

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

NINA JANŽIČ

**DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA JANŽIČ

**DOLOČANJE DELEŽA LEVKEMIČNIH MATIČNIH CELIC
S PRETOČNO CITOMETRIJO PRI BOLNIKI Z AKUTNO
LEVKEMIJO**

**LEUKEMIC STEM CELLS DETERMINATION BY FLOW
CYTOMETRY IN ACUTE LEUKEMIAS PATIENTS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, pod mentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, spec. med. biokem. in somentorstvom prof. dr. Petra Černelča, dr. med..

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Heleni Podgornik in somentorju prof. dr. Petru Černelču za vso strokovno pomoč pri nastajanju diplomske naloge. Najlepša hvala tudi celotnemu osebju Specializiranega hematološkega laboratorija v UKC Ljubljana za vso izkazano pomoč. Posebna zahvala gre Darji Žontar, univ. dipl. biol., za vse nasvete in veliko pomoč pri izvajanju praktičnega dela diplomske naloge.

Na tem mestu bi se rada zahvalila še svojim staršem in vsej svoji družini, ki mi je vedno stala ob strani in me podpirala na moji študijski poti, vsem prijateljem in Roku za vse nepozabne trenutke, ki smo jih preživeli skupaj.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, spec. med. biokem. in somentorstvom prof. dr. Petra Černelča, dr. med..

Ljubljana, oktober 2011

Nina Janžič

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Članica diplomske komisije: prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec. med. biokem.

VSEBINA

| | |
|---|------------|
| POVZETEK | V |
| ABSTRACT | VI |
| SEZNAM OKRAJŠAV | VII |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 KOSTNI MOZEG IN KRVNE MATIČNE CELICE | 1 |
| 1.2 BOLEZNI ZARADI OKVARE KRVNE MATIČNE CELICE..... | 2 |
| 1.3 AKUTNE LEVKEMIJE | 3 |
| 1.3.1 Razvrstitev akutnih levkemij | 4 |
| 1.3.2 Klinična slika | 6 |
| 1.3.3 Prevalenca..... | 6 |
| 1.3.4 Ugotavljanje | 7 |
| 1.3.5 Zdravljenje..... | 9 |
| 1.4 LEVKEMIČNE MATIČNE CELICE (LMC)..... | 9 |
| 1.4.1 Izvor LMC | 10 |
| 1.4.2 Določanje imunofenotipa LMC..... | 11 |
| 1.4.2.1 <i>Monoklonska protitelesa za označevanje LMC</i> | 12 |
| 1.5 PRETOČNA CITOMETRIJA | 14 |
| 1.5.1 Sipanje svetlobe..... | 15 |
| 1.5.2 Imunofluorescenca | 15 |
| 2 NAMEN DELA | 17 |
| 3 MATERIALI IN METODE | 18 |
| 3.1 MATERIALI | 18 |
| 3.1.1 Biološki materiali | 18 |
| 3.1.2 Pufri in raztopine | 19 |
| 3.1.3 Protitelesa | 20 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.1.4 | Laboratorijska oprema..... | 20 |
| 3.2 | METODE..... | 21 |
| 3.2.1 | Osamitev levkocitov..... | 21 |
| 3.2.2 | Priprava kompleksov s protitelesi..... | 21 |
| 4 | REZULTATI IN RAZPRAVA..... | 23 |
| 4.1 | DOLOČANJE DELEŽA CD34+ LEVKEMIČNIH CELIC..... | 23 |
| 4.2 | DOLOČANJE DELEŽA LMC..... | 27 |
| 4.2.1 | Delež LMC glede na podtip AL po razvrstitvi FAB..... | 28 |
| 4.2.2 | Povezava med deležem CD34+ blastov in deležem LMC..... | 31 |
| 4.3 | DOLOČANJE IMUNOFENOTIPA LMC..... | 32 |
| 4.4 | UGOTAVLJANJE VPLIVA ŠTEVILA LEVKOCITOV NA DELEŽ LMC..... | 37 |
| 4.5 | ODVISNOST DELEŽA LMC OD PRIDRUŽENIH CITOGENETSKIH IN MOLEKULARNO-GENETSKIH NEPRAVILNOSTI..... | 38 |
| 4.6 | SPREMLJANJE TRENUTNEGA IZIDA ZDRAVLJENJA PRI OBRAVNAVANIH BOLNIKIHI..... | 43 |
| 5 | SKLEPI..... | 45 |
| 6 | VIRI..... | 46 |
| 7 | PRILOGA..... | 49 |

KAZALO SLIK

| | |
|---|----|
| Slika 1: Razvoj krvnih celic iz pluripotentne matične celice (4) | 2 |
| Slika 2: Celice v KM pri akutni mieloični levkemiji (6) | 7 |
| Slika 3: Razvoj LMC iz HMC ali usmerjenih oz. zrejših celic (19) | 11 |
| Slika 4: A) Sestava pretočnega citometra, B) Hidrodinamsko fokusiranje vzorca (29) | 14 |
| Slika 5: Pri interakciji s celico se svetloba razprši v dve smeri; prednje in stransko sipanje (32) | 15 |
| Slika 6: Razporeditev celic glede na velikost (FS Lin) in granulacije v citoplazmi (SS Lin) | 23 |
| Slika 7: Razporeditev celic glede na velikost (FS lin) in prisotnost celičnega označevalca CD34; zamejitev CD34+ (N) | 24 |
| Slika 8: Razporeditev celic po velikosti in prisotnosti celičnega označevalca CD34, oboje pri AML; težja zamejitev populacije CD34+ od ostalih celic | 24 |
| Slika 9: Točkovna histograma celic bolnika z AML (A) in bolnika z ALL (B); večina celic je CD34+, označene so z zeleno in modro barvo | 25 |
| Slika 10: Zamejitev populacije levkemičnih matičnih celic med CD34+ blasti | 27 |
| Slika 11: Točkovni histogram deleža LMC pri bolniku z AML (A), pri bolniku z ALL (B); težja zamejitev LMC med CD34+ levkemičnimi celicami (C) | 28 |
| Slika 12: Odvisnost deleža LMC od deleža CD34+ blastov | 32 |
| Slika 13: Točkovni histogrami določanja specifičnih antigenov (CD45, CD71, CD90, CD117, CD123, HLA-DR) na LMC (CD34+/CD38- celice) pri AML | 33 |
| Slika 14: Točkovni histogrami določanja specifičnih antigenov (CD19, CD33, CD45) na LMC (CD34+/CD38- celice) pri ALL | 34 |
| Slika 15: Delež označevalca pri različnih deležih LMC (modra: 0,1%-0,9% LMC, 16 vzorcev; rdeča: 1%-5% LMC, 4 vzorci; zelena: 15%-92% LMC, 4 vzorci) | 36 |
| Slika 16: Odvisnost deleža LMC in CD34+ blastov od števila levkocitov v krvi | 38 |
| Slika 17: Odvisnost deleža LMC od kariotipa bolnikov (N- normalen kariotip, K- kompleksno preurejen kariotip, P- ponavljajoče kromosomske spremembe) | 40 |
| Slika 18: Odvisnost deleža LMC od napovednega pomena (U- ugoden, V- vmesen, N-neugoden) | 41 |
| Slika 19: Odvisnost deleža LMC od <i>WTI</i> | 42 |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|---|----|
| Preglednica I: Morfološka FAB razvrstitev AL (1)..... | 4 |
| Preglednica II: WHO razvrstitev AML (5)..... | 5 |
| Preglednica III: Imunofenotipska razvrstitev ALL (1)..... | 5 |
| Preglednica IV: WHO razvrstitev ALL (5) | 6 |
| Preglednica V: Podatki bolnikov z akutno levkemijo (AL)..... | 18 |
| Preglednica VI: Delež CD34+ blastov pri obravnavanih bolnikih z akutno levkemijo (AL) | 25 |
| Preglednica VII: Delež CD34+ celic pri bolnikih z B-KLL in DP | 26 |
| Preglednica VIII: Delež levkemičnih matičnih celic (CD34+/CD38-) pri bolnikih z akutno mieloično levkemijo (AML)..... | 29 |
| Preglednica IX: Delež levkemičnih matičnih celic (CD34+/CD38-) pri bolnikih z akutno limfatično levkemijo (ALL) | 30 |
| Preglednica X: Delež CD34+ blastov in delež LMC pri bolnikih z AL | 31 |
| Preglednica XI: Prisotnost antigenov na LMC pri bolnikih z akutno mieloično levkemijo (AML)..... | 35 |
| Preglednica XII: Prisotnost antigenov na LMC pri bolnikih z akutno limfatično levkemijo (ALL)..... | 35 |
| Preglednica XIII: Citogenetske in molekularno-genetske spremembe pomembne za napoved poteka bolezni pri obravnavanih bolnikih..... | 39 |
| Preglednica XIV: Trenuten izid zdravljenja pri bolnikih z akutno levkemijo..... | 43 |

POVZETEK

Akutne levkemije so rakave bolezni, ki nastanejo zaradi nenadzorovane rasti in razvoja klona maligno spremenjenih krvotvornih celic. Pri levkemijah obstaja podobna ureditev krvotvornih celic kot pri normalnih hematopoetskih celicah. Na čelu vrste so levkemične matične celice (LMC), ki imajo, tako kot normalne hematopoetske matične celice, velik potencial samoobnove in delitve, kar jim omogoča vzdrževanje malignega klona in posledično rakave bolezni. Zato so te LMC predmet številnih raziskav z namenom podrobno opredeliti njihove lastnosti, kar je lahko ključno pri razvoju novih načinov zdravljenja.

Namen našega dela je bil določiti delež LMC pri bolnikih z akutno levkemijo in opredeliti njihov imunofenotip. Obravnavali smo bolnike z na novo ugotovljeno boleznijo v času izvajanja diplomskega dela, zato nas je omejevalo samo število vstopnih vzorcev. Metoda, ki smo jo pri delu uporabili, je bila pretočna citometrija. Na točkovnih histogramih, dobljenih z analizo vzorcev, smo zamejili želeno populacijo celic z uporabo kombinacije različnih specifičnih monoklonskih protiteles. Pri tem smo se osredotočili predvsem na LMC z najbolj osnovnim imunofenotipom CD34+/CD38-. Dobljene rezultate o lastnostih LMC smo primerjali z izsledki rutinskih preiskav (število levkocitov v periferni krvi ob postavitvi diagnoze ter izsledki citogenetike in molekularne genetike) in poskušali ugotoviti, ali obstaja povezava med temi parametri. Ugotovili smo, da delež LMC ni odvisen od števila levkocitov, deleža CD34+ levkemičnih celic ali od podvrste akutne levkemije. Prav tako nismo opazili povezave imunofenotipa LMC niti z deležem LMC niti s podvrsto bolezni. Pri analizi povezave deleža LMC z izsledki citogenetike in molekularne genetike prav tako nismo našli specifičnih povezav. Pri večini analiz so se pojavile tudi izjeme, ki bi lahko kazale na povezavo med parametri, vendar je bilo število vzorcev premajhno, da bi jih lahko statistično ovrednotili. Za nekatere bolnike smo pridobili tudi podatke o trenutnem izidu zdravljenja, tj. približno pol leta po postavitvi diagnoze. Pri bolnikih z rezistentno levkemijo smo iz naših rezultatov lahko sklepali, da bo velik delež LMC pri njih lahko pomenil hitrejše napredovanje bolezni.

Menimo, da je metodo, ki smo jo pri našem delu uporabili, za rutinsko uporabo potrebno še ustrezno dopolniti. Veljalo bi razmisliti o dopolnitvi nabora protiteles in dodelati strategijo zamejevanja populacije. Vsekakor pa bi jo bilo smiselno uporabiti že ob ugotovitvi bolezni.

ABSTRACT

Acute leukemia is a disease resulting from an uncontrolled proliferation of a clone of malignantly modified hematopoietic cells. Leukemias have a similar hierarchical organization as normal hematopoietic cells. Like normal hematopoietic stem cells, leukemia stem cells (LSC) have a very high self-renewal potential and propagation, which allows them to sustain the malignant clone and subsequently cancer. This is why LSC are the subject of many studies aiming to specify their properties, which may be crucial in the development of new treatments.

The purpose of our work was to determine the proportion of LSC among bone marrow cells in acute leukemia patients and to identify their immunophenotype. Only patients diagnosed during the time of the thesis preparation were included in the study. Therefore, we were limited with the overall number of input samples. The method we used was flow cytometry. At the point histograms, obtained by the analysis of the samples, we selected the population of LSC using a combination of different specific monoclonal antibodies. We were focusing on the LSC with the most primitive immunophenotype CD34+/CD38-. We compared the obtained results with the results of routine tests (white blood cell count in peripheral blood at diagnosis and the results of cytogenetics and molecular genetics) and we tried to link these parameters. Results showed that the proportion of LSC is not connected to the number of leukocytes, the proportion of CD34+ of leukemic cells nor to the subtype of acute leukemia. Possible links between the immunophenotype of LSC and the proportion of LSC or the subtype of the disease were not established, just as there were no specific links between the proportion of LSC and cytogenetics or molecular genetics. Some exceptions were discovered that might indicate a link between the parameters, but the number of samples was so small that these could not be statistically evaluated. For some patients data on the current outcome (about six months after the diagnosis) of the treatment was obtained. The results regarding patients with resistant leukemia showed that a bigger proportion of LSC indicate the disease could progress faster.

We concluded that the method used in our work has to be further developed in order to be suitable for routine use. We believe that the set of antibodies should be amended and the strategy of the population gating improved. However, it would be beneficial to introduce this method into the initial diagnosis of acute leukemias.

SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|----------|--|
| AL | akutna levkemija |
| ALL | akutna limfatična levkemija |
| AML | akutna mieloična levkemija |
| CD | »Cluster of Differentiation«- označevanje antigenov na površini posameznih celic |
| CEBPA | CCAAT vezni protein |
| ECD | fikoeritrin-TexasRed |
| FAB | »french-american-british«- klasifikacija levkemij, ki so jo uvedli francoski, ameriški in britanski hematologi |
| FISH | fluorescenčna <i>in-situ</i> hibridizacija |
| FITC | fluorescein-5-izotiocianat |
| FLT3 | »FMS like« tirozin kinaza |
| FS | ang. »forward scatter«- predno sipanje |
| HMC | hematopoetske matične celice |
| Ig | imunoglobulin |
| inv | inverzija |
| KM | kostni mozeg |
| KMC | krvotvorne matične celice |
| KML | kronična mieloična levkemija |
| LMC | levkemične matične celice |
| MDS | mielodisplastični sindrom |
| NOD/SCID | ang. »non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency«- imunooslabljene miši za študijo levkemogeneze |
| NPM1 | nukleofozmin 1 |
| p | kratki krak kromosoma |
| PBS | puferirana fiziološka raztopina |

| | |
|-------|--|
| PC5 | fikoeritrin cianin 5 |
| PC7 | fikoeritrin cianin 7 |
| PE | fikoeritrin |
| PKMC | presaditev krvotvornih matičnih celic |
| q | dolgi krak kromosoma |
| SL-IC | ang. »SCID leukemia-initiating cell«- celice iniciatorke bolezni, zmožne prenest levkemijo v NOD/SCID miši |
| SS | ang. » <i>side scatter</i> «- stransko sipanje |
| t | translokacija |
| WHO | ang. »World Health Organization«- Svetovna zdravstvena organizacija |
| WT1 | »Wilms' tumor 1« gen |

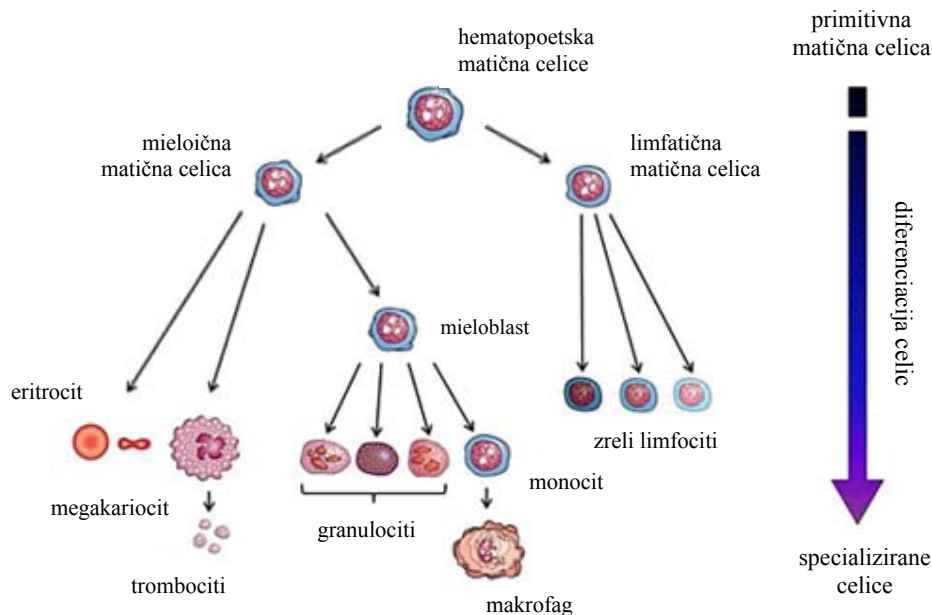
1 UVOD

1.1 KOSTNI MOZEG IN KRVNE MATIČNE CELICE

Krvne celice pri človeku nastajajo v krvotvornem ali hematopoetskem tkivu, ki ga pri odraslem človeku predstavljata rdeči kostni mozeg in limfatično tkivo. Pri zdravem človeku nastajajo eritrociti, granulociti, monociti in megakariociti samo v kostnem mozgu, kjer nastajajo tudi limfociti. Rdeči kostni mozeg je pri zdravem odraslem človeku v vretencih, rebrih, lobanji, medenici in proksimalnih epifizah stegenic in nadlahtnic. Krvotvorne celice ležijo v medmrežju opornega tkiva in žil, ki tvori hematopoetsko mikrookolje, primerno za razmnoževanje in diferenciacijo hematopoetskih matičnih celic (HMC) (1). Kostni mozeg mora biti sposoben vzdrževati število posameznih krvnih celic, kar pomeni, da mora biti število nastalih celic enako številu odmrlih celic. Na ta način se vzdržuje hemostaza. Proces hematopoeze je pri zdravih ljudeh natančno uravnan in je odvisen od potreb posameznika (2).

Vse krvne celice nastajajo iz matičnih celic v kostnem mozgu. Matične celice so zelo redke celice, ki naj bi se v kostnem mozgu pojavljale le 1 na 1 milijon celic (ali celo 1 na 10 milijonov) in jih morfološko ni mogoče nedvoumno opredeliti. Njihov obstoj dokazuje njihova funkcijska zmožnost ene same celice, da lahko proizvede celice več hematopoetskih linij. Glavne lastnosti HMC so visoka sposobnost razmnoževanja, samoobnove in diferenciacije v različne vrste krvnih celic (2, 3).

Osnovna matična celica je pluripotentna. Z delitvijo se obnavlja in zori v multipotentne celice. Multipotentne matične celice so dveh vrst- mieloične in limfatične, ki so prav tako sposobne samoobnove in zorenja v usmerjene matične celice. Iz mieloične vrste nastajajo usmerjene matične celice eritrocitne vrste, granulocitno-monocitne vrste in megakariocitno-trombocitne vrste. Iz teh se po več delitvah in z dozorevanjem razvijejo zrele krvne celice, ki se iz kostnega mozga izplavljajo v kri. Iz multipotentne matične celice limfatične vrste pa se v limfatičnem tkivu s procesom transformacije razvijejo limfociti T in B ter plazmatke (*slika 1*) (1, 2).



Slika 1: Razvoj krvnih celic iz pluripotentne matične celice (4)

Zrele celice nimajo več zmožnosti delitve in so linijsko omejene. Te se v krvi nahajajo v velikem številu in se hitro obnavljajo. HMC pa so v kostnem mozgu v zelo majhnem številu in v mirovanju. HMC v manjši meri preko cirkulacije migrirajo do drugih hematopoetskih organov (3).

1.2 BOLEZNI ZARADI OKVARE KRVNE MATIČNE CELICE

Pri teh boleznih pride do okvare na eni od stopenj matične celice. To je na stopnji pluripotentne, multipotentne ali usmerjene matične celice. Glede na patogenetski mehanizem lahko vse bolezni razdelimo na poliklonske in (mono)klonske. Poliklonske bolezni so posledica okvare krvotvornih matičnih celic iz različnih vzrokov, (mono)klonske bolezni pa so posledica rasti klona bolezensko spremenjenih celic, ki so vse potomke ene matične celice. Klinična slika je odvisna od sposobnosti rasti in stopnje dozorelosti, na kateri je bila matična celica prizadeta (1).

Poliklonske bolezni:

- aplastična anemija
- čista aplazija rdeče vrste

Klonske bolezni:

- akutne levkemije
- mielodisplastični sindromi (MDS)
- mieloproliferativne bolezni (MPB)
- paroksizmalna nočna hemoglobinurija (PNH)
- limfoproliferativne bolezni

1.3 AKUTNE LEVKEMIJE

levkemija (bela (levk-)/kri (-emija))

Akutne levkemije (AL) so rakave bolezni, ki izvirajo iz nenadzorovane klonalne razrasti krvotvornih celic. Normalni celični nadzorni mehanizmi so pri levkemijah neučinkoviti zaradi sprememb v zapisu genov, ki so odgovorni za uravnava celične rasti in razvoja. Levkemije nastanejo kot posledica kombinacije več sprememb. Ključni pri tem so onkogeni, ki imajo pomembno vlogo pri normalnem celičnem razvoju in nadzoru. Njihov potencial se izrazi le v primeru, ko je njihova genetska zgradba ali njihovi kontrolni elementi mutirani ali aktivirani (2). V večini primerov je to posledica recipročnih kromosomskih translokacij in posledično novih, fuzijskih genov. Levkemične celice (blasti) ohranijo sposobnost delitve oz. pridobijo zmožnost neomejene delitve (če gre za razvoj iz zrelejše oblike), izgubijo pa zmožnost zorenja (1).

Na splošno so levkemije opredeljene kot maligne novotvorbe krvotvornega sistema, ki nastajajo v kostnem mozgu. Z zapolnjenjem kostnega mozga z malignimi celicami, se le-te začnejo sproščati tudi v kri in različne telesne organe. To privede do zmanjšanja števila normalnih krvnih celic in posledično do anemije, trombocitopenije (krvavitev), nevtropenije (okužbe), zapletov v delovanju organov itd. (1, 2).

Pri večini akutnih levkemij ne poznamo sprožilnega dejavnika in govorimo o primarnih oblikah bolezni. O sekundarnih boleznih govorimo, če je sprožilni dejavnik znan (npr. zdravljenje s citostatiki, imunosupresivi, izpostavljenost ionizirajočim sevanjem, razvoj iz MDS) (1).

1.3.1 Razvrstitev akutnih levkemij

Obstajata dva načina razvrstitve akutnih levkemij. Prvi, starejši način, razvršča levkemije glede na morfološke in citokemične lastnosti levkemičnih celic. To je t.i. FAB razvrstitev (francosko-ameriško-britansko združenje), ki deli akutne mieloične levkemije (AML) v sedem večjih podskupin (FAB-M0 do FAB-M7) in akutne limfatične levkemije (ALL) v tri večje podskupine (FAB-L1 do FAB-L3) (*preglednica I*).

Preglednica I: Morfološka FAB razvrstitev AL (1)

| |
|---|
| M0: slabo diferencirana AML; mieloičen imunofenotip |
| M1: mieloblastna levkemija brez dozorevanja |
| M2: mieloblastna levkemija z dozorevanjem |
| M3: hipergranularna promielocitna levkemija |
| M4: mielomonocitna levkemija |
| M5a: monoblastna levkemija- slabo diferencirana |
| M5b: monoblastna levkemija- diferencirana |
| M6: eritrolevkemija |
| M7: megakarioblastna levkemija |
| L1: ALL z majhnimi limfoblasti |
| L2: ALL z dvema populacijama limfoblastov (veliki in mali) |
| L3: Burkittova levkemija z velikimi vakuoliziranimi limfoblasti |

Danes se zaradi napredka v razvoju imunoloških metod in citogenetike v ospredje postavlja drug način razvrstitve. V uporabi je t.i. razvrstitev po WHO («World Health Organisation»). Ta razvrstitev temelji na določitvi imunoloških označevalcev levkemičnih celic (imunofenotipizacija) ter na njihovih citogenetskih nepravilnostih (spremembe kariotipa) in onkogenih (*preglednice II, III, IV*) (1, 2).

Preglednica II: WHO razvrstitev AML (5)

| |
|---|
| <p>AML s ponavljajočimi genetskimi preureditvami</p> <ul style="list-style-type: none"> • AML s t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 • APL s t(15;17)(q22;q12); PML-RARA • AML z inv(16)(p13.1q22); CBFβ-MYH11 • AML s t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL • AML s t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 • AML z inv(3)(q21q26.2); RPN1-EVI1 • AML (megakarioblastna) s t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1 • <i>AML z mutiranim NPM1</i> • <i>AML z mutiranim CEBPA</i> |
| AML s spremembami sorodnimi mielodisplaziji |
| <p>AML in MDS zaradi predhodnega zdravljenja (t-AML/t-MDS) s</p> <ul style="list-style-type: none"> • citostatiki • inhibitorji topoizomerase II |
| AML, ki ni drugače opredeljena ali razvrščena imunološko in morfološko |
| Mieloična levkemija (AML, MDS) povezana z Downovim sindromom |

Preglednica III: Imunofenotipska razvrstitev ALL (1)

| |
|--|
| <p>B-limfoblastna AL: CD19+, CD22+, CD79a+, TdT+</p> <ul style="list-style-type: none"> • pro-B (brez dodatnih celičnih označevalcev) • common (CD10+, ci IgM-) • pre-B (ci IgM+) • zrela (membranski Ig+) |
| <p>T-limfoblastna AL: ci CD3+, CD7+, TdT+</p> <ul style="list-style-type: none"> • pro-T (brez dodatnih celičnih označevalcev) • pre-T (CD2+ in/ali CD5+) • kortikalna T ALL (CD1a+) • zrela T ALL (CD3+) |

(opomba: ci- citoplazemski)

Preglednica IV: WHO razvrstitev ALL (5)

| |
|--|
| <p>B-limfoblastna levkemija</p> <p>B-limfoblastna levkemija, ki ni drugače opredeljena</p> <p>B-limfoblastna levkemija s ponavljajočimi genetskimi preureditvami</p> <ul style="list-style-type: none"> • B-limfoblastna levkemija s t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1 • B-limfoblastna levkemija s t(v;11q23); MLL preureditev • B-limfoblastna levkemija s t(12;21)(p13;q22); TEL-AML1 • B-limfoblastna levkemija s hiperdiploidijo • B-limfoblastna levkemija s hipodiploidijo • B-limfoblastna levkemija s t(5;14)(q31;q32); IL3-IGH • B-limfoblastna levkemija s t(1;19)(q23;p13.3); TCF3-PBX1 |
| <p>T-limfoblastna levkemija</p> |

1.3.2 Klinična slika

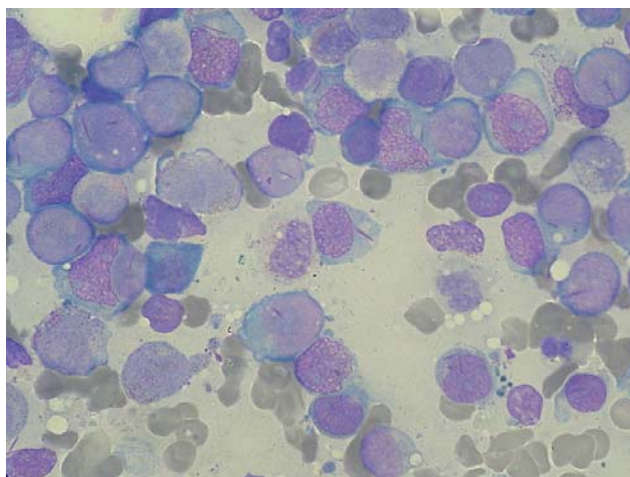
Ne glede na vrsto AL so ob odkritju bolezni v ospredju simptomi supresije kostnega mozga: utrujenost, slabost, hujšanje, potenje, okužbe in nagnjenost h krvavitvam. Veliko število levkocitov lahko poveča viskoznost krvi, kar privede do levkostaze (oviran pretok krvi po malih žilah). Klinično se to kaže kot dispneja, na rentgenski sliki pljuč pa so vidni difuzni infiltrati. Pri določenih oblikah AL lahko pride tudi do tvorbe infiltratov zunaj kostnega mozga (najpogosteje v dlesnih, testisih, ovarijih, koži). Redko se kaže bolezen kot omejena tumorska tvorba. Pri ALL se v več kot polovici primerov pojavijo povečana vranica, jetra in bezgavke (2).

1.3.3 Prevalenca

AML je predvsem bolezen odraslih, pri otrocih se pojavi v 20%. ALL je najpogostejša rakava bolezen pri otrocih mlajših od 15 let in je na drugem mestu kot vzrok smrtnosti otrok te starosti. Okoli 80% vseh ALL se pojavi pri otrocih. Pri odraslih ALL zajema okoli 20% vseh akutnih levkemij, imajo pa slabše preživetje kot otroci. V večini primerov gre pri ALL za B-limfoblastno obliko levkemije (1, 2).

1.3.4 Ugotavljanje

Za postavitev diagnoze akutnih levkemij se uporablja kombinacija več laboratorijskih metod. Določanje **morfoloških lastnosti** celic še vedno ostaja izhodiščni pristop pri postavljanju diagnoze bolezni. Pri tem so najpomembnejši pregled razmaza periferne krvi, aspirata kostnega mozga (KM) ali biopsije KM v primeru suhe punkcije. Pri **AML** je v krvni sliki pri več kot polovici bolnikov ob postavitvi diagnoze zvečano število levkocitov. Včasih je prisotna pancitopenija (zmanjšano število vseh krvnih celic). Število blastov v diferencialni krvni sliki je odvisno od podvrste AML in njenih lastnosti (stopnja diferenciacije, zrelost celic). Diagnozo AML potrdimo s preiskavo kostnega mozga, ki je praviloma hipercelularen in tlakovan z blastnimi celicami (*slika 2*). Delež infiltracije KM z blastnimi celicami mora biti nad 20%. Pri **ALL** je v krvni sliki število levkocitov v večini primerov normalno, lahko je tudi zvečano. Celice, ki prevladujejo, so limfoblasti, pogosto je prisotna nevtropenija. Ni diferenciacije do zrelih limfocitov (1, 2).



Slika 2: Celice v KM pri akutni mieloični levkemiji (6)

Citokemične preiskave se še uporabljajo, vendar ob vseh drugih preiskavah vedno manj. Z njimi prikažemo določene celične sestavine ali aktivnost encima v obliki obarvanega reakcijskega proizvoda (2).

Novejše metode nam omogočajo pridobitev pomembnih bioloških, diagnostičnih in napovednih informacij. **Imunofenotipizacija** z monoklonskimi protitelesi omogoča linijsko delitev levkemij na mieloične ali limfatične in še dodatno subklasifikacijo znotraj teh skupin. Specifični imunološki celični označevalci za mieloblaste so MPO, CD33, CD13,

CD34, CD65 in CD117. Ostali označevalci, ki so pogosto prisotni pri zrelejših AML, so CD11b, CD14 in CD15. Za postavitev diagnoze je pomembna prisotnost več linijsko specifičnih celičnih označevalcev na površini celic. Prisotnost antigenov na celicah ALL glede na podvrsto bolezni prikazuje preglednica III (1, 2).

Citogenetske preiskave pokažejo prisotnost morebitnih recipročnih translokacij, delecij in ostalih kromosomskih preureditev, ki so pomembne pri razumevanju bioloških lastnosti levkemij. Z različnimi podskupinami so povezane specifične citogenetske spremembe, ki imajo pomemben, neodvisen napovedni pomen. Ta je lahko ugoden, neugoden ali vmesen. Pri AML predstavljajo ugoden potek bolezni npr. t(8;21), t(15;17), inv(16), pogostejše so pa napovedno neugodne nepravilnosti (npr. delecija kromosomov 5, 7, kompleksno spremenjen kariotip). Bolnike z normalnim kariotipom uvrščamo v vmesno skupino po napovednem pomenu, v katero spadajo tudi bolniki s citogenetskimi spremembami, ki niso definirane kot spremembe ugodnega ali neugodnega napovednega pomena (npr. +8, del(9q)). Pri ALL hiperdiploiden kariotip in t(12;21) pomenita ugodnejši potek bolezni, medtem ko t(9;22)- *Philadelphia kromosom*, t(4;11), trisomija kromosoma 8 in druge spremembe pomenijo izrazito slabo napoved poteka bolezni. Bolnike z normalnim kariotipom prav tako uvrščamo v vmesno skupino po napovednem pomenu (1, 2, 7).

Molekularna genetska diagnostika nam omogoča določanje mutiranih genov ter fuzijskih genov, vpletenih pri posameznih kromosomskih translokacijah. Pri bolnikih z normalnim kariotipom je ta del diagnostike pomemben za natančnejšo določitev napovednega pomena (1, 2). Za dokončno opredelitev le-tega je potrebno določiti morebitne mutacije genov *FLT3* (»FMS like« tirozin kinaza), *CEBPA* (CCAAT vezni protein) in *NPM1* (nukleofozmin 1). Prisotnost mutacije *FLT3*-ITD (notranja tandemska podvojitev) gena pri bolniku pomeni slabšo napoved poteka bolezni in večjo verjetnost, da bo prišlo do rezistence na zdravljenje. Prisotnost mutacij genov *NPM1* oz. *CEBPA* pri bolniku pomeni dobro napoved poteka bolezni. Ob sočasni prisotnosti mutacije *NPM1* in *FLT3*-ITD zadnja prevlada in je napoved poteka bolezni slaba (8, 9, 10). Pomembno je tudi določanje izražanja *WT1* (Wilms' tumor 1) gena. Njegovo izražanje je močno povečano pri različnih oblikah raka, tudi pri levkemijah, kjer je dober tumorski označevalec za določanje minimalne preostale bolezni. Določitev mutacije v tem genu ob postavitvi diagnoze po nekaterih raziskavah pomeni slab napovedni potek bolezni (11, 12).

1.3.5 Zdravljenje

Zdravljenje AL se lahko razdeli v dve obdobji. Prvo je začetno *intenzivno* (indukcijsko) zdravljenje, ki sestoji iz kombinacije citostatikov (npr. daunorubicin, citozin-arabinozid). Gre za več krogov zdravljenja s citostatiki, kjer se spremlja remisija (50-80% bolnikov pri AML, 80% pri ALL) bolezni. Izbira zdravljenja je odvisna od starosti bolnika in od njegovih pridruženih bolezni. Za preprečitev ponovitve bolezni se zdravljenje nadaljuje z *vzdrževalnim* (konsolidacijsko) zdravljenjem, kjer se nadaljuje zdravljenje s primarnimi citostatiki. Problem predstavlja zdravljenje starejših bolnikov, kjer preživetje ob postavitvi diagnoze merijo v tednih. Zaradi vseh zapletov, ki nastopijo pri uporabi citostatikov in posledično visoke umrljivosti, pri njih zdravijo le simptome (1).

Končno obliko zdravljenja predstavlja presaditev krvotvornih matičnih celic (PKMC). Zdravljenje je odvisno od napovedi poteka bolezni, njene oblike in od same starosti bolnika. Bolnikom, ki so v slabši prognostični skupini (neugodna citogenetika, sekundarne oblike bolezni, na zdravljenje odporne oblike bolezni), priporočajo sorodno ali nesorodno alogenično PKMC. Če ne najdejo primerne darovalca, se odločijo za avtologno PKMC, kar velja za bolnike stare do 60 let. Pri ponovni ponovitvi bolezni možnost dolgoročne ozdravitve predstavlja le alogenična PKMC (1).

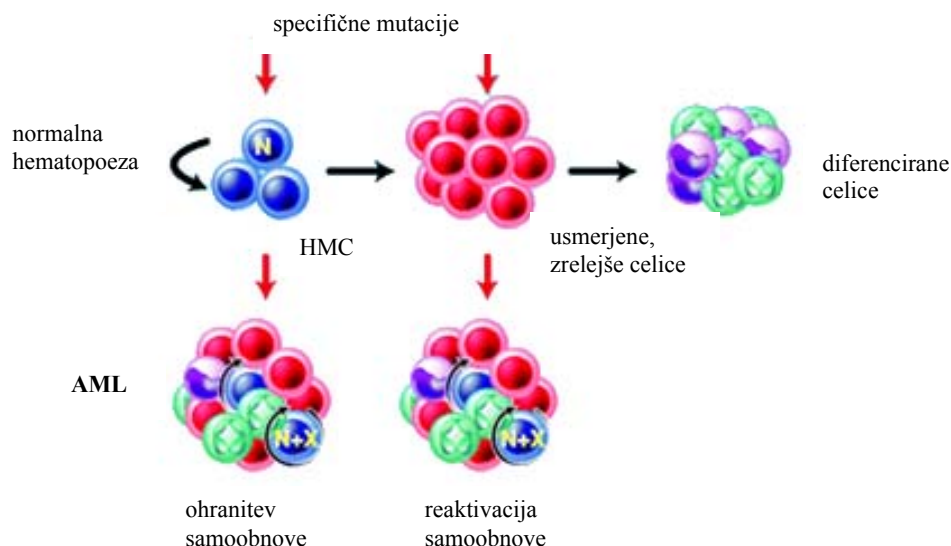
1.4 LEVKEMIČNE MATIČNE CELICE (LMC)

Že več let se ve, da je večina malignih bolezni, med nje sodijo tudi levkemije, heterogenih glede na rastni potencial posameznih celic (13). To heterogenost tumorjev razlagata dva modela: stohastičen in hierarhičen. *Stohastičen model* predvideva, da je tumor biološko homogen in da je razlog za heterogeno izražanje celičnih označevalcev in drugih znakov dozorevanja med tumorskimi celicami vpliv intrinzičnih (npr. signalne poti) ali ekstrinzičnih (npr. mikrookolje, imunski odziv) dejavnikov. Glavno načelo tega modela je, da so vse celice tumorja enako dovzetne za take stohastične vplive, torej so se vse celice zmožne obnašati kot levkemične matične celice. Nasprotno pa *hierarhičen model* predvideva, da so tumorske celice urejene v enako hierarhično strukturo kot v normalnem tkivu, z matičnimi celicami, ki uravnavajo sistem, na vrhu. LMC so po tem modelu biološko različne, ohranjajo sebe in klon s procesom samoobnove in dozorevajo v celice, ki izgubijo lastnosti matičnih celic (14).

Spoznanje o obstoju LMC izhaja iz različnih študij že od sredine 70-ih let, ki so pokazale, da le majhna frakcija levkemičnih blastov, izoliranih iz tumorskega tkiva lahko tvori kolonije *in vitro* oz. je zmožna delitve *in vivo* (13). Kasnejše študije na področju AML so pokazale, da so le levkemični blasti z nezrelim celičnim imunofenotipom CD34+/CD38-, ki predstavljajo majhen delež celotne levkemične populacije, zmožni izzvati AML v imunsko oslabljenih mišjih modelih (NOD/SCID miši). Te celice so poimenovali SL-IC («leukemia-initiating cells») in imajo velik potencial samoobnove. Nasprotno so bile CD34+/CD38+ celice, usmerjene zrelejše celice, brez tega potenciala. Na podlagi teh rezultatov in kasnejših študij so sklepali, da obstaja pri levkemiji hierarhična ureditev podobna normalni hematopoezi, z LMC na čelu (15, 16). Danes je hierarhični model splošno sprejet.

1.4.1 Izvor LMC

Za večino rakavih obolenj še ni povsem jasno, katere celice so tarča malignih transformacij. LMC so po svojih lastnostih zelo podobne normalnim HMC. Njihova najpomembnejša skupna lastnost je velik potencial samoobnove. Na podlagi tega in podobnih razvojnih poti sklepajo, da so levkemične matične celice HMC, ki so postale maligne zaradi nakopičenih mutacij. HMC so zaradi dolgoživosti bolj dovzetne za kopičenje različnih mutacij kot zrelejše celice, ki obstajajo samo kratek čas in bi potrebovale več različnih mutacij za pridobitev zmožnosti samoobnove v primerjavi z HMC, ki jim je ta lastnost že fiziološko vgrajena. Nasprotno pa bi lahko LMC izhajale tudi iz usmerjenih matičnih celic ali bolj zrelih celic, ki bi sprva morale pridobiti lastnost samoobnove, da bi pridobile rakotvorni potencial in bi lahko kopičile dodatne mutacije (*slika 3*). Lahko pa bi pri HMC prišlo do akumulacije genetskih in epigenetskih sprememb, kar bi končno privedlo do pridobitve lastnosti samoobnove pri zrelejših, usmerjenih celicah (npr. izguba programirane celične smrti) (17, 18).



Slika 3: Razvoj LMC iz HMC ali usmerjenih oz. zrelejših celic (19)

1.4.2 Določanje imunofenotipa LMC

Matičnim celicam KM se med dozorevanjem spreminjata tako velikost in oblika kot tudi antigeni. Antigeni so večinoma makromolekule, ki se nahajajo na površini celic ali v njihovi citoplazmi. Med dozorevanjem celice pridobivajo nove in izgubljajo stare antigene, kar omogoča določevanje razvojne stopnje celic. Imunofenotip določamo z uporabo nabora monoklonskih protiteles za antigene, ki jih pričakujemo v določenem zrelostnem obdobju celic (1).

Študije pri **AML** so pokazale, da so LMC po imunofenotipu zelo podobne normalnim HMC. Celični označevalci, ki so skupni tem celicam, so CD34, CD38, CD71 in HLA-DR. Samo na podlagi teh celičnih označevalcev ločitev med populacijama ni možna. Pomemben napredek so zato prinesle študije, ki so pokazale obstoj specifičnih celičnih označevalcev na LMC. Med temi bi naj bile najpomembnejše odsotnost celičnih označevalcev CD90 in CD117 ter prisotnost CD123, ki je specifično izražen le na LMC. Na podlagi teh podatkov so imunofenotip LMC pri AML opredelili kot CD34+/CD38-/CD71-/CD90-/CD117-/HLA-DR-/CD123+ (20, 21, 22). Nekatere novejšje študije dokazujejo obstoj še več specifičnih celičnih označevalcev, npr. CD44, CD96. Slednji je močno izražen na LMC in šibko na HMC, kar je pomembno za ločevanje populacij (23).

Študije pri **ALL** so prav tako pokazale podoben osnovni imunofenotip LMC (CD34+/CD38-). Nadaljnje študije na področju prenosa bolezni v imunsko oslABLjene

mišje modele so potrdile, da so celice, ki so bile zmožne prenesti bolezen, imele specifičen CD34+/CD19- imunofenotip. Ti rezultati in podobne študije dokazujejo, da je specifičen imunofenotip LMC pri ALL CD34+/CD19-/CD33-/CD38- (24).

Z uporabo kombinacij ustreznih monoklonskih protiteles lahko na podlagi teh lastnosti ločimo med LMC in normalnimi HMC.

1.4.2.1 Monoklonska protitelesa za označevanje LMC

CD34 je monomerni transmembranski fosfoglikoprotein. Izražen je na zrelejših hematopoetskih celicah vseh linij in tudi na najbolj primitivnih pluripotentnih matičnih celicah, kjer je ekspresija antigena najmočnejša. Z diferenciacijo v usmerjene matične celice se prisotnost antigena postopoma izgublja. Najdemo ga tudi na kapilarnih endotelijskih celicah in na stromalnih celicah KM (25).

CD38 je membranski glikoprotein tipa II z NH₂-terminalnim delom, ki sega v citoplazmo. Je encim z različnimi aktivnostmi, npr. NAD glikohidrolaza, ADP ribozilciklaza, ciklična ADP riboza hidrolaza. CD38 je izražen na aktiviranih limfocitih T in B, NK celicah, monocitih, plazmatkah in medularnih timocitih. Izražanje antigena CD38 je odvisno od diferenciacije in aktivacije celic. V B celični liniji je CD38 izražen na zgodnjih stopnjah v B-celičnem razvoju, izgubi se med dozorevanjem in spet pridobi pri končni diferenciaciji v plazmatke. CD38 je razširjeno uporabljen označevalec za proučevanje aktivacije limfocitov T in B (25).

CD71 je transferinski receptor. Po strukturi je membranski glikoprotein tipa II, dimer. Izražen je na aktiviranih limfocitih T in B, makrofagih in eritroblastih. N-terminalni del, ki je v citoplazmi, sodeluje pri endocitozi in samo-recikliranju. Ni prisoten na mirujočih levkocitih v krvi. Ekspresija antigena je zvišana na proliferirajočih celicah (25).

CD117 je c-kit proto-onkogen, ki spada v skupino III receptorjev družine tirozin kinaz. Ta antigen je receptor za rastni faktor matičnih celic (SCF). V majhni meri je izražen na zgodnjih humanih CD34 celicah, z dozorevanjem celic se ekspresija povečuje. Izražajo ga tudi mastociti (25).

CD90, znan tudi kot Thy-1, je zelo N-glikozilirana molekula, ki spada v skupino super družine imunoglobulinov (IgSF). CD90 je v širokem izražen pri različnih tkivih (živčno, vezivno tkivo) in stromalnih celicah. Označuje redko podskupino humanih fetalnih celic

KM, ki imajo aktivnost multipotentnih hematopoetskih matičnih celic. Izražen je tudi na podskupini CD34⁺ celic humanega KM, popkovnične krvi ali jetrih fetusa ter na mali podskupini timocitov in perifernih T-limfocitov (25).

HLA-DR molekule se nahajajo na antigen-predstavnih celicah (APC), to je na dendritičnih celicah, limfocitih B, monocitih, makrofagih in epitelnih celicah timusa. Izražajo jih tudi aktivirane T celice, ne pa granulociti, trombociti in eritrociti (25).

CD123 je interleukin-3 alfa receptor (IL-3R), ki spada v skupino citokinskih receptorjev. Prisoten je na površini usmerjenih HMC, epitelnih celicah, monocitih, bazofilnih in mastocitih. Močno je izražen na CD34⁺/CD38⁻ celicah pri AML, medtem ko na normalnih celicah v tej skupini ni prisoten. Predstavlja pomemben faktor za ločevanje med LMC in HMC (25, 26).

CD45 je eno-verižni membranski protein, ki zavzema vsaj 5 izoformnih oblik. Vse imajo zunaj-celična zaporedja, na katera se vežejo vsa monoklonska protitelesa in so zmožna prepoznati vse izoformne oblike antigena. T.i. »neomejen« CD45 epitop je prisoten na površini vseh humanih levkocitov, tudi na usmerjenih matičnih celicah. CD45 je velik sestavni del membrane limfocitov. Ne najdemo ga na eritrocitih (zgubi se med zorenjem eritrocitov v KM) in trombocitih (25).

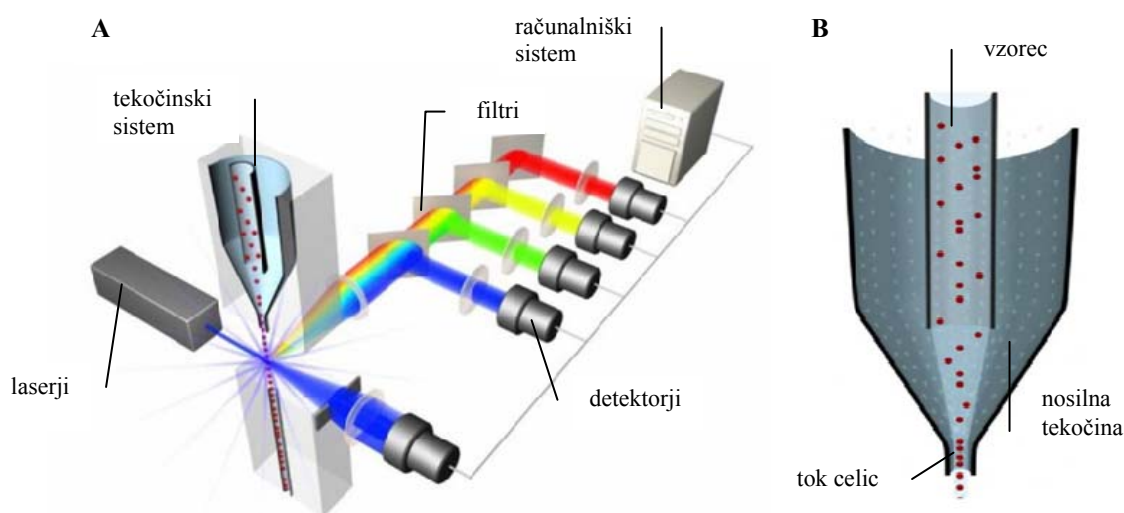
CD19 je tip I membranski glikoprotein. Sodeluje pri regulaciji razvoja B limfocitov, aktivaciji in diferenciaciji. Izražen je na vseh normalnih limfocitih B, vendar se izgubi ob zorenju v plazmatke. Prisoten je tudi na površini folikularnih dendritskih celic in na zgodnjih celicah mielo-monocitne vrste. Ni prisoten na normalnih limfocitih T, NK celicah, monocitih in granulocitih (25).

CD33 je eno-verižni transmembranski glikoprotein. Bila naj bi od sialične kisline odvisna adhezijska molekula. Antigen CD33 je izražen na monocitih v periferni krvi, v KM pa ga najdemo na predhodnikih zrelih granulocitov in makrofagov, ni pa prisoten na pluripotentnih matičnih celicah (25).

1.5 PRETOČNA CITOMETRIJA

Pretočna citometrija je sodobna tehnika, ki omogoča kvantitativno oceno in molekularno opredelitev celic. Njena prednost je v učinkovitosti in veliki stopnji občutljivosti, ki temeljijo na sposobnosti analiziranja več celičnih parametrov hkrati znotraj heterogenih populacij celic. Na področju diagnostične hematologije je pomembna za imunofenotipizacijo, kjer služi kot nujna laboratorijska preiskava pri opredelitvi hematoloških novotvorb (27).

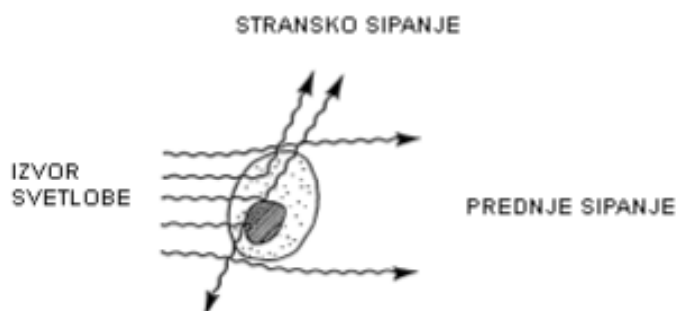
Za oceno na pretočnem citometru potrebujemo celice v suspenziji. Celice ena za drugo (*hidrodinamsko fokusiranje*- nosilna tekočina ima hitrejši tok od vzorca, zaradi površinske napetosti in laminarnega toka pride do prehajanja kapljic vzorca iz injektorja v ozek, hiter tok nosilne tekočine. Natančen nadzor hitrosti obeh pretokov omogoča kontrolo širine sredinskega toka in posledično poravnave celic v njem.) potujejo skozi ozek snop laserske svetlobe, pri čemer vsaka celica odda signale odvisne od njenih lastnosti. Pri stiku celice z laserskim žarkom pride do razpršitve svetlobe ali emisije fluorescence, ki ju merijo ustrezni detektorji. Fotodetektorji svetlobne signale pretvorijo v električne, računalniški sistemi jih pretvorijo v digitalno obliko in rezultate predstavijo v obliki točkovnih diagramov in/ali histogramov (*slika 4*). Dobimo rezultate o velikosti, granularnosti in fenotipu celic (28, 29).



Slika 4: A) Sestava pretočnega citometra, B) Hidrodinamsko fokusiranje vzorca (29)

1.5.1 Sipanje svetlobe

Ob stiku laserskega žarka s celico pride do odboja oz. razpršitve svetlobe. Količino razpršene svetlobe, ki jo oddaja obsevana celica (oddana svetloba je enake valovne dolžine kot obsevalna svetloba), merita dva fotodetektorja. Prvi fotodetektor je FALS (angl. *forward angle light scatter*), ki se nahaja v ravni poti laserskega žarka (tj. na nasprotni strani toka) in omogoča zaznavo odbite svetlobe pod kotom do 20°. Parameter, imenovan »prednje sipanje« (angl. *forward scatter*, FS), nastane zaradi kontakta s celičnimi membranami in je sorazmeren velikosti celic - čim večja je celica, tem večje je sipanje svetlobe in posledično signal, ki ga zaznamo na detektorju. Drugi detektor, RALS (angl. *right angle light scatter*), se nahaja pravokotno od poti laserskega žarka in omogoča zapis parametra »stransko sipanje« (angl. *side scatter*, SS), ki je premo sorazmeren granuliranosti oz. notranji strukturi celic. Celice so namreč prosojne in tako svetloba laserskega žarka prehaja tudi skozi citoplazmo. Tam ob interakciji z organeli (jedro, endoplazmatski retikulum...) pride do odboja svetlobe pravokotno od smeri laserskega žarka (*slika 5*). Več kot je organelov oz. membranskih struktur, večje bo stransko sipanje in večji bo signal (28, 30, 31).



Slika 5: Pri interakciji s celico se svetloba razprši v dve smeri; prednje in stransko sipanje (32)

1.5.2 Imunofluorescenca

S pretočno citometrijo lahko ob določevanju morfoloških lastnosti z metodo *imunofenotipizacije* analiziramo še funkcionalne lastnosti celic oz. fenotip celic. Normalne celice izražajo (na površini ali v notranjosti) različne označevalske molekule- antigene, odvisne od tipa celic in stopnje njihove zrelosti. Pri patoloških stanjih lahko pride do povečanega ali zmanjšanega izražanja določenih antigenov. S pretočno citometrijo lahko na podlagi teh lastnosti ločimo med zdravimi in obolelimi celicami (27, 28).

Pri imunofenotipizaciji najpogosteje uporabljamo fluorescenčne molekule, kot so s fluorokromi označena protitelesa, specifična za želeni antigen. *Fluorokromi* so barvila, ki absorbirajo svetlobo specifične valovne dolžine in oddajajo svetlobo višje valovne dolžine; pri imunofluorescenčnih tehnikah vzorec obsevamo z vzbujevalno (ekscitacijsko) svetlobo, ki jo fluorokromi absorbirajo, merimo pa relativno intenziteto oddane (emitirane) svetlobe, ki odraža količino imunskih kompleksov. Energija oddane svetlobe je odvisna od ravni energije, do katerega je fluorokrom ekscitiran. Ta svetloba ima specifično valovno dolžino in posledično specifično barvo. Vsak detektor pretočnega citometra prejema emitirano fluorescenčno svetlobo določene valovne dolžine in tako meri signal, ki ga odda določeno fluorescenčno barvilo. Fotodetektorji svetlobne signale pretvorijo v električne, ki jih po računalniški obdelavi predstavimo matematično in grafično (28, 30). Osnovni rezultat pretočne citometrije je točkovni histogram, na katerem vsaka točka predstavlja celico. Položaj točke oz. celice je odvisen od izmerjenih celičnih parametrov. Skupino celic, ki nas zanima oz. jo želimo še naprej proučevati, zamejimo kot novo populacijo, izvedemo t.i. »gating« (28).

V isti preiskavi lahko kombiniramo več fluorokromnih barvil hkrati, ki jih vzbuja z eno vrsto svetlobe (npr. argonski laser, 488 nm), pri tem pride do oddajanja svetlobe različnih valovnih dolžin, ki jih zaznavamo s pomočjo fotodetektorjev. Zaželeno je čim manjše prekrivanje emisijskih spektrov, kar pri večini pretočnih citometrov odstranimo s t.i. metodo barvne kompenzacije (28).

2 NAMEN DELA

Levkemične matične celice so podskupina levkemičnih celic (blastov) z osnovnim imunofenotipom CD34+/CD38-. Problem teh celic je, da je njihov delež med blastnimi celicami izredno majhen (0,2-1%) (18), zato jih je težko specifično določiti in opredeliti. Te celice delujejo kot iniciatorke in vzdrževalke klona levkemičnih celic in posledično vzdržujejo rakavo bolezen. Zato si prizadevajo za podrobnejšo opredelitev njihovih lastnosti, kar bi lahko pomagalo pri odkrivanju novih terapevtskih možnosti in načinov zdravljenja. Verjetno je njihov delež ob odkritju bolezni povezan tudi z napovednim pomenom. Kot že rečeno, pa je prav njihova nedvoumna opredelitev zelo zahtevna. Zato je razvoj rutinske metode za določitev deleža levkemičnih matičnih celic ter njihovih imunoloških in genetičnih lastnosti področje intenzivnih raziskav.

Glavni namen našega dela bo uvajanje določanja deleža levkemičnih matičnih celic (LMC) pri bolnikih z akutno levkemijo ob postavitvi diagnoze. Pri tem bomo poskušali doseči čim manjšo porabo protiteles in vzorca (kostni mozeg oz. periferna kri). Obenem je potrebno zagotoviti ustrezní časovni okvir izvedbe in tehnološko primernost za rutinsko izvajanje v kliničnem laboratoriju. Populaciji LMC bomo poskušali opredeliti imunofenotip, rezultate pa bomo primerjali z drugimi, že uveljavljenimi diagnostičnimi parametri pridobljenimi z rutinskimi preiskavami (citogenetika, molekularna genetika). Poskušali bomo ugotoviti, ali obstaja kakšna povezava med njimi in deležem LMC.

Metoda, ki jo bomo pri našem delu uporabili, bo pretočna citometrija, s katero bomo določili delež LMC in opredelili njihove imunofenotipske lastnosti. Želeno populacijo celic bomo poizkušali nedvoumno zamejiti z uporabo kombinacije različnih specifičnih monoklonskih protiteles, kjer bosta najpomembnejšo vlogo igrali protitelesi CD34 in CD38.

Kot negativno kontrolo bomo uporabili vzorce kostnih mozgov bolnikov z malignim limfomom in difuznim plazmocitomom, da dokažemo, da smo res določili le LMC, ki jih najdemo pri akutnih levkemijah in ne pri drugih hematopoetskih boleznih oziroma sklepamo, da jih ne najdemo med blasti kostnega mozga pri zdravih.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Biološki materiali

V Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo UKC Ljubljana smo v obdobju od avgusta 2010 do februarja 2011 ocenjevali vzorce kostnih mozgov oz. periferne krvi bolnikov, ki so bili napoteni na diagnostično opredelitev zaradi suma na akutno levkemijo. Obravnavali smo 30 bolnikov, 17 moških in 13 žensk. Med bolniki je bilo 5 otrok povprečne starosti 9 let, ostali so bili odrasli s povprečno starostjo 65 let.

Preglednica V: Podatki bolnikov z akutno levkemijo (AL)

| VRSTA AL | BOLNIKI | SPOL | STAROST (let) | FAB RAZVRSTITEV | ŠT. LKC ($\times 10^9/L$) |
|-------------|---------|------|------------------|--------------------|--------------------------------|
| AML | 1 | M | 81 | s-AML | 7,7 |
| | 2 | Ž | 54 | s-AML | 9,6 |
| | 3 | Ž | 84 | AML-M1/M2 | 137,7 |
| | 4 | M | 48 | AML-M2 | 21,4 |
| | 5 | M | 45 | AML-M4 | 149 |
| | 6 | Ž | 73 | AML-M5 | 68,9 |
| | 7 | Ž | 61 | AML-M1/M2 | 41,4 |
| | 8 | M | 77 | AML-M2 | 1,5 |
| | 9 | M | 78 | AML-M1 | 22,1 |
| | 10 | M | 62 | AML-M5 | 46,2 |
| | 11 | M | 69 | s-AML | 200,9 |
| | 12 | Ž | 75 | AML-M5b | 135,3 |
| | 13 | Ž | 49 | AML-M1 | 243 |
| | 14 | Ž | 66 | AML-M1 | 1,2 |
| | 15 | Ž | 47 | AML-M1 | 422 |
| | 16 | Ž | 71 | AML-M1 | 3,8 |
| | 17 | M | 79 | AML-M1 | 1,7 |
| | 18 | M | 49 | AL mešan fenotip | 4,2 |
| | 19 | M | 9 | AML-M1 | n.p. |
| | 20 | M | 84 | s-AML | 0,6 |
| | 21 | Ž | 61 | AML-M1/M2 | 24 |
| | 22 | Ž | 62 | AML-M1 | 0,7 |
| | 23 | M | 62 | AML-M1/M2 | 40,2 |
| | 24 | M | 62 | AML-M1 | 1,6 |

| | | | | | |
|-----|----|---|----|----------------|------|
| ALL | 25 | M | 4 | "common" B-ALL | n.p. |
| | 26 | Ž | 72 | pre-B-ALL | 16,5 |
| | 27 | Ž | 6 | "common"-B-ALL | n.p. |
| | 28 | M | 10 | T-ALL | n.p. |
| | 29 | M | 62 | "common"-B-ALL | 6,2 |
| | 30 | M | 18 | "common"-B-ALL | n.p. |

(Legenda: Ž- ženska; M- moški; FAB- francosko, ameriško, britanska; AML- akutna mieloična levkemija; AMoL- akutna monocitna levkemija; ALL- akutna limfatična levkemija; s-AML- sekundarna AML; št. LKC- število levkocitov v venski krvi; n.p.- ni podatka- *Pediatrični bolniki*)

3.1.2 Pufri in raztopine

- Raztopina za lizo eritrocitov (NH_4Cl):

Matična raztopina:

10× NH_4Cl : 82,60 g NH_4Cl

10,00 g KHCO_3

0,37 g EDTA

Soli raztopimo v 1000 mL destilirane vode.

Delovna raztopina: 10× NH_4Cl redčimo z destilirano vodo v razmerju 1:10 tik pred uporabo.

- PBS (puferirana fiziološka raztopina):

Matična raztopina:

10× PBS: 80,00 g NaCl

2,00 g KCl

2,00 g KH_2PO_4

15,20 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

Soli raztopimo v 1000 mL destilirane vode.

Delovna raztopina: 100 mL 10× PBS redčimo z 900 mL destilirane vode in dodamo 1 g NaN_3 (natrijev azid služi kot konzervans).

3.1.3 Protitelesa

Monoklonska mišja protitelesa proti humanim antigenom, konjugirana z različnimi fluorokromi (IOTest[®], Beckman Coulter):

| | | |
|------------------------|------------------------|--------------------------|
| CD13- FITC, PC5 | CD38- FITC, PC5 | CD117- PC5, PC7 |
| CD19- PC5, PC7 | CD45- PC7 | CD123- PE |
| CD33- PE | CD71- FITC, PE | HLA-DR- FITC, ECD |
| CD34- PE, ECD | CD90- PC5 | |

Uporabljeni fluorokromi:

| | |
|-------------|----------------------------|
| FITC | fluorescein-5-izotiocianat |
| PE | fikoeritrin |
| ECD | fikoeritrin-TexasRed |
| PC5 | fikoeritrin cianin 5 |
| PC7 | fikoeritrin cianin 7 |

3.1.4 Laboratorijska oprema

- pipete (2 mL, 1 mL, 500 μ L, 200 μ L, 100 μ L, 20 μ L, 10 μ L); Eppendorf
- nastavki za pipete (2-200 μ L, 500-2500 μ L, 50-1000 μ L); Eppendorf
- epruvete (4 mL, 10 mL), gumijasti zamaški
- filtri (20 μ m, 50 μ m)
- urna stekelca, steklene palčke
- čaše
- bučke (100 mL, 1000 mL)
- centrifugirke (50 mL); FALCON[®]
- stresalnik Vibromix 10; Tehnica[®]
- hematološki analizator:
 - Coulter LH 750 Analyzer; Beckman Coulter[®]
 - Coulter Hmx Hematology Analyzer; HMX, Beckman Coulter[®]

- centrifuga:
 - Labofuge 400, Heraeus[®], Functionline; Kendro laboratory product
 - Lavofuge 24, Heraeus[®]; Kendro laboratory product
- pretočni citometer Cytomics FC500; Beckman Coulter[®]

3.2 METODE

3.2.1 Osamitev levkocitov

Vzorci polne krvi/aspirata kostnega mozga vsebujejo veliko eritrocitov, ki lahko pri imunofenotipizaciji nespecifično vežejo protitelesa in tako motijo analizo vzorcev na pretočnem citometru. Zato je potrebno predhodno osamiti levkocite iz polne krvi. Eritrocite smo lizirali z uporabo delovne raztopine NH_4Cl ($10\times$ razredčena) tako, da smo v centrifugirko (50 mL) odpipetirali 2 mL vzorca, dopolnili z NH_4Cl do 50 mL in pustili stati na sobni temperaturi 10 minut. Po 10-ih min smo vzorec centrifugirali 5 min pri hitrosti 1500 rpm, odlili supernatant in celice resuspendirali s PBS-om. Celice smo prenesli v manjšo epruveto (4 mL), premešali na stresalniku in $2\times$ ročno sprali s PBS-om (to pomeni: dodatek približno 2 mL PBS-a, centrifugiranje 90 s pri 2950 rpm, odlitje supernatanta in še $1\times$ ponovitev postopka). Izolirane celice smo ponovno resuspendirali s PBS-om in morebitne skupke prefiltrirali. Nato smo na hematološkem analizatorju izmerili število levkocitov in ga uravnali na $10\text{-}20\times 10^9/\text{L}$. V primeru, da smo dobili vzorec biopsijskega stebrička, smo le-tega čim bolj strli s stekleno palčko, prefiltrirali vsebino in izmerili vsebnost celic na hematološkem analizatorju. V primeru prisotnosti eritrocitov je bilo vzorec predhodno potrebno še lizirati z NH_4Cl .

3.2.2 Priprava kompleksov s protitelesi

Glede na vrsto bolezni (AML, ALL) smo imeli pripravljene panele protiteles, s katerimi smo želeli zajeti LMC. Odvisno od vrste celic, ki smo jih želeli preučiti, in od razpoložljivosti protiteles smo izbrali ustrezno kombinacijo z različnimi fluorescenčnimi barvili. Poskušali smo najti čim bolj optimalne kombinacije, da bi bili tako poraba protiteles kot poraba vzorca minimalni. Zato smo se odločili za postopek brez uporabe izotipskih kontrol, ki se tudi sicer v diagnostiki vse bolj opuščajo.

Pri bolnikih z AML smo v prvih nekaj primerih uporabili 3 epruvete, ki smo jih označili:

1. CD38-FITC/CD34-PE/HLA-DR-ECD/CD90-PC5/CD45-PC7
2. CD38-FITC/CD123-PE/CD34-ECD/CD117-PC5/CD45-PC7
3. CD38-FITC/CD71-PE/CD34-ECD/CD13-PC5/CD45-PC7

Pomembno je bilo, da sta bili v vseh epruvetah protitelesi CD34 in CD38, da smo lahko določali prisotnost več različnih antigenov izključno na LMC. Po začetnih poskusih smo našli naslednjo kombinacijo protiteles, pri kateri smo število epruvet lahko zmanjšali le na 2:

1. CD38-FITC/CD34-PE/HLA-DR-ECD/CD90-PC5/CD117-PC7
2. CD71-FITC/CD123-PE/CD34-ECD/CD38-PC5/CD45-PC7

Pri bolnikih z diagnozo ALL smo uporabili samo eno epruveto, z naslednjo kombinacijo protiteles:

1. CD38-FITC/CD33-PE/CD34-ECD/CD19-PC5/CD45-PC7

V vsako epruveto smo najprej odpipetirali ustrezno količino protiteles. Odpipetirali smo po 20 μL protiteles konjugiranih s fluorokromi FITC in PE, ter po 10 μL protiteles konjugiranih z ECD, PC5 in PC7. Dodali smo 100 μL vzorca oz. izoliranih celic in inkubirali v temi pri sobni temperaturi 15 min. Po inkubaciji smo vzorce analizirali na pretočnem citometru.

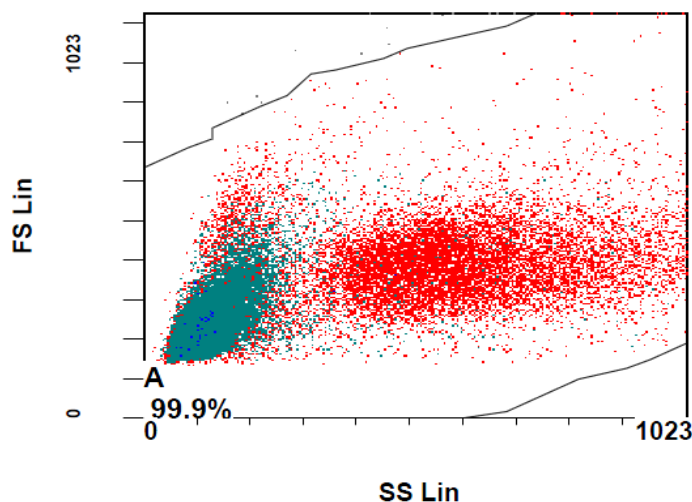
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Za analizo kompleksov celic z monoklonskimi protitelesi smo uporabili metodo pretočne citometrije. Iz dobljenih grafov smo pri vzorcih najprej odčitali delež CD34+ levkemičnih celic (blastov). Znotraj te CD34+ populacije celic smo poskušali čim bolj natančno zamejiti populacijo CD34+/CD38- celic (LMC) in določiti delež le-teh med CD34+ blasti. Tem levkemičnim matičnim celicam smo določili še imunofenotip z uporabo ustreznih monoklonskih protiteles. Pri delu nismo uporabili kontrolnih protiteles, zato smo pri odčitavanju deleža LMC večinoma opazovali med seboj jasno ločene populacije. Če pa ločitev populacij ni bila jasna, smo se ravnali po načelu, da populacijo opredeljuje vsaj 10 točk na točkovnem histogramu in tako poskušali dobiti primerljive rezultate med vzorci.

Iz rezultatov redne laboratorijske diagnostike smo dobili podatke o značilnem imunofenotipu celic posameznega bolnika pri določeni obliki AL, številu levkocitov v periferni krvi ob diagnozi in o pridruženih citogenetskih in molekularno genetskih spremembah. Podatke smo uporabili za ugotavljanje korelacije z deležem LMC.

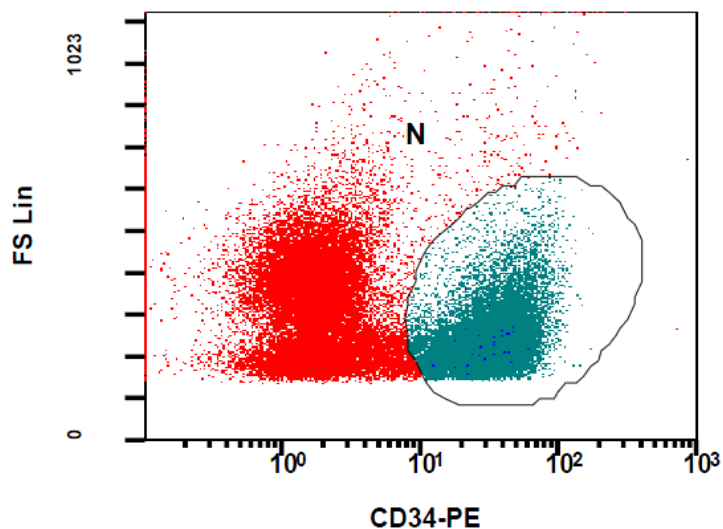
4.1 DOLOČANJE DELEŽA CD34+ LEVKEMIČNIH CELIC

Slika 6 prikazuje točkovni histogram vseh krvnih celic prisotnih v vzorcu. Abscisna os predstavlja granularnost, ordinatna os pa velikost celic. Z zeleno barvo so označene levkemične CD34+ celice, z rdečo pa vse ostale celice. Levkemične celice se večinoma nahajajo levo spodaj, saj so pretežno nezrele, dokaj majhne celice brez granulacij ali malo granularne, z malima vrednostma FS in SS.



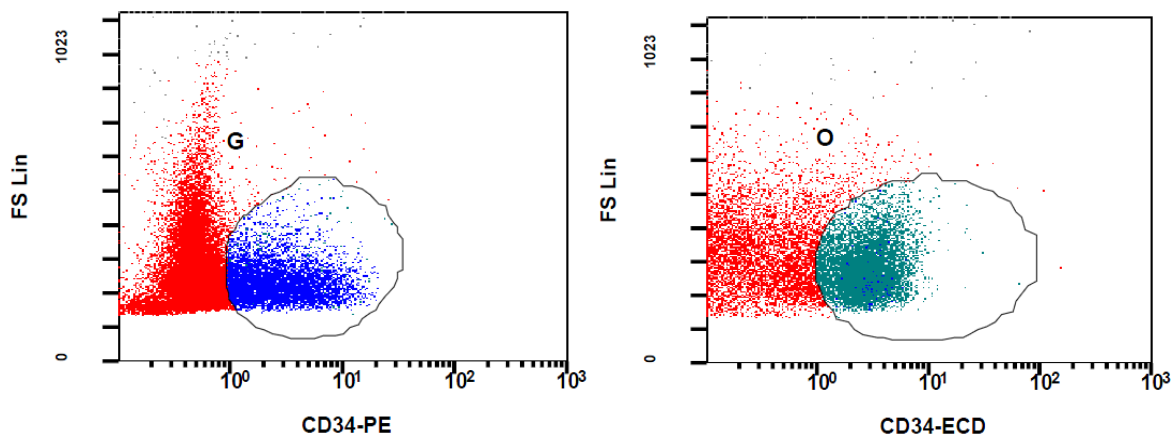
Slika 6: Razporeditev celic glede na velikost (FS Lin) in granulacije v citoplazmi (SS Lin)

Na sliki 7 je prikazan točkovni histogram razporeditve celic glede na velikost (FS Lin) in prisotnost celičnega označevalca CD34. Z zeleno barvo so zamejane CD34+ levkemične celice, rdeče so vse ostale CD34- celice. Na spodnjem histogramu je vidna dobra ločitev populacij celic. CD34+ populacijo ločimo brez večjih težav.



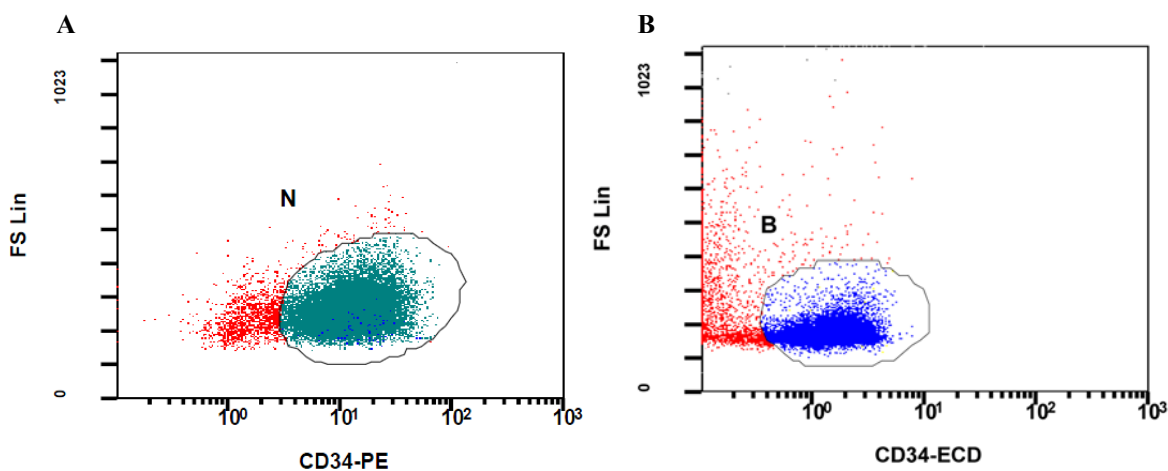
Slika 7: Razporeditev celic glede na velikost (FS lin) in prisotnost celičnega označevalca CD34; zamejitev CD34+ (N)

Pri nekaterih primerih pa je prišlo do slabše ločbe med posameznimi populacijami, kar nam je otežilo ustrezno zamejitev populacije CD34+ celic. Slika 8 prikazuje dva takšna primera. Z modro in zeleno barvo so ponovno označene populacije levkemičnih CD34+ celic. V teh primerih je zamejitev ustrezne populacije prepuščena subjektivni presoji.



Slika 8: Razporeditev celic po velikosti in prisotnosti celičnega označevalca CD34, oboje pri AML; težja zamejitev populacije CD34+ od ostalih celic

Preiskovali smo tudi vzorce, kjer je bila večina celic ($\approx 90\%$) pozitivnih na celični označevalec CD34. Dva primera sta prikazana na sliki 9.



Slika 9: Točkovna histograma celic bolnika z AML (A) in bolnika z ALL (B); večina celic je CD34+, označene so z zeleno in modro barvo

V preglednici predstavljamo rezultate o deležu CD34+ blastov pri obravnavanih bolnikih. Podatke smo razporedili glede na delež CD34+ blastov naraščajoče, za vsako obliko AL posebej.

Preglednica VI: Delež CD34+ blastov pri obravnavanih bolnikih z akutno levkemijo (AL)

| BOLNIKI | VRSTA AL | FAB RAZVRSTITEV | % CD34+ BLASTOV |
|---------|----------|------------------|-----------------|
| 8 | AML | AML-M2 | 4 |
| 24 | | AML-M1 | 5,8 |
| 11 | | s-AML | 7,5 |
| 12 | | AML-M5b | 12 |
| 5 | | AML-M4 | 24 |
| 18 | | AL mešan fenotip | 28 |
| 4 | | AML-M2 | 30 |
| 20 | | s-AML | 32 |
| 7 | | AML-M1/M2 | 42 |
| 19 | | AML-M1 | 44 |
| 16 | | AML-M1 | 47 |
| 17 | | AML-M1 | 49 |
| 23 | | AML-M1/M2 | 49 |
| 14 | | AML-M1 | 50 |
| 2 | | s-AML | 52 |
| 1 | | s-AML | 60 |
| 15 | | AML-M1 | 60 |

| | | | |
|----|-----|----------------|----|
| 22 | | AML-M1 | 62 |
| 6 | | AML-M5 | 64 |
| 21 | | AML-M1/M2 | 65 |
| 3 | | AML-M1/M2 | 80 |
| 9 | | AML-M1 | 81 |
| 10 | | AML-M5 | 87 |
| 13 | | AML-M1 | 90 |
| 28 | ALL | T-ALL | 25 |
| 26 | | pre-B-ALL | 45 |
| 29 | | "common"-B-ALL | 75 |
| 25 | | "common" B-ALL | 85 |
| 27 | | "common"-B-ALL | 95 |
| 30 | | "common"-B-ALL | 95 |

V nadaljevanju bomo tudi pogledali, ali ta delež CD34+ blastov, ki smo jih določili, kakorkoli vpliva na deleže levkemičnih matičnih celic pri obravnavanih bolnikih (*poglavje 4.2.1*).

Kot kontrolne vzorce smo vzeli aspirate kostnih mozgov 10-ih bolnikov z malignim limfomom ali difuznim plazmocitomom (*preglednica VII*). Vzorce smo uporabili kot negativno kontrolo, da bi izključili možnost, da z uporabljenimi metodami med normalnimi CD34+ blasti kostnega mozga določimo CD34+/CD38- levkemične matične celice. Ustrezneje bi bilo poskuse narediti na vzorcih kostnega mozga zdravih dajalcev, ki pa so nedostopni.

Preglednica VII: Delež CD34+ celic pri bolnikih z B-KLL in DP

| BOLNIKI | % CD34+ celic |
|----------------|----------------------|
| B-KLL | 0,8 |
| B-KLL | 1 |
| B-KLL | 0,6 |
| B-KLL | 0,3 |
| B-KLL | 0,8 |
| DP | 0,4 |
| DP | 0,9 |
| NHL | 0,3 |
| B-KLL | 0,5 |
| B-KLL | 0,5 |

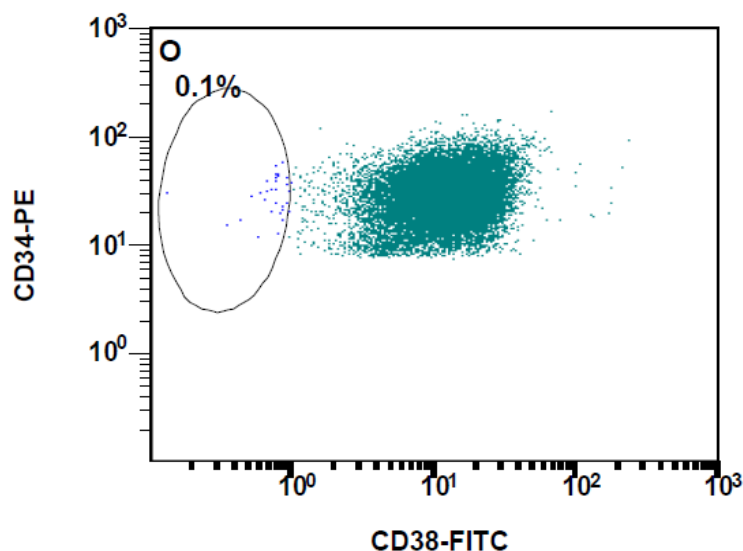
(Legenda: DP- difuzni plazmocitom; B-KLL- kronična limfatična levkemija; NHL- Non-Hodgkin limfom)

Iz preglednice VII je razvidno, da je bil pri vseh kontrolnih vzorcih delež CD34+ levkemičnih celic pod 5%, kar je zgornja normalna vrednost.

4.2 DOLOČANJE DELEŽA LMC

Na podlagi predhodno določenega deleža CD34+ blastov smo nato znotraj te populacije določili delež levkemičnih matičnih celic. Pri tem smo sočasno uporabili monoklonsko protitelo CD38 ter določili delež CD34+/CD38- celic.

Slika 10 prikazuje zamejitev populacije levkemičnih matičnih celic, ki so CD34+/CD38-, obarvane temno modro kot populacija O. Zelene so vse ostale levkemične celice, ki so CD34 in CD38 pozitivne.

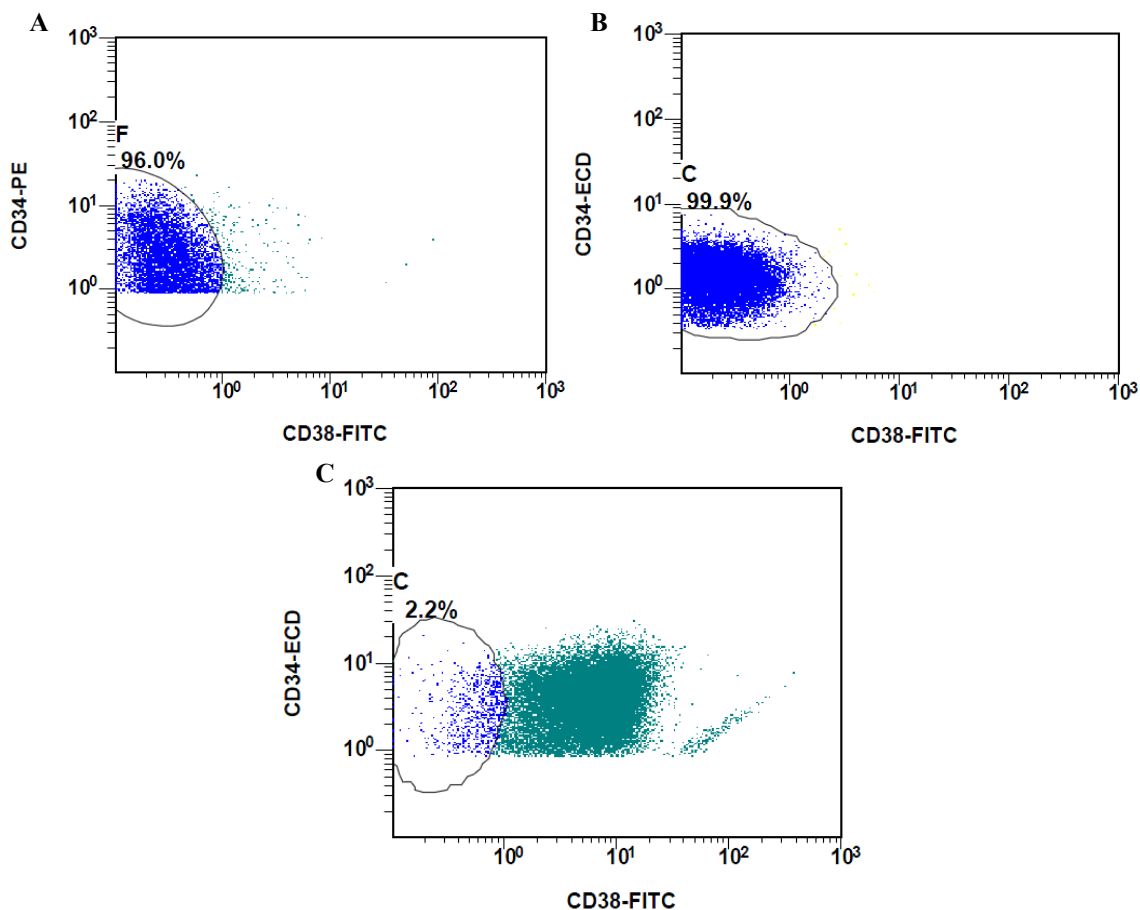


Slika 10: Zamejitev populacije levkemičnih matičnih celic med CD34+ blasti

Kot je razvidno iz slike 10, se LMC ne ločijo od ostalih levkemičnih celic kot jasno zamejena populacija. To je veljalo za večino preiskovanih vzorcev, zato je določitev njihovega deleža delno podvržena presoji analitika. Obenem pa smo s številnimi zaporednimi poskusi ugotovili, da se ne glede na arbitrarno zamejitev populacije vrednosti znatno ne spreminjajo.

Po drugi strani pa se je delež LMC pri vzorcih različnih bolnikov zelo spreminjal (\approx od 0,1% do 99%). Na sliki 11 je prikazanih nekaj posebnih primerov: Točkovna histograma A (AML) in B (ALL) predstavljata populaciji levkemičnih celic, ki po imunofenotipu skoraj v celoti ustrezata LMC (CD34+/CD38-). Točkovni histogram C predstavlja primer

arbitrarne ločbe LMC od ostale populacije CD34+ levkemičnih celic. Populacija je skoraj povsem enotna in je zato težko jasno zamejiti populacijo LMC. V takih primerih smo se zato ravnali po splošnem načelu, da samostojno populacijo predstavlja najmanj 10 točk na histogramu in smo na ta način določili delež LMC.



Slika 11: Točkovni histogram deleža LMC pri bolniku z AML (A), pri bolniku z ALL (B); težja zamejitev LMC med CD34+ levkemičnimi celicami (C)

4.2.1 Delež LMC glede na podtip AL po razvrstitvi FAB

Rezultate določanja deleža levkemičnih matičnih celic smo podali v dveh preglednicah, posebej za AML in ALL. Znotraj posamezne preglednice smo rezultate združili po podvrstah bolezni in jih razporedili glede na delež LMC naraščajoče. V preglednicah smo navedli še podatke o značilnem imunofenotipu posamezne AL.

Preglednica VIII: Delež levkemičnih matičnih celic (CD34+/CD38-) pri bolnikih z akutno mieloično levkemijo (AML)

| BOLNIKI | FAB RAZVRSTITEV | ZNAČILEN IMUNOFENOTIP (AML) | CD34+/CD38- (%) |
|---------|------------------|---|-----------------|
| 11 | s-AML | CD13+/CD33+/CD34š+/CD65+/CD64+/MPO+/ HLA-DR+/CD117+ | 0,7 |
| 20 | s-AML | CD13+/CD33+/CD34+/CD65+/MPO+/HLA-DR+/ CD117+ | 0,8 |
| 1 | s-AML | CD13+/CD34+/CD65+/MPOš+/HLA-DR+ | 0,9 |
| 2 | s-AML | CD13+/CD33+/CD34+/CD65+/HLA-DR+ | 30 |
| 17 | AML-M1 | CD13+/CD33+/CD34+/MPO+/HLA-DR+/CD65+ | 0,1 |
| 22 | AML-M1 | CD13+/CD33+/CD34+/MPO+/HLA-DR+/CD64+/ CD117+ | 0,1 |
| 9 | AML-M1 | CD13+/CD33+/CD34+/MPO+/HLA-DRš+/CD65+/ CD117+ | 0,2 |
| 13 | AML-M1 | CD13+/CD33+/CD34+/MPOš+/HLA-DR+/CD65+/ CD117+ | 0,3 |
| 16 | AML-M1 | CD13+/CD33+/CD34+/MPO+/HLA-DR+/CD65+/ CD117+ | 0,7 |
| 19 | AML-M1 | CD13+/CD33+/CD34+/MPO+/HLA-DR+/CD65+/ CD117+ | 0,8 |
| 15 | AML-M1 | CD13+/CD33+/CD34+/MPO+/HLA-DR+/CD65+ | 1 |
| 24 | AML-M1 | CD13+/CD33+/CD34+/HLA-DR+/CD71+ | 1,6 |
| 14 | AML-M1 | CD13+/CD33+/CD34+/MPO+/HLA-DR+/CD65+/ CD117+ | 30 |
| 23 | AML-M1/M2 | CD13+/CD15+/CD33+/CD34+/MPO+/HLA-DR+/ CD65+ | 0,2 |
| 7 | AML-M1/M2 | CD13+/CD15+/CD33+/CD34+/MPO+/HLA-DR+/ CD65+/CD64+ | 0,3 |
| 21 | AML-M1/M2 | CD13+/CD15+/CD33+/CD34+/MPO+/HLA-DR+/ CD65+ | 0,3 |
| 3 | AML-M1/M2 | CD11c+/CD13+/CD33+/CD34+/MPO+/HLA-DR+/ CD64+/ CD117+ | 0,4 |
| 8 | AML-M2 | CD13+/CD33+/CD34+/MPO+/HLA-DR+/CD65+/ CD117+/CD16+ | 5 |
| 4 | AML-M2 | CD13+/CD33+/CD34+/MPOš+/HLA-DR+/ CD117+ | 92 |
| 5 | AML-M4 | CD13+/CD33+/CD34+/MPO+/HLA-DR+/ CD117+/CD4+/CD11c+/CD15+/CD64+ | 2,6 |
| 6 | AML-M5 | CD13+/CD33+/CD34+/MPOš+/HLA-DR+/ CD64+/CD117+/CD14 š+/CD3-/CD4+ | 0,2 |
| 10 | AML-M5 | CD13+/CD34+/CD56+/CD65+/CD117+/CD123+/ MPO-/HLA-DR+ | 0,3 |
| 12 | AML-M5b | CD11c+/CD13+/CD14+/CD16+/CD33+/CD34š+/ CD65+/CD64+/HLA-DR+/MPOš+ | 15 |
| 18 | AL mešan fenotip | CD13+/CD33+/CD34+/CD10+/CD19+/ciCD79a+/ HLA-DR+/CD58+ | 0,2 |

(opombe: š+ - šibko pozitiven)

Preglednica IX: Delež levkemičnih matičnih celic (CD34+/CD38-) pri bolnikih z akutno limfatično levkemijo (ALL)

| BOLNIKI | FAB RAZVRSTITEV | ZNAČILEN IMUNOFENOTIP (ALL) | CD34+/CD38- (%) |
|---------|-----------------|---|-----------------|
| 26 | pre-B-ALL | CD13š+/CD19+/CD22+/CD34+/ciCD79a+/HLA-DR+/ci-IgM+/CD58+ | 18 |
| 29 | "common"-B-ALL | CD10+/CD19+/CD20š+/CD34+/ciCD79a+/HLA-DR+/TdT+/CD58+ | 2,2 |
| 27 | "common"-B-ALL | CD10+/CD13+/CD19+/CD22+/CD34+/ciCD79a+/HLA-DR+ /ci-IgM-/CD58+ | 3,3 |
| 30 | "common"-B-ALL | CD10+/CD19+/ciCD22+/CD34+/ciCD79a+/HLA-DR+/CD58+ | 90 |
| 25 | "common" B-ALL | CD10+/CD13+/CD19+/CD34+/ciCD79a+/HLA-DR+/ci-IgM-/CD58+ | 99 |
| 28 | T-ALL | CD2+/CD4+/CD7+/CD13+/CD34+/HLA-DR+ | 6 |

(opombe: ci- citoplazemski)

Iz predstavljenih rezultatov vidimo, da je pri bolnikih z AML v večini primerov delež LMC v območju od 0,1% do 5% (20 od 24 vzorcev). Pri 4-ih od 24-ih bolnikov je bil delež LMC večji, to je od 15-92%. Med vzorci so prevladovali bolniki z AML-M1 (9 od 24 vzorcev), s-AML (4 od 24) in AML-M1/M2 (4 od 24). Delež LMC znotraj posameznih podskupin je bil večinoma majhen (do 2%) in enakomerno porazdeljen. Pri s-AML in AML-M1 smo imeli po en primer, kjer je bil delež LMC večji od ostalih (30%). Tudi pri AML-M5b je bil delež večji (15%) od ostalih dveh bolnikov z AML-M5. Pri dveh vzorcih AML-M2 je bila razlika v deležu LMC velika (5% in 92%). Pri vzorcih bolnikov z ALL smo določili nekoliko večje deleže LMC. Najmanjši delež LMC je bil 2,2%. Od 6-ih bolnikov smo pri treh določili majhen (2,2-6%) in pri treh velik (18-99%) delež LMC. Prevladovali so bolniki s »common«-B-ALL (4 od 6), kjer je bil delež LMC v dveh primerih majhen in v dveh velik. Kar 50% bolnikov z ALL je imelo velik ($\geq 18\%$) delež LMC, vendar moramo upoštevati, da je bila ta skupina zelo majhna (le 6 bolnikov).

Glede na to, da smo imeli dokaj malo vzorcev posameznih podvrst AML oz. ALL ne moremo z gotovostjo trditi, da obstaja povezava med deležem LMC in podvrsto AL po razvrstitvi FAB, ker tudi statistično vrednotenje pri tako majhnem številu vzorcev ni mogoče. Opazili pa smo, da je bil delež LMC pri obeh bolnikih z AML-M2 nekoliko večji, medtem ko smo pri ostalih podvrstah dobili le posamezne bolnike z zvečanim deležem. Po podatkih iz literature bi naj bil delež LMC v vzorcih med 0,2-1%, odvisno od

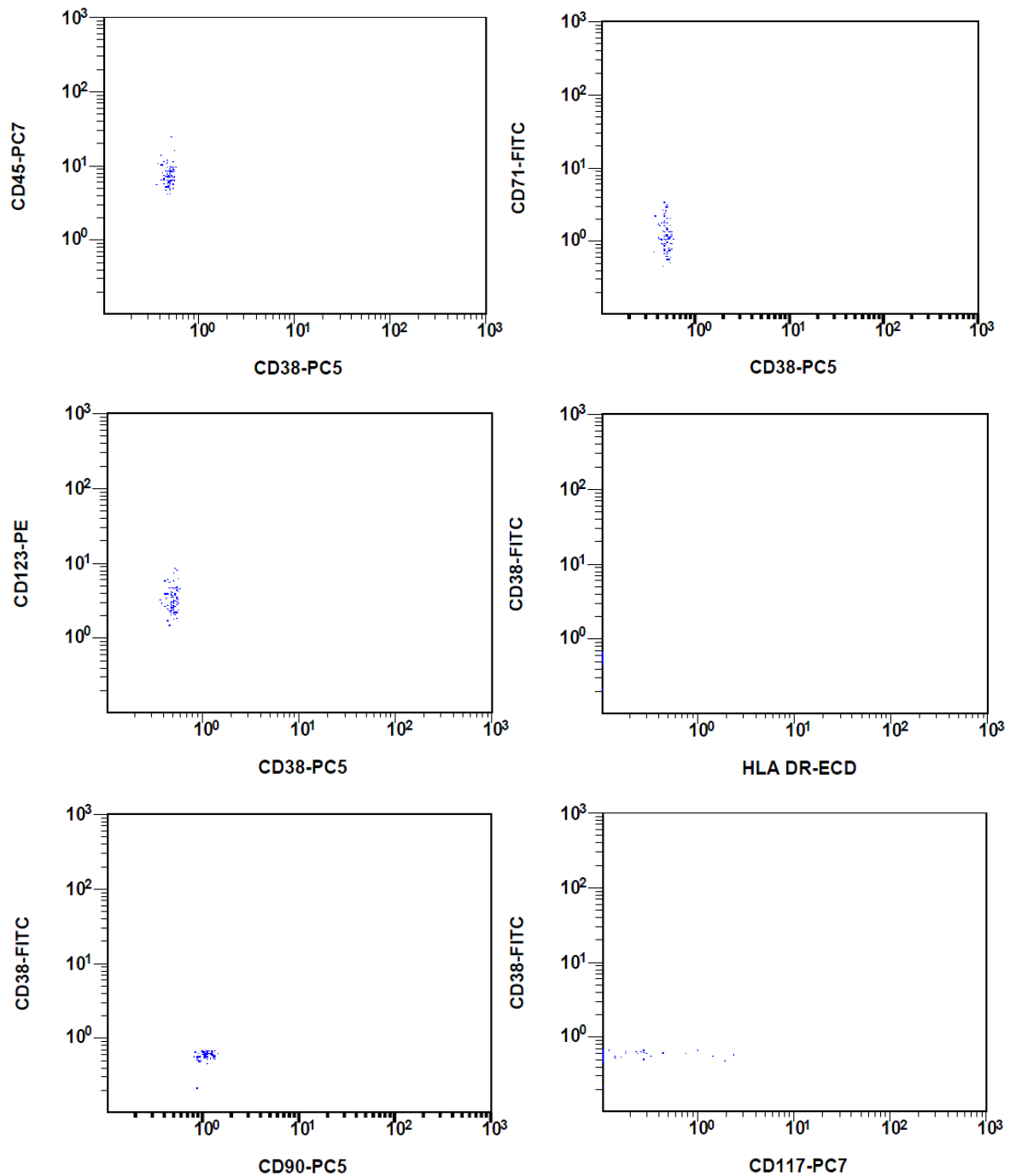
posameznika. Večina naših rezultatov se sklada s tem podatkom, jih je pa tudi nekaj, kjer je delež izrazito večji (6 vzorcev pri AML, pri ALL vsi vzorci).

4.2.2 Povezava med deležem CD34+ blastov in deležem LMC

Pogledali smo tudi, ali obstaja kakšna zveza med deležem CD34+ blastov (*poglavje 4.1*) in deležem LMC pri obravnavanih bolnikih. V spodnji preglednici smo primerjali oba podatka. Bolnike smo razporedili po vrsti AL in po naraščajočem deležu LMC.

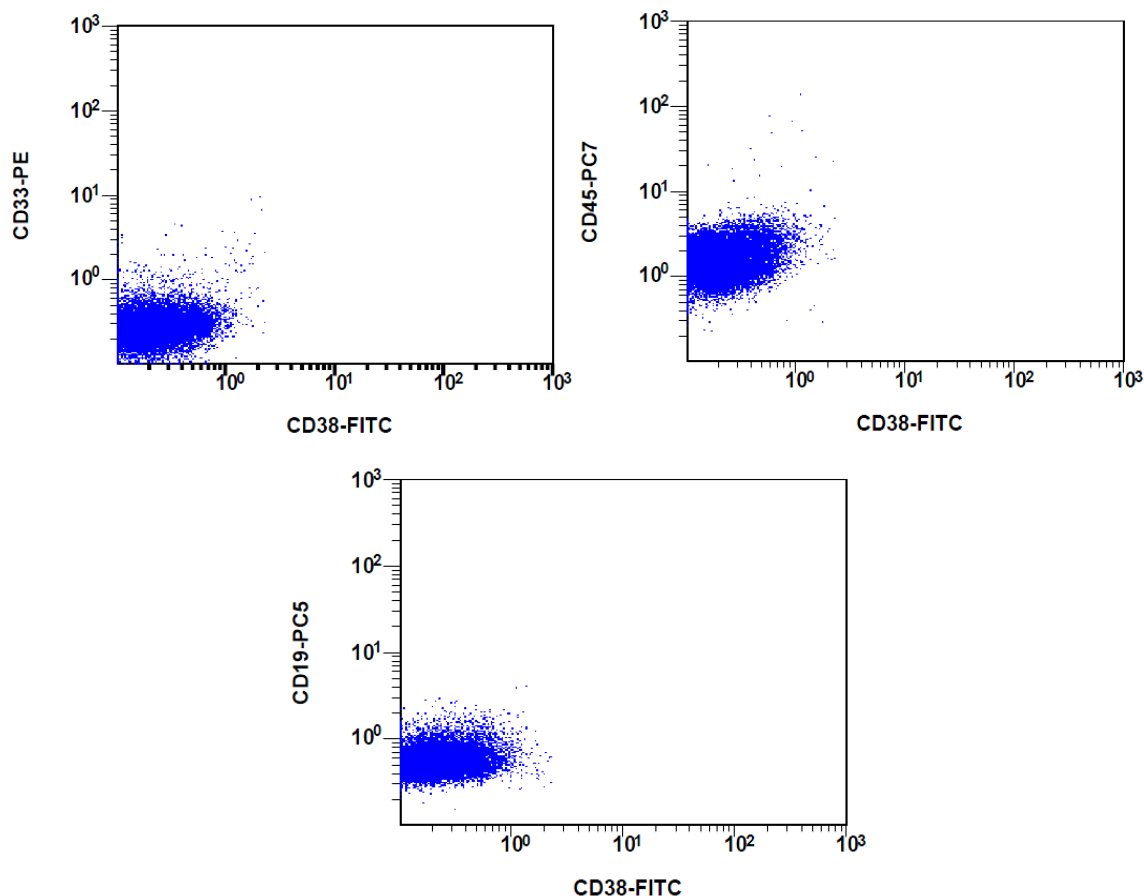
Preglednica X: Delež CD34+ blastov in delež LMC pri bolnikih z AL

| BOLNIKI | VRSTA AL | FAB RAZVRSTITEV | % CD34+ BLASTOV | % LMC (CD34+/CD38-) | |
|---------|----------------|------------------|-----------------|---------------------|-----|
| 17 | AML | AML-M1 | 49 | 0,1 | |
| 22 | | AML-M1 | 62 | 0,1 | |
| 6 | | AML-M5 | 64 | 0,2 | |
| 9 | | AML-M1 | 81 | 0,2 | |
| 18 | | AL mešan fenotip | 28 | 0,2 | |
| 23 | | AML-M1/M2 | 49 | 0,2 | |
| 7 | | AML-M1/M2 | 42 | 0,3 | |
| 10 | | AML-M5 | 87 | 0,3 | |
| 13 | | AML-M1 | 90 | 0,3 | |
| 21 | | AML-M1/M2 | 65 | 0,3 | |
| 3 | | AML-M1/M2 | 80 | 0,4 | |
| 11 | | s-AML | 7,5 | 0,7 | |
| 16 | | AML-M1 | 47 | 0,7 | |
| 19 | | AML-M1 | 44 | 0,8 | |
| 20 | | s-AML | 32 | 0,8 | |
| 1 | | s-AML | 60 | 0,9 | |
| 15 | | AML-M1 | 60 | 1 | |
| 24 | | AML-M1 | 5,8 | 1,6 | |
| 5 | | AML-M4 | 24 | 2,6 | |
| 8 | | AML-M2 | 4 | 5 | |
| 12 | | AML-M5b | 12 | 15 | |
| 2 | | s-AML | 52 | 30 | |
| 14 | | AML-M1 | 50 | 30 | |
| 4 | | AML-M2 | 30 | 92 | |
| 29 | | ALL | "common"-B-ALL | 75 | 2,2 |
| 27 | | | "common"-B-ALL | 95 | 3,3 |
| 28 | T-ALL | | 25 | 6 | |
| 26 | pre-B-ALL | | 45 | 18 | |
| 30 | "common"-B-ALL | | 95 | 90 | |
| 25 | "common" B-ALL | | 85 | 99 | |



Slika 13: Točkovni histogrami določanja specifičnih antigenov (CD45, CD71, CD90, CD117, CD123, HLA-DR) na LMC (CD34+/CD38- celice) pri AML

Slika 14 prikazuje prisotnost antigenov na LMC pri bolniku z ALL. V tem primeru gre za bolnika, pri katerem so skoraj vse CD34+ celice tudi levkemične matične celice, torej so tudi CD38-.



Slika 14: Točkovni histogrami določanja specifičnih antigenov (CD19, CD33, CD45) na LMC (CD34+/CD38- celice) pri ALL

Rezultate za vse bolnike predstavljata spodnji preglednici. Bolnike smo, kot poprej, razdelili glede na vrsto AL, jih razporedili po skupinah z istimi imunofenotipi in po deležu LMC naraščajoče. Pri zapisu imunofenotipa pri AML smo izpustili CD45, ker je pozitiven pri vseh bolnikih, saj je specifičen celični označevalec vseh levkocitov. Pri ALL pa je naveden pri vsakem vzorcu. Prav tako sta bila pri vseh bolnikih CD34+ in CD38-.

Pri vseh bolnikih z AML (z izjemo enega) je bil celični označevalec CD123 pozitiven. To potrjuje, da so vse celice, ki smo jih zajeli, bile LMC, saj se po podatkih iz literature ta celični označevalec izraža le na teh celicah in ne na normalnih HMC (26). Zato smo ga prav tako izpustili pri zapisu imunofenotipa v preglednici. Izjema je bil bolnika 1 (s-AML), pri katerem je bil CD123 negativen (ostali označevalci: CD90+, HLA-DR+/-, CD117-; CD71 ni bil določen, ker ni bilo protitelesa; ni naveden v preglednici).

Preglednica XI: Prisotnost antigenov na LMC pri bolnikih z akutno mieloično levkemijo (AML)

| BOLNIKI | FAB RAZVRSTITEV | CD34+/CD38- (%) | IMUNOFENOTIP LMC (CD34+/CD38-) | | | |
|---------|------------------|-----------------|--------------------------------|-------|---------|--------|
| | | | CD71- | CD90- | HLA-DR- | CD117- |
| 9 | AML-M1 | 0,2 | CD71- | CD90- | HLA-DR- | CD117- |
| 5 | AML-M4 | 2,6 | | | | |
| 18 | AL mešan fenotip | 0,2 | CD71- | CD90- | HLA-DR+ | CD117- |
| 3 | AML-M1/M2 | 0,4 | | | | |
| 17 | AML-M1 | 0,1 | CD71- | CD90+ | HLA-DR- | CD117- |
| 10 | AML-M5 | 0,3 | | | | |
| 12 | AML-M5b | 15 | | | | |
| 15 | AML-M1 | 1 | CD71+ | CD90- | HLA-DR+ | CD117- |
| 24 | AML-M1 | 1,6 | | | | |
| 4 | AML-M2 | 92 | | | | |
| 23 | AML-M1/M2 | 0,2 | CD71+ | CD90+ | HLA-DR- | CD117- |
| 13 | AML-M1 | 0,3 | | | | |
| 20 | s-AML | 0,8 | | | | |
| 21 | AML-M1/M2 | 0,3 | CD71+ | CD90+ | HLA-DR+ | CD117- |
| 11 | s-AML | 0,7 | | | | |
| 19 | AML-M1 | 0,8 | | | | |
| 7 | AML-M1/M2 | 0,3 | CD71- | CD90- | HLA-DR- | CD117+ |
| 8 | AML-M2 | 5 | CD71- | CD90+ | HLA-DR- | CD117+ |
| 14 | AML-M1 | 30 | CD71- | CD90+ | HLA-DR+ | CD117- |
| 22 | AML-M1 | 0,1 | CD71+ | CD90+ | HLA-DR+ | CD117+ |
| 6 | AML-M5 | 0,2 | CD71+ | CD90- | HLA-DR- | CD117+ |
| 16 | AML-M1 | 0,7 | CD71+ | CD90- | HLA-DR+ | CD117+ |
| 2 | s-AML | 30 | CD71+ | CD90- | HLA-DR- | CD117- |

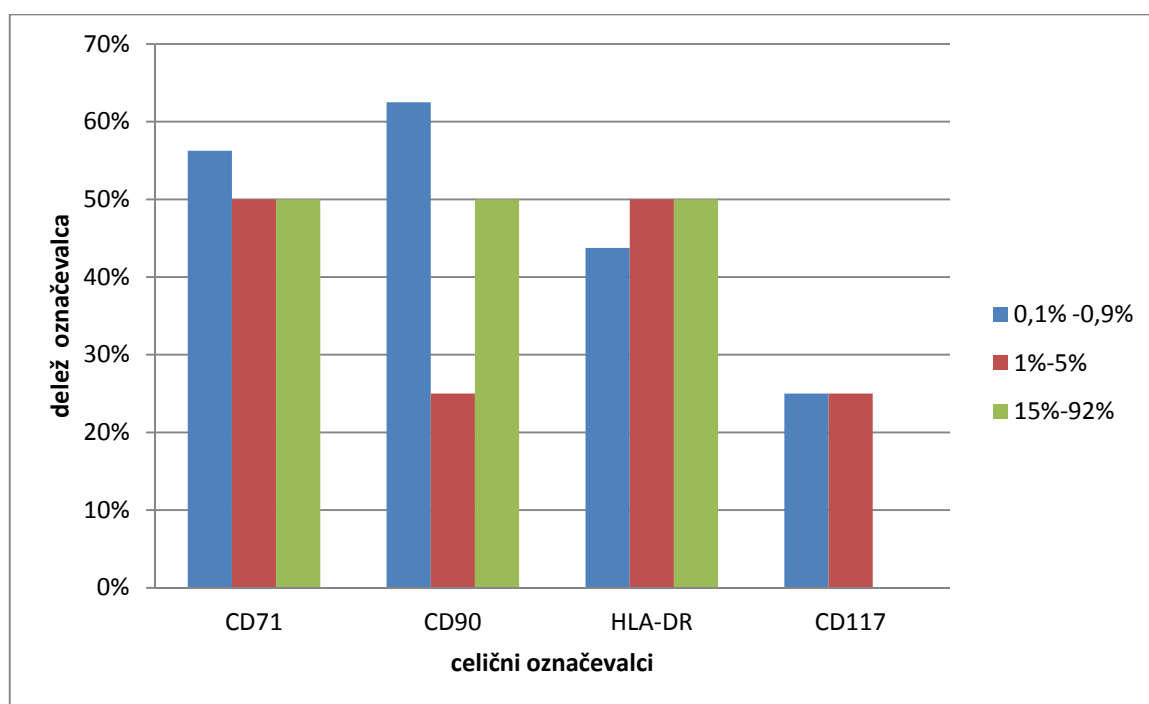
Preglednica XII: Prisotnost antigenov na LMC pri bolnikih z akutno limfatično levkemijo (ALL)

| BOLNIKI | FAB RAZVRSTITEV | CD34+/CD38- (%) | IMUNOFENOTIP LMC (CD34+/CD38-) | | |
|---------|-----------------|-----------------|--------------------------------|---------|-------|
| | | | CD33- | CD19- | CD45+ |
| 26 | pre-B-ALL | 18 | CD33- | CD19- | CD45+ |
| 25 | "common"-B-ALL | 99 | | | |
| 29 | "common"-B-ALL | 2,2 | CD33- | CD19+/- | CD45- |
| 27 | "common"-B-ALL | 3,3 | | | |
| 28 | T-ALL | 6 | CD33+* | CD19- | CD45+ |
| 30 | "common"-B-ALL | 90 | CD33- | CD19+ | CD45- |

(opombe: *- vidni 2 populaciji celic)

Iz podatkov vidimo, da se je določen imunofenotip ponovil pri različnih oblikah AML oz. ALL. Pri AML so imeli štirikrat trije bolniki skupen imunofenotip in prav tako dvakrat dva bolnika. Ostali bolniki (7 od 24-ih) so imeli različne imunofenotipe. Pri ALL sta imela dvakrat dva bolnika skupen imunofenotip.

Skupine z enakim imunofenotipom so zajemale bolnike z različnimi podvrstami AML in različnim deležem LMC od majhnih do velikih vrednosti. Za nekako lažjo interpretacijo imunofenotipov smo naredili graf pojavnosti (*slika 15*) določenega celičnega označevalca pri AML v določenem območju deleža LMC. Bolnike smo razporedili v tri skupine glede na delež LMC.



Slika 15: Delež označevalca pri različnih deležih LMC (modra: 0,1%-0,9% LMC, 16 vzorcev; rdeča: 1%-5% LMC, 4 vzorci; zelena: 15%-92% LMC, 4 vzorci)

CD117 je bil pri velikem deležu LMC (15% do 92%) pri vseh 4-ih bolnikih negativen, pri manjšem deležu LMC (0,1%-0,9% in 1%-5%) pa se je pojavil v 25% (torej je bil pri 60% vseh bolnikov pozitiven). CD90 je bil v najmanjši meri prisoten na LMC v območju od 1-5%, bil pa je prisoten na LMC pri več kot polovici vseh bolnikov z AML. CD71 in HLA-DR sta v enaki meri zastopana pri vseh treh skupinah in sta bila prisotna na LMC približno polovice bolnikov. Po nekaterih podatkih iz literature naj bi LMC pri AML imele zelo nezrel imunofenotip CD34+/CD38-/CD90-/CD71-/HLA-DR-/CD117-/CDC123+. Takšen

specifičen imunofenotip smo dobili le pri dveh od 24-ih bolnikov (bolnik 5 in 9). Obenem pa obstajajo tudi podatki, da je imunofenotip LMC pri nekaterih oblikah levkemij lahko bolj zrel.

Pri ALL sta dva bolnika z isto obliko bolezni (»common«-B-ALL) imela enak imunofenotip LMC in tudi delež LMC je bil podoben. Pri bolniku s T-ALL sta se lepo ločili dve populaciji, kjer je bila ena CD33+ in druga CD33-. Bolnik je imel neznačilno obliko T-ALL, kar je lahko tudi vzrok pojavljanja dveh populacij LMC. Pri bolniku 25 in 26 je bil imunofenotip enak, vendar je bil delež zelo različen (18% in 99%) in tudi podvrsta ALL je bila različna. Tudi tukaj smo v primerjavi s podatki iz literature, kjer je imunofenotip LMC definiran kot CD34+/CD38-/CD33-/CD19-, v večini primerov dobili drugačen, bolj zrel imunofenotip.

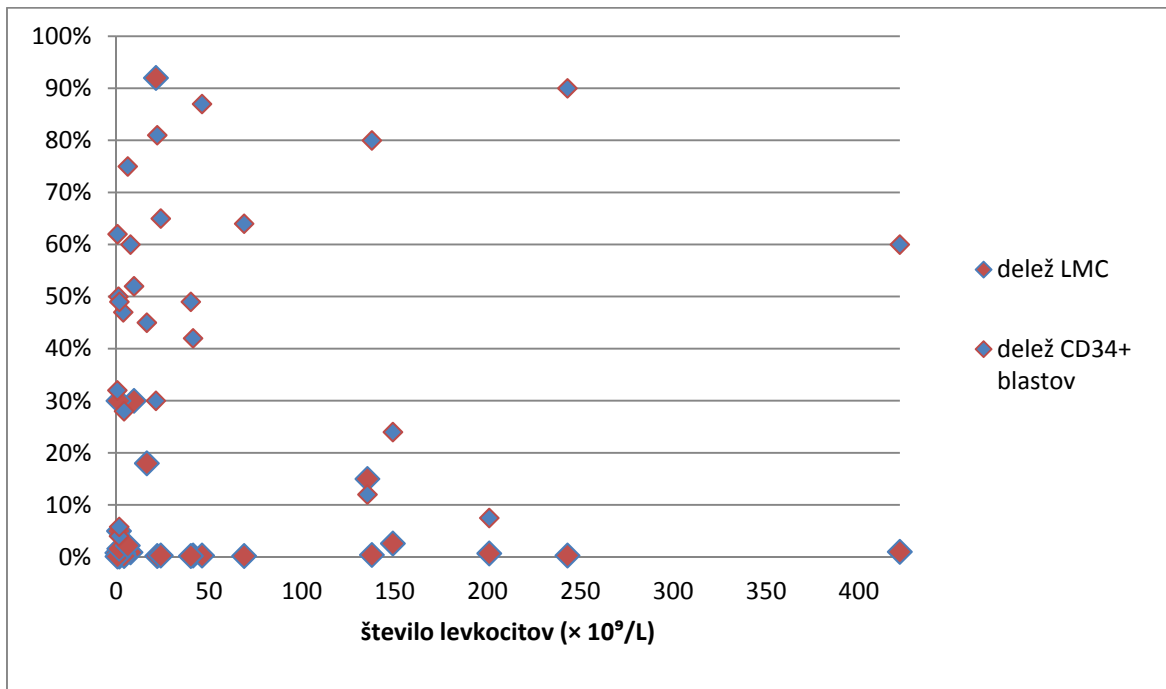
Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da imunofenotip LMC ni odvisen od njihovega deleža niti od podvrste AML oz. ALL. Izjema sta dva primera »common«-B-ALL, vendar gre za zelo majhno število vzorcev. Prišlo je tudi do odstopanj med podatki o imunofenotipu iz literature in našimi določenimi imunofenotipi. Mogoče bi z uporabo kontrolnih protiteles tukaj lahko izboljšali rezultate, saj je bilo pri nekaterih primerih težko določiti, ali je celični označevalec pozitiven ali negativen (npr. bolniki 1, 29, 27).

Velja poudariti, da smo se pri naši zamejitvi osredotočili zgolj na populacijo celic z najbolj značilnim imunofenotipom LMC CD34+/CD38-. V prihodnje pa bi bilo smiselno zamejitev analizirati tudi tako, da bi znotraj te populacije poiskali celice z najbolj primitivnim imunofenotipom (CD90-/HLA-DR-/CD71-/CD117-/CD123+). V ta namen bi bilo potrebno izdelati protokole za naknadno analizo populacij. Dodati pa bi bilo smiselno tudi nove označevalce kot npr. CD44, CD96. Morda bi tako določen delež LMC boljše koreliral tudi z drugimi parametri, s katerimi smo primerjali delež LMC v našem delu.

4.4 UGOTAVLJANJE VPLIVA ŠTEVILA LEVKOCITOV NA DELEŽ LMC

Pogledali smo, ali obstaja kakšna povezava med številom levkocitov (*preglednica V*), določenim v periferni krvi bolnikov ob postavitvi diagnoze, in deležem levkemičnih matičnih celic pri posameznih bolnikih.

Slika 16 prikazuje to povezavo, ki je, kot je razvidno, slaba. Načeloma so pri številu levkocitov do $100 \times 10^9/L$ deleži LMC lahko majhni ali veliki. Pri številu levkocitov $> 100 \times 10^9/L$ pa so deleži LMC večinoma mali. V graf smo dodali še podatke o deležu CD34+ blastov. Tudi iz teh vidimo, da je povezava s številom levkocitov slaba.

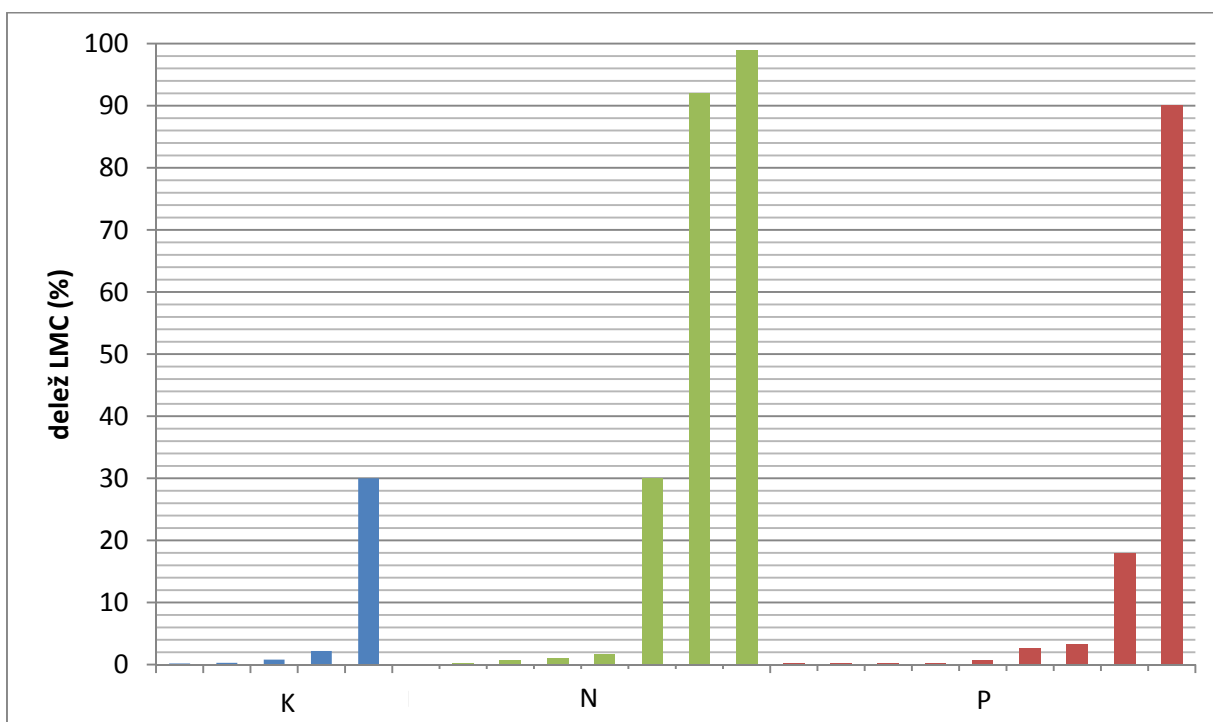


Preglednica XIII: Citogenetske in molekularno-genetske spremembe pomembne za napoved poteka bolezni pri obravnavanih bolnikih

| BOLNIKI | STANDARDNA CITOGENETIKA | NAPOVEDNI POMEN | FISH | MOLEKULARNA GENETIKA | | | CD34+/CD38- (%) |
|---------|----------------------------|--------------------|--|-------------------------|------|------|--------------------|
| | | | | WT1 | FLT3 | NPM1 | |
| 27 | P | ugoden | 94% +21 | / | / | / | 3,3 |
| 26 | P | ugoden | 74% celic s pomnoženimi signali BCR, ABL1, MLL | 283,73 | / | / | 18 |
| 17 | S | vmesen | 30% +13 | / | / | / | 0,1 |
| 22 | N | vmesen | / | 274,8 | / | / | 0,1 |
| 21 | N | vmesen | / | 53,47 | - | - | 0,3 |
| 16 | N | vmesen | / | 25,72 | - | - | 0,7 |
| 24 | N | vmesen | / | 2,56 | - | - | 1,6 |
| 14 | N | vmesen | / | 123,73 | - | - | 30 |
| 30 | P | vmesen | 15% t(12;17) | / | / | / | 90 |
| 25 | N | vmesen | 58% +21 | / | / | / | 99 |
| 6 | K | neugoden | 96% del (5q), 67% del (7q), 22% -7 | 88,07 | - | - | 0,2 |
| 9 | P | neugoden | 93% +11 | / | / | / | 0,2 |
| 18 | P (t(9;22)) | neugoden | 34%+ BCR/ABL1 | 4,48 | / | / | 0,2 |
| 23 | P | neugoden | 51% +8 | 92,06 | / | / | 0,2 |
| 7 | K | neugoden | 88% -7 | 0,63 | - | - | 0,3 |
| 13 | P | neugoden | 85% +11 | 126,34 | + | - | 0,3 |
| 11 | P (-7) | neugoden | / | 35,21 | - | - | 0,7 |
| 19 | K | neugoden | / | / | / | / | 0,8 |
| 15 | N | neugoden | / | 76,85 | + | - | 1 |
| 29 | K | neugoden | 88% celic 1 signal za BCR | 59,77 | - | - | 2,2 |
| 5 | P | neugoden | 18% +8 | 89,37 | + | - | 2,6 |
| 2 | K | neugoden | / | / | / | / | 30 |
| 4 | N | neugoden | / | 411,39 | + | + | 92 |

(Legenda: **N**- normalen kariotip, **K**- kompleksno preurejen kariotip, **P**- ponavljajoče kromosomske spremembe, **S**- preurejen kariotip, FISH- fluorescenčna *in-situ* hibridizacija, *WT1*- Wilms-tumor gen, *FLT3*- »FMS like« tirozin kinaza, *NPM1*- nukleofozmin, /- ni podatka, del - delecija, q- dolgi krak kromosoma, + - dodaten kromosom, - - manjkajoči kromosom, t- translokacija)

Slika 17 prikazuje povezavo med izsledki standardne citogenetike in deležem levkemičnih matičnih celic. Vrednosti so predstavljene po skupinah za posamezen kariotip. Pri vseh oblikah kariotipa so prisotni veliki in majhni deleži LMC.

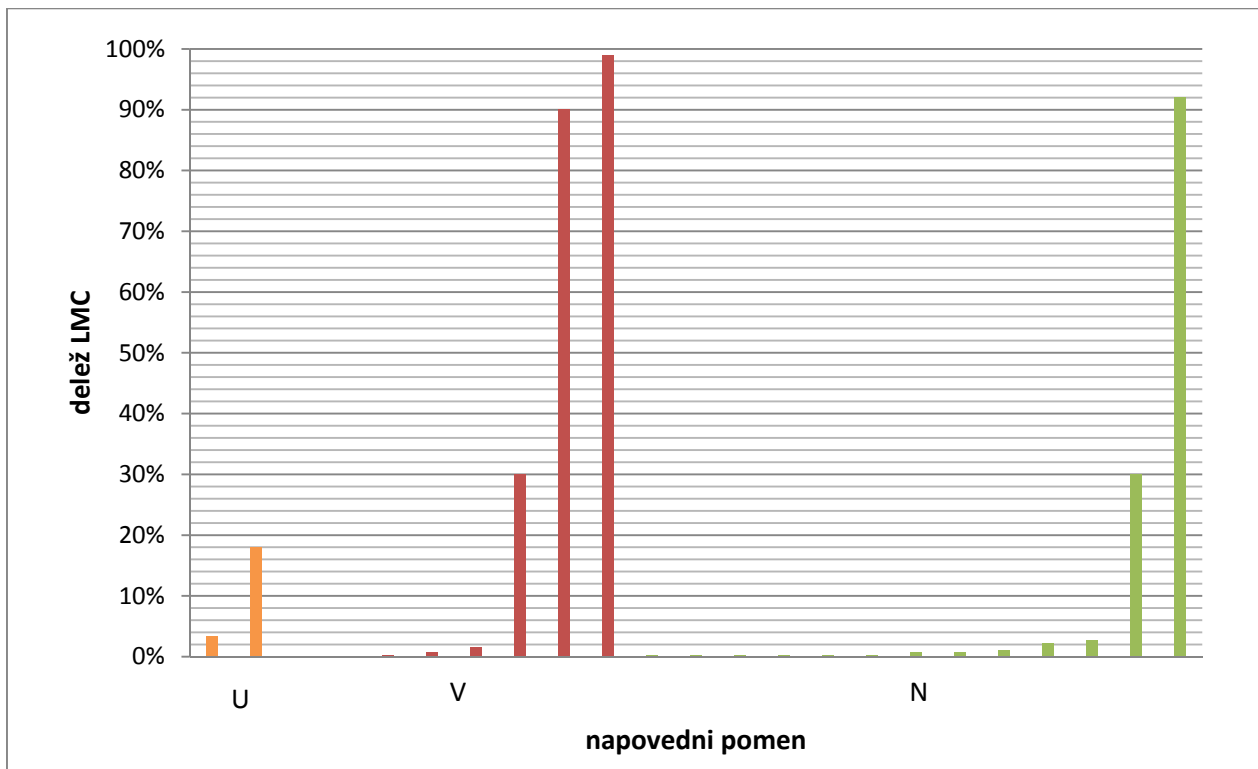


Slika 17: Odvisnost deleža LMC od kariotipa bolnikov (N- normalen kariotip, K- kompleksno preurejen kariotip, P- ponavljajoče kromosomske spremembe)

Najboljša povezava z deležem LMC je vidna pri skupini bolnikov s kompleksnim kariotipom (K), kjer je pri 4-ih od 5-ih bolnikov delež LMC od 0,2-2,2%. Eden ima večjo vrednost (30%). Pri bolnikih z normalnim kariotipom (N) je viden največji razpon v deležu LMC. 5 od 8-ih bolnikov je imelo delež LMC majhen (0,1-1,6%), pri treh pa so bili deleži veliki (30-99%). Največ bolnikov je bilo v skupini s ponavljajočimi kromosomskimi spremembami (P). Pri 7-ih od 9-ih bolnikov je bil delež LMC majhen, in sicer od 0,2-3,3%, pri dveh bolnikih pa večji (18% in 90%). S preurejenim kariotipom (S; ni prikazan na grafu) smo imeli enega bolnika, pri katerem je bil delež LMC 0,1%.

Pogledali smo tudi kakšna je povezava med napovednim pomenom in deležem LMC. Iz slike 18 je razvidno, da smo imeli največ bolnikov z neugodnim napovednim pomenom (N), pri katerih po velikem deležu LMC odstopata le dva primera (30%, 92%). Pri večini

bolnikov (11 od 13-ih) z neugodnim napovednim pomenom je delež LMC majhen (0,2-2,6%).

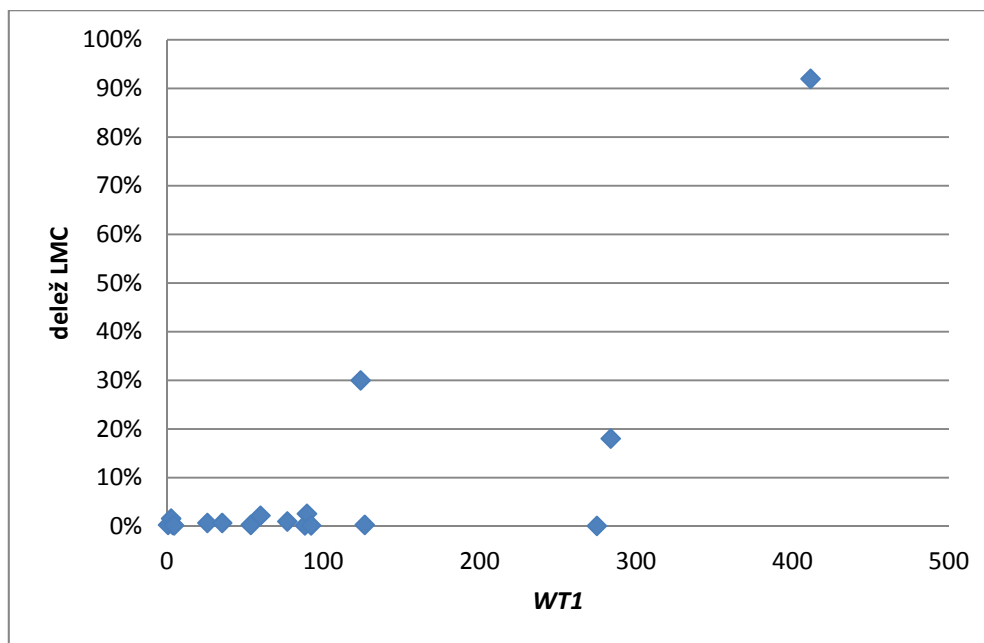


Slika 18: Odvisnost deleža LMC od napovednega pomena (U- ugoden, V- vmesen, N- neugoden)

V skupini z vmesnim napovednim pomenom smo imeli 8 bolnikov, od katerih jih je 5 imelo majhen delež LMC (0,1-1,6%), trije pa velikega (30-99%). Pri dveh bolnikih z ugodnim napovednim pomenom je bil delež LMC 3,30% in 18%. Iz teh podatkov lahko sklepamo, da bo pri neugodnem napovednem pomenu delež LMC po večji verjetnosti majhen, medtem ko bi pri vmesnem in ugodnem napovednem pomenu lahko bil delež velik ali majhen. Rezultati so v nasprotju s pričakovanji, saj bi sklepali, da bi pri neugodnem napovednem pomenu lahko bili deleži LMC večji. Torej iz samega napovednega pomena bolezni na podlagi citogenetskih in molekularno genetskih podatkov ne moremo sklepati o deležu LMC, saj je ta lahko zelo različen pri posamezniku ne glede na napovedni pomen.

Naprej smo pogledali tudi, če obstaja kakšna zveza med molekularno-genetskimi podatki iz rutinske preiskave in deležem LMC. Slika 19 prikazuje povezavo med deležem LMC in izražanjem gena *WT1* (tumorski faktor). Iz grafa je razvidno, da pri vrednostih *WT1* do 100

pri nobenem od bolnikov nismo določili več kot 3 odstotke LMC. Pri večjih vrednostih *WT1* pa smo pri treh od petih bolnikov določili tudi velik delež LMC.



Slika 19: Odvisnost deleža LMC od *WT1*

Praviloma velja, da je večja vrednost *WT1* znak napredovale bolezni. Naši rezultati pa kažejo, da je pri velikih vrednostih *WT1* pri bolnikih tudi delež levkemičnih matičnih celic večji, kar se je izkazalo pri treh izmed petih bolnikov z vrednostjo *WT1* nad 100.

Mutaciji genov *FLT3* in *NPM1* sta pomembna napovedna dejavnika pri bolnikih z normalnim kariotipom. Pozitivne oz. negativne vrednosti pomenijo prisotnost ali odsotnost mutacije v posameznem genu (*FLT3*, *NPM1*). Prisotnost mutacije *FLT3*-ITD pomeni slabo napoved za bolnika, izolirana mutacija *NPM1* pa ugodno. Če je prisotna mutacija *FLT3*-ITD, tudi mutacija *NPM1* ne spremeni neugodne napovedi poteka. Mutacija gena *NPM1* je bila določena le pri enem bolniku. Mutacija v genu *FLT3* je bila prisotna pri 4-ih od 13-ih bolnikov, kjer je bila narejena diagnostika. To ustreza deležem LMC 0,3%, 1%, 2,60% in 92%. V prvih treh primerih je delež LMC majhen in ni opazne razlike med deležem LMC pri bolnikih, kjer mutacija ni prisotna (deleži od 0,3%-30%). Edini vzorec bolnika, ki vidno odstopa od teh podatkov, je bolnik 4. Pri njem sta prisotni obe mutaciji, tako *FLT3* kot *NPM1* in tudi delež LMC je največji (92%). Pri tem bolniku je tudi izražanje *WT1* največje (411,39). Samo na podlagi tega primera ne moremo sklepati o statistično pomembni povezavi z deležem LMC.

4.6 SPREMLJANJE TRENUTNEGA IZIDA ZDRAVLJENJA PRI OBRAVNAVANIH BOLNIKI

Po približno pol leta od postavitve diagnoze smo preverili zdravstveno stanje bolnikov po terapiji. Podatke, ki so nam bili na voljo, predstavlja spodnja preglednica.

Preglednica XIV: Trenuten izid zdravljenja pri bolnikih z akutno levkemijo

| BOLNIKI | STAROST (let) | FAB RAZVRSTITEV | CD34+/CD38- (%) | TRENUTEN IZID ZDRAVLJENJA |
|---------|---------------|------------------|-----------------|--|
| 17 | 79 | AML-M1 | 0,1 | simptomatsko zdravljenje, smrt |
| 22 | 62 | AML-M1 | 0,1 | umrla |
| 6 | 73 | AML-M5 | 0,2 | umrla |
| 11 | 69 | s-AML | 0,7 | umrl |
| 15 | 47 | AML-M1 | 1 | umrla |
| 29 | 62 | "common"-B-ALL | 2,2 | smrt po presaditvi KMC |
| 5 | 45 | AML-M4 | 2,6 | brez remisije, smrt po presaditvi KMC |
| 26 | 72 | pre-B-ALL | 18 | rezistentna levkemija, umrla |
| 2 | 54 | s-AML | 30 | ni dosežena popolna remisija, ponovna pojavitev bolezni po 6m, rezistenca na zdravljenje, smrt |
| 4 | 48 | AML-M2 | 92 | ni dosežena popolna remisija, napredovanje bolezni po 6 m, rezistenca na zdravljenje, smrt |
| 23 | 62 | AML-M1/M2 | 0,2 | primarna rezistenca |
| 7 | 61 | AML-M1/M2 | 0,3 | rezistentna levkemija, simptomatsko zdravljenje |
| 1 | 81 | s-AML | 0,9 | simptomatsko zdravljenje |
| 18 | 49 | AL mešan fenotip | 0,2 | remisija po alogenični presaditvi KMC |
| 10 | 62 | AML-M5 | 0,3 | remisija |
| 21 | 61 | AML-M1/M2 | 0,3 | remisija |
| 16 | 71 | AML-M1 | 0,7 | remisija |
| 24 | 62 | AML-M1 | 1,6 | remisija |
| 14 | 66 | AML-M1 | 30 | remisija |

(Legenda: m- mesec, KMC- krvotvorne matične celice)

10 od 19-ih bolnikov, za katere je znan trenuten izid zdravljenja, je v tem času umrlo. Pri treh od teh je bil vzrok bolezen, rezistentna na zdravljenje (bolezen se ne odziva na zdravljenje). Dva bolnika sta umrla po presaditvi krvotvornih matičnih celic, pri obeh predhodno ni bila dosežena remisija. Pri enem bolniku je bilo zaradi visoke starosti uvedeno samo simptomatsko zdravljenje. Če pogledamo, kakšen je bil delež LMC ob

postavitvi diagnoze, vidimo, da je bil pri 7-ih bolnikih delež majhen (od 0,1%-2,6%). Pri vseh treh bolnikih, kjer je bil vzrok smrti rezistentna levkemija, je bil delež LMC velik (18%, 30% in 92%). Iz tega lahko sklepamo, da velik delež LMC ob postavitvi diagnoze lahko napoveduje potencialno rezistenco na zdravljenje. Vendar imamo tudi tri bolnike (*označeni rumeno*) z rezistentno levkemijo, kjer smo določili majhen delež LMC. Ti bolniki so kljub rezistentni levkemiji še vedno živi. Iz tega lahko sklepamo, da ni nujno, da bo majhen delež LMC napovedal dober odgovor na zdravljenje. Vendar pa bo pri bolnikih z rezistentno levkemijo in večjim deležem LMC verjetno bolezen hitreje napredovala (vsi trije bolniki spadajo v slabšo napovedno skupino). Pri šestih od 19-ih bolnikov je bila dosežena remisija. Pri petih od teh bolnikov je bil delež LMC majhen (0,2%-1,6%), pri enem pa velik (30%).

Pri bolniku 5 smo določili specifičen imunofenotip LMC, katerih delež je bil majhen (2,6%). Pri njem je bila prisotnost tudi mutacija *FLT3-ITD*, kariotip je bil preurejen (prisotna trisomija 18) in vrednost *WT1* je bila dokaj velika (89,37). Izid zdravljenja je bil slab, bolnik je namreč umrl po presaditvi KMC. Tudi pri bolniku 9 smo določili specifičen imunofenotip LMC, katerih delež je bil majhen (0,2%). Prisotna je bila trisomija 11, kar kaže na napovedno neugoden potek bolezni. Nimamo pa podatka o izidu zdravljenja.

V večini preiskovanih primerov velik delež LMC sovпада s slabšo napovedjo poteka bolezni. To je najboljše vidno pri bolniku 4, kjer je bil delež LMC velik (92%), prisotna je bila mutacija *FLT3-ITD* (tudi *NPM1*) in velika začetna vrednost *WT1*. Izid zdravljenja je bil slab in se je končal s smrtjo. Izjema je bila bolnica 14. Pri njej je bil delež LMC velik (30%), *FLT3-ITD* mutacija ni bila prisotna (prav tako tudi ne *NPM1*), začetna vrednost *WT1* pa je bila visoka (123,73). Izid zdravljenja je bil dober, saj je bolnica trenutno v remisiji. Velik delež LMC je torej lahko potencialno povezan s slabšo napovedjo poteka bolezni, posebej ob prisotnosti neugodnih citogenetskih oz. molekularno-genetskih dejavnikov. Vendar je bilo število bolnikov v posameznih napovednih podskupinah premajhno, da bi lahko zanesljivo določili pomen deleža LMC. Potrebno je tudi dodati, da je čas spremljanja bolnikov za obdobje priprave diplomskega dela prekratek in bi ga bilo potrebno za ta namen podaljšati.

5 SKLEPI

- Določili smo deleže levkemičnih matičnih celic (LMC) in njihove imunofenotipske lastnosti. Največ težav se je pojavilo pri analizi rezultatov na pretočnem citometru, zato bi v nadaljnjem razvoju rutinske metode veljalo razmisliti o vključitvi izotipskih kontrol. Menimo, da je bila izbira kombinacije protiteles v posamezni epurveti ustrezna. V vsaki smo imeli kombinacijo protiteles CD34 in CD38, ki nam je omogočila zamejitev populacije CD34+/CD38- za nadaljnjo opredelitev imunofenotipa.
- Ugotovili smo, da delež LMC pri bolniku ni odvisen od števila levkocitov, deleža CD34+ blastov niti od podvrste akutne levkemije. Pri bolnikih z ALL so bili deleži večji kot pri AML, vendar je bilo število bolnikov zelo majhno (6 vzorcev). Tudi pri AML-M2 smo določili večje deleže kot pri drugih oblikah AML, vendar smo določali LMC pri premajhnem številu bolnikov, da bi lahko rezultate statistično ovrednotili.
- Pri imunofenotipu LMC tudi nismo opazili povezave z deležem LMC niti s podvrsto akutne levkemije. Pri ALL se je edina povezava pokazala pri dveh bolnikih s »common«-B-ALL, vendar gre znova za premajhen vzorec.
- Pri določitvi povezave med deležem LMC in pridruženimi citogenetskimi in molekularno-genetskimi nepravilnostmi prav tako nismo našli specifičnih povezav.
- Iz podatkov o trenutnem izidu zdravljenja bolnikov sklepamo, da delež LMC ni zanesljiv pokazatelj napovedi poteka bolezni, saj je bil velik tudi pri enem bolniku, ki je trenutno v remisiji. Sklepamo pa lahko, da velik delež LMC pri rezistentni levkemiji lahko pomeni hitrejše napredovanje bolezni.

6 VIRI

1. Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina. Tretja izdaja. Littera picta, Ljubljana, 2005: 1172-1313.
2. McClatchey D Kenneth: Clinical laboratory medicine. Druga izdaja. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002: 896-915.
3. Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham Edward GD, Green AR: Postgraduate Haematology; Stem cells and haematopoiesis (*Elaine Dzierzak*). Šesta izdaja. Blackwell Publishing Ltd., Rotterdam, 2011: 1-11.
4. Immuneregen Biosciences, Inc. [Elektronski] 2003-2011. [Navedeno: 10. Marec 2011.] <http://www.immuneregen.com/stem-cells.php>.
5. Vardiman WJ, Thiele J, Arber AD, et al.: The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937-951
6. Wikimedia Foundation, Inc. Wikipedia. [Elektronski] [Navedeno: 2. junij 2011.] http://en.wikipedia.org/wiki/Acute_myelogenous_leukemia.
7. Slovak LM, Kopecky JK, Cassileth AP: 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: 4075-4083
8. Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, Kiyoi H, Naoe T: Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia* 2005; 19: 1345-1349
9. Verhaak GW Roel, Goudswaard SC, Van Putten W, et al.: Mutations in nucleophosmin (*NPM1*) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* 2005; 109: 3747-3754
10. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, et al.: Favorable prognostic significance of *CEBPA* mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood* 2002; 100: 2717-2723.

11. Paschka P, Marcucci G, Ruppert SA, et al.: Wilms' Tumor 1 Gene Mutations Independently Predict Poor Outcome in Adults With Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26: 4595-4602
12. Sugiyama Haruo: WT1 (Wilms' Tumor Gene 1): Biology and Cancer Immunotherapy. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2010; 40: 377-387
13. Krause SD, Van Etten AR: Right on target: eradicating leukaemic stem cells. *Trends in Molecular Medicine* 2007; 13: 470-481
14. Dick EJ: Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 2008; 112: 4793-4807
15. Bonnet D, Dick EJ: Human acute leukemia is organized as hierarchy that originates from a primitive haematopoietic cell. *Nature Medicine* 1997; 3: 730-737.
16. Hope JK, Jin L, Dick EJ: Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nature Immunology* 2004; 5: 738-743.
17. Passegue E, Jamieson Catriona HM, Ailles EL, Weissman Irving L: Normal and leukemic haematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *PNAS* 2003; 100: 11842-11849
18. Bonnet D: Normal and leukaemic stem cells. *British Journal of Haematology* 2005; 130: 469-479.
19. Stubbs CM, Armstrong AS: Therapeutic implications of leukemia stem cell development. *Clinical cancer research* 2007; 13: 3439-3442
20. Lane WS, Gilliland DG: Leukemia stem cells. *Seminars in Cancer Biology* 2010; 20: 71-76
21. Jin L, Lee ME, Ramshaw SH, et al.: Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 31-42
22. Luo L, Han CZ: Leukemia stem cells. *International journal of hematology* 2006; 84: 123-127
23. Bapat S: *Cancer Stem Cells; Identification and Targets*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2009: 1-46.

24. Cox CV, Blair A: A primitive cell origin for B-cell precursors ALL? *Stem Cell Reviews* 2005; 1: 189-196.
25. Beckman Coulter. [Elektronski] [Navedeno: 5. marec 2011.]
<http://www.coulterflow.com/CommerceProcessor/Pages/Products/ProductSearch.aspx>.
26. Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, et al.: The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Nature* 2000; 14: 1777-1784
27. Nguyen D, Diamond L, Braylan R: *Flow Cytometry in Hematopathology; A visual approach to data analysis and interpretation*. Druga izdaja. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 2007: 1-12
28. Sack U, Tarnok A, Rothe G: *Cellular Diagnostics; Basic Principles, Methods and Clinical Applications of Flow Cytometry*. Karger, Basel, 2009: 53-88; 107-140
29. Flow Cytometry Core Facility. MRC Clinical Sciences Centre. [Elektronski] 2011. [Navedeno: 7. Marec 2011.] http://flow.csc.mrc.ac.uk/?page_id=5.
30. Invitrogen, Flow Cytometry Introduction. [Elektronski] [Navedeno: 5. februar 2011.]
http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html.
31. Rahman M: Introduction to flow cytometry. [Elektronski] 2006. [Navedeno: 5. februar 2011.] <http://www.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf>.
32. Milek M: *Diagnostična uporaba pretočne citometrije*. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, Vaje iz klinične kemije, 2008.

7 PRILOGA

Preglednica izpisa celotnega izvida kariotipa pri obravnavanih bolnikih

| BOLNIKI | STANDARDNA CITOGENETIKA | FISH | TIP KARIOTIPA |
|---------|--|--|---------------|
| 1 | / | / | / |
| 2 | 47,XX,+8,t(9;22)(q34;q11),i(17)(q10)[17]/48,idem,+der(22)t(9;22)(q34;q11)[3] | / | K |
| 3 | / | / | / |
| 4 | 46,XY[20] | / | N |
| 5 | 47,XY,+8[4]/46,XY[18] | 18% +8 | P |
| 6 | 46,XX,del(4)(q22),del(5)(q22q35),-7,add(13)(q34),+mar[1]/43~44,idem,del(3)(q26),del(4)(q22),del(5)(q22q35),-6,der(7;12)(p10;q10),-19,-21,+2~3mar[cp18]/43,X,-X,i(1)(p10),-2,del(5)(q22q35),del(7)(q21),add(13)(q34),-19[1].nuc ish(EGR1×1,D5S721×2)[192/200],(D7Z1×2,D7S522×1)[134/200],(D7Z1,D7S522)×1[44/200],(MLL×2)[200] | 96% del (5q), 67% del (7q), 22% -7 | K |
| 7 | 45,XX,i(17)(q10)[2]/45,idem,-7[13].nuc ish(D7Z1,D7S522)×1[176/200] | 88% -7 | K |
| 8 | / | / | / |
| 9 | 47,XY,+11[1].nuc ish(MLLx3)[186/200] | 93%+11 | P |
| 10 | / | / | / |
| 11 | 45,XY,-7[11]/46,XY[9] | / | P (-7) |
| 12 | / | / | / |
| 13 | 47,XX,+11[19].nuc ish(MLL×3)[170/200] | 85% +11 | P |
| 14 | 46,XX[20].nuc ish(RUNX1T1,MLL,RUNX1)×2[200] | / | N |
| 15 | 46,XX[21].nuc ish(RUNX1T1,MLL,RUNX1)×2[200] | / | N |
| 16 | 46,XX[14] | / | N |
| 17 | 47,XY,+13[6]/45,X,-Y[3]/46,XY[11].nuc ish(RUNX1T1,MLL,RUNX1)×2[200] | 30% +13 | S |
| 18 | 46,XY,t(9;22)(q34;q11)[12]/47,idem,+der(22)t(9;22)(q34;q11)[4]/46,XY[4].nuc ish(BCRx2,ABL 1x3)(BCR con ABL 1x1)[68/200] | 34%+ BCR/ABL1 | P (t(9;22)) |
| 19 | 45,X,-Y,del(4)(q12q25),t(8;21)(q22;q22)[17]/46,XX[3].nuc ish(DXZ1×2,DYZ3×0)[68/200],(DXZ1×1,DYZ3×0)[132/200] | / | K |
| 20 | / | / | / |
| 21 | 46,XX | / | N |

| | | | |
|----|--|--|---|
| 22 | 46,XX[20].nuc ish(MLL×2)(5'MLL con 3'MLL)[200] | / | N |
| 23 | 47,XY,+8[18]/46,XY[2].nuc ish(RUNX1T1×3)[102/200],(MLL)×2(5'MLL con 3'MLL×2)[200],(CBFB×2)(5'CBFB con 3'CBFB×2)[200],(RUNX1×2)[200] | 51% +8 | P |
| 24 | 46, XY | / | N |
| 25 | 46,XY[26].nuc ish(ABL 1,MLL,ETV6,BCR)×2[200],(RUNX1×3)[116/200] | 58% +21 | N |
| 26 | 53~57,XX,+1,+6,+7,+9,+hsr(11)(q23),+der(11)(?),-14,der(19)add(19)(p13),+der(21)del(21)(q22),+22,+1~4mar[cp14]/47~51,idem,-5[3]/46,XX[4].nuc ish(ABL 1,BCR)×3[148/200],(amp(MLL))[148/200],(D5S721,EGR1)×1[50/200] | 74% celic s pomnoženimi signali BCR, ABL1, MLL | P |
| 27 | 55,XX,+X,der(1)dup(1)(q21q32),+6,+8,+10,+16,+18,+21,+21,+mar[18].nuc ish(ABL 1,MLL,ETV6,BCR)×2[200],(RUNX1×4)[188/200] | 94% +21 | P |
| 28 | / | / | / |
| 29 | 35,X,-Y,der(1)t(1;17)(p36;q21),-2,-3,del(6)(q21),-7,-12,-13,dic(13;22)(q21;q11),-14,-15,-16,-17,der(17)t(?;17)(?;q21),-18,-21,-22,+der(?)t(?;13)(?;13),+mar1,+mar2[15]/46,XY[7]. ish der(1)(WCP17+),der(?)t(WCP13+),dic(13;22)(WCP13+;WCP22+) nuc ish(BCR×1)[176/200] | 88% celic 1 signal za BCR | K |
| 30 | 46,XY,t(12;17)(p13;q11)[3]/46,XY[17].nuc ish(ABL 1,MLL,ETV6,RUNX1,BCR)×2[200] | 15% t(12;17) | P |