

Laboratorinė medicina.  
2021, t. 23, Nr. 4(90), p. 187–197.

# Ūminėmis mieloidinėmis leukemijomis sergančių pacientų blastų biožymenų raiškos ypatumai

**Benas Matuzevičius<sup>1</sup>**  
**Gabrielė Jonauskaitė<sup>1</sup>**  
**Vytautas Janulis<sup>1</sup>**  
**Dovilė Karčiauskaitė<sup>2,3</sup>**  
**Mindaugas Stoškus<sup>4</sup>**  
**Mantas Radzevičius<sup>2,3</sup>**  
**Aušra Janiulionienė<sup>3</sup>**  
**Rėda Matuzevičienė<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>Vilniaus universiteto  
Medicinos fakultetas  
Faculty of Medicine, Vilnius University  
El. paštas:  
benas.matuzevicius@mf.stud.vu.lt

<sup>2</sup>Vilniaus universiteto Medicinos  
fakulteto Biomedicinos mokslų instituto  
Fiziologijos, biochemijos,  
mikrobiologijos ir laboratorinės  
medicinos katedra  
Department of Physiology,  
Biochemistry, Microbiology  
and Laboratory Medicine, Institute  
of Biomedical Sciences, Faculty  
of Medicine, Vilnius University

<sup>3</sup>Vilniaus universiteto ligoninės  
Santaros klinikų Laboratorinės  
medicinos centras  
Vilnius University Hospital Santaros  
Klinikos, Centre of Laboratory  
Medicine

<sup>4</sup>Vilniaus universiteto ligoninės  
Santaros klinikų Hematologijos,  
onkologijos ir transfuziologijos centras  
Hematology, Oncology and Transfusion  
Medicine Centre, Vilnius University  
Hospital Santaros Klinikos

## Santrauka

**Įvadas.** Ūminė mieloidinė leukemija (ŪML) – didelė grupė hematoonkologinių ligų, kurias vienija intensyvi nediferencijuotų mieloidinės kilmės kraujodaros ląstelių (blastų) proliferacija, jų kaupimasis ir infiltracija kaulų čiulpuose bei kituose organuose. Sutrikusi kaulų čiulpų veikla pasireiškia įvairių citopenijų išsivystymu. Trečdalį visų leukemijos atvejų sudaranti ŪML susijusi su 40 % mirčių nuo leukemijų. Vis daugiau dėmesio diagnozuojant ligą skiriama genetiniams tyrimams, naudojama Pasaulio sveikatos organizacijos pasiūlyta klasifikacija, kurioje apibendrintos turimos žinios apie blastų morfologiją, jiems būdingus citogenetinius ar molekulinis genetinius pakitimus bei blastų imunofenotipinius žymenis. Klasifikacijai itin aktualu atrasti naujus žymenis bei jų tarpusavio ekspresijos ypatumus, nes tai gali turėti teigiamą klinikinę, terapijos efektyvumo vertinimo ar prognostinę reikšmę.

**Tyrimo tikslas** – nustatyti ŪML sergančių pacientų blastų imunofenotipinių biožymenų sąryšį su kitų laboratorinei ŪML diagnostikai naudojamų tyrimų duomenimis.

**Tyrimo medžiaga ir metodai.** Buvo surinkti nuasmeninti ūminės mieloidinės leukemijos diagnozę turinčių 95 pacientų duomenys. Šie duomenys buvo panaudoti ieškant sąsajų tarp imunofenotipo duomenų, gautų atlikus tėkmės citometrijos tyrimą, ir kiekybinių kraujo ląstelių rodiklių, genetinių mutacijų bei citomorfologinio tyrimo rezultatų. Pacientai buvo suskirstyti į dvi populiacijas pagal žymens raišką: raiškos nėra (CDX<sup>-</sup>) arba raiška yra (CDX<sup>+</sup>).

**Tyrimo rezultatai.** Hematologinio analizatoriaus pateikti ŪML pacientų kraujo kiekybinės sudėties rodikliai statistiškai reikšmingai susiję su biožymenų raiškos pokyčiais blastuose: leukocitozė ŪML pacientų kraujyje su CD14<sup>+</sup>, CD15<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>, CD99<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>; limfocitozė ŪML pacientų kraujyje su CD36<sup>+</sup> ir CD133<sup>+</sup>, limfopenija – su CD99<sup>-</sup>, CD117<sup>-</sup>; monocitozė ŪML pacientų kraujyje su CD7<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD15<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD36<sup>+</sup>, CD96<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>, CD113<sup>+</sup>; bazofilija ŪML pacientų kraujyje su CD14<sup>+</sup>.

Atliekant citomorfologinį tyrimą randamas citoplazmos grūdėtumas statistiškai reikšmingai susijęs su CD11a<sup>+</sup> ir CD117<sup>+</sup>. Nustatyta, kad ŪML pacientams rastos genetinės mutacijos turi statistiškai reikšmingas sąsajas su tam tikra biožymenų raiška: *FLT3* geno mutacija – su CD11b<sup>+</sup>, CD36<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>; *NPM1* geno mutacija – su CD14<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>; *TP53* geno mutacija – su CD33<sup>+</sup>; *IDH1* geno mutacija – su CD11b<sup>-</sup>, CD15<sup>-</sup>, CD96<sup>-</sup>; *IDH2* geno mutacija – su CD64<sup>-</sup>, ŽLA-DR<sup>-</sup>; *CEBPA* geno mutacija – su CD64<sup>+</sup> ir CD96<sup>+</sup>.

**Išvados.** Atlikto tyrimo rezultatai leidžia daryti išvadą, kad ŪML pacientų kraujo kiekybinės sudėties rodikliai, citomorfologiniu tyrimu nustatomas citoplazmos grūdėtumas bei įvairių genų mutacijos yra statistiškai reikšmingai susiję su biožymenų raiška ŪML blastuose.

**Reikšminiai žodžiai:** ŪML, *FLT3*, citoplazmos grūdėtumas, mutacija, kaulų čiulpų vėžys.

## ĮVADAS

Ūminė mieloidinė leukemija (ŪML) – didelė grupė hematologinių ligų, kurias vienija nediferencijuotų mieloidinės kilmės kraujodaros ląstelių (blastų) kaupimasis kaulų čiulpuose ir kitų organų infiltracija. Blastų infiltruoti kaulų čiulpai pakeičia normalią hemopoezės eigą ir lemia įvairių citopenijų išsivystymą [1, 2]. Apytiksliai trečdali visų leukemijų atvejų sudaranti ŪML susijusi su 40 % mirčių nuo leukemijų – tai didžiausiu mirtingumu pasižyminti leukeminė liga [3]. Be to, ŪML yra pati dažniausia suaugusiesiems (diagnozės mediana 68 metai) nustatoma ūmaus tipo kraujo onkologinė liga, sudaranti ~80 % visų ūminių leukemijų atvejų [4]. Savo prigimtimi itin heterogeniška ligų grupė, atsižvelgiant į blastų morfologiją, nuo 1976 m. skirstoma į aštuonis tipus (M0-M7) pagal FAB (angl. *French-American-British*) klasifikaciją, tačiau vis didesnę dėmesį ligos diagnostikoje kreipiant į genetinius tyrimus naudojama ir 2001 m. Pasaulio sveikatos organizacijos pasiūlyta ir 2008 m. papildyta klasifikacija, kurioje kartu sujungtos turimos žinios apie blastų morfologiją bei jiems būdingus citogenetinius, imunofenotipavimo, molekulinis genetinius pakitimus, išskirtos 6 pagrindinės ligos kategorijos [5].

Siekiant tinkamai identifikuoti ŪML susirgimus ir paskirti kuo specifiskesnį ir efektyvesnį gydymą, ligai diagnozuoti taikomas platus spektras laboratorinių tyrimų: automatizuotas hematologinis kraujo tyrimas, citomorfologinė periferinio kraujo ar kaulų čiulpų analizė, ląstelių imunofenotipą pagal paviršiaus ar citoplazminius žymenis nustatanti tėkmės citometrija bei citogenetiniai ir molekuliniai genetiniai tyrimai.

ŪML diagnostikoje plačiai naudojamas tėkmės citometrija paremtas blastų imunofenotipavimas, atliekamas tuomet, kai periferiniame kraujyje arba kaulų čiulpuose randama 20 % mieloidinės kilmės blastų. Nemėnas iššūkis atliekant imunofenotipinę analizę kyla sudarant biožymenų rinkinį, kuris padėtų nustatyti ne tik

piktybinių ląstelių potipį, brandumą, tačiau ir galimus blastų biožymenų fenotipo variantus, susijusius su prastesne ar palankesne ligos baigtimi, sudarytų galimybes vertinti skiriamo gydymo efektyvumą. Siekiant integruoti ŪML diagnostikai taikomų laboratorinių tyrimų informaciją, šiame darbe atlikta statistinė blastų biožymenų raiškos analizė, kurios metu imunofenotipavimo tyrimų duomenys palyginti su kraujo ląstelių (leukocitų, neutrofilų, limfocitų, monocitų, eozinofilų, bazofilų, trombocitų) bei hemoglobino kiekio pokyčiais, citomorfologinio (Auerio lazdelių, citoplazmos grūdėtumo) bei genetinio tyrimų radiniais (mutacijų *FLT3*, *NPM1*, *TP53*, *IDH1*, *IDH2* ir *CEBPA* genuose). Palyginti 22-iejų biožymenų (CD4, CD7, CD11a, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33, CD34, CD36, CD38, CD56, CD64, CD96, CD99, CD117, CD123, CD133, ŽLA-DR, NG2, cMPO ir TdT) raiškos duomenys, pacientus skirstant į dvi populiacijas pagal žymens raišką: raiškos nėra (CDX<sup>-</sup>) arba raiška yra (CDX<sup>+</sup>).

## DARBO TIKSLAS

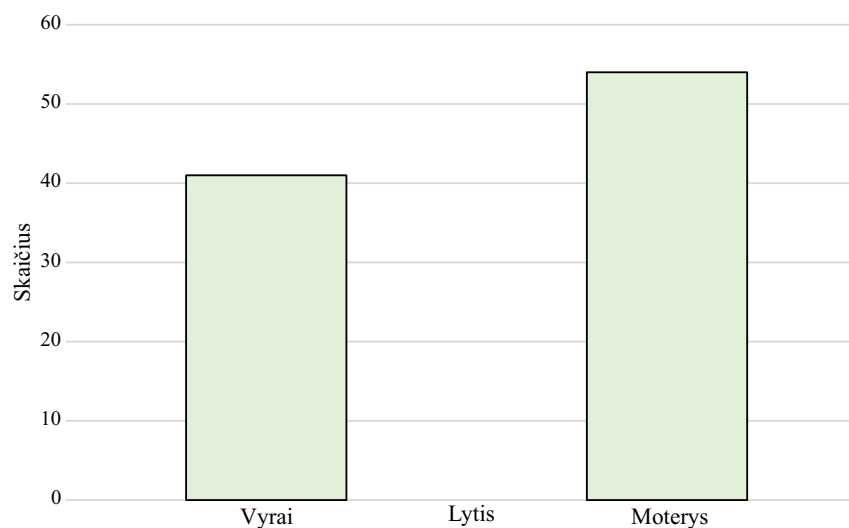
Nustatyti ūminės mieloidinės leukemijos diagnozę turinčių pacientų blastų imunofenotipo sąryšį su kraujo kiekybinės sudėties rodikliais, molekuli-

nių genetinių tyrimų rezultatais bei citomorfologinio tyrimo metu pastebėtomis ŪML blastų morfologinėmis ypatybėmis.

## TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

Tyrimas atliktas Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro (VUL SK LMC) Hematologijos ir bendrosios citologijos laboratorijoje. Tyrimo tikslui įgyvendinti nuo 2019 m. rugsėjo iki 2020 m. gruodžio rinkti nuasmeninti ūminė mieloidinė leukemija sergančių pacientų duomenys apie automatizuoto bendro hematologinio, citomorfologinio kaulų čiulpų ir blastų biožymenų imunofenotipavimo tyrimų rezultatus. Kartu su laboratorijoje atliktų tyrimų rezultatų duomenimis retrospektyviai surinkta informacija apie šių pacientų citogenetinių ir molekulinų genetinių tyrimų rezultatus. Tiriamųjų grupę sudarė 95 asmenys, kuriems atlikus visus reikiamus tyrimus patvirtinta ūminė mieloidinė leukemija. Iš 95 imties pacientų 56,8 % sudarė moterys (n = 54) ir 43,2 % vyrai (n = 41). Tiriamosios imties (n = 95) amžiaus vidurkis – 66,51 ± 1,69 metų (1 pav.).

Pacientų kraujo tyrimai atlikti hematologiniu analizatoriumi „Sysmex



1 pav. Tiriamųjų imtis (amžiaus vidurkis 66,51 ± 1,69 metų)  
Fig. 1. Test subjects (mean age 66.51±1.69)

XE-5000“, o citomorfologinė analizė – šviesiniu mikroskopu „Nikon“ (May-Grünwald, Romanowsky-Giemsa tepinėlio dažymas). Nustatyti pacientų kraujo tyrimų rezultatų nuokrypiai nuo bazinių verčių intervalo, periferiniame kraujyje ar kaulų čiulpuose identifikuoti ŪML būdingi radiniai. Pakitę šių tyrimų rezultatai leido įtarti kraujodaros sistemos sutrikimą, kuris detalčiau ištirtas taikant imunofenotipinę mėginių analizę tėkmės citometru „BD FACSCanto II“.

ŪML blastų imunofenotipinių biožymenų sąryšiui su kiekybinių kraujo ląstelių rodikliais nustatyti panaudoti tyrimo hematologiniu analizatoriumi duomenys. Duomenų analizę atlikta lyginant kraujo ląstelių (bendro leukocitų skaičiaus (WBC), neutrofilų (NEU), limfocitų (LYM), monocitų (MON), eozinofilų (EOS), bazofilų (BAS), trombocitų (PLT) ir hemoglobino (Hgb)) koncentracijos skirtumus grupėse, suformuotose pagal konkretaus imunofenotipinio biožymens (CD4, CD7, CD11a, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33, CD34, CD36, CD38, CD56, CD64, CD96, CD99, CD117, CD123, CD133, ŽLA-DR, NG2, cMPO ir TdT) raišką ar jos nebuvimą. Klinikiniai atvejai suskirstyti į dvi grupes pagal biožymens raišką (raiškos nėra (CDX<sup>-</sup>) / raiška yra (CDX<sup>+</sup>)) ir palyginti taikant parametrinis ir neparametrinius statistinius įrankius.

Imunofenotipinių biožymenų ir genetinių mutacijų sąsajos nustatyti buvo naudojami molekulinis genetinis tyrimų duomenys. Sąryšiui tarp biožymenų raiškos ir ŪML pacientams randamų genų mutacijų (*FLT3*, *NPM1*, *TP53*, *IDH1*, *IDH2* ir *CEBPA*) nustatyti pritaikytas tikslusis Fišerio kriterijus.

Imunofenotipinių biožymenų raiškos ir jos galimų sąsajų su Auerio lazdelėmis ir citoplazmos grūdėtumu nustatyti panaudoti kaulų čiulpų citomorfologinio tyrimo duomenys. Sąryšiui nustatyti pritaikytas tikslusis Fišerio kriterijus.

Duomenų kaupimui ir statistinei analizei atlikti buvo naudojamos Microsoft Office Excel 2019 ir IBM SPSS 24.0 programos. Atsižvelgiant į duomenų tipą, analizę atlikta taikant dvi skirtingas duomenų tarpusavio priklausomumą apibūdinančias statistinės analizės strategijas. Surinktų tolydžių duomenų pasiskirstymo normalumas vertintas naudojant *Shapiro-Wilk* normalumo testą: duomenų pasiskirstymas normalus, jei  $p > 0,05$ , kai pasirinktas patikimumo lygmuo  $\alpha = 0,05$  ( $p > 0,05$ ). Jei *Shapiro-Wilk* normalumo sąlyga tenkinama,

taikomas parametrinis Studento *t* kriterijus (angl. *Student t-test*): skirtumai tarp grupių laikomi statistiškai reikšmingais, kai  $p < 0,05$ . Jei sąlyga netenkinama, taikomas neparametrinis *Mann-Whitney U* testas: skirtumai tarp dviejų grupių dispersijų laikomi statistiškai reikšmingais, jei  $p < 0,05$ . Pagal testo rezultatuose pateiktą *Z* vertę apskaičiuotas efekto dydis  $\eta^2$  rodo statistiškai reikšmingai besiskiriančių kintamųjų ryšio stiprį: silpnas ( $0,01 < \eta^2 < 0,06$ ), vidutinis ( $0,06 < \eta^2 < 0,14$ ), stiprus ( $0,14 < \eta^2 < 1$ ).

Kategorinių dichotominių duomenų analizę atliekama sudarant dviejų požymių dažnių lenteles ( $2 \times 2$ ), kuriose nurodytų požymių tarpusavio nepriklausomumui įvertinti pritaikytas tikslusis Fišerio kriterijus (angl. *Fisher's exact test*): požymiai vienas nuo kito nepriklauso, kai  $p > 0,05$ . Statistiškai reikšmingai besiskiriančių požymių efekto dydis vertinamas pasitelkiant *Phi* koeficientą: sąryšio tarp požymių stiprumas skirstomas į silpną  $|0,1| < |0,3|$ , vidutinį  $|0,3| < |0,5|$  ir stiprų  $|0,5| < |1|$  ir laikomas statistiškai reikšmingu, kai  $p < 0,05$ . Šansų santykis (angl. *Odds ratio*) įvertina santykinį vieno požymio dažnumą kito požymio atžvilgiu. Šansų santykio reikšmės (OR) parodo: požymiai vienas nuo kito nepriklauso (OR = 1), požymiai susiję ir teigiamai veikia kito požymio šansus (OR > 1), požymiai susiję ir neigiamai veikia kito požymio šansus (OR < 1). Šansų santykiui apskaičiuoti, kai vieno iš keturių galimų atvejo variantų dažnis lygus nuliui, pritaikyta *Haldane-Anscombe* korekcija.

## REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

### Leukocitų kiekio sąryšis su biožymenų raiška

Sergant ŪML būdinga leukocitozė, o atliktos analizės rezultatai parodė, kad, priklausomai nuo leukocitozės dydžio, egzistuoja statistiškai reikšmingi biožymenų raiškos skirtumai, rodantys tendenciją turėti teigiamą CD14, CD15, CD64, CD99 ir neigiamą CD117 bei CD133 biožymenų raišką blastuose (2 pav.).

Leukocitų kiekio skirtumas CD14<sup>+</sup> ir CD14<sup>-</sup> pacientų grupėse įvertintas kaip statistiškai reikšmingas, sąryšis tarp tiriamų kintamųjų – vidutinis pagal efekto dydį ( $\eta^2 = 0,0624$ ) (2 pav.). Monocitams būdingo CD14 žymens raiškos teigiama koreliacija leukocitų kiekio atžvilgiu pastebėta ir kitų autorių tyrimuose [6–8], tačiau apie kore-

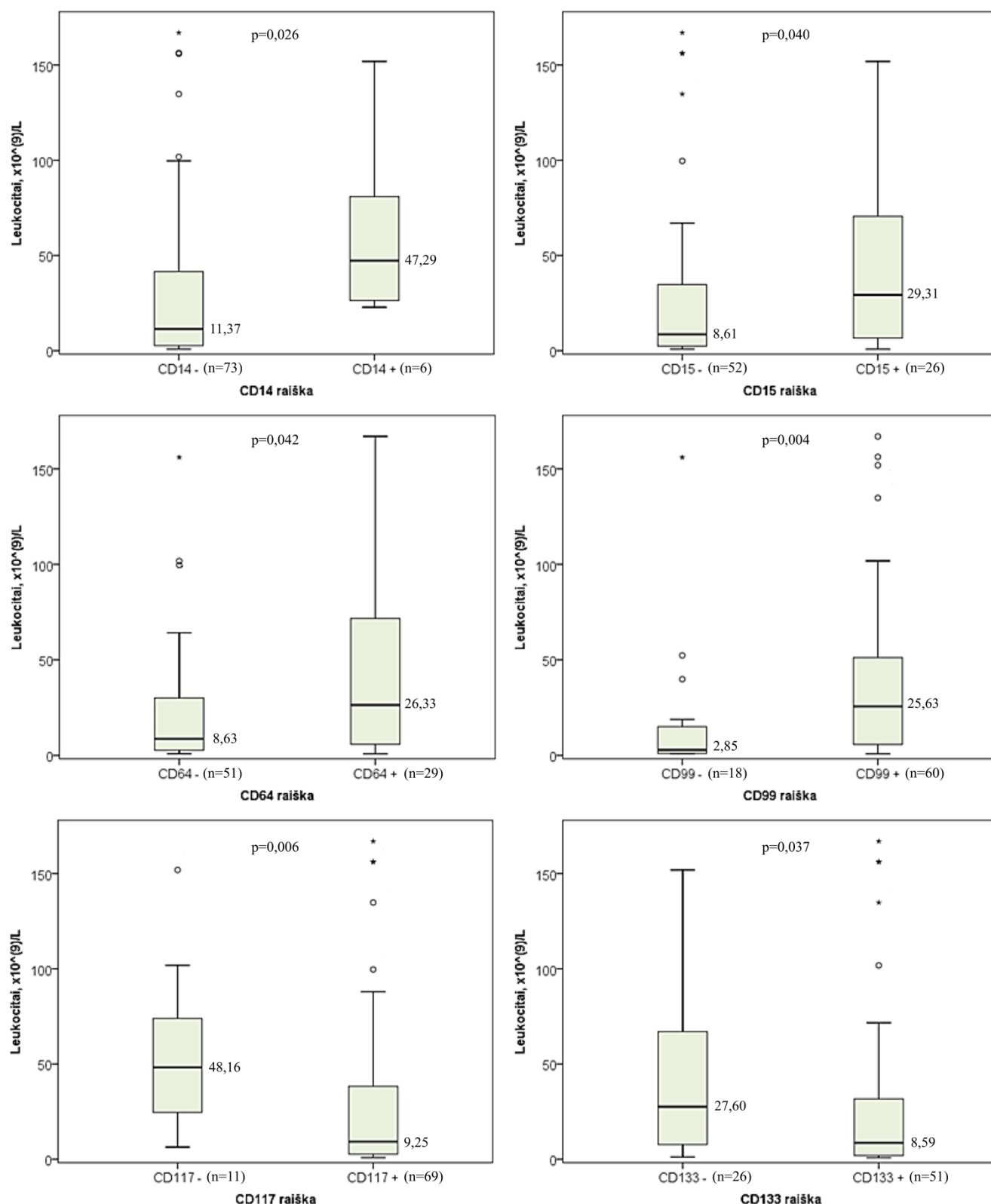
liacijos priežastis medžiagos nedaug. Galimai padidėjusi CD14 raiška nustatoma dėl nepakankamo hematologinio analizatoriaus matavimų specifiškumo – blastai gali būti palaikomi subrendusiais monocitais.

Esant CD15<sup>+</sup> (2 pav.), kraujyje dažniau pastebimas padidėjęs leukocitų kiekis, tačiau efekto dydis (pagal *Mann-Whitney U* testo *Z* reikšmę) rodo silpną kintamųjų sąryšį ( $\eta^2 = 0,0542$ ). Kitų autorių atliktuose publikuotuose tyrimuose pastebėta, kad granulocitų žymens CD15 raiška blastų ląstelėse susijusi su išaugusia leukocitų koncentracija kraujyje tam tikrų leukemijų atvejais [8]. Blastai gali būti palaikomi subrendusiais granulocitais, kas lemtų fiksuojamą padidėjusią leukocitų koncentraciją. CD15 žymens ekspresija siejama su vėžio dauginimusi, plitimu, kas gali lemti aukštesnius leukocitų rodiklius [9].

CD64 raiška gali būti siejama su dideliu leukocitų kiekiu kraujyje (2 pav.). Kintamieji tarpusavyje silpnai susiję ( $\eta^2 = 0,0519$ ). Apie galimą CD64 raiškos ir didelio leukocitų skaičiaus kraujyje sąryšį ŪML atvejais minima ir kituose tyrimuose [10]. Leukemijų atvejais pacientai yra imlesni infekcijoms [11], o tai galbūt paaiškina išaugusį leukocitų skaičių: CD64 receptorius infekcijos metu prisijungia antikūnus, sąveikauja su grandine ir taip aktyvuoja ląstelių imuninį atsaką [12].

CD99<sup>+</sup> ir CD99<sup>-</sup> pacientų grupėse leukocitų kiekis statistiškai reikšmingai skyrėsi ir išryškino didesnio leukocitų kiekio kraujyje tendenciją CD99<sup>+</sup> grupėje (2 pav.). Kintamieji tarpusavyje susiję vidutinio stiprumo ryšiu ( $\eta^2 = 0,1083$ ). Mokslinėse publikacijose leukocitų kiekis dažniau nagrinėjamas CD99 žymens raiškos intensyvumo atžvilgiu, o ne siejant jį su kategorinio fenotipo suskirstymu į CD99<sup>+</sup> ir CD99<sup>-</sup> grupes pagal sutartines ribines fluorescencijos procentines išraiškas. Nepaisant to, pateikta informacija leidžia teigti, kad intensyvi biožymens raiška teigiamai koreliuoja su didesniu nustatomu leukocitų kiekiu ŪML pacientų kraujyje [13]. Intensyvesnė CD99 raiška, tikėtina, padeda ŪML blastams greičiau patekti iš kaulų čiulpų į kraują, nes šis žymuo svarbus leukocitų judėjimui per kapiliarų sienelę normos atveju [14].

Skirtingai nuo prieš tai aprašytų rezultatų, gauti duomenys apie CD117 ir CD133 raišką rodo, kad biožymenų raiška pastebima leukocitų kiekiui esant pamatinių biologinių verčių intervale, o viršijant intervalą nepastebima. Efekto dydis tarp blastų žymenų raiškos ir leukocitų kiekio ro-

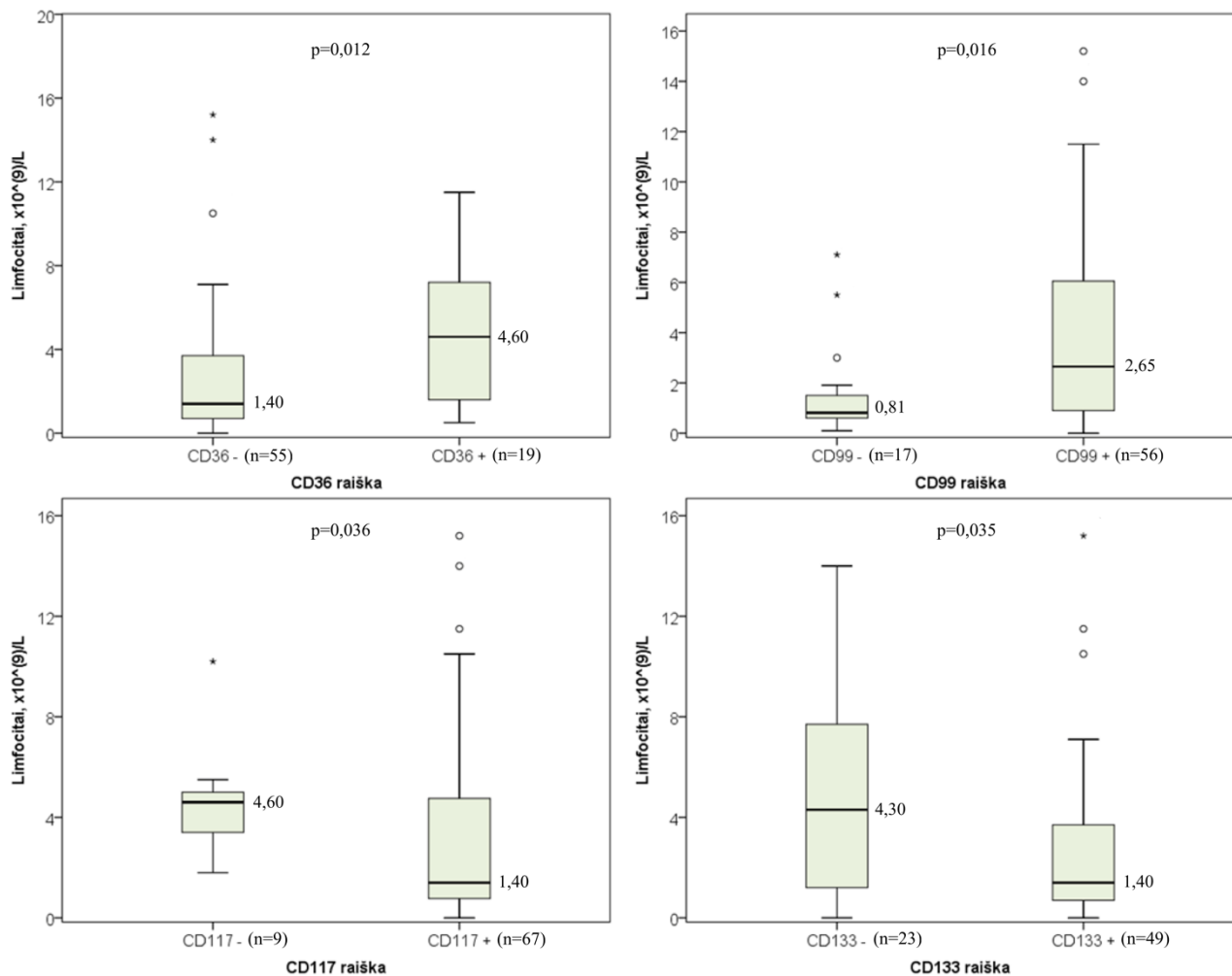


2 pav. Statistiškai reikšmingi leukocitų kiekio skirtumai tarp pacientų grupių su biožymenų CD<sup>+</sup> ir CD<sup>-</sup> raiška  
Fig. 2. Statistically significant differences in leukocyte count between patient groups with CD<sup>+</sup> and CD<sup>-</sup> expression

do vidutinio stiprumo CD117<sup>+</sup> žymens ( $\chi^2 = 0,0942$ ) ir silpną CD133<sup>+</sup> žymens ( $\chi^2 = 0,0567$ ) raiškos tendenciją (2 pav.). Gauti rezultatai apie CD117 raišką sutampa su mokslinių publikacijų tyrimais, kuriuose teigiama, kad mažas leukocitų kiekis ŪML atveju susijęs su teigiama CD117 raiška [10].

Irodyta, kad ŪML blastai stabdo T limfocitų ir NK ląstelių proliferaciją [15]. Galima hipotezė, kad CD117<sup>+</sup> blastai aktyviau nei CD117<sup>-</sup> populiacija sintetina limfocitų ir galbūt kitų kraujo ląstelių proliferacijos inhibicines medžiagas. CD133 raiškos rezultatai nesutampa su kitame tyrime

gautais rezultatais – statistiškai reikšmingų sąryšių tarp žymens ir leukocitų kiekio nenustatyta [16], jų neparodė ir CD133 geno raiškos koreliacijos su leukocitų kiekiu tyrimai [17]. Nevienareikšmiai rezultatai galėjo būti dėl hematologinio analizatoriaus jautrumo.



3 pav. Statistiškai reikšmingi limfocitų kiekio skirtumai tarp pacientų grupių su biožymenų CD<sup>+</sup> ir CD<sup>-</sup> raiška  
Fig. 3. Statistically significant differences in lymphocyte count between patient groups with CD<sup>+</sup> and CD<sup>-</sup> expression

## Limfocitų sąryšis su biožymenimis

Gauti statistiškai reikšmingi skirtumai CD15, CD34, CD36, CD96, CD99, CD117 ir CD133 pacientų grupėse įvertinti atsižvelgus į suaugusiems nustatytą limfocitų kiekio pamatinių biologinių verčių intervalą. Atsižvelgus į gautus rezultatus, išskiriami CD36, CD99, CD117 ir CD133 biožymenys (3 pav.).

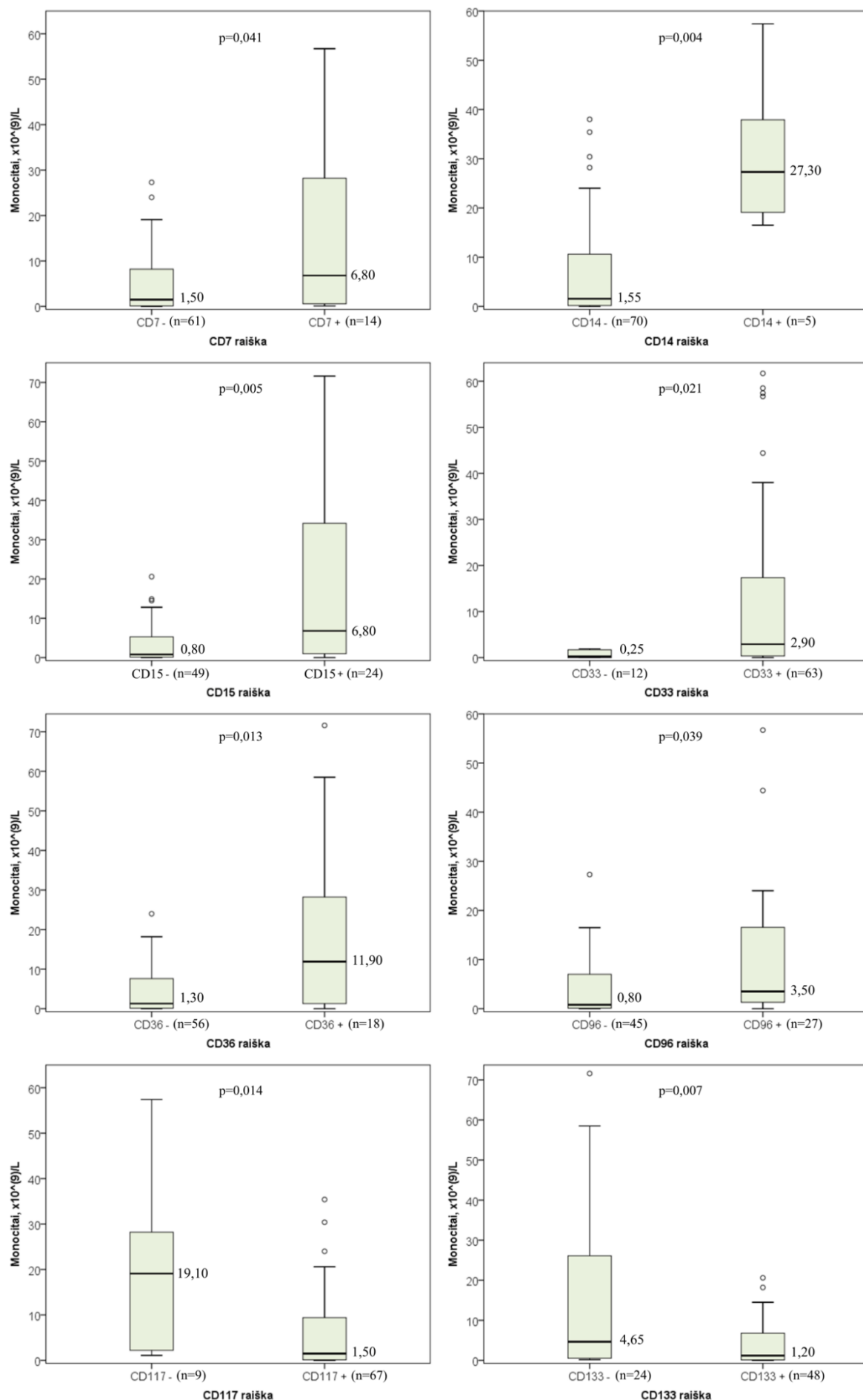
Iš rezultatų matyti, kad CD36<sup>+</sup> blastų ląstelių populiacijai būdingas didesnis limfocitų kiekis kraujyje. Kintamieji tarpusavyje susiję vidutinio stiprumo ryšiu ( $r^2 = 0,0853$ ) (3 pav.). Kitų autorių studijos, analizuojančios, kaip kinta CD36 biožymens raiška priklausomai nuo limfocitozės, taip pat teigia, kad didesnis limfocitų kiekis statistiškai reikšmingai susijęs su teigiama CD36 biožymens raiška [18], tačiau analizuojama lėtinė limfoidinė leukemija, o duomenų apie palyginimus esant ŪML neaptikta. CD36 ekspresuojantys blastai turi didesnę išgyvenamumo galimybę,

nes CD36 yra atsakingas už ilgagrądžių riebalų rūgščių transportą mitochondrijoms energijos gamybai per ląstelės plazminę membraną. Dėl šios priežasties blastai galėtų turėti pakankamai išteklių atitikti hematologinio analizatoriaus limfocitų matmenis [19].

CD99<sup>+</sup> turinčių pacientų limfocitų kiekis yra pamatinių biologinių verčių intervale, o pacientų, turinčių CD99<sup>-</sup>, limfocitų kiekis yra sumažėjęs (3 pav.). Statistiškai reikšmingas skirtumas tarp limfocitų kiekio CD99<sup>+</sup> ir CD99<sup>-</sup> grupėse įvertintas vidutinio stiprumo sąryšiu ( $r^2 = 0,0795$ ). Mokslinėse publikacijose, aptariančiose CD99 raiškos ypatybes, susijusias ne su ŪML, o kitomis onkologinėmis kraujų ligomis, teigiama, kad CD99 raiškos kaulų čiulpu blastuose praradimo priežastis yra susijusi su vėžinių ląstelių siekiu plėsti savo išgyvenamumo galimybę. Pastebėta, kad CD99<sup>-</sup> fenotipo ląstelės būdingas atsparumas citotoksiniams T limfocitams bei apoptozės procesams [20].

CD117<sup>+</sup> blastų populiacijoje pamatinių biologinių verčių intervalą atitinkantis limfocitų kiekis pastebimas, o CD117<sup>-</sup> populiacija susijusi su sumažėjusiu limfocitų kiekiu (3 pav.). Sąryšio efekto dydis ( $r^2 = 0,0579$ ) priklauso silpną ryšį apibūdinančiam intervalui. Nors sąryšis yra statistiškai reikšmingas, klinikinės vertės neturi, nes abi populiacijos beveik vienodai viršija pamatinių biologinių verčių intervalą. Atlikta panaši analizė su lėtine limfoidine leukemija sergančiais pacientais parodė, kad limfocitų kiekis ir CD117 žymens raiška tarpusavyje nekoreliuoja [21].

CD133<sup>+</sup> turinčių pacientų limfocitų kiekis viršija suaugusiems asmenims būdingas pamatinio intervalo vertes, o tendencijos efekto dydis, apskaičiuotas pagal Mann-Whitney U testo rezultatuose pateiktą Z reikšmę ( $r^2 = 0,0618$ ), rodo vidutinio stiprumo sąsają (3 pav.). Kitų autorių publikacijose teigiama, kad CD133 žymuo slopina kamieninių ląstelių diferenciaciją [22], todėl jo raiškos sumažėjimas, tikėtina, paskatina subrendusių limfocitų kiekio padidėjimą.



4 pav. Statistiškai reikšmingi monocitų kiekio skirtumai tarp pacientų grupių su biožymenų CD<sup>+</sup> ir CD<sup>-</sup> raiška  
Fig. 4. Statistically significant differences in monocyte count between patient groups with CD<sup>+</sup> and CD<sup>-</sup> expression

## Monocitų sąryšis su biožymenimis

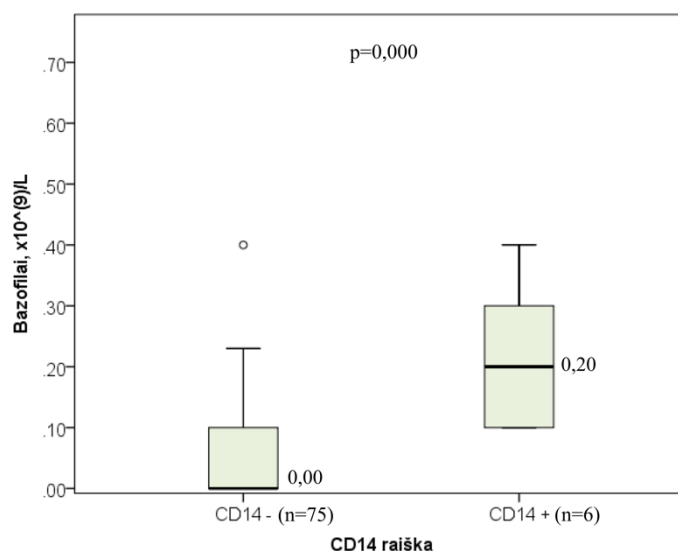
Sergant ŪML monocitų kiekis dažnai padidėja nuo kelių iki keliolikos kartų, palyginti su pamatinių reikšmių intervalu. Gauti rezultatai parodė, kad statistiškai reikšmingai monocitų kiekio kraujyje duomenys skiriasi net 8 iš 22 tirtų biožymenų raiškos grupių: CD7, CD14, CD15, CD33, CD36, CD96, CD117, CD133 (4 pav.).

Remiantis gautais rezultatais galima teigti, kad pamatinių biologinių verčių intervalo normas viršijantys monocitų kiekio kraujyje rodikliai ŪML atveju yra susiję su CD7<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD15<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD36<sup>+</sup>, CD96<sup>+</sup> bei CD117<sup>+</sup> ir CD133<sup>+</sup> (4 pav.). Įvertinus efekto dydį, silpną sąryšį tarp kintamųjų turi CD7 ( $\chi^2 = 0,0549$ ) bei CD96 ( $\chi^2 = 0,0591$ ) žymenys, o vidutinio stiprumo ryšys tarp kintamųjų nustatytas likusiose žymenų grupėse: CD14 ( $\chi^2 = 0,1004$ ), CD15 ( $\chi^2 = 0,1069$ ), CD33 ( $\chi^2 = 0,0710$ ), CD36 ( $\chi^2 = 0,0839$ ), CD117 ( $\chi^2 = 0,0788$ ), CD133 ( $\chi^2 = 0,0998$ ).

Limfocitams būdingo CD7 biožymens aberantinė raiška blastų ląstelėse ŪML atveju – dažnai pasitaikantis reiškinys, ir pastebėta, kad ji smarkiai koreliuoja su blastuose nustatytomis citogenetinėmis anomalijomis sutrikus genetinei reguliacijai [23]. Vertinant visus ŪML atvejus, aptinkama CD14<sup>+</sup> mielomonocitinės diferenciacijos blastų ląstelėse [24]. Išlauges monocitų kiekis galėtų padėti lengviau identifikuoti šią retai ŪML atveju aptinkamą populiaciją. Panaši tendencija, kai išlauges monocitų kiekis kraujyje neatitinka vyraujančio ŪML imunofenotipo, pastebima vertinant granulocitinės diferenciacijos (CD15), mieloidinio kamieno (CD36), leukeminių ląstelių (CD96) ir blastams identifikuoti naudojamų biožymenų (CD117, CD133) raišką. Tikėtina, visų šių žymenų atitinkama raiška padeda išgyventi mielomonocitinės diferenciacijos blastams, kurie citokiniais galėtų palaikyti uždegiminę fazę, naudingą tolesniam ŪML vystymuisi [25].

## Bazofilų kiekio sąryšis su biožymenimis

Atlikus neparimetrinių duomenų pasiskirstymo palyginimą biožymenų raiškos grupėse (CDX<sup>+</sup> ir CDX<sup>-</sup>), nustatyti statistiškai reikšmingi bazofilų kiekio kraujyje skirtumai vertinant CD14, CD36 ir CD117 žymenų raišką, atsižvelgiant į sveikiems suaugusiems individams būdingą bazofilų kiekio kraujyje intervalą.



5 pav. Statistiškai reikšmingi bazofilų kiekio skirtumai tarp pacientų grupių su biožymenų CD14<sup>+</sup> ir CD14<sup>-</sup> raiška

Fig. 5. Statistically significant differences in basophil count between patient groups with CD14<sup>+</sup> and CD14<sup>-</sup> expression

Potencialią klinikinę prasmę turi CD14 žymuo. Nustatyta, kad pacientams, kurių bazofilų kiekis kraujyje viršijo pamatinių verčių intervalo ribas, būdinga CD14<sup>+</sup> žymens raiška ŪML blastuose (5 pav.). Pagal Mann–Whitney U testo pateiktą Z vertę nustatytas stiprus ryšys ( $\chi^2 = 0,1766$ ). Literatūros šaltiniuose minima, kad padidėjęs bazofilų kiekis būdingas esant lėtinei mieloidinei ar ūminei mieloidinei leukemijai, ypač tais atvejais, kai pacientai turi citogenetinių anomalijų [26]. Publikacijų, siejusių bazofilus su CD14 žymens raiška, nerasta. Įrodyta, kad ŪML blastų plitimas indukuoja CD14 ekspresiją [27], todėl koreliacijos priežastis galėjo būti bendras CD14 raiškos padidėjimas dėl blastų ekspansijos.

## Neutrofilų, trombocitų, hemoglobino kiekio sąryšis su biožymenimis

Neutrofilų kiekio kraujyje duomenų pasiskirstymas neišėjo už sveikų suaugusių individų pamatinių reikšmių intervalo, o trombocitų kiekio ir hemoglobino koncentracijos skirtumai pasireiškė dėl ŪML būdingų trombocitopenijos ir anemijos sutrikimų [28]. Dėl šių priežasčių nustatytas statistiškai reikšmingas neutrofilų, trombocitų ir hemoglobino kiekio sąryšis su biožymenimis buvo įvertintas kaip neturintis klinikinės prasmės.

Apibendrinant tyrimo rezultatus išaiškėjo, kad hematologinio analizatoriaus pateikta informacija apie kiekybinę kraujo ląstelių sudėtį gali būti naudojama formuojant biožymenų

rinkinį ūminės mieloidinės leukemijos diagnozei. Palyginus hematologinio analizatoriaus pateiktą rodiklį (leukocitų, limfocitų, monocitų, bazofilų, neutrofilų ir trombocitų skaičiaus bei hemoglobino koncentracijos) ir 22 blastų biožymenų raiškos (CDX<sup>+</sup> ir CDX<sup>-</sup>) grupes nustatyta, kad leukocitų, limfocitų ir monocitų kiekio padidėjimas yra susijęs su CD117<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup> raiška blastuose, limfocitų ir monocitų – su CD36<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>, leukocitų ir bazofilų – su CD14<sup>+</sup>, CD15<sup>+</sup>. Leukocitų kiekio padidėjimas ir limfocitų kiekio sumažėjimas susijęs su CD99<sup>+</sup> raiška blastuose. Tik leukocitų kiekio padidėjimas susijęs su CD64<sup>+</sup>, tik monocitų – su CD7<sup>+</sup>, CD96<sup>+</sup>. Kita vertus, biožymenų sąsajos su neutrofilų ir trombocitų kiekiu bei hemoglobino koncentracija analizės rezultatų klinikinis pritaikymas negalimas. Visose biožymenų grupėse nustatyta ŪML būdinga anemija bei trombocitopenija, neutrofilų skaičius vyraavo normos intervale.

## FLT3 ir NPM1 genų mutacijos

Gauti duomenys rodo, kad ŪML pacientų blastų imunofenotipinių žymenų CD11b, CD36, CD64 ir CD133 raiška statistiškai reikšmingai susijusi su nustatoma FLT3 mutacija (1 lentelė), o sąsaja tarp NPM1 geno mutacijos ir CD14, CD34, CD117, CD133 taip pat yra statistiškai reikšminga (2 lentelė).

Lyginant tyrimo rezultatus su mokslinėse publikacijose aprašytais FLT3 mutacijos ir biožymenų sąryšiais pastebėta, kad mutacija gali turėti įtakos CD11b žymens raiškai ( $p = 0,005$ ). Mutacijos su CD36

( $p = 0,08$ ) ir CD64 ( $p = 0,30$ ) biožymenimis įvertintos kaip nesusijusios [29]. CD133 žymens raiška gali būti siejama su mutacija, kai, esant *FLT3* geno mutacijai, CD133<sup>+</sup> nustatoma rečiau nei CD133<sup>-</sup> [30]. Publikacijoje, kurioje aprašytas cMPO raiškos blastų ląstelėse sąsajos su *FLT3* mutacijos variantu (*FLT3-ITD*) tyrimas, teigiama, kad sąsajos tarp minimų kintamųjų nėra ( $p = 0,676$ ) [31].

Gauti atliktų tyrimų rezultatai daugiausia sutampa su literatūroje aprašytomis blastų ląstelių biožymenų tendencijomis esant ŪML su *NPM1* mutacija. Mokslinėse publikacijose teigiama, kad *NPM1* mutacija susijusi su teigiama žymenų CD14, CD33, CD64, CD11b bei neigiama žymenų CD34, CD133, ŽLA-DR raiška [23, 32]. Prieštarai literatūroje aptariama CD117 biožymens raiška. Esant nustatytai *NPM1* mutacijai, vienur žymens raiška aprašoma kaip būdinga, kitur įvardijama kaip silpna [23]. Tačiau mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad esant šiai mutacijai vyrauja CD117 blastų fenotipas.

*FLT3* ir *NPM1* genų mutacijos dažniausiai yra susijusios kaip trijų mutacijų bloko dalis. Pirminė mutacija gali įvykti *DNMT3A* gene, neleukeminiuose T limfocituose, pirmtakinėse ir subrendusiose kraujo ląstelėse, antrinė įvyksta *NPM1* gene, o tretinė (*NPM1* genui antrinė) įvyksta *FLT3-ITD* mutacija [33]. Atrasta, kad mutavęs ir išėjęs į blastų citoplazmą *NPM1* geno koduojamas baltymas sukelia *HOX* genų raiškos hiperaktyvaciją [34], o šie genai netiesiogiai didina CD14 [35] ir mažina CD34, CD133 [36] raišką. Tikslus veikimo mechanizmas šiuo metu nėra aiškus, CD117 raišką, tikėtina, taip pat veikia *HOX* genai. *HOX* genai didina ir *FLT3* geno raišką [34], galima kelti hipotezę, kad CD36, CD64, CD133 ir cMPO raiškos pokyčiai labiau susiję su pakitusiu *HOX* genų reguliavimu, nei su *FLT3* genu, turint omenyje, kad *FLT3-ITD* mutacija yra *NPM1* mutacijos pasekmė.

## TP53 geno mutacija

Iš rezultatų matome, kad *TP53* geno mutacija ir CD33 žymuo turi statistiškai reikšmingą sąryšį (3 lentelė). Nors atliktų studijų, tiriančių CD33 žymens ir *TP53* sąryšį, nėra daug, tačiau vienoje jų teigiama, kad požymiai vienas nuo kito nepriklauso [37]. *TP53* genas slopina ląstelių dalijimąsi ir netiesiogiai sukelia apoptozę [38]. Pakitusi jo funkcija lemia nekontroliuojamą ląstelių dauginimąsi ir jos nespėja diferencijuotis. Galima kelti hipotezę,

1 lentelė. Imunofenotipinių biožymenų raiška ir *FLT3* mutacijos dažnis

Table 1. Expression of immunophenotypic biomarkers and frequency of *FLT3* mutation

|                    | <i>FLT3</i> mutacija nustatyta (tiriamųjų skaičius) | <i>FLT3</i> mutacija nenustatyta (tiriamųjų skaičius) | Mutacijos tikimybė CDX <sup>+</sup> (p) | Sąryšio efekto dydis ( ) | Neinvertuotas / invertuotas šansų santykis (OR) |
|--------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------|
| CD11b <sup>+</sup> | 9                                                   | 18                                                    | 0,021                                   | 0,319                    | 5,67 / –                                        |
| CD11b <sup>-</sup> | 3                                                   | 34                                                    |                                         |                          |                                                 |
| CD36 <sup>+</sup>  | 6                                                   | 9                                                     | 0,022                                   | 0,307                    | 5,00 / –                                        |
| CD36 <sup>-</sup>  | 6                                                   | 45                                                    |                                         |                          |                                                 |
| CD64 <sup>+</sup>  | 9                                                   | 19                                                    | 0,021                                   | 0,315                    | 5,68 / –                                        |
| CD64 <sup>-</sup>  | 3                                                   | 36                                                    |                                         |                          |                                                 |
| CD133 <sup>+</sup> | 5                                                   | 38                                                    | 0,048                                   | –0,261                   | 0,26 / 3,80                                     |
| CD133 <sup>-</sup> | 7                                                   | 14                                                    |                                         |                          |                                                 |
| cMPO <sup>+</sup>  | 11                                                  | 34                                                    | 0,026                                   | 0,285                    | 11,67 / –                                       |
| cMPO <sup>-</sup>  | 0                                                   | 17                                                    |                                         |                          |                                                 |

2 lentelė. Imunofenotipinių biožymenų raiška ir *NPM1* mutacijos dažnis

Table 2. Expression of immunophenotypic biomarkers and frequency of *NPM1* mutation

|                    | <i>NPM1</i> mutacija nustatyta (tiriamųjų skaičius) | <i>NPM1</i> mutacija nenustatyta (tiriamųjų skaičius) | Mutacijos tikimybė CDX <sup>+</sup> (p) | Sąryšio efekto dydis ( ) | Neinvertuotas / invertuotas šansų santykis (OR) |
|--------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------|
| CD14 <sup>+</sup>  | 4                                                   | 0                                                     | 0,002                                   | 0,468                    | 39,52 / –                                       |
| CD14 <sup>-</sup>  | 11                                                  | 50                                                    |                                         |                          |                                                 |
| CD34 <sup>+</sup>  | 2                                                   | 45                                                    | 0,000                                   | –0,722                   | 0,0171 / 58,5                                   |
| CD34 <sup>-</sup>  | 13                                                  | 5                                                     |                                         |                          |                                                 |
| CD117 <sup>+</sup> | 11                                                  | 48                                                    | 0,007                                   | –0,379                   | 0,0916 / 10,9                                   |
| CD117 <sup>-</sup> | 5                                                   | 2                                                     |                                         |                          |                                                 |
| CD133 <sup>+</sup> | 1                                                   | 41                                                    | 0,000                                   | –0,638                   | 0,0183 / 54,6                                   |
| CD133 <sup>-</sup> | 12                                                  | 9                                                     |                                         |                          |                                                 |

3 lentelė. Imunofenotipinių biožymenų raiška ir *TP53* mutacijos dažnis

Table 3. Expression of immunophenotypic biomarkers and frequency of *TP53* mutation

|                   | <i>TP53</i> mutacija nustatyta (tiriamųjų skaičius) | <i>TP53</i> mutacija nenustatyta (tiriamųjų skaičius) | Mutacijos tikimybė CDX <sup>+</sup> (p) | Sąryšio efekto dydis ( ) | Neinvertuotas / invertuotas šansų santykis (OR) |
|-------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------|
| CD33 <sup>+</sup> | 9                                                   | 1                                                     | 0,041                                   | 0,650                    | 27,0 / –                                        |
| CD33 <sup>-</sup> | 1                                                   | 3                                                     |                                         |                          |                                                 |

kad dėl šios priežasties galbūt padidėja CD33 raiška, nes šis žymuo yra specifiškai būdingas mieloidinėms ląstelėms [39].

## IDH1 ir IDH2 genų mutacijos

Tyrime nustatyta, kad statistiškai reikšmingą sąryšį su *IDH1* geno mutacija turi CD11b, CD15, CD96 biožymenys (4 lentelė), o kaip turintys statistiškai reikšmingus sąryšius su *IDH2* geno mutacija identifikuoti ŽLA-DR ir CD64 biožymenys (5 lentelė).

Kitų autorių tyrimuose teigiama, kad CD11b ir CD15 žymenų raiška gali būti susijusi su geno mutacija – pastebėtas dėsningumas, kai laukinio ti-

po (angl. *wild-type*) *IDH1* geno variante, lyginant su mutavusiu variantu, tiek CD11b, tiek CD15 biožymenų raiška buvo nustatyta dažniau [40]. Panašių tyrimų, kuriuose būtų nagrinėta blastų žymens CD96 raiškos asociacija su *IDH1* geno mutacija, nėra, tačiau viename tyrime teigiama, kad sąsajos tarp CD96 biožymenį koduojančio geno raiškos ir *IDH1* geno nerasta [41].

Publikacijose apie žymenų sąsajas su *IDH2* genu rasta, kad su mutacija *IDH2* gene ŽLA-DR koreliuoja neigiamai [42]. Tačiau panašiu principu atliktų tyrimų, vertinančių CD64 raišką ir jos dažnį esant *IDH2* mutacijai, neaptikta.

4 lentelė. Imunofenotipinių biožymenų raiška ir *IDH1* mutacijos dažnis

 Table 4. Expression of immunophenotypic biomarkers and frequency of *IDH1* mutation

|                    | <i>IDH1</i> mutacija nustatyta (tiriamųjų skaičius) | <i>IDH1</i> mutacija nenustatyta (tiriamųjų skaičius) | Mutacijos tikimybė CDX <sup>+</sup> (p) | Sąryšio efekto dydis ( ) | Neinvertuotas / invertuotas šansų santykis (OR) |
|--------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------|
| CD11b <sup>+</sup> | 0                                                   | 27                                                    | 0,03                                    | -0,294                   | 0,0797 / 12,5                                   |
| CD11b <sup>-</sup> | 6                                                   | 28                                                    |                                         |                          |                                                 |
| CD15 <sup>+</sup>  | 0                                                   | 23                                                    | 0,040                                   | -0,274                   | 0,0922 / 10,8                                   |
| CD15 <sup>-</sup>  | 7                                                   | 32                                                    |                                         |                          |                                                 |
| CD96 <sup>+</sup>  | 0                                                   | 27                                                    | 0,015                                   | -0,306                   | 0,0715 / 14,98                                  |
| CD96 <sup>-</sup>  | 7                                                   | 29                                                    |                                         |                          |                                                 |

 5 lentelė. Imunofenotipinių biožymenų raiška ir *IDH2* mutacijos dažnis

 Table 5. Expression of immunophenotypic biomarkers and frequency of *IDH2* mutation

|                     | <i>IDH2</i> mutacija nustatyta (tiriamųjų skaičius) | <i>IDH2</i> mutacija nenustatyta (tiriamųjų skaičius) | Mutacijos tikimybė CDX <sup>+</sup> (p) | Sąryšio efekto dydis ( ) | Neinvertuotas / invertuotas šansų santykis (OR) |
|---------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------|
| CD64 <sup>+</sup>   | 1                                                   | 26                                                    | 0,028                                   | 0,302                    | 0,1038 / 9,6                                    |
| CD64 <sup>-</sup>   | 10                                                  | 27                                                    |                                         |                          |                                                 |
| ŽLA-DR <sup>+</sup> | 6                                                   | 49                                                    | 0,003                                   | -0,452                   | 0,073 / 13,6                                    |
| ŽLA-DR <sup>-</sup> | 5                                                   | 3                                                     |                                         |                          |                                                 |

 6 lentelė. Imunofenotipinių biožymenų raiška ir *CEBPA* mutacijos dažnis

 Table 6. Expression of immunophenotypic biomarkers and frequency of *CEBPA* mutation

|                   | <i>CEBPA</i> mutacija nustatyta (tiriamųjų skaičius) | <i>CEBPA</i> mutacija nenustatyta (tiriamųjų skaičius) | Mutacijos tikimybė CDX <sup>+</sup> (p) | Sąryšio efekto dydis ( ) | Neinvertuotas / invertuotas šansų santykis (OR) |
|-------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------|
| CD64 <sup>+</sup> | 4                                                    | 0                                                      | 0,028                                   | 0,302                    | 14,36 / -                                       |
| CD64 <sup>-</sup> | 23                                                   | 37                                                     |                                         |                          |                                                 |
| CD96 <sup>+</sup> | 4                                                    | 23                                                     | 0,029                                   | 0,301                    | 13,98 / -                                       |
| CD96 <sup>-</sup> | 0                                                    | 36                                                     |                                         |                          |                                                 |

7 lentelė. Imunofenotipinių biožymenų raiška ir citoplazmos grūdėtumo dažnis

Table 7. Expression of immunophenotypic biomarkers and frequency of cytoplasmic granulation

|                    | Citoplazma grūdėta | Citoplazma negrūdėta | Iš viso |
|--------------------|--------------------|----------------------|---------|
| CD11a <sup>+</sup> | 55                 | 7                    | 62      |
| CD11a <sup>-</sup> | 3                  | 4                    | 7       |
| Iš viso            | 58                 | 11                   | 69      |
| CD117 <sup>+</sup> | 56                 | 8                    | 64      |
| CD117 <sup>-</sup> | 3                  | 3                    | 6       |
| Iš viso            | 59                 | 11                   | 70      |

Pastebėta, kad mutavę *IDH1* ir *IDH2* genų koduojami fermentai nebūdingai redukuoja -ketoglutaratą iki (R)-2-hidroksiglutarato, kuris hipermetilina histonų bei DNR, taip sutrikdydamas genų raišką ir hematopoetinių ląstelių pirmtakų diferenciaciją [43]. Galima kelti hipotezę, kad dėl slopinamojo mutacijų efekto blastuose su *IDH1* ir *IDH2* genų mutacijomis CD11b, CD15, CD96, ŽLA-DR ir CD64 žymenų raiška yra neigiamą.

## CEBPA geno mutacija

Tyrimo metu rasti su *CEBPA* geno mutacija susiję biožymenys: CD64 ir CD96 (6 lentelė).

Panašiu principu atliktų tyrimų, nagrinėjančių CD64 ir CD96 žymenų raišką ir *CEBPA* geno mutacijos dažnių skirtumą esant skirtingam žymens fenotipui, neaptikta, tačiau vienoje publikacijoje minima, kad, esant *CEBPA* mutacijai, pastebima CD96

žymenį koduojančio geno padidėjusi raiška, kuri galėtų lemti ir didėjančią CD96 raišką leukeminėse ląstelėse [44]. Kitoje publikacijoje pastebėta padidėjusi CD64 raiška, tačiau ne blastuose, o bręstančiuose neutrofiluose [45]. *CEBPA* genas koduoja svarbų transkripcijos veiksni C/EBP, kuris skatina granulocitų diferenciaciją, tačiau slopina įvykusią *CEBPA* mutaciją [46]. Galima kelti hipotezę, kad pakitusios struktūros C/EBP netiesiogiai aktyvina tiek CD64, tiek CD96 genų raišką.

## Imunofenotipinių biožymenų ir citomorfologinių radinių sąsajos

Statistiškai reikšmingo sąryšio tarp Auerio lazdelių ir biožymenų raiškos nerasta, tačiau identifikuoti du blastų imunofenotipui nustatyti naudojami žymenys, CD11a ir CD117, statistiškai reikšmingai susiję su citoplazmos grūdėtumu (7 lentelė).

CD11a raiška blastuose susijusi su jų citoplazmos grūdėtumu ( $p = 0,01$ ). Sąsajos efekto dydis – vidutinio stiprumo ( $\chi^2 = 0,378$ ;  $p = 0,002$ ). Šansų santykis ( $OR = 10,48$ ) leidžia teigti, kad CD11a<sup>+</sup> blastų fenotipas 10,48 karto dažnesnis nei CD11a<sup>-</sup>, kai atliekant citomorfologinį tyrimą matoma grūdėta blastų ląstelių citoplazma.

Blastų ląstelių žymens CD117 raiška susijusi su blastų citoplazmos grūdėtumu ( $p = 0,045$ ) silpnu ryšiu ( $\chi^2 = 0,288$ ;  $p = 0,016$ ). Šansų santykis ( $OR = 7,0$ ) rodo, kad, esant grūdėtai blastų citoplazmai, CD117<sup>+</sup> blastuose 7 kartus dažnesnė nei CD117<sup>-</sup>.

Analizuojant priežastis, kodėl CD11a ir CD117 biožymenys gali būti susiję, svarbu atkreipti dėmesį į tai, kokioms ląstelėms jie būdingi ir kokiuose procesuose dalyvauja. Visiems subrendusiems leukocitams būdingas CD11a žymuo; kaip integrinų receptorius, jis dalyvauja ląstelių ekstravazacijoje bei T ląstelių ir antigenų pateikiančių ląstelių sąveikoje [47]. Nors žymens raiška pastebima visose sveikų individų leukocitų ląstelėse, ji būdinga ir ŪML blastams, išskyrus FAB M7 grupę [48]. Tačiau granulės citoplazmoje randamos didesnio brandumo ŪML atvejais. Galima šios sąsajos priežastis yra granulocitinių ląstelių – neutrofilų – pasirengimas degranuliacijai, kuriai vykstant suintensyvėja CD11a raiška [49]. Ankstyvo mieloidinio žymens CD117 raiška būdinga mažo brandumo ląstelėms, tačiau jo sąsajos su grūdėta citoplazma priežastis literatūroje neaprašyta. Klinikiniai atvejai, analizuojantys lėtinės mieloidi-

nės leukemijos fenotipo ir citoplazmos grūdėtumo tendencijas, rodo, kad esant grūdėtumui pastebima stipri CD117 raiška [50]. Galima kelti hipotezę, kad nors grūdėtumas būdingas labiau subrendusioms kraujo ląstelėms, bręsdami ŪML blastai nepraranda CD117, kadangi jis yra SCF (angl. *Stem Cell Factor*) receptorių. SCF poveikis naudingas vėžinių ląstelių išgyvenamumui ir ekspansijai [51].

## IŠVADOS

Hematologinio analizatoriaus pateikti ŪML pacientų kraujo kiekybinės sudėties rodikliai statistškai reikšmingai susiję su biožymenų raiškos pokyčiais blastuose: ryški leukocitozė susijusi su CD14<sup>+</sup>, CD15<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>, CD99<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>; limfocitozė – su CD36<sup>+</sup> ir CD133<sup>+</sup>, limfopenija – su CD99<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>; monocitozė – su CD7<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD15<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD36<sup>+</sup>, CD96<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>, CD113<sup>+</sup>; bazofilija – su CD14<sup>+</sup>.

Atliekant citomorfologinį tyrimą pastebimas citoplazmos grūdėtumas statistškai reikšmingai susijęs su CD11a<sup>+</sup> ir CD117<sup>+</sup>.

Nustatytos genetinės mutacijos turi statistškai reikšmingas sąsajas su blastų biožymenų raiška: mutacija *FLT3* gene susijusi su CD11b<sup>+</sup>, CD36<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>; mutacija *NPM1* gene – su CD14<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>; mutacija *TP53* gene – su CD33<sup>+</sup>; mutacija *IDH1* gene – su CD11b<sup>+</sup>, CD15<sup>+</sup>, CD96<sup>+</sup>; mutacija *IDH2* gene – su CD64<sup>+</sup>, ŽLA-DR<sup>+</sup>; mutacija *CEBPA* gene – su CD64<sup>+</sup> ir CD96<sup>+</sup>. ◆

Gauta: 2021 09 09  
Priimta spaudai: 2021 12 30

## Summary

### CHARACTER OF BIOMARKER EXPRESSION ON BLAST CELLS IN PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKAEMIA

**Benas Matuzevičius, Gabrielė Jonauskaitė, Vytautas Janulis, Dovilė Karčiauskaitė, Mindaugas Stoškus, Mantas Radzevičius, Aušra Janiulionienė, Rėda Matuzevičienė**

**Introduction.** Acute myeloid leukaemia (AML) is a large group of blood and bone marrow oncological diseases characterised by the accumulation of undifferentiated myeloid lineage cells in peripheral blood or bone marrow. Approximately one-third of leukaemia cases are AML and almost 40% of deaths due to leukaemia are associated with acute myeloid leukaemia. The most inclusive classification of AML is suggested by The World Health Organisation (WHO), which comprises blast morphology, cytogenetic, molecular genetic variations and immunophenotypic markers. New biomarkers and insight into their distinct expression are crucial for the expansion of the WHO classification while the association between distinct types of blast immunophenotypes, blood count parameters, cytomorphology features and genetic testing results would carry significant clinical or prognostic value.

**The aim of the study** was to evaluate the association between immunophenotypic markers of AML patients' blasts and other results of laboratory testing.

**Materials and methods.** Anonymised data of 95 patients with AML diagnosis was collected. This data was used to find associations between immunopheno-

type data acquired by flow cytometry and the results of complete blood count, genetic conditions associated with the patients and morphological evaluation of cells. Patients were classified into two populations according to biomarker expression data: expression absent (CDX<sup>-</sup>) or expression present (CDX<sup>+</sup>).

**Results.** Quantitative parameters of AML patients' blood provided by a hematology analyser showed a statistically significant association to changes in blast biomarker expression: leukocytosis was statistically significantly associated with CD14<sup>+</sup>, CD15<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>, CD99<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>; lymphocytosis – with CD36<sup>+</sup> and CD133<sup>+</sup>, lymphopenia – with CD99<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>; monocytosis – with CD7<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD15<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD36<sup>+</sup>, CD96<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>, CD113<sup>+</sup>; basophilia – with CD14<sup>+</sup>.

The cytoplasmic granulation observed in the cytomorphological study had a statistically significant association with CD11a<sup>+</sup> and CD117<sup>+</sup> AML patients. Genetic mutations found in AML patients have statistically significant associations with the biomarker expression: mutation in *FLT3* gene was statistically significantly associated with CD11b<sup>+</sup>, CD36<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>; mutation in *NPM1* gene – with CD14<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>; mutation in *TP53* gene – with CD33<sup>+</sup>; mutation in *IDH1* gene – with CD11b<sup>+</sup>, CD15<sup>+</sup>, CD96<sup>+</sup>; mutation in *IDH2* gene – with CD64<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>; mutation in *CEBPA* gene – with CD64<sup>+</sup> and CD96<sup>+</sup>.

**Conclusions.** The obtained results showed that there are statistically significant associations between AML patients' blast immunophenotype and blood indices, cytomorphological and genetic test results.

**Keywords:** AML, *FLT3*, cytoplasmic granulation, mutation, bone marrow cancer.

## LITERATŪRA

1. Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Rev* 2017; 31(1): 63–76.
2. Short NJ, Rytting ME, Cortes JE. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2018; 392(10147): 593–606.
3. Song X, Peng Y, Wang X, Chen Y, Jin L, Yang T, et al. Incidence, survival, and risk factors for adults with acute myeloid leukemia not otherwise specified and acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities: analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database, 2001–2013. *Acta Haematol* 2018; 139(2): 115–27.
4. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer J* 2016; 6(7): e441.
5. Hwang SM. Classification of acute myeloid leukemia. *Blood Res* 2020; 55(Suppl): S1–4.
6. Solary E, Casasnovas RO, Campos L, Béné MC, Faure G, Maingon P, et al. Surface markers in adult acute myeloblastic leukemia: correlation of CD19<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup>/DR<sup>+</sup> phenotypes with shorter survival. *Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies (GEIL). Leukemia* 1992; 6(5): 393–9.
7. Jiang X-Q, Zhang L, Liu H-A, Yuan N, Hou P-Q, Zhang R-Q, et al. Expansion of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes is related to acute leukemia. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(8): 12297–306.
8. Casasnovas RO, Slimane FK, Garand R, Faure GC, Campos L, Deney V, et al. Immunological classification of acute myeloblastic leukemias: relevance to patient outcome. *Leukemia* 2003; 17(3): 515–27.
9. Liang J, Liang Y, Gao W. Clinicopathological and prognostic significance of sialyl Lewis X overexpression in patients with cancer: a meta-analysis. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 3113–25.
10. Li X, Li J, Du W, Zhang J, Liu W, Chen X, et al. Relevance of immunophenotypes to prognostic subgroups of age, WBC, platelet count, and cytogenetics in de novo acute myeloid leukemia. *APMIS* 2011; 119(1): 76–84.
11. Chandran R, Hakki M, Spurgeon S. Infections in leukemia [Internet]. Sepsis – an ongoing and significant challenge. IntechOpen; 2012 [cited 2021 Aug 31]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/39664>
12. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc receptors: old friends and new family members. *Immunity* 2006; 24(1): 19–28.
13. Vaikari VP, Du Y, Wu S, Zhang T, Metzler K, Batcha AMN, et al. Clinical and preclinical characterization of CD99 isoforms in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2020; 105(4): 999–1012.
14. Dufour EM, DeRoche A, Bae Y, Muller WA. CD99 is essential for leukocyte diapedesis in vivo. *Cell Commun Adhes* 2008; 15(4): 351–63.

15. Orleans-Lindsay JK, Barber LD, Prentice HG, Lowdell MW. Acute myeloid leukaemia cells secrete a soluble factor that inhibits T and NK cell proliferation but not cytolytic function – implications for the adoptive immunotherapy of leukaemia. *Clin Exp Immunol* 2001; 126(3): 403–11.
16. Tolba FM, Foda ME, Kamal HM, Elshabrawy DA. Expression of CD133 in acute leukemia. *Med Oncol* 2013; 30(2): 527.
17. Ji H, Chen L, Dai Y, Sun X, Li X, Wang Q, et al. Aberrant expression of CD133 and CD82 in patients with pediatric acute lymphoblastic leukemia and the clinical significance. *Oncol Lett* 2017; 14(5): 5811–8.
18. Rutella S, Rumi C, Puggioni P, Barberi T, Di Mario A, Larocca LM, et al. Expression of thrombospondin receptor (CD36) in B-cell chronic lymphocytic leukemia as an indicator of tumor cell dissemination. *Haematologica* 1999; 84(5): 419–24.
19. Tabe Y, Konopleva M. Break the life-line of AML cells. *Blood* 2021; 137(25): 3465–7.
20. Pasello M, Manara MC, Scotlandi K. CD99 at the crossroads of physiology and pathology. *J Cell Commun Signal* 2018; 12(1): 55–68.
21. Bagheri M, Vosoughi T, Hosseinzadeh M, Saki N. Evaluation of immunophenotypic markers and clinico-hematological profile in chronic lymphocytic leukemia: implications for prognosis. *BMC Res Notes* 2020; 13(1): 412.
22. Park EK, Lee JC, Park JW, Bang SY, Yi SA, Kim BK, et al. Transcriptional repression of cancer stem cell marker CD133 by tumor suppressor p53. *Cell Death Dis* 2015; 6(11): e1964.
23. Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA, Schuurhuis GJ. Review of the relevance of aberrant antigen expression by flow cytometry in myeloid neoplasms. *Br J Haematol* 2011; 153(4): 421–36.
24. Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* 2011; 25(4): 567–74.
25. Ismail MM, Abdulateef NAB. Absolute monocyte count is superior than absolute lymphocyte count at day 28 as an independent prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2019; 35(1): 100–8.
26. Fierl J, Depasse F, Geneviève F. How I investigate basophilia in daily practice. *Int J Lab Hematol* 2020; 42(3): 237–45.
27. van den Ancker W, Wijnands PGJTB, Westers TM, Bontkes HJ, van Wetering S, Kruisbeek AM, et al. Expansion of AML blasts induces CD14 expression and facilitates leukemic DC development for therapeutic application in AML. *Blood* 2010; 116(21): 2193.
28. Narayanan D, Weinberg OK. How I investigate acute myeloid leukemia. *Int J Lab Hematol* 2020; 42(1): 3–15.
29. Angelini DF, Ottone T, Guerrera G, Lavorghia S, Cittadini M, Buccisano F, et al. A leukemia-associated CD34/CD123/CD25/CD99+ immunophenotype identifies FLT3-mutated clones in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2015; 21(17): 3977–85.
30. Riccioni R, Pelosi E, Riti V, Castelli G, Lo-Coco F, Testa U. Immunophenotypic features of acute myeloid leukaemia patients exhibiting high FLT3 expression not associated with mutations. *Br J Haematol* 2011; 153(1): 33–42.
31. Kim Y, Yoon S, Kim SJ, Kim JS, Cheong JW, Min YH. Myeloperoxidase expression in acute myeloid leukemia helps identifying patients to benefit from transplant. *Yonsei Med J* 2012; 53(3): 530–6.
32. Bain BJ, Béné MC. Morphological and immunophenotypic clues to the WHO categories of acute myeloid leukaemia. *Acta Haematol* 2019; 141: 232–44.
33. Heath EM, Chan SM, Minden MD, Murphy T, Shlush LI, Schimmer AD. Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia* 2017; 31(4): 798–807.
34. Alharbi RA, Pettengell R, Pandha HS, Morgan R. The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia* 2013; 27(5): 1000–8.
35. Kim D-Y, Choi S-J, Kim S-H, Chung H-Y, Yi S, Kim D-W, et al. Upregulated hoxC4 induces CD14 expression during the differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 2005; 46(7): 1061–6.
36. Becker H, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, et al. Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2010; 28(4): 596–604.
37. Hou H-A, Chou W-C, Kuo Y-Y, Liu C-Y, Lin L-I, Tseng M-H, et al. TP53 mutations in de novo acute myeloid leukemia patients: longitudinal follow-ups show the mutation is stable during disease evolution. *Blood Cancer J* 2015; 5(7): e331.
38. Molica M, Mazzone C, Niscola P, de Fabritiis P. TP53 mutations in acute myeloid leukemia: still a daunting challenge? *Front Oncol* 2021; 10: 610820.
39. Naeim F, Nagesh Rao P, Song SX, Phan RT. Principles of immunophenotyping. In: Naeim F, Nagesh Rao P, Song SX, Phan RT, eds. *Atlas of hematopathology*. 2nd ed. [Internet]. Academic Press; 2018 [cited 2021 Aug 31]. p. 29–56. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128098431000024>
40. Schnittger S, Haferlach C, Ulke M, Alpermann T, Kern W, Haferlach T. IDH1 mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated NPM1 status. *Blood* 2010; 116(25): 5486–96.
41. Lin S-Y, Miao Y-R, Hu F-F, Hu H, Zhang Q, Li Q, et al. A 6-Membrane Protein Gene score for prognostic prediction of cytogenetically normal acute myeloid leukemia in multiple cohorts. *J Cancer* 2020; 11(1): 251–9.
42. Chou W-C, Lei W-C, Ko B-S, Hou H-A, Chen C-Y, Tang J-L, et al. The prognostic impact and stability of Isocitrate dehydrogenase 2 mutation in adult patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2011; 25(2): 246–53.
43. Medeiros BC, Fathi AT, DiNardo CD, Pollyea DA, Chan SM, Swords R. Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies. *Leukemia* 2017; 31(2): 272–81.
44. Lavallée V-P, Kros J, Lemieux S, Boucher G, Gendron P, Pabst C, et al. Chemo-genomic interrogation of CEBPA mutated AML reveals recurrent CSF3R mutations and subgroup sensitivity to JAK inhibitors. *Blood* 2016; 127(24): 3054–61.
45. Mannelli F, Ponziani V, Bencini S, Bonetti MI, Benelli M, Cutini I, et al. CEBPA-double-mutated acute myeloid leukemia displays a unique phenotypic profile: a reliable screening method and insight into biological features. *Haematologica* 2017; 102(3): 529–40.
46. Wang W, Xia X, Mao L, Wang S. The CCAAT/enhancer-binding protein family: its roles in MDSC expansion and function. *Front Immunol* 2019; 10: 1804.
47. Evans BJ, McDowall A, Taylor PC, Hogg N, Haskard DO, Landis RC. Shedding of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) in a human inflammatory response. *Blood* 2006; 107(9): 3593–9.
48. Boztug H, Schumich A, Pötschger U, Mühlegger N, Kolenova A, Reinhardt K, et al. Blast cell deficiency of CD11a as a marker of acute megakaryoblastic leukemia and transient myeloproliferative disease in children with and without Down syndrome. *Cytometry B Clin Cytom* 2013; 84(6): 370–8.
49. Hussien J, Koy M, Petzl W, Schuberth HJ. Neutrophil degranulation differentially modulates phenotype and function of bovine monocyte subsets. *Innate Immunol* 2016; 22(2): 124–37.
50. Song J, Liu K, Pinilla-Ibarz J, Zhang H. A case report and case review: chronic myeloid leukemia (CML) blast phase with myelomastocytic differentiation. *Leuk Res Rep* 2020; 14: 100222.
51. Kent D, Copley M, Benz C, Dykstra B, Bowie M, Eaves C. Regulation of hematopoietic stem cells by the steel factor/KIT signaling pathway. *Clin Cancer Res* 2008; 14(7): 1926–30.