekamosios ligos tyrimas padeda prognozuoti recidyvus ir suskirstyti ligonius į rizikos grupes [98, 99, 147, 148, 152-155].

Išsamiausiai ištirta vaikų, sergančiųjų ŪLL, minimalios liekamosios ligos, kaip ligos eigos rodiklio, reikšmė. Pirmoji studija, tvirtai įrodžiusi minimalios liekamosios ligos prognostinę vertę, atlikta J. Van Dongeno ir kolegų iš BFM grupės. Tirti 129 vaikai, sirgę ūminėmis limfoblastinėmis leukemijomis ir gydyti pagal BFM 90 protokolą. Remiantis minimalia liekamąja liga, ligoniai suskirstyti į tris rizikos grupes: mažos rizikos, kuriems MLL 33-ą ir 78-ą gydymo dieną buvo neigiama (recidyvų dažnis per trejus metus šioje grupėje buvo 2%), didelės rizikos, kuriems minimali liekamoji liga abiem gydymo etapais buvo $>0,1\%$ (recidyvavo 75% ligonių) ir likusi vidutinės rizikos, kuriuos stebint toliau, minimali liekamoji liga po metų

gydymo arba išnyko (recidyvų dažnis 39%) arba išliko teigiama (recidyvų dažnis 90%) [152].

Kai kurie tyrėjai teigia, kad net vienas minimalios liekamosios ligos tyrimas gali padėti prognozuoti ligos išeitį. H. Cave ir kt. tyrė 178 vaikų, sergančių ŪLL, minimalios liekamosios ligos dydžio po gydymo indukcijos sąsajas su ketverių metų išgyvenamumu be recidyvo. Ligonių, kurių MLL buvo neigiama, šis rodiklis buvo 92%, palyginus su 60% tų, kuriems buvo aptikta teigiama MLL [153]. C. Nyvold ir kolegų iš NOPHO grupės duomenimis, nei vienam iš ligonių, kuriems 29-ą gydymo dieną MLL buvo neigiama, liga per septynerius metus neatsinaujino, o ligonių, kuriems aptikta teigiama MLL, septynerių metų išgyvenamumas be „įvykio“ (angl. *event free survival*) tesiekė 52% [154]. E. Coustan-Smith ir kt. duomenimis, net vienas MLL tyrimas 14-ą gydymo savaitę yra stiprus prognostinis vaikų ūminės limfoblastinės leukemijos veiksnys. Trejų metų išgyvenamumas be recidyvo ligonių, kurių MLL buvo neigiama sudarė 93,4%, o ligonių, kuriems nustatyta teigiama MLL, jis tebuvo 57,9% [155]. M. Dworzak ir kolegų studija pateikia analogiškus rezultatus, blastų skaičių vertinant kiekybiškai: aptikus > 10 blastų/ μ l 33-ą gydymo dieną ir > 1 blasto/ μ l 12-ą gydymo savaitę, išgyvenamumo be recidyvo rodiklis yra 0%, lyginant su 94% likusiųjų [147].

Nors studijų, tyrusių suaugusiųjų, sergančių ūmine limfoblastine leukemija minimalios liekamosios ligos, kaip prognostinio rodiklio, vertę, mažiau, jos taip pat įrodo šio rodiklio svarbą. M. Bruggemann su kolegomis teigia, kad standartinės rizikos ŪLL sergančius suaugusiuosius pagal minimalios liekamosios ligos dydį 11-ą, 24-ą gydymo dieną ir 16-ą gydymo savaitę galima sugrupuoti į 3 papildomas grupes: mažos rizikos, kuriems 11-ą ir 24-ą dieną MLL $< 0,01\%$), didelės rizikos, kuriems 24-ą dieną ir 16-ą savaitę MLL $> 0,01\%$ ir vidutinės rizikos, kuriai priklauso visi likę ligoniai. Recidyvų dažnis per trejus metus šiose grupėse labai skyrėsi ir buvo atitinkamai 0%, 94% ir 47% [156].

Analogiškus rezultatus gavo ir M. Vidriales bei kolegų grupė, kuri tyrė ŪLL sergančių paauglių ir suaugusių minimalią liekamąją ligą 14-ą ir 35-ą

gydymo dieną. 90% ligonių, kurių MLL 14-ą gydymo dieną buvo $< 0,03\%$, penkerius metus išgyveno be recidyvo. Ir atvirkščiai, visiems ligoniams, kurių MLL 35-ą dieną buvo $> 0,1\%$ per penkerius metus liga atsinaujino [157]. Lenkijos tyrėjų grupė nustatė, kad ligonių, sergančių ŪLL ir neturinčių Filadelfijos chromosomos, kuriems po indukcijos kurso nustatyta MLL $< 0,1\%$, trejų metų išgyvenamumas be recidyvo buvo 9%, palyginus su 71% likusiųjų [158].

Šiuo metu minimalios liekamosios ligos dydis jau plačiai naudojamas, skirstant sergančiuosius ūminėmis limfoblastinėmis leukemijomis į rizikos grupes bei pritaikant jiems tinkamą gydymą.

Ūminių mielogeninių leukemijų minimalios liekamosios ligos pritaikymo gydymui individualizuoti tyrimai dar vykdomi. Situacija yra sudėtingesnė dėl to, kad tėkmės citometrijos metodas, ypač neturint daugiaspalvės tėkmės citometrijos galimybių, yra kiek mažesnio jautrumo, nei tiriant ŪLL, o PGR metodu minimalią liekamąją ligą įmanoma tirti tik mažiau nei pusei ligonių: molekuliniai pakitimai aptinkami tik daliai ligonių, be to, ne visus juos įmanoma tirti pakankamu jautrumu. Tėkmės citometrijos metodas gali būti pritaikomas didesnei daliai sergančiųjų ŪML minimaliai liekamajai ligai tirti, bet turi savų ypatumų: ŪML atveju žymenų ekspresija dažnai yra heterogeninė, aptinkamos kelios blastų subpopuliacijos, su leukemija susiję aberantiniai fenotipai yra mažesnio specifiškumo [159]. Todėl minimalios liekamosios ligos tyrimas tėkmės citometru įmanomas, tik užtikrinus galimybę tirti kuo daugiau ląstelės rodiklių vienu metu (mažiausiai 6), iširti didelį skaičių ląstelių (mažiausiai 100 000) ir palyginti ligonio ir sveiko asmens kaulų čiulpų tėkmės citometrinių tyrimų rezultatus.

Daugumoje pirmųjų studijų, tyrusių minimalios liekamosios ligos prognostinę vertę, buvo įtraukiama tik nedidelė dalis ŪML ligonių, turinčių tam tikrą fenotipo aberaciją. Pvz., D. Campana tyrė ŪML, kurių metu blastai ekspresavo TdT žymenį, paprastai aptinkamą limfoidinių ląstelių pirmtakų branduolyje, minimalios liekamosios ligos dydžio sąsajas su ligos eiga. Recidyvas išsivystė visiems keturiems iš 7 ligonių, kuriems aptikta teigiama

minimali liekamoji liga, ir tik vienam iš trijų, kuriems minimalios liekamosios ligos neaptikta [160]. Vėlesnėje tų pačių tyrėjų studijoje jau tirta 13 ligonių, kuriems esant remisijoje atlikta alogeninė kaulų čiulpų transplantacija. Liga atsinaujino visiems keturiems ligoniams, kuriems aptikta minimali liekamoji liga (vidutiniškai per 2 mėnesius nuo aptikimo), ir tik dviems iš septynių, kuriems minimalios liekamosios ligos neaptikta (per metus po transplantacijos) [32].

Iki šiol diskutuojama, kada tikslingiausia tirti minimalią liekamąją ligą. C. Readingo ir kolegų duomenims, tiriant minimalią liekamąją ligą po gydymo indukcijos, šešiams iš 16 ligonių, kuriems tuo laikotarpiu aptikta $>0,2\%$ aberantinį fenotipą turinčių blastų, ir tik vienam iš likusių 10, per 7 mėnesius liga atsinaujino [161]. J. San Miguel su kolegomis ŪML sergančius ligonius išskiria net į keturias rizikos grupes pagal minimalios liekamosios ligos dydį po gydymo indukcijos: labai mažos rizikos (MLL $<0,01\%$), mažos rizikos (MLL $0,01\% - 0,1\%$), vidutinės rizikos ($0,1\% - 1\%$) ir didelės rizikos ($>1\%$), kurių trejų metų išgyvenamumas be recidyvo buvo atitinkamai 100%, 85%, 55% ir 15% [162]. A. Venditti ir kt. nustatė, kad minimalios liekamosios ligos riba $3,5 \times 10^{-4}$ ($0,035\%$) po gydymo konsolidacijos padeda išskirti mažos ir didelės rizikos grupes. Per trejus metus liga atsinaujino 17% ir 77% atitinkamų grupių ligonių [163]. Vėlesnė tų pačių tyrėjų studija parodė, nepaisant minimalios liekamosios ligos dydžio po gydymo indukcijos, jos dydis po gydymo konsolidacijos yra esminis prognostinis rodiklis, numatant ligos eigą (riba $0,035\%$) [164].

Apibendrinant galima teigti, kad minimali liekamoji liga, tiriama patikimais standartizuotais diagnostiniais metodais, gali būti taikoma ūminių reikiamo intensyvumo ūminių limfoblastinių leukemijų gydymui parinkti. Ypač svarbus rodiklis, išskiriantis labai geros prognozės ligonių grupę – ankstyvas (po indukcijos ar net anktyvesnis) minimalios liekamosios ligos išnykimas. Minimali liekamoji liga padeda numatyti ir gresiančius sergančiųjų ūmine mielogenine leukemija recidyvus (taikant ar netaikant gydymo pakeitimų).

2.4.3.3. Dauginis atsparumas vaistams

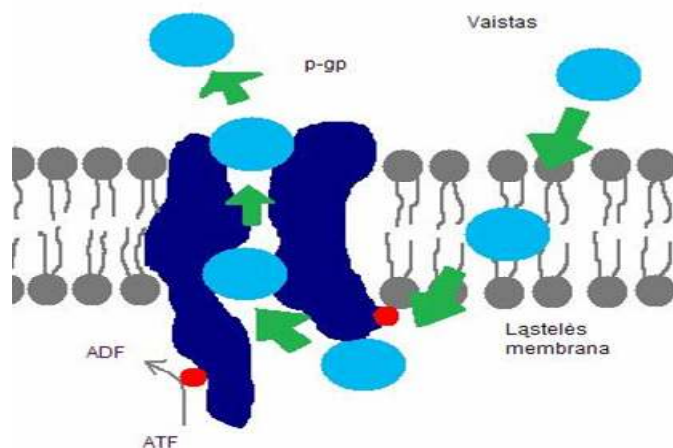
Viena iš pagrindinių ūminių leukemijų atsinaujinimo priežasčių yra piktybinių ląstelių atsparumas vaistams. Atsparių ląstelių gali būti aptinkama jau diagnozuojant ūminę leukemiją arba dėl savaiminių mutacijų jų gali atsirasti vėliau. Atsparios vaistams ląstelės gali išlikti per visą gydymą ir išstumti jautrias ląsteles [165]. Dažnai ląstelės yra atsparios ne vienam, o daugeliui struktūriškai ir funkciškai skirtingų vaistų (dauginis atsparumas vaistams, DAV). DAV išsivystymo būdai įvairūs: padidėjusi transportinių baltymų ekspresija, molekulių taikinių tankio sumažėjimas ląstelės membranoje, pagreitėjęs DNR atsinaujinimo procesas, ląstelės ciklo reguliacijos, apoptozės kelių pokyčiai vėžinėse ląstelėse, taip pat sumažėjęs vaistų įsisavinimas ar pakitęs jų metabolizmas [166, 167].

Vienas labiausiai ištirtų DAV mechanizmų – tai transmembraninių baltymų (vadinamųjų siurblių) lemiamas citotoksinių medžiagų išstūmimas iš vėžio ląstelės ir taip mažėjantis jų kaupimasis. Didžioji dalis šių siurblių priskiriami ATF jungties pernašos baltymų superšeimai, dar vadinamai ABC nešikliais (angl. *ATP binding cassette, ABC*). Šios superšeimoms baltymų aptinkama ir nevėžinėse ląstelėse ir jie yra atsakingi už didelę pernašos funkcijų įvairovę, pvz., jai priklauso epitelio nešikliai CTFR (jų genai mutuoja cistinės fibrozės atveju), kepenų tulžies rūgščių nešikliai cBAT, už antigenų procesingą T limfocituose atsakingi baltymai (TAP), cholesterolio ir fosfolipidų išstūmimą iš ląstelių užtikrinantys baltymai (ABCA1). Šiuos baltymus koduojantys genai filogenezės metu kito nedaug ir tai rodo jų svarbą saugant organizmo ląsteles nuo gamtoje esančių toksinų (ksenobiotikų). Žmonių ir kitų žinduolių organizmuose šie nešikliai užtikrina toksinų pašalinimą kepenyse ir inkstuose, kraujo ir smegenų barjero funkcionavimą, užuomazginių ir kamieninių ląstelių apsaugą [168–170].

Pirmasis ir plačiausiai aprašytas su dauginiu atsparumu vaistams susijęs membraninis siurblys – p-glikoproteinas (p-gp). 1976 m. R. Juliano ir V. Ling išskyrė p-gp iš atsparių Kinijos žiurkėno patelės kiaušidžių ląstelių.

P-gp yra koduojamas 7-osios chromosomos ilgajame petyje esančio MDR1 geno. Tai 170 kDa baltymas, susidedantis iš dviejų homologiškų domėnų, kurių kiekvienas turi po 6 transmembraninius hidrofobiškus segmentus ir adenzinotrifosfato (ATF) molekulę surišančią vietą [171] (3 pav.).

3 pav. P-gp membraninio nešiklio vykdomo transporto schema.



P-gp atsakingas už tokių substratų, kaip antraciklinai, taksanai, vinka alkaloidai, epipodofilotoksinai ir kitų pernašą [172]. Padidėjusi p-gp ekspresija dažnai nustatoma kraujodaros sistemos neoplazijų (ŪML, ŪLL, limfomų) atvejais. Dažniau ji aptinkama tiems, kurie jau buvo gydyti citostatikais (antrinis atsparumas), ir išsivysto dėl atsparių ląstelių selekcijos gydant, taip pat dėl priešvėžinių vaistų aktyvintos p-gp transkripcijos [172, 173]. Kadangi ŪL gali išsivystyti iš p-gp fenotipą turinčios kamieninės kraujodaros ląstelės, šis žymuo gali būti ekspresuojamas jau ligos pradžioje, pvz., p-gp ekspresija nustatoma net ~19–75 % negydytų ŪML atvejų. P-gp ekspresija diagnozės metu turi įtakos ne tik remisijos dažniui, bet ir jos trukmei ir ilgalaikiam išgyvenamumui [174–178]. ŪLL atveju padidėjusi p-gp ekspresija aptinkama ~38 % atvejų ir yra nepriklausomas blogos prognozės veiksnys tiek vaikams, tiek suaugusiesiems [179].

Kitas ATF jungiančių pernašos baltymų superšeimai priklausantis baltymas, kuris dalyvauja DAV patogenezėje – su dauginiu atsparumu susijęs

baltymas 1 (angl. *multidrug resistance protein 1*, MRP1). Tai nuo ATF priklausantis membraninis siurblys, išstumiantis iš ląstelės su glutationu sujungtas ksenobiotines medžiagas. MRP baltymų grupė susideda iš devynių MRP homologų (MRP1–MRP9). Pirmą kartą MRP1 išskyrė S. Cole su kolegomis iš doksorubicinui atsparios smulkialąstelinio vėžio ląstelių linijos [180]. Tai 16-oje chromosomoje esančio MRP1 geno koduojamas 160 kDa N-glikozilintas anijoninis nešiklis, randamas ne tik ląstelės membranoje, bet ir endoplazminiame tinkle bei Goldžio komplekse [181]. Nuo MRP1 priklausantis atsparumo spektras panašus, kaip ir p-gp. *In vitro* padidėjusi MRP1 ekspresija siejama su atsparumu antraciklinams, vinka alkaloidams, epipodofilotoksinams, kamptotecinams ir metotreksatui, bet ne taksanams ir mitoksantronui. ~50% naujų ŪML atvejų blastuose randama didesnė nei normaliose kraujo ląstelėse MRP1 ekspresija [182]. Atkritusių ŪML ligonių MRP1 ekspresija didesnė nei naujai susirgusiųjų [183]. Dažnai pasitaiko MRP1 ir p-gp koekspresija [184, 185]. Ir nors izoliuoto MRP1 ekspresijos padidėjimo klinikinė reikšmė nėra visiškai aiški, mišri ekspresija turi ryškia neigiamą įtaką atsakui į gydymą ir ligonių išgyvenamumui [186-189].

Pastarąjį dešimtmetį ištirta ir nemažai kitų veiksnių, galinčių sukelti leukemijos atsparumą gydymui. Įrodyta, kad plaučių atsparumo baltymo LRP lygis koreliuoja su ūminės mielogeninės leukemijos remisijos dažniu, atsparumu gydymui ir bendru išgyvenamumu. Taip pat buvo rasta padidėjusi LRP ekspresija atkritusiems ŪML ligoniams, kuriems pirminės gydymo schemos buvo papildytos p-gp inhibitoriumi ciklosporinu (antrinis atsparumas kaip atsakas į p-gp sukulto atsparumo reversiją) [190, 191]. O štai krūties vėžio atsparumo ekspresijos klinikinė vertė neįrodyta [192].

Sumažėjęs topoizomerazės II, kuri yra antraciklinių ir epipodofilotoksinų ląstelinis taikinytis siejamas su prastesniu atsaku į gydymą, o indukavus didesnę jos lygį, gydymo rezultatai geresni [193, 194]. Nuo citarabino priklausomas atsparumas vaistams apibūdinamas sumažėjusiu deoksicitidinkinazės (dCK), kuri metabolizuoja citarabiną į aktyvią trifostato formą, ir padidėjusiu jį metabolizuojančio fermento citidindeaminazės (CDD)

lygiu. Kadangi citarabinas įeina į daugumą ŪML gydymo schemų, šis atsparumo mechanizmas galėtų turėti klinikinės reikšmės. Viena studija įrodė vyresnių ŪML sergančių ligonių atsparumo citarabinui įtaką ligos prognozei [195]. Apoptozės žymenų (bcl-2 ir kt.) hiperekspresija taip pat siejama su atsparumu vaistams ląstelių kultūrose, tačiau patikimų duomenų apie koreliaciją su gydymo rezultatais nėra daug [196].

Atsparumas vaistams gali būti tiriamas keliais būdais. Tradiciniu būdu DAV nustatomas tiriant ląstelių išgyvenimą (angl. *cell survival assays*) citotoksinių vaistų aplinkoje. Visgi šis tyrimas užima daug laiko (keletą dienų) ir yra sunkiai pritaikomas pacientų mėginiams. Su atsparumu vaistams susijusių baltymų mRNR gali būti tiriama polimerazės grandininės reakcijos su atvirkštine transkriptaze metodu. Metodas taip pat sunkiai pritaikomas kasdienėje klinikinėje praktikoje, be to, mRNR kiekis nebūtinai koreliuoja su DAV baltymų ekspresija ar funkcija. DAV baltymų ekspresija gali būti nustatoma imunohistocheminiais ar tėkmės citometrijos metodais, naudojant monokloninius antikūnus prieš ląstelės paviršiuje esančius šių baltymų epitopus. Sukurti antikūnai ir prieš paviršinius MRP1 epitopus, o kai kurie antikūnai prieš p-gp, pridėjus substrato, yra jautrūs konformaciniams pokyčiams.

Funkciniai DAV tyrimai nustato pernašos baltymų aktyvumą. Daugelis tokių tyrimų gali būti atliekama tik mokslinių tyrimų laboratorijų sąlygomis (pvz., radioaktyviųjų substratų pernašos tyrimai, ATF'azės aktyvumo nustatymas). Labiausiai paplitę fluorescencijos matavimais grindžiami funkciniai dauginio atsparumo vaistams tyrimai. Jie yra pasiskirstymo ir kaupimo tipo, kuomet matuojamas fluorescencinės medžiagos pasiskirstymas ląstelėje ir už jos ribų (pvz., rodamino-123) arba fluorescencinė medžiaga kaupiama ląstelėje dėl jungimosi su viduląstelinėmis struktūromis ar viduląstelinės fermentinės modifikacijos (pvz., acetometoksikalceino virtimas kalceinu) [197–202].

Su DAV susijusių membraninių nešiklių stabilumo problema vis dar kontraversiška. Dalis tyrėjų teigia, kad chemoterapinių vaistų poveikyje šių

nešiklių ekspresija vėžio ląstelėse padidėja. Štai X. Hu ir kolegų studijoje nustatyta, kad p-gp ekspresija šviežiai izoliuotose blastų ląstelėse padidėjo vos po 16 valandų inkubacijos su klasikiais p-gp substratais – epirubicinu, daunorubicinu ir idarubicinu bei nauju antraciklinų analogu MX2 [203]. J. Weisburg ir kt. taip pat įrodė p-gp ekspresijos padidėjimą ne tik paveikus vėžio ląstelės chemoterapiniais vaistais, bet ir įvedus į jas retrovirusą MDR1 geną, koduojantį p-gp [204].

Vis tik kiti tyrėjai teigia, kad membraninių nešiklių ekspresija nesikeičia diagnozuojant ūminę leukemiją ir tiriant blastus gydymo metu ar ligai atsinaujinus. Pvz., M. van der Pol 2003 m. nustatė funkcinį p-gp aktyvumą 36 iš 45, o MRP1 aktyvumą 26 iš 44 ŪML sergančių asmenų. Nebuvo pastebėta jokių reikšmingų pokyčių stebint ligos eigą (tiriant minimalią liekamąją ligą ar ligos recidyvą) [205]. M. Van der Heuvel-Eibrink savo 2002 m. darbe nustatė, kad MDR1 (p-gp koduojančio geno) ir MRP1 mRNR ekspresija diagnozuojant ŪL ir jos recidyvo metu reikšmingai nesiskyrė [206]. Tai reikštų, kad nustatant DAV sukeliančių membraninių nešiklių ekspresiją ir jų funkciją jau ligos pradžioje, galima būtų prognozuoti jos eigą.

Studijų, siejančių blastų dauginio atsparumo vaistams rodiklius diagnozuojant ūminę leukemiją ir tolimesnę jos eigą vertinant ją laboratoriškai, nėra daug.

J. San Miguel su kolegomis 2002 m. studijoje įrodė, kad funkcinis DAV, tirtas rodamino 123 testo pagalba, koreliavo su blastų skaičiumi ŪML gydymo indukcijos pabaigoje. Pacientai, kuriems šiame gydymo etape buvo rasta 0,5% ar daugiau blastų, diagnozuojant ŪML rodamino 123 iš vėžinės ląstelės buvo pašalinama daugiau (vid. $56\% \pm 24\%$) negu tiems, kuriems po indukcijos minimali liekamoji liga buvo mažesnė nei 0,5% (vid. $32\% \pm 31\%$, $p=0,04$) [162].

A. Venditti ir kt. 2000 m. darbe nustatė p-gp ekspresijos diagnozuojant ŪML sąsajas su minimalia liekamąja liga po gydymo konsolidacijos: teigiama

p-gp ekspresija koreliavo su didesne nei 0,035% minimalia liekamąja liga ($p=0,031$) [163].

M. van der Pol 2003 m. studijoje nustatyta koreliacija tarp p-gp aktyvumo lygio po antro indukcijos kurso ir po konsolidacijos ir minimalios liekamosios ligos lygio (atitinkamai $\rho=0,306$, $p=0,073$ ir $\rho=0,379$, $p=0,057$). Ir atvirkščiai, išskiriant pacientus su mažais ir dideliais MLL lygiais (riba – 0,03%) po antro indukcijos kurso ir po konsolidacijos, jų p-gp aktyvumas diagnozuojant ryškiai skyrėsi (po indukcijos p-gp indeksas 1,41 ir 1,09, Mann-Whitney U-testo $p=0,044$, po konsolidacijos p-gp indeksas 2,13 ir 1,14, $p=0,018$). Tyrėjai ieškojo ir MRP1 koreliacijos su minimalia liekamąja liga, tačiau šio ryšio įrodyti nepavyko [205].

Dauginio atsparumo vaistams rodiklių sąsajos su leukeminiais fenotipais iširtos menkai. O. Legrand ir kolegų studijoje, tyrusioje sergančiųjų ūmine mielogenine leukemija imunofenotipo prognostinę reikšmę, buvo nustatyta, kad ligoniai, ekspresuojantys „panmieloidinį“ fenotipą (pagrindinius 5 mieloidinius žymenis ir neturintys aberacijų), pasižymi mažesniu p-gp aktyvumu, kuris nustatytas metil-tiazol-tetrazolio testu ($0,37\pm 0,26$ lyginant su $0,52\pm 0,25$ likusiųjų, $p=0,05$). Šioje studijoje taip pat rasti teigiami ryšiai tarp p-gp aktyvumo ir CD34 ekspresijos ir neigiami – tarp p-gp aktyvumo ir CD10, CD14, CD33, CDw65 ir TdT žymenų ekspresijos [145]. Analogiški rezultatai gauti ir kituose biomedinininiuose tyrimuose: teigiama CD34 koreliacija su p-gp ekspresija nustatyta P. Te Boekhorst ir kolegų studijoje, o C. Wurcher ir kt. studijoje aptikta neigiama koreliacija tarp p-gp ir CD14 bei CD65 žymenų ekspresijos [207, 208]. Yra duomenų, kad CD7 žymens ekspresija sergančiųjų ūmine mielogenine leukemija siejasi su p-gp geno aptikimu [209]. Dauginio atsparumo vaistams rodiklių ryšiai su ūminių limfoblastinių leukemijų fenotipais beveik netirti.

Duomenų DAV rodiklius laikyti ūminių leukemijų, ypač ūminės mielogeninės leukemijos, prognostiniais veiksniais pakanka, tačiau egzistuoja keletas metodologinių problemų: nėra optimalaus standartizuoto jų nustatymo metodo (tiriant tėkmės citometru, taikomos skirtingos nustatymo ribos,

vertinant funkcinį aktyvumą, naudojami skirtingi substratai), o sąsajos su leukeminiais fenotipais ištirtos menkai.

3. Tyrimo medžiaga ir metodai

3.1. Tyrimo sumanymas

Tai analizinis stebėjimo tyrimas. Siekta patikrinti hipotezę, kad su leukemija susiję aberantiniai fenotipai, atspindintys „nutolimą“ nuo sveikų kraujodaros ląstelių pirmtakų turi įtakos ligos eigai: jie siejasi su dauginio atsparumo vaistams rodikliais ir per šį mechanizmą – su minimalios liekamosios ligos dinamika.

Visi rodikliai (LSAF, MLL, DAV) tirti tėkmės citometrijos metodu. Tėkmės citometrijos metodas – ne tik pakankamai jautrus, tikslus ir patikimas diagnostinis metodas, bet turi ir kitų privalumų, kurie lemia jo ypatingą reikšmę klinikinėje laboratorijoje, t.y. jis gali būti pritaikomas didžiąjai daliai ligonių, atliekamas greitai (rezultatus galima pateikti po 3-4 valandų), o tyrimo kaina, atsižvelgiant į pateikiamos informacijos reikšmingumą, yra santykinai neaukšta. Kiti šio tyrimo privalumai yra galimybė tirti daug ląstelės parametrų vienu metu, vertinti ląstelių gyvybingumą, tirti ląstelės paviršiaus, citoplazmos ir net branduolio žymenis.

Jei šis tyrimo metodas jau įsitvirtinęs ūminių leukemijų diagnostikos algoritme, tai jo vaidmuo prognozuojant ūminių leukemijų eigą nėra iki galo ištirtas. Minimali liekamoji liga yra pripažintas prognostinis ūminių leukemijų veiksnys, tačiau ji tiriama, jau pradėjus gydymą. Mūsų tikslas buvo parodyti, kad jau diagnozuojant ūminę leukemiją, tėkmės citometriniu tyrimu gali pateikti daug informacijos apie blastų savybes, galinčias lemti atsaką į gydymą: su leukemija susijusių aberantinių fenotipų ir dauginį atsparumą vaistams.

Diagnozuojant ūminę leukemiją, sergantiesiems B-ŪLL buvo vertinama 17 su leukemija susijusių aberantinių fenotipų, sergantiesiems T-

ŪLL – 18 su leukemija susijusių aberantinių fenotipų ir sergantiesiems ŪML – 25 su leukemija susiję aberantiniai fenotipai. Remiantis kiekvienu LSAF, ligoniai buvo skirstomi į dvi grupes (turintys ir neturintys atitinkamo LSAF) ir vertinamas kiekvienos grupės blastų skaičiaus vidurkis aštuoniais gydymo etapais: diagnozuojant ūminę leukemiją, indukcijos metu, po indukcijos, konsolidacijos metu, po konsolidacijos ir, esant poreikiui, 4-ą, 5-ą ir 6-ą gydymo mėnesį.

Dauginis atsparumas vaistams buvo tiriamas kiekybiškai, vertinant vidutinį p-gp, MRP1 ir kalceino fluorescencijos intensyvumą. Buvo vertinami šių rodiklių vidurkiai išskirtose LSAF grupėse bei nustatomos jų sąsajos su minimalios liekamosios ligos dydžiu aštuoniais gydymo etapais.

Siekta surasti prognostiškai reikšmingus LSAF, t.y. tuos, kurie turi įtakos minimalios liekamosios ligos dydžiui ir pasižymi dauginiu atsparumu vaistams.

3.2. Tiriamieji

Pacientai. Į tyrimą buvo įtraukti pirmą kartą ūminėmis leukemijomis susirgę ligoniai, 2005 – 2009 m. gydyti Vilniaus Universiteto ligoninės Santariškių klinikų Hematologijos, onkologijos ir transfuziologijos centre bei Vilniaus Universiteto Vaikų ligoninės Onkohematologijos centre. Įtraukti tik tie ligoniai, kuriems buvo numatoma skirti intensyvią chemoterapiją ir tirti minimalią liekamąją ligą (paliatyviai gydomi ligoniai neįtraukti). Jei dėl tam tikrų priežasčių (ligonio mirtis, gydymo atsisakymas ar nepakankamai specifiškos fenotipo aberacijos) minimali liekamoji liga nebuvo tiriama, pacientas buvo pašalinamas iš tyrimo. Tyrimui gautas Lietuvos Bioetikos komiteto leidimas (tyrimas vykdytas kaip dalis studijos „Naujų ūminių ir lėtinių leukemijų remisijos diagnostikos metodų paieškos ir tyrimai“).

Kontrolinė grupė. Kaip kontrolinė grupė, minimalios liekamosios ligos tyrimo optimizavimui, su leukemija susijusių aberantinių fenotipų specifiškumo nustatymui ir dauginio atsparumo vaistams tyrimui įtraukta 12 sveikų kaulų čiulpų donorų.

3.3. Tyrimo metodai

Tyrimai atlikti iš pacientų ir sveikų asmenų kaulų čiulpų ėminių. Punkcijos būdu buvo imama 4–5 ml kaulų čiulpų ir perpilama į du vakuuminius mėgintuvėlius su K₃EDTA.

Tyrimai buvo atlikti Vilniaus Universiteto ligoninės Santariškių klinikų Laboratorinės diagnostikos centro Hematologijos ir bendrosios citologijos laboratorijoje. Blastų imunofenotipo tyrimas ir minimalios liekamosios ligos tyrimai buvo atliekami per 24 valandas, funkcinis atsparumo vaistams tyrimas dėl galimo ATF išsekimo blastuose – per 6 val. po ėminio paėmimo.

Atliekamų tyrimų schema:

- 1) Diagnozuojant ūminę leukemiją:
 - a. Blastų imunofenotipo tyrimas:
 - nustatoma fenotipinė leukemijos diagnozė,
 - įvertinami su leukemija susiję aberantiniai fenotipai.
 - b. Dauginio atsparumo vaistams tyrimai (daliai ligonių):
 - p-gp ir MRP1 ekspresijos tyrimas,
 - funkcinis DAV tyrimas - kalceino testas.
- 2) Minimalios liekamosios ligos tyrimai:
 - a. Ūminių limfoblastinių leukemijų:
 - gydymo indukcijos metu (11-15 d.),
 - po gydymo indukcijos (29-35 d.),
 - gydymo konsolidacijos metu pagal klinikinę situaciją (36-76 d.),
 - po gydymo konsolidacijos (77-90 d.)

- 4-a, 5-a, 6-a gydymo mėnesį pagal klinikinę situaciją.
- b. Ūminių mielogeninių leukemijų: po pirmosios indukcijos ir 1-a, 2-a, 3-a, 4-a, 5-a, 6-a gydymo mėnesį pagal klinikinę situaciją.

3.3.1. Leukemijų diagnostika ir aberantinių fenotipų tyrimas

Blastų imunofenotipo tyrimai buvo atliekami, taikant dr. Rėdos Matuzevičienės įdiegtą ir 2003 m. daktaro disertacijoje aprašytą metodiką [37]. Laboratorijoje pradėjus naudoti pažangesnį tėkmės citometrą – FACS Canto (BD, JAV), leukemijų fenotipui tirti pradėti taikyti keturspalviai monokloninių antikūnų, žymėtų FITC, PE, PerCP-Cy5,5 ir APC fluorochromais, deriniai.

Mėginiai ruošti, taikant lizuoto „viso“ kraujo techniką (angl. *Lysed Whole Blood*). 100 µl kraujo ar kaulų čiulpų buvo inkubuojama su 20 µl titruotų antikūnų ląstelių paviršiaus dažymui (lentelė 2).

2 lentelė. Žymenys, naudojami ūminių leukemijų fenotipui tirti.

Žymenys	CD klasifikacija
Ankstyvieji ir linijai nespecifiniai žymenys	CD34, CD38, CD45, CD99, CD117, ŽLA-DR, TdT, CD10, CD56
Mieloidiniai žymenys	CD13, CD14, CD15, CD33, CD11c, CD64, CD66c, MPO
T-limfoidiniai žymenys	CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8
B-limfoidiniai žymenys	CD19, CD20, CD22, CD79a, IgM
Megakariocitiniai žymenys	CD41a, CD61
Etritroidiniai žymenys	CD71, CD235a

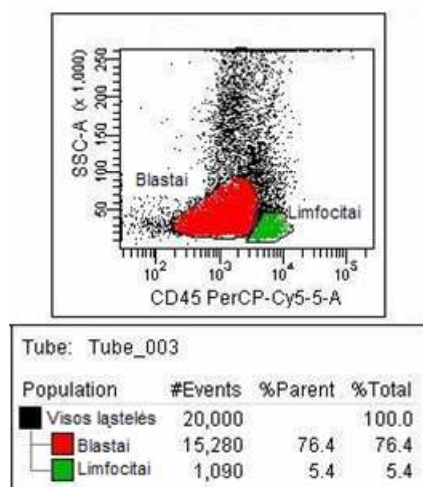
Mėginyje esantys eritrocitai buvo suardomi tam skirtu hipotoniniu tirpalu (*FACS Lysing Solution*, BD, JAV), atliekamos dvi plovimo procedūros

fosfatinu buferiniu tirpalu (PBS). Viduląsteliniams žymenims aptikti buvo atliekama ląstelių permeabilizacija jų membranos pralaidumą didinančiu tirpalu (*FACS Permeabilizing Solution, BD, JAV*). Mėginys fiksuojamas *Cell Fix (BD, JAV)* tirpalu, kurio pagrindą sudaro paraformaldehidas.

Nespecifiniam antikūnų prisijungimui įvertinti naudotas izotipų kontrolės reagentas (*Mouse IgG1, klonas X40, BD, JAV*). Vidinė tėkmės citometro kokybės kontrolė buvo atliekama, kasdien tiriant *Multi-Check Control (BD, JAV)* mėginį su žinomomis limfocitų subpopuliacijų reikšmėmis. Techninių analizatoriaus parametrų stabilumas užtikrinamas ir stebimas, naudojant tam skirtą kalibratorių *7 color setup beads (BD, JAV)*.

Mėginiai tiriami *FACS Canto (BD, JAV)* tėkmės citometru, duomenys renkami ir analizuojami *FACS Diva* programa. Diagnozuojant ūmines leukemijas, buvo renkama 30 000 ląstelių. Blastų populiacija apibrėžiama pagal šoninę spindulio sklaidą ir blankią CD45 žymens ekspresiją (4 pav.). Paviršiniams žymenims taikyta 20% ribinė vertė (žymuo laikomas teigiamu, kai jį ekspresuoja 20% blastų populiacijos), viduląsteliniams žymenims – 10% ribinė vertė.

4 pav. Blastų populiacijos identifikavimas pagal šoninę spindulio sklaidą ir CD45 ekspresiją: blastai (raudona spalva) apibrėžiami kaip mažos šoninės sklaidos ir blankios CD45 ekspresijos ląstelės.



Imunofenotipinė ūminių leukemijų kilmė nustatoma, remiantis Europos leukemijų imunologinės klasifikacijos grupės rekomendacijomis [210]. Ūminė B-limfoblastinė leukemija diagnozuojama, kai blastai ekspresuoja bent 2 iš šiai linijai specifinių žymenų: CD19, CD79a ar CD22. Ūminė T-limfoblastinė leukemija nustatoma, aptikus paviršinį ar citoplazminį CD3 žymenį. Ūminė mielogeninei leukemijai diagnozuoti būtini bent 2 iš linijai specifinių žymenų: MPO, CD13, CD33 ar CD117. Detalesnė diagnozė, jei įmanoma, nustatoma, taikant PSO hematopoezinių ir limfoidinių navikų klasifikacijos kriterijus [69].

Ūminės leukemijos diagnozės nustatymo metu taip vertinti su leukemija susiję aberantiniai fenotipai. Tyrimo pradžioje su leukemija susiję fenotipai buvo vertinami, nustatant nukrypimą nuo literatūroje aprašytų sveikų asmenų kraujodaros ląstelių pirmtakų fenotipų [211-215].

Su leukemija susijęs aberantinis fenotipas buvo laikomas kaip egzistuojantis tam tikroje blastų populiacijoje tada, kai buvo randamas daugiau kaip 50% populiacijos. Vertinant žymenų ekspresijos pakitimus, neigiama riba laikyta izotipinės kontrolės fluorescencija, o teigiama – sveikų tos pačios kilmės mėginyje esančių ląstelių fluorescencija. Pvz., asinchroninė žymenų ekspresija CD34+CD11c+ ŪML atveju fiksuota tuomet, kai bent 50% blastų populiacijos ekspresavo abu žymenis, CD45 hipoekspresija B-ŪLL atveju fiksuota, kuomet 50% blastų šio žymens neekspresavo, o CD7 hiperekspresija T-ŪLL atveju buvo pažymima, kai bent 50% blastų turėjo didesnę, nei sveikų mėginyje likusių T limfocitų ir NK ląstelių šio žymens ekspresiją.

Vertinamų LSAF sąrašas ir klasifikacija pateikiami 3 lentelėje.

3 lentelė. Darbe vertintų su leukemija susijusių aberantinių fenotipų sąrašas ir klasifikacija.

	Asinchroninė žymenų ekspresija	Žymenų hipoekspresija	Žymenų hiperekspresija	Kitų linijų žymenų ekspresija	Ektopinė žymenų ekspresija
B-ŪLL	CD10++TdT+ CD10- TdT- CD10- CD34+ CD10++CD20++ CD22++CD34+ CD45-TdT- CD45-CD34- CD10-CD20-CD34+	CD10 CD22 CD38 CD45 TdT	CD10 CD34	CD13 CD33 CD15	-
T-ŪLL	-	CD2 sCD3 cCD3 CD5 CD7 CD45	CD7	CD13 CD33 CD56 CD117	TdT CD34 CD99 CD10 CD1a CD4+CD8+ CD4-CD8-
ŪML	CD34+ŽLA-DR- CD117+CD33+ŽLA-DR- CD117+CD34-CD15- CD34+CD11c+ CD34+CD15+ CD34+CD14+ CD34+CD56+ CD34+CD64+ CD117+CD11c+ CD117+CD64+ CD117+CD56+ CD45 bl CD4+ CD13+CD33+ CD56+	CD13 CD33 CD38 ŽLA-DR	CD33 CD34	CD2 CD5 CD7 CD19 CD22 TdT	-

3.3.2. Minimalios liekamosios ligos tyrimas

Vilniaus Universiteto ligoninės Santariškių klinikų Laboratorinės diagnostikos centro Hematologijos ir bendrosios citologijos laboratorijoje buvo įdiegtas originalus standartizuotas minimalios liekamosios ligos tyrimas.

Tiriant minimalią liekamąją ligą, itin svarbus tinkamas kaulų čiulpu paėmimas, nes mėginio praskiedimas veniniu krauju gali turėti žymios įtakos tyrimo rezultatams [216]. Mėginio adekvatumas buvo tikrinamas morfologiškai tiriant kaulų čiulpu tepinėlių. Mėginys laikytas tinkamu, kai tepinėlyje buvo randama branduolėtų eritrocitų pirmtakų, stebimas visų kraujodaros linijų brendimas (randama megakariocitų, įvairaus brendimo granulocitų) ir aptinkama kitų kaulų čiulpu elementų (pvz., osteoblastų, osteoklastų, makrofagų).

Minimalios liekamosios ligos tyrimui mėginiai buvo ruošiami taikant lizuoto „viso“ kraujo paruošimo techniką, kaip ir tiriant ūminių leukemijų fenotipą. Buvo naudojami originalūs dažniausiomis ūminių leukemijų fenotipo aberacijomis paremti žymenų deriniai.

Nemažai studijų įrodė, kad ūminės limfoblastinės leukemijos atveju keturspalviai žymenų deriniai gali būti naudojami tirti daugumos sergančiųjų šia liga minimaliai liekamajai ligai ir leidžia pasiekti pakankamą tyrimo jautrumą [98, 150, 155, 157, 160]. Keturspalvius žymenų derinius naudojome ir šioje studijoje (3, 4 lentelės).

Ūminės mielogeninės leukemijos atveju fenotipo aberacijos randamos ne tokiai didelei daliai ligonių, yra mažiau specifinės ir dažnai aptinkamos tik dalyje blastų populiacijos, todėl būtina tirti kaip galima daugiau parametrų vienu metu. Šiuo atveju minimaliai liktinei ligai tirti pasirinkti šešių spalvų žymenų deriniai (5 lentelė).

Visiems sergantiesiems ŪLL minimaliai liekamajai ligai tirti buvo taikomi visi žymenų deriniai, o sergantiesiems ŪML pagal diagnozuojant rastus su leukemija susijusius aberantinius fenotipus atrenkama nuo 1 iki 7 labiausiai tinkančių.

3 lentelė. Žymenų deriniai ūminės B-limfoblastinės leukemijos minimaliai liekamajai ligai tirti.

FITC	PE	PerCP-Cy5.5	APC
TdT	CD10	CD34	CD19
CD38	CD10	CD20	CD19
TdT	CD38	CD34	CD19
TdT	CD22	CD34	CD19
TdT	CD19	CD34	CD45

4 lentelė. Žymenų deriniai ūminės T-limfoblastinės leukemijos minimaliai liekamajai ligai tirti.

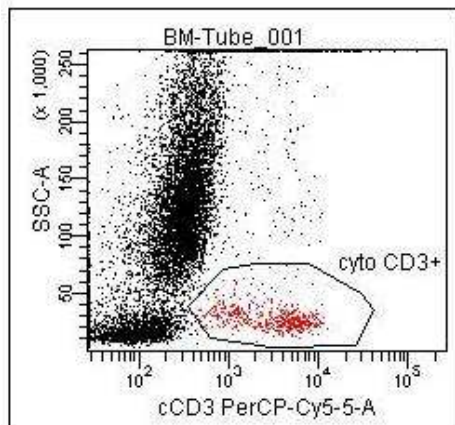
FITC	PE	PerCP-Cy5.5	APC
TdT	CD7	citoplazminis CD3	CD19
CD99	CD7	citoplazminis CD3	CD2

5 lentelė. Žymenų deriniai ūminės mielogeninės leukemijos minimaliai liekamajai ligai tirti.

FITC	PE	PerCP-Cy5,5	APC	PE-Cy7	APC-H7
CD33	CD117	CD34	CD11c	CD56	CD45
CD33	CD117	CD34	CD13	CD56	CD45
CD15	CD117	CD34	CD33		CD45
CD64	CD117	CD34	CD33	CD38	CD45
ŽLA-DR	CD117	CD34	CD33	CD4	CD45
CD7	CD5	CD34	CD33	CD2	CD45
TdT	CD22	CD34	CD33	CD19	CD45

Mėginiai tirti *BD FACS Canto* tėkmės citometru *FACS Diva* programa.

Ūminių limfoblastinių leukemijų atveju ląstelės buvo renkamos į tikslingą B ar T ląstelių regioną (angl. *live-gate* metodika) (5 pav.)



5 pav. Tikslingas T ląstelių regionas (cCD3+). Apibrėžiamos citoplazminį CD3 ekspresuojančios ląstelės (raudona spalva).

Apibrėžus ląsteles, ekspresuojančias CD19 ar citoplazminį CD3 ir pasižyminčias nedidele šonine spindulio sklaida, analizei išsaugomos tik šios ląstelės, viso renkant milijoną kaulų čiulpų ląstelių arba rinkimas pabaigiamas, išsekus mėginiui. Kiekvienu atveju buvo siekiama ištirti bent 100 000 ląstelių. Surinkus mažiau ląstelių, bet aptikus minimalią liekamąją ligą, rezultatas buvo fiksuojamas. Surinkus mažiau ląstelių ir neaptikus minimalios liekamosios ligos, mėginys vertintas kaip neinformatyvus. Analizuojama taikant standartinę “tuščių regionų“ sistemą. B-ŪLL atveju išskiriami 3 kiekvieno žymens fluorescencijos intensyvumo lygiai ir dviparametrėse histogramose sudaromi 9 stačiakampiai regionai. T-ŪLL atveju išskiriami 6 stačiakampiai regionai. Dalyje regionų aptinkamos normalios regeneruojančios ar brandžios tam tikros linijos ląstelės, kituose jų neturi būti (tušti regionai). Bent dešimties ląstelių populiacija, randama viename ar keliuose tuščiuose regionuose, visiškai ar iš dalies atitinkanti diagnozuojant nustatytą fenotipą, laikoma minimalia liekamąja liga. Jos dydis apskaičiuojamas tuščiaame regione rastų ląstelių skaičių padalijus iš viso surinktų kaulų čiulpų ląstelių skaičiaus ir išreiškus procentais.

Kadangi ūminės mielogeninės leukemijos pasižymi fenotipo heterogeniškumu, tikslingas ląstelių rinkimo regionas nebuvo taikomas. Buvo renkamas milijonas visų kaulų čiulpų ląstelių arba visos mėginyje esančios ląstelės (bent 100 000, surinkus mažiau, mėginio informatyvumas vertintas, kaip ir ŪLL atveju). Analizuojant apibrėžiamas blastų regionas (nedidelės

šoninės spindulio sklaidos ląstelės, blankiai ekspresuojančios CD45 žymenį), pagal CD34, CD117 ir CD33 žymenis išskiriami mieloblastai ir analizuojama taikant „tuščių regionų“ strategiją.

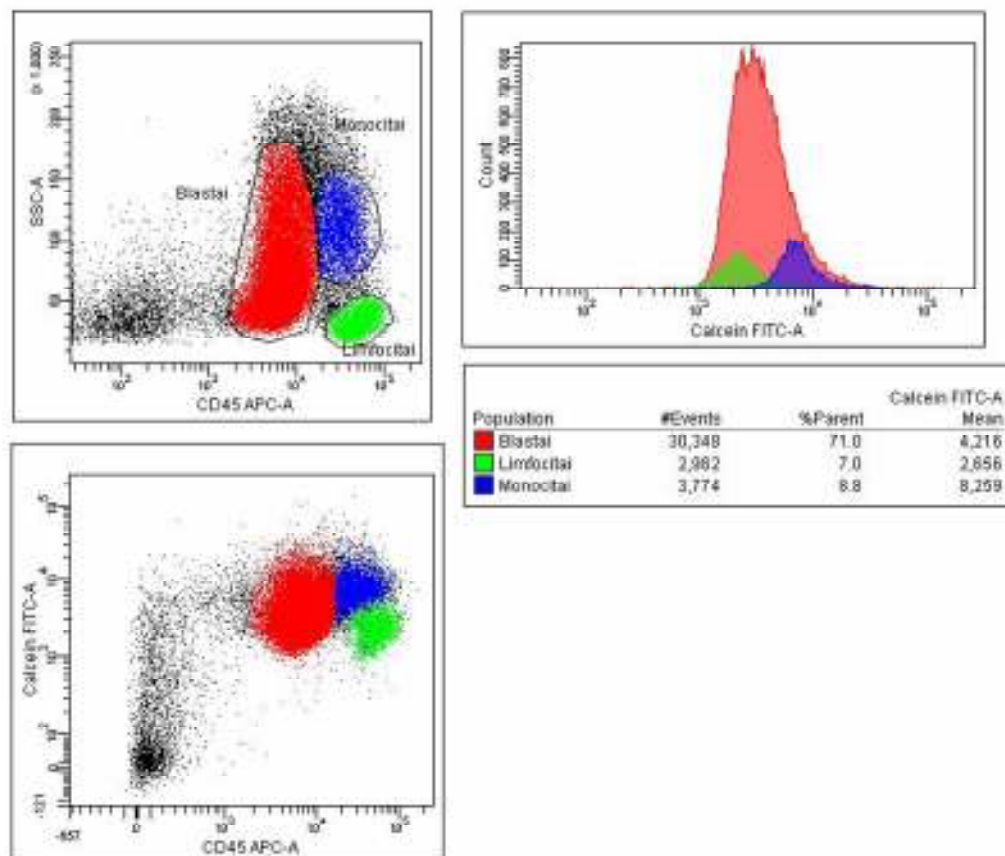
3.3.3. Blastų dauginio atsparumo vaistams tyrimas

Ligoniams buvo atliekami dvejetainiai dauginio atsparumo vaistams tyrimai: tėkmės citometru buvo tiriama su dauginiu atsparumu vaistams susijusių baltymų (p-gp ir MRP1) ekspresija bei atliekamas kalceino testas jų funkciniam aktyvumui vertinti.

Kalceino testas. Mėginiai buvo ruošiami taikant mononuklearų išskyrimo pagal tankio gradientą metodą. 4 ml *Ficoll-Paque* tirpalo buvo pilama į 15 ml centrifuginį mėgintuvėlį. Ant viršaus atsargiai užpylus 6 ml 1:1 PBS buferiniu tirpalu atskiesto kaulų čiulpų ar kraujo mėginio, centrifuguojama 400 g režimu 30 min. kambario temperatūroje. Atsargiai nusiurbtas susidaręs mononuklearų sluoksnis buvo perpilamas į kitą mėgintuvėlį ir dukart nuplaunamas *Cell Wash* (BD, JAV) tirpalu, centrifuguojant po 10 min. 300 g režimu. Vėliau hematologiniu analizatoriumi nustatius ląstelių skaičių, paruošiama suspensija, kurioje būtų 2–5 mln. ląstelių. Į tris mėgintuvėlius pripilama po 100 µl paruoštos ląstelių suspensijos ir 20 µl 1:10 titruotų APC žymėtų monokloninių antikūnų prieš žmogaus CD45 (BD, JAV). Inkubuojama 20 min. kambario temperatūroje. Į kiekvieną mėgintuvėlį pridedama po 20 µl 1:10 titruoto paruošto AM kalceino tirpalo. Inkubuojama lygiai 10 min. 37 °C temperatūroje. Po 10 min. reakcija nutraukiama greitu centrifugavimu (1 min. 2000 g, 15 sek. greitėjimas ir lėtėjimas). Nusiurbiamas ir išpilamas viršnuosėdinis skystis, o ląstelės resuspenduojamos 0,5 ml reakcijos buferio su propidžio jodidu. Mėginys tiriamas iš karto paruošus, tačiau esant reikalui gali būti saugomas 4 °C temperatūroje 24 val. Nustatoma kalceino fluorescencija FL1 gyvybingų (neigiamų propidžio jodidui) ląstelių populiacijoje.

Duomenų rinkimui sukuriama FL1 (pirmojo fluorescencijos detektoriaus registruotų duomenų) vienparametrė histograma ir FSC–SSC (priekinės ir šoninės spindulio sklaidos), SSC–CD45 (šoninės sklaidos ir CD45 ekspresijos), CD45–FL1 (CD45 ekspresijos ir pirmojo fluorescencijos detektoriaus registruotų duomenų) ir SSC–FL2 (šoninės sklaidos ir antrojo fluorescencijos detektoriaus registruotų duomenų) taškinės histogramos. Surenkami duomenys iš visų trijų mėgintuvėlių, ištyrus po 50 000 ląstelių. Analizuojant SSC–FL2 taškinėje histogramoje atmetamos negyvybingos (teigiamos propidžio jodidui) ląstelės ir SSC–CD45 taškinėje histogramoje nubrėžiami blastų, limfocitų, monocitų ir granulocitų regionai. Nustatomas kalceino vidutinis fluorescencijos intensyvumas (angl. *mean fluorescence intensity*, MFI), apskaičiuojamas visų trijų mėgintuvėlių kalceino MFI vidurkis (6 pav.).

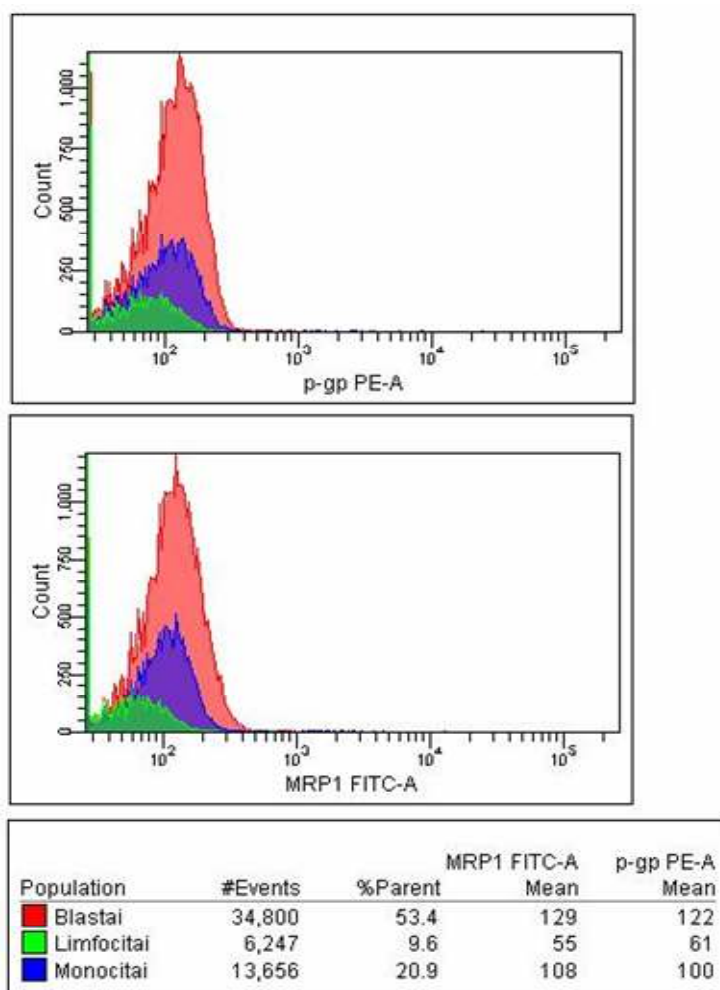
6 pav. Kalceino fluorescencijos tyrimas tėkmės citometru.



Blastų, limfocitų ir monocitų populiacijos apibrėžiamos pagal šoninės spindulio sklaidos ir CD45 parametrus, kalceino ekspresija vertinama taškinėje ir vienparametrėje histogramose, nustatant vidutinį fluorescencijos intensyvumą (angl. *mean fluorescence intensity, MFI*).

P-gp ir MRP1 ekspresija buvo nustatoma tiesioginiu imunofluorescencijos metodu, kaip žymenys blastams identifikuoti. Naudoti PE žymėti antikūnai prieš p-gp (klonas 17F9, *Pharmingen*, JAV) ir FITC žymėti antikūnai prieš MRP1 (klonas QCRL-3, *Pharmingen*, JAV). Nustatomas blastų populiacijos abiejų žymenų vidutinis fluorescencijos intensyvumas (angl. *mean fluorescence intensity, MFI*) (7 pav.).

7 pav. MRP1 ir p-gp ekspresijos tyrimas tėkmės citometru.



3.4. Statistinė analizė

Statistinė analizė atlikta SPSS for Windows v.12.0 programa. Su leukemija susijusių aberantinių fenotipų įtaka minimalios liekamosios ligos dydžiui bei su leukemija susijusių aberantinių fenotipų įtaka dauginio atsparumo vaistams rodikliams tirta, pasitelkiant Mano-Vitnio-Vilkoksono (Mann-Whitney-Wilcoxon) kriterijų. Dauginio atsparumo vaistams rodiklių ir minimalios liekamosios ligos dydžio ir ryšio tarp atskirų DAV rodiklių nustatymui buvo naudojamas Spirmeno (Spearman) koreliacijos koeficientas. Praskiedimo eksperimento rezultatams vertinti, kuomet tas pats mėginys buvo ruošiamas, pasitelkiant skirtingas ruošimo technikas, taikytas porinis (priklausomų imčių) t-testas. Ūmine leukemija sergančių ligonių ir sveikų asmenų atsparumo vaistams rodiklių palyginimui buvo naudojamas dviejų nepriklausomų imčių t testas. Anova testu patikrinta, ar yra statistiškai reikšmingų skirtumų tarp skirtingas diagnozes turinčių ligonių atsparumo vaistams rodiklių.

4. Tyrimo rezultatai

4.1. Tiriamųjų charakteristikos

Po pradinio blastų fenotipo įvertinimo, kuris atliktas 134 ligoniams, tolesniems tyrimams atrinkta 114 ligonių:

- 35 ligoniai, sergantys ūmine B-limfoblastine leukemija (Burkitto limfomai būdingą fenotipą turintys atvejai neįtraukti):
 - 28 suaugę: 21 vyras, 7 moterys, amžiaus vidurkis 33,6 metų (17 - 82),
 - 7 vaikai: 5 berniukai, 2 mergaitės, amžiaus vidurkis 3,4 metų (1,1 – 8,0).
- 29 ligoniai, sergantys ūmine T-limfoblastine leukemija:

- 14 suaugusiųjų: 12 vyrų, 2 moterys, amžiaus vidurkis 28,2 metų (17 - 50),
- 15 vaikų: 12 berniukų, 3 mergaitės, amžiaus vidurkis 8,2 metų (1,4 – 16,2),
- 50 suaugusių ligonių, sergančių ūmine mielogenine leukemija (sergantieji ūmine promielocitine leukemija neįtraukti): 26 vyrai, 24 moterys, amžiaus vidurkis 44,6 metų (18 - 79).

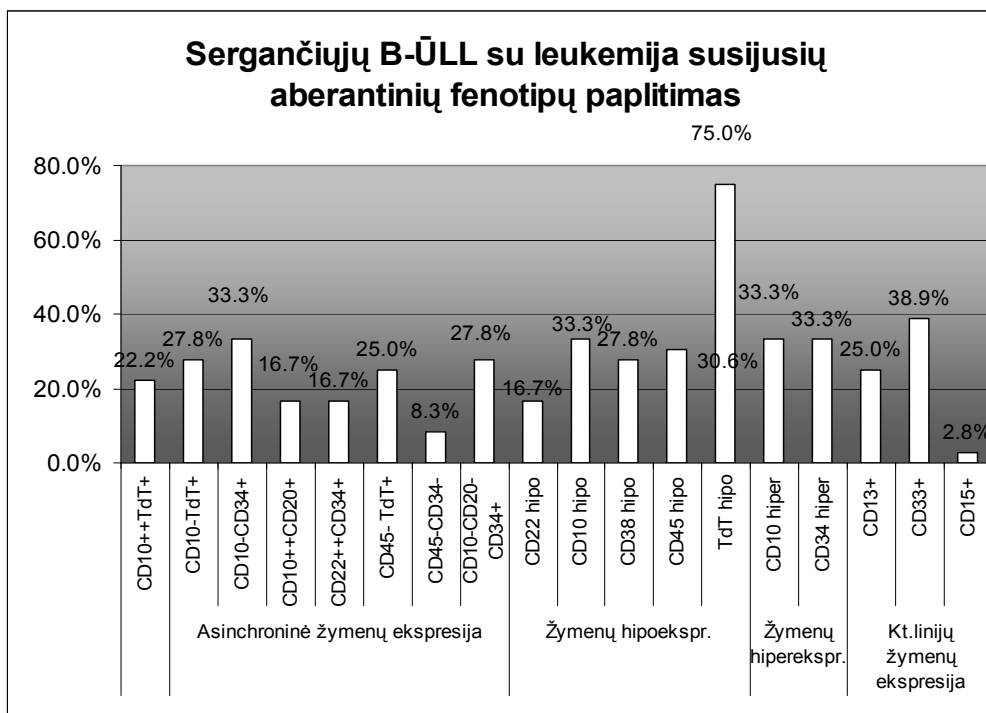
30 šių ligonių taip pat atlikti DAV tyrimai. Tarp jų buvo 19 suaugusiųjų ir 11 vaikų. Tarp suaugusiųjų buvo 10 moterų ir 9 vyrai, jų amžiaus vidurkis 52,2 metų (18 – 74). Vaikų grupėje buvo 10 berniukų ir viena mergaitė, jų amžiaus vidurkis 4,6 metų (1,5 – 14,7). Visi vaikai sirgo ūminėmis limfoblastinėmis leukemijomis: 7 – ūmine B-limfoblastine leukemija, 4 – ūmine T-limfoblastine leukemija. 17 suaugusiųjų sirgo ūmine mielogenine leukemija, o 2 – ūmine B- limfoblastine leukemija.

Minimalios liekamosios ligos optimizavimui ir su leukemija susijusių aberantinių fenotipų tyrimui įtraukta 12 sveikų kaulų čiulpų donorų (10 vyrų, 2 moterys, amžiaus vidurkis 34,4 metų (16 - 61).

4.2. Su leukemija susijusių fenotipų paplitimas

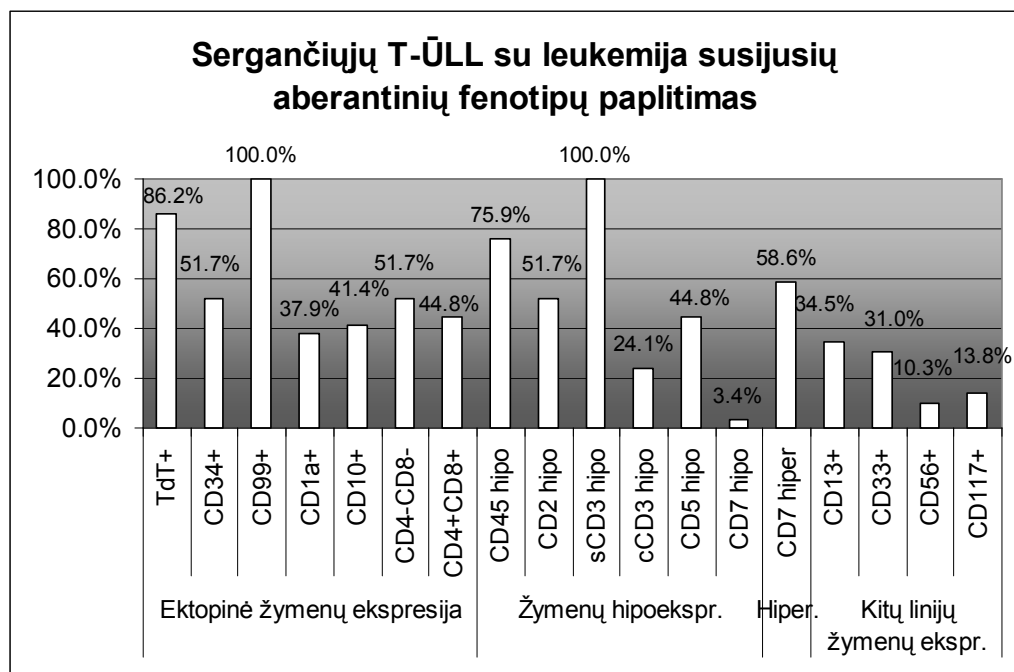
Visiems tirtiems sergantiems B-ŪLL ligoniams buvo nustatyta bent po vieną fenotipo aberaciją (vidutiniškai 5,1, nuo 1 iki 10). Labiausiai paplitusi su leukemija susijusių fenotipų grupė buvo žymenų hipoekspresija. Dažniausiai (75% atveju) aptikome ląstelės branduolio žymens TdT hipoekspresiją. Nemažai daliai ligonių aptiktas žymenų CD10, CD38 ir CD45 žymenų ekspresijos sumažėjimas (atitinkamai 33,3%, 27,8%, 31,0%). Iš kitų linijų žymenų koekspresijos grupės dažniausiai nustatyta mieloidinio žymens CD33 ekspresija leukeminių B limfoblastų populiacijoje (38,9%). Neretai aptikta asinchroninė žymenų ekspresija CD10-CD34+ bei žymenų CD34 ir CD10 hiperekspresija (33,3%). Visi nustatyti su leukemija susiję aberantiniai fenotipai pateikti diagramoje (8 pav.).

8 pav. Su leukemija susijusių aberantinių fenotipų paplitimas B-ŪLL pacientų grupėje.



T-ŪLL pacientų blastų fenotipo aberacijų skaičius buvo dar didesnis: vidutiniškai rasta po 8,6 aberacijos (5-12). Dažniausios fenotipo aberacijos priklausė ektopinės žymenų ekspresijos grupei: ankstyvosios diferenciacijos žymens TdT ekspresija kaulų čiulpų T limfocitų populiacijoje aptikta 86,2%, o CD99 – net 100% atvejų. O štai kito ankstyvojo žymens CD34 ekspresija aptikta vos daugiau nei pusei ligonių, t.y. 51,7%. Kita dažna aberacijų grupė buvo žymenų hipoekspresija, pvz, CD45 ir CD3 žymenų hipoekspresija rasta 75,9% ir 100% atvejų. Visi aptikti T-ŪLL su leukemija susiję aberantiniai fenotipai pateikti diagramoje (9 pav.).

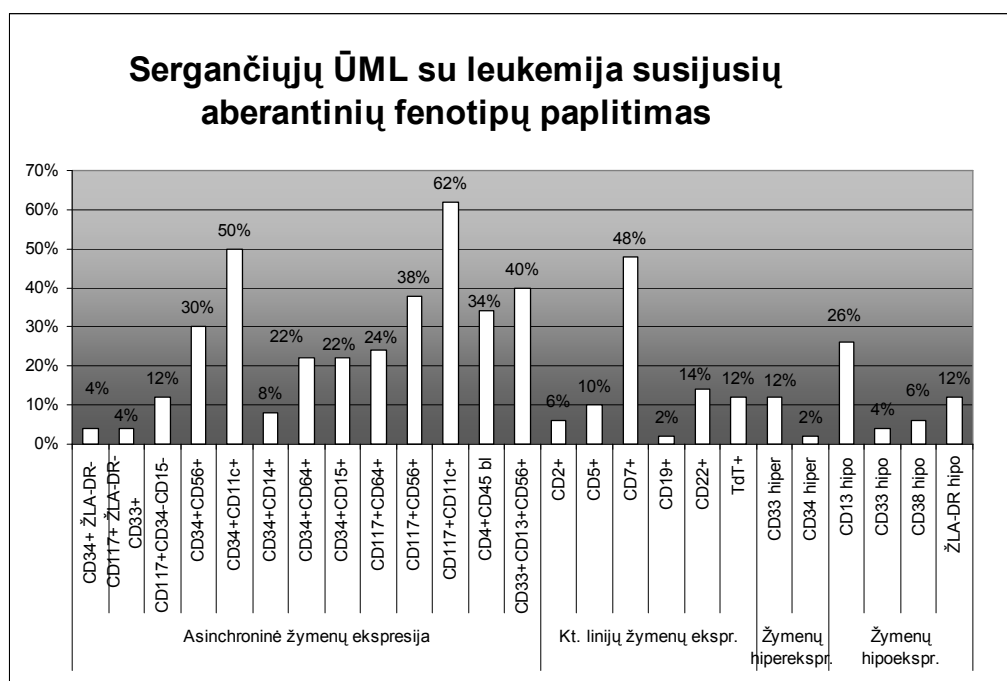
9 pav. Su leukemija susijusių aberantinių fenotipų paplitimas T-ŪLL pacientų grupėje.



Bent viena fenotipo aberacija buvo nustatyta 71,4% sergančiųjų ŪML (vidutiniškai 5,0, nuo 1 iki 11). Sergantieji ūmine mielogenine leukemija pasižymėjo didele su leukemija susijusių aberantinių fenotipų įvairove. Visgi vyraujanti šių fenotipų grupė, skirtingai nuo sergančiųjų ūminėmis limfoblastinėmis leukemijomis, buvo asinchroninė žymenų ekspresija. Žymens CD11c, kuris vykstant normaliai hemopoezei atsiranda pakankamai vėlyvose brendimo stadijose, ekspresija kartu su ankstyvaisiais žymenimis CD117 ir CD34 rasta atitinkamai 62% ir 50% ŪML atvejų. Žymuo CD56 nėra būdingas normaliai mielopoezei, tačiau neretai aptinkamas granulocitų ar monocitų populiacijose ir nesergantiems ūminėmis leukemijomis dėl reakciniai pokyčių, tame tarpe ir susijusių su chemoterapija [219]. Be to, nors ir siejamas su NK ląstelėmis, šis žymuo nėra joms specifiškas ir priklauso adhezijos molekulių grupei. Tirdami su leukemija susijusius aberantinius fenotipus, šio žymens ekspresiją priskyrėme asinchroninei žymenų ekspresijai. CD56 ekspresija kartu su CD34 žymenim aptikta 30%, su CD117

– 38%, o derinyje su mieloidiniais žymenimis CD13 ir CD33 - 40% ŪML atvejų. Su monocitine diferenciacija siejamo žymens CD4 ekspresija blastų, o ne monocitų regione esančių ląstelių populiacijoje rasta 34% atvejų. Kitų linijų žymenų ekspresijos grupėje dažniausiai nustatyta T limfoidinio žymens CD7 ekspresija (48%). Žymenų hiperekspresija buvo gana reta, tik mieloidinio žymens CD13 hipoekspresija nustatyta 26% atvejų. Visi nustatyti sergančiųjų ŪML su leukemija susiję aberantiniai fenotipai pateikti diagramoje (10 pav.).

10 pav. Su leukemija susijusių aberantinių fenotipų paplitimas ŪML pacientų grupėje.



4.3. Minimalios liekamosios ligos tyrimo optimizavimas

Šiame darbe minimalios liekamosios ligos dydis buvo vertinamas kaip ūminių leukemijų eigos rodiklis ir buvo naudojamas kitų rodiklių prognozei reikšmei nustatyti. Iki šio darbo pradžios minimalios liekamosios ligos tyrimo Lietuvoje atliekama nebuvo, taigi reikėjo jį įdiegti ir standartizuoti. Minimalios liekamosios ligos įdiegimas buvo atliekamas keliais etapais:

- Remiantis dažniausiais sergančiųjų B-ŪLL, T-ŪLL ir ŪML su leukemija susijusiais aberantiniais fenotipais, sudaryti 4 spalvų žymenų deriniai ūminėms limfoblastinėms ir 6 spalvų žymenų deriniai ūminėms mielogeninėms leukemijoms tirti.
- Atlikus ūminių leukemijų mėginių praskiedimo eksperimentą, nustatytas tyrimo jautrumas (mažiausias įmanomas aptikti leukeminių ląstelių kiekis) bei parinkta pakankamą tyrimo jautrumą užtikrinanti mėginių ruošimo technika: palygintos lizuoto kraujo ir mononuklearų išskyrimo pagal tankio gradientą mėginio paruošimo technikos.
- Sukurta standartizuota duomenų analizės sistema.
- Iširti sveikų asmenų grupės kaulų čiulpai ir nustatytas ląstelių, turinčių su leukemija susijusių aberantinių fenotipų, kiekis.
- Įvertintas su leukemija susijusių aberantinių fenotipų stabilumas.

4.3.1. Žymenų derinių parinkimas

Sergantiesiems B-ŪLL į visus žymenų derinius įtraukėme specifinį B limfoidinį žymenį, aptinkamą kone visais šios ligos atvejais – CD19. Blastų populiacijos aptikimui buvo būtinas ankstyvasis žymuo CD34. Jo atsisakėme derinyje CD38/CD10/CD20/CD19, nes šio derinio tikslas – ne tik aptikti MLL, bet ir pagal būdingą populiacijų išsidėstymą įvertinti B limfoidinių ląstelių pirmtakų, kurių viena išskirtinių savybių – homogeniška ir ryški

CD38 žymens ekspresija, kiekį ir brendimo sinchroniškumą. Kadangi TdT hipoekspresija buvo dažniausia B-ŪLL fenotipo aberacija, šis žymuo įtrauktas į visus likusius derinius. Kad išvengtume klaidingai teigiamų (kuomet regeneruojantys B limfoidinių ląstelių pirmtakai palaikomi leukeminiais) ar klaidingai neigiamų (įvykus fenotipo pokyčiams) rezultatų, blastų populiaciją siekėme apibrėžti ne pagal vieną žymenų aberaciją. Tam įtraukėme papildomus žymenis, kurių ekspresijos pakitimai dažni sergantiesiems B-ŪLL: CD10 (hiper ir hipoekspresija sutinkama net 66% B-ŪLL atveju), CD45 (hipoekspresija 31% atveju), CD38 (hipoekspresija 28% atveju) ir CD22 (hipoekspresija 17% ir asinchroninė ekspresija CD22++CD34+ 17% atveju). Galutinis 5 žymenų derinių rinkinys pateiktas 3 lentelėje (“Tyrimo medžiaga ir metodai”).

Kadangi absoliučios daugumos sergančiųjų T-ŪLL blastai ekspresavo ankstyvuosius žymenis CD99 ir TdT (atitinkamai 100% ir 86%), o sveikų asmenų kaulų čiulpuose T limfocitų pirmtakų nerandama, šios ligos MLL tirti parinkome 2 keturspalvių žymenų derinius: TdT/CD7/cCD3/CD19 ir CD99/CD7/cCD3/CD2. T limfoidinėms ląstelėms identifikuoti naudotas specifinis žymuo CD3. Kadangi visais T-ŪLL atvejais šio žymens ekspresija ląstelių paviršiuje buvo sumažėjusi, šis žymuo tirtas jų citoplazmoje. CD7 žymuo buvo įtrauktas, nes jo hiperekspresija nustatyta net 59% pacientų bei T limfoidinėms ląstelėms identifikuoti, kai CD3 žymuo ir ląstelių citoplazmoje yra blankus (24% ligonių). B-limfoidinis žymuo CD19 įtrauktas atmesti TdT turinčius B limfoidinių ląstelių pirmtakus, dėl techninių ar biologinių priežasčių patenkančius į cCD3+ regioną ir galinčius imituoti T limfoblastus. CD2 įtrauktas, nes buvo hipoekspresuojamas nemažoje dalyje T-ŪLL atveju (52%).

Ūminių limfoblastinių leukemijų atvejais visų ligonių minimaliai liekamajai ligai tirti buvo taikomi visi mūsų sudaryti standartiniai žymenų deriniai. Ūminės mielogeninės leukemijos pasižymėjo didele su leukemija susijusių aberantinių fenotipų įvairove, todėl ekonomiškai naudingo visiems pacientams pritaikomo žymenų derinių rinkinio sudaryti nepavyko. Sudaryti 7

žymenų deriniai, iš kurių pagal pradinį blastų fenotipą kiekvieno ligonio minimaliai liekamajai ligai tirti buvo parenkama nuo 1 iki visų 7. Kadangi blastai nebuvo renkami į tikslingą regioną, jų populiacija buvo identifikuojama analizuojant pagal būdingą leukocitų žymens CD45, mieloidinio žymens CD33 ir ankstyvųjų žymenų CD34 ir CD117 ekspresiją. Bent 3 iš šių žymenų buvo įtraukiami į visus derinius. Likę du fluorescencijos kanalai buvo naudojami dviems blastų aberacijoms iširti. Pilnas 7 žymenų derinių rinkinys pateiktas skyriuje „Tyrimo medžiaga ir metodai“.

4.3.2. Mėginių ruošimo technikos parinkimas

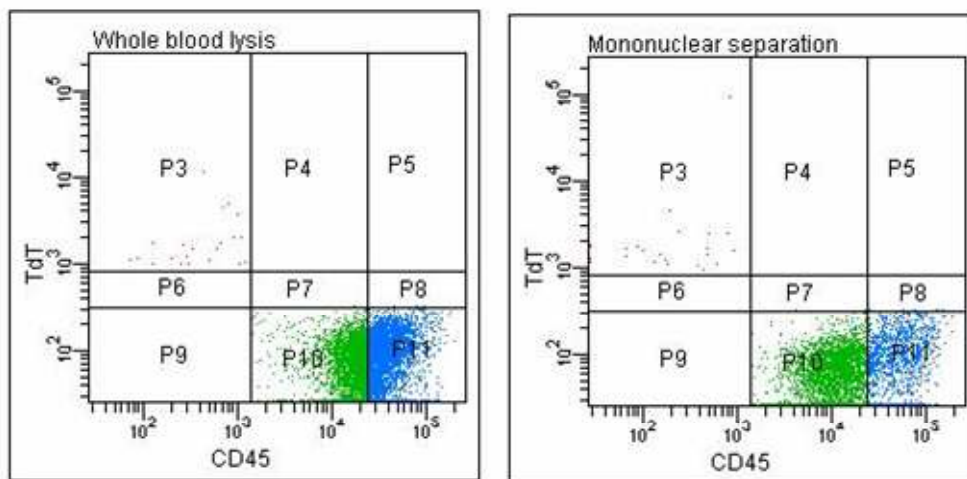
Nustatant minimalią liekamąją ligą, siekiama kuo didesnio tyrimo jautrumo. Mononuklearų išskyrimo pagal tankio gradientą mėginių paruošimo metodas leidžia sukcentruoti ląsteles ir iširti didesnę jų skaičių, tačiau turi keletą trūkumų: mėginyje gali likti eritrocitų, mononuklearų išskyrimo efektyvumas priklauso nuo tinkamos antikoagulantų proporcijos mėginyje ir jo laikymo sąlygų. Taikant lizuoto kraujo techniką, gali būti surenkamas mažesnis ląstelių skaičius, tačiau minimalios liktinės ligos dydį galima išreikšti kaip santykį su visomis kaulų čiulpų ląstelėmis, kaip tai daroma diagnozuojant ūminę leukemiją. Taip blastų skaičiaus mažėjimas stebimas objektyviau [220, 221].

Šiame darbe lizuoto kraujo ir mononuklearų išskyrimo pagal tankio gradientą mėginių ruošimo technikos palygintos analizuojant ūminių leukemijų mėginių praskiedimo eksperimento rezultatus.

Praskiedimo eksperimentui atsitiktinai atrinkta po vieną B-ŪLL, T-ŪLL ir ŪML mėginį. Mėginiai skiesti sveiko donoro veniniu krauju 100, 1000, 10000 ir 100000 kartų. Mėginiai ruošti taikant lizuoto kraujo ir mononuklearų išskyrimo technikas ir po vieną B-ŪLL, T-ŪLL, ŪML minimalios liekamosios ligos tyrimo žymenų rinkinio derinį. Duomenys rinkti ir analizuoti pagal jau aprašytą minimalios liekamosios ligos tyrimo metodiką („Tyrimo medžiaga ir metodai“). Procentine išraiška nustatytas leukeminių ląstelių santykis su visoms mėginio branduolėtoms ląstelėms.

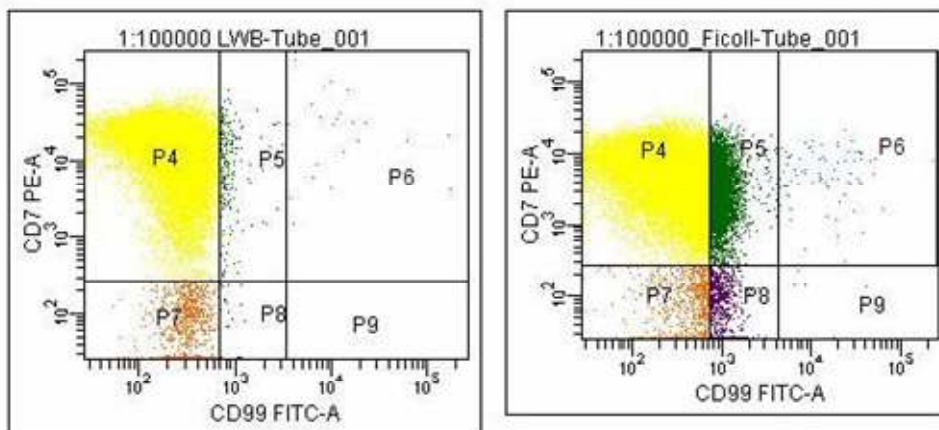
B-ŪLL ir T-ŪLL praskiedimo atveju leukeminių ląstelių rasta visuose praskiestuose mėginiuose. Labiausiai praskiestame (100000 k.) B-ŪLL mėginyje leukeminės ląstelės sudarė 0,007% visų mėginio, ruošto taikant lizuoto kraujo ir 0,008% mėginio, ruošto, taikant mononuklearų išskyrimo metodą, ląstelių (11 pav.).

11 pav. Lizuoto kraujo ir mononuklearų išskyrimo mėginio ruošimo technikų palyginimas (B-ŪLL mėginys skiestas 100000 kartų). Leukeminiai blastai matomi P3 regione.



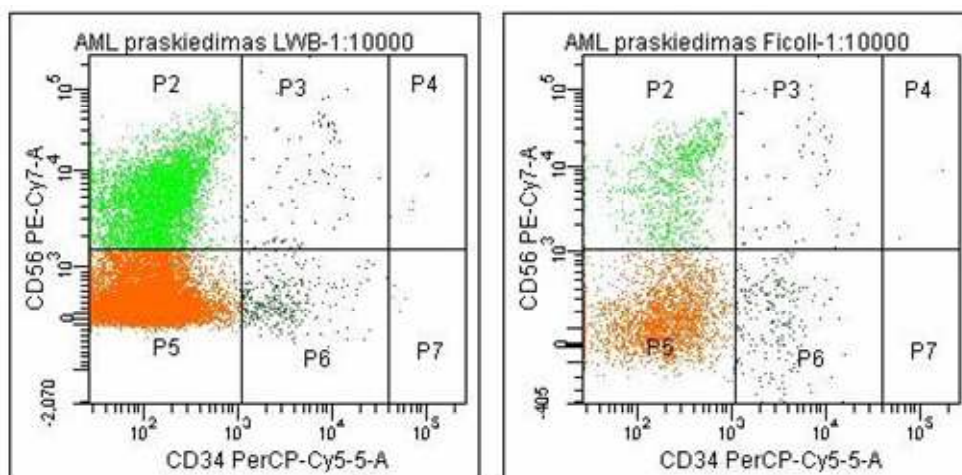
100000 kartų skiestame T-ŪLL mėginyje leukeminės ląstelės sudarė 0,009% mėginio, ruošto taikant lizuoto kraujo ir 0,008% mėginio, ruošto, taikant mononuklearų išskyrimo metodą, ląstelių (12 pav.).

12 pav. Lizuoto kraujo ir mononuklearų išskyrimo mėginio ruošimo metodikų palyginimas (T-ŪLL mėginys skiestas 100000 kartų). Leukeminiai blastai matomi P6 regione.



Atskiedus ŪML mėginį 100000 kartų, leukeminių ląstelių populiacijos, atitinkančios minimalios liekamosios ligos kriterijus, neaptikta. 10000 kartų praskiestame mėginyje, ruoštame taikant lizuoto kraujo techniką, aptikta 0,07%, o taikant mononuklearų išskyrimo techniką – 0,05% leukeminių ląstelių (13 pav.).

13 pav. Lizuoto kraujo ir mononuklearų išskyrimo mėginio ruošimo metodikų palyginimas (ŪML mėginys skiestas 10000 kartų). Leukeminiai blastai P3 regione.



Rezultatai rodo, kad ūminių limfoblastinių leukemijų atvejais pasiektas netgi didesnis nei literatūroje [98, 147, 155, 157] nurodomas 0,01% jautrumas. Ūminės mielogeninės leukemijos atveju tokio jautrumo pasiekti nepavyko, tačiau, kadangi šios ligos atveju paprastai taikoma 0,1% ribinė minimalios liekamosios ligos vertė, mūsų pasiektas jautrumas (0,07% ir 0,05%) yra pakankamas.

Priešingai nei tikėtasi, nustatyta, kad bene visuose praskiedimo etapuose leukeminių ląstelių skaičius mėginiuose, ruoštuose taikant lizuoto kraujo techniką, buvo didesnis nei ruoštuose taikant mononuklearų išskyrimo techniką. Pavyzdžiui, praskiedus 100 kartų, jis didesnis vidutiniškai 0,69%, praskiedus 10000 kartų - 0,11%, o praskiedus 100000 – 0,01%. Tokie radiniai galėtų būti paaiškinti ląstelių praradimu taikant mononuklearų išskyrimo metodą: dalis ląstelių gali būti prarandama keletą kartų pasikartojančiuose centrifugavimo etapuose, dalies netenkama rankiniu būdu surenkant susidariusį mononuklearų žiedą. Visgi statistiškai patikimo skirtumo negauta ($p=0,220$, porinis t-testas), todėl ląstelės greičiausiai prarandamos neselektyviai.

Dėl pakankamo jautrumo bei galimybės nuosekliai vertinti blastų skaičiaus mažėjimo procesą nuo pat diagnozės nustatymo, minimalios liekamosios ligos tyrimams pasirinkta lizuoto kraujo mėginio paruošimo technika.

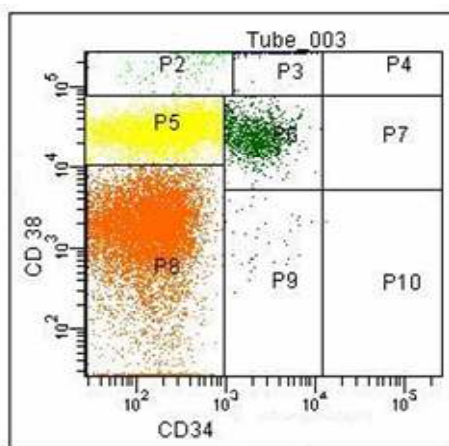
4.3.3. Duomenų analizės sistema

Analizės sistema sukurta, remiantis nustatytais blastų fenotipo aberacijomis ir normalių kaulų čiulpų tyrimu.

B-ŪLL minimaliai liekamajai ligai tirti taikyta „3x3 tuščių regionų“ analizė. Žinoma, kad sveiko asmens kaulų čiulpuose yra ne tik subrendusių B limfoidinių ląstelių, bet ir jų pirmtakų. Ištyrus sveikus asmenis, sukurta „tuščių regionų“ duomenų analizės sistema. Ji iš dalies paremta BIOMED-1 grupės „tuščių erdvių“ duomenų analizės sistema: nustatomi taškinių histogramų plotai, kuriuose sveikų asmenų kaulų čiulpuose ląstelių

nerandama, bet aptinkama B-ŪLL ligoniams [222]. Mūsų darbe tušti regionai apibrėžti dar konkrečiau. Kiekvienos taškinės histogramos ašies parametro reikšmė (tam tikro žymens ekspresija) suskirstyta į 3 lygius: neigiama/blanki, teigiama, ryški. Taip suformuojami 9 stačiakampiai regionai. Šis analizės metodas pavadintas „3x3 tuščių regionų“ analize. Dalis jų esti užpildyta regeneruojančiomis ar brandžiomis B-limfoidinėmis ląstelėmis, kita dalis priskiriama „tuščių regionų“ kategorijai – juose vėliau ieškoma minimalios liekamosios ligos (12 pav.).

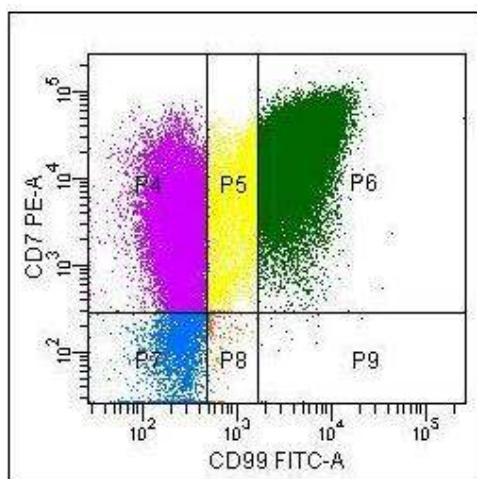
14 pav. „3x3 tuščių regionų“ analizė: P5, P6 – regeneruojančių B limfoidinių ląstelių regionas, P8 – subrendusių B limfocitų regionas; P2 – plazminių ląstelių regionas, P3, P4, P7, P9, P10 – tušti regionai.



T-ŪLL minimaliai liekamajai ligai tirti taikyta „2x3 tuščių regionų“ analizės sistema. Pradėjus pirmuosius sveikų asmenų kaulų čiulpų tyrimus, pastebėta, kad į tikslingą cCD3+ regioną patenka nedidelis skaičius B-limfoidinių ląstelių pirmtakų, kurie savo branduolyje turi TdT žymenį ir dėl kurių gaunamas klaidingai teigiamas minimalios liekamosios ligos rezultatas. To priežastimi galėtų būti ląstelės membranos permeabilizacijos procedūra, dėl kurios CD3 antikūniai gali patekti į B limfoidinių ląstelių citoplazmą ir ten nespecifiškai įsitvirtinti. Todėl į žymenų derinį, reikalaujantį ląstelės

permeabilizacijos, buvo įtrauktas B limfoidinis žymuo CD19. Analizuojant pirmiausia buvo atmetamos CD19 turinčios ląstelės, o likusios analizuojamos taikant „2x3 tuščių regionų“ sistemą. CD7/TdT and CD7/CD99 taškinės histogramos buvo padalintos į 6 regionus pagal šių žymenų ekspresijos lygi: CD7 žymens ekspresija verinta kaip teigiama ar neigiama bei išskirti TdT ir CD99 neigiamos, blankios ir ryškios ekspresijos regionai. Kai kuriuose šių regionuose buvo aptikta normalių T limfocitų populiacijų, kiti priskirti „tušties regionams“ (15 pav.).

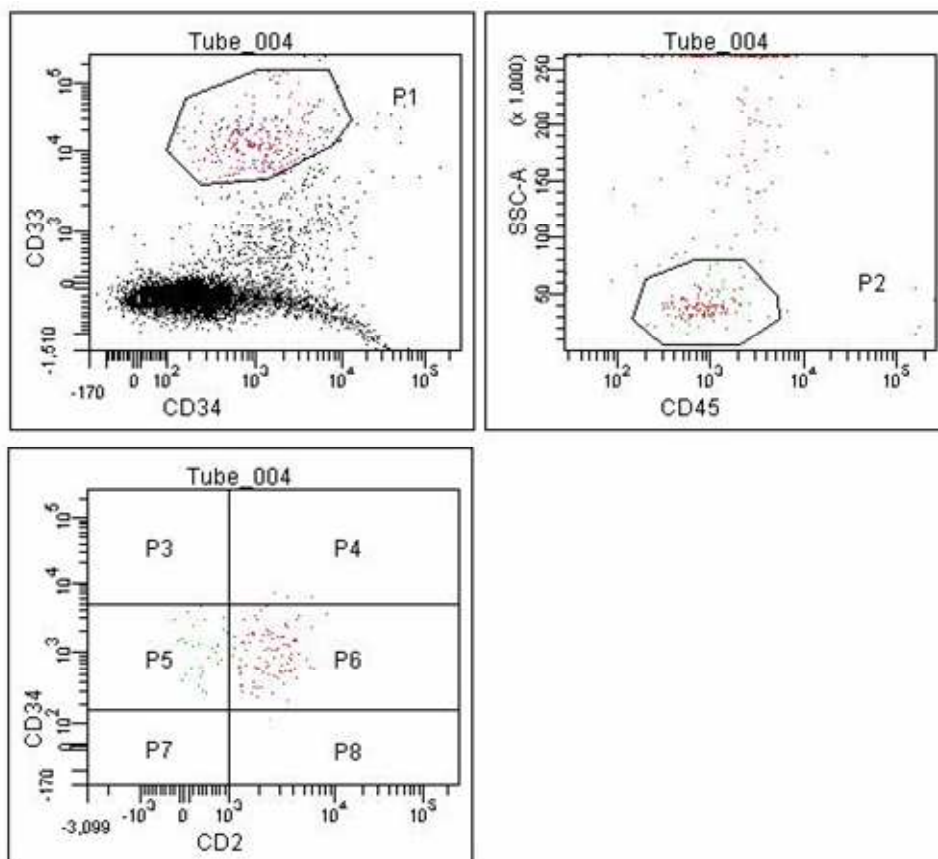
15 pav. „2x3 tuščių regionų“ analizė: P4, P7, P5 – normalių T limfocitų ląstelių regionai, P6, P8, P9 – „tušti regionai“. Šiuo atveju P6 regione rasta leukeminių T limfoblastų populiacija.



ŪML minimaliai ligai tirti taip pat taikyta „2x3 tuščių regionų“ analizės sistema. Tiriant ūminės mielogeninės leukemijos minimalią liekamąją ligą buvo naudojami 6 spalvų žymenų deriniai. Kadangi dėl ŪML fenotipų heterogeniškumo ląstelės nebuvo renkamos į tikslingą regioną 4 iš 6 žymenų buvo naudojami mieloblastų populiacijai identifikuoti (CD45, CD34, CD117, CD33). Likę žymenys buvo naudojami aberacijoms tirti. Aberantinių žymenų ekspresija buvo vertinama kaip teigiama ir neigiama, o ankstyvųjų ir mieloidinių (dėl galimos hiper ir hipoekspresijos) kaip neigiama, teigiama ar ryški. Taip suformuoti 6 stačiakampiai regionai, kurių dalyje buvo aptiktos

normalių mieloblastų populiacijos, o kiti priskirti „tušties regionams“ (16 pav.)

16 pav. ŪML minimalios liekamosios ligos duomenų analizė: pakopinis blastų populiacijos identifikavimas (CD34+CD33+ populiacijos dydis patikslinamas CD45/SSC taškinėje historigrame) bei „2x3 tuščių regionų“ analizės sistema: P3, P4, P6, P7, P8 – tušti regionai, P5 – normalių mieloblastų regionas. Šiuo atveju leukeminių mieloblastų populiacija aptikta P6 regione.



4.3.4. Sveikų asmenų kaulų čiulpų tyrimas

12 sveikų asmenų (kaulų čiulpų donorų) kaulų čiulpai ištirti taikant standartizuotą minimalios liekamosios ligos metodiką. Buvo nustatyti B limfoidinių, T limfoidinių ląstelių ir mieloblastų populiacijų dydžiai ir fenotipai. Taip pat siekta nustatyti ląstelių, turinčių atskirų su leukemija susijusių fenotipų, būdingų B-ŪLL, T-ŪLL ir ŪML, kiekį, išreikštą procentais. Ląstelių skaičius, rastas tam tikruose „tuščiuose regionuose“ rodytų šių regionų specifiškumą ir galėtų būti naudojamas kaip teigiamos vertės riba.

Sveikų asmenų kaulų čiulpuose aptiktos šios B limfoidinių ląstelių subpopuliacijos:

- 1) Ankstyvieji B limfoidinių ląstelių pirmtakai, sudarantys $0,08 \pm 0,04\%$ kaulų čiulpų ląstelių. Jų fenotipas: TdT+, CD10+, CD19+, CD22+blankus, CD34+, CD38+, CD45+ blankus, CD20-.
- 2) Vėlyvieji B limfoidinių ląstelių pirmtakai, sudarantys $0,60 \pm 0,03\%$ kaulų čiulpų ląstelių. Jų fenotipas: CD10+, CD19+, CD20+ blankus, CD22+ blankus, CD38+, CD45+ blankus, TdT-, CD34-.
- 3) Subrendę B limfocitai, sudarantys $1,57 \pm 0,53\%$ kaulų čiulpų ląstelių. Jų fenotipas: CD19+, CD20+, CD22+, CD45+, TdT-, CD10-, CD34-, CD38-/++blankus.

Ląstelių, turinčių su leukemija susijusių aberantinių fenotipų, skaičius, išreikštas procentais nuo visų kaulų čiulpų ląstelių, pateiktas 6 lentelėje.

6 lentelė. Ląstelių, turinčių su leukemija susijusių aberantinių fenotipų, būdingų B-ŪLL, skaičius sveikų asmenų kaulų čiulpuose.

Ląstelių skaičius	Su leukemija susiję aberantiniai fenotipai															
	Asinchroninė žymenų ekspresija							Žymenų hipoekspresija				Žymenų hiperekspresija		Kitų linijų žymenų koekspresija		
	CD10++ TdT+	CD10- TdT+	CD10-CD34+	CD10++CD20++	CD22++CD34+	CD45- TdT+	CD45-CD34-	CD10-CD20-CD34+	CD22 hipo	CD10 hipo	CD38 hipo	CD45 hipo	TdT hipo	CD10 hiper	CD34 hiper	CD13
0,001%	0,001%	0,003%	0,001%	0,012%	0,000%	0,004%	0,000%	0,010%	0,015%	0,006%	0,002%	0,003%	0,000%	0,000%	0,021%	0,019%

Gauti rezultatai patvirtina, kad dauguma aberacijų yra specifinės – jų sveikų asmenų kaulų čiulpuose randami labai maži kiekiai, neviršijantys standartinės minimalios liktinės ligos nustatymo ribos – 0,01%. Kiek daugiau aptikta tik ląstelių, turinčių asinchroninei žymenų ekspresijai priskiriamą fenotipą CD22++CD34+ (0,012%), hipoekspresuojančių CD10 žymenį (0,015%) bei ekspresuojančių mieloidinius žymenis (CD33 - 0,021%, CD13 – 0,019%).

Taip pat tirtos ir sveikų asmenų kaulų čiulpų T limfoidinės ląstelės. Rastos šios T limfoidinių ląstelių subpopuliacijos:

- Subrendę T limfocitai, kurių fenotipas yra CD2+cCD3+CD7+TdT-CD99- (3,81% ± 2,67% kaulų čiulpų ląstelių),
- Subrendę T limfocitai, kurių fenotipas yra CD2+cCD3+CD7+TdT-CD99blankus T limfocitai (0,18% ± 0,09% kaulų čiulpų ląstelių),

- T limfocitai, kurių fenotipas yra CD2+cCD3+CD7-TdT-CD99- (0,17% ±0,16% kaulų čiulpu ląstelių).

Kaip ir tikėtasi, CD7 žymenį ekspresavo dauguma T limfocitų. CD7- T limfocitų subpopuliacija galėtų būti literatūroje aprašomi atminties CD4+ T limfocitai – helperiai [217, 218].

Kadangi T-ŪLL minimaliai liekamajai ligai tirti pasirinkome nedidelį žymenų derinių rinkinį, pagrįstą dviem pagrindinėmis aberacijomis, t.y. ankstyvųjų žymenų CD99 ir TdT ektopine ekspresija kaulų čiulpu T limfoidinių ląstelių populiacijoje, sveikų asmenų kaulų čiulpuose taip pat tyrėme tik jas. T limfoidinių ląstelių, blankiai ekspresuojančių TdT, kiekis sveikų asmenų kaulų čiulpuose buvo 0,009% ± 0,004%, o ryškiai ekspresuojančių TdT T limfoidinių ląstelių neaptikta (0,000%). Ryški CD99 ekspresija aptikta 0,004% ± 0,004% T limfoidinių ląstelių populiacijos.

cCD3+CD19+ ląstelių kiekis sveikų asmenų kaulų čiulpuose buvo 0,037% ±0,034%. Šis radinys įrodo, kad norint pasiekti pakankamą tyrimo specifiškumą ir išvengti klaidingai teigiamų minimalios liekamosios ligos rezultatų, šios ląstelės prieš tolimesnę analizę turi būti atmestos.

Ištirta ir sveikų asmenų kaulų čiulpuose aptinkama mieloblastų populiacija. Ji sudaro 0,421% ± 0,193% branduolėtų ląstelių ir turi šį fenotipą: CD45+ blankus, CD34+, CD117+, CD38+, ŽLA-DR+, CD13+, CD33+. Taip pat tirtas ląstelių, turinčių ŪML būdingų fenotipo aberacijų, skaičius jų specifiškumui nustatyti (7 lentelė).

7 lentelė. Ląstelių, turinčių su leukemija susijusių aberantinių fenotipų, būdingų ŪML, skaičius sveikų asmenų kaulų čiulpuose.

Su leukemija susiję aberantiniai fenotipai	
Asinchroninė žymenų ekspresija	
Kitų limfų žymenų koekspresija	
Žymenų hiperekspresija	
Žymenų hipoekspresija	
Ląstelių kiekis	
0,053%	CD34+ŽLA-DR-
0,089%	CD11+ŽLA-DR-D33+
0,133%	CD117+CD34-CD15-
0,055%	CD34+CD56+
0,163%	CD34+CD11c+
0,002%	CD34+CD14+
0,106%	CD34+CD15+
0,031%	CD34+CD64+
0,132%	CD117+CD64+
0,040%	CD117+CD56+
0,092%	CD117+CD11c+
0,070%	CD4+CD45+blankus
0,039%	CD33+CD13+CD56+
0,059%	CD2+
0,044%	CD5+
0,048%	CD7+
0,028%	CD19+
0,035%	CD22+
0,028%	TdT+
0,078%	CD33 hiper
0,017%	CD34 hiper
0,144%	CD13 hipo
0,169%	CD33 hipo
0,068%	CD38 hipo
0,075%	ŽLA-DR hipo

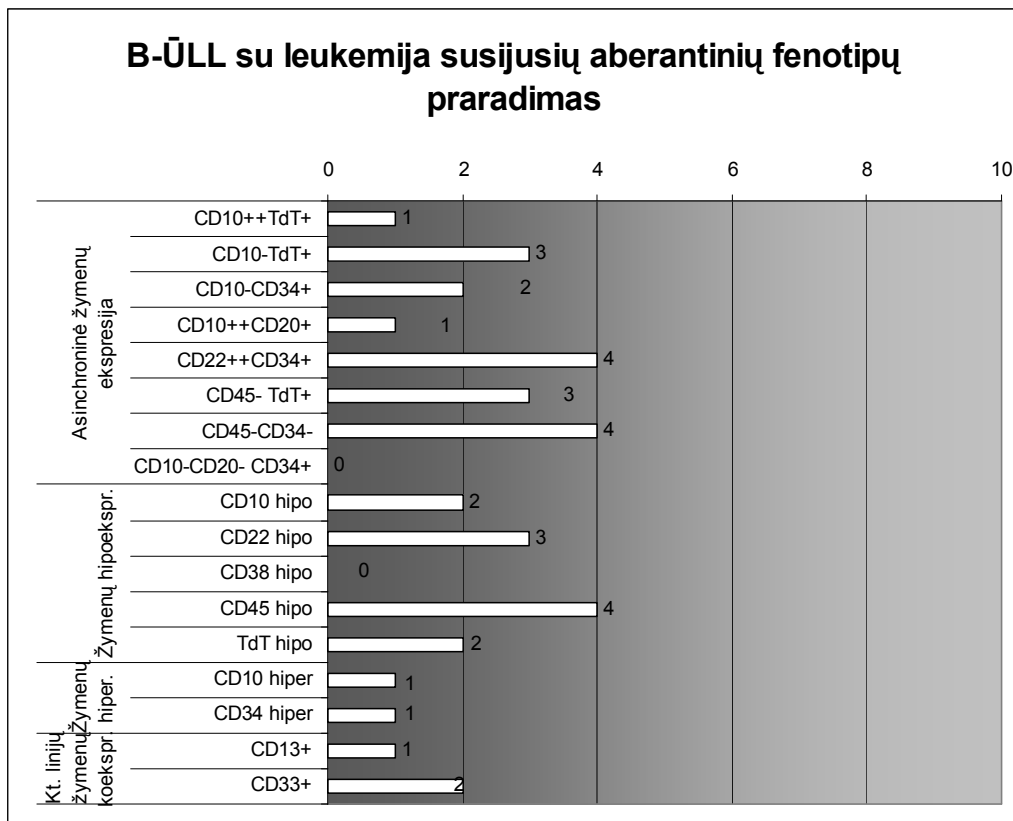
Gauti rezultatai rodo, kad dauguma ŪML aberacijų yra mažiau specifinės, nei aberacijos, būdingos limfoblastinėms leukemijoms. Tačiau ir standartinė ŪML minimalios liekamosios ligos nustatymo riba yra didesnė - 0,1%. Daugiau už šį dydį aptikta tik ląstelių, turinčių asinchroninei žymenų ekspresijai priskiriamą fenotipą CD117+CD34-CD15- (0,133%, galimai mastocitai), CD34+CD11c+ (0,163%, nedidelį šio žymens kiekį ekspresuojantys mieloblastai), CD117+CD64+ (0,132%, promielocitai), hipoekspresuojančių CD13 ir CD33 žymenis (atitinkamai 0,144% ir 0,169%, mieloblastai). Šie su leukemija susiję fenotipai neturėtų būti naudojami minimaliai liekamajai ligai nustatyti vieni, tačiau gali būti naudojami rinkinyje su kitas aberacijas nustatančiais žymenų deriniais.

4.3.5. Aberantinių fenotipų stabilumo tyrimas

Blastų fenotipo pokyčiai gydymo metu – vienas svarbiausių veiksnių, galinčių daryti įtaką minimalios liekamosios ligos nustatymo efektyvumui ir sudarančių sąlygas klaidingai neigiamam jos rezultatui. Nors ligoniai stebėti pakankamai neilgą laiką, pabandėme įvertinti pagrindinių su leukemija susijusių fenotipų stabilumą.

Minimali liekamoji liga nustatyta 28 iš 36 (77,8%) B-ŪLL sergančių tiriamųjų. Stabiliausi su leukemija susiję aberantiniai fenotipai buvo asinchroninė žymenų ekspresija CD10-CD20-CD34+ ir CD38 žymens hipoekspresija (nepakito nei vienam ligoniui). Palyginti stabilūs buvo ir fenotipai CD10++ TdT+, CD10++CD20++, CD10 ir CD34 hiperekspresija, CD13 koekspresija (prarasti 1 atveju iš 28). Gana nestabilūs pasirodė CD22++CD34+, CD45-CD34- fenotipai ir CD45 hipoekspresija (neteko 4 ligoniai). Dažniausiai sutikta B-ŪLL fenotipo aberacija, TdT hipoekspresija, pakito, t.y. TdT ekspresija padidėjo, tik dviems tiriamiesiems (17 pav.). Atvirkščiai, 9 ligoniams (32,15%) TdT ekspresija minimalios liekamosios ligos metu, palyginus su diagnoze, dar labiau sumažėjo.

17 pav. B-ŪLL su leukemija susijusių aberantinių fenotipų praradimas gydant.

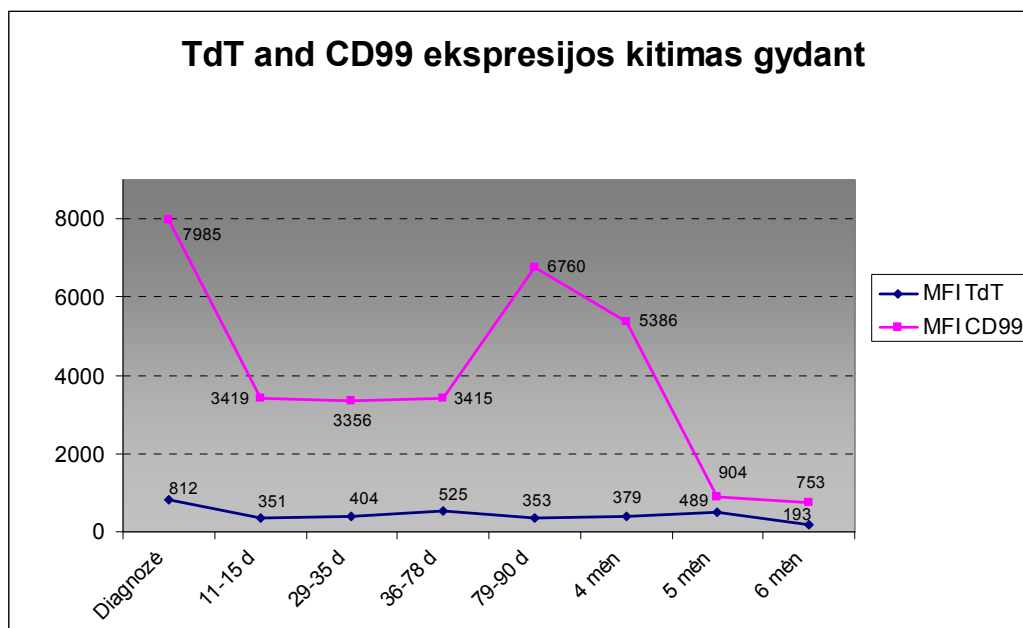


Atsižvelgiant į LSAF paplitimą sergančiųjų B-ŪLL populiacijoje jų kiekius sveikų asmenų kaulų čiulpuose ir pokyčių dažnį, CD10 ir CD34 žymenų hiperekspresija pasirodė turintis optimaliausią pritaikomumo, specifiškumo ir stabilumo savybių derinį. O štai su leukemija susijęs aberantinis fenotipas CD22++CD34+, atvirkščiai, yra ne toks paplitęs, nepakankamai specifiškas ir dažnai kintantis.

Minimali liekamoji liga nustatyta 16 iš 29 (55,2%) sergančiųjų T-ŪLL. Buvo vertinti tik minimaliai liekamajai ligai tirti taikytų su leukemija susijusių aberantinių fenotipų (ektopinės TdT ir CD99 žymenų ekspresijos kaulų čiulpų T limfoidinių ląstelių populiacijoje) pokyčiai. Šie aberantiniai fenotipai išliko stabilūs visiems ligoniams, tačiau žymenų ekspresijos intensyvumas svyravo.

Vidutinis TdT žymens fluorescencijos intensyvumas (MFI) diagnozuojant buvo 812 (santykinų vienetų), o 6-ą mėnesį nukrito iki 193, bet išliko didesnis nei sveikų asmenų, kurių (MFI 96 ± 19). CD99 ekspresija svyravo dar labiau: jei diagnozuojant MFI siekė 7985, tai 6-ą mėnesį ji sumažėjo iki 753, tačiau liko didesnė už sveikų asmenų (646 ± 193) (18 pav.). Visgi Friedmano testas neparodė jokių tendencijų: χ^2 TdT atveju buvo 1,600 ($p = 0,809$), o CD99 atveju 5,600 ($p = 0,231$).

18 pav. TdT ir CD99 MFI kitimas gydant.



4.4. Su leukemija susijusių fenotipų įtaka minimalios liekamosios ligos dinamikai

Ši įtaka vertinta, ligonius pagal kiekvieną LSAF išskiriant į dvi grupes (turinčius jį ir neturinčius), o skirtumų statistinė reiškmė įrodoma, pasitelkiant Mano-Vitnio-Vilkoksono (Mann-Whitney-Wilcoxon) kriterijų.

B-ŪLL LSAF įtakos blastų skaičiui įvairiais gydymo etapais tyrimo rezultai pateikti 8, 9 lentelėse.

8 lentelė. Blastų skaičiaus įvairiais gydymo etapais palyginimas skirtingose B-ŪLL LSAF grupėse.

Etapas	CD10++ TdT+	CD10- TdT+	CD10- CD34+	CD10++ CD20++	CD45- TdT+	CD45- CD34-	CD22 hipo	CD10 hipo	CD45 hipo	CD34 hiper
Diagn.	0,923	0,701	0,578	1,000	0,151	0,498	0,030	0,578	0,110	0,531
11-15d.	0,049	0,689	0,316	0,171	0,334	0,168	0,412	0,316	0,078	0,049
29-35d.	0,229	0,315	0,065	0,039	0,142	0,063	0,376	0,065	0,095	0,195
36-76d.	0,145	0,296	0,203	0,114	0,367	0,184	0,504	0,203	0,331	0,745
77-90d.	0,064	0,532	0,400	0,403	0,123	0,193	0,310	0,400	0,126	0,820
4 mėn.	0,873	0,671	0,893	0,525	-	0,525	-	0,893	0,631	0,671
5 mėn.	0,572	0,094	0,180	0,576	0,576	0,576	-	0,180	0,287	1,000
6 mėn.	0,058	0,946	0,870	0,540	0,058	0,219	0,072	0,870	0,671	0,951

9 lentelė. Blastų skaičiaus vidurkis įvairiais gydymo etapais B-ŪLL LSAF grupėse.

Etapas	CD10++ TdT+		CD10- TdT+		CD10- CD34+		CD10++ CD20++		CD45- TdT+	
	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Diagn.	66.93%	63.38%	65.40%	67.90%	65.30%	67.67%	65.97%	66.83%	62.23%	77.33%
11-15d.	7.51%	0.32%	5.33%	6.98%	2.69%	12.34%	7.00%	0.27%	7.24%	1.85%
29-35d.	2.21%	0.19%	1.53%	2.14%	0.66%	4.26%	2.00%	0.00%	1.77%	1.35%
36-76d.	1.94%	0.01%	1.43%	1.61%	1.27%	1.80%	1.76%	0.00%	1.32%	2.06%
77-90d.	1.45%	0.00%	1.23%	0.67%	1.25%	0.73%	1.25%	0.24%	0.67%	2.16%
4 mėn.	0.48%	0.04%	0.45%	0.25%	0.31%	0.47%	0.43%	0.00%	0.38%	-
5 mėn.	0.16%	0.00%	0.00%	0.32%	0.00%	0.25%	0.16%	0.00%	0.16%	0.00%
6 mėn.	12.75%	0.00%	13.03%	1.07%	13.75%	0.93%	11.19%	4.00%	12.75%	0.00%
Etapas	CD45- CD34-		CD22 hipo		CD10 hipo		CD45 hipo		CD34 hiper	
	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Diagn.	66.66%	60.33%	62.69%	82.67%	65.30%	67.67%	60.92%	77.45%	68.43%	61.67%
11-15d.	6.35%	0.30%	5.58%	6.91%	2.69%	12.34%	7.60%	2.08%	2.55%	12.64%
29-35d.	1.84%	0.00%	1.79%	0.79%	0.66%	4.26%	2.22%	0.15%	1.17%	2.72%
36-76d.	1.69%	0.00%	1.77%	0.33%	1.27%	1.80%	1.64%	1.00%	1.82%	1.04%
77-90d.	1.20%	0.00%	1.16%	0.73%	1.25%	0.73%	1.54%	0.23%	1.45%	0.40%
4 mėn.	0.43%	0.00%	0.38%	-	0.31%	0.47%	0.28%	0.75%	0.25%	0.45%
5 mėn.	0.16%	0.00%	0.13%	-	0.00%	0.25%	0.21%	0.00%	0.21%	0.01%
6 mėn.	11.09%	0.00%	7.15%	24.43%	13.75%	0.93%	8.91%	11.81%	10.70%	8.59%

Galima išskirti keletą fenotipų, kurie turi įtakos blastų skaičiui gydant.

Su leukemija susiję fenotipai, lemiantys mažesnę blastų skaičių gydant dažniausiai apima CD10 ir CD45 žymenų ekspresijos pakitimus:

- 1) CD10 hiperekspresijos įtaka mažesniai blastų skaičiui gydant:
 - a. ligoniams, kurių blastai turi CD10++ TdT+ fenotipą 11-15 d. nustatytas mažesnis blastų skaičius negu jo neturintiems. Blastų skaičiaus skirtumas 77-90 d. ir 6 mėn. arti statistinio reikšmingumo ribos,
 - b. CD10++ CD20++ fenotipas siejasi su mažesniu blastų skaičiumi 29-35 d.
- 2) CD45 hipoeekspresijos įtaka mažesniai blastų skaičiui gydant:
 - a. ligonių, turinčių CD45- TdT+ fenotipą ir neturinčių jo, blastų skaičiaus skirtumas 6-ą mėn. arti statistinio reikšmingumo ribos,
 - b. ligonių, turinčių CD45-CD34- fenotipą ir neturinčių jo, blastų skaičiaus skirtumas 29-35 d. arti statistinio reikšmingumo ribos,
 - c. pavienės CD45 hipoeekspresijos įtaka blastų skaičiui 11-15 d. ir 29-35 d. beveik statistiškai reikšminga.

Su leukemija susiję aberantiniai fenotipai, turintys įtakos didesniai blastų skaičiui, apima CD10, CD22 ir CD34 žymenų ekspresijos pakitimus:

- 1) CD10 hipoeekspresijos įtaka didesniai blastų skaičiui gydant:
 - a. ligonių, turinčių 10- TdT+ fenotipą ir neturinčių jo, blastų skaičiaus skirtumas 5-ą gydymo mėnesį arti statistinio reikšmingumo ribos,
 - b. CD10- 34+ fenotipas ir pavienė CD10 hipoeekspresija beveik statistiškai patikimai siejasi su didesniu blastų skaičiumi 29-35 d.
- 2) Pavienės CD22 hipoeekspresijos įtaka didesniai blastų skaičiui yra statistiškai patikima diagnozės metu ir beveik statistiškai patikima 6-ą gydymo mėnesį.

- 3) Pavienė CD34 hiperekspresijos aptikimas išskiria lignonius, kuriems 11-15 d. nustatomas didesnis blastų skaičius.

Mieloidinių žymenų koekspresija neturėjo statistiškai patikimos įtakos blastų skaičiaus kitimui gydymo eigoje.

T-ŪLL LSAF įtakos blastų skaičiui įvairiais gydymo etapais tyrimo rezultai pateikti 10, 11 lentelėse.

10 lentelė. Blastų skaičiaus įvairiais gydymo etapais palyginimas skirtingose T-ŪLL LSAF grupėse.

Etapas	CD34+	CD1a+	CD2 hipo	CD3 hipo	CD5 hipo	CD7 hiper	CD4- CD8-	CD4+ CD8+	CD13+	CD33+
Diagn.	0,710	0,216	0,136	0,345	0,658	0,658	0,471	0,469	0,148	0,085
11-15d.	0,031	0,005	0,006	0,724	0,575	0,286	0,025	0,058	0,040	0,087
29-35d.	0,080	0,005	<0,001	0,382	0,191	0,673	0,006	0,006	0,050	0,034
36-76d.	0,408	0,157	0,042	0,037	0,017	0,487	0,061	0,061	0,333	0,465
77-90d.	0,306	0,026	0,002	0,305	0,086	0,690	0,026	0,026	0,174	0,163
4 mėn.	0,775	0,513	0,663	0,186	0,087	1,000	0,775	0,513	0,513	0,513
5 mėn.	0,513	0,513	0,513	0,383	0,016	0,079	0,513	0,513	0,663	0,775
6 mėn.	0,427	0,024	0,001	0,151	0,128	0,933	0,054	0,093	0,017	0,160

11 lentelė. Blastų skaičiaus vidurkis įvairiais gydymo etapais T-ŪLL LSAF grupėse.

Etapas	CD34+		CD1a+		CD2 hipo		CD3 hipo		CD5 hipo	
	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Diagn.	73.93%	72.20%	68.94%	79.73%	77.33%	61.75%	76.15%	66.11%	71.60%	82.00%
11-15d.	0.45%	8.97%	7.74%	0.02%	0.53%	17.23%	3.46%	7.82%	5.27%	1.33%
29-35d.	<i>0.21%</i>	<i>0.54%</i>	0.59%	0.00%	0.01%	1.40%	0.12%	0.89%	0.39%	0.47%
36-76d.	0.71%	0.01%	0.53%	0.00%	0.00%	1.92%	0.00%	1.15%	0.00%	1.44%
77-90d.	2.43%	0.16%	1.46%	0.00%	0.02%	3.13%	0.05%	2.05%	<i>0.11%</i>	<i>4.32%</i>
4 mėn.	0.00%	0.02%	0.02%	0.00%	0.02%	0.02%	0.00%	0.03%	<i>0.00%</i>	<i>0.10%</i>
5 mėn.	0.00%	0.03%	0.03%	0.00%	0.03%	0.00%	0.01%	0.05%	0.00%	0.09%
6 mėn.	2.24%	1.99%	3.58%	0.00%	0.00%	6.65%	0.11%	6.43%	1.19%	8.01%
Etapas	CD7 hiper		CD4-CD8-		CD4+ CD8+		CD13+		CD33+	
	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Diagn.	75.90%	66.67%	75.14%	71.07%	70.94%	75.62%	76.05%	67.30%	78.10%	61.78%
11-15d.	0.32%	13.98%	0.44%	8.98%	<i>8.38%</i>	<i>0.47%</i>	1.16%	6.39%	<i>3.60%</i>	<i>7.48%</i>
29-35d.	0.49%	0.23%	0.06%	0.66%	0.66%	0.06%	0.09%	0.86%	0.13%	0.97%
36-76d.	0.48%	0.01%	<i>0.00%</i>	<i>0.65%</i>	<i>0.65%</i>	<i>0.00%</i>	0.01%	1.15%	0.42%	0.00%
77-90d.	1.33%	0.07%	0.00%	1.46%	1.46%	0.00%	0.05%	2.31%	1.33%	0.25%
4 mėn.	0.03%	0.01%	0.00%	0.02%	0.02%	0.00%	0.02%	0.00%	0.02%	0.00%
5 mėn.	0.04%	0.00%	0.00%	0.03%	0.03%	0.00%	0.02%	0.04%	0.02%	0.00%
6 mėn.	2.82%	0.26%	<i>0.06%</i>	<i>4.18%</i>	<i>3.83%</i>	<i>0.07%</i>	0.07%	5.08%	1.85%	2.51%

Su leukemija susiję aberantiniai fenotipai, lemiantys didesnę blastų skaičių gydant siejasi su ankstyvesne blastų diferenciacijos stadija, specifinių T limfoidinių žymenų ekspresijos pakitimais ir mieloidinių žymenų koekspresija:

- 1) Ligoniams, kurių T limfoblastai ekspresuoja ankstyvą žymenį CD34 ankstyvajame gydymo etape (11-15 d. ir galimai 29-35 d.) nustatomas didesnis blastų skaičius.
- 2) Ankstyvos diferenciacijos fenotipas CD4-CD8- siejasi su didesniu blastų skaičiumi beveik visais gydymo etapais iki 77-90d.
- 3) T limfoidinio žymens CD2 hipoekspresija lemia didesnę blastų skaičių ankstyvesniais, o CD5 hipoekspresija – vėlesniais gydymo etapais. liekamosios ligos dydį įvairias. Paviršinio CD3 žymens hipoekspresija susijusi su didesniu blastų skaičiumi 36-76 d. CD7 žymens hiperekspresija turėjo įtakos didesniai blastų skaičiui 11-15 d.

- 4) Skirtingai nuo radinių B-ŪLL atveju, mieloidinių žymenų CD13 ir CD33 ekspresija lemia didesnę blastų skaičių ankstyvuojų gydymo periodu, o CD13 ekspresija - ir po 6 mėn.

Ir atvirkščiai, fenotipai, susiję su vėlesne diferenciacija, lėmė mažesnę blastų skaičių gydant: ligoniams, kuriems rasta CD1a ekspresija ir CD4+CD8+ fenotipas, 11-15 d., 29-35 d. ir 77-90d. nustatytas mažesnis blastų skaičius.

ŪML LSAF įtakos blastų skaičiui įvairiais gydymo etapais tyrimo rezultai pateikti 12, 13 lentelėse.

12 lentelė. Blastų skaičiaus įvairiais gydymo etapais palyginimas skirtingose ŪML LSAF grupėse.

Etapas	CD34+CD15+	CD117+ CD64+	CD117+ CD11c+	CD13+CD33+ CD56+	CD5+	CD7+	CD22+	CD33 hipo	ŽLA-DR hipo
Diagn.	0,406	0,214	0,734	0,902	0,131	0,075	0,096	0,088	0,462
Iki 1 mėn.	0,339	0,073	0,749	0,478	0,675	-	0,160	0,330	0,160
1 mėn.	0,061	0,181	0,749	0,227	0,583	0,132	-	0,595	0,077
2 mėn.	0,403	0,342	0,043	0,659	0,655	0,484	0,440	0,545	1,000
3 mėn.	0,172	1,000	0,621	0,352	0,042	0,295	-	0,534	-
4 mėn.	0,293	0,854	0,594	0,424	0,096	0,030	-	1,000	0,515
5 mėn.	0,176	0,570	1,000	1,000	0,322	-	-	0,803	-
6 mėn.	0,199	0,358	0,744	0,005	0,193	1,000	-	0,893	-

13 lentelė. Blastų skaičiaus vidurkis įvairiais gydymo etapais ŪML LSAF grupėse.

Etapas	CD34+ CD15+		CD117+ CD64+		CD117+ CD11c+		CD13+CD33+ CD56+	
	0	1	0	1	0	1	0	1
Diagn.	40.18%	46.82%	39.44%	49.45%	41.19%	42.37%	42.21%	40.53%
Iki 1 mėn.	12.40%	1.38%	13.15%	0.93%	11.53%	9.88%	14.23%	4.01%
1 mėn.	5.34%	1.36%	5.34%	1.37%	5.76%	1.76%	5.33%	2.46%
2 mėn.	3.19%	15.52%	7.24%	0.13%	7.40%	2.48%	6.41%	4.19%
3 mėn.	0.93%	2.03%	1.04%	1.52%	1.33%	1.02%	0.97%	1.47%
4 mėn.	0.96%	0.00%	1.09%	0.03%	1.19%	0.02%	1.08%	0.06%
5 mėn.	0.00%	3.22%	2.11%	0.10%	3.17%	0.05%	2.71%	0.06%
6 mėn.	2.89%	4.79%	3.96%	1.98%	2.32%	4.62%	1.00%	7.80%
Etapas	CD5+		CD7+		CD33 hipo		ŽLA-DR hipo	
	0	1	0	1	0	1	0	1
Diagn.	40.21%	64.00%	43.71%	23.00%	37.03%	54.77%	40.68%	56.67%
Iki 1 mėn.	11.30%	6.26%	10.82%	-	11.54%	9.02%	8.86%	50.00%
1 mėn.	4.42%	2.76%	3.93%	13.00%	3.91%	5.55%	2.65%	49.00%
2 mėn.	5.38%	9.90%	5.63%	6.64%	4.20%	10.43%	6.15%	1.50%
3 mėn.	1.17%	1.36%	0.68%	7.25%	1.80%	0.01%	1.18%	-
4 mėn.	0.79%	0.17%	0.02%	14.00%	1.02%	0.04%	0.85%	0.00%
5 mėn.	1.90%	0.15%	1.61%	-	0.04%	3.80%	1.61%	-
6 mėn.	3.11%	10.00%	3.27%	3.99%	2.74%	4.68%	3.35%	-

Ūminės mielogeninės leukemijos atveju nustatyti tik pavienių su leukemija susijusių fenotipų įtaka blastų skaičiui gydant. Asinchroninė žymenų ekspresija CD117+CD11c+ susijusi su mažesniu blastų skaičiumi 2-ą gydymo mėnesį. Fenotipas CD33+CD13+CD56+ lemia didesnę blastų skaičių 6-ą mėnesį. T limfoidinio žymens CD5 koekspresija susijusi su didesne minimalia liekamąja liga 3-ą, o CD7 žymens koekspresija – su jos dydžiu 4-ą gydymo mėnesį. Arti statistinio patikimumo ribos buvo fenotipų CD34+CD15+, CD117+CD64+ įtaka mažesniai blastų skaičiui ankstyvuojamą gydymo etapu ir mieloidinio žymens CD33 hipoekspresijos įtaka didesniai blastų skaičiui diagnozės metu bei ŽLA-DR hipoekspresijos (ne ūmine promielocitine leukemija sergantiems pacientams) įtaka didesniai blastų skaičiui 1-ą gydymo mėnesį.

Pasirėmus tiesinės regresijos modeliu buvo tikrinama, ar pradinis blastų skaičius įtakoja fenotipų pakitimus B-ŪLL, T-ŪLL ir ŪML grupėse. Gauta, kad visose grupėse pradinis blastų skaičius neturi reikšmingos įtakos fenotipų pakitimams, atitinkamai B-ŪLL, T-ŪLL ir ŪML grupėse $p = 0.359$, $p = 0.694$ ir $p = 0.400$.

4.5. Dauginio atsparumo vaistams tyrimo optimizavimas

Mėginiai DAV tyrimams buvo ruošiami, remiantis gamintojų pateiktomis metodikomis. Standartizuotas buvo tik šių tyrimų rezultatų vertinimas. Pradėjus šių žymenų ekspresijos tyrimus, atsisakyta standartinės 20% ribos teigiamam rezultatui apibrėžti, nes pastebėta, kad šią ribą pasiekia tik pavieniai ŪL atvejai. Vietoje šios reikšmės pasirinkta vertinti vidutinį žymens fluorescencijos intensyvumą (angl. *mean fluorescence intensity, MFI*).

4.5.1. Sveikų asmenų DAV rodiklių tyrimas

Palyginti visų kaulų čiulpų mononuklearų populiacijų su dauginiu atsparumu vaistams susiję rodikliai. Rezultatai pateikti 14 lentelėje.

14 lentelė. Sergančiųjų ŪL ir sveikų asmenų kalceino, MRP1 ir p-gp ekspresijos reikšmių palyginimas (nepriklausomų imčių t testas).

	Tiriamoji grupė	MFI vidurkis	Standartinis nuokrypis	p reikšmė
Blastų kalceinas	ŪL	5242,533	2044,126	0,080
	Kontr. gr.	6856,143	2685,027	
Blastų MRP1	ŪL	121,500	47,042	0,919
	Kontr. gr.	123,429	34,058	
Blastų p-gp	ŪL	170,167	80,514	0,158
	Kontr. gr.	125,286	25,766	
Limfocitų kalceinas	ŪL	4400,800	1589,829	0,311
	Kontr. gr.	4826,842	1087,813	
Limfocitų MRP1	ŪL	76,800	10,580	0,260
	Kontr. gr.	71,789	44,120	
Limfocitų p-gp	ŪL	131,267	44,120	0,002
	Kontr. gr.	96,316	16,941	
Monocitų kalceinas	ŪL	9719,464	4513,511	0,013
	Kontr. gr.	12806,579	3147,798	
Monocitų MRP1	ŪL	253,400	123,731	0,004
	Kontr. gr.	164,842	24,548	
Monocitų p-gp	ŪL	282,967	142,416	0,079
	Kontr. gr.	222,526	42,891	

Rasti šie statistiškai patikimi sergančių ūmine leukemija asmenų ir sveikų donorų įvairių ląstelių populiacijų su atsparumu vaistams susijusių rodiklių skirtumai:

- ligonių grupėje limfocitų p-gp reikšmė didesnė ($p=0,002$),
- ligonių grupėje monocitų kalceino reikšmė mažesnė ($p=0,013$),
- ligonių grupėje monocitų MRP1 reikšmė didesnė ($p=0,04$).

Kadangi ligonių blastų kalceino, MRP1 ir p-gp reikšmės patikimai nesiskyrė nuo kontrolinės grupės, palyginome jas su kitų ląstelių populiacijų (limfocitų ir monocitų) atitinkamų rodiklių reikšmėmis (15 ir 16 lentelės, 19 pav.). Beveik visų blastų populiacijos rodiklių reikšmė patikimai skyrėsi nuo kitų populiacijų rodiklių.

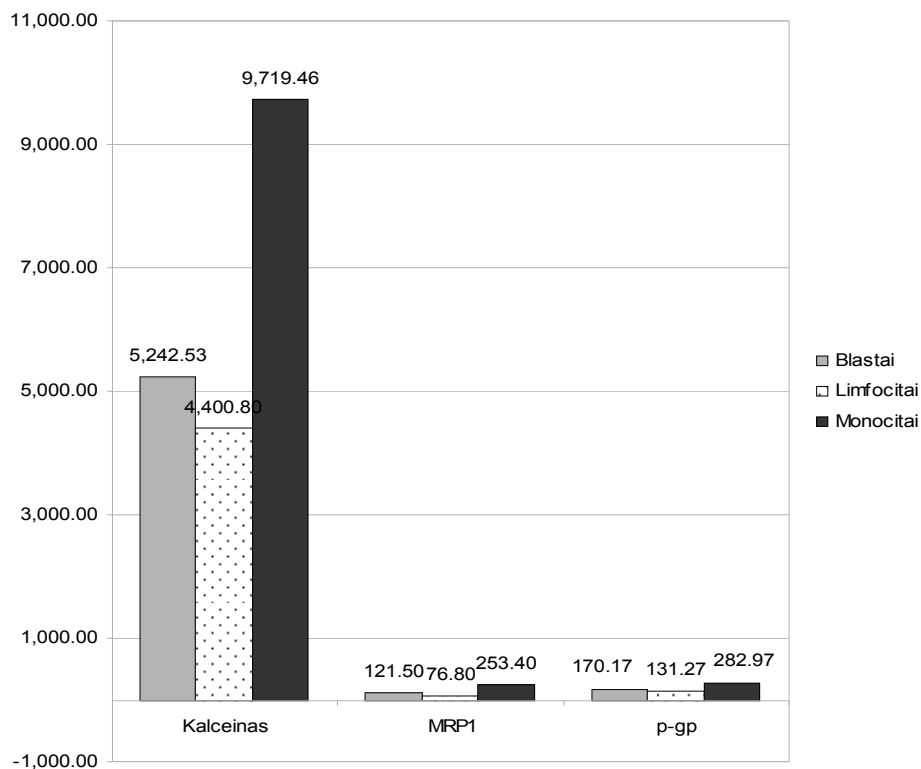
15 lentelė. Blastų ir limfocitų populiacijų kalceino, MRP1 ir p-gp ekspresijos reikšmių palyginimas

Rodiklis	Blastai		Limfocitai		p reikšmė
	MFI vidurkis	Standartinis nuokrypis	MFI vidurkis	Standartinis nuokrypis	
Kalceinas	5242,533	2044,126	4400,800	1589,829	0,075
MRP1	121,500	47,042	76,800	10,580	0,0008
p-gp	170,167	80,514	131,267	44,120	0,024

16 lentelė. Blastų ir monocitų populiacijų kalceino, MRP1 ir p-gp ekspresijos reikšmių palyginimas

Rodiklis	Blastai		Monocitai		p reikšmė
	MFI vidurkis	Standartinis nuokrypis	MFI vidurkis	Standartinis nuokrypis	
Kalceinas	5242,533	2044,126	9719,464	4513,511	0,0008
MRP1	121,500	47,042	253,400	123,731	0,0002
p-gp	170,167	80,514	282,967	142,416	0,04

19 pav. DAV rodiklių rezultatai įvairiose kraujo ląstelių populiacijose.



4.5.2. Struktūrinių ir funkcinų DAV rodiklių koreliacija

Struktūrinių ir funkcinų DAV rodiklių koreliacija tirta taikant Spirmeno (Spearman) koreliacijos koeficientą. Gauti ryšiai tarp įvairių kiekybiškai įvertintų DAV rodiklių sergančiųjų B-ŪLL grupėje pateikti 17 lentelėje.

17 lentelė. Ryšys tarp įvairių atsparumo vaistams rodiklių (B-ŪLL).

		Kalceinas	MRP1	p-gp
Kalceinas	Spirmeno korel. koef.	1	0,452	0,567
	p	<0,0001	0,222	0,112
MRP1	Spirmeno korel. koef.	0,452	1	0,929
	p	0,222	<0,0001	<0,0001
p-gp	Spirmeno korel. koef.	0,567	0,929	1
	p	0,112	<0,0001	<0,0001

Irodytas tik statistiškai patikimas stiprus ryšys tarp atskirų struktūrinio atsparumo vaistams elementų: p-gp ir MRP1 ekspresijos.

Sergantiesiems T-ŪLL jokių statistiškai patikimų ryšių tarp DAV rodiklių nenustatyta.

ŪML grupėje aptikti ryšiai tarp DAV rodiklių pateikti 18 lentelėje.

18 lentelė. Ryšys tarp įvairių atsparumo vaistams rodiklių (ŪML).

		Kalceinas	MRP1	p-gp
Kalceinas	Spirmeno korel. koef.	1	-0,103	0,105
	p	<0,0001	0,694	0,687
MRP1	Spirmeno korel. koef.	-0,103	1	0,767
	p	0,694	<0,0001	<0,0001
p-gp	Spirmeno korel. koef.	0,105	0,767	1
	p	0,687	<0,0001	<0,0001

Taip pat kaip B-ŪLL atveju, sergantiesiems ŪML įrodytas tik statistiškai patikimas ryšys tarp p-gp ir MRP1 ekspresijos.

4.5.3. Ūminės leukemijos potipių DAV rodiklių skirtumai

19 lentelėje pateikiamos skirtingą diagnozę turinčių ligonių su dauginiu atsparumu vaistams susijusių rodiklių reikšmės.

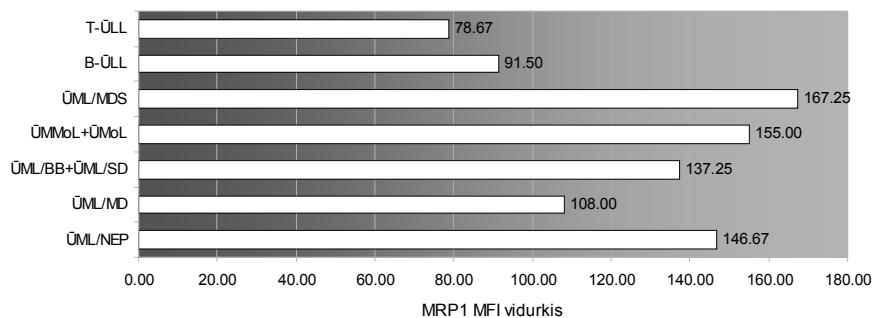
19 lentelė. Su dauginiu atsparumu vaistams susijusių rodiklių reikšmės skirtingą diagnozę turintiems ligoniams

	Diagnozė	MFI vidurkis	Standartinis nuokrypis
Kalceinas	ŪML/nepatikslinta	4630,333	1809,0579
	ŪML/MD	3560,500	1344,210
	ŪML/BB+ŪML/SD	4508,000	774,330
	ŪMMoL+ŪMoL	7570,500	1921,591
	ŪML/MDS	6288,000	3071,996
	B-ŪLL	4638,100	1633,819
	T-ŪLL	5472,333	2098,601
MRP1	ŪML/nepatikslinta	146,667	47,816
	ŪML/MD	108,000	1,414
	ŪML/BB+ŪML/SD	137,250	52,766
	ŪMMoL+ŪMoL	155,000	30,078
	ŪML/MDS	167,250	29,182
	B-ŪLL	91,500	40,045
	T-ŪLL	78,667	21,502
p-gp	ŪML/nepatikslinta	228,333	100,401
	ŪML/MD	147,000	1,414
	ŪML/BB+ŪML/SD	183,500	107,090
	ŪMMoL+ŪMoL	231,000	12,490
	ŪML/MDS	218,000	98,031
	B-ŪLL	120,200	65,518
	T-ŪLL	131,333	7,506

ANOVA testo rezultatai parodė, kad skirtingą diagnozę turintiems ligoniams patikimai skiriasi MRP1 reikšmės ($p = 0,013$). P-gp ir kalceino vertės patikimai nesiskyrė (atitinkamai $p = 0,100$ ir $p = 0,142$).

Matome, kad limfoblastine leukemija sergančių ligonių MRP1 ekspresija yra mažesnė (B-ŪLL atveju MFI lygus 91,500, T-ŪLL atveju – tik 78,667), o ligonių, sergančių mielogenine leukemija, ypač ūmine mieloleukemija su monocitiniu komponentu bei ūmine mielogenine leukemija su mielodisplazijos požymiais, ji yra gerokai didesnė (MFI atitinkamai 155,000 ir 167,250) (20 pav.).

20 pav. Ūmine leukemija sergančių ligonių MRP1 ekspresija



4.6. Su leukemija susijusių fenotipų įtaka DAV rodikliams

Su leukemija susiję aberantiniai fenotipai turėjo įtakos dauginio atsparumo vaistams rodikliams tik sergančiųjų ŪML grupėje.

Asinchroninei žymenų ekspresijai priskirtas fenotipas CD13+CD33+CD56+ turėjo įtakos mažesniajam kalceino vidutiniam fluorescencijos intensyvumui: Mano-Vitnio-Vilkoksono kriterijaus reikšmė buvo 0,036, turinčių šį fenotipą kalceino vidutinio fluorescencijos intensyvumo vidurkis buvo 5382, neturinčių - 6128. Mažesnis kalceino

susikaupimas ląstelėje rodo didesnę membraninių su DAV susijusių nešiklių funkcinį aktyvumą.

T-limfoidinio žymens CD5 koekspresija mieloidinių blastų populiacijoje taip pat siejasi su mažesniu kalceino vidutiniu fluorescencijos intensyvumu: Mano-Vitnio-Vilkoksono kriterijaus reikšmė 0,020, vidutinis fluorescencijos intensyvumas ekspresuojančių CD5 grupėje buvo 4217, neekspresuojančių - 5845.

T limfoidinio žymens CD7 koekspresija turi įtakos didesniai p-gp vidutiniam fluorescencijos intensyvumui: Mano-Vitnio-Vilkoksono kriterijaus reikšmė buvo 0,049, vidutinis fluorescencijos intensyvumas turinčių šį fenotipą grupėje buvo 3991, neturinčių - 6211.

Tirta ir pavienių žymenų ekspresijos koreliacija su DAV rodikliais. Statistiškai reikšmingų ryšių beveik nerasta. Gautas ryšys tik tarp CD38 ekspresijos (MFI) ir kalceino kiekio ūminės B-limfoblastinės leukemijos atvejais (Spirmeno koreliacijos koeficientas 0,655, $p = 0,046$).

4.7. DAV rodiklių ryšys su minimalios liekamosios ligos dinamika

Sergančiųjų ūmine B-limfoblastine leukemija grupėje aptikta keletas statistiškai reikšmingų ryšių tarp DAV rodiklių ir blastų skaičiaus:

- itin stiprus ryšys tarp kalceino MFI ir blastų skaičiaus 35–76 gydymo dieną (Spirmeno koreliacijos koeficientas 1,000, $p < 0,0001$),

- stiprus ryšys tarp MRP1 ekspresijos ir blastų skaičiaus 29-35 bei 77–90 gydymo dieną (atitinkamai Spirmeno koreliacijos koeficientas 0,712, $p = 0,048$ ir 0,706, $p = 0,034$),

-stiprus ryšys tarp p-gp ekspresijos ir blastų skaičiaus 77–90 gydymo dieną (Spirmeno koreliacijos koeficientas 0,703, $p = 0,035$).

Sergančiųjų ūmine T-limfoblastine leukemija grupėje nustatyti stiprūs ryšiai tarp MRP1 ekspresijos ir blastų skaičiaus diagnozuojant ūminę leukemiją bei tarp p-gp ekspresijos ir blastų skaičiaus 77–90 gydymo dieną

ir 4-ą gydymo mėnesį (Spirmeno koreliacijos koeficientas 1,000, $p=0,000$). Visgi tiriamųjų skaičius nebuvo pakankamas patikimai interpretacijai.

Tiriant sergančiuosius ŪML, gauta stipri koreliacija tarp p-gp ekspresijos ir blastų skaičiaus 4-ą gydymo mėnesį (Spirmeno koreliacijos koeficientas 1,000, $p<0,0001$).

5. Rezultatų aptarimas

5.1. Su leukemija susiję aberantiniai fenotipai

Ilgą laiką vyravo nuomonė, kad leukeminiai blastai tarsi „sustingsta“ tam tikroje brendimo stadijoje po to, kai praranda sugebėjimą diferencijuotis toliau. Buvo manoma, kad leukeminių blastų fenotipai atitinka anstyvųjų kraujodaros ląstelių, bręstančių sveikų asmenų kaulų čiulpuose, fenotipus. Visgi vėlyvesnės studijos parodė, kad tam tikrų žymenų ekspresija leukeminių blastų populiacijoje skiriasi nuo normalių kraujodaros pirmtakų. Tokie pakitimai vadinami su leukemija susijusiais aberantiniais fenotipais. Šie fenotipai yra taikomi ne tik tiriant minimalią liekamąją ligą ligoniams, kuriems pasiekta pilna morfologinė remisija (<5% blastų kaulų čiulpuose), bet ir patys savaime gali būti naudojami kaip ūminės leukemijos prognostiniai rodikliai [100-103]. LSAF aptinkami daugumai sergančiųjų ūminėmis limfoblastinėmis leukemijomis. Štai B-ŪLL atveju jie randami 85 - 99% pacientų, o T-ŪLL atveju – vos ne visiems ligoniams [101-107]. Mūsų duomenys tik patvirtina šiuos faktus. Bent viena fenotipo aberacija aptikta visiems ūminėmis limfoblastinėmis leukemijomis sergantiems ligoniams. ŪML atveju bent vienas su leukemija susijęs fenotipas buvo nustatytas 71,4% sergančiųjų šia liga. Literatūroje pateikiamos labai plačios ŪML su leukemija susijusių fenotipų paplitimo ribos [108-114]. Itin svarbią reikšmę ŪML tyrimų srityje įgauna daugiaspalvė (6, 8 ir daugiau spalvų) tėkmės citometrija. Pastebėta, kad daugiau su leukemija susijusių fenotipų aptinkama, tiriant

daugiau žymenų vienu metu. Taikant bent 5 spalvų žymenų derinius LSAF aptinkami didžiajai daugumai (virš 90%) ŪML sergančių ligonių [30].

Viena išsamiausių studijų, tyrusių ūminių limfoblastinių leukemijų aberantinius fenotipus, tinkamus minimalios liekamosios ligos stebėjimui, yra atlikta BIOMED-1 grupės mokslininkų [222]. Šioje studijoje, kaip ir mūsų darbe, buvo taikomi keturspalviai žymenų deriniai bei taikoma panaši analizės strategija. Su leukemija susiję aberantiniai fenotipai aptikti 98% sergančiųjų B-ŪLL. Kaip dažniausiai hiperkespresuojamas žymuo minimas ankstyvasis B-pirmtakų žymuo CD10 (32,3%). Taip pat neretai hipoekspressuojamas B-limfoidinis žymuo CD22 (25,7%). O štai kito pirmtakų žymens CD34 hiperekspresija gana reta (9,4%). Mūsų darbe CD10 hiperekspresija rasta 33,3%, CD22 hipoekspresija – 16,7%, o CD34 hiperekspresija – net 33,3% B-ŪLL atvejų. Dažniausia mūsų darbe aptikta fenotipo aberacija – TdT hipoekspresija (75% atvejų). BIOMED-1 grupės studijoje ji nevertinta atskirai nuo kitų žymenų, o derinyje su CD10 hiperekspresija aptikta taip pat gana nemažai ligonių daliai (45,7%). Kiek daugiau BIOMED-1 tyrėjai aptiko B-ŪLL atvejų su sumažėjusia CD10 ekspresija: pvz., CD10blankusCD34+ fenotipas aptiktas 55,6% atvejų, o mūsų darbe CD10-CD34+ fenotipą turėjo tik 33,3% ligonių. Kitų asinchroninei žymenų ekspresijai priskiriamų fenotipų dažnis mūsų ir BIOMED-1 tyrėjų darbe panašus: CD10++CD20++ fenotipas buvo rastas atitinkamai 16,7% ir 13,3%, CD22++CD34+ 16,7% ir 15,4%, CD45-CD34+ 8,3 ir 9,9% ligonių.

Kitos linijos žymenų ekspresija mūsų darbe dažniausiai pasireiškė kaip mieloidinių žymenų CD13 and CD33 koekspressija. Bent vienas iš mieloidinių žymenų BIOMED-1 grupės studijoje rastas 39,6%. Mūsų darbe CD33 ekspresija aptikta panašiai daliai ligonių (38,9%), o CD13 buvo koekspressuojamas 25,0% atvejų. Taigi, remiantis tik fenotipų paplitimu, mieloidiniai žymenys galėtų būti taikomi ir nemažos dalies B-ŪLL ligonių minimaliai liekamajai ligai tirti.

Vis tik mūsų vėlesni duomenys parodė, kad ne visos aberacijos yra vienodai reikšmingos. Ištyrus sveikų asmenų kaulų čiulpus, pasirodė, kad

ląstelių, turinčių kai kuriuos su leukemija susijusius fenotipus, kiekis viršija standartinę minimalios liekamosios ligos nustatymo ribą (0,01%). Tarp tokių aberacijų buvo asinchroninė žymenų ekspresija CD22++ CD34+ (rasta 0,012% sveikų asmenų kaulų čiulpų ląstelių), CD22 ir CD10 žymenų hipoekspresija (atitinkamai 0,010% ir 0,015%) bei mieloidinių žymenų CD13 ir CD33 koekspresija (0,021% ir 0,019%). Nepavyko rasti kitų tyrėjų duomenų, analogiškų šiems radiniams, kurie galėtų reikšti, kad tam tikras normalių kaulų čiulpų ląstelių lemiamas su leukemija susijusių aberantinių fenotipų „fonas“ vėgi gali lemti vieno ar kito žymenų derinio specifiškumą. LSAF, kurių sveikų asmenų kaulų čiulpuose randama daugiau 0,01%, neturėtų būti naudojami minimaliai liekamajai ligai nustatyti izoliuotai, tačiau gali būti naudojami, esant kitų, specifiškesnių aberacijų. Reikalingi išsamesni sveikų asmenų kaulų čiulpų, reaguojančių į infekciją ir regeneruojančių po užslopinimo kaulų čiulpų tyrimai, įtaukiant kuo daugiau tiriamųjų.

Ūminės T limfoblastinės leukemijos atveju pagrindinė su leukemija susijusių aberantinių fenotipų grupė yra ektopinė žymenų ekspresija. T limfocitų pirmtakai, koekspresuojantys ankstyvuosius žymenis, turėtų būti aptinkami tik čiobrialiaukėje, o jų radimas kaulų čiulpuose būdingas T-ŪLL.

BIOMED-1 grupė, tyrusi B-limfoidinių ląstelių aberantinius fenotipus, taip pat iniciavo studiją T-ŪLL minimalios liekamosios ligos tyrimo standartizavimui. Buvo ištirtos sveikų asmenų kaulų čiulpų T limfoidinių ląstelių populiacijos ir, remiantis jų fenotipais, sukurtas minimalios liekamosios ligos tyrimo žymenų rinkinys. Naudoti keturi trijų žymenų deriniai: CD7/CD5/CD3, CD7/CD4/CD8, CD7/CD2/CD3, CD7/CD38/CD34 ir TdT/CD7/CD3 bei lizuoto „viso“ kraujo mėginių paruošimo technika. Dažniausia fenotipo aberacija BIOMED-1 tyrėjų darbe buvo TdT koekspresija CD7+ ląstelių populiacijoje (91%). Kito ankstyvojo žymens CD34 ekspresija buvo aptikta žymiai rečiau (40%). Mūsų duomenimis, TdT ekspresija aptikta visais T-ŪLL atvejais, o CD34 ekspresija - 52% ligonių. Mūsų darbe 56% atvejų rasta CD7 žymens hiperekspresija, o BIOMED-1 tyrėjai atskirą CD7 hiperkespresiją aptiko tik 14% atvejų, tačiau išskyrė

fenotipą CD2blankus/neigiamasCD3-CD7+++ (aptiktas 62% ligonių), kurio dėl skirtingo duomenų rinkimo būdo (į tikslingą CD3+ ląstelių regioną) įvertinti negalėjome. O pavienę CD2 hipoekspresiją radome 56% sergančiųjų T-ŪLL. Tiek mūsų, tiek BIOMED-1 grupės tyrimuose kaulų čiulpuose nebuvo rasta aiškiai apibrėžtos T limfoidinių pirmtakų populiacijos.

Nors TdT yra naudingas T-limfoblastų žymuo, jo nustatymas gali būti sudėtingas (ekspresija branduolyje, kartais nedideli jo kiekiai ląstelėse). Buvo bandyta ieškoti žymens, kurį T limfoblastai ryškiai ekspresuotų ląstelių paviršiuje ir kuris padėtų atskirti juos nuo brandesnių T limfoidinių ląstelių. Toks žymuo galėtų būti CD99. M. Dworzak ir kolegos nustatė, kad CD99 T limfoblastuose yra vidutiniškai 7,7 kartus dažniau aptinkamas nei brandžiuose T limfocituose [223]. O vertinant vidutinį fluorescencijos intensyvumą, 85% T-ŪLL atvejų blastų populiacijos CD99 MFI buvo didesnis už T limfocitų CD99 MFI. Mūsų darbe visais T-ŪLL atvejais CD99 ekspresija buvo ryški ir skyrėsi nuo subrendusių T limfocitų. Taigi manome, kad CD99 įtaukimas į T-ŪLL minimalios liekamosios ligos žymenų derinius yra tikslingas.

ŪML atveju šiame darbe dažniausiai nustatyti su leukemija susiję fenotipai priklausė asinchroninės žymenų ekspresijos grupei. Panašaus sumanymo ir metodologijos A. Al-Mawali studijoje gauti analogiški rezultatai [30]. Vis tik konkrečių LSAF paplitimas kiek skyrėsi. A. Al-Mawali ir kt. darbe dažniausiai nustatytas aberantinis fenotipas buvo, CD117+CD65+ (40,7%), o mūsų darbe analogiškas aberantinis fenotipas CD117+CD64+ buvo rastas 24% ligonių. Mūsų duomenimis, pats dažniausias LSAF buvo CD11c ekspresija CD117+CD11c+ (62%), o A. Al-Mawali studijoje analogišką fenotipą CD117+CD11b+ turėjo tik 18,5% ligonių. CD56 ekspresija kartu su CD34 žymeniu aptikta 30%, su CD117 – 38% mūsų ligonių, lyginant su 11% ir 9% australų tyrėjų. T limfoidinio žymens CD7 ekspresija aptikta atitinkamai 48% ir 22% ŪML atvejų.

Šiame darbe nustatėme keletą prognostiškai svarbių su leukemija susijusių fenotipų. B-ŪLL atveju, CD10 hiperekspresiją ir CD45

hipoekspresiją įtraukiantys LSAF turėjo įtakos mažesniai blastų skaičiui gydant, o CD22 hipoekspresija, CD10 hipoekspresija ir CD34 hiperekspresija buvo susijusi su didesniu blastų skaičiumi. Šie duomenys iš dalies atitinka literatūroje skelbiamus duomenis. CD10 hiperekspresija kartu su CD45 hipoekspresija gali būti būdinga B-ŪLL su t(12;21), kuriai būdingas stiprus atsakas į gydymą. CD10 hipoekspresija ar nebuvimas siejamas su B-ŪLL su 11q23 persitvarkymais, o CD34 hiperekspresija dažnai aptinkama Ph+ B-ŪLL ligoniams [122]. Abi šios genetinės anomalijos sąlygoja blogesnę ligos prognozę. Būtų vertingos tolimesnės studijos, kurios tirtų fenotipo – genotipo asociacijas ir nustatytų, ar šie fenotipai yra nepriklausomi prognostiniai veiksniai, ar susiję su genetiniais pakitimais.

T-ŪLL atveju mūsų duomenys patvirtina žinomą informaciją, kad ankstyvo diferenciacijos laipsnio T-ŪLL pasižymi blogesne prognoze, nei labiau diferencijuota ligos forma [123-125]. Vis tik gavome ir naujų duomenų, pvz., apie specifinių T limfoidinių žymenų (CD2, CD5, CD3) hipoekspresijos bei mieloidinių žymenų (CD13, CD33) koekspresijos įtaką didesniai blastų skaičiui gydant.

Tirdami ŪML su leukemija susijusius aberantinius fenotipus, nustatėme, kad dalis jų (CD5, CD7, CD56 koekspresija) patvirtina literatūros duomenis apie jų, kaip blogos prognozės rodiklių, reikšmę [140-145]. Kita grupė fenotipų (CD117+CD11c+, CD34+CD15+, CD117+CD64+) susijusi su mažesniu blastų skaičiumi gydant ir priklauso asinchroninei žymenų ekspresijai, t.y. vėlesnės mieloidinės diferenciacijos žymenys CD11c, CD15, CD64 ekspresuojami kartu su ankstyvaisiais CD117+ ir CD34+, kaip niekada nevyksta normalios hemopoezės metu. Nedidelė dalis ŪML ligonių (6%) CD38 hipoekspresiją. Literatūros duomenimis, CD38 žymens hipoekspresija gali būti ne tik fenotipo aberacija, bet ir rodyti itin akstyvų leukeminių mieloblastų („kamieninių leukeminių ląstelių“) buvimą [233].

Su leukemija susiję aberantiniai fenotipai yra minimalios liekamosios ligos tyrimo tėkmės citometru pagrindas. Vis tik pastebėta, kad su leukemija susiję fenotipai ne visada yra stabilūs – daliai ligonių gydant jie gali pakisti.

Jei minimali liekamoji liga tirama pasitelkiant remiantis tik viena aberacija, jai išnykus, gali būti gaunamas klaidingai neigiamas rezultatas.

Klaidingai neigiamo rezultato galimybė, įvykus fenotipo pokyčiams, yra pagrindinis tėkmės citometrinio minimalios liekamosios ligos trūkumas, tačiau jie stebimi iki 90% ligonių [149-151]. Vis tik, tiriant keletą su leukemija susijusių aberantinių fenotipų, nors vienas jų išlieka bent 80% atvejų [33]. Mūsų duomenys patvirtina šią informaciją. Fenotipo pokyčiai aptikti 70% B-ŪLL ligonių, tačiau visais atvejais vis dar buvo įmanoma atskirti leukeminius B-limfoblastus.

Gaipa ir kt. studijoje, tyrusioje vaistų sukeltus B-ŪLL fenotipo pakitimus, nustatė, kad ankstyvieji žymenys (CD34, CD10) gydymo metu blastų dažniausiai prarandami, o vėlesni (CD20, CD19, CD45RA, CD11a) įgaunami [151]. Tai galėtų būti paaiškinta kortikosteroidų sukeltais genų transkripcijos proceso pokyčiais ar selektyviu jaunesnių blastų populiacijoje esančių ląstelių deplecija dėl mažiau užslopintų apoptozės procesų jose [224]. Mes nustatėme, kad dažniausias fenotipo pakitimas buvo TdT ekspresijos sumažėjimas, o tai taip pat galėtų rodyti poslinkį link labiau subrendusių ląstelių.

Mažiau duomenų pateikiama apie fenotipo pokyčius T-ŪLL atveju. Roshal ir kolegos nustatė, kad CD99 ekspresija leukeminių blastų populiacijoje 8-ą, 15-ą ir 29-ą gydymo dieną sumažėjo atitinkamai 24%, 26% ir 62%. Taip pat aptiktas TdT ekspresijos sumažėjimas 30%, 44% ir 60% atitinkamomis dienomis. [225]. Mūsų duomenimis, TdT ir CD99 ekspresija, vertinant vidutinį fluorescencijos intensyvumą, svyravo, tačiau visada išliko didesnė, negu sveikų asmenų.

5.2. Minimali liekamoji liga

Šiuo metu neabejojama, kad minimali liekamoji liga – svarbus rodiklis, padedantis prognozuoti ūminės leukemijos išėitį. Tėkmės citometriniai tyrimai savo klinicine verte beveik nenusileidžia PGR tyrimams: yra

pritaikomi didesniai daliai lignonų, o diegiant į praktiką citometrus, galinčius nustatyti vis daugiau ląstelės parametrų, ir lygiagrečiai tiriant vis naujų žymenų panaudojimo minimalios liekamosios ligos tyrimams galimybes, šio metodo jautrumas artėja prie polimerazės grandininės reakcijos pasiekiamo jautrumo.

Vis tik minimalios liekamosios ligos tyrimas tėkmės citometru nėra standartizuotas: vieni tyrėjai taiko “viso kraujo”, kiti – mononuklearų išskyrimo mėginių paruošimo technikas, taikomi skirtingi žymenų deriniai ir analizės metodai. Nestandartizuoti minimalios liekamosios ligos tyrimo rezultatai dažnai priklauso nuo tyrėjo kompetencijos, todėl gali būti subjektyvūs. Skirtingai atlikti minimalios liekamosios ligos tyrimai sunkiai palyginami tarp institucijų.

Nors mononuklearų išskyrimas pagal tankio gradientą gali lemti didesnę mėginio ląstelių koncentraciją ir galimai didesnę tyrimo jautrumą, jis turi keletą trūkumų: bebranduolių ląstelių (pvz., eritrocitų) priemaišą, antikoagulantų disbalanso įtaką mononuklearų išskyrimo efektyvumui, ląstelių susijungimo su antikūnais pakitimus, nespecifinį antikūnų prisijungimą. Lizuoto “viso” kraujo technika leidžia vertinti nepakitusių mėginio ląstelių sąstatą, jai reikia mažesnio mėginio kiekio, paruošimo procedūra trumpesnė ir paprastesnė, o jos metu blokuojami ląstelių paviršiuje esantys Fc receptoriai, galintys sukelti nespecifinį antikūnų prisijungimą [221]. Mūsų atliktas praskiedimo eksperimentas parodė, kad abi technikos jautrumo atžvilgiu yra lygiavertės.

Žymenų rinkinio sudarymas minimalios liekamosios ligos tyrimui turi remtis vieno ar kito žymens ar jų derinio sugebėjimu atskirti sveikas ir leukemines ankstyvasias tam tikros linijos ląsteles.

B-ŪLL atveju ši užduotis sudėtinga dėl to, kad kaulų čiulpuose regeneruojančios B limfoidinės ląstelės turi panašų, kaip ir leukeminių blastų fenotipą. Mūsų rezultatai rodo, kad sergantiesiems B-ŪLL dažniausiai aberantiškai ekspresuojamas žymuo buvo TdT. TdT yra ląstelės branduolyje esantis enzimas, kuris skaitina dezoksinukleotidų trifosfatų prijungimą prie

DNR grandinės 3' galo [226]. TdT, kaip ankstyvos B ląstelių diferenciacijos žymenį, įtaukėme į 4 iš 5 B-ŪLL minimalios liekamosios ligos žymenų rinkinių. Visgi, vėlesni rezultatai parodė, kad jis taip pat yra dažniausiai gydymo eigoje pakintantis žymuo, todėl tikslinga į žymenų derinius įtraukti ir kitą ankstyvos diferenciacijos žymenį, pvz. CD34 ar CD10.

Tiriant sergančiųjų T-ŪLL minimalią liekamąją ligą, ilgą laiką buvo remiamasi tik ankstyvųjų žymenų nustatymu T limfoidinių ląstelių populiacijoje, nes įprastai T limfocitai, ekspresuojantys ankstyvuosius žymenis, aptinkami tik čiobrialiaukėje [227]. Skirtingi tyrėjai taikė panašius žymenų derinius: D. Campana studijoje buvo naudojami TdT/CD5/cCD3, CD34/CD5/cCD3 deriniai, M. Dworzako darbe - TdT/CD7/sCD3/cCD3, CD99/CD7/sCD3/cCD3 ir CD99/CD7/CD5/CD3, mūsų darbe - TdT/CD7/cCD3/CD19 ir CD99/CD7/cCD3/CD2, o M. Krampera tyrime - tiesiog cCD3/TdT in [223, 228, 229]. Visgi naujausi M. Roshal ir kolegų duomenys rodo, kad ankstyvųjų žymenų TdT, CD99, CD34 ir CD10 ekspresija gydant dramatiškai sumažėja. Mūsų duomenimis, TdT ir CD99 ekspresija taip pat svyravo, nors ir nenukrito žemiau normalių kaulų čiulpų ląstelių lygio. Tuo tarpu specifinių T limfoidinių žymenų CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8 ekspresijos intensyvumas, M. Roshal duomenimis, beveik nekinta [225].

Mūsų darbe keturių spalvų žymenų deriniai buvo sudaryti taip, kad kiekvienas apimtų bent dvi fenotipo aberacijas ir leistų aptikti minimalią liekamąją ligą, net išnykus vienai jų. Atlikę praskiedimo eksperimentą, įrodėme, kad gali būti pasiektas net kiek didesnis nei 0,01% minimalios liekamosios ligos jautrumas. Ši taktika yra ekonomiška ir gali būti taikoma standartizuotam minimalios liekamosios ligos tyrimui klinikinėse laboratorijose, turinčiose keturspalvius tėkmės citometrus. Vis tik, esant galimybių aukščiausio lygio gydymo institucijose ir mokslo centruose, turinčiose naujausios kartos tėkmės citometrines įrangas, vertėtų ieškoti naujų prognostiškai reikšmingų žymenų bei žymenų, padedančių atskirti

leukeminius blastus nuo regeneruojančių, taikant šešiaspalvę, aštuonspalvę ar daugiau spalvų tėkmės citometriją.

Tokios studijos jau vyksta. E. Coustan-Smith ir kt. tyrė žymenų CD44, CD73, CD24, CD123, CD72, CD86, CD200, CD79b, CD164, CD304, CD97, CD69, CD49f, CD102, CD300a, CD130, NG2, BCL-2, HSPB1, PBX1, CTNNA1 panaudojimo galimybes, tiriant minimalią liekamąją ligą. Tyrėjų duomenys rodo, kad 81,4% atvejų jie skirtingai ekspresuojami leukeminių ir regeneruojančių blastų populiacijose. Šioje E. Coustan-Smith ir kolegų studijoje buvo naudota jau šiašiaspalvė tėkmės citometrija ir pasiektas net 0,001% minimalios liekamosios ligos nustatymo jautrumas [230].

Iki šiol daugelyje studijų, tyrusių ŪML minimalios liekamosios ligos prognostinę reikšmę naudoti keturių spalvų žymenų deriniai [162-164]. Vėlesnėse studijose naudojami jau 5 spalvų deriniai [231]. Šiuo metu vykdoma keletas studijų, kuriose minimali liekamoji liga tiriama šešiomis ar aštuoniomis spalvomis žymenų deriniais. Jungtinė įvairių Europos šalių mokslininkų grupė, vadinama „Euroflow Consortium“, nuolat ieško naujų žymenų, padedančių diagnozuoti ir įvairias piktybines kraujo ligas bei stebėti jų eigą, optimizuoja mėginių paruošimo ir analizės procedūras, kuria naują kompiuterinę duomenų analizės įrangą. Ši grupė dar nėra publikavusi ŪML minimalios liekamosios ligos tyrimo rezultatų, tačiau preliminarioje medžiagoje rekomenduoja naudoti 8 spalvų žymenų derinius [232].

Duomenų analizė, tiriant minimalią liekamąją ligą gali būti individualizuota ar standartinė. Individualizuotas analizės būdas, kai diagnozuojant nustatomi kiekvieno paciento fenotipiniai „pirštų anstpaudai“, t.y. kiekvienam pacientui specifiška su leukemija susijusių fenotipų visuma, naudojamas ir iki šiol, pvz., F. Buccisano ir kt. studijoje, tyrusioje minimalios liekamosios ligos įtaką sergančiųjų ŪML remisijos trukmei ir išgyvenamumui [164]. Vis tik toks požiūris padidina klaidingai teigiamo rezultato tikimybę, įvykus fenotipo pokyčiams. Dauguma tyrėjų stengiasi standartizuoti tyrimo analizę, remiantis sveikų asmenų kaulų čiulpų tyrimu. Pvz., BIOMED-1 grupės tyrėjai standartizavo B-ŪLL ir T-ŪLL minimalios liekamosios ligos

analizę, pavadindami ją „tuščių erdvių“ analizės sistema [106, 222]. Taškinėse histogramose optiškai buvo nustatytos vietos, kuriose išsidėsto sveikos kraujodaros ląstelės. Kitos vietos pavadintos „tuščiomis“, būtent jose ir ieškoma minimalios liekamosios ligos. Visgi vizualinis vertinimas gali būti subjektyvus, todėl mes šį metodą patobulinome, kiekvieną taškinę histogramą suskirstydami į 9 ar 6 („3x3“ ar „2x3“ sistema) stačiakampius regionus ir tuos jų, kuriuose, tiriant sveikų asmenų kaulų čiulpus, neaptinkama ląstelių, pavadiname „tuščiais regionais“. Standartizuota analizė užtikrina nuo tyrėjo nepriklausomą rezultatų interpretaciją, galimybę palyginti skirtingų pacientų duomenis ar skirtingų institucijų duomenis.

Standartizuota duomenų analizė remiasi sveikų kaulų čiulpų tyrimu. Mūsų darbe taip pat tirti sveikų asmenų kaulų čiulpų limfoidinių ir mieloidinių ląstelių pirmtakai, nustatant jų skaičių ir fenotipus.

Viena išsamiausių studijų, tyrusių B limfocitų diferenciaciją atlikta P. Lucio ir kolegų [105]. B limfocitų pirmtakus jie išskyrė į dvi grupes: anktyviausius CD19- ir vėlyvesnius CD19+. CD19- grupėje išskirtos CD34+/CD22+ ir TdT+/CD10+ fenotipus turinčios ląstelės, sudarančios atitinkamai $0.11 \pm 0.09\%$ ir $0.04 \pm 0.05\%$ kaulų čiulpų kariocitų. Mūsų darbe nebuvo išskirtas CD19- B ląstelių pirmtakų fenotipas, nes pagrindinis tikslas buvo atskirti leukeminius B limfoblastus, kurių visi ekspresavo CD19 žymenį. P. Lucio studijoje CD19+ pirmtakai toliau buvo suskirstyti į tris grupes pagal jų subrendimo lygį, taip pat, kaip ir mes tai atlikome savo darbe. Ankstyviausia CD10+CD34+TdT+ subpopuliacija sudarė $0.44 \pm 0.65\%$ ir $0.08 \pm 0.04\%$, vidutinio brandumo CD10+CD34-TdT- subpopuliacija - $3.75 \pm 5.75\%$ ir $0.6 \pm 0.03\%$, o brandžiausia CD10-CD34-TdT- subpopuliacija - $2.58 \pm 1.43\%$ ir $1.57 \pm 0.53\%$ kaulų čiulpų kariocitų atitinkamai P. Lucio ir mūsų darbuose. Mažesni visų B ląstelių populiacijų kiekiai mūsų darbe gali būti paaiškinti skirtingu sveikų asmenų amžiumi, nes sveiki vaikai nebuvo įtraukti į mūsų studiją. P. Lucio duomenimis, bręstant B limfocitams, mažėjo TdT, CD34 ir CD10 ekspresija ir didėjo CD20 ir CD45 ekspresija. Mes taip

pat pastebėjome ankstyvųjų žymenų CD34 ir CD10 ekspresijos sumažėjimą, CD20, CD22 ir CD45 žymenų ekspresijos didėjimą bręstant.

T limfocitų fenotipai sveikų asmenų kaulų čiulpuose detaliam apibūdinti BIOMED-1 studijoje [106]. Nei BIOMED-1 tyrėjai, nei mes kaulų čiulpuose neaptikome ankstyvųjų T limfocitinių ląstelių. Tyrimo pražioje keliems sveikiems asmenims nustatėme cCD3+TdT+ populiaciją, kuri, kaip paaiškėjo, taip pat ekspresavo B limfocitinių žymenų CD19. Tai galėtų būti B limfocitinių ląstelių pirmtakai, nespecifiškai prisijungę T limfocitinių žymenų ar labai ankstyvos diferenciacijos stadijos limfoblastai, turintys abiejų limfocitinių linijų savybių. Vidutinis subrendusių CD7+ ląstelių skaičius sveikų asmenų kaulų čiulpuose BIOMED-1 darbe buvo $10\% \pm 3,6\%$, o mūsų darbe cCD3+ ląstelių rasta $4,21 \pm 1,95\%$. Skirtumą galėtų paaiškinti CD7+CD3- ląstelių priemaiša (pvz., NK ląstelės). Nedidelė dalis CD3+ T limfocitų neturėjo CD7 žymens. Ši subpopuliacija galėtų būti suadaryta iš literatūroje aprašytų atminties CD4+ T limfocitų [217-218].

Savo darbe nustatėme ir sveikų asmenų kaulų čiulpuose esančių mieloidinių blastų fenotipą. Blastai ekspresavo mieloidinius žymenis CD13, CD33, ankstyvuosius žymenis CD34, CD117 ir ŽLA-DR, neturėjo vėlyvesnių mieloidinių žymenų (CD11c, CD14, CD15, CD64) ir kitų linijų žymenų.

5.3. Dauginis atsparumas vaistams

P-gp ekspresija ūmine ir lėtine leukemija sergantiems ligoniams jau tirta ir Lietuvoje bei aprašyti dr. R. Matuzevičienės daktaro disertacijoje „Žmogaus ūminių ir lėtinių leukemijų ląstelių imunofenotipai: diferenciacijos žymenų ekspresijos tyrimai“ [70]. Padidėjusi p-gp ekspresija rasta tiek ūminės mielogeninės leukemijos, tiek ūminės B-limfoblastinės, tiek ūminės T-limfoblastinės leukemijos atvejais (p-gp atitinkamai ekspresavo $27,50\% \pm 12,32$, $37,89\% \pm 14,23$ ir $19,00\% \pm 10,10$ blastų). Kadangi dabartinėje studijoje tokios ryškios p-gp ekspresijos negavome (20% teigiamą ribą siekė tik pavieniai atvejai), vertiname vidutinį fluorescencijos intensyvumą. Skirtingai nei 2003 m. R. Matuzevičienės darbe, šioje studijoje didžiausias p-

gp reikšmes gavome ūminės mieloleukemijos, ypač ūminės mielogeninės leukemijos su monocitiniu komponentu, atveju (p-gp MFI 231,00), o ūminės B-limfoblastinės ir ūminės T-limfoblastinės leukemijos atveju p-gp reikšmės buvo daug mažesnės (MFI atitinkamai 120,20 ir 131,333), tačiau vis tiek patikimai skyrėsi nuo sveikų asmenų limfocitų p-gp reikšmių (p 0,024).

A. Takeshita su kolegomis lygino normalių ir leukeminių mieloblastų p-gp ekspresiją ir nustatė, kad sveikų asmenų CD34+CD33– blastų populiacijoje p-gp ekspresija buvo $12,2 \pm 2,2$ %, CD34+33+ populiacijoje $6,3 \pm 3,1$ %, o naujai susirgusių ŪML – atitinkamai $19,8 \pm 6,6$ % ir $12,9 \pm 5,3$ %. Mūsų darbe blastus apibrėžėme kaip mažos šoninės sklaidos ląsteles, blankiai ekspresuojančias CD45 žymenį ir DAV tyrimuose linijai savitų žymenų nenaudojome. Tačiau visoje blastų populiacijoje statistiškai patikimų skirtumų tarp sveikų asmenų ir ūmine leukemija sergančių ligonių p-gp ekspresijos negavome (MFI atitinkamai 170,167 ir 125,286) [234].

Mūsų darbe nepavyko įrodyti koreliacijos tarp p-gp ir MRP1 ekspresijos ir funkcinio aktyvumo. Skirtumų tarp DAV baltymų ekspresijos ir jų funkcijos pastebėta ir anksčiau. Pavyzdžiui, C. P. Leith su kolegomis DAV funkcijai įvertinti naudojo DiOC₂ fluorescencinį dažiklį ir dešimčiai ŪML atvejų nustatė padidėjusį funkcinį DAV aktyvumą be ryškesnės p-g ekspresijos, o šešiais atvejais p-gp ekspresija buvo padidėjusi be funkcijos pokyčių. Funkciniai DAV rodikliai taip pat koreliavo su CD34 ekspresija: CD34 ekspresija rasta 31 iš 39 ligonių, kuriems aptiktas padidėjęs DiOC₂ išmetimas, ir tik 5 ligoniams, kuriems DiOC₂ išmetimas buvo normalus [48]. Mes savo darbe CD34 ekspresijos ryšio su pakitusia DAV funkcija įrodymų negavome, tačiau įrodėme ryšį tarp tam tikrų su leukemija susijusių aberantinių ŪML fenotipų (CD13+CD33+CD56+, CD5+, CD7+) ir dauginio atsparumo vaistams rodiklių - kalceino fluorescencijos ir p-gp ekspresijos. Visi šie fenotipai siejosi su didesniu blastų skaičiumi gydant.

D. Raspadori ir kolegų studijoje tirti 143 sergantys ŪML ligoniai ir nustatytas skirtingas remisijos dažnis skirtingą p-gp ir CD56 ekspresijos modelį turintiems ligoniams [236]. Remisijos dažnis p-gp-/CD56- fenotipo

grupėje buvo 83%, p-gp-/CD56+ grupėje - 60%, p-gp+/CD56+ grupėje - 58%, o p-gp+/CD56- grupėje 46% ($p=0,002$). Vidutiniškai ligoniai, turintys CD56+/p-gp+ fenotipą išgyveno 10-23 mėn. Šie duomenys, kaip ir mūsų gautieji, rodo esant ryšio tarp CD56 ekspresijos ir dauginio atsparumo vaistams.

Taip pat nustatėme, kad T limfoidinio žymens CD7 koekspresija turi įtakos didesniai p-gp vidutiniam fluorescencijos intensyvumui. Analogiški duomenys pateikiami C. Wurcher studijoje: funkcinio p-gp aktyvumu, nustatytu tiriant rodamino 123 pasiskirstymą, pasižymėjo 70% ŪML ligonių, kuriems aptikta CD7 ekspresija ir 33% ligonių, kurie CD7 neturėjo [237].

Nustatėme, jog kai kurie DAV rodikliai, pavyzdžiui, MRP1 ir p-gp ekspresija, koreliuoja su blastų skaičiumi diagnozės metu, 29–35 ir 77–90 dieną (minimali liekamoji liga). A. Venditti su kolegomis taip pat aptiko, kad ŪML MLL lygis $3,5 \times 10^{-4}$ po konsolidacijos koreliuoja su p-gp+ blastų fenotipu ir kitais blogos prognozės rodikliais [163]. J. F. San Miguel su kolegomis ištyrė, kaip ŪML minimali liekamoji liga koreliuoja su funkcinio DAV tyrimo (rodamino-123 testas) rezultatais ligos pradžioje. Ligoniams, kuriems minimali liekamoji liga indukcijos pabaigoje buvo $\geq 5 \times 10^{-3}$, diagnozuojant ūminę leukemiją buvo rastas gerokai didesnis rodamino-123 išmetimas ($56\% \pm 24\%$) negu tiems, kuriems minimali liekamoji liga buvo mažesnė nei 5×10^{-3} ($32\% \pm 31\%$; $p = 0,04$) [238].

6. Išvados

- 1) Absoliučiai daugumai sergančiųjų ūmine limfoblastine leukemija ir žymiai daliai sergančiųjų ūmine mielogenine leukemija randama su leukemija susijusių aberantinių fenotipų, kurie gali būti taikomi tiriant minimalią liekamąją ligą.
- 2) Tėkmės citometrinis tyrimo metodas, kuomet sergantiesiems ūmine limfoblastine leukemija taikomi aberantiniai fenotipais pagrįsti keturspalviai žymenų deriniai, o sergantiesiems ūmine mielogenine leukemija - šešiaspalviai žymenų deriniai, lizuoto kraujo mėginių paruošimo technika ir standartizuota, paremta sveikų asmenų kaulų čiulpu tyrimais analizės sistema, leidžia pakankamu jautrumu ir specifiškumu tirti daugumos sergančiųjų minimalią liekamąją ligą.
- 3) Nustatyta šių su leukemija susijusių aberantinių fenotipų įtaka minimalios liekamosios ligos dydžiui:
 - a) Sergantiesiems ūmine B-limfoblastine leukemija asinchroninė žymenų ekspresija CD10++TdT+ ir CD10++CD20++ turi įtakos mažesniai, o CD34 hiperekspresija – didesniai blastų skaičiui gydant.
 - b) Sergantiesiems ūmine T-limfoblastine leukemija su ankstyvąja diferenciacija susiję fenotipai CD34+ ir CD4-CD8-, taip pat žymenų CD2 ir CD5 hipoekspresija bei mieloidinių žymenų CD13 ir CD33 koekspresija turi įtakos didesniai blastų skaičiui, o vėlesnės diferenciacijos fenotipai CD1a+ ir CD4+CD8+ – mažesniai blastų skaičiui gydant.
 - c) Ūminės mielogeninės leukemijos atveju asinchroninė žymenų ekspresija CD117+CD11c+ turi įtakos mažesniai blastų skaičiui, o fenotipas CD13+CD33+CD56+ ir CD5 bei CD7 žymenų koekspresija - didesniai blastų skaičiui gydant.

- 4) Blastų atsparumas vaistams gali būti tiriamas nustatant p-gp ir MRP1 ekspresiją (struktūrinis atsparumas) ir kalceino susikaupimą (funkcinis atsparumas) ir šių žymenų vidutinį fluorescencijos intensyvumą lyginant su atitinkamais sveikų ląstelių rodikliais. Struktūrinis atsparumas vaistams nebūtinai susijęs su funkciniu.
- 5) Sergančiųjų ūmine mielogenine leukemija fenotipas CD13+CD33+CD56+ ir T limfoidinių žymenų CD5 bei CD7 ekspresija susijusi su didesniu dauginiu atsparumu vaistams.
- 6) P-gp ekspresija patikimai susijusi su minimalia liekamąja liga sergančiųjų B-ŪLL ir ŪML grupėje, o MRP1 ekspresija ir kalceino susikaupimas – tik sergančiųjų B-ŪLL grupėje.

Apibendrinant galima teigti, kad sergančiųjų ūmine mielogenine leukemija aberantinis fenotipas CD13+CD33+CD56+ ir T limfoidinių žymenų CD5 bei CD7 koekspresija lemia didesnę minimalią liekamąją ligą per dauginio atsparumo vaistams mechanizmą. Likę aberantiniai fenotipai bei sergančiųjų ūmine limfoblastine leukemija aberantiniai fenotipai turi įtakos minimalios liekamosios ligos dydžiui per kitus biologinius mechanizmus.

7. Praktinės rekomendacijos

- 1) Kiekvienam sergančiajam ūmine leukemija diagnozės metu tikslinga įvertinti šiuos prognozinę reikšmę turinčius su leukemija susijusius imunofenotipus:
 - a. Sergantiesiems B-ŪLL: CD10++TdT+, CD10++CD20++, CD34 hiperekspresija,
 - b. Sergantiesiems T-ŪLL: CD34+, CD4-CD8- CD2 ir CD5 hipoekspresija, mieloidinių žymenų CD13 ir CD33 koekspresija, CD1a ekspresija, CD4+CD8+,

c. Sergantiesiems ŪML: CD117+CD11c+, CD13+CD33+CD56+, CD5 ir CD7 koekspresija.

- 2) ŪLL minimaliai liekamajai ligai tirti tikslinga naudoti bent 4 spalvų žymenų derinius (didesniam jautrumui pasiekti pageidautini 6, 8 ar daugiau spalvų žymenų deriniai). Ūminės mielogeninės leukemijos minimaliai liekamajai ligai tirti taikytini bent 6 spalvų žymenų deriniai. Naujai įdiegiant minimalios liekamosios ligos tyrimus, būtina tirti sveikų asmenų kaulų čiulpus ir išsiaiškinti ieškomų su leukemija susijusių fenotipų specifiškumą. Minimalios liekamosios ligos analizė turi būti standartizuota, pagrįsta sveikų asmenų kaulų čiulpų tyrimais ir svarbiausiais su leukemija susijusiais fenotipais. Analizuojant minimalią liekamąją ligą, būtina atsižvelgti į klaidingai neigiamo rezultato galimybę, įvykus fenotipo pokyčiams. Šiai galimybei sumažinti, minimali liekamoji liga turėtų būti tiriama, naudojant ne vieną, o daugiau su leukemija susijusių fenotipų. Jei tai neįmanoma, gavus neigiamą minimalios liekamosios ligos rezultatą, turi būti pateikiama informacija apie minimalios liekamosios ligos tyrimo ypatumus.
- 3) Dauginio atsparumo vaistams baltymų ekspresijos ir funkcijos tyrimai gali būti įtraukti į ūminių leukemijų diagnostikos algoritmus ar bent atliekami, nustatčius su jais susijusius aberantinius fenotipus. Atsirandant dauginį atsparumą mažinančių vaistų, tikslingi laboratoriniai DAV slopinimo tyrimai.
- 4) Reikalingos tolimesnės studijos, siejančios aberantinių fenotipų aptikimą ir dauginį atsparumą vaistams su atokiais gydymo rezultatais. Tikslinga iširti ir kitus ūminių leukemijų, ypač limfoblastinių, aberantinių fenotipų sąsajų minimalia liekamąja liga mechanizmus,

pvz., ryšius su genetinėmis anomalijomis bei kitais prognozės veiksniais.

8. Padėka

Norėčiau išreikšti nuoširdžią padėką šio darbo vadovei prof. habil. dr. Zitai Aušrelei Kučinskienei už jos paramą ir tobulėti skatinančias pastabas doktorantūros studijų metu ir disertacijos rengimo procese. Taip pat dėkoju moksliniam konsultantui prof. Laimonui Griškevičiui už produktyvias idėjas, diskusijas ir įžvalgas.

Esu labai dėkinga doc. Rėdai Matuzevičienei, kuri savo žiniomis ir patirtimi tėkmės citometrijos srityje padėjo rengiant šį darbą, o prieš dešimtmetį atvedė mane į „spalvingą“ tėkmės citometrijos pasaulį bei nuolat skatina siekti naujovių.

Darbas atliktas Vilniaus Universiteto ligoninės Santariškių Klinikų Laboratorinės diagnostikos centro Hematologijos ir bendrosios citologijos laboratorijoje. Nuoširdžiai dėkoju laboratorijos vyresniajai ordinatoriui Elvyrai Ostonevičiūtei ir darbuotojams už visokeriopą paramą. Ypač esu dėkinga savo kolegėms Aušrai, Daivai, Katažinai ir Agnei už pagalbą atliekant tėkmės citometrinius tyrimus bei tėkmės citometrijos poskyrio laborantėms Nijolei, Daliai, Ilonai ir Virginijai už „viršvalandinį“ triūsą.

Dėkoju Vilniaus Universiteto ligoninės Santariškių klinikų Hematologijos, onkologijos ir transfuziologijos centro bei Vaikų ligoninės Onkohematologijos centro gydytojams už pagalbą organizuojant tyrimų atlikimą.

Labai ačiū mano šeimai – vyrui Tomui, mamai Mildai, vaikams Juliiui ir Justinai, už palaikymą sunkiais studijų periodais.

9. Disertacijos tema paskelbtų darbų sąrašas

9.1. Straipsniai leidiniuose, įrašytuose į mokslinės informacijos instituto (ISI) sąrašą

Janeliūnienė M, Matuzevičienė R, Griškevičius L, Kučinskienė Z.A. Monitoring of T-cell acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry. Central European Journal of Medicine 2010; 5(6): 651-658.

9.2. Straipsniai Lietuvos recenzuojamuose periodiniuose leidiniuose

1. Janeliūnienė M, Matuzevičienė R, Griškevičius L, Kučinskienė Z. Optimizing detection of minimal residual disease in B-precursor acute lymphoblastic leukemia by multiparameter flow cytometry. Acta Medica Lituanica 2007; 4(14): 257-266.
2. Janeliūnienė M, Matuzevičienė R, Kučinskienė Z. Blastų dauginio atsparumo vaistams tyrimo tėkmės citometru reikšmė diagnozuojant ūminę leukemiją. Laboratorinė medicina 2011; 2(50): 65-75.

9.3. Kiti darbai

1. Janeliūnienė M, Matuzevičienė R, Janiulionienė A, Kučinskienė Z. Žymenų panelis ūminės B-limfocitinės leukemijos minimalios liktinės ligos tyrimui daugiaparametre tėkmės citometrija (Marker panel for B-acute lymphocytic leukemia minimal residual disease diagnostics by multiparameter flow cytometry). Tezės VIII Baltijos šalių laboratorinės medicinos kongrese, Vilnius, 2006.
2. Janeliūnienė M, Matuzevičienė R, Kučinskienė Z.A. Detection of minimal residual disease in T-cell acute lymphoblastic leukemia by multiparameter flow cytometry. Tezės VII Europos klinikinės ląstelių analizės konferencijoje, Roterdamas (Olandija), 2007.

10. Literatūros sąrašas

1. Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B. Wintrobe's Clinical Hematology, 12th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
2. Longo D. Malignancies of Lymphoid Cells. In: Kasper DL, Braunwald E, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Fauci AS. Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th ed. New York: McGraw-Hill Professional; 2004.
3. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA, Edwards BK (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008, National Cancer Institute. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008 (2011 09 28).
4. Cortelazzo S, Ponzoni M, Ferreri AJ, Hoeltzer D. Lymphoblastic lymphoma. [Journal article]. Crit Rev Oncol Hematol 2011, Jan 25.
5. Farber S. Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic Acid (Aminopterin). N Engl J Med 1948; 238: 787-793.
6. Pearson OH, Eliel LP. Use of pituitary adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and cortisone in lymphomas and leukemias. J Am Med Assoc 1950; 144(16): 1349-53.
7. Pinkel D. Total therapy of acute lymphocytic leukemia. J Am Med Assoc 1972; 222(9): 1170-4.
8. Pui CH, Boyett JM, Rivera GK, Hancock ML, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Behm FG, Raimondi SC, Gajjar A, Razzouk B, Campana D, Kun LE, Relling MV, Evans WE. Long-term results of Total Therapy studies 11, 12 and 13A for childhood acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children's Research Hospital. Leukemia 2000; 14(12): 2286-94.

9. Kamps WA, Veerman AJ, van Wering ER, van Weerden JF, Slater R, van der Does-van den Berg A. Long-term follow-up of Dutch Childhood Leukemia Study Group (DCLSG) protocols for children with acute lymphoblastic leukemia, 1984-1991. *Leukemia* 2000; 14(12):2240-6.
10. Silverman LB, Declerck L, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, Hurwitz CA, Moghrabi A, Samson Y, Schorin MA, Lipton JM, Cohen HJ, Sallan SE. Results of Dana-Farber Cancer Institute Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1981-1995). *Leukemia* 2000;14(12): 2247-56.
11. Barrett AJ, Horowitz MM, Pollock BH, Zhang MJ, Bortin MM, Buchanan GR, Camitta BM, Ochs J, Graham-Pole J, Rowlings PA, et al. Bone marrow transplants from HLA-identical siblings as compared with chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia in a second remission. *N Engl J Med* 1994; 331(19): 1253-8.
12. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD, European Leukemia Net. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net. *Blood* 2010; 115(3): 453-74.
13. Diamandopoulos GT. Cancer: An historical perspective. *Anticancer Res.* 1996; 16: 1595-1602.
14. Kris MG, Benowitz SI, Adam S, Diller L, Ganz P, Kahlenberg MS, Le QT, Markman M, Masters GA, Newman L, Obel JC, Seidman AD, Smith SM, Vogelzang N, Petrelli NJ. *Clinical Cancer Advances 2010: Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology.* *J Clin Oncol* 2010; 28(36): 5327-47.

15. Meyer L. Timeline: Milestones in Cancer Treatment. http://www.curetoday.com/index.cfm/fuseaction/article.show/id/2/article_id/631 (2011 09 28).
16. Mastrangelo R, Poplack D, Bleyer A, Riccardi R, Sather H, D'Angio G. Report and recommendations of the Rome workshop concerning poor-prognosis acute lymphoblastic leukemia in children: biologic bases for staging, stratification, and treatment. *Med Pediatr Oncol* 1986; 14(3): 191-4.
17. Patte C, Auperin A, Michon J, Behrendt H, Leverger G, Frappaz D, Lutz P, Coze C, Perel Y, Raphaël M, Terrier-Lacombe MJ; Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique. The Societe Fran aise d'Oncologie Pediatrique LMB89 protocol: highly effective multiagent chemotherapy tailored to the tumor burden and initial response in 561 unselected children with B-cell lymphomas and L3 leukemia. *Blood* 2001; 97(11): 3370-9.
18. Kanerva J, Saarinen-Pihkala UM, Riikonen P, Mäkipernaa A, Möttönen M, Salmi TT. Reemphasis on lymphoblast L2 morphology as a poor prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1999; 33(4): 388-94.
19. Ritter J, Vormoor J, Creutzig U, Schellong G. Prognostic significance of Auer rods in childhood acute myelogenous leukemia: results of the studies AML-BFM-78 and -83. *Med Pediatr Oncol* 1989; 17(3): 202-9.
20. Creutzig U, Ritter J, Niederbiermann-Koczy G, Harbott J, Schellong G. Prognostic significance of eosinophilia in children with acute myeloid leukemia in the studies AML-BFM-78 and -83. *Klin Pediatr*. 1989; 201(4): 220-6.
21. Shapiro HM. Flow cytometry: problems, parameters, probes and principles. In: Shapiro HM. *Practical flow cytometry*. 4th ed. New Jersey: Willey-Liss; 2003, p. 18 - 48.
22. Givan AL. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol* 2011; 699: 1-29.

23. Rots MG, Pieters R, Peters GJ, Noordhuis P, van Zantwijk CH, Kaspers GJ, Hähnen K, Creutzig U, Veerman AJ, Jansen G. Role of poly(l)polyglutamate synthetase and poly(l)polyglutamate hydrolase in methotrexate accumulation and polyglutamylolation in childhood leukemia. *Blood* 1999; 93(5):1677-83.
24. Schrappe M, Camitta B, Pui CH, Eden T, Gaynon P, Gustafsson G, Janka-Schaub GE, Kamps W, Masera G, Sallan S, Tsuchida M, Vilmer E. Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000; 14(12): 2193-4.
25. Castaigne S, Chomienne C, Daniel MT, et al. All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. Clinical results. *Blood* 1990; 76: 1704–1709.
26. Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004; 18(2): 115-36.
27. Czibere A, Grall F, Aivado M. Perspectives of proteomics in acute myeloid leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006; 6(11): 1663-75.
28. Bullinger L, Valk PJ. Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23(26): 6296-305.
29. Babusíková O, Glasová M, Koníková E, Kusenda J. Leukemia-associated phenotypes: their characteristics and incidence in acute leukemia. *Neoplasma* 1996; 43(6): 367-72.
30. Al-Mawali A, Gillis D, Hissaria P, Lewis I. Incidence, sensitivity and specificity of leukemia associated phenotypes in acute myeloid leukemia using specific five-color multiparameter flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 934-45.
31. Macedo A, Orfao A, Vidriales MB, et al. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Ann Hematol* 1995; 70: 189-194.
32. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodological advances and clinical significance. *Blood* 1995; 85: 1416-34.

33. Campana D. Determination of minimal residual disease in leukemia patients. *Br J Hemat* 2003; 121: 823-38.
34. Peters JM, Ansari MQ. Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135(1): 44-54.
35. Vasconcelos F, Cavalcantijr G, Silva K, Demeis E, Kwee J, Rumjanek V, Maia R. Contrasting features of MDR phenotype in leukemias by using two fluorochromes: Implications for clinical practice. *Leuk Res* 2007; 31(4): 445-54.
36. Funato T, Harigae H, Abe S, Sasaki T. Assessment of drug resistance in acute myeloid leukemia. *Exp Rev Mol Diagn* 2004; 4(5): 705-13.
37. Matuzevičienė R. Žmogaus ūminių ir lėtinių leukemijų imunofenotipai: diferenciacijos žymenų ekspresijos tyrimai: daktaro dis.: biomed. mokslai: medicina (07B) / VU. Vilnius, 2003.
38. Slobinas A, Matuzevičienė R. The immunophenotype of adults with acute myeloid leukemia: proposal of prognostic value. *Acta medica Lituanica* 2005; 12(3): 54-59.
39. Liesveld JL, Lichtman MA. Acute myelogenous leukemia. In: Lichtman MA, Beutler E, Kaushansky K, Kipps T, Seligsohn U, Prshal J. *Williams Hematology*. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 2006, pp. 1183-1236.
40. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008; 22(397):1030-43.
41. Greaves MF. Aetiology of acute leukaemia. *Lancet* 1997; 349: 344–9.
42. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 2008; 358 (5): 502–11.
43. Wiemels JL, Ford AM, Van Wering ER, Postma A, Greaves M. Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. *Blood* 1999; 94: 1057–62.

44. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet* 1999; 354: 1499–1503.
45. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; 81: 2844-53.
46. Jun S, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self renewal versus differentiation. *Syst Biol Med* 2010, 2: 640-53.
47. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-11.
48. Till JE, Mcculloch EA, Siminovich L. A scholastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proceeding of National Academy of Sciences* 1964; 51: 29-36.
49. Korn AP, Henkelman RM, Ottensmeyer FP, Till JE. Investigations of a scholastic model of haemopoiesis. *Experimental Hematology* 1973; 1(6): 362-75.
50. Heppner GH. Tumor heterogeneity. *Cancer Research* 1984; 44(6): 2259-65.
51. Mackillop WJ, Ciampi A, Till JE, Buick RN. A stem cell model of human tumor growth: implications for tumor cells clonogenic assays. *Journal of the National Cancer Institute* 1983; 70(1): 9-16.
52. Buick RN, Pollak MN. Perspectives on clonogenic tumor cells, stem cells and oncogenes. *Cancer Research* 1984; 44(11): 4909-18.
53. Pinkel D. Curing children of leukemia. *Cancer* 1987; 59: 1683.
54. Mcculloch EA, Howatson AF, Buick RN, Minden MD, Izaguirre CA. Acute myeloblastic leukemia considered as a clonal hemopathy. *Blood Cells* 1979; 52: 261-82.
55. Fialkow PJ, Singer JW, Raskind WH, Adamson JW, Jacobson RJ, Bernstein ID, Dow LW, Najfeld V, Veith R. Clonal development, stem-cell differentiation, and clinical remissions in acute nonlymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine* 1987; 317(8): 468-73.

56. Hooke R. *Micrographia*. London; 1665.
57. Van Leeuwenhoek A. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, vol.9, pp. 121-28. London; 1674.
58. Lieutaud J. *Elementa Physiologiae*. Amsterdam; 1749.
59. Bennet JH. Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburg Medical and Surgical Journal* 1985; 64: 413-24.
60. Virchow R. Weisses Blut. *Froriep's Notizen* 1845; 36: 151-56.
61. Erlich P. Beitrag zur Kenntnis der Anilinfärbungen unter ihrer Verwendung in der Mikroskopischen Technik. *Archives Microchirurgie Anatomischer* 1877; 13: 163-77.
62. Hayhoe FGJ, Quaglino D, Doll R. *The cytology and cytochemistry of acute leukemias*. London: Her Majesty's Stationery Office; 1964.
63. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnik HR, Sultan C. Proposals for the classification of acute leukaemias. French-American-British Cooperative Group. *British Journal of Haematology* 1976; 33(4): 451-8.
64. Bernard A, Boumsell L. The clusters of differentiations defined by the First International Workshop of Human Leukocyte Differentiation Antigens. *Human Immunology* 1984; 11(1): 1-10.
65. Melamed MR, Kamensky LA. Automated cytology. *International Review of Experimental Pathology* 1975; 14: 205-95.
66. First MIC Cooperative Study Group. Morphologic, Immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1986; 23: 189-97.
67. Second MIC Cooperative Study Group. Morphologic, Immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukaemias. *British Journal of Haematology* 1988; 68: 487-94.
68. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC, 2001.

69. Vardiman JW. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chemico-Biological Interactions* 2010; 184(1-2): 16-20.
70. Matuzevičienė R. Tėkmės citometrija ir jos taikymas klinikinėje praktikoje. Mokomoji knygelė. 2010. Vilnius: Laboratorinė medicina. p. 7-21.
71. Givan, A.L. *Flow Cytometry: First Principles*. 2nd Edition. 2001. New York: John Wiley and Sons.
72. Owens MA, Loken MR. *Flow Cytometry: Principles for Clinical Laboratory Practice*. 1995. New York: Wiley-Liss. p. 288.
73. Marti GE, Stetler-Stevenson M, Bleasing JJ, Fleisher TA. Introduction to flow cytometry. *Sem Hematology* 2001; 38(2): 93-9.
74. Stetler-Stevenson M, Davis B, Wood B, Braylan R. 2006 Bethesda international consensus conference on flow cytometric immunophenotyping of hematolymphoid neoplasia. *Cytometry B* 2007; 72: S3.
75. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008; 111: 3941–3967.
76. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 107: 3481.
77. Estey EH. Therapeutic options for acute myelogenous leukemia. *Cancer* 2001; 92: 1059-62.
78. Malcovati L, Della Porta MT, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglino E et al. Prognostic Factors and Life Expectancy in Myelodysplastic Syndromes Classified According to WHO Criteria: A Basis for Clinical Decision Making. *J Clin Oncol* 2005;23(30): 7594-760.
79. Keating MJ, Smith TL, Kantarjian H et al. Cytogenetic pattern in acute myelogenous leukemia: a major reproducible determinant of outcome. *Leukemia* 1988; 2: 403.

80. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 2000; 96: 4075.
81. Marcucci G, Mrózek K, Bloomfield CD. Molecular heterogeneity and prognostic biomarkers in adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics. *Curr Opin Hematol* 2005; 12: 68-71.
82. Monzo M, Brunet S, Urbano-Ispizua A, et al. Genomic polymorphisms provide prognostic information in intermediate-risk acute myeloblastic leukemia. *Blood* 2006; 107: 4871-4.
83. Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. Flt3 mutations and leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 122: 523-8.
84. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood* 2007; 109: 874-85.
85. Lück SC, Russ AC, Du J, et al. KIT mutations confer a distinct gene expression signature in core binding factor leukaemia. *Br J Haematol* 2010; 148: 925-37.
86. Legrand O, Simonin G, Perrot JY, et al. Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1998; 91: 4480-8.
87. Karászi E, Jakab K, Homolya L et al. Calcein assay for multidrug resistance reliably predicts therapy response and survival rate in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 112: 308-14.
88. Schaich M, Soucek S, Thiede C, et al. MDR1 and MRP1 gene expression are independent predictors for treatment outcome in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2005; 128: 324-32.
89. Adida C, Recher C, Raffoux E et al. Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2000; 111: 196-203.

90. Del Poeta G, Venditti A, Del Principe MI et al. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2003; 101: 2125-31.
91. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WL et al. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients. *Blood* 2003; 101: 837-45.
92. Sather HN. Age at diagnosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1986; 14: 166-9.
93. Smith M, Arthur D, Camitta B, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1996; 14: 18-25.
94. Harrison CJ. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2009; 144:147-56.
95. Reaves MF, Janossy G, Peto J, Kay H. Immunologically defined subclasses of acute lymphoblastic leukaemia in children: their relationship to presentation features and prognosis. *Br J Haematol* 1981; 48:179-86.
96. Gajjar A, Ribeiro R, Hancock ML, et al. Persistence of circulating blasts after 1 week of multiagent chemotherapy confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995; 86: 1292-5.
97. Steinherz PG, Gaynon PS, Breneman JC, et al. Cytoreduction and prognosis in acute leukemia – the importance of early bone marrow response: report from the Children’s Cancer Group. *Journal of Clinical Oncology* 1996; 14: 389-98.
98. Campana D, Pui CH: Detection of minimal residual disease in acute leukemia: Methodological advances and clinical significance. *Blood* 1995; 85:1416-34.

99. Szczepanski T, Orfao A, van der Velden VH, et al. Minimal residual disease in leukaemia patients. *British Journal of Haematology* 2003; 121: 823-38.
100. Macedo A, Orfao A, Vidriales MB, Lopez-Berges MC, Valverde B, Gonzalez M, Caballero MD, Ramos F, Martinez M, Fernandez-Calvo J, et al. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Annals of Hematology* 1995; 70(4): 189-94.
101. Garcia Vela JA, Monteserin MC, Delgado I, Benito L, Ona F. Aberrant immunophenotypes detected by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 2000; 36(3-4): 275-84.
102. Griesinger F, Piro-Noak M, Kalib N et al. Leukaemia – associated immunophenotypes (LAIP) are observed in 90% of adult and childhood acute lymphoblastic leukaemia: detection in remission marrow predicts outcome. *British Journal of Hematology* 1999; 105: 241-55.
103. Drach J, Drach D, Glassl H, Gattringer C, Huber H. Flow cytometric determination of atypical antigen expression in acute leukemia for the study of minimal residual disease. *Cytometry* 1992; 13(8): 893-901.
104. Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, Garcia Marcos MA, Gonzalez M, Vazquez L et al. Detection of abnormalities in B-cell differentiation patterns is a useful tool to predict relapse in precursor B-ALL. *British Journal of Hematology* 1999; 104(4):695-705.
105. Lucio P, Parreira A, van den Beemd MW, van Lochem EG, van Wering ER, Baars E et al. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia* 1999; 13(3): 419-27.
106. Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Lucio P, van Lochem EG, Mazur J, Parreira A et al. BIOMED-1 concerted action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone

- marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia* 2000; 14(5): 816-25.
107. Babusikova O, Glasova M, Konikova E, Kusenda J, Cap J, Gyarfás J, Koubek K. Phenotypic heterogeneity and aberrant markers expression in T-cell leukemia. *Neoplazma* 1998; 45(3): 128-34.
 108. Reading CL, Estey EH, Huh YO, Claxton DF, Sanchez G, Terstappen LW, O'Brien MC, Baron S, Deisseroth AB. Expression of unusual immunophenotype combinations in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1993; 81(11): 3083-90.
 109. Coustan-Smith E, Behm FG, Hurwitz CA, Rivera GK, Campana D. N-CAM (CD56) expression by CD34+ malignant myeloblasts has implications for minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1993; 7(6):853-8.
 110. Lauria F, Raspadori D, Martinelli G, Rondelli D, Ventura MA, Farabegoli P et al. Increased expression of myeloid antigen markers in adult acute lymphoblastic leukaemia patients: diagnostic and prognostic implications. *British Journal of Hematology* 1994; 87(2): 286-92.
 111. Zeleznikova T, Babusikova O. The value of dot plot patterns and leukemia-associated phenotypes in AML diagnosis by multiparameter flow cytometry. *Neoplazma* 2005; 52(6): 517-22.
 112. San Miguel JF, Martinez A, Macedo A, Vidriales MB, Lopez-Berges C, Gonzalez M. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997; 90(6): 2465-70.
 113. Al-Mawali A, Gillis D, Hissaria P, Lewis I. Incidence, sensitivity, and specificity of leukemia-associated phenotypes in acute myeloid leukemia using specific five-color multiparameter flow cytometry. *American Journal of Clinical Pathology* 2008; 129(6): 934-45.
 114. Terstappen LW, Safford M, Unterhalt M, Könemann S, Zurlutter K, Piechotka K, Drescher M, Aul C, Büchner T, Hiddemann W, et al.

- Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia: IV. Comparison to the differentiation pathway of normal hematopoietic progenitor cells. *Leukemia* 1992; 6(10): 993-1000.
115. Vannier JP, Bene MC, Faure GC, Bastard C, Garand R, Bernard A. Investigation of CD10 CALLA negative acute lymphoblastic leukemia: further description of a group with poor prognosis. *British Journal of Hematology* 1989; 72: 156-60.
 116. Gleissner B, Goekbuget N, Rieder H, Arnold R, Schwartz S, Diedrich H et al. CD10- pre-B acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a distinct high-risk subgroup of adult ALL associated with a high frequency of *MLL* aberrations: results of the German Multicenter Trials for Adult ALL (GMALL). *Blood* 2005; 106: 4054-6.
 117. Ludwig WD, Rieder H, Bartram CR, et al. Immunophenotypic and genotypic features, clinical characteristics, and treatment outcome of adult pro-B acute lymphoblastic leukaemia: results of the German multicenter trials GMALL03/87 and 04/89. *Blood* 1998; 92:1898-1909.
 118. Pui CH, Behm FG, Downing JR, Hancock ML, Shurtleff SA, Ribeiro RC, Head DR, Mahmoud HH, Sandlund JT, Furman WL. 11q23/*MLL* rearrangement confers a poor prognosis in infants with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 1994; 12(5): 909-15.
 119. Pane F, Intrieri M, Quintarelli C, Izzo B, Muccioli GC, Salvatore F. *BCR/ABL* genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations. *Oncogene* 2002; 21(56): 8652-67.
 120. Tabernero MB, Bortoluci AM, Alaejos I, Lopez-Berges MC, Rasillo A, Garcia-Sanz R, Garcia M, Sayagues JM, Gonzalez M, Mateo G, San Miguel JF and Orfao A. Adult precursor B-ALL with *BCR/ABL* gene rearrangements displays a unique immunophenotype based on

- the pattern of CD10, CD34, CD13 and CD38 expression. *Leukemia* 2001; 15: 406-14.
121. Munoz L, Lopez O, Martino R, Brunet S, Bellido M, Rubiol E, Sierra J, Nomdedeu JF. Combined use of reverse transcriptase polymerase chain reaction and flow cytometry to study minimal residual disease in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Hematologica* 2000; 85: 704-10.
 122. Charrin C, Magaud JP, Sebban D, et al. Cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia: correlations with hematologic findings and outcome. A Collaborative Study of the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. *Blood*. 1996; 87: 3135-42.
 123. Babusikova O, Stevulova L, Fajtova M. Immunophenotyping parameters as prognostic factors in T-acute leukemia patients. *Neoplazma* 2009; 56(6): 508-13.
 124. Schabath R, Ratei R, Ludwig WD. The prognostic significance of antigen expression in leukemia. *Best Practice & Research Clinical Hematology* 2003; 16(4): 613-28.
 125. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, Behm FG, Raimondi SC, Pei D, et al. Early T-cell precursor leukemia: a subtype of very high risk acute lymphoblastic leukemia identified in two independent cohorts. *Lancet Oncology* 2009; 10(2): 147-56.
 126. Kita K, Nakase K, Miwa H, Masuya M, Nishii K, Morita N et al. Phenotypical characteristics of acute myelocytic leukemia associated with the t(8;21)(q22;q22) chromosomal abnormality: frequent expression of immature B-cell antigen CD19 together with stem cell antigen CD34. *Blood* 1992; 80(2): 470-7.
 127. Hurwitz CA, Raimondi SC, Head D, Krance R, Mirro J Jr, Kalwinsky DK, Ayers GD, Behm FG. Distinctive immunophenotypic features of t(8;21)(q22;q22) acute myeloblastic leukemia in children. *Blood* 1992; 80(12): 3182-8.

128. Drexler HG, Thiel E, Ludwig WD. Acute myeloid leukemias expressing lymphoid-associated antigens: diagnostic incidence and prognostic significance. *Leukemia* 1993;7(4):489-98.
129. Orfao A, Chillon MC, Bortolucci AM et al. The flow cytometric pattern of CD34, CD15 and CD13 expression in acute myeloblastic leukemia is highly characteristic of the presence of PML-RAR α gene rearrangements. *Haematologica* 1999; 84: 405-12.
130. Exner M, Thalhammer R, Kapiotis S et al. The “typical” immunophenotype of acute promyelocytic leukemia (APL-M3): Does it prove true for the M3-variant? *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 2000; 42: 106-9.
131. Ferrara F, Morabito F, Martino B et al. CD56 expression is an indicator of poor clinical outcome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with simultaneous all-trans-retinoic acid and chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 2000; 18: 1295-300.
132. Paietta E, Andersen J, Gallagher RE. The immunophenotype of acute promyelocytic leukemia (APL): An ECOG study. *Leukemia* 1994; 8: 1108–12.
133. Adriaansen HJ, te Boekhorst PAW, Hagemeijer AM, van der Schoot CE, Delwel HR, van Dongen JJM. Acute myeloid leukemia M4 with bone marrow eosinophilia (M4Eo) and inv(16) (p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. *Blood* 1993; 81: 3043-7.
134. Griffin JD, Davis R, Nelson DA, Davey FR, Mayer RJ, Schiffer C et al. Use of surface marker analysis to predict outcome of adult acute myeloblastic leukemia. *Blood* 1986; 68: 1232-41.
135. Schwarzingler I, Valent P, Koller U, Marosi C, Schneider B, Haas O et al. Prognostic significance of surface marker expression on blasts of patients with de novo acute myeloblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 1990; 8:423-30.

136. Solary E, Casasnovas RO, Campos L, Bene MC, Faure G, Maingon P et al. Surface markers in adult acute myeloblastic leukemia: correlation of CD19+, CD34+ and CD14+/DR- phenotypes with shorter survival. Groupe d'Etude Immunologique des Leucemies (GEIL). *Leukemia* 1992; 6: 393-9.
137. Bradstock K, Bishop J, Matthews J, Benson E, Page F et al. Prognostic value of immunophenotyping in acute myeloid leukemia. Australian Leukaemia Study Group. *Blood* 1994; 84: 1220-5.
138. Chang H, Salma F, Yi Q, Patterson L, Brien B, Minden B, et al. Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia Research* 2004; 28: 43-8.
139. Geller RB, Zahurak M, Hurwitz CA, Burke PJ, Karp JE, Piantadosi S et al. Prognostic importance of immunophenotyping in adults with acute myelocytic leukaemia: The significance of the stem cell glycoprotein CD34 (My-10). *British Journal of Haematology* 1990; 76: 340-7.
140. Miwa H, Nakase K, Kita K. Biological characteristics of CD7 (+) acute leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 1996; 21: 239-44.
141. Venditti A, Del Poeta G, Buccisano F, Tamburini A, Cox-Froncillo MC, Aronica G et al. Prognostic relevance of the expression of Tdt and CD7 in 335 cases of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1998;12:1056-63.
142. Saxena A, Sheridan DP, Card RT, McPeck AM, Mewdell CC, Skinnider LF. Biologic and clinical significance of CD7 expression in acute myeloid leukemia. *American Journal of Hematology* 1998; 58: 278-84.
143. Huh YO, Smith TL, Collins P, Buesco-Ramos C, Albitar M, Kantarjan HM et al. Terminal deoxynucleotidyl transferase expression in acute myelogenous leukemia and myelodysplasia as determined by flow cytometry. *Leuk Lymphoma* 2000; 37: 319-31.

144. Venditti A, Del Poeta G, Buccisano F, Tamburini A, Cox-Froncillo MC, Aronica G, et al. Prognostic relevance of the expression of Tdt and CD7 in 335 cases of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1998; 12: 1056-63.
145. Legrand O, Perrot JY, Baudard M, Cordier A, Lautier R, Simonin G et al. The immunophenotype of 177 adults with acute myeloid leukemia: proposal of a prognostic score. *Blood* 2000; 96(3): 870-7.
146. Cheson BD, Cassileth PA, Head DR et al. Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 1990; 8: 813-19.
147. Dworzak MN, Froschl G, Printz D, et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 99: 1952–8.
148. Van der Velden VHJ, Boeckx N, van Wering ER et al. Detection of minimal residual disease in acute leukemia. *J Biol Regul Homeost Ag* 2004: 146-149.
149. Van Wering ER, Beishuizen A, Roeffen ET et al. Immunophenotypic changes between diagnosis and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1995; 352: 1731-1533.
150. Borowitz MJ, Pullen DJ, Winick N, Martin PL, Bowman WP, Camitta B. Comparison of diagnostic and relapse flow cytometry phenotypes in childhood acute lymphoblastic leukemia: implications for residual disease detection: a report from the Children's Oncology Group. *Cytometry B* 2005; 68: 18-24.
151. Gaipa G, Basso G, Maglia O, Leoni V, Faini A, Cazzaniga G, Bugarin C, Veltroni M, Michelotto B, Ratei R, Coliva T, Valsecchi MG, Biondi A, Dworzak MN; I-BFM-ALL-FCM-MRD Study Group. Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood

- ALL: implications for minimal residual disease detection. *Leukemia* 2005; 19(1): 49-56.
152. Van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998; 352: 1731–8.
 153. Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suciú S et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998; 339: 591–8.
 154. Nyvold C, Madsen HO, Ryder LP et al. Precise quantification of minimal residual disease at day 29 allows identification of children with acute lymphoblastic leukemia and an excellent outcome. *Blood* 2002; 99: 1253–9.
 155. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1998; 351: 550-4.
 156. Brüggemann M, Raff T, Flohr T et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006; 107: 1116-23.
 157. Vidriales MB, Pérez JJ, López-Berges MC, et al. Minimal residual disease in adolescent (older than 14 years) and adult acute lymphoblastic leukemias: early immunophenotypic evaluation has high clinical value. *Blood* 2003; 101:4695-700.
 158. Holowiecki J, Krawczyk-Kulis M, Giebel S, et al. Status of minimal residual disease after induction predicts outcome in both standard and high-risk Ph-negative adult acute lymphoblastic leukaemia. The Polish Adult Leukemia Group ALL 4-2002 MRD Study. *Br J Haematol* 2008; 142: 227-37.
 159. Kern W, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Cancer* 2008; 112(1): 4-16.

160. Campana D, Coustan-Smith E, Janossy G. The immunologic detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1990; 76: 163-74.
161. Reading CL, Estey EH, Huh YO, Claxton DF, Sanchez G, Terstappen LW, O'Brien MC, Baron S, Deisseroth AB. Expression of unusual immunophenotype combinations in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1993;81(11): 3083-90.
162. San-Miguel JF, Vidriales MB, Orfão A. Immunological evaluation of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukaemia (AML). *Best Pract Res Clin Haematol* 2002; 15(1): 105-18.
163. Venditti A, Buccisano F, Del Poeta G, Maurillo L, Tamburini A, Cox C et al. Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96(12): 3948-52.
164. Buccisano F, Maurillo L, Gattei V, Del Poeta G, Del Principe MI, Cox MC et al. The kinetics of reduction of minimal residual disease impacts on duration of response and survival of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006; 20(10): 1783-9.
165. Goldie JH, Coldman AJ. Quantitative model for multiple levels of drug resistance in clinical tumors. *Cancer Treatment Reports* 1983; 67: 923-30.
166. Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai S, Gazdar A, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *Journal of National Cancer Institute* 1989; 2: 116-24.
167. Borst P. Genetic mechanisms of drug resistance: a review. *Acta Oncologica* 1991; 30: 87-105.
168. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research* 2001; 11: 1156-66.
169. Klein I, Sarkadi B, Varadi A. An inventory of human ABC proteins. *Biochimica Biophysica Acta* 1999; 1461: 237-62.

170. Hrycyna CA, Zhang S, Ramachandra M, Ni B, Pastan I, Gottesman MM. Functional and molecular characterization of the human multidrug transporter. In: Gupta S, Tsuruo T. *Multidrug Resistance in Cancer Cells*. Chichester, England: Wiley, 1996; p. 29.
171. Juliano RL, Ling V. Surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese-hamster ovary cell mutants. *Biochimica Biophysica Acta* 1976; 455: 152–62.
172. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesmann MM, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proceedings of National Academy of Sciences* 1987; 84: 265.
173. Kohno K, Sato S, Takano H, Matsuo K, Kuwano M. The direct activation of human multidrug resistance gene (*mdr1*) by anticancer agents. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 1415–21.
174. Sato H, Gottesmann MM, Goldstein LJ, Pastan I, Block AM, Sandberg AA, et al. Expression of the multidrug resistance gene in myeloid leukemias. *Leukemia Research* 1990; 14: 11–21.
175. Marie JP, Zittoun R, Sikic BI. Multidrug resistance (*mdr1*) gene expression in adult acute leukemias: correlations with treatment outcome and in vitro drug sensitivity. *Blood* 1991; 78: 586–92.
176. Zhou DC, Marie JP, Suberville AM, Zittoun R. Relevance of *mdr1* gene expression in acute myeloid leukemia and comparison of different diagnostic methods. *Leukemia* 1992; 6: 879–85.
177. Pirker R, Wallner J, Geissler K, Linkesch W, Haas OA, Bettelheim P, et al. *Mdr1* gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Journal of National Cancer Institute* 1991; 83: 708–12.
178. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, McConnell T, Slovak ML, Chen IM, et al. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard

- chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood* 1997; 89: 3323–9.
179. Goasquen JE, Dossot JM, Fardel O, Le Mee F, Le Gall E, Leblay F, et al. Expression of the multidrug resistance-associated glycoprotein (P-170) in 59 cases of de novo acute lymphoblastic leukemia: prognostic implications. *Blood* 1993; 81: 2394–8.
 180. Cole SPC, Bhardway G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist AJ, et al. Overexpression of a transporter gene in multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; 258: 1650–4.
 181. Lautier D, Canitrot Y, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 967–77.
 182. Hart SM, Ganeshaguru K, Hoffbrand AV, Prentice HG, Mehta AB. Expression of the multidrug resistance-associated protein (mrp) in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 48: 2163–8.
 183. Schneider E, Cowan KH, Bader H, Toomey S, Schwartz GN, Karp JE, et al. Increased expression of the multidrug resistance-associated protein gene in relapsed leukemia. *Blood* 1995; 85: 186–90.
 184. Slapak CA, Mizunuma N, Kufe DW. Expression of the multidrug resistance associated protein and P-glycoprotein in doxorubicin-selected human myeloid leukemia cells. *Blood* 1994; 84: 3113–21.
 185. Schuurhuis GJ, Broxterman HJ, Ossenkoppele GJ. Functional multidrug resistance phenotype associated with combined overexpression of Pgp/mdr1 and mrp together with 1- β -arabinofuranosylcytosine sensitivity may predict clinical response in acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research* 1995; 1: 81–93.
 186. Legrand O, Simonin G, Zittoun R, Maria JP. Comparison of MDR1, MRP and LRP expression with in vitro drug sensitivity in vivo response to treatment in fresh blast cells from adult myeloid leukemia patients [Abstract]. *Blood* 1997; 90: 180.

187. Van der Kolk DM, De Vries EGE, Koning JA, Van Den Berg E, Müller M, Vellenga E. Activity and expression of the multidrug resistance protein MRP1 and MRP2 in acute myeloid leukemia cells, tumor cell lines, and normal hematopoietic CD34+ peripheral blood cells. *Clinical Cancer Research* 1998; 4: 1727–36.
188. Baer MR, Swann VL, Shollo MM, et al. Frequent coexistence of multiple mechanisms of multidrug resistance in acute myeloid leukemia cells. *Blood* 1997; 90: 181a.
189. Ross DD. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 467–73.
190. Filipits M, Pohl G, Stranzl T, Suchomel RW, Scheper RJ, Jager U, et al. Expression of the lung resistance protein predicts poor outcome in de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 1998; 91: 1508–13.
191. List AF, Spier CS, Grogan TM, Johnson C, Roe DJ, Greer JP, et al. Overexpression of a major vault transporter protein - lung resistance protein predicts treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 1996; 87: 2464–9.
192. Ross DD, Karp JE, Chen TT, Doyle LA. Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. *Blood* 2000; 96: 3658.
193. Gieseler F, Glasmacher A, Kampfe D, Wandt H, Nuessler V, Valsamas S, et al. Topoisomerase II activities in AML blasts and their correlation with cellular sensitivity to anthracyclines and epipodophyllotoxines. *Leukemia* 1996; 10: 1177–80.
194. Mainwaring M, Lynch J, Reddy V, Rimsza R, Rowe T, Bradshaw K, et al. Topoisomerase II levels and DNA fragmentation in leukemia blasts treated with topotecan followed by etoposide + mitoxantrone (T-EM) in a time sequential chemotherapy regimen [Abstract]. *Blood* 1999; 94 (Suppl 1): 381.

195. Kaufmann SH, Gore SD, Miller CB, Jones RJ, Zwelling LA, Schneider E, et al. Topoisomerase II and the response to antileukemic therapy. *Leukemia & Lymphoma* 1998; 29: 217–37.
196. Banker DE, Groudine M, Norwood T, Appelbaum FR. Measurement of spontaneous and therapeutic agent-induced apoptosis with BCL-2 protein expression in acute myeloid leukemia. *Blood* 1997; 89: 243–55.
197. Kaspers GJL, Pieters R, Weerman AJP. Drug resistance in leukemia and lymphoma III (Advances in experimental medicine and biology). 3rd ed. Springer, 1999.
198. Musto P, Cascavilla N, Di RN, Ladogana S, La Sala A, Melillo L, et al. Clinical relevance of immunocytochemical detection of multidrug-associated P-glycoprotein in haematologic malignancies. *Tumori* 1990; 76: 353–59.
199. Kaspers GJL, Pieters R, Van Zantwijk CH, et al. In vitro drug sensitivity of normal peripheral blood lymphocytes and childhood leukemic cells from bone marrow and peripheral blood. *British Journal of Cancer* 1991; 64: 469–74.
200. Futscher B, Abbaszadegan MR, Somann F, Dalton WS. Analysis of MRP mRNA in mitoxantrone-selected, multidrug-resistant human tumor cells. *Biochemistry and Pharmacology* 1994; 47: 1601–8.
201. Feller N, Kuiper CM, Lankelma J, Ruhdal JK, Scheper RJ, Pinedo HM, Broxterman HJ. Functional detection of MDR1/P170 and MRP P190-mediated multidrug resistance in tumor cells by flow cytometry. *British Journal of Cancer* 1995; 72: 543–8.
202. Lamy T, Drenou B, Grulois I, Fardel O, Jacquelinet C, Goasguen J, et al. Multi-drug resistant (MDR) activity in acute leukemia determined by rhodamine 123 efflux assay. *Leukemia* 1995; 9: 1549–56.

203. Hu XF, Slater A, Kantharidis P, et al. Altered multidrug resistance phenotype caused by anthracycline analogues and cytosine arabinoside in myeloid leukemia. *Blood*. 1999; 93: 4086-95.
204. Weisburg JH, Curcio M, Caron PC, et al. The multidrug resistance phenotype confers immunological resistance. *Journal of Experimental Medicine* 1996;183: 2699-2704.
205. van der Pol MA, Broxterman HJ, Pater JM, Feller N, van der Maas M, Weijers GW, Scheffer GL, Allen JD, Scheper RJ, van Loevezijn A, Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ. Function of the ABC transporters, P-glycoprotein, multidrug resistance protein and breast cancer resistance protein, in minimal residual disease acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2003; 88(2): 134-47.
206. Van der Heuvel-Eibrink MM, Wiemer EA, de Boevere MJ, Slater RM, Smit EM, van Noesel MM et al. MDR1 gene related clonal selection and P-glycoprotein function and expression in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 15(3): 398-405.
207. Te Boekhorst PA, de Leeuw W, Schoester M et al. Predominance of multidrug resistance (MDR-1) phenotype in CD34+ acute myeloid leukemia. *Blood* 1993; 82: 3157-61.
208. Wurcher C, Karawajew L, Ruppert V et al. Clinical significance of CD95, bcl-2 and Bax expression and CD95 function in adult de novo acute myeloid leukemia in context of P-glycoprotein function, maturation stage and cytogenetics. *Leukemia* 1999; 13: 1943-8.
209. Miwa H, Kita K, Nishii K et al. Expression of MDR1 gene in acute leukemia cells: association with acute myeloblastic leukemia/acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993; 82: 3445-51.
210. Bene MC, Bernier M, Castoldi G, et al. European Group on Immunological Classification of Leukaemias. Impact of immunophenotyping on management of acute leukaemias. *Haematologica* 1999; 84: 1024-34.

211. Dworzak MN, Fritsch G, Fleischer C, et al. Comparative phenotype mapping of normal vs. malignant pediatric B-lymphopoiesis unveils leukemia - associated aberrations. *Experimental Hematology* 1998; 26: 305-13.
212. Terstappen LW, Safford M, Unterhalt M, Könemann S, Zurlutter K, Piechotka K, Drescher M, Aul C, Büchner T, Hiddemann W, et al. Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia: IV. Comparison to the differentiation pathway of normal hematopoietic progenitor cells. *Leukemia* 1992; 6(10): 993-1000.
213. Van Lochem EG, van der Velden VHJ, Wind HK, Marvelde JG, Westerdal NAC, van Dongen JJM. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age related changes and disease induced shifts. *Clinical Cytometry* 2004; 60: 1-13.
214. Ciudad J, Orfao A, Vidriales B, Macedo A, Martinez A, Gonzalez M, Lopez-Berges MC, Valverde B, San Miguel JF. Immunophenotypic analysis of CD19+ precursors in normal human adult bone marrow: implications for minimal residual disease detection. *Hematologica* 1998; 83: 1069-75.
215. Terstappen LW, Loken MR. Myeloid cell differentiation in normal bone marrow and acute myeloid leukemia assessed by multi-dimensional flow cytometry. *Analytical Cellular Pathology*. 1990; 2(4): 229-40.
216. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML et al. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 100: 2399-2402.
217. Reinhold U, Liu L, Sesterhenn J, Abken H. CD7-negative T cells represent a separate differentiation pathway in a subset of post-thymic helper T cells. *Immunology*. 1996; 89(3): 391-6.

218. Reinhold U, Abken H. CD4+ CD7- T cells: a separate subpopulation of memory T cells? *Journal of Clinical Immunology*. 1997; 17(4): 265-71.
219. Xu Y, McKenna WR, Karandikar NJ, Pildain AJ, Kroft SH. Flow cytometric analysis of monocytes as a tool for distinguishing chronic myelomonocytic leukemia from reactive monocytosis. *American Journal of Clinical Pathology* 2005; 124: 799-806.
220. Renzi P, Ginns LC. Analysis of T cell subsets in normal adults. Comparison of whole blood lysis technique to Ficoll-Hypaque separation by flow cytometry. *J Immunol Met* 1987(98):53-6.
221. Tamul KR, Schmitz JL, Kane K, Folds JD. Comparison of the effects of Ficoll-Hypaque separation and whole blood lysis on results of immunophenotypic analysis of blood and bone marrow samples from patients with hematologic malignancies. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995(3):337-42.
222. Lucio P, Gaipa G, van Lochem EG et al. BIOMED-1 concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of B-ALL with standardized triple – stainings. *Leukemia* 2001; 15: 1185-92.
223. Dworzak MN, Froschl G, Printz D, Zen LD, Gaipa G, Ratei R, Basso G, Biondi A, Ludwig WD, Gadner H. CD99 expression in T-lineage ALL: implications for flow cytometric detection of minimal residual disease. *Leukemia* 2004; 18: 703-8.
224. Stahnke K, Eckhoff S, Mohr A et al. Apoptosis induction in peripheral leukemia cells by remission induction treatment in vivo: selective depletion and apoptosis in a CD34+ subpopulation of leukemia cells. *Leukemia* 2003; 17: 2130-9.
225. Roshal M, Fromm JR, Winter S, Dunsmore K, Wood L. Immaturity associated antigens are lost during induction for T cell lymphoblastic leukemia: implications for minimal residual disease detection. *Cytometry B* 2010; 78B: 139-146.

226. Chilosi M, Pizzolo G. Review of terminal deoxynucleotidyl transferase. Biological aspects, methods of detection, and selected diagnostic application. *Appl Immunohistochem* 1995; 3: 209-21.
227. Janossy G, Bollum FJ, Bradstock KF, Ashley J. Cellular phenotypes of normal and leukemic hemopoietic cells determined by analysis with selected antibody combinations. *Blood* 1980;56:430-41.
228. Krampera M, Vitale A, Vincenzi C, Perbellini O, Guarini A, Annino L et al. Outcome prediction by immunophenotypic minimal residual disease detection in adult T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haemat* 2003;120:74-9.
229. Campana D, Coustan-Smith E. Advances in immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002;15:1-19.
230. Coustan-Smith E, Song G, Clark C, Key L, Liu P, Mehrpooya M et al. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2011; 9: 6267-76.
231. Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myelogenous leukemia. *Am J Clin Pathol* 2009; 131:16-26.
232. www.euroflow.org (2011 11 05).
233. Van Rhenen A, Moshaver B, Kelder A, Feller N, Nieuwint AW, Zweigman S et al. Aberrant marker expression patterns of the CD34+CD38- stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the normal stem cell compartment both at diagnosis and in remission. *Leukemia* 2007; 8: 1700-7.
234. Takeshita A, Shinjo K, Ohnishi K, Ohno R. Expression of Multidrug-resistance P-glycoprotein in myeloid progenitor cells of different phenotype: comparison between normal bone marrow cells and leukaemia cells. *Br J Haemat* 1996; 93: 18–21.

235. Leith CP, Chen IM, Kopecky KJ, Appelbaum FR, Head DR, Godwin JE et al. Correlation of multidrug resistance (MDR1) protein expression with functional dye/drug efflux in acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: identification of discordant MDR-/efflux+ and MDR1+/efflux- cases. *Blood* 1995; 86: 2329–42.
236. Raspadori D, Damiani D, Micheli M, Stocci R, Gentili S, Gozzeti A et al. CD56 and p-gp expression in acute myeloid leukemia: impact on clinical outcome. *Haematologica* 2002; 87: 1135-40.
237. Wuchter C, Karawajew L, Ruppert V, Schrappe M, Buchner T, Schoch C et al. Clinical significance of P-glycoprotein expression and function for response to induction chemotherapy, relapse rate and overall survival in acute leukemia. *Haematologica* 2000; 85: 711-721.
238. San Miguel JF, Martinez A, Macedo A, Vidriales MB, Lopez Berges C, Gonzalez M, et al. Immunophenotyping Investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997; 90: 2465-70.