

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.460>

<https://orcid.org/0000-0002-0288-3615>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Mantas Radzevičius

Piktybinių plazminių ląstelių
imunofenotipavimo svarba
diagnozuojant dauginę mielomą,
vertinant gydymo efektyvumą ir
prognozę

DAKTARO DISERTACIJA

Medicinos ir sveikatos mokslai,
Medicina (M 001)

VILNIUS 2023

Disertacija rengta 2017–2022 metais Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedroje.

Mokslinius tyrimus rėmė Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas.

Mokslinė vadovė – akad. prof. habil. dr. Zita Aušrelė Kučinskienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Mokslinis konsultantas – dr. Valdas Pečeliūnas (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001). Konsultantas nuo 2018-09-30 iki 2022-09-30.

Gynimo taryba:

Pirmininkė – prof. dr. Janina Tutkuvienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Nariai:

prof. dr. Marius Miglinas (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

prof. dr. Jelena Rascon (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

dr. Raija Silvennoinen (Helsinkio universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

prof. dr. Daiva Urbonienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2023 m. gegužės mėn. 15 d. 14 val. VUL SK Raudonojoje auditorijoje. Adresas: Santariškių g. 2, E122, Vilnius, Lietuva), tel. +370 656 87976; el. paštas mantas.radzevicius@mf.vu.lt

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.460>

<https://orcid.org/0000-0002-0288-3615>

VILNIUS UNIVERSITY

Mantas Radzevičius

Malignant plasma cell
immunophenotyping in multiple
myeloma diagnostics, prognosis and
treatment monitoring

DOCTORAL DISSERTATION

Medicine and Health Science,
Medicine (M 001)

VILNIUS 2023

The dissertation was prepared between 2017 and 2022 at the Department of Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Vilnius University

The research was supported by the Faculty of Medicine, Vilnius University.

Academic supervisor – Prof. Habil. Dr. Zita Aušrelė Kučinskienė (Vilnius University, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Academic consultant – Dr. Valdas Pečeliūnas (Vilnius University, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001). Consultant from 2018-09-30 to 2022-09-30.

This doctoral dissertation will be defended in a public/closed meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Janina Tutkuvienė (Vilnius University, Medical and Health Sciences, Medicine - M 001).

Members:

Prof. Dr. Marius Miglinas (Vilnius University, Medical and Health Sciences, Medicine - M 001),

Prof. Dr. Jelena Rascon (Vilnius university, Medical and Health Sciences, Medicine - M 001),

Dr. Raija Silvennoinen (University of Helsinki, Medical and Health Sciences, Medicine - M 001),

Prof. Dr. Daiva Urbonienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine - M 001).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 14:00 on 15th May 2023 in Red auditorium of Vilnius university hospital Santaros klinikos.

Address: E122, Santariskiu g. 2, Vilnius, Lithuania

Tel. +370 656 87976; e-mail: mantas.radzevicius@mf.vu.lt

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

SANTRUMPOS.....	8
1. ĮVADAS.....	10
1.1. Tiriamoji problema	10
1.2. Problemos aktualumas	11
1.3. Darbo tikslas	12
1.4. Darbo uždaviniai.....	12
1.5. Darbo mokslinis naujumas ir svarba	12
1.6. Ginamieji teiginiai.....	13
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	14
2.1. Dauginė mieloma ir plazminių ląstelių diskrazijos.....	14
2.1.1. Epidemiologija.....	15
2.1.2. Etiologija ir patogenezė.....	16
2.1.3. Požymiai ir simptomai	19
2.1.4. Dauginės mielomos diagnostika.....	20
2.1.5. Dauginės mielomos plazminių ląstelių genetiniai pokyčiai.....	26
2.1.6. Dauginės mielomos stadijos ir rizikos vertinimas	28
2.1.7. Gydymas ir ligos stebėseną	31
2.2. Tėkmės citometrijos metodas.....	37
2.2.1. Tėkmės citometrijos tyrimo eigos principai	37
2.2.2. Šviesos šaltinio ir signalų registravimo sistema	39
2.2.3. Tėkmės citometrijos reagentai.....	40
2.2.4. Duomenų analizė.....	41
2.3. Dauginės mielomos imunofenotipavimas.....	43
2.3.1. Diagnostinis dauginės mielomos imunofenotipavimas.....	44
2.3.2. Dauginės mielomos minimali liekamoji liga	45
2.3.3. Minimalios liekamosios ligos metodo harmonizacija.....	49
2.3.4. Minimalios liekamosios ligos analizės strategijos	51
2.3.5. Cirkuliuojančių plazminių ląstelių imunofenotipavimas	53

3. TYRIMŲ METODIKA	58
3.1. Piktybinių plazminių ląstelių imunofenotipavimas	58
3.2. Adhezijos imunofenotipo matavimas	58
3.2.1. Adhezijos imunofenotipo tiriamųjų grupė.....	59
3.2.2. Mėginių paruošimas adhezijos molekulėms nustatyti	59
3.3. Piktybinių plazminių ląstelių diagnostinio imunofenotipo nustatymas.....	60
3.3.1. Tėkmės citometrijos metodu nustatant diagnozę tirtų pacientų grupė.....	61
3.3.2. Diagnostinio imunofenotipo matavimo metodika	61
3.4. Minimalios liekamosios ligos imunofenotipo analizės harmonizacija	62
3.4.1. Dauginės mielomos minimalios liekamosios ligos analizės harmonizacijos etapai	63
3.5. Statistinė duomenų analizė.....	63
4. TYRIMŲ REZULTATAI.....	65
4.1. Piktybinių plazminių ląstelių adhezijos imunofenotipo vertinimas recidyvinės ir (ar) refrakterinės dauginės mielomos pacientams	65
4.1.1. Tiriamųjų grupės apibūdinimas.....	65
4.1.2. Recidyvinės ir (ar) refrakterinės dauginės mielomos pacientų grupių adhezijos imunofenotipo skirtumai aptinkant ir neaptinkant cirkuliuojančių plazminių ląstelių	66
4.2. Piktybinių plazminių ląstelių diagnostinio imunofenotipo sąsaja su rizikos veiksniais	72
4.2.1. Pacientų apibūdinimas	72
4.2.2. Piktybinių plazminių ląstelių imunofenotipo ir chromosominių aberacijų įtaka išgyvenamumui	73
4.2.3. Piktybinių plazminių ląstelių imunofenotipo skirtumai aptikus skirtingas chromosomų aberacijas	74
4.3. Minimalios liekamosios ligos imunofenotipo duomenų analizės strategijos harmonizavimas	80
4.3.1. Pirmas etapas: duomenų failų analizė naudojant skirtingose laboratorijose taikomas analizės strategijas	81

4.3.2. Antras etapas: pirminės bendros analizės strategijos taikymas.....	84
4.3.3. Trečias etapas: galutinės bendros duomenų analizės strategijos priėmimas.....	84
4.4. Kaulų čiulpų aspiracijos mėginio kokybės vertinimas	86
4.4.1.1. Kaulų čiulpų aspiracijos mėginio kokybę apibrėžiančių ląstelių ribinių verčių nustatymas	88
5. REZULTATŲ APTARIMAS.....	90
5.1. Piktybinių plazminių ląstelių adhezijos imunofenotipo reikšmė CPL formavimuisi	90
5.2. Diagnostinio piktybinių plazminių ląstelių imunofenotipo sąsaja su genetiniais dauginės mielomos rizikos veiksniais	91
5.3. Minimalios liekamosios ligos imunofenotipo duomenų analizės strategijos harmonizavimas	94
6. IŠVADOS.....	98
7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS	99
8. LITERATŪRA.....	100
9. DARBO APROBACIJA.....	115
10. SUMMARY	118
11. PADĖKA.....	156
12. CURRICULUM VITAE.....	157
13. PRIEDAI	159

SANTRUMPOS

AL	amiloido lengvosios grandys
AUC	plotas po kreive (angl. <i>area under curve</i>)
BMP-2	Kaulų morfogenetinis baltymas 2 (angl. <i>bone morphogenetic protein 2</i>)
CCL3	Chemokino C-C motyvo ligandas 3 (angl. <i>chemokine (C-C motif) ligand 3</i>)
CD	diferenciacijos klasteris (angl. <i>cluster of differentiation</i>)
CPL	cirkuliuojančios plazminės ląstelės
CR	visiškas atsakas (angl. <i>complete response</i>)
CRAB	akronimas: kalcis, inkstai, anemija, kaulai (angl. <i>calcium, renal, anemia, bone</i>)
CV	variacijos koeficientas (angl. <i>coefficient of variation</i>)
DM	dauginė mieloma
ECOG	Rytų bendradarbiavimo onkologijos grupė (angl. <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>)
EDM	ekstramedulinė dauginė mieloma
FISH	fluorescencinė <i>in situ</i> hibridizacija (angl. <i>Fluorescence in-situ hybridization</i>)
FCS	standartinių tėkmės citometrijos duomenų (angl. <i>flow cytometry standard</i>) failo formatas
FSC	priekinė šviesos sklaida (angl. <i>forward scatter</i>)
GEP	genų raiškos profiliavimas (angl. <i>Gene expression profiling</i>)
HK	hiperdiploidinis kariotipas
Ig	imunoglobulinas
IgH	imunoglobulino sunkioji grandis
IL	Interleukinas
IMWG	Tarptautinė mielomos darbo grupė (angl. <i>International Myeloma Working Group</i>)
ISS	tarptautinė (ligos) stadijos nustatymo sistema (angl. <i>International Staging System</i>)
KČ	kaulų čiulpai
KKLT	kamieninių kraujodaros ląstelių transplantacija
LDH	laktato dehidrogenazė
LOD	aptikimo riba (angl. <i>limit of detection</i>)
LOQ	nustatymo riba (angl. <i>limit of quantification</i>)
MDE	mielomą apibrėžiantis įvykis (angl. <i>myeloma defining event</i>)
MFI	vidutinis švytėjimo intensyvumas (angl. <i>mean fluorescence intensity</i>)

MLL	minimali liekamoji liga (angl. <i>minimal residual disease, MRD</i>)
m-SMART	mielomos stratifikacijos ir su rizika susijusios terapijos klasifikacija (angl. <i>Stratification for Myeloma and Risk-Adapted Therapy</i>)
NGF	naujos kartos tėkmės citometrija (angl. <i>next-generation flow</i>)
NGS	naujos kartos sekvenavimas (angl. <i>next-generation sequencing</i>)
nPL	normalios plazminės ląstelės
NRMG	neaiškios reikšmės monokloninė gamapatija (angl. <i>monoclonal gamopathy of undetermined significance, MGUS</i>)
PGR	polimerazių grandininė reakcija (angl. <i>polymerase chain reaction, PCR</i>)
PK	periferinis kraujas
PL	plazminės ląstelės
pPL	piktybinės plazminės ląstelės
RANKL	branduolinio faktoriaus kapa-B ligando receptoriaus aktyvatorius (angl. <i>receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>)
RRDM	recidyvinė ir (ar) refrakterinė dauginė mieloma (angl. <i>relapsed/refractory multiple myeloma, RRMM</i>)
RDM	rusenanti dauginė mieloma (angl. <i>smouldering multiple myeloma, SMM</i>)
R-ISS	peržiūrėta tarptautinė stadijos nustatymo sistema (angl. <i>Revised International Staging System</i>)
ROC	sprendimus priimančiojo ypatybių kreivė (angl. <i>receiver operating characteristic</i>)
sCR	griežtas visiškas atsakas (angl. <i>stringent complete response</i>)
SD	standartinis nuokrypis (angl. <i>standard deviation</i>)
SSC	šoninė sklaida (angl. <i>side scatter</i>)
SNP-a	vieno nukleotido polimorfizmo mikrogardelė (angl. <i>single nucleotide polymorphism array</i>)
TC	tėkmės citometrija
TNF-alfa	tumoro nekrozės faktorius alfa (angl. <i>tumor necrosis factor alpha</i>).
VUL SK	Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos

1. ĮVADAS

1.1. Tiriamoji problema

Dauginė mieloma (DM) yra piktybinių plazminių ląstelių (PL) proliferacija kaulų čiulpuose (KČ). PL yra galutinė B limfocitų diferenciacijos stadija, o kloninės PL yra įprastų funkcijų neatliekantis, neoplazinis normalių PL atitikmuo (1). Lietuvoje DM yra trečia pagal dažnį piktybinė hematologinė liga, kuri sudaro daugiau nei 10 % hematologinių navikų atvejų (2).

Gydant DM pasiekta didelė pažanga, kadangi daugiau nei 50 % pacientų pavyksta pasiekti visišką atsaką (CR) į gydymą, tačiau išlieka poreikis nustatant diagnozę išsamiai charakterizuoti sunkesnės eigos ar didesnės recidyvo rizikos ligos atvejus, taip pat stebėti remisiją pasiekusius ar ilgalaikį palaikomąjį gydymą gaunančius žmones dėl recidyvo galimybės (3). Remisija laikomas simptomų, siejamų su DM išnykimas, ir piktybinių ląstelių, ar jų išskiriamų medžiagų neaptikimas naudojant jautrius tyrimo metodus, kurie bus aptarti vėliau.

Šios disertacijos tiriamoji problema apima darbus, kuriais siekiama spręsti keletą iššūkių. Visų pirma – tai DM minimalios liekamosios ligos (MLL) tyrimo atlikimo tėkmės citometriniu (TC) metodu optimizavimas. MLL tyrimas yra pagrįstas piktybinių PL imunofenotipo nustatymu diagnozuojant ligą. Gydant DM šios informacijos pagrindu stebima liekamoji piktybinių PL koncentracija kraujyje ir (ar) kaulų čiulpuose, siekiant įvertinti gydymo efektyvumą bei vykdyti ilgalaikę pacientų stebėseną dėl ligos recidyvo. TC tyrimo optimizavimas apima piktybinių PL imunofenotipo duomenų analizės gairių harmonizavimą ir KČ ėminio surinkimo kokybės įvertinimą. Antras iššūkis – piktybinių PL imunofenotipo informacijos panaudojimas ankstyvajai DM prognozei charakterizuoti dar jau diagnozuojant ligą. Ir trečias iššūkis – TC tyrimo metodu stebėti piktybinių PL imunofenotipo pokyčius, nulemiančius periferiniame kraujyje (PK) cirkuliuojančių piktybinių plazminių ląstelių (CPL) formavimąsi, siejamą su ligos agresyvėjimu ir progresavimu. Ši informacija leistų anksčiau koreguoti paciento gydymo metodus, siekiant laiku kontroliuoti ligos progresavimą.

TC metodas plačiai naudojamas DM diagnostikai, norint nustatyti būdingą piktybinių PL imunofenotipą (4), tačiau šiuo tyrimu gaunami duomenys gali būti taikomi plačiau – ligos atsinaujinimo rizikai ir eigos prognozei (5) vertinti. TC metodas taip pat leidžia stebėti gydymo metu išliekantį nedidelį piktybinių PL kloną – vadinamąjį MLL. MLL tyrimai leidžia įvertinti organizme po gydymo kurso likusį piktybinių ląstelių kiekį ne tik periferiniame kraujyje, bet ir įvairiuose organizmo skysčiuose, kuriuose šios

ląstelės išplinta ar išlieka (6). Vis dėlto, norint pagerinti MLL tyrimo rezultatų pakartojamumą ir patikimumą, būtina tyrimą harmonizuoti (7). Harmonizavimo procesas leistų didesniu jautrumu nustatyti MLL dydį, taip pat palyginti skirtingose laboratorijose atliktų bei klinikinių tyrimų rezultatus (8).

Jei DM išlieka atspari gydymui ir atsinaujina, tokia ligos forma vadinama recidyvine ir (ar) refrakterine DM (RRDM) (9). RRDM pacientams piktybinės PL neretai aptinkamos net periferiniame kraujyje, nors įprastinė piktybinių ir normalių PL aptikimo vieta yra kaulų čiulpai (KČ). Periferiniame kraujyje randamos piktybinės PL yra vadinamos CPL. Kraštutinai sunki piktybinių PL sukelta liga yra plazminių ląstelių leukemija, kuriai esant periferiniame kraujyje aptinkami ypač dideli kiekiai piktybinių PL, be to, liga dažnai yra atspari gydymui (10). Šis piktybinių PL patekimas į periferiją siejamas su adhezijos molekulių, kuriomis PL tvirtinasi prie KČ stromos, pokyčiais (11). Adhezijos molekulių pokyčius galima vertinti TC metodu ir kaulų čiulpuose, ir periferiniame kraujyje. Taigi CPL aptikimo bei susiformavimo mechanizmo tyrimai gali padėti anksti suprasti DM atsparumo gydymui mechanizmą ir efektyviau koreguoti gydymą.

1.2. Problemos aktualumas

DM yra viena dažniausių hematoonkologinių patologijų, tačiau nepaisant didelių pastangų ieškant pažangių DM gydymo metodų, galutinai išgydyti ligą kol kas yra sunku net ir taikant tokius metodus, kaip kaulų čiulpų transplantacija (12). Itin svarbus yra tikslus pirminis pacientų įvertinimas ir su juo susijęs tinkamo gydymo parinkimas. Sėkmingam gydymui labai padeda laboratoriniai tyrimai, tarp jų biocheminiai, hematologiniai, taip pat didelę įtaką turi genetinė ligos prognozė (13). Svarbi reikšmė tenka ir piktybinių PL imunofenotipo nustatymui, kadangi dalis imunofenotipo žymenų turi ryšį su genetiniais ligos formavimosi mechanizmais, taip pat yra imunoterapijoje naudojamų monokloninių antikūnų taikiniai. Imunofenotipo įvertinimas diagnozuojant ligą gali suteikti papildomos informacijos nustatant ligos riziką. Net esant geram atsakui į gydymą, kuris vertinamas MLL tyrimais, DM pacientus reikia stebėti ilgą laiką, o reguliariai atliekamas MLL tyrimas leidžia įvertinti ligos eigą ir ilgalaikį gydymo efektyvumą (14). Kaulų čiulpuose matuojamos MLL rezultatų patikimumą padidintų geresnis rezultatų pakartojamumas ir kaulų čiulpų aspirato kokybę leidžiantys vertinti kriterijai. Jei liga yra atspari gydymui, naudingos informacijos galima gauti identifikuojant jos progresavimo mechanizmus ir įvertinant CPL susidarymą

periferiniame kraujyje (15), ištyrus PL adhezijos molekulių fenotipą tėkmės citometrijos metodu.

1.3. Darbo tikslas

Darbo tikslas – ištirti, kaip piktybinių PL imunofenotipavimas tėkmės citometriniu metodu galėtų būti naudojamas DM recidyvo prognozei, šios ligos agresyvėjimo vertinimui pagal periferinio kraujo CPL formavimąsi bei DM MLL tyrimų optimizavimui harmonizuojant PL imunofenotipo analizės strategiją.

1.4. Darbo uždaviniai

1. Ištirti KČ piktybinių PL adhezijos molekulių imunofenotipą ir nustatyti jo reikšmę periferinių CPL formavimuisi.
2. Išanalizuoti piktybinių PL diagnostinio imunofenotipo žymenų raiškos ypatumų vertę DM prognozei, jų sąsajas su genetiniais DM prognozės kriterijais.
3. Įvertinti nuo tyrėjo priklausomų PL imunofenotipavimo duomenų analizės harmonizavimo įtaką DM MLL tyrimo rezultatų variabilumui.
4. Nustatyti KČ mėginio tėkmės citometriniu ištyrimo parametrus, geriausiai atspindinčius KČ aspirato paėmimo kokybę.

1.5. Darbo mokslinis naujumas ir svarba

Gydant DM ne visuomet pavyksta pasiekti pageidaujamą ligos atsaką, todėl ypač svarbu turėti galimybę anksti įvertinti su ligos progresavimu susijusius veiksnius. Periferinio kraujo CPL yra vis plačiau tyrinėjama DM sritis, ypač svarbi siekiant anksti aptikti agresyvias, atsparias gydymui, nepalankios eigos ligos formas. CPL yra kaulų čiulpų aspirate tiriamos MLL atitikmuo periferiniame kraujyje ir siejamos su ligos progresavimu (16). Kadangi CPL nustatomos iš veninio kraujo ėminių, jiems surinkti reikalinga mažesnė intervencija, taigi CPL tyrimas galėtų būti naudojamais papildomai informacijai gauti šalia įprastinių KČ MLL tyrimų (17). Vienas pagrindinių su periferinio kraujo CPL atsiradimu siejamų veiksnių yra adhezijos molekulių raiškos pokyčiai piktybinėse PL. Šiandien iki galo nėra aišku, kurių konkrečių adhezijos molekulių raiškos pokyčiai gali būti siejami su CPL atsiradimu (9). TC metodas leidžia įvertinti šiuos pokyčius tiek PK, tiek KČ.

Piktybinių PL imunofenotipavimas gali būti atliekamas ne vien ligos diagnozei nustatyti, bet ir recidyvo prognozei įvertinti. Šiandien vertinant ligos prognozę jau atsižvelgiama į chromosominės aberacijas ir kitus PL

genetinius pokyčius, todėl, jei rastume sąsają tarp imunofenotipo ir genetinių prognozės veiksnių, atsivertų papildomos DM prognozavimo galimybės (18).

Ekspertinės DM MLL tyrimų rekomendacijos padeda laboratorijoms suvienodinti tyrimų reagentų rinkinius, parinkti tėkmės citometrų nustatymus ir taikyti tokį mėginių paruošimą, kuris sumažintų DM MLL tyrimo rezultatų variabilumą. Tai kertinis naujos kartos tėkmės citometrijos (angl. *Next-generation Flow*) pritaikymo etapas (19), tačiau trūksta konkrečių, plačiai taikomų citometrinių duomenų analizės gairių, kurios sumažintų nuo tyrimą atliekančio specialisto žinių ir patirties priklausomą tyrimo rezultatų variabilumą (20). Tai būtų ypač svarbu klinikiniam vaistų tyrimams, ilgalaikiam pacientų gydymo efektyvumo stebėjimui ir gydymą skiriantiems bei koreguojantiems specialistams (21).

1.6. Ginamieji teiginiai

1. Piktybinių PL adhezijos molekulių imunofenotipo pokyčiai kaulų čiulpuose nulemia DM progresavimą ir CPL formavimąsi periferiniame kraujyje.
2. DM piktybinių PL diagnostinio imunofenotipo žymenų raiškos ypatumai turi ryšį su šios ligos prognozei vertinti naudojamais genetiniais kriterijais.
3. Tėkmės citometrijos duomenų analizės gairių parinkimas ir jų suvienodinimas pagerina DM MLL tyrimo rezultatų pakartojamumą.
4. Tėkmės citometrinių tyrimo duomenų analizės gairių suvienodinimas leidžia turėti kriterijus KČ ėminio surinkimo kokybei įvertinti.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Dauginė mieloma ir plazminių ląstelių diskrazijos

DM yra piktybinių PL proliferacijos nulemta liga, pasireiškianti specifiniais simptomais, požymiais ir laboratorinių tyrimų pokyčiais (1). Ligos substratas – tai savo įprastos funkcijos neatliekantis ir organus pažeidžiantis normalių PL piktybinis klonas (22). Normalios PL yra galutinė B limfocitų, kurių imuninė paskirtis yra gaminti antikūnus prieš specifinius infekcijos sukėlėjų antigenus, diferenciacijos stadija (23).

Remiantis klinikinių, laboratorinių ir instrumentinių tyrimų duomenimis, piktybinės PL ligos gali būti skirstomos į atskirus nozologinius vienetus (24). Šie vienetai skiriasi klinikinės būklės sunkumu, kuris dažniausiai turi biologinį pagrindą – skirtingą piktybinių ląstelių kiekį (naviko masę), ląstelių piktybiškumą, išplitimo laipsnį (25). Ligos eigai dažnai būdingas progresavimas iš lengvesnės formos į sunkesnę (12).

DM yra dalis piktybinių PL sukeltų ligų spektro, plačiau vadinamo plazminių ląstelių diskrazijomis (gr. *dyskrāsia* – blogas mišinys). Ši ligų grupė apima ankstyvas ir specifinio gydymo ne visuomet reikalaujančias būkles (neaiškios reikšmės monokloninę gamapatiją – NRMG, rusenančią dauginę mielomą – RDM), taip pat tokias kliniškai pasireiškiančias ir gydymo reikalaujančias ligas, kaip DM (26). DM taip pat gali pasireikšti skirtingomis formomis – kaip nesekretuojanti DM, arba ligos agresyvios eigos būklėmis, kai piktybinės PL išplinta už KČ ribų, – kaip ekstramedulinė DM (27). Šios PL ligos pasižymi progresavimu iš ankstyvų, mažiau piktybinių būklių į stipresnės klinikinės raiškos, sunkesnes būkles (3).

Su piktybinėmis PL taip pat siejamos ir kitos ligos, tačiau jų pasireiškimas, eiga ir gydymas dažnai skiriasi nuo ikivėžinių būklių ar įprastinės DM ligos progresavimo. Dėl šių skirtumų neretai jos aprašomos ir nagrinėjamos atskirai nuo DM. Tokių būklių pavyzdžiai: plazminių ląstelių leukemija, izoliuota plazmacitoma ir limfoplazmocitinė limfoma – vadinamoji Waldenstromo makroglobulinemija (28).

Plazminių ląstelių leukemiją galima apibrėžti kaip terminalinę piktybinių PL ekstramedulinio plitimo būseną – neribotą plitimą į PK (10). Lengvesnės ligos, pavyzdžiui, izoliuota plazmacitoma, neplinta už pirminio židinio ribų. Limfoplazmocitinė limfoma siejama su piktybinėmis plazmocitoidinės diferenciacijos B limfoidinėmis ląstelėmis, kurios sekretuoja imunoglobuliną M (IgM). Dažnai aptinkamos ir piktybinės PL ląstelės, ir piktybiniai B limfocitai – B ląstelių limfoma. Taigi dalis šios ligos savybių bendros su DM, pavyzdžiui, progresavimas iš NRMG į RDM ir galiausiai DM, tačiau dalis

labiau būdingos ne-Hodžkino limfomų grupei, pvz. plitimas į limfmazgius, gali būti aptinkamas tik piktybinių B limfoidinių ląstelių komponentas (28).

Taip pat yra su piktybinių PL proliferacija susijusių sindromų ar kitų ligų, kurių klinikinė eiga irgi gali būti dalis DM eigos. Monokloninių imunoglobulinų kaupimo ligos nustatomos, kai monokloniniai antikūnai kaupiasi inkstų glomerulų pamatinėje membranoje ir sukelia inkstų nepakankamumą. Gali būti pažeisti ir kiti organai – kepenys, širdis, periferiniai nervai, plaučiai, oda. Prie šių ligų priskiriama pirminė amiloidozė, kitaip vadinama AL (amiloido lengvųjų grandžių) amiloidoze – tai sisteminė amiloidozės forma, kai inkstus pažeidžia lengvosios grandys. Taip pat šiai grupei priklauso lengvųjų ir sunkiųjų grandžių sankauptų ligos (24).

Kita, retesnė grupė ligų yra plazminių ląstelių piktybinės ligos su susijusiais paraneoplaziniais sindromais. Joms priskiriami POEMS ir TEMPI sindromai. POEMS sindromas pasižymi polineuropatija, organomegalija, endokrinopatija, M baltymu ir odos pokyčiais. Sindromo pagrindas yra piktybinių PL sukelti papildomi imuniniai pokyčiai, citokinų gamyba, taip pat angiogenezės skatinimas, sukeliantis papildomų simptomų ir pažeidimų (1). TEMPI sindromas pasireiškia teleangiektazijomis, padidėjusiu eritropoetino kiekiu ir eritrocitoze, monoklonine gamapatija, perinefriniu skysčių kaupimu ir intrapulmoniniu nuosruviu.

2.1.1. Epidemiologija

Europoje per metus aptinkama 4,5–6,0 naujų ligos atvejų, tenkančių 100 000 gyventojų. DM yra vyresnio amžiaus žmonių liga, amžiaus mediana – 72 metai. Mirtingumas sudaro 4,1 iš 100 000 gyventojų per metus (8). JAV duomenimis, tai antra pagal dažnumą piktybinė hematologinė liga, apimanti ~1 % visų vėžinių ligų ir apie 10 % onkohematologinių ligų (24). Vidutinis amžius, kai diagnozuojama liga, JAV yra 65 metai (29). Dažniau pasireiškia moterims, taip pat šioje šalyje dažnesnė tarp juodaodžių. Remiantis ilgalaikiais stebėjimais, JAV kasmet diagnozuojami 4 ligos atvejai iš 100 000 žmonių. Lietuvoje kasmet nustatoma ~180 ligos atvejų (~6 atvejus iš 100 000 žmonių) (2).

Didžioji dalis DM išsivysto iš ankstesnės, simptomais nepasireiškiančios, nepiktybinės ligos – neišskios reikšmės monokloninės gamapatijos (NRMG). Tyrimų duomenimis, NRMG paplitimas gali būti iki 3 % žmonių, vyresnių kaip 50 metų amžiaus. NRMG progresavimo į DM dažnis yra maždaug 1 % per metus. Dauguma žmonių, kuriems nustatoma NRMG, šią būklę turi iki 10 metų prieš DM diagnozę (30).

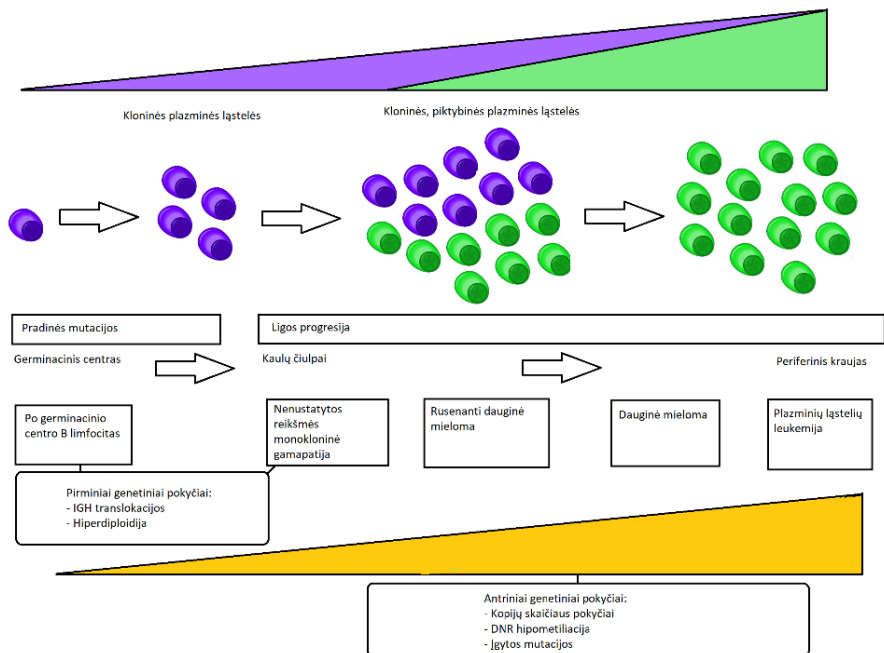
2.1.2. Etiologija ir patogenezė

Iki šiol nėra nustatyta tiksli ar vienintelė DM išsivystymo priežastis. Ligos pradžia siejama su tokiais mutacijas skatinančiais veiksniais, kaip jonizuojančioji spinduliuotė, kancerogenai, taip pat dažna pakartotinė imuninės sistemos stimuliacija, tačiau daugumai pacientų konkretus etiologinis ryšys su aiškia priežastimi nenustatomas (31).

Įprastai PL KČ būna sustabdytos būsenos, G0/G1 ląstelės cikle. Jas aktyvuoja infekcija, kadangi kyla poreikis gaminti reikalingus antikūnus. Vystantis DM piktybinės PL turi didesnius nei įprastos PL augimo ir dauginimosi gebėjimus, o tai įmanoma tik išėjus iš sustabdyto ląstelės ciklo. Tam turi reikšmės genetiniai pokyčiai, kurie bus aptarti plačiau, siejami su ląstelės ciklu ir perėjimo iš G0/G1 fazės reguliavimu (31).

Nustatyti pradiniai chromosomų pokyčiai (translokacijos, aneuploidija), kurios siejamos su pirminiu DM vystymusi, bus aprašyti atskirai (32). Taip pat aprašyti genai, kurie gali nulemti DM išsivystymą, pvz. *CCDN* genas, koduojantis cikliną D1. Šių genų pokyčiams dažnai turi įtakos piktybinėse PL nustatomos DM nulemiančios translokacijos, paprastai susijusios su imunoglobulinų sunkiąją grandį koduojančiu genu (*IGH*) 14 chromosomoje, arba su lengvąsias grandis koduojančiais genais - *IGK* 2 chromosomoje ir *IGL* 22 chromosomoje (33, 34).

Dažniausiai iki išsivystant simptominei DM ligai galima aptikti besimptomius, ikivėžinius etapus, pvz. NRMG ar rusenančią dauginę mielomą (RDM). Žinoma, tik dalis šių ikivėžinių būklių ilgainiui progresuoja į DM, o vėliau – į ekstramedulinę DM formą. Tik 20 % pacientų, kuriems nustatoma NRMG, ilgainiui išsivysto DM (35).



1 paveikslas. Plazminių ląstelių diskrazijų progresijos schema ir būdingos pirminės ir antrinės mutacijos. Parengta pagal Kumar ir kt., 2017 (1)

Progresavimas dažniausiai prasideda nuo tokių besimptomų būklių, kaip NRMG, po kurios vystosi RDM, vėliau DM ir galiausiai ekstramedulinė DM (1 pav.), tačiau ne visuomet pasireiškia ar nustatomi visi etapai. Ekstramedulinė ligos forma – kai piktybinės PL plinta už KČ ribų – aptinkama 1–2 % pacientų nustatant diagnozę, taip pat 8 % išsivysto jau sergant šia liga (36). Galimos ir kitos su piktybinėmis PL susijusios būklės (pvz. plazminių ląstelių leukemija), kurioms nebūdingas šis vystymosi eiliškumas.

Ekstramedulinis ligos plitimas siejamas su piktybinių PL plitimu už KČ ribų, kuomet CPL aptinkamos ne tik periferiniame kraujyje, bet ir kituose organizmo skysčiuose, pvz. pleuros skystyje, ar tokiuose organuose, kaip oda, kuriuos pažeidžia. Šis plitimas yra siejamas su imunofenotipo pokyčiais, ypač adhezijos molekulių – CXCR4 (CD184) ar CD54 netekimu (37).

DM formavimasis siejamas su procesais, kurie vyksta PL brendimo metu. Besivystant PL vyksta somatinė hipermutacija, kai persitvarko *V(D)J* genai, koduojantys imunoglobulinų molekules. Įprastinė šio proceso paskirtis – užtikrinti imunoglobulinų molekulių įvairovę. Manoma, kad pirminiai pakitimai, nulemiantys DM išsivystymą, yra susiję su klaidomis vykstant *V(D)J* genų persitvarkymui (38).

Išskiriamos pirminės chromosominės anomalijos: translokacijos, paliečiančios IgH koduojantį geną, taip pat aneuploidija, chromosomų skaičiaus pokyčiai. DM patogenezė siejama su šiais ligą inicijuojančiais pirminiais pakitimais, tačiau taip pat aprašomi antriniai pakitimai, kurie aptinkami ligai progresuojant. Be klasikinių chromosominių pažaidų ir translokacijų, nustatyta daug atskirų genų, kurie siejami su DM patogenezė ir yra plačiai tiriami (38).

MM yra heterogeniška genetiškai – dažnai aptinkamos chromosomų duplikacijos, dažniausiai nelyginių chromosomų, arba translokacijos su 14 chromosoma, kur ir yra *IGH* genas. Šios dvi genetinių pokyčių grupės dažniausiai neaptinkamos tiems patiems pacientams – pastebėta, kad paprastai aptinkama tik viena arba kita grupė pokyčių (33). Manoma, kad chromosominės aberacijos (aneuploidija) ir IgH translokacijos yra aptinkamos ankstyvose ligos stadijose – jau NRMG etape, kai dar nėra simptominės ligos formos. Kitos mutacijos ar chromosomų aberacijos atsiranda vėliau, ligai progresuojant į simptominę DM (39).

Yra aptikta genetinių pakitimų, kurie nulemia NRMG perėjimą į DM – *KRAS* geno, esančio 12 chromosomoje, mutacijos, *Myc* geno, esančio 8 chromosomoje, aktyvacija, *TP53* geno, esančio 17 chromosomoje inaktyvacija. Vėlesni antriniai pokyčiai lemia DM perėjimą į ekstramedulinę DM. Nustatyti ir RMM progresijos į DM riziką lemiantys genetiniai veiksniai – t(4;14) translokacija, 17p delecija, 1q duplikacija (28). Aprašyti šiai progresijai būdingi genų pokyčiai, susiję su *Myc* ir *Ras* onkogenais (40, 38).

Ankstyvose ligos stadijose dažnai nustatomas intrakloninis heterogeniškumas – skirtingų genetinių klonų formavimasis ir egzistavimas, tačiau vėlesnėse stadijose pradeda dominuoti pavieniai klonai, kas nulemia ligos progresavimą (39).

Vienas mažiau tirtų ligos progresavimo požymių – tai skirtingą imunofenotipą turinčių subpopuliacijų mažėjimas ligai pereinant iš NRMG į DM. Toks procesas atspindi minėtą kloninę selekciją – vykstant genetinei konsolidacijai, pastebimi ir dominuojantys imunofenotipai, nustatant DM diagnozę tėkmės citometrijos metodu dažniausiai aprašomas vienas, daugiausia du skirtingi piktybinių PL imunofenotipai (35).

DM ligos simptomai pradeda ryškėti, kai KČ pažeidžia juose proliferuojančios piktybinės PL, taip pat išskiriamas patologinis M baltymas, kuris nulemia inkstų ir kitų organų pažeidimus. DM pažeidžia KČ ir tiesiogiai, ir per piktybinių PL išskiriamas medžiagas, tokias kaip RANKL, TNF-alfa, IL-3 ir IL-6, kurios skatina osteoklastų veiklą ir skatiną kaulinio audinio pažeidimą, taip pat per CCL3 sumažina kraujodaros funkciją. M baltymas dažniausiai sudarytas iš sunkiųjų ir lengvųjų grandžių klonų, tačiau galimi

variantai, kai gaminamos tik lengvosios grandinės arba sekrecijos išvis nėra. Nuo šių skirtumų priklauso ir pažeidimo lokalizacija bei sunkumas (26).

Jei ligos eiga nerodo atsako į gydymą, išskiriama atskira, gydymui atspari ir recidyvuojanti ligos forma – RRDM. Ji apibrėžiama remiantis laboratoriniais ir radiologiniais kriterijais – 25 % ar daugiau padidėjusiu kraujo serumo ar šlapimo M baltymo kiekiu arba laisvųjų lengvųjų grandžių santykio padidėjimu nuo geriausios pasiektos vertės gydymo metu. Taip pat įvertinama naujai atsiradusi hiperkalcemija, radiologiškai aptinkami nauji piktybinių PL židiniai – plazmacitomos. Nesekretuojančios DM formos atveju vertinamas plazminių ląstelių skaičiaus pokytis KČ aspirate ar trepanobiopate, jei liga anksčiau įvertinta kaip turėjusi minimalų ar geresnį atsaką į gydymą, tačiau šiuo metu atsakas nebepasiekiamas, liga progresuoja gydymo metu ar 60 dienų po paskutinio gydymo kurso (41, 42).

2.1.3. Požymiai ir simptomai

Dažniausius DM simptomus nulemia KČ pažeidimas, pasireiškiantis anemija, didesne infekcijų rizika, taip pat kaulinio audinio pažeidimas, pasireiškiantis kaulų lūžiais, hiperkalcemija, ir inkstų funkcijos nepakankamumas bei jo nulemti simptomai. Šiuos pažeidimus sukelia piktybinės PL arba jų išskiriamos medžiagos. Simptomus galima apibūdinti anglišku trumpiniu CRAB (angl. *hyperCalcemia, Renal failure, Anemia, Bone lesions*) – hiperkalcemija, inkstų nepakankamumas, anemija, kaulų pažeidimas (24).

DM sergantiems pacientams aptinkami piktybinių PL židiniai, kurie pasireiškia kaip dariniai arba ardomo kaulo pažeidimo vietos. Kaulinio audinio pažeidimas neretai nulemia kaulų lūžius, ypač ligai pažengus, dažnai pasitaiko kompresiniai stuburo slankstelių lūžiai. Kartais pirmas DM pasireiškimo požymis yra būtent lūžis arba atsitiktinis kaulo struktūrą ardančių židinių aptikimas atliekant rentgenologinį tyrimą (43).

Skirtingai nuo kai kurių kitų piktybinių ligų, esant DM organizmo pažeidimą daugiausia nulemia ne naviko masės efektas ar ląstelių plitimas, bet piktybinių PL išskiriamos medžiagos – citokinai, M baltymas (31). Kaulų pažeidimą sukelia osteoklastų aktyvacija, osteoblastų supresija. Svarbi ne tik lokali osteoporozė aplink naviko masę, tačiau ir sisteminis poveikis, kadangi atsiranda daugybinių kaulinės destruktijos židinių, o tai nulemia kalcio atsipalaidavimą į kraujotaką ir hiperkalcemiją. Hiperkalcemija gali paveikti širdies veiklą, taip pat turi įtakos kitiems elektrolitų kiekiui jautriems audiniams (43).

Anemiją nulemia kaulų čiulpų pažeidimas ir sumažėjusi geba gaminti eritrocitus. Šį poveikį daugiausia sukelia ne kaulų čiulpų tūrinis peraugimas piktybinėmis ląstelėmis ar naviko masės poveikis, bet specifinės signalinės molekulės, kurios slopina eritrocitų gamybą panašiu mechanizmu, kaip ir lėtinių ligų anemijos atveju. DM lemia uždegiminio atsako ir citokinų pokyčius KČ – padidėjus IL-6 ir BMP-2 sekrecijai, didėja ir hepcidino sekrecija (23).

Inkstų nepakankamumas vystosi dėl piktybinių PL išskiriamų pataloginių imunoglobulinų, kurių nesugeba efektyviai filtruoti inkstai. Inkstų funkcijos nepakankamumas būdingas daugiau nei 50 % DM pacientų. Dažniausi patogenezės mechanizmai yra lengvųjų grandžių nefropatija, kai lengvosios grandys jungiasi su inkstų kanalėliuose gaminamais *Tamm–Horsfall* baltymais. Taip inkstų kanalėliuose formuojasi cilindrai, kurie sutrikdo inkstų funkciją ir nulemia nepakankamumą. Lengvosios grandys taip pat gali tiesiogiai pažeisti glomerulo pamatinę membraną ir sutrikdyti filtraciją (23).

Kiti simptomai atsiranda dėl padidėjusio baltymų – pataloginių imunoglobulinų ar jų komponentų kiekio, pavyzdžiui, padidėjęs kraujo klampumas. Taip pat dažna yra imunosupresija dėl sutrikusios įprastų imunoglobulinų sekrecijos. Pasitaiko ir kiti su DM susiję klinikiniai sindromai – AL amiloidozė, periferinė neuropatija, autoimuniniai sutrikimai; galimi ir tokie nespecifiniai simptomai, kaip karščiavimas (44).

2.1.4. Dauginės mielomos diagnostika

DM diagnostika remiasi laboratoriniais kraujo, šlapimo ir kaulų čiulpų tyrimais, taip pat vaizdiniais rentgenologiniais tyrimais. Surinkti anamnezę išlieka svarbu dėl pataloginių baltymų ar plazminių ląstelių proliferacijos sukeltų simptomų, pvz. kompresinių lūžių, inkstų veiklos sutrikimo, anemijos ar hiperkalcemijos sukeltų padarinių ir pojūčių. Įtarimą taip pat gali sukelti atsitiktiniai, atliekant vaizdinimo (klasikinį rentgenologinį, kompiuterinės tomografijos) tyrimus pastebėti daugybiniai besimptomiai kaulų pažeidimai, kompresiniai stuburo slankstelių lūžiai. Esant izoliuotiems ar pavieniams dariniams, pvz. solitarinei plazmacitomai, plazminės ląstelės gali būti aptiktos ir identifikuotos atlikus darinio biopsiją ir histologinį bei imunohistocheminį bioptato ištyrimą (24).

DM židiniai gali būti aptikti įprastu rentgenologiniu tyrimu, tačiau DM plitimui nustatyti taikomi tikslesni metodai. KT arba viso kūno mažų dozių KT būdu galima aptikti židinius kauluose, ypač jei aptikus vieną židinį norima patvirtinti solitarinės plazmacitomos, o ne išplitusios ligos diagnozę (45).

PET-KT, kaip ir MRT, leidžia aptikti židinius ir ne kauliniame audinyje, esant ekstramedulinės DM įtarimui.

Iktivėžinės būklės (pvz. NRMG) dažnai nesukelia pastebimų klinikinių simptomų, taigi gali būti aptinkamos atsitiktinai, atliekant kraujo tyrimus, pvz. taikant elektroforezės ar imunoglobulinų kiekiui nustatyti skirtas analičių paletes (30). Vieni pirmųjų pokyčių – M baltymo (arba M gradiento) aptikimas kraujo serume, naudojant baltymų elektroforezės tyrimą, su papildomu imunofiksacijos tyrimu konkrečiai M baltymo sudėčiai nustatyti. Naudingas ir laisvų lengvųjų grandžių tyrimas, ypač esant lengvųjų grandžių ligos formai. Taip pat svarbu identifikuoti piktybines plazmines ląsteles, dažniausiai kaulų čiulpuose, naudojant citomorfologinius, tėkmės citometrinius kaulų čiulpų aspirato tyrimus ar histologinį kaulų čiulpų trepanobioptato tyrimą (24).

Nors itin svarbu nustatyti M baltymą ir laisvas lengvasias grandis bei įvertinti jų kiekį, nes juos gamina piktybinės PL, tačiau pasitaiko išimčių – nesekretuojančių ligos formų, kai kraujo serume, šlapime neaptinkama nei patologinių imunoglobulinų ar jų komponentų, nei padidėjusio kiekio intaktinių imunoglobulinų, nei atskirų lengvųjų ar sunkiųjų grandžių. Tokios išimtys sudaro tik 3 % ligos atvejų (46). Šiais atvejais ypač svarbūs morfologiniai ar klinikinės ląstelių analizės tyrimai, pvz. tėkmės citometrija.

Baltymų elektroforezė – tai tyrimo metodas, kai makromolekulės, DM atveju baltymai, yra įleidžiami į laidžią terpę, kurioje paveikti elektrinio lauko juda priklausomai nuo molekulės svorio ir elektrinio krūvio. Serumo baltymų elektroforezei taikoma izoelektrinio fokusavimo elektroforezės modifikacija, kai baltymai sustoja neutralioje vietoje, kurioje krūvis nelemia tolesnio judėjimo. Serumo baltymų elektroforezės metu siekiama aptikti piktybinių PL gaminamą M baltymą, kuris savo krūvio ir molekulinės masės charakteristikomis skirsis nuo normalių kraujo serume aptinkamų baltymų, netgi panašios struktūros imunoglobulinų. Kadangi tai baltymas, artimas imunoglobulinams, jis dažnai aptinkamas serumo baltymų gama frakcijoje, tačiau dažnai to baltymo kiekis yra didesnis nei įprastų imunoglobulinų ir jis koncentruojasi konkrečioje frakcijos vietoje. Taip pat gali būti randamas ir kitose frakcijose arba tarp skirtingų frakcijų, kur paprastai aptinkami maži baltymų kiekiai. Kadangi M baltymą gamina kloninės PL, šis baltymas yra vienodos sudėties, taigi elektroforezės lauke koncentruojasi vienoje konkrečioje vietoje, skirtingai nei dauguma įprastų baltymų frakcijų, kurios dėl savo heterogeniškos sudėties pasklinda plačiau. Tai leidžia aptikti M baltymą ir atlikti tolesnius tyrimus jam identifikuoti (23).

Imunofiksacija yra metodas, leidžiantis aptikti specifinius M baltymą sudarančius antikūnus. Galima atskirai aptikti M baltymo – kloninio

imunoglobulino – sunkiausias (IgG, IgA, IgD, IgM, IgE) ir lengvasias grandis (kappa, lambda). Šis aptikimas turi reikšmės ne tik diagnozei patvirtinti ar ligai stebėti, tačiau svarbus ir ligos klasifikacijai, pavyzdžiui, aptikus IgM dažnai nustatoma limfoplazmocitinė limfoma. Laisvų lengvųjų grandžių tyrimas leidžia nustatyti ne intaktinių imunoglobulinų sudėtyje kraujo serume esančių laisvų kappa ir lambda lengvųjų grandžių kiekį ir santykį tarp jų, kuris diagnozuojant DM dažnai būna pakitęs (47).

Kiti laboratoriniai pakitimai, leidžiantys įtarti simptominę ligą, yra nulemti organų taikinių pažeidimo – hiperkalcemija, sumažėjęs hemoglobino kiekis – anemija, padidėjęs kreatinino ar kitų inkstų funkcijos žymenų kiekis kraujyje (24).

DM diagnostikai taip pat naudojami KČ aspirato ir trepanobioptato tyrimai. Kadangi dėl adhezinių savybių PL yra linkusios pasilikti kaulinėse čiulpų struktūrose, dažniau didesnis kiekis PL aptinkamas būtent trepanobioptate. Labai svarbi gera kaulų čiulpų aspiracijos mėginio kokybė, nes šiame mėginyje tiksliau atspindimas piktybinių PL kiekis. Taip pat atliekama 24 valandų šlapimo ėminio analizė, siekiant įvertinti naviko masę pagal M baltymo kiekį, išskirtą su šlapimu per šį laiką. Nustatant ligos riziką vertinami ir kiti biocheminiai kraujo tyrimai – beta-2 mikroglobulino, LDH, albumino, hematologiniai kraujo tyrimai – automatizuotas hematologinis kraujo tyrimas. Ligos rizikai vertinti svarbūs genetiniai tyrimai iš išgrynintų PL, kuriose nustatomi chromosominiai pakitimai. Tam taikoma FISH ir kariotipo analizė. Pagal chromosomų rinkinio ir struktūros pažeidimus (aneuploidiją, translokacijas) diagnozė dažniausiai nėra patvirtinama ar paneigiama, tačiau chromosominės aberacijos svarbios vertinant ligos riziką ir prognozę (3).

Tarptautinė mielomos darbo grupė (angl. *International Myeloma Working Group* – IMWG) nustatė įvairių DM stadijų, įskaitant IgM NRMG, ne-IgM NRMG, lengvųjų grandžių NRMG, RMM, ir simptominės DM diagnostikos kriterijus (žr. 1 lentelę) (42).

DM diagnozei būtinas mielomą apibrėžiantis įvykis – MDE (angl. *myeloma defining event*). MDE apima su PL ląstelių proliferacija siejamą organų pažeidimą – hiperkalcemiją, inkstų nepakankamumą, anemiją, kaulų pažeidimo židinius. Taigi, pagal IMWG apibrėžimą, DM diagnozei būtini CRAB kriterijai. Taip pat į kriterijus yra įtrauktas labai padidėjęs plazminių ląstelių kiekis kaulų čiulpuose, padidėjęs laisvųjų grandžių santykis, daugiau nei vieno kaulų destruktijos židinio nustatymas atliekant magnetinio rezonanso tomografijos ar kompiuterinės tomografijos tyrimus (45).

NRMG atveju aptinkamas M baltymas, tačiau diagnozei nustatyti serumo M baltymo koncentracija turi būti mažesnė nei 30 g/l, o PL kiekis kaulų čiulpuose – mažesnis nei 10 %, taip pat nenustatyta MDE (48).

Rusenanti DM (RDM) yra simptomais nepasireiškiantis sutrikimas, apibrėžiamas aptiktu didesniu nei 30 g/l M baltymo kiekiu ir/arba 10–60 % PL kaulų čiulpuose, tačiau jokių MDE neaptinkama (48).

Neseniai peržiūrėjus DM apibrėžimą, RDM pacientai, anksčiau laikyti turinčiais didelę progresijos riziką, buvo perklasifikuoti į sergančiuosius DM. Įvertinti progresavimo riziką yra gana svarbu, kadangi nustatyta, kad esant šiai rizikai ankstyvas gydymas nulemia geresnes baigtis ir NRMG, ir RDM pacientams (48).

1 lentelė. Plazminių ląstelių diskrazijų kriterijai. Sudaryta pagal Rajkumar ir kt. (2020) (49)

Liga	Kriterijai
Neaiškios reikšmės monokloninė gamapatija (NRMG) – ne IgM tipo	Turi atitikti visus tris kriterijus: <ul style="list-style-type: none"> • monokloninio baltymo (M baltymas) serume <30 g/l; • piktybinių plazminių ląstelių kaulų čiulpuose <10 %; • nėra organų pažeidimo, kuris būtų priskiriamas plazminių ląstelių proliferacinei ligai, pasireiškiančiai hiperkalcemija, inkstų nepakankamumu, anemija, kaulų pažeidimu (CRAB simptomai)
Rusenanti dauginė mieloma (RDM)	Turi atitikti abu kriterijus: <ul style="list-style-type: none"> • monokloninio baltymo (IgG ar IgA) serume ≥ 30 g/l arba $\geq 0,5$ g per 24 valandas šlapime ir/ar kloninių plazminių ląstelių kaulų čiulpuose 10–60 %; • nenustatyti mielomą apibrėžiantys įvykiai (MDE) ar amiloidozė
Dauginė mieloma (DM)	Turi atitikti abu kriterijus: <ul style="list-style-type: none"> • kloninių plazminių ląstelių kaulų čiulpuose ≥ 10 % arba biopsijos metodu aptikta plazmacitoma kauluose arba už kaulų čiulpų ribų;

	<ul style="list-style-type: none"> • vienas arba daugiau iš šių MDE: <p>Organų taikinių pažeidimo simptomai, kuriuos galima sukėlė plazminių ląstelių proliferacinis sutrikimas:</p> <p>hiperkalcemija: serumo kalcio kiekis $>0,25$ mmol/l didesnis nei viršutinė normalių verčių riba, arba $>2,75$ mmol/l;</p> <p>inkstų nepakankamumas: kreatinino klirensas <40 ml/min arba serumo kreatininas >170 μmol/l;</p> <p>anemija: hemoglobino kiekis >20 g/l mažesnis nei apatinė normalių verčių riba, arba <100 g/l;</p> <p>kaulų pažeidimas: vienas ar daugiau osteolizės židinių skeleto radiologiniame tyrime, kompiuterio tomografijos (KT) ar pozitronų emisijos tomografijos – KT (PET-KT) tyrime;</p> <p>kloninių plazminių ląstelių kiekis kaulų čiulpuose ≥ 60 %;</p> <p>serumo laisvų lengvųjų grandžių (LLG) santykis tarp kloninių plazminių ląstelių gaminamų ir normalių LLG ≥ 100 (kloninių plazminių ląstelių gaminamų LLG turi būti ≥ 100 mg/l);</p> <p>>1 osteolizės židinys (bent 5 mm dydžio) magnetinio rezonanso tomografijos (MRT) tyrime</p>
IgM tipo NRMG	<p>Turi atitikti visus tris kriterijus:</p> <ul style="list-style-type: none"> • monokloninio baltymo (IgM tipo) serume <30 g/l; • kloninių plazminių ląstelių kaulų čiulpuose <10 %; • nėra anemijos, B simptomų, kraujo plazmos klampumo padidėjimo, limfadenopatijos ar hepatosplenomegalijos, kurią būtų galima priskirti limfoproliferacijai
Lengvųjų grandžių NRMG	<p>Turi atitikti visus kriterijus:</p> <ul style="list-style-type: none"> • nenormalus laisvų lengvųjų grandžių kappa ir lambda santykis ($<0,26$ arba $>1,65$); • padidėjęs kiekis atitinkamo kloniškumo lengvųjų grandžių – padidėjusios kappa LLG pacientams su santykiu $>1,65$, arba lambda LLG pacientams su santykiu $<0,26$;

	<ul style="list-style-type: none"> • nepastebima sunkiųjų grandžių ekspresija imunofiksacijoje; • nėra organų taikinių pažeidimo, sietino su plazminių ląstelių proliferacine liga; • kloninių plazminių ląstelių kaulų čiulpuose <10 %; • monokloninio baltymo šlapime <500 mg/24 val.
Solitarinė kaulo plazmacitoma	<p>Turi atitikti visus keturis kriterijus:</p> <ul style="list-style-type: none"> • atlikus biopsiją nustatytas kaulo ar minkštųjų audinių pažeidimas, aptikus kloninių plazminių ląstelių; • nepakitę kaulų čiulpai neaptikus kloninių plazminių ląstelių; • skeleto apžvalginiai rentgenologiniai tyrimai, stuburo ir dubens MRT (arba KT) – be pakitimų, išskyrus pirminį izoliuotą židinį; • nenustatyta organų taikinių pažeidimo – hiperkalcemijos, inkstų nepakankamumo, anemijos ar kaulų pažeidimo (CRAB), kuri būtų galima priskirti plazminių ląstelių proliferacinei ligai
Solitarinė plazmacitoma esant minimaliai įtrauktiems kaulų čiulpams	<p>Turi atitikti visus keturis kriterijus:</p> <ul style="list-style-type: none"> • atlikus biopsiją nustatytas kaulo ar minkštųjų audinių pažeidimas, aptikus kloninių plazminių ląstelių; • kloninių plazminių ląstelių kaulų čiulpuose <10 %; • skeleto apžvalginiai rentgenologiniai tyrimai, stuburo ir dubens MRT (arba KT) – be pakitimų, išskyrus pirminį izoliuotą židinį; • nenustatyta organų taikinių pažeidimo – hiperkalcemijos, inkstų nepakankamumo, anemijos ar kaulų pažeidimo (CRAB), kuri būtų galima priskirti plazminių ląstelių proliferacinei ligai

Diagnozuojant DM svarbu įvertinti ligos prognozę, kurią nulemia progresavimo ar atkryčio rizika. Šiai rizikai įvertinti atliekami chromosominius pokyčius leidžiantys aptikti tyrimai – FISH (angl. *fluorescence in situ hybridisation*) dėl *IGH* translokacijų, kariotipavimas dėl aneuploidijų (hipodiploidijos ar trisomijų), taip pat molekulinis kariotipavimas dėl 17p delecijos ar kitų didelės rizikos aberacijų (1q duplikacija, 1p delecija, 13 chromosomos delecija (50)).

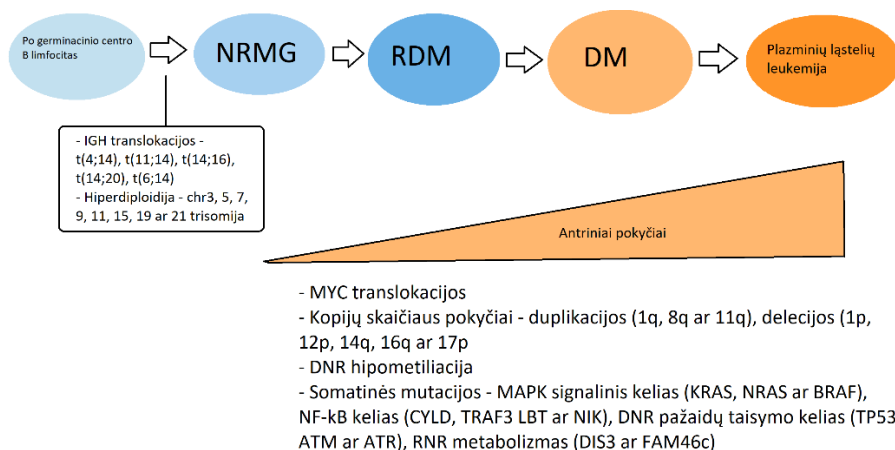
Konvencinį kariotipavimą, kai nustatomi chromosomų kiekio ar sudėties pokyčiai, patogų taikyti dažnai DM metu pasitaikančioms aberacijoms aptikti. Šį metodą taip pat galima pakeisti SNP (vieno nukleotido polimorfizmo – angl. *single nucleotide polymorphism*) mikrogardelės molekulinio kariotipavimo metodu, norint nustatyti tikslius kopijų skaičiaus pokyčius, chromosomines aberacijas – nelyginio skaičiaus chromosomų (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19) duplikacijas, ilgojo ar trumpojo chromosomos peties delecijas (50). Galima atlikti ir genų raiškos profiliavimo tyrimą (GEP, angl. *gene expression profiling*), kai nustatomas didelės ar standartinės rizikos įvairių genų mutacijų rinkinys (51).

Vis plačiau diskutuojama dėl cirkuliuojančių plazminių ląstelių (CPL) tyrimo, naudojamo DM diagnostikai. Didelei daliai pacientų CPL aptinkamos, taigi jų tyrimas veniniame kraujyje būtų pranašesnis nei KČ aspirato tyrimas dėl mažesnės intervencijos. CPL tyrimas galėtų būti atliekamas pirminei patikrai kartu su biocheminiais kraujo tyrimais. Pasiėkus pakankamą tyrimo jautrumą, periferinėje kraujotakoje galima nustatyti ir aberantinio fenotipo, piktybines PL, taip pat įvertinti piktybinių CPL fenotipo variantus, kurie gali turėti reikšmės DM prognozei (7).

2.1.5. Dauginės mielomos plazminių ląstelių genetiniai pokyčiai

DM yra genetiškai heterogeniška liga. Skirtumai pastebimi ne tik tarp skirtingų pacientų, bet ir tarp skirtingų klonų, aptinkamų vieno paciento navike. Intranavikinis heterogeniškumas – kai nustatomi skirtingi piktybinių ląstelių klonai – yra dažnesnis ikiklinikinėje ligos stadijoje (NRMG) ar diagnozės nustatymo metu, tačiau ligai progresuojant dažnai pastebimas vieno klono dominavimas. Taip pat gali atsirasti papildomų genetinių pažeidimų, kurios nulemia atsparumą gydymui ir tolesnę šio klono progresiją (52).

Nors pokyčiai heterogeniški, juos galima grupuoti (2 pav.). Išskiriami dviejų rūšių pirminiai, arba ligą inicijuojantys, genetiniai pokyčiai: hiperdiploidijos (trisomijos) ir ne hiperdiploidiniai pokyčiai – translokacijos (34). Hiperdiploidiniai pokyčiai – dažniausiai neporinio skaičiaus (išskyrus 1, 13 ir 21) chromosomų trisomijos – 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 ir/ar 21 (53).



2 paveikslas. Dauginės mielomos progresijos schema, pirminiai ir antriniai genetiniai pokyčiai. Parengta pagal Awada ir kt. (2021) (54)

Ne hiperdiploidiniai pirminiai pokyčiai – translokacijos, įtraukiančios 14 chromosomą, būtent joje esantį imunoglobulinų sunkiąją grandį (IgH) koduojantį IGH geną. Dažniausiai aptinkamos translokacijos t(4;14), t(6;14), t(11;14), t(14;16), t(14;20). IGH translokacijų lūžio taškai parodo, kad jos atsiranda vykstant germinacinio centro B limfocitų klasės keitimo rekombinacijai (55).

Dažniausiai aptinkama t(11;14) translokacija, iki 15–20 % DM atvejų. Translokacija t(11;14) siejama su *CCND1* genu 11 chromosomoje ir padidėjusia ciklino D1 ekspresija; ši translokacija siejama su standartinė ligos rizika. Translokacija t(4;14) įtraukia *MMSET/FGFR3* geną 4 chromosomoje, ji aptinkama 11–15 % DM atvejų ir laikoma blogos prognozės požymiu. Tiesa, kai taikomas šiuolaikinis gydymas proteosomų inhibitoriais (pvz. bortezomibu), pacientai, turintys šią translokaciją, pasiekia geresnes baigtis. Translokacijos t(14;16) ir t(14;20) yra retesnės, apima atitinkamai *c-MAF* ir *MAFB* genus ir yra siejamos su didele rizika ir prastesnėmis baigtimis net taikant modernų gydymą. Translokacija t(6;14) randama ~1 % pacientų ir nulemia *CCND3* raiškos padidėjimą (39).

Rečiau aptinkami mišrūs variantai, kai randama ir IGH translokacijos, ir trisomijos. Taip pat gali būti aptinkama izoliuota 14 chromosomos, kurioje yra IgH koduojantis genas, monosomija ar 14 chromosomos ilgojo peties (14q) delecija. Tačiau neretai diagnozuojant ligą neaptinkama jokių chromosominių aberacijų ar genetinių pokyčių, bent turinčių aiškų sąsają su DM patogenezė (34).

Antriniai pokyčiai dažniausiai formuojasi kaip kloninė evoliucija, atsakas į gydymą arba ligos progresavimas. Tarp jų yra ir dažniau naudojami tokie prognostiniai žymenys, kaip 17 chromosomos trumpojo peties (17p) delecija, apimanti p53 geną, *MYC* translokacijos, 1 chromosomos aberacijos (trumpojo peties – 1p delecija ar ilgojo peties 1q duplikacija (56)). Taip pat aptinkama 13 chromosomos delecija, *RAS* (*KRAS*, *NRAS*) genų mutacijos, *BRAF* geno mutacijos (39).

Atlikus genetinių mutacijų analizę nustatyta, kad dauguma naujai diagnozuotų DM (NDDM) atvejų aptinkamos unikalios ar retos mutacijos, kurias sunku grupuoti ar vertinti jų reikšmę dėl didelio heterogeniškumo (34). Vienas iš būdų vertinti šias heterogeniškas mutacijas yra ne išskirti atskiras mutacijas, bet vertinti pokyčių profilį, t. y. atlikti genų raiškos profiliavimą (GEP). Šis metodas leidžia pritaikyti duomenų bazėse sukauptą informaciją apie skirtingų ligos atvejų genetinį profilį, kuris gali būti skirstomas pagal prognozę, ir leidžia nuspėti numanomą konkretaus paciento prognozę (57).

2.1.6. Dauginės mielomos stadijos ir rizikos vertinimas

Diagnozuojant DM nustatoma ligos išplitimas, arba stadija, taip pat kiti veiksniai, nuo kurių priklauso ligos prognozė ir rizika – su pacientu susiję veiksniai, piktybinių ląstelių kiekis (naviko masė), vėžio biologinės savybės, atsako į gydymą prognozė (25). Didžioji dalis rizikos vertinimo susideda iš kraujo žymenų ir genetinių aberacijų tyrimo (58). Su pacientu susiję veiksniai, turintys svarios įtakos gydymo sėkmei, yra amžius, inkstų funkcija, paciento veiksnio vertinimo skalės, pvz. ECOG (angl. *Eastern Cooperative Oncology Group*)(59).

Riziką galima vertinti remiantis biocheminiais kraujo tyrimais ir genetiniais veiksniais – chromosomų aberacijomis. Viena iš tradicinių rizikos vertinimo skalių yra *Durie–Salmon* stadijos apskaičiavimo sistema, tačiau ją daug kur pakeitė tarptautinė ligos stadijos nustatymo sistema – ISS (angl. *international staging system*) ir peržiūrėta tarptautinė stadijos nustatymo sistema (angl. *revised – international staging system*)(12).

Pagal *Durie–Salmon* vertinimo sistemą liga skirstoma į tris stadijas, kurių kiekviena turi du potipius. Stadijos atspindi ligos išplitimą, arba naviko masę, o potipiai – inkstų funkciją (58). I stadija atitinka šiuos kriterijus: hemoglobino koncentracija >100 g/l, nepakitęs kalcio kiekis kraujyje, IgG >50 g/l arba IgA >30 g/l, monokloninio baltymo šlapime <4 g/24 val. ir rasta ne daugiau kaip vienas kaulų pažeidimo židiny. II stadija neatitinka nei I, nei III stadijos kriterijų. III stadija atitinka bent vieną iš sąlygų: hemoglobino koncentracija <85 g/l, kalcio <3 mmol/l, IgG >70 g/l, IgA >50 g/l, monokloninio baltymo

šlapime >12 g/24 val., daugybiniai kaulų pažeidimo židiniai arba lūžiai. DM vertinimo sistemos potipiai yra A ir B: A – kreatinino <177 $\mu\text{mol/l}$, B – kreatinino ≥ 177 $\mu\text{mol/l}$. *Durie–Salmon plus* klasifikacija papildomai vertina pažeidimo židinių kiekį, taip pat detalizuoja kreatinino koncentraciją.

Durie–Salmon ar *Durie–Salmon plus* klasifikacijas iš esmės pakeitė ISS (ir vėliau R-ISS) rizikos vertinimo sistema, kuri pagrįsta beta-2 mikroglobulino ir albumino koncentracija kraujyje. Abu šie veiksniai yra kliniškai nustatyti kaip turintys aiškia sąsają su ligos prognoze. Ligos sukeltas pažeidimas galutinai įvertinamas tik atsižvelgiant į pažeidimų visumą – kaulų pažeidimus, su liga susijusių organų pažeidimus – CRAB simptomus. Šis klinikinis vertinimas derinamas su rizikos skalėmis (ISS ar R-ISS).

M baltymo imunoglobulino klasė turi ryšį su ligos prognoze – nors dažniausiai aptinkama IgG sekretuojanti DM, tačiau IgA siejamas su didesniu ligos agresyvumu. IgD DM forma itin reta, tačiau taip pat vertinama kaip didelės rizikos liga, galimai susijusi su plazminių ląstelių leukemija, kurią apibrėžia didelis kiekis kraujyje aptinkamų piktybinių plazminių ląstelių (60). Kiti su agresyvia vėžio biologija susiję veiksniai – padidėjęs serumo LDH kiekis, taip pat plazminių ląstelių aptikimas periferiniame kraujyje. Panašus rizikos veiksnys – ekstramedulinės ligos (už kaulų čiulpų ribų) aptikimas, kadangi tai būdinga toliau pažengusiai ligai (60).

Didžioji dalis rizikos vertinimo siejama su vėžio biologinėmis savybėmis, kurias daugiausia apibrėžia pirminiai ir antriniai genetiniai pokyčiai. Įprastai taikomas kariotipavimas ir FISH iš KČ atrinktų CD138+ plazminių ląstelių (38). Su didesne rizika siejami pokyčiai – 17p delecija, 1q duplikacija, 1p delecija. Taip pat translokacijos t(4;14), t(14;16), t(14;20)(34). 1q yra viena dažniausiai aptinkamų aberacijų sergant DM ir kitoms piktybinėms ligoms, taip pat ji padeda numatyti DM prognozę (56).

2015 m. Palumbo ir kt. paskelbė IMWG darbo grupės rezultatus ir aprašė atnaujintus DM stadijos nustatymo kriterijus (R-ISS). R-ISS į vieną sistemą bando sujungti ISS pateikiamą vėžio stadijos vertinimą, tačiau taip pat vertina tris plačiai taikomus didesnės rizikos citogenetinius žymenis ir LDH koncentraciją kraujyje (1). Naudojant R-ISS klasifikaciją, tampa itin reikšmingi skirtingoms stadijoms būdingi išgyvenamumo ir laiko iki progresavimo skirtumai, kuriuos pakartotinai patvirtina klinikiniai tyrimai.

R-ISS remiasi ISS kriterijais (beta-2 mikroglobulinas, serumo albuminas), tačiau papildomai vertina serumo LDH ir didelės rizikos chromosomines aberacijas, aptiktas interfazės FISH izoliuotoje CD138 populiacijoje. R-ISS į DM ligos stadijos nustatymą įtraukia veiksnius iš ISS (beta-2 mikroglobuliną, albuminą), taip pat tris plačiausiai taikomus ir prieinamus genetinės rizikos veiksnius: t(14;16), t(4;14) ir 17p deleciją, taip pat LDH koncentraciją

kraujyje (61). R-ISS I – ISS I stadija ir įprastinės rizikos genetinės aberacijos, nepakitusi LDH koncentracija kraujyje; R-ISS II – nepriskiriama nei ISS I, nei ISS III; R-ISS III – ISS III stadija ir didelės rizikos genetinės aberacijos arba padidėjusi LDH koncentracija.

Su genetinių rizikos veiksnių vertinimu ypač susijusi mielomos stratifikacijos ir su rizika susijusios terapijos – m-SMART (angl. *Stratification for Myeloma and Risk-Adapted Therapy*) klasifikacija, kurioje yra išskiriama standartinės ir didelės rizikos DM liga. Šioje klasifikacijoje didelės rizikos veiksniai yra 17p delecija, translokacijos t(4;14), t(14;16), t(14;20), p53 geno mutacija, 1q duplikacija, taip pat didelės rizikos signalas GEP, R-ISS III stadija ir didesnė aptikta S-fazė plazminėse ląstelėse. Taip pat išskiriamos dviejų ar trijų didelės rizikos pažaidų DM, kuriai būdinga ypač didelė rizika.

2013 m. atnaujintoje m-SMART klasifikacijoje (26) taip pat galima išskirti tarpinės (tarp didelės ir standartinės) rizikos laipsnį, kuriam būdinga t(4;14), 13 chromosomos delecija, hipodiploidija, plazminių ląstelių dažymo indeksas >3 (aptinkamas atliekant histologinį tyrimą), tačiau tarpinės rizikos kategorija taikoma rečiau. Standartinė rizika – visi kiti genetiniai pokyčiai, tarp kurių minima t(11;14), t(6;14), trisomijos. M-SMART klasifikacija yra svarbi priimant sprendimą persodinti kaulų čiulpus ar pasirenkant kitą gydymo būdą (62).

Kitas didelės rizikos rodmuo yra ekstramedulinė liga – išplitimas į audinius už kaulų čiulpų ribų. Šios grupės pacientams būdingas ypač mažas išgyvenamumas, vidutiniškai 2-3 metai, (kai įprastinis DM pacientų išgyvenamumas siekia ir gali viršyti 5-10 metų) ir greitas ligos progresavimas. Susijęs blogos prognozės rodiklis yra didesnis CPL kiekis. CPL nustatymas ir imunofenotipas taip pat gali turėti reikšmės DM prognozei, kadangi seniai nustatyta CPL aptikimo ir blogos ligos prognozės sąsaja. Tačiau, kad būtų galima plačiau taikyti šį tyrimo metodą, reikalinga paties metodo harmonizacija (7) – panašių reagentų rinkinių naudojimas, – taip pat kriterijai, kurie leistų klasifikuoti pacientus. Netaikant aiškių standartų sunku vertinti konkrečią CPL aptikimo reikšmę, ypač kai naudojami skirtingi metodai ir CPL apibrėžimai (17).

Didelės rizikos ligos įvertinimas turi daug įtakos gydymo parinkimui (26). Plačiausiai priimtas didelės rizikos DM apibrėžimas apima R-ISS stadijos vertinimą, didelės rizikos citogenetinius tyrimus, remiantis m-SMART, ir padidėjusį LDH kiekį (12), tačiau galimi skirtingi didelės rizikos apibrėžimai. Yra išskiriama ir ypač didelės rizikos ligos kategorija, kai aptinkami šie pokyčiai: bialelinis TP53 netekimas arba 1q21 amplifikacija daugiau 4 kopijų, kartu nustatant ISS III stadiją. Šios kategorijos pacientų išgyvenamumas ypač mažas (vidutiniškai 1,7 metų) (61). GEP taip pat gali būti vertinamas didelei

rizikai nustatyti, tačiau nėra plačiai taikomas neklinikinėse studijose, nors yra įtrauktas į m-SMART apibrėžimą. GEP gali turėti sąsajų su prognoze ar terapijos parinkimu (57). Deja, iki šiol nerasta vieno aiškaus didelės rizikos genetinio žymens ar atsparumo terapijai mechanizmo – didelės rizikos DM yra gana heterogeniška, tačiau bendras bruožas yra terapijai atsparūs ląstelių klonai, kurie aptinkami MLL stadijoje (63).

2.1.7. Gydymas ir ligos stebėseną

Per pastaruosius dešimtmečius DM gydymui pradėta taikyti keletas skirtingų veikimo mechanizmų vaistų, kurie labai pagerino pacientų išgyvenamumą (64, 65). Naudojami tokie vaistai kaip proteosomų inhibitoriai, imunomodulatoriai, monokloniniai antikūnai prieš CD38 ir histonų deacetilazės inhibitoriai, dažnai rekomenduojami vaistų deriniai (8). DM dažniausiai nėra iki galo išgydoma, tačiau galima pasiekti gerą atsaką į terapiją. Taikant trijų ar keturių vaistų derinius, CR pasiekiamas net 70–80 % pacientų (66).

Viena plačiai naudojamų vaistų grupių – imunomodulatoriai. Tai tokie vaistai kaip talidomidas ir jo analogai, pvz. lenalidomidas. Jų veikimas pagrįstas poveikiu imuninei sistemai, citokinams, tačiau *in vivo*, tikėtina, stimuliuoja ir prieš vėžį nukreiptą imuninį atsaką per NK ir T limfocitus, esančius mikroaplinkoje (63). Taigi galima daryti prielaidą, kad ir imuninės sistemos būklė gydymo pradžioje, ir jos pokyčiai gydymo metu gali būti svarbūs parenkant ir vertinant šį gydymą, o imuninės sistemos būklė galima stebėti tėkmės citometrijos metodu (67).

Proteosomų inhibitorių ir imunomoduliatorių veikimo principas, pagrįstas apoptozės mechanizmų atkūrimu, taip pat užkerta daugelį signalinių kelių, kurie palaiko piktybinių PL augimą, proliferaciją, angiogenezę ir išlikimą (68).

Pagrindinė gydymo strategija, leidžianti pasiekti geriausių baigčių, tačiau ribojama paciento sveikatos būklės ir tokių veiksnių, kaip amžius ar inkstų funkcija, yra kamieninių kraujodaros ląstelių transplantacija (KKLT). Gydymo strategija susideda iš indukcijos, KKLT atlikimo, trumpos konsolidacijos ir palaikomojo gydymo. Esant didesnės rizikos prognozei, taikoma tandeminė KKLT – dviejų autologinių KKLT atlikimas per trumpesnę nei 6 mėnesių laikotarpį.

Dažnai naudojamos gydymo taktikos apima KKLT, jei paciento būklė gera, arba sudėtinę chemoterapiją, jei atlikti KKLT negalima. Gydymo eiga priklauso ir nuo diagnozės metu nustatytų didelės rizikos genitinių pokyčių (translokacijų t(4;14), t(14;16), t(14;20), 1q duplikacijos, 17p delecijos, arba

p53 mutacijos). Visuomet rekomenduojama pacientus įtraukti į klinikinius tyrimus tik nesant galimybės remtis standartinėmis schemomis. Taip pat didelės reikšmės turi recidyvinės ir (ar) refrakterinės DM gydymas, reikalaujantis skirtingos taktikos ir gydymo schemas keitimo (49). Geros klinikinės būklės pacientams taikoma didelių dozių terapija ir autologinė kraujodaros kamieninių ląstelių transplantacija (autoKKLT), po kurios skiriamas palaikomasis gydymas (8). Alogeninė KKLT neskiriama kaip pirmos eilės gydymas. Pacientams, kurių būklė neleidžia atlikti transplantacijos, galima pasirinkti kelis vaistų derinius indukcijai. Deja, liga yra laikoma neišgydoma, tačiau taikant šiuolaikinį gydymą 16% pacientų pasireiškia recidyvas per 1 metus, o vidutinis laikas iki recidyvo viršija 2 metus (24).

Jei pacientas tinkamas transplantacijai, atliekama indukcija (trijų ar keturių vaistų deriniu, įtraukiant prieš CD38 nukreiptą monokloninį antikūną), tuomet KKLT, o esant didelei rizikai – tandeminė KKLT, vėliau tęsiamas palaikomasis gydymas stebint pacientą. Palaikomojo gydymo ir stebėjimo laikotarpiu daug reikšmės turi ligos atsinaujinimo ar MLL tyrimai taikant tėkmės citometrijos metodą. Jei pacientas netinkamas KKLT arba liga yra gana mažos rizikos – galima indukcija, būtinai keturių vaistų deriniu, o po jos – stebėjimas, kraujodaros kamieninių ląstelių (CD34+) rinkimas, ilgalaikis stebėjimas ir esant ligos recidyvui – KKLT (3).

Jei nėra galimybės taikyti KKLT, išlieka kitos galimybės – gydymas mononokloniniais antikūnais (daratumumbas), imunomoduliatoriais (lenalidomidas), proteosomų inhibitoriais (bortezomibas) ir deksametazonu. Naudojant prieš CD38 nukreiptus monokloninius antikūnus svarbi ir tėkmės citometrija, leidžianti įvertinti, ar CD38 ekspresija plazminėse ląstelėse yra pakankama terapijai, tačiau toks gydymas kol kas nėra paplitęs (69).

Yra įvairių indukcijos schemas, kurias gali sudaryti proteosomų inhibitoriai (bortezomibas), alkilinantys agentai (ciklofosfamidai), imunomoduliatoriai (talidomidas, lenalidomidas) ir steroidiniai hormonai (deksametazonas). Tokių schemų yra daug, Europoje plačiai taikomas bortezomibo, talidomido ir deksametazono derinys (VTD). JAV labiau paplitęs bortezomibo, lenalidomido ir deksametazono derinys (VRD). Taip pat galimos indukcijos schemas įtraukiant ciklofosfamidą: ciklofosfamidai + talidomidas + deksametazonas (CTD)(70).

VRD derinys leidžia pasiekti geras baigtis esant naujai diagnozuotai DM. Tačiau ir VTD derinys, ypač kartu su daratumumabu – prieš CD38 nutaikytu monokloniniu antikūnu, taip pat yra veiksmingas. Sukurta ir naujos kartos proteosomų inhibitorių, pvz. karfilzomibas, tačiau klinikiniai tyrimai parodė, kad jie nepasižymi ženkliai geresniais rezultatais nei VRD (71). Pirmas

gydymo pasirinkimas esant naujai diagnozuotai DM yra VRD (bortezomibas-lenalidomidas-deksametazonas). Tačiau vienas svarbiausių veiksnių yra MLL statusas po konsolidacijos. Tačiau pacientams, kuriems išlieka teigiama MLL, reikia didesnę MLL neaptikimo tikimybę užtikrinančios terapijos, keturių vaistų derinio, įtraukiančio monokloninius antikūnus prieš CD38 (12).

Remisiją pasiekusius pacientus skirstant pagal tai, ar jiems aptinkama teigiama MLL, galima detalesnė prognozių diferenciacija – kai MLL neigiama, remisiją pasiekusių pacientų klinikinės baigtys yra geresnės – net nepaisant gydymo, kuriuo buvo pasiektas MLL neigiamumas (72). MLL neigiamumas turi didesnę įtaką baigtims nei diagnozės metu nustatyti didelės rizikos genetiniai veiksniai (72). Remisija, vertinama pagal neigiamą MLL rezultatą tėkmės citometrijos metodu, yra vienas patikimiausių prognostinių veiksnių, nulemiančių DM pacientų baigtis po atliktos KKL. 2008 metų studijos duomenimis (73), išgyvenamumo mediana nebuvo pasiekta MLL neigiamoje grupėje, o MLL teigiamoje grupėje buvo 89 mėnesiai.

2012 m. Paiva ir kt. (74) vertino įvairių veiksnių įtaką DM pacientų remisijos išlikimui daugiau nei vienerius metus. Vieninteliai veiksniai, kurie rodė patikimą ryšį su ilgalaikė remisija, buvo diagnozės metu nustatyti didelės rizikos genetiniai veiksniai ir ilgą laiką išliekanti neigiama MLL.

2014 m. prancūzų dauginės mielomos darbo grupė (*Intergroupe Francophone du Myelome*) paskelbė duomenis (75), kuriais įvertino transplantacijos po lenalidomido, bortezomibo ir deksametazono indukcijos, su paskesne lenalidomido palaikomąja terapija, rezultatus. Buvo pasiekti geri gydymo rezultatai, ypač tų pacientų, kuriems nustatyta neigiama MLL, – nė vienas šios grupės pacientų neturėjo recidyvo tyrimo laikotarpiu. Taigi MLL neigiamumas buvo susietas su gera prognoze.

2015 m. publikuotas pranešimas, kad išskirta griežtą (MLL neigiamą) CR pasiekusių pacientų grupę turėjo geresnes baigtis būtent dėl apibrėžime įtraukto neigiamo MLL statuso (76), o laisvųjų grandžių santykio pakitimai neprisideda prie blogesnės prognozės. Taip pat buvo nustatyta, kad išliekanti teigiama MLL susijusi su prasta prognoze.

2015 m. apžvalgoje (77) Paiva ir bendraautorai aprašė kelis dešimtmečius kaupiamus įrodymus, kad didėjant remisijos pasiekimo dažniui tarp DM pacientų, vis didesnę svarbą recidyvo tikimybei nuspėti turi gydymo stebėjimas taikant MLL tyrimus tėkmės citometrijos, PGR ar PET/KT metodais. MLL tyrimai gali ir turėtų būti naudojami kaip gydymo vertinimo biožymuo, taip pat būti išgyvenamumo, kaip tyrimo baigties, pakaitinis rodiklis. Buvo iškeltas visiško atsako (CR) apibrėžimo klausimas. Pastebėta, kad CR nustatymas remiantis palankiais biocheminiais rodikliais (pvz. neigiama imunofiksacija), plazmacitomų neaptikimu ir <5 % plazminių

ląstelių kaulų čiulpuose yra nepakankami rodikliai spręsti apie ligos prognozę. Buvo iškelta griežto CR (sCR) idėja, kurią vėliau priėmė ir paskelbė IMWG (2 lentelė). Taip pat buvo paminėta galimybė naudoti duomenų bazes, kuriose yra piktybinių ir gerybinių plazminių ląstelių imunofenotipai. Tai leistų taikyti automatinę analizę ir taip sumažinti analizės kompleksiskumą. IMWG paskelbė atsako kriterijus, į kuriuos įtrauktas MLL vertinimas.

2 lentelė. IMWG atsako į gydymą kriterijai

Visiškas atsakas	Neigiama serumo ir šlapimo imunofiksacija, minkštųjų audinių plazmacitomų išnykimas ir <5 % plazminių ląstelių kaulų čiulpuose
MLL neigiama pagal naujos kartos tėkmės citometriją – NGF (angl. <i>next generation flow</i>)	Visiškas atsakas, neaptikta kloninių PL KČ naudojant <i>Euroflow</i> arba kitą validuotą metodą, kurio jautrumas bent 10^{-5}
MLL neigiama pagal naujos kartos sekvenavimą – NKS (angl. <i>next generation sequencing</i>)	Visiškas atsakas, neaptikta kloninių PL KČ naudojant NKS pagrįstą kloniškumo tyrimą, kurio jautrumas bent 10^{-5}
Vaizdinimo tyrimai, neaptikta MLL	Kaulų čiulpų MLL neaptikta (pagal NGF/NKS), visų didesnio žymens kaupimo zonų išnykimas lyginant su ankstesniais PET/KT arba sumažėjimas iki mažesnio nei mediastinalinės kraujotakos arba aplinkinių audinių standartinio sunaudojimo kiekio
Išliekantis MLL neigiamumas	Kaulų čiulpų MLL neigiamumas (NGF/NKS) ir neigiami vaizdinimo tyrimai, tarp kurių bent 1 metų pertrauka

2016 m. Rawstron ir kt. (78) aprašė poreikį naudoti MLL kaip stebimąją baigtį klinikiniuose tyrimuose, kadangi naudojant šiuolaikinį gydymą didelės dalies pacientų išgyvenamumas viršija 5 metus, o tai reiškia, kad trečios fazės klinikiniai tyrimai, lyginantys vaistus, užtruktų itin ilgai, jei būtų lyginamas vien išgyvenamumas. Buvo pažymėta, kad MLL siejosi su išgyvenamumu ir laiku iki progresavimo, taip pat kad MLL tyrimą galima pritaikyti daugumai

pacientų. 2017 m. Munshi ir kt. (79). publikuotos meta-analizės duomenimis, MLL statusas gali nuspėti DM pacientų išgyvenamumą. Tai būtų esminis faktas, leidžiantis naudoti MLL statusą kaip pakaitinę baigtį klinikiniuose tyrimuose, kadangi, kaip minėta, pasiekti statistiškai reikšmingus išgyvenamumo skirtumus užtrunka keletą metų ar ilgiau. MLL neigiamumas buvo siejamas su ilgesniu laiku iki progresavimo ir ilgesniu išgyvenamumu nepaisant pasiekto gydymo rezultato – ir CR pasiekusiems, ir kitiems pacientams. Taigi MLL neigiamą statusą galima traktuoti kaip nepriklausomą prognostinį veiksnį, paremiant ir jo naudojimą klinikiniuose tyrimuose. 2018 m. Spencer ir kt. (80) lygino pacientus, gydomus prieš CD38 nutaikytu monokloniniu antikūnu – vaistu daratumumabu, ir juo negydomus. Kaip antrinė baigtis buvo stebimas laikas iki ligos progresavimo pagal MLL statusą – abiejose pacientų grupėse neigiamą MLL turintys pacientai turėjo statistiškai ilgesnį laiką iki ligos progresavimo. Nors vartojant daratumumabą laikas iki progresavimo buvo ilgesnis, tačiau abi MLL neigiamos grupės turėjo geresnes baigtis, nepaisant gydymo. 2018 m. Gambella ir kt. (81) vertino MLL senesniu aleliams specifinių oligonukleotidų metodu, taip pat tėkmės citometrija. Buvo vertinama lenalidamido palaikomoji terapija, kurią gaunantiems pacientams buvo dažniau nustatoma neigiama MLL, ir remisijos trukmė buvo ilgesnė. . Taip pat pastebėta, kad MLL aptikimo statusas turėjo reikšmingesnį poveikį laikui iki ligos progresavimo, nei standartiniai rizikos veiksniai. Rasta gera koreliacija tarp molekulinio ir tėkmės citometrijos metodo nustatant MLL. 2020 m. Cavo ir kt. (82) palygino skirtingas gydymo schemas, taikytas naujai diagnozuotos DM atvejais (su ir be konsolidacijos), tačiau kaip antrinę stebimą baigtį lygino pacientų su aptinkama ir neaptinkama MLL baigtis. Jei MLL buvo neaptinkama palaikomojo gydymo metu, laikas iki ligos progresavimo buvo daug ilgesnis.

Senesni gydymo atsako kriterijai rėmėsi tik monokloninių baltymų aptikimu serume ar šlapime, taip pat kaulų čiulpų trepanobioptato vertinimu, kurio jautrumas nepakankamai didelis. Ligai stebėti reikalingi nauji kriterijai. Juos apibrėžė IMWG ir tie kriterijai apima gilesnį atsaką į gydymą, nei klasikinė CR (42). Pirminiai KČ atsako kriterijai reikalavo mažiau nei 5 % plazminių ląstelių KČ, nediferencijuojant jų piktybinės ar gerybinės kilmės. Vėliau atsirado tikslesni biocheminiai tyrimo metodai, leidžiantys aptikti nedidelį kiekį patologinio baltymo, taip pat galimybė išmatuoti laisvas lengvasias grandis. Tačiau klinikiniai tyrimai, kaip antai atlikti Ispanijos mielomos grupės (PETHEMA/GEM), parodė, kad net esant biochemiškai neaptiktam patologiniam baltymui vis vien galima aptikti teigiamą MLL, ir šių pacientų ligos baigtys bus blogesnės (83). Panašūs radiniai gauti ir Rawstron ir kt. atliktame MRC IX tyrime (42).

Taip pat nustatyta, kad MLL neaptikimas po gydymo gali būti svarbesnis veiksnys, nulemiantis ligos progresavimą, nei diagnozės metu nustatyta rizika. PETHEMA/GEM grupės duomenimis, R-ISS I, II, ir III stadijos pacientams, kuriems nustatyta neigiama MLL, laikas iki ligos progresavimo buvo vienodas (83). Galima teigti, kad išsiskiria grupė pacientų, kuriems ligos progresavimo rizika vien remiantis NGF MLL neigiamu tyrimo rezultatu yra daug mažesnė. Tačiau pasitaiko išimčių – pacientų, kuriems neaptinkama MLL, tačiau vėliau pasireiškia ligos recidyvas. Viena iš galimų priežasčių – nevientisas ligos plitimas, kai formuojasi solitariniai dariniai (plazmacitomos), iš kurių nepaimamas mėginys tyrimui ir piktybinės PL neaptinkamos. Vienas iš būdų išspręsti šią problemą yra MLL tyrimų derinimas su vaizdiniais (PET/KT) tyrimais, ką rekomenduoja IMWG (82, 42). Tokie tyrimai leidžia aptikti ekstramedulinį (už kaulų čiulpų ribų vykstantį) ligos plitimą, kuris siejamas su progresuojančia liga ir blogesnėmis baigtimis. Neatsižvelgus į nevientisą ligos plitimą, galimas klaidingai neigiamas MLL rezultatas (72).

Dažniausi KČ MLL nustatymo metodai yra NKS ir NGF tėkmės citometrija (84). Abiem metodais gaunami rezultatai yra suderinami, kai pasiekiamas panašus jautrumas (85), rezultatų atitikimas įvairiose pacientų grupėse siekia 76–94,4 %, didžiausi neatitikimai yra ties jautrumo riba 10^{-6} .

Idealus metodas turėtų atitikti šiuos kriterijus: pasižymėti dideliu pritaikomumu (daugumai pacientų), dideliu jautrumu ir specifiskumu, būti patikimai atliekamas (rezultatai gaunami daugumai pacientų), lengvai prieinamas, greitai atliekamas ir su mažu kiekiu mėginio, kurį lengva pervežti, turėti pakartojamumą, įrodytą klinikinę vertę ir pateisinamą kainą. Deja, kol kas nėra testo, kuris atitiktų visus šiuos reikalavimus (42).

Kalbant tėkmės citometrija, būtina išskirti naujus, *EuroFlow* konsorciumo sudarytus naujos kartos tėkmės citometrijos (angl. *next-generation flow cytometry* – NGF) protokolus, kurių tikslas – didesnis tyrimų jautrumas ir harmonizacija. Ir NGS, ir NGF gali pasiekti jautrumą iki 10^{-6} – tai yra aptikti vieną piktybinę plazminę ląstelę iš vieno milijono. Dauguma laboratorijų geba pasiekti jautrumą 10^{-4} , o toks jautrumas, įrodyta, siejamas su skirtinga CR pasiekusių pacientų prognoze (6). Tačiau šiuo metu įmanoma pasiekti didesnę – 10^{-5} ar NGF atveju net 10^{-6} jautrumą, kuris leidžia dar tiksliau nustatyti prognozę (86).

Kiekvienas logaritminis (dešimteriopas) MLL sumažėjimas siejamas su geresnėmis baigtimis. Klinikiniai tyrimai, pvz. IFM-2009 ir PETHEMA/GEM2012MENOS65, parodė, kad ligos baigtys yra geresnės lyginant 10^{-5} ir 10^{-6} pasiektą MLL (14).

2021 m. Narita ir kt. paskelbė, kad sCR pasiekimas siejamas su gerokai ilgesniais bendru išgyvenamumu ir laiku iki ligos progresavimo. MLL ir CR buvo vertinami pagal IMWG kriterijus. Taip pat buvo pastebėta skirtumų tarp lengvųjų grandžių DM, kai aptinkamos tik laisvos lengvosios grandys, ir visą nepakitusį imunoglobuliną produkuojančios DM. Tačiau ši studija buvo parinkusi 10^{-4} aptikimo ribą, kuri yra per žema pagal pačias naujausias rekomendacijas, todėl, tikėtina, sumažino MLL aptikimo prognostinę vertę. Panašūs stebėjimai atliekami ir su kitomis ligomis. Pavyzdžiui, B-ūminės limfoblastinės leukemijos MLL tyrimuose gydymo pradžioje matuojama MLL, pagal kurios aptinkamą kiekį ir išnykimą pacientai yra skirstomi į didesnės ar standartinės rizikos grupes. Vėliau, gydymo metu, intensyvesnė terapija MLL teigiamų grupių gydymo rezultatus priartina prie MLL neigiamų (87).

Taip pat MLL stebėjimas gydymo metu ir jos pokyčiai ar KČ, ar PK gali nulemti tolesnio gydymo sėkmę. Tai suteiktų galimybę laiku keisti gydymą arba išvengti ankstyvo recidyvo (16). Taip pat pastebėta, kad CPL stebėjimas ir kiekio nesumažėjimas po vieno gydymo ciklo gali lemti trumpesnę laiką iki ligos progresavimo ir trumpesnę išgyvenamumą (16).

2021 m. Narita tyrė DM laisvų lengvųjų grandžių ir nepakitusių imunoglobulinų pacientų grupes, kurios pasiekė gerą dalinį atsaką arba geresnį nei gerą dalinį atsaką. Buvo pasirinkta neigiama MLL riba $<1 \times 10^{-4}$, ir lyginti pacientai siekiant įvertinti, ar skiriasi jų išgyvenamumas priklausomai nuo MLL statuso ir pasiekto sCR. Išgyvenamumo ir atsako skirtumai buvo pastebimi lengvųjų grandžių grupėje, lyginant sCR ir MLL statusą, tačiau panašaus skirtumo nebuvo lyginant nepakitusių imunoglobulinų grupę. Ypač mažas MLL procentas buvo geros baigties kriterijus, nepriklausomai nuo bet kurių kitų veiksnių.

2.2. Tėkmės citometrijos metodas

2.2.1. Tėkmės citometrijos tyrimo eigos principai

Pagrindinis tėkmės citometrijos metodo pranašumas ir principas yra pavienių ląstelių imunofenotipo įvertinimas ir jo analizė. Mėginyje esančių ląstelių srautas išrikiuojamas taip, kad pro lazerio spindulį eitų tik viena ląstelė vienu metu. Tam pasiekti naudojamas hidrodinaminis fokusavimas (88). Principo pagrindas jau seniai naudojamas hematologiniuose kraujo analizatoriuose, veikiančiuose *Coulter* principu. Pavienių ląstelių analizė suteikia galimybę įvertinti skirtingų ląstelių požymių visumą, taip identifikuojant norimas ląsteles ar piktybinių ląstelių pokyčius (89). Taip pat

naudojami lazerio šviesos sklaidos principai, kurie leidžia analizuoti tam tikras ląstelių fizines savybes. Ląstelės suspensijoje po vieną keliauja pro lazerio spindulį ir detektorius. Hidrodinaminis fokusavimas leidžia nešančiam skysčiui iš mėginio suformuoti pakankamai siaurą, vienos ląstelės pločio srautą (90).

Šiuolaikinė daugelio parametrų tėkmės citometrijos metodika remiasi pavienių ląstelių paviršiuje, citoplazmoje ar branduolyje esančių baltymų nustatymu. Šie baltymai taip pat vadinami ląstelių žymenimis – tai biožymenys, kurių raiškos, arba ekspresijos, intensyvumas leidžia identifikuoti normalias ar pakitusias – vėžines ar aberantines ląsteles ir jas aprašyti. Ląstelėms galima priskirti kilmę, patologinę ar nepatologinę prigimtį, funkciją, imuninį statusą, aprašant ir piktybines, atipines, ir normalias ląsteles (89).

Pagrindinės tėkmės citometrijos analizatoriaus dalys – skysčių sistema, šviesos šaltiniai, šviesos jutikliai ir duomenų registravimo bei analizės programinė įranga. Galimos kitokios papildomos dalys, kurios modifikuoja veikimo ar mėginio surinkimo principą. Akustinio fokusavimo tėkmės citometrijai naudojamos garso bangos, kad būtų galima geriau fokusuoti ląsteles. Ląstelių rūšiuotuvai (angl. *cell sorter*) leidžia nustacius tam tikro žymens raišką jį ekspresuojančią (ar neekspresuojančią) ląstelę nukreipti į tam tikrą surinkimo mėgintuvėlį, naudojant magnetus, nukreipiančius skysčio srovę po analizės. Vaizdiniai citometrai – yra mikroskopijos ir citometrijos derinys (91). Masės citometrijos esmė ta, kad vietoje tradicinių fluorochromų naudojami su monokloniniais antikūnais sujungti sunkiųjų metalų jonai, kurie detektuojami masių spektrometrijos būdu. Privalumai – siauras signalo aptikimo spektras, nereikalaujantis kompensavimo, taip pat daug didesnis vienu metu nustatomas žymenų kiekis. Tačiau yra ir trūkumų, kuriais nusileidžia tradicinei tėkmės citometrijai: tiriamas mėginys yra sunaikinamas, tradicinių šviesos spindulio sklaidos parametrų, mėginio praleidimas daug lėtesnis (91). Kitas tėkmės citometrijos būdas – spektro analizatoriai, kai detektuojamas visas išspinduliuotos šviesos spektras, o tai leidžia nustatyti tam tikro biožymens spektro pobūdį, vadinasi, tiksliau identifikuojami aptikti žymenys, nereikia matematiškai kompensuoti spektrų sanklotos, kad būtų galima nustatyti tikslią ekspresiją (19).

Tėkmės citometro skysčių sistemos principas – mėginyje esančių tiriamų ląstelių nešimas pavieniui pro lazerio šviesą. Tam formuojamas pavienių ląstelių srautas, o susikirtimo su lazerio spinduliu vietoje matuojama tik vienos ląstelės charakteristika. Tam naudojami įvairūs srauto formavimo būdai, tarp jų hidrodinaminis fokusavimas. Kartu su mėginiu skysčių sistema leidžia papildomą nešantį skystį, kuris išleidžiamas laminaraus, arba

sluoksninio, srauto pavidalu, kartu leidžiant mėginyje esantį skystį. Šiam tikslui naudojamas apgaubiantis nešančio skysčio srautas (angl. *sheath fluid*), į kurio ašį lėčiau švirksčiama mėginio suspensija. Nešantis skystis apsupa mėginio ląstelių suspensiją, ir jas greitai siauresniu kanalu nuneša iki lazerio spindulio ir mėginio susikirtimo vietos. Galutinis skysčio srauto skersmuo būna kiek didesnis, nei pačios ląstelės – apie 70 mikrometrų. Priklausomai nuo mėginio ėmimo greičio nustatymų ir analizatoriaus charakteristikos, pro lazerio spindulį gali būti praleista nuo kelių tūkstančių iki kelių dešimčių tūkstančių ląstelių per sekundę (91).

Taip pat veikimui būtini šviesos šaltiniai – lazeriai. Veikimo principas – naudojami lazeriai, skleidžiantys tam tikro bangos ilgio šviesą. Dažniausiai naudojami raudonos (633–637 nm), mėlynos (488 nm), violetinės (405–407 nm), žaliai geltonos (514 nm) šviesos bei ultravioletinių ir infraraudonųjų spindulių lazeriai. Didesnis lazerių kiekis leidžia naudoti didesnę kiekį skirtingų fluorochromų – kadangi skirtingus fluorochromus sužadina skirtingo bangos ilgio lazerio šviesa. Lazeriai spinduliuoja tam tikro bangos ilgio spindulį, kurį sugeria fluorochromas, sujungtas su tam tikru monokloniniu antikūnu, kuris pritvirtintas prie ląstelės paviršiaus (92).

Seniausi lazeriai buvo žaliai melsvi (488 nm), ir jiems pritaikytas fluoresceinas (FITC). Ši pora vis dar itin dažnai taikoma kaip derinys. Vėliau buvo atrastas fluorochromas fikoeritrinas (PE). Po to išrasti tandeminiai PE konjugatai (PE-Cy5, PE-Cy5,5, PE-CY7), kurie pasižymi skirtingais šviesos sugėrimo ir išskyrimo spektrais. Vėliau daugėjo įvairių lazerių ir fluorochromų derinių, siekiant praplėsti naudojamas spektro dalis ir suteikti kuo didesnę kiekį įmanomų žymenų derinių vienu metu (93).

2.2.2. Šviesos šaltinio ir signalų registravimo sistema

Prie ląstelių prijungtų ir lazeriu sužadintų fluorochromų išspinduliuotos šviesos signalai yra stiprinami ir paverčiami suprantamais naudojant programinę įrangą – spektrų atskyrimą pagal ląstelės aptikimo laiką, skirtingų aptiktų signalų atskyrimą. Tėkmės citometrijoje naudojami specifinio bangos ilgio lazeriai, gebantys sužadinti specifinius fluorochromuose naudojamus dažus – fluoroforų molekules. Kuo didesnis spindulių kiekis, tuo daugiau skirtingų rūšių fluorochromų galima sužadinti, ir didėja geba identifikuoti didesnę kiekį ląstelių paviršiaus žymenų (94).

Lazerio spindulys pačios ląstelės yra paveikiamas dvejopai. Priekinė sklaida (angl. *forward scatter* – FSC) yra nustatoma priešingoje nei lazeris dalelės pusėje ir atspindi santykinį ląstelės dydį. Šoninė sklaida (angl. *side scatter* – SSC) yra nustatoma 90 laipsnių kampu nuo lazerio ir atspindi ląstelės

vidinių komponentų kompleksiskumą arba grūdėtumą. Kuo didesnė šoninė sklaida, tuo daugiau ląstelės viduje yra elementų – segmentuotas branduolys, granulės (būdingos monocitams ar granulocitams). Kuo mažesnė sklaida – tuo mažiau vidinio kompleksiskumo, pvz. tik branduolys ir mažai citoplazmos (limfocitai) (95).

Fluorochromai yra tam tikros fluorescuojančios molekulės ir monokloninio antikūno konjugatai. Fluorescencinė molekulė gali būti iš vieno komponento arba gali turėti vieną dalį, kuri sugeria šviesos bangas, o kitą – kuri švyti. Dauguma fluorochromų nespinduliuoja vieno specifinio bangos ilgio šviesos, o švyti tam tikrame spektre, kurio pikas yra viename ar keliuose bangos ilgio diapazonuose. Dėl šio fakto, naudojant daugiau nei vieną fluorochromą, reikalingas tam tikras skirtingų signalų diferencijavimas, naudojant kompensavimą – matematinius veiksmus, kurie leidžia pašalinti nenorimo signalo įtaką matuojamam signalui (96).

Šviesos signalų detektoriai – paprastai iš fluorochromų spinduliuojama šviesa yra pernelyg silpna, kad galėtų būti registruojama, taigi reikia pirminio šviesos stiprinimo. Tam naudojami fotomultiplikacijos vamzdeliai – PMT (angl. *photomultiplier tubes*). PMT naudoja katodus ir anodus šalto vakuumo sąlygomis, kad sukeltų šviesos signalo nulemtą elektrinį signalą. Proceso metu generuojami papildomi elektronai, kurie stiprina signalą. Galutinis iš fotomultiplikacijos vamzdelių gautos informacijos registravimas vyksta prie tėkmės citometrijos analizatoriaus prijungtame kompiuteryje, kuriame yra reikalinga programinė įranga (93). Įrašoma signalų informacija visuose norimuose detektorių kanaluose, kartu ir ląstelių surinkimo laiko informacija. Taip pat išsaugoma informacija apie eksperimentą, priklausomai nuo naudojamos aparatūros – kokia naudojamo įrenginio konfigūracija, lazeriai, kokie fluorochromai naudoti, kiek laiko vyko duomenų rinkimas. Informacijai išsaugoti naudojamas standartinis FCS failo formatas (97).

2.2.3. Tėkmės citometrijos reagentai

Nuo šviesos spindulio sklaidos nepriklausomi parametrai remiasi ląstelių dažymu – sujungimu su reagentais. Šios medžiagos turi savybę sugerti lazerio šviesą ir išspinduliuoti kito bangos ilgio šviesos spindulius, kuriuos aptinka detektoriai. Tai gali būti medžiagos, kurios savaime dažo tam tikrus ląstelės komponentus, arba monokloniniai antikūnai, sujungti su fluorochromais, kurie pasižymi minėtomis savybėmis. Monokloninių antikūnų paskirtis yra jungtis tik prie tam tikrų paviršiaus ar vidaus baltymų, kurių aptikimą ir santykinį kiekį ląstelėje parodys išspinduliuotos šviesos kiekis (89).

Ląstelės gali būti dažomos fluorescenciniais dažais, pvz. propidžio jodidu, dažančiu DNR, arba su fluorescencinėmis molekulėmis konjuguotais monokloniniais antikūnais – fluorochromais. Veikimo principas – antigeno ir antikūno sąveika. Naudojami fluorochromai, kurie sugeria vieno bangos ilgio spindulį, tačiau išleidžia kito bangos ilgio. Yra tam tikri nustatyti fluorochromų absorbcijos ir emisijos spektrai (95). Jei norimas nustatyti žymuo, kurio koncentracija ląstelėje maža, reikia naudoti stipriau švytinčius žymenis, jei koncentracija didelė – silpniau. Jei taikoma terapija prieš tam tikrą žymenį (pvz. CD38), verta naudoti ne vieno, o daugelio epitopų (multiepitopinius) monokloninius antikūnus, kurie galėtų jungtis prie ląstelių net taikant terapiją (5).

Fluorochromai gali patys tiesiogiai dažyti tam tikras ląstelės elementus, struktūras arba būti sujungti su antikūnu prieš tam tikrus baltymus. Dažniausiai tėkmės citometrijos būdu tyrinėjamiems baltymams yra suteikiami CD (angl. *cluster of differentiation*) nomenklatūros numeriai (pvz. CD1a, CD2 ir t. t.), kurių šiuo metu yra įvardyta beveik keturi šimtai (91).

Dažai gali sugerti vieno ar kelių skirtingų bangos ilgių lazerių šviesą, taip pat spinduliuoja plačiu diapazonu, taigi norint atskirti skirtingų fluorochromų signalus būtina suderinti naudojamus lazerius, fluorochromus ir detektorius. Sustiprintas signalas yra fiksuojamas duomenų apdorojimo sistemos ir automatiškai užrašomas į standartinį FCS formato failą. Įrašomas FCS failas, kuriame yra visa visi duomenys, taip pat papildomi duomenys apie rinkimą (rinkimo laikas, naudoti lazeriai, fluorochromai). FCS failų standartas sukurtas 1984 m. Visi FCS duomenų failai turi .fcs plėtinį ir gali būti atidaryti bet kurios tėkmės citometrijos duomenų analizės programos, o naujausias FCS standartas yra FCS 3.1 (97).

2.2.4. Duomenų analizė

Į duomenų failų analizę įeina keli etapai: kompensavimas, pakopinis duomenų pasirinkimas, arba *geitavimas* (angl. *gating*), kuris gali būti automatizuotas, su operatoriaus priežiūra, duomenų įvertinimas ir interpretavimas, išvadų darymas.

Kompensavimas – tai matematinė operacija, leidžianti sumažinti fluorochromų švytėjimo spektrų sanklotos įtaką vieno kitam. Kadangi fluorochromai švyti ne viename konkrečiame bangos ilgyje, o diapazone, vieno fluorochromo signalui fiksuoti skirtas detektorius gali pagauti dalį kito fluorochromo skleisto šviesos spektro. Norint sumažinti tokių tariamai užfiksuotų signalų kiekį, iš tikrojo norimo signalo detektuojamų signalų kanalo atimama tam tikra dalis kito, galimai interferuojančio signalo stiprumo.

Taip galima sumažinti interferuojančio signalo įtaką iki žemesnės nei teigiamą ekspresiją nurodančios ribos (19).

Pakopinis duomenų parinkimas – dažniausiai tai vieno ar dviejų žymenų derinių naudojimas, norint visų pirma atskirti gyvybingas, analizuotinas ląsteles, o antra – priskirti ląsteles prie reikiamų populiacijų (98).

Gautus duomenis dažniausiai vertina patyręs specialistas, tačiau dalinė interpretacija galima tam tikroje programinėje įrangoje – automatiškai pateikiamos normalių ląstelių populiacijų ribos, taip pat pasiūlomas nustatyto ląstelių fenotipo vertinimas. Duomenų analizė remiasi pakopiniu apibrėžimu atvejų (angl. *events*) – taškinės diagramos taškų, kurie atitinka norimus parametrus. Dažniausiai naudojami dviejų parametrų deriniai taškinėje diagramoje. Taip pat galima vieno parametro analizė, kuomet apibrėžimas vykdomas vienos ašies histogramoje (98). Daugumoje šių etapų automatizacija nėra galima, tačiau ląstelių populiacijų skirstymas gali būti iš dalies automatizuotas – pritaikant patyrusio analizatoriaus priežiūrą.

Itin svarbios ribos, kurios parenkamos kaip nuo foninio švytėjimo besiskirianti tam tikro žymens ekspresija. Toks ekspresijos pobūdis, viršijantis neigiamomis kontrolėmis nustatytą arba pagal sutarimą priimtą vertę, įvardijamas kaip teigiamas. Taigi dvimatėje taškinėje diagramoje galimi keturi dviejų parametrų deriniai – neigiama abiejų ekspresija, teigiama abiejų ekspresija, taip pat teigiama tik vieno, arba tik kito žymens ekspresija (99).

Priekinė šviesos spindulio sklaida – FSC nurodo ląstelės dydį: didesnėms ląstelėms (pvz. neutrofilams) būdinga aukšta priekinė sklaida (FSC-aukšta), mažoms ląstelėms (pvz. limfocitams) būdinga žema priekinė sklaida (FSC-žema). Šoninė šviesos sklaida – SSC nurodo ląstelės vidaus sandaros kompleksiskumą. Didesnio sandaros kompleksiskumo ląstelėms – polimorfonuklearams, grūdėtoms ląstelėms (pvz. neutrofilams, eozinofilams) būdinga aukšta šoninė sklaida (SSC-aukšta), o paprastos sandaros ląstelėms (pvz. limfocitams) – žema šoninė sklaida (SSC-žema).

Taip pat įvertinama ir imunofenotipo žymenų raiška. Ji gali būti teigiama (pvz. CD19+ B limfocitai), neigiama (pvz. CD3-NK ląstelės), tačiau galimos ir kitos ekspresijos variacijos. Dalinė žymens ekspresija pastebima, kai tik dalis ląstelių populiacijos pasižymi žymens ekspresija (pvz. CD16+dal monocitai). Taip pat galima blanki ekspresija (pvz. CD20+bl B limfocitai), lyginant su referentine populiacija (įprastu nepiktybiniu ląstelės atitikmeniu, arba limfocitais, priklausomai nuo tiriamos populiacijos ir raiškos įvertinimo paskirties), ryški ekspresija (pvz. CD38+ryš plazminės ląstelės), heterogeniška ekspresija, kai ekspresijos spektras platus – nuo neigiamos iki teigiamos ekspresijos, arba teigiamos ekspresijos, kai ekspresija apima plačias ribas nuo blankios iki ryškios (pvz. HLA-DR+het T limfocitai) (94).

Žymens ekspresija gali būti vertinama teigiamu žymens ekspresijos procentu, pavyzdžiui – 60 % CD4 ekspresija aptikta CD3 T limfocitų populiacijoje. Ekspresiją taip pat galima vertinti vidutiniu švytėjimo intensyvumu – MFI (angl. *mean fluorescence intensity*), kuris parodo vidutinį tam tikro fluorochromo švytėjimą parinktoje ląstelių populiacijoje, tačiau nevertina švytėjimo diapazono. MFI priklausomas nuo naudojamo fluorochromo dažo intensyvumo, tačiau leidžia palyginti skirtingų mėginių ar populiacijų švytėjimą, jei naudojamas tas pats dažas (100).

Analizės programos yra įvairios: siūlomi komerciniai ir nekomerciniai variantai – *FACSDiva*, *FlowJo*, *Infinicyt*, *Kaluza*, *FCS Express*, *WinList*, *WINMDI*. APS (angl. *automatic population separator*) – tai *Infinicyt* (Cytognos, Salamanka, Ispanija) programai būdingas duomenų sintezės metodas, kai vertinama ne vieno ar kelių žymenų ekspresija, tačiau remiantis visų ar didelio kiekio žymenų ekspresija išskiriamos iš principo skirtingos ląstelių populiacijos. Šios populiacijos atskiriamos remiantis principinio komponento analize (angl. *principle component analysis*), nustatoma vidutinė tam tikro žymens populiacija, ir visos ląstelės, kurios turi panašią visų norimų žymenų vidutinę ekspresiją, yra grupuojamos kartu.

Šis metodas leidžia iš dalies automatizuoti tyrimą, kadangi naudojant vienodus reagentus atsiranda galimybė skirstyti populiacijas pagal žinomą ląstelių ekspresiją. Esant daugiau nei 14 parametrų, konvencinė analizė yra nepatogi, todėl naudojami automatizuoti kompiuteriniai algoritmai (91).

2.3. Dauginės mielomos imunofenotipavimas

2012 m. van Dongen aprašė *EuroFlow* validuotų žymenų rinkinius leukemijų ir limfomų diagnostikai. Progresas, pasiektas šioje srityje, buvo ženklus – anksčiau būdavo pateikiami įvairūs žymenys, kuriuos rekomenduodavo ekspertai, tačiau nebūdavo atilikti validavimo veiksmai. *EuroFlow* žymenų deriniai buvo validuoti ir patikimai veikė tarpusavyje. Tai buvo tam tikras paradigmos keitimas, kuris nulėmė tolesnio harmonizavimo galimybes.

CD138 – specifinis plazminių ląstelių žymuo, naudojamas jų selekcijai magnetinėmis dalelėmis, taip pat plazminių ląstelių identifikacijai imunofenotipuojant ar tiriant imunohistochemiškai (20). Nepaisant specifiškumo, ekspresija gana silpna, todėl šiuo metu šis žymuo nėra taikomas kaip terapijos taikynys. CD38 – daug skirtingų funkcijų turintis ląstelių paviršiaus žymuo, randamas ankstyvų kraujodaros ląstelių (pirmtakų) paviršiuje, taip pat kai kurių limfocitų, daugumos monocitų paviršiuje, didelė jo koncentracija aptinkama plazminių ląstelių paviršiuje (69). CD45 – visų

leukocitų bendras žymuo. Dažniau turi blankesnę ekspresiją piktybinėse PL (101), taigi naudojamas jų diferenciacijai. CD19 – specifinis B limfocitų kilmės žymuo, aptinkamas daugumoje įprastų PL, tačiau retai ekspresuojamas piktybinių PL (102). CD56 – NK ląstelių, dalies T limfocitų, taip pat dalies monocitų ir normalių plazminių ląstelių žymuo, taip pat ne kraujodaros ląstelių žymuo, aptinkamas nervinio audinio ląstelėse. Dažnai piktybinėms PL būdinga padidėjusi jo ekspresija (103). CD117 – jaunų kraujodaros ląstelių, mastocitų, taip pat ne kraujodaros ląstelių žymuo. Gali būti ekspresuojamas piktybinių PL, tačiau neaptinkamas normaliose PL (18). CD81 – B limfocitų ir kitų jaunų ląstelių žymuo, ekspresuojamas normalių PL, tačiau dažnai ekspresija sumažėjusi piktybinėse PL (104). CD27 – atminties B ir T limfocitų žymuo, aptinkamas ir normaliose PL, tačiau piktybinėms PL dažnai būdinga jo hipoekspresija (105). cKappa/cLambda – citoplazminės lengvosios grandys: įprasti B limfocitai ar plazminės ląstelės yra skirtingų klonų ir paprastai ekspresuoja vieną ar kitą lengvąją grandį santykiu 2:1–1:1. Kloninės (piktybinės) ląstelės ekspresuoja tik vieną ar kitą žymenį (106).

2.3.1. Diagnostinis dauginės mielomos imunofenotipavimas

DM siejama su įprastų B limfocitų diferenciacijos ir funkcijos slopinimu (imunopareze), ir yra aptiktas atvirkščiai proporcingas ryšys tarp ligos stadijos ir imuninės pažaidos. Anksčiau aprašyta, kad PPL aptikimas DM diagnozės metu KČ yra siejamas su geresnėmis baigtimis, panašūs pokyčiai aprašyti pacientams, kurie turi ilgalaikę stabilią ligos eigą, taip pat akivaizdžiai didesnius kiekius brandžių B limfocitų PK (107). Diagnozės metu DM pacientai turi daug mažesnius kiekius B limfocitų, B limfocitų pirmtakų ir normalių PL. Tačiau šie pokyčiai grįžta į normą po gydymo ir aiškiai skiriasi mėginiuose, kuriuose nėra hemodiliucijos. Taip pat nebuvo pastebėta, kad skirtingi B limfocitų ar piktybinių PL ląstelių kiekiai priklausomai nuo genetinės prognozės diagnozės metu ar po indukcijos, ar po KKL (107).

2016 m. Rastwron ir kt. paskelbė, kad RDM diagnozės metu aptinkamas PL fenotipas ir piktybinių PL kiekis procentais turi didelės įtakos RDM progresijai į DM, ypač kai piktybinių PL kiekis viršija 95 % visų KČ PL (12). 2018 m. Yoshida nustatė, kad mažesnė CD56 koduojančio geno raiška buvo susijusi su mažesniu atsaku į bortezumibą, kuris plačiai vartojamas DM gydyti. CD56 ekspresijos sumažėjimas kitose studijose yra siejamas su blogesnės prognozės liga, taip pat su CPL atsiradimu periferijoje, kur CD56 ekspresija dažnai yra sumažėjusi. Taip pat buvo rasta sąsaja tarp t(4;14) translokacijos ir padidėjusios CD56 ekspresijos, o t(14;16) buvo susieta su CD56 ekspresijos sumažėjimu. 2018 m. Gupta įvertino diagnostinio tėkmės

citometrijos reagentų rinkinyje esančių žymenų aberacijas naujai diagnozuotų NRMG ir DM pacientų piktybinėse plazminėse ląstelėse. Buvo įvertintas aberacijų skaičius, lyginant su normaliomis PC, didesnis kiekis rastas esant DM nei NRMG. Buvo įvertinti žymenų ekspresijos ryšiai su kitais laboratoriniais tyrimais. Dažniausios aberacijos buvo CD56, CD138 ekspresija ir CD27 netekimas. Didžiausias skirtumas tarp DM ir NRMG buvo CD19 ekspresijos netekimas ir didesnė CD56 ekspresija DM atveju. Tačiau nebuvo vertinta žymenų asociacija su progresavimu dėl per trumpo stebėjimo laiko.

2.3.2. Dauginės mielomos minimali liekamoji liga

DM MLL aptikti naudojamas tam tikras fluorochromų rinkinys, kuriuo įmanoma atskirti piktybines ir normalias PL. DM MLL tyrimas yra plačiai pritaikomas, kadangi piktybinių PL žymenų ekspresija nepriklausomai nuo gydymo ar biologinių vėžio savybių skirsis nuo normalių PL (77), taigi pritaikomumas siekia ~100 %. Žinoma, šiam tyrimui atlikti reikalingas 8 ir daugiau spalvų tėkmės citometras bei mėginių paruošimo metodika, leidžianti surinkti daugiau nei 5 mln. branduolėtųjų ląstelių – taip pasiekiamas norimas 10^{-5} jautrumas. Panašūs MLL tyrimai yra taikyti ir kitomis hematologinėmis ligomis, pvz. B-pirmtakų ūmine limfoblastine leukemija, sergančių pacientų stebėjimui bei gydymo vertinimui. Šie tyrimai parodė, kad MLL tyrimai leidžia sėkmingai parinkti tinkamą chemoterapinio gydymo intensyvumą ir esant reikalui keisti gydymą (87).

Aprašyta daugybė skirtingų imunofenotipo žymenų, kuriuos galima naudoti minimaliai liekamajai ligai aptikti. Dažniausiai naudojami šie: CD138, CD38, CD45, CD56. CD19, citoplazminės imunoglobulinų lengvosios grandys kappa ir lambda. Taip pat naudojami papildomi žymenys, kurie skirtingai išreiškiami pPL ir nPL – CD20, CD27, CD28, CD81 ir CD117 (42). Tačiau šių žymenų raiška gali būti itin skirtinga, priklausomai nuo mėginių paruošimo ir naudojamų reagentų, taigi egzistuoja didelė atsakymų įvairovė matuojant MLL net tuo pačiu tėkmės citometrijos metodu.

MLL tyrimo analitinę gebą apibrėžia kelios reikšmės – aptikimo riba (angl. *limit of detection* – LOD), kiekybinio nustatymo riba (angl. *limit of quantification* – LOQ) ir tuštumo riba (angl. *limit of blank*). Tuštumo riba parodo didžiausią teigiamą vertę, kurią galima aptikti neigiamame mėginyje, 95 % neigiamų verčių bus žemiau šios ribos. Kiekybinio nustatymo riba parodo mažiausią kiekį pPL, kurias galima statistiškai reikšmingai apskaičiuoti. Aptikimo riba nurodo mažiausią ląstelių kiekį, kurį galima patikimai atskirti nuo neigiamų mėginių 95 % atveju (100).

IMWG, siūlydama įtraukti MLL į gydymo stebėjimo algoritmą, taip pat apibrėžė tinkamas metodikas ir siektiną tyrimo jautrumą. Remdamasi tuo, kad gydymui skiriant modernius vaistų derinius daug pacientų pasiekia CR, ši darbo grupė suprato, jog pacientus reikia skirstyti detaliau, naudojant jautresnius papildomus metodus, kadangi šioje pacientų grupėje ligos baigtys gali labai skirtis (42).

Pagal *EuroFlow* gaires, NGF metodas susideda iš reikalavimų mėginiams, mėginių paruošimo gairių, analizatoriaus paruošimo gairių, taip pat reagentų rinkinių ir automatizuotos analizės. NGF reikalauja 10 mln. (10^7) surinktų atvejų. Juos surinkus iš tinkamo mėginio (pakankamas kiekis ir minimalus praskiedimas PK), galima pasiekti 2×10^{-6} MLL aptikimo ribą (20 piktybinių PL iš 10 mln. atvejų) (108). Itin svarbu yra įsitikinti, kad KČ aspiratas nepraskiestas PK (hemodilucija), kadangi tai gali sumažinti tyrimo jautrumą net iki 100 kartų (72).

Siektinos aptikimo ribos tyrimui klausimas išlieka sudėtingas. Nors 10^{-6} atrodo optimali riba, tačiau jai pasiekti reikia didesnio kiekio (2–5 ml) ir geros kokybės (pageidautinai pirmojo traukimo) KČ aspirato. Taip pat, JAV Maisto ir vaistų administracija (angl. *Food and Drug Administration* – FDA) rekomenduoja, kad aptikimo riba tyrimui būtų bent 10 kartų žemiau klinikinių pasirinkimų ribos. Taigi norint pasiekti 10^{-5} ribą, tyrimas turi būti validuotas 10^{-6} jautrumui. Tai reiškia, kad tikroviškiausia riba daugumai tyrimų ir pacientų yra 10^{-5} , kas taip pat atitinka IMWG rekomendacijas. Žinoma, jei leidžia mėginio kokybė ir analitinė tyrimo geba, net ir maži MLL kiekiai ($<10^{-6}$) turėtų būti pranešami (84).

Pagal *EuroFlow* gaires, NGF yra plačiai pritaikomas ir dažnai jam nereikia diagnostinio mėginio. PETHEMA/GEM2014MAIN biomedicininis tyrimas parodė, kad NGF leido sėkmingai nustatyti MLL statusą 99,6 % mėginių, aptikimo ribą 2×10^{-6} pasiekė 1 % mėginių, o tarp 2×10^{-6} ir 1×10^{-5} – 88 % mėginių (83).

KČ aspirato kokybė yra ypač svarbi, nes, nepaisant jautrios aptikimo ribos, praskiestas PK mėginys gali duoti netinkamą rezultatą (84). Dažniausia kaulų čiulpų aspirato preanalizinė problema yra praskiedimas PK, arba hemodilucija. Ją nulemia fibroziški arba tankiai infiltruoti kaulų čiulpai, kurie neleidžia ištraukti pakankamo aspirato kiekio. Dažnai imami skirtingi mėginiai citogenetikai, morfologiniams tyrimams, biomedicininų tyrimų kontekste – įvairiems kitiems tyrimams. Kadangi MLL tyrimams ypač svarbi mėginio kokybė ir ląstelių kiekis, rekomenduojama, kad pirmas aspirato „traukimas“ būtų skiriamas MLL tyrimui (84). Taip pat neabejotinos reikšmės gali turėti parinkta aspiracijos vieta ir mėginių gabenimas į laboratoriją (109),

kurie turėtų atitikti harmonizacijos gairių (pvz. *EuroFlow*) keliamus reikalavimus.

Yra daug metodų, leidžiančių spręsti, ar KČ mėginys yra praskiestas PK. Galima mėginyje nustatyti ląsteles, kurios arba aptinkamos tik KČ, bet ne PK, arba PK aptinkami gerokai didesni jų kiekiai. Tai taip pat priklauso nuo reagentų rinkinyje naudojamų žymenų, kadangi bus aptiktos tik tos ląstelės, kurios juo naudojantis gali būti identifikuotos. Galimos ląstelių populiacijos – eritrokariocitai, mastocitai, plazminės ląstelės, B limfocitų pirmtakai (hematogonai), mieloidinės eilės pirmtakai. 2019 m. Paiva ir kt. atliktoje pirmoje perspektyviojoje klinikinėje studijoje praskiedimas buvo laikomas ženkliu, jei aptikta <0,01 % plazminių ląstelių, B limfocitų pirmtakų, eritrokariocitų arba mastocitų (83).

2018 m. Europos vaistų agentūra (*European Medicines Agency*) pateikė gaires dėl MLL kaip klinikinės baigties vertinimo DM tyrimuose (8).

MLL vertinimas yra įtraukiamas į daugelį DM biomedicininųjų tyrimų (84). Biomedicininuose tyrimuose jis naudojamas koreliavimui su kitais veiksniais, taip pat kaip pakaitinė vertinamoji baigtis ar net parenkant tolesnį gydymą (84). Taigi, siekiant lyginti šių tyrimų rezultatus, būtinas bendras sutarimas ir MLL atlikimo gairės.

Vienos iš pasiūlytų gairių, orientuotos būtent į biomedicininųjų tyrimų atlikimą, yra pasaulinės mokslininkų grupės siūlytos harmonizacijos gairės, pristatytos 61-ame Amerikos hematologų draugijos (*American Society of Hematology*) kasmetiniame susitikime (84). Šios gairės parengtos atsižvelgiant į IMWG konsensuso kriterijus. Jos apima reikalavimus tikslingam MLL tyrimui apibrėžti, taip pat KČ MLL tyrimo derinimą su kitais tyrimais – PK CPL tyrimu, vaizdiniais tyrimo metodais, taisyklingą MLL vertinimą atliekant biomedicininuosius tyrimus ir tinkamą rezultatų skelbimą. Pabrėžtas sąvokų „neigiama“ ar „teigiama“ MLL pakeitimas į apibrėžtas tokias sąvokas, kaip pasiektas NGF MLL $<10^{-5}$, nurodant naudojamą metodą ir jo aptikimo ribą.

Europos vaistų agentūra taip pat išleido panašias gaires (8), kurios apibrėžia MLL įtraukimą į klinikinius tyrimus. Apibrėžiamas tinkamas laikas MLL tyrimui atlikti ir siekiamas jautrumas, atitinkantis IMWG kriterijus (1 iš 10^5 ląstelių). Taip pat pabrėžti nežinomi kintamieji – dalis pacientų gali turėti už kaulų čiulpų ribų išplitusią ligą, kurios nebus aptikta aspirate, taigi būtina tyrimus derinti su vaizdiniais metodais (pvz. pozitronų emisijos tomografija). Taip pat pabrėžta galimybė sumažinti tyrimo invazyvumą bandant atlikti MLL tyrimus iš PK, taip pat pagerinti prognostiką atliekant tyrimus ligos metu (MLL kinetika).

2019 m. publikuoti DM tiriančios ispanų grupės PETHEMA/GEM perspektyviojo tyrimo rezultatai – pirmojo klinikinio tyrimo, kurio antrinė stebima baigtis buvo MLL nustatymo nauda (83). Iširta 458 pacientų, kurie buvo gydyti VRD schema ir autologine KKLТ, o pirminė stebėta tyrimo baigtis buvo laikas iki ligos progresavimo. Vėliau buvo skiriamas palaikomasis gydymas pagal Rd schemą, o palaikomojo gydymo tęsimas po dvejų metų priklausė nuo MLL rezultato.

2021 m. Yoroidaka ir kt. (110) palygino du skirtingus MLL metodus – 8 fluorochromų 1 mėgintuvėlio *DuraClone* metodą ir seniau taikomą *EuroFlow* NGF metodą. Nepaisant geros koreliacijos tarp metodų ($r = 0.92$, $p < 0.0001$), dalyje mėginių (5,2 %) buvo ir skirtumų, tikėtina, dėl didesnio ląstelių skaičiaus, surinkto pagal *EuroFlow* metodiką. Taip pat buvo pabrėžtas skirtumas, kad naudojant vieną mėgintuvėlį, kuriame nėra lengvųjų grandžių (κ ir λ) antikūnų, nėra patikimai įrodomas PPL kloniškumas.

Yra aprašyti specifiniai imunofenotipo bruožai, būdingi MLL ir siejami su chemorezistentiškumu – atsparumu terapijai. Šios aberantinės PL pasižymi didesne adhezijos molekulių CD11a, CD11c, CD29, CD44, CD49d, CD54, CD138, CXCR4 ir HLA-DR ekspresija (75). Tikėtina, kad ryškesnė šių baltymų ekspresija egzistuoja jau nustatant diagnozę, tačiau dėl jų adhezijos prie KČ savybių išlieka gydymo metu ir gali būti aptinkamos MLL stadijoje.

Gydant vaistais, kurie yra monokloniniai antikūnai prieš ląstelės paviršiaus žymenis, šių žymenų ekspresija išlieka sumažėjusi iki pusės metų po terapijos pabaigos ir tai sudaro papildomą kliūtį MLL tyrimui atlikti – pavyzdžiui, aberantinių PL intensyviai ekspresuojamas CD38 po gydymo daratumumabu išlieka sumažėjęs. Didelė dalis MLL tyrimo remiasi šio žymens aptikimu, tačiau lieka keli sprendimo būdai – modifikuoti analizę arba naudoti alternatyvius reagentus (111). Žinoma, tyrimą atliekanti laboratorija turėtų žinoti apie tyrimui didelės reikšmės turinčius klinikinius faktus.

2019 m. Tarin (112) vertino naują biožymenį – piktybinius subklonus, rastus naudojant daugiaparametrę tėkmės citometriją. Jis nustatė, kad ankstyvesnėse ligos stadijose (NRMG, R-ISS I DM) pastebima daugiau skirtingų piktybinių ląstelių grupių, tačiau ligai progresuojant lieka vienas dominuojantis ląstelių klonas. Taip pat buvo rasta koreliacijų su CD27, CD44 ir CD81 ekspresija.

Subklonai buvo išskirti naudojantis APS funkcija (angl. *Automatic Population Separator*) pagal tris žymenis – CD56, CD81 ir CD27. Taip pat buvo nustatyti geriausiai piktybines ląsteles atskiriantys žymenis – CD81, CD56, CD44, CD28, CD27, CD117, CD19, CD200, CD45, CD138 ir b2-mikroglobulinas. Iš jų CD44, CD28, CD200 ir b2-mikroglobulinas neįeina į MLL reagentų rinkinį.

Nors klonų kiekis skyrėsi, fenotipo skirtumų nepastebėta, išskyrus recidyvinės DM pacientų pPL išnykusią CD27, ryškesnę CD44 ir CD81 ekspresiją. Panašaus skirtumo nebuvo MLL+, bet remisiją pasiekusių pacientų grupėje – buvo atgautas subklonų išsidėstymas, panašus į NRMG.

2016 m. Ise (113) nustatė, kad RRDM atvejais gali būti randama mažesnė CD38 ekspresija. Ypač retais atvejais galimas visiškas CD38 ekspresijos netekimas, dažniausiai rodantis, kad liga yra ypač pažengusi.

2.3.3. Minimalios liekamosios ligos metodo harmonizacija

Išlieka MLL atlikimo įvairovė ir tyrimo atlikime ir atsakymo pateikime (84). 2013 m. Flanders ir kt. (114) laiške žurnalo *Blood* redaktoriui pažymėjo, kad esama didelių skirtumų, kaip skirtingos laboratorijos atlieka MLL tyrimus. Tuo metu didžioji dalis laboratorijų surinkdavo tarp 100 000 ir 500 000 ląstelių, o aptikimo riba buvo nuo 20 iki 50 ląstelių. Dauguma laboratorijų naudojo tik kelių žymenų atipinę ekspresiją – CD19 ir CD45 neigiamumą, kartu su teigiama CD56 ekspresija, nors dalis įprastų plazminių ląstelių taip pat pasižymi tokia žymenų ekspresija. Buvo pasiūlyta naudoti papildomus žymenis – CD27, CD81 ir CD117. Stipriai pabrėžta būtinybė suvienodinti MLL tyrimo atlikimą. Išleistas nemažai sutarimo dokumentų, kuriuose aprašoma mėginių apdorojimas, paruošimas, reagentų rinkinių kūrimo principai, duomenų rinkimas, taip pat tyrimo validavimas ir kokybės kontrolė (115–117).

2016 m. Rawstron ir kt. (78) pažymėjo kelis svarbiausius poreikius, norint pasiekti MLL atlikimo harmonizaciją: tai mėginių rinkimo gairės, analizės gairės ir kokybės kontrolės kriterijai, leidžiantys pasiekti patikimą tyrimo aptikimo lygį. Visus šiuos punktus vėliau įgyvendino *EuroFlow* konsorciumo gairės. 2016 m. Arroz ir kt. (115) pasiūlė sutarimo kriterijus, kaip atlikti MLL tyrimą ir pateikti rezultatus. Tačiau kriterijų apibrėžime buvo leidžiama naudoti ir minimalų 6 fluorochromų derinį, su galimybe naudoti daugiau. Pagrindinės išvados buvo pirminių apibrėžimo kriterijų nustatymas – CD38, CD138 ir CD45 ekspresija, šoninė ir priekinė šviesos spindulio sklaida plazminėms ląstelėms apibrėžti. Vėlesnis žingsnis buvo aprašyti atipinio imunofenotipo plazminės ląstelės, kurių ekspresija skiriasi nuo normalių plazminių ląstelių, surinktų tuo pačiu instrumentu ir naudojant tuos pačius reagentus. Taip pat buvo pažymėta būtinybė aprašyti, kiek surinkta ląstelių ir kiek aptikta pPL ir nPL. Taip pat buvo pažymėtas siekis pasiekti $10e-5$ jautrumo ribą dar iki buvo paskelbti IMWG kriterijai (45). IMWG įvardijo MLL neigiamumą kaip pasiektą CR į terapiją, taip pat neaptiktą aberantinių

plazminių ląstelių kloną, naudojant ne mažesnę nei 1 iš 10^5 branduolėtųjų ląstelių jautrumą (tai yra 10^{-5} jautrumą).

EuroFlow konsorciumas pasiūlė dviejų mėgintuvėlių kombinaciją, apimančią 10 antigenų derinį, kuris sugeba atskirti pPL ir nPL (84). Tai būtų dviejų mėgintuvėlių kombinacija, į kuriuos įeitų kertiniai žymenys CD138, CD27, CD38, CD45, CD56, CD19, į pirmąjį, ne citoplazminio mėgintuvėlio paruošimo metodika paruoštą mėgintuvėlį įtraukti CD81 ir CD117, o citoplazminiame mėgintuvėlyje būtų matuojama citoplazminė Ig kappa ir Ig lambda ekspresija.

EuroFlow mėginių paruošimas ir reagentai reikalauja didesnių išteklių, todėl buvo lyginami su skirtingais mėginių paruošimo būdais ir žymenų deriniais. MSKCC (angl. *Memorial Sloan Kettering Cancer Centre*) grupė pasiūlė vieno mėgintuvėlio variantą, palikdami *EuroFlow* paruošimo metodiką, ir nustatė, kad testų suderinamumas yra 98 % (72). Roswell Park vėžio institutas (RCPI) siūlė skirtingus mėginių paruošimo metodus ir skirtingą tyrimo metodą, kad būtų galima sutrumpinti mėginio paruošimo laiką ir tyrimui atlikti reikėtų mažiau personalo. Maclachlan ir kt. (72) aprašė pagrindinius dalykus, kuriuos reikėtų harmonizuoti siekiant lyginti visus šiuos skirtingus metodus: tai MLL apskaičiavimas naudojant nuo programinės įrangos nepriklausomą analizės algoritmą; kitų populiacijų, kurios leidžia įvertinti KČ aspirato kokybę, apibrėžimas.

KČ aspirato kokybė ypač svarbi kritiškai vertinant mėginio tinkamumą MLL aptikimui vertinti, ypač kai nuo to priklauso pacientų skirstymas į skirtingas gydymo intensyvumo kategorijas. Kad didžiausias kiekis aberantinių PL yra pirmame aspirato traukime, o kiekviename kitame jų yra vis mažiau, aprašė Rawstron ir kt. (118). Jau kurį laiką mastocitai ir B limfocitų pirmtakai (arba hematogonai) plačiai naudojami kaulų čiulpų aspirato kokybei vertinti – šios ląstelių populiacijos turėtų būti aptinkamos tik kaulų čiulpuose, bent jau sveikų žmonių kaulų čiulpuose. Tačiau taip pat galimos ląstelių populiacijos yra normalios PL, mieloidiniai ir eritroidiniai pirmtakai.

2021 m. Yoroidaka (110) lygino *EuroFlow* dviejų MLL mėgintuvėlių rinkinį su *Duraclone* vieno mėgintuvėlio metodu. Nors *Duraclone* metodas pigesnis, dalies mėginių MLL skyrėsi. *EuroFlow* taip pat demonstravo didesnę jautrumą ir didesnę surinktų ląstelių skaičių, pakankamą 1×10^{-5} reikalavimui.

Įdomu, kad nors buvo naudojami skirtingi komerciniai MLL metodai, kuriems reikalingas skirtingas mėginių paruošimas, taip pat skirtingi tėkmės citometrai ir skirtingos duomenų analizės programos, rezultatų tapatumas buvo gana didelis. Prie to galėjo prisidėti logiškai aprašyti analizės etapai,

kuriuos įvardija tyrėjai. Tačiau vienas didžiausių *Duraclone* trūkumų yra pasirinkti žymenys, kai vietoje dažnai aberantiškai ekspresuojamo CD117 buvo pasirinktas CD200, taip pat neįtraukta cKappa ir cLambda ekspresija, reikalinga ląstelių populiacijų kloniškumui įrodyti.

2.3.4. Minimalios liekamosios ligos analizės strategijos

Žymenys, kurie privalo būti taikomi norint atpažinti PL ir atskirti pPL ir nPL, buvo aprašyti 2015 m. Paiva ir kt. (77) apžvalgoje, tačiau žinios apie juos kaupėsi jau kelis dešimtmečius. CD38 ir CD138 reikalingi atpažinti PL, o tokie žymenys kaip CD19, CD27, CD45, CD56, CD81 ir CD117, cKappa ir cLambda dažniausiai skirtingai ekspresuojami pPL, nepaisant galimai heterogeniškos dalies žymenų ekspresijos nPL. Būtent dėl šios heterogeniškos ekspresijos vieno ar kelių šių žymenų ekspresija nepakankama, o tai reiškia, kad reikalingas vienu metu analizuojamas žymenų derinys.

Automatinė analizė yra kitas analizės metodas, kuris yra integruotas į Euroflow siūlomas NGF gaires. Šio metodo pranašumai – automatinis kitų, ne vien plazminių ląstelių subpopuliacijų paskirstymas, taip pat įtartinų populiacijų pažymėjimas (42).

EuroFlow rekomenduoja taikyti automatinės analizės programą, kuri yra integruota į *Infinicyt* programinę įrangą. Ji remiasi automatiniumi normalių ląstelių populiacijų paskirstymu remiantis kelių žymenų raiškos visuma. Tai pagrindinio komponento analizė, kai nustatoma tam tikra visai populiacijai būdinga daugelio žymenų ekspresija, kuri programinėje įrangoje integruota į automatinį populiacijų atskyrimo įrankį (APS).

Yoroidaka ir kt. (110) aprašyta analizės strategija pagal *DuraClone* metodiką yra panaši į taikomą *EuroFlow*, tačiau skiriasi keletas naudojamų antikūnų. Panašūs žingsniai yra pavienių ląstelių atskyrimas naudojant šviesos spindulio sklaidos charakteristikas, taip pat dažų agregatų atmetimas išmetant daug labiau švytinčius atvejus CD81-FITC ir CD56-APC-A750 kanaluose, nei bet kokia ląstelių populiacija. Plazminės ląstelės parenkamos apibrėžiant atvejus, ryškiai ekspresuojančius CD38 ir CD138, taip pat parenkant blankiau CD45 ekspresuojančius atvejus. Taip pat aprašyta įprastinė žymenų raiška nPL, kurios nepaisančios PL buvo apibrėžtos kaip pPL. nPL žymenų raiška apibrėžta kaip CD45-vidutinė, CD38-ryški, CD138-vidutinė/ryški, CD19-teigiama, CD56-blanki/neigiama, CD27-ryški, CD81-ryški, CD200-blanki/neigiama. CD200 neįeina į *EuroFlow* rekomenduojamų antikūnų rinkinius MLL tyrimui atlikti, taip pat yra aprašomas kaip mažai patikimas žymuo dėl plataus ekspresijos diapazono normaliose kaulų čiulpų PPL. Žinoma, analizuojant visuomet galimas platesnis visų žymenų ekspresijos

spektras PPL, todėl norint atskirti PPL nepakanka remtis vieno ar net kelių žymenų ekspresija, būtina visų žymenų ekspresijos visuma.

Norint pasiekti gerų, pakartojamų rezultatų, taip pat augant MLL tyrimų poreikiui, vis daugiau diskutuojama apie automatinės analizės taikymą. *EuroFlow* grupė yra išleidusi straipsnių, kuriuose aprašoma automatinės analizės nauda, lyginant su rankine tėkmės citometrijos ekspertų analize (86). Automatizuoti analizės komponentai gali pagreitinti duomenų analizę, nes suskirsto didelę dalį skirtingų ląstelių rūšių mėginyje, bet šiuo metu negeba iki galo atskirti normalių ir aberantinių PL. Tikslus aberantinių ląstelių atpažinimas ir priskyrimas ligai išlieka analizuojančio eksperto atsakomybe, taigi net automatizuojant dalį analizės reikalingas rankinis eksperto darbas atskirti normalias ir pakitusias ląsteles, taip pat peržiūrėti, ar programinė įranga nepraleido ar klaidingai neklasifikavo tam tikrų ląstelių. Taip pat patyręs tėkmės citometrijos specialistas gali nuodugniai įvertinti visas ligai būdingas biologines savybes atlikdamas rankinę duomenų analizę.

Tačiau yra ir kita pusė – rankinė TC duomenų analizė yra subjektyvi ir dėl to gali būti didelių variacijų tarp laboratorijų ar net tyrėjų toje pačioje laboratorijoje. Siekiant užtikrinti geros kokybės duomenų analizę ir patikimus rezultatus, reikalinga harmonizuota DM MLL duomenų analizė, panašiai kaip yra išleisti su mėginio paruošimu ar naudojamais reagentų rinkiniais susiję sutarimo dokumentai, kuriuose trūksta instrukcijų, kaip tiksliai turi būti analizuojami surinkti tėkmės citometrijos duomenys. Tai galioja ir pačios MLL analizei, ir mėginio kokybės apibrėžimui.

Papildomos harmonizacijos poreikis buvo pabrėžtas Jungtinės Karalystės Nacionalinio išorinės kokybės kontrolės vertinimo plano (UK-NEQAS) sudarytojų organizuotame tyrime, kuriame buvo atliktas DM MLL tyrimas aštuoniose laboratorijose, naudojant DM MLL turinčius kaulų čiulpus, praskiestus keturiais skirtingais santykiais su sveiko žmogaus aferezės produktu (119). Nors buvo rastas pakankamai geras suderinamumas tarp laboratorijų rezultatų, nepaisant įvairios naudotos įrangos ar reagentų rinkinių, tačiau iškelta mintis, kad geresnė analizės harmonizacija dar labiau sumažintų nesutapimus. Visgi šiame tyrime nebuvo kalbama apie KČ mėginio kokybės vertinimą, suvienodinus kitų kaulų čiulpų mėginio ląstelių analizę.

Taip pat išleistas Kraujo ir kaulų čiulpų transplantacijos klinikinių tyrimų tinklo (angl. *Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network*) sutarimo dokumentas, skirtas tarptautiniam MLL tyrimų harmonizavimui ir rezultatų pateikimui būtent DM klinikiniuose tyrimuose, kuriuose ypač svarbu palyginti tam tikros terapijos rezultatus, nors ji tuo pačiu metu taikoma skirtingose įstaigose (84).

Analizės strategija turėtų būti nepriklausoma nuo naudojamos įrangos, reagentų ar mėginio paruošimo metodikos. Tėkmės citometrijos specialisto atliekama duomenų analizė yra labiausiai kompleksinis ir daugiausiai laiko trunkantis tėkmės citometrijos tyrimų žingsnis, dėl kurio gali būti rezultatų skirtumų, net jei duomenų analizę atlieką didelę patirtį turintys specialistai (141).

DM MLL tyrimo harmonizacija yra svarbi siekiant didesnio jautrumo, kad būtų galima lyginti šio tyrimo rezultatus, kol trunka pacientų gydymas, ar tarp skirtingų laboratorijų (7). Šiuo metu naudojami skirtingi MLL tyrimo atlikimo metodai, o skirtumai apima mėginių paruošimą, skirtingus fluorochromų ir antikūnų derinius, taip pat skirtingas analizės strategijas ir tyrimo rezultatų bei išvadų pateikimą (16). Visi šie veiksniai turi įtakos tyrimo rezultatų patikimumui (127), o tai svarbu ne tik atliekant kasdienes tyrimus, bet ir lyginant rezultatus klinikinėse studijose. Suvienodinus reagentų rinkinius, mėginių paruošimą, surinktų ląstelių kieki, galima geriau suderinti rezultatus, tačiau trūksta paskutinės tyrimo grandies – harmonizuotų tėkmės citometrijos duomenų analizės gairių. Standartinių duomenų analizės gairių taikymas leidžia vienodai vertinti ne vien pagrindinį tyrimo rezultatą – MLL nustatymą ar piktybinių PL kieki, tačiau ir kitus, su KČ aspirato mėginio kokybe susijusius kriterijus, kurie suteikia papildomos klinikinės informacijos. Mėginio kokybės vertinimas itin svarbus, kai atliekama intervencinė procedūra didelės rizikos pacientams, ir leidžia pasikliauti gautais tyrimo rezultatais, taip pat patikimai lyginti šiuos rezultatus (105).

2.3.5. Cirkuliuojančių plazminių ląstelių imunofenotipavimas

CPL – tai PK aptinkamos plazminės ląstelės. Įprastai PK neaptinkama arba aptinkami itin maži kiekiai PPL. Jų padaugėjimas gali būti kaip reakcija į kitus ligas – infekcines, onkologines, imunines. Tačiau dažnai DM atveju PPL gali būti aptiktos PK ir įvardijamos kaip CPL.

Yra atlikta tyrimų, kuriuose lyginti PK ir KČ mėginiai, tačiau nustatyta, kad maždaug 40 % pacientų, kuriems KČ aptinkama MLL, PK jos neaptinkama (120). Panašūs duomenys matomi ir PK tiriant laisvą DNR ar naudojant NGS metodiką – MLL tyrimai naudojant PK mėginį yra daug mažiau jautrūs ir koreliacija su KČ aspirato duomenimis nepatikima (84).

2010 m. Perez-Persona ir kt. (35) tyrinėjo tėkmės citometrijos vaidmenį vertinant NRMG ir RDM pacientus, kuriems pagal IMWG kriterijus liga yra progresuojanti arba stabili. Buvo tikrinamas >95 % piktybinių plazminių ląstelių iš visų plazminių ląstelių kriterijus, išmatuotas tėkmės citometrijos metodu, ir lyginama, ar šis faktorius leidžia prognozuoti ligos progresavimą.

Ši kriterijų atitiko gerokai daugiau RDM pacientų, lyginant su NRMG pacientais, kas atitiktų toliau pažengusią ligą. Visose keturiose grupėse (kintanti ir stabili NRMG ir RDM) kriterijus rodė didesnę progresavimo riziką. Vadinas, tėkmės citometrija nustatant diagnozę gali būti naudinga progresavimo rizikai vertinti.

2016 m. Rawstron ir kt. (78) pabrėžė, kad CPL aptinkamos 80 % pacientų, kuriems naujai diagnozuota DM, ir jų aptikimas turi didelės prognostinės reikšmės. 2021 m. Cheng ir kt. tyrė naujai diagnozuotas DM pacientus ir nustatė CPL ribą 0,038 %, virš kurios pacientams būdingas didesnis naviko tūris ir blogesnės baigtys (17). Tai parodė, kad CPL aptikimas gali būti vertinamas kaip nepriklausomas rizikos veiksnys, tačiau jis turi būti derinamas su kitais nustatytais rizikos veiksniais – biocheminiais (beta-2 mikroglobulinas) ar genetiniais (didelės rizikos translokacijos) tam, kad būtų galima prognozuoti ligos eigą.

Ypač svarbus yra PK tyrimas naujai diagnozuota ir recidyvine DM sergantiems pacientams, kuriems ląstelių aptikimas gali būti siejamas su prasta prognoze ir ligos progresavimu (121). Viena iš PK tyrimo paskirčių galėtų būti intervencijų sumažinimas, kadangi aptikus pokyčius PK galbūt nereikėtų papildomai imti KČ aspirato mėginio. Taip pat yra siūlymų, kad PK tyrimas papildytų KČ tyrimą, o ne jį pakeistų (72).

CPL aptikimas recidyvinių ir (ar) refrakterinių DM atveju yra siejamas su blogomis baigtimis, o CPL nesumažėjimas po vieno gydymo ciklo yra atsparumo terapijai žymuo (16). Didesni kaip 5 % CPL kiekiai rodo ypač blogas baigtis, prilygintinas plazminių ląstelių leukemijai, nors nėra pasiekiami įprastai PL leukemijai pritaikomi CPL aptikimo kriterijai, o tai kelia klausimą apie šios ligos formos apibrėžimą (10).

CPL atsiradimo mechanizmai nėra iki galo aiškūs, tačiau siejami su dviem procesais – adhezijos molekulių neteikimu ir didesne migracijos molekulių ekspresija ląstelių paviršiuje. Adhezijos molekulės dažnai yra inkariniai baltymai, kurie leidžia ląstelėms įsitvirtinti kaulų čiulpų stromoje. Migracijos molekulių tikslas yra įgalinti ląsteles palikti kaulų čiulpus ir pasiekti organą taikinį. Abi šios baltymų grupės gali būti vertinamos tėkmės citometrijos metodu, ir remiantis pokyčiais būtų galima nustatyti šių procesų tikimybę ar net užkirsti jiems kelią, jei tie pokyčiai aptinkami prieš patį ekstramedulinį plitimą ar ligos progresavimą.

Taip pat yra aprašomas su adhezijos molekulių ekspresija susijęs chemorezistentiškumas, kai didesnę adhezijos molekulių ekspresiją turinčios ląstelės labiau atsparios tam tikroms chemoterapinių vaistų grupėms.

CPL aptikimas siejamas su adhezijos molekulių netekimu, pvz. CD184 ir CD54, kurių paviršiaus ekspresijos sumažėjimas taip pat siejamas su ekstrameduliniu piktybinių PL plitimu į odą (37).

Adhezijos molekulių pokyčiai DM piktybinėse PL tyrinėjami jau seniai. 1990 m. Aruffo (122) aprašė, kad CD44 yra pagrindinis adhezijos žymuo PL jungiantis prie KČ esančio hialuronato. 1992 m. Ahsmann (123) aprašė didesnę adhezijos molekulių CD11a/CD18 ekspresiją esant blogesnei ligos eigai, taip pat aktyviai ligos fazei ir neaptiko šių molekulių normaliose plazminėse ląstelėse. 1994 m. Zandecki (124) aprašė CPL, aptiktas DM atveju, ir jas susiejo su naviko mase, tačiau 1 % jautrumas nebuvo pakankamas skirtingos prognozės pacientams diferencijuoti. Tačiau šis tyrėjas nustatė, kad, skirtingai nei NRMG ar RDM, dauguma DM pacientų turi aptinkamas CPL. 1995 m. Pellat-Deceunynk (125) aprašė CPL adhezijos molekulių skirtumus KČ ir PK, išsivysčius ekstramedulinei DM ligos formai. Nustatė, kad adhezijos molekulių ekspresijos mažėjimas ir didėjimas gali būti siejamas su skirtingomis ligos progresavimo fazėmis – CD56 ekspresija didesnė KČ nei PK ar už KČ ribų, žymenų ekspresija mažesnė esant stabiliai ligai, bet padidėja esant akceleracijai. 1996 m. Stauder (126) aprašė CD44 variantus kaip prognostinius DM žymenis, taip pat taikomus ir kitų piktybinių ligų atvejais. 2004 m. Vincent (127) aprašė IL-6 poveikį adhezijos molekulės CD44 ekspresijai piktybinėse PL. Šis mechanizmas galimai turi ženklų poveikį mielominės ligos išlikimui KČ ir proliferacijai. 2008 m. Ohwada (128) aprašė CD44 ekspresijos įtaką deksametazono, plačiai mielomos gydymui taikomo imunitetą slopinančio gliukokortikoido, veikimui. Didesnė CD44 ekspresija buvo siejama su didesne adhezija ir didesniu atsparumu gydymui. Taip pat aprašoma sąveika tarp CD44 ir kaulų čiulpu matricoje randamo hialuronano – šis adhezijos mechanizmas, tikėtina, nulemia atsparumą gydymui ir DM išlikimą. 2009 m. Hatano (129) vertino plačiai taikomo DM gydyti proteosomų inhibitoriaus bortezomibo poveikį adhezijos molekulių ekspresijai. Didesnė adhezijos molekulių ekspresija siejama su adhezijos nulemta chemorezistencija. Panašu, kad bortezomibo poveikis ypač efektyvus mažinant CD49d ekspresiją – tai gali turėti įtakos CPL formavimuisi, kadangi CPL atsiradimas taip pat siejamas su šios molekulės raiška. Pasak tyrėjų, kiti mielominės ligos gydymui vartojami vaistai tokiu poveikiu nepasižymi.

2011 m. Kraj (11) tyrinėjo plazminių ląstelių leukemiją – agresyvios eigos plazminių ląstelių neoplaziją, kurią charakterizuoja didelis kiekis piktybinių ląstelių periferiniame kraujyje. Dėl panašumų su CPL žymenų pokyčiai gali būti susiję su adhezijos sumažėjimu ir plazminių ląstelių išėjimu į periferiją. Adhezijos žymenų pokyčiai, tikėtina, yra panašūs į CPL būdingus žymenų

pokyčius. 2013 m. Bolzoni ir kt. (130) aprašė vieną iš imunomoduliatorių veikimo mechanizmų mielominės ligos atveju. Esant DM dažnai pasireiškia didesnė adhezija kaulų čiulpuose, tačiau imunomodulatoriai veikia RANK ligandą naviko mikroaplinkoje ir sumažina adheziją. Adhezijos sumažėjimas pasireiškė mažesne CD49d molekulės ekspresija. 2014 m. Vij (131) aprašė, kad iš kaulų čiulpų CD138 ląstelių nustačius *IGH* persitvarkymus, kurie randami ne visais atvejais, panašius persitvarkymus galima aptikti atliekant DNR sekoskaitą beveik visuose DM pacientų kraujo mėginiuose. Tai atitiktų CPL tyrimus, tačiau turi mažesnę jautrumą ir taikymo galimybes. Vėliau autoriai validavo rezultatus naudodami tėkmės citometriją. 2017 m. Chakraborty (132) pademonstravo, kad CPL neaptikimas diagnozės metu ir prieš KKLТ reišė daug geresnę prognozę, nei aptikimas vienu ar abiem šiais laikotarpiais. Tyrimas buvo atliktas naudojant 6 spalvų metodiką ir surinktas tik 150 000 ląstelių, taigi jautrumas buvo mažas, tačiau to pakako statistškai reikšmingam skirtumui pasiekti. 2017 m. Li (133) atliko metaanalizę, kurioje lygino CPL prognostinę reikšmę. CPL aptikimas turėjo blogą prognostinę reikšmę išgyvenamumui ir lėmė ankstyvą progresavimą – tai parodė tyrimai, atlikti ir nustatant diagnozę, ir ligos recidyvo laikotarpiu ar atliekant KKLТ. Taip pat aprašyta CPL sąsaja su blogesne rizikos prognoze diagnozės metu. Tyrimo trūkumas buvo tas, kad neįtraukti kiti klinikiniai ir gydymo duomenys. 2018 m. Cowan ir kt. (134) tyrė CPL aptikimą atliekant autologinę KKLТ. Rasta patikima koreliacija su ligos progresavimu, bet ne su išgyvenamumu. Kontroliuojant kitus veiksnius (atmetant palaikomąją terapiją, didelės rizikos citogenetiką, ISS stadiją diagnozės metu), CPL aptikimas buvo patikimas ankstyvo recidyvo ar mirties rodiklis. 2018 m. Foulk ir kt. (135) charakterizavo CPL subpopuliacijas, aptinkamas nustačius PL diskrazijas. Diagnozės metu CPL koreliavo su kitais klinikiniais KČ infiltracijos rodikliais, taip pat su standartiniu rizikos vertinimu (ISS stadija). CPL buvo aptikti ~98 % naujai diagnozuotos DM NDMM atveju. Pasiekus remisiją, CPL kiekiai sumažėjo, tačiau riba tarp geresnių ir blogesnių baigčių buvo 100 CPL/4 ml kraujo (0,025/μl). Esant RDM, didesnės rizikos pacientai turėjo didesnius kiekius CPL, kaip ir pacientai, kuriems liga progresavo. 2018 m. Sanoja-Flores ir kt. (136) pateikė duomenis apie CPL kiekius pacientams, kuriems naujai diagnozuota DM. CPL buvo aptikti visiems DM ir RDM pacientams, tačiau tik pusei NRMG ir penktadaliui solitarinės plazmacitomos pacientų. Didesni CPL kiekiai buvo susieti su didesne KČ infiltracija ir blogesniais prognostiniais duomenimis, taip pat su greitesniu progresavimu iš NRMG į DM ir mažesniu DM pacientų išgyvenimu. Taip pat nustatyta, kad CPL fenotipas pasižymi mažesne CD38, CD138, CD81, CD56 ir CD27 ekspresija. Šie žymenys buvo siejami su mažiau brandžiomis ląstelėmis,

tačiau dalis jų turi sąsają su adhezija kaulų čiulpuose. CPL lygmuo, leidžiantis diferencijuoti RRMG ir DM, buvo nustatytas 0,058 CPL/ μ l.

2020 m. Gonsalves ir kt. (137) aprašė, kaip CPL pagerina R-ISS rizikos klasifikaciją – turintys ≥ 5 CPL/ μ l buvo išskirti ir analizuojant turėjo blogesnes baigtis, nei kiti R-ISS I ir II stadijos pacientai. Didesnis CPL kiekis taip pat buvo siejamas su didelės rizikos citogenetiniais veiksniais, didesne proliferacija ir kaulų čiulpų infiltracija, didesniais LDH kiekiais kraujyje. 2021 m. Cheng ir kt. (17) nustatė, koks CPL kiekis diagnozės metu nurodo didesnę navikinių ląstelių kiekį KČ ir blogesnes baigtis – 0,038 %. Šis rodiklis gali būti naudojamas kaip nepriklausomas išgyvenamumą ir ligos progresavimą lemiantis veiksnys. Buvo sukurtas modelis, kuriame pagal CPL, LDH ir kreatinino kiekius išskirtos didelės ir standartinės rizikos grupės. Buvo atlikta nuspėjamoji statistika, kuri gerai koreliavo su stebėtomis pacientų baigtimis – 1 ir 2 metų išgyvenamumu ir ligos progresavimu. 2021 m. Janjetovic ir kt. (138) tyrė pacientus, kuriems rasta ekstramedulinių (iš kaulų čiulpų išėjusių) piktybinių ląstelių, esant toliau pažengusiai DM formai, ir rado ne tik genetinių, bet ir baltymų ekspresijos skirtumų, palyginti su DM be ekstramedulinių formų. Esant ekstrameduliniam plitimui rasta didesnė CD44 ekspresija, tačiau esant ne pirminei ar vienintelei ekstramedulinei plazmacitomai – tikėtina, kad šio baltymo ekspresija didina piktybinių PL plitimą į ekstramedulinę terpę, tačiau ne pirminį naviko formavimąsi už kaulų čiulpų ribų. Dažniausia citogenetinė aberacija esant pirminei ekstramedulinei plazmacitomai buvo 1q21 amplifikacija, kitos aberacijos buvo aptiktos retai. 2020 m. Peng ir kt. (139) aprašė 12 genų rinkinių, kurie buvo siejami su ląstelių adhezija ir kurių ekspresija buvo dažniau aptinkama esant DM. Dalis genų buvo koduojantys integrinus, pvz. CD11b ir CD18, tačiau su kliniškai reikšmingais pokyčiais siejami LAMB1 ir ITGA9 nėra tiriami tėkmės citometrijos metodu įprastinėje praktikoje. Didesnė integrinų ekspresija esant neplintančiai (mažai CPL turinčiai) DM yra suprantamas reiškinys.

3. TYRIMŲ METODIKA

3.1. Piktybinių plazminių ląstelių imunofenotipavimas

PL imunofenotipavimui buvo naudojamas 8 spalvų (10 parametru) tėkmės citometras BD *FACSCanto II* (BD Biosciences, San Jose, CA, JAV), gebantis matuoti signalus fluorescencijos aptikimo kanaluose V450, Pacific Orange, FITC, PE, PerCP-Cy5.5, APC, Pe-Cy7 ir APC-H7, taip pat FSC ir SSC parametrus. Kaulų čiulpų ir periferinio kraujo mėginiai buvo ruošiami taikant paviršinio dažymo metodiką, pirmame etape lizuojant mėginį, toliau inkubuojant su fluorochromais, galiausiai plaunant ląsteles fosfato buferiniu druskos tirpalu, norint pašalinti nekonjuguotus reagentus ir pašalines medžiagas. Lizės būdu pašalinami branduolio neturintys eritrocitai, siekiant tirti tik branduolį turinčias ląsteles (kariocitus). Inkubuojant ląstelės padengiamos fluorochromais, kuriuose konjuguotas antikūnas prieš tiriamą ląstelinį antigeną ir šviesos spindulius sugeriantis bei skirtingo bango ilgio šviesą skleidžiantis fluoroforas.

PL atpažinti buvo naudojami paviršiaus žymenys CD38, CD138 ir CD45. Piktybinės PL ir normalios PL buvo identifikuojamos pagal būdingą žymenų raišką. Piktybinės PL įprastai turi blankesnę CD38, CD45, CD27, CD81 ekspresiją, aberantiškai ekspresuoja CD117, taip pat turi tik vienos iš citoplazminių lengvųjų grandžių (kappa ir lambda) ekspresiją. Kadangi galimi skirtingi šių žymenų ekspresijos variantai, buvo naudojamas pakopinis ląstelių populiacijų apibrėžimas remiantis kelių žymenų deriniais (pvz. CD38+bl ir CD45–, CD81– ir CD117+, CD27+bl ir CD45–).

Paruošti mėginiai buvo analizuojami tėkmės citometru, o tyrimo duomenys įrašyti į standartinį FCS failą. Šie duomenys vėliau išanalizuoti BD *FACSDiva* (BD Biosciences, San Jose, CA, JAV) programine įranga, analizės metu identifikuotos plazminės ląstelės ir jų antigenų ekspresija – imunofenotipas. Statistiškai išmatuota teigiama paviršiaus antigenų ekspresija procentais ir vidutinis kiekvieno fluorochromo švytėjimo intensyvumas (MFI), taip pat ląstelių procentinis kiekis kaulų čiulpuose.

3.2. Adhezijos imunofenotipo matavimas

Adhezijos molekulės yra ląstelės paviršiuje aptinkami antigenai, siejami su ląstelių tvirtinimusi prie jungiamojo audinio. PL atveju tai užtikrina ląstelių tvirtinimąsi prie KČ stromos. Šios tyrimo dalies paskirtis buvo nustatyti, kokie adhezijos žymenų ekspresijos pokyčiai nulemia CPL formavimąsi. Seniau aprašyta, kad adhezijos molekulės yra svarbios PL tvirtinimuisi KČ stromoje

(140), tačiau nėra žinomi tikslūs mechanizmai, lemiantys tai, kad PL palieka KČ. Piktybinės PL gali būti aptinkamos ir KČ, ir PK, tačiau PK aptinkamos ne visiems pacientams, vis dėlto tai gali keistis ligos eigoje. Atliekant MLL tyrimus iš KČ, imunofenotipo analizė taikoma siekiant atskirti piktybines PL nuo normalių, KČ aptinkamų PL. Tačiau piktybinių PL imunofenotipas gali suteikti papildomos informacijos, ypač svarbios vertinant ligos eigą ir progresą. Aprašyta, kad esant tokioms būklėms, kaip plazminių ląstelių leukemija, PK aptinkamas gausus piktybinių PL kiekis turi specifinius imunofenotipo pokyčius, būtent sumažėjusią adhezijos molekulių raišką (11). Taigi pagrindinis tikslas buvo išmatuoti adhezijos molekulių raišką ir KČ, ir PK dviem pacientų grupėms – turintiems PK CPL ir neturintiems, taip pat kaip adhezijos molekulių raiškos kontrolinę grupę naudojant sveikų donorų KČ PL.

3.2.1. Adhezijos imunofenotipo tiriamųjų grupė

Į tyrimą buvo įtraukti suaugę (vyresni kaip 18 metų) pacientai, sergantys recidyvine ir (ar) refrakterine DM, kai diagnozė nustatyta pagal EBMT kriterijus – po gydymo daugiau nei vienu ankstesniu terapijos metodu turintys >5 % piktybinių PL KČ aspirate. Kontrolinė grupė buvo sveiki donoriai, kuriems atlikta KČ aspiracija dėl medicininių priežasčių (hematopoetinių kamieninių ląstelių donoriai), kurie davė sutikimą dalyvauti tyrime. Neįtraukimo kriterijai buvo šie: nustatyta solitarinė plazmacitoma, plazminių ląstelių leukemija ir kitos piktybinės vėžinės ligos. Visi pacientai buvo gydomi VUL SK nuo 2013 m. kovo mėn. iki 2015 m. spalio mėn. Kaulų čiulpų ir periferinio kraujo mėginiai buvo gauti rutininio ištyrimo būdu, gavus informuoto paciento sutikimą dalyvauti tyrime. Į tyrimą buvo įtraukt 41 RRDM sergantys pacientai ir 14 sveikų donorų.

3.2.2. Mėginių paruošimas adhezijos molekulėms nustatyti

Kaulų čiulpų aspiracijos mėginiai buvo surinkti į K2-EDTA *Vacutainer* mėgintuvėlius (BD, Plymouth, JK). Visi mėginiai buvo ruošiami naudojant viso kraujo lizavimo metodą, siekiant kuo artimesnio ląstelių populiacijų santykio, lyginant su pirminiu mėginiu. Buvo naudojamas ir įprastinis paviršinis dažymo metodas, ir citoplazminis imunoglobulino lengvųjų grandžių dažymas naudojant *BD Cytotfix/Cytoperm*TM (BD Biosciences, San Jose, CA, JAV) ląstelių permeabilizacijos tirpalą. Periferinio kraujo ir KČ aspiracijos mėginiai buvo dažomi keturiais deriniais, turinčiais šiuos su antikūnais konjuguotus fluorochromus:

1. CD45-V450/CD138-Pacific Orange/CD38-FITC/CD168-PE/
CD19-PerCP-Cy5.5/kappa-APC/CD56-Pe-Cy7/lambda-APC-H7;
2. CD45-V450/CD138-Pacific Orange/CD19-FITC/CD49e-PE/
CD49d-PerCP-Cy5.5/CD44-APC/CD56-Pe-Cy7/CD38-APC-H7;
3. CD45-V450/CD138-Pacific Orange/CD58-FITC/CD18-PE/
CD19-PerCP-Cy5.5/CD11a-APC/CD56-Pe-Cy7/CD38-APC-H7;
4. CD45-V450/CD138-Pacific Orange/CD19-FITC/CD184-PE/
CD34-PerCP-Cy5.5/CD117-APC/CD56-Pe-Cy7/CD38-APC-H7.

Mėginiai buvo analizuojami *FACSCanto II* tėkmės citometru, naudojant *FACSDiva* (v. 6.1.3) analizės programą (BD Biosciences, San Jose, JAV). Piktybinės PL buvo identifikuotos ir atskirtos nuo kitų KČ ląstelių imant plačias apibrėžimo sritis, kad į jas patektų kuo daugiau piktybinių PL, leidžiant įtraukti ląsteles, kuriose matoma blankesnė CD38, CD45 ir (ar) CD138 ekspresija. Taip pat buvo atmesti limfocitai, sulipusios ląstelės ir kitos ląstelinės šiukšlės, naudojant priekinės (FSC) ir šoninės (SSC) sklaidos parametrus, taip pat CD45 ekspresiją. Buvo taikomas modifikuotas *European Myeloma Net* metodas, kuriam būtini mažiausiai septyni apibrėžimo kriterijai (CD38, CD138, CD45, CD19, CD56 ekspresija, FSC ir SSC savybės) tame pačiame mėgintuvėlyje. Šiam metodui reikalinga aštuonių spalvų daugiaparametrė tėkmės citometrijos metodika.

Piktybinės PL ir CPL buvo atskiriamos nuo įprastų PL pagal sumažėjusią CD38 ir CD45 ekspresiją, lengvųjų grandžių restrikciją, CD19 neigiamą ekspresiją ir (ar) CD56 teigiamą ekspresiją. Mažiausia populiacija, kurią buvo galima identifikuoti kaip piktybines PL, buvo 100 iš 1 000 000 ląstelių, taigi tyrimo jautrumas buvo ~0,01 %.

Adhezijos molekulių (CD11a, CD18, CD44, CD49d, CD49e, CD58, CD168, CD184) ekspresija buvo vertinama sveikų donorų KČ normaliose PL, DM pacientų KČ piktybinėse PL ir periferinio kraujo CPL. Ekspresijai vertinti buvo naudojamas pakopinio apibrėžimo metodas.

3.3. Piktybinių plazminių ląstelių diagnostinio imunofenotipo nustatymas

Šios tyrimo dalies tikslas buvo nustatyti piktybinių PL imunofenotipo ypatumus, būdingus esant didelės rizikos DM diagnozei, kurią apibrėžia specifinės chromosominės aberacijos (141). Lyginant piktybinių PL imunofenotipo skirtumus aptinkant ir neaptikus šių aberacijų, būtų charakterizuojamas didesnės rizikos piktybinių PL imunofenotipas. Piktybinėse PL aptinkamos įvairios chromosominės aberacijos, dalis jų siejamos su didesnės rizikos liga ir yra plačiai naudojamos tokiose rizikos

apskaičiavimo sistemose, kaip R-ISS ir m-SMART. Galutinis šių chromosominių ir genetinių pokyčių rezultatas yra pakitusi baltymų ekspresija, kurią galima išmatuoti tėkmės citometrijos metodu. Kadangi DM MLL tyrimuose matuojama būtent tų baltymų pakitusi ekspresija, kuri leidžia piktybines ląsteles atskirti nuo normalių, taikomas žymenų rinkinys, palankus ieškant šių pakitimų (142).

3.3.1. Tėkmės citometrijos metodu nustatant diagnozę tirtų pacientų grupė

Buvo peržiūrėti duomenys tų pacientų, kuriems 2019–2020 m. VUL SK buvo diagnozuota DM. Buvo atrinkti 73 pacientai, kuriems piktybinių PL ištyrimas atliktas pagal *EuroFlow* grupės reikalavimus, naudojant naujos kartos tėkmės citometrijos rinkinį DM MLL tyrimams *Multiple Myeloma Minimal Residual Disease* (Cytognos, Salamanca, Ispanija). Pacientams taip pat turėjo būti atliktas SNP mikrogardelės molekulinis kariotipavimas ir FISH analizė dėl chromosominių aberacijų. Įtraukimo kriterijai buvo šie: suaugę pacientai (18 metų ar vyresni); DM diagnozuota pagal IMWG kriterijus; nenustatyta plazminių ląstelių leukemija; netaikomas gydymas nuo kitų piktybinių vėžinių ligų.

Visi klinikiniai ir laboratoriniai duomenys buvo gauti iš elektroninės ligos istorijos ir prieš atliekant statistinę analizę nuasmeninti VUL SK priimta tvarka. *Durie–Salmon* rizika, ISS, R-ISS stadija, m-SMART rizika buvo apskaičiuota pagal duomenis, prieinamus diagnozės metu. Genų raiškos profiliavimo (GEP) tyrimas nebuvo prieinamas m-SMART klasifikacijai. Imunohistochemiškai piktybinėse PL nustatytas didelis Ki-67 aktyvumas (>10 %) buvo naudojamas vietoje padidėjusios piktybinių PL S fazės (paminėtos m-SMART kriterijuose), kadangi gali būti pakaitinis daug aktyvesnio ląstelių dalijimosi žymuo (143).

3.3.2. Diagnostinio imunofenotipo matavimo metodika

Visiems pacientams buvo atlikta TC analizė iš kaulų čiulpų aspiratų, naudojant *EuroFlow* mėginių paruošimo, reagentų parinkimo ir tėkmės citometro nustatymų parinkimo protokolus. Mėginiai buvo dažomi naudojant *MM-MRD* rinkinį (Cytognos, Salamanca) ir praleisti BD *FACSCanto II* tėkmės citometru. Duomenys buvo analizuojami naudojant *FACSDiva v9.0*.

Visos PL, įskaitant piktybines PL ir įprastas PL, buvo atskirtos nuo kitų gyvybingų ląstelių, kuo plačiau brėžiant regionus, kad būtų apimtos CD38, CD45 ir CD138 blankiai ekspresuojančios ląstelės. Limfocitai, sulipusios ląstelės ir ląstelinės šiukšlės buvo atmestos remiantis FSC ir SSC parametrais,

CD45 ekspresija. Piktybinės PL ir įprastos PL buvo atskirtos remiantis dvimatėmis diagramomis su žymenimis, kurių ekspresijos skirtumai būdingi piktybinėms PL, – CD27, CD81, CD117, CD19, CD45, CD56.

Buvo išmatuotas visų naudotų žymenų ekspresijos procentas piktybinėse PL, taip pat ekspresijos intensyvumas pagal MFI. Taip pat buvo apibrėžtos kitos ląstelių populiacijos – NK/T limfocitai (CD56+, SSC-žema, CD45+ryški), B limfocitai (CD19+, SSC-žema, CD45+ryški, CD138–), CD27+ atminties limfocitų subpopuliacijos. Aptikimo riba visoms populiacijoms buvo 20 ląstelių. Tikslus ekspresijos procentas buvo apskaičiuotas visiems žymenims, išskyrus CD38 ir CD138, kurių ekspresija buvo vertinama kaip teigiama 100 % PL.

CD138+ plazminės ląstelės buvo atrinktos naudojant magnetines daleles prieš SNP mikrogardelės molekulinį kariotipavimą. Visi atvejai buvo tirti atliekant *Infinium HD* viso genomo genotipavimo tyrimą, taikant *HumanCytoSNP-12 BeadChip* (Illumine Inc, San Diego, CA), kuris padengia visą genomą vidutiniu 9,6 kilobazių atstumu ir leidžia vidutinę 31 kb raišką. Mėginiai buvo paruošti ir tyrimai atlikti naudojant įprastą protokolą, pateiktą gamintojo. Genotipai buvo įvardyti *GenomeStudio* GT modulio v 1.7 (Illumina Inc) ir toliau analizuoti *QuantiSNP* versija 1.1(144) ir *KaryoStudio* versija 1.0.3 (Illumina Inc). Konstituciniai kopijų skaičiaus polimorfizmai buvo neįtraukti remiantis palyginimu su genomo variantų duomenų baze (angl. *Database of Genomic Variants*).

3.4. Minimalios liekamosios ligos imunofenotipo analizės harmonizacija

Šios tyrimo dalies tikslas buvo priimti harmonizuotą MLL tyrimo analizės algoritmą, kuriuo analizuodami duomenis vadovautųsi specialistai ir gautų panašius tyrimo rezultatus. VUL SK tėkmės citometrijos padalinys prisijungė prie mokslininkų grupės, kuri siekė palyginti naudojamus analizės algoritmus ir priimti bendrą algoritmą. Siekėme įvertinti kiek tai mažina skirtumus tarp laboratorijų vertinant tiek MLL kiekį, tiek su KČ aspirato kokybe siejamas ląstelių populiacijas. Tyrime dalyvavo septyniolika tyrimų centrų, esančių JAV, Europoje, Azijoje ir Australijoje, kuriuose atliekami DM MLL tyrimai. Duomenys analizei buvo surinkti iš mėginių, paruoštų ir surinktų vienoje laboratorijoje, vadovaujantis ta pačia metodika, taigi vienintelis skirtumas tarp rezultatų būtų nulemtas analizės strategijos skirtumų. Kiekviename etape visi dalyviai aptarė rezultatus, ir siūlė algoritmo žingsnius, vėliau priėmė bendrą, visiems priimtina analizės strategiją. Vėlesniuose tyrimo etapuose tyrėjai iš naujo analizavo ankstesnius ir naujus duomenų rinkinius bei įvertino, ar naudota bendra analizės strategija pagerino rezultatų tapatumą.

3.4.1. Dauginės mielomos minimalios liekamosios ligos analizės harmonizacijos etapai

Pirmame etape buvo analizuojami duomenų failai, gauti iš dviejų mėgintuvėlių, kurių kiekvienas turėjo aštuonių fluorochromų kombinaciją. Šis rinkinys yra patvirtintas ir validuotas ICCS ir ESCCA darbo grupių. Analizuodami failus taikėme savo laboratorijoje priimtą analizės strategiją, naudodami *Infinicyt* v2.0 programinę įrangą. Tačiau dėl geresnių pakopinių ląstelių apibrėžimo galimybių, taip pat pritaikomumo failų formatui, galutinę analizę atlikome taikydami *Kaluza* (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, JAV) programinę įrangą.

Analizės metu VUL SK tėkmės citometrijos padalinyje apskaičiavome ir į rezultatų lentelę įrašėme šiuos duomenis: „bendras ląstelių kiekis“, „normalios PL“, „aberantinės PL“, „MLL procentas“, „tyrimo aptikimo riba“, „kiekybinio nustatymo riba“. Taip pat reikėjo apskaičiuoti kitų KČ aspiratui būdingų populiacijų kiekius: mastocitų, hematogonų (B limfocitų pirmtakų), mieloidinių ir eritroidinių pirmtakų. Taip pat turėjome nuspręsti, ar mėginyje yra aptinkama MLL, ar neaptinkama MLL, ar MLL aptikimo negalima įvertinti. Įvertinome KČ mėginio kokybę, remdamiesi KČ būdingų kraujodaros ląstelių kiekiais. Po pirmo etapo rezultatai buvo surinkti ir apibendrinti bendroje visų dalyvių rezultatų lentelėje. Įvertinome savo gautus MLL rezultatus, palyginome su kitų tyrimų centrų rezultatais. Susirinkime aptarėme bendrai priimto analizės algoritmo pirminis variantas. Šis pirminis variantas vėliau buvo koreguojamas remiantis papildomo, po susirinkimo visoms laboratorijoms išsiųsto klausimyno atsakymais.

Antrame etape iš naujo įvertinome FCS failus, gautus pirmo etapo metu, tačiau naudodami pirminį bendros analizės strategijos variantą. Peržiūrėjus antro etapo rezultatus, pirminė sutarimo analizės strategija buvo atnaujinta. Trečiame etape buvo analizuojama 10 naujų FCS failų. Trečio etapo tikslas buvo patikrinti, ar galutinė bendra analizės strategija pagerina rezultatų pakartojimą tarp tyrėjų, jiems analizuojant vienodus duomenis.

3.5. Statistinė duomenų analizė

Visos tirtose ląstelių populiacijose išmatuota teigiama paviršiaus ar citoplazmos antigenų ekspresija procentais ir vidutinė kiekvieno žymens ekspresija pagal MFI, taip pat ląstelių procentinis dalis iš visų ląstelių. Visi tirti kintamieji patikrinti dėl normalaus pasiskirstymo naudojant *Shapiro-Wilk* testą. Kai kintamųjų, tokių kaip teigiamos žymenų ekspresijos procento ir MFI, pasiskirstymas nebuvo normalus, buvo naudojami neparametriniai testai

– *Mann–Whitney U* arba *Wilcoxon* testas grupėse su dviem kategorijomis ir *Kruskal–Wallis* testas grupėms su daugiau nei dviem kategorijomis. Nustatant geriausiai CPL aptikimą nuspėjančius adhezijos žymenis, buvo pritaikytas logistinės regresijos modelis, taikant *Wald* chi kvadratą atrasti nustatomi geriausiai modeliui tinkantys žymenys. Norint nustatyti šių žymenų jautrumą ir specifiškumą, konstruota ROC kreivė. Lyginant bendrą išgyvenamumą buvo taikomos *Kaplan–Meier log rank* testas. Statistiškai pasirinktas patikimumas $p < 0,05$.

Lyginant MLL rezultatus tarp skirtingų laboratorijų, pagrindinis statistinis matmuo siekiant lyginti skirtumus tarp laboratorijų buvo variacijos koeficientas – CV (angl. *coefficient of variation*). CV procentas buvo apskaičiuotas padalinus standartinį nuokrypį – SD (angl. *standard deviation*) iš rezultatų vidurkio ir padauginus iš šimto procentų. Visi rezultatai, kurie buvo nutolę daugiau nei 2 SD nuo vidurkio, buvo vertinami kaip išskirtys ir pašalinti iš analizės. Vertinant mastocitų, hematogonų, piktybinių PL, eritroidinių ir mieloidinių pirmtakų naudojimą apibrėžiant KČ aspirato kokybę, buvo apskaičiuotas plotas po ROC.

4. TYRIMŲ REZULTATAI

4.1. Piktybinių plazminių ląstelių adhezijos imunofenotipo vertinimas recidyvinės ir (ar) refrakterinės dauginės mielomos pacientams

4.1.1. Tiriamųjų grupės apibūdinimas

Į tyrimą buvo įtrauktas 41 RRDM sergantis pacientas (3 lentelė) ir 14 sveikų donorų. Donorų amžius buvo 26,5 metų, tarp jų buvo 13 moterų ir 1 vyras. RRDM pacientų vidutinis amžius buvo 72 metai (55–81 m.), iš jų 22 moterys ir 19 vyrų. Donorų amžiaus vidurkis buvo didesnis, nei pacientų, tačiau sveikų donorų KČ aspirato paskirtis buvo įvertinti normalių PL, įprastai aptinkamų KČ, adhezijos imunofenotipą sveikoje populiacijoje, nepriklausomai nuo amžiaus.

3 lentelė. Adhezijos imunofenotipo tyrimo pacientų duomenys

Parametras	CPL+ grupės mediana (ribos)	CPL– grupės mediana (ribos)	p-vertė (Mann–Whitney U testas)
Grupės dydis	30	11	
Amžius	71 (55–81)	72 (68–81)	0,156
HgB (g/l)	99 (70–137)	109 (86–136)	0,204
Trombocitų sk. ($\times 10^9/l$)	135 (58–226)	199 (113–261)	0,010
Serumo baltymai (g/l)	87,4 (61,8–126,2)	80,6 (63,2–104,4)	0,495
Albuminas (g/l)	39,5 (22,7–57,8)	34,9 (27,9–58,9)	0,571
M baltymas (g/l)	32,6 (1,44–66,5)	21,9 (4,73–49)	0,824
Kreatininas ($\mu\text{mol/l}$)	87 (57–393)	77 (61–157)	0,717
B2 mikroglobulinas (mg/l)	5,2 (2,33–23,1)	5,8 (2,5–14,3)	0,805
Ca ²⁺ (mmol/l)	1,25 (1,04–1,78)	1,15 (1,08–1,43)	0,329

KČ PL (mikroskopija) (%)	27,5 (5,5–79)	16 (1–61)	0,116
LDH (U/l)	207 (103–1796)	185 (123–291)	0,717
Taikytos terapijos kursų skaičius	2 (1–7)	3 (1–4)	0,717
KKLT	19/30	3/11	
Gydymas proteosomų inhibitoriais	22/30	3/11	
Gydymas imunomodulatoriais	20/30	11/11	

PL – plazminės ląstelės, CPL – cirkuliuojančios PL, CPL+ - pacientai su aptinkamomis CPL, CPL- - pacientai be aptinkamų plazminių ląstelių. KČ – kaulų čiulpai. KKLT – kamieninių kraujodaros ląstelių transplantacija.

Kadangi įvertintas visų DM pacientų PK, buvo išskirta grupė pacientų, kuriems aptikta CPL. Tuomet buvo įvertintas CPL adhezijos imunofenotipas. Vidutinis CPL kiekis buvo 0,79 (SD ± 1,309), o mediana 0,1505 (Q1 0,024; Q3 0,901). CPL procentų ribos buvo 0,0069 % – 4,71 %.

Dalis žymenų, kurie buvo naudojami piktybinėms PL aptikti (CD38, CD138 ir CD56), taip pat turi vaidmenį ląstelių adhezijoje, todėl buvo analizuojami kartu su adhezijos molekulėmis.

4.1.2. Recidyvinės ir (ar) refrakterinės dauginės mielomos pacientų grupių adhezijos imunofenotipo skirtumai aptinkant ir neaptinkant cirkuliuojančių plazminių ląstelių

Tyrimė buvo palygintos dvi pacientų grupės – su aptinkamomis CPL (CPL+) ir neaptinkamomis CPL (CPL-) (4 lentelė). Lyginti jų KČ piktybinių PL adhezijos imunofenotipai. Pastebėjome, kad CPL+ ir CPL- RRDM pacientų KČ piktybinės PL turėjo labai skirtingą adhezijos žymenų ekspresiją.

4 lentelė. Adhezijos žymenų ekspresijos palyginimai tarp skirtingų piktybinių PL populiacijų

Lyginamos PL populiacijos	Adhezijos žymuo	Ekspresija procentais	Wilcoxon <i>p</i> reikšmė	Ekspresija MFI	Wilcoxon <i>p</i> reikšmė
		Mediana		Vidurkis	
CPL– ir CPL+ pacientų KČ piktybinės PL	CD49d	100 vs 100	0,5820	45322 vs 24645	0,0284
	CD49e	12 vs 9	0,0464	814 vs 328	0,0800
	CD38	100 vs 100	1,0000	21025 vs 16040	0,1154
	CD138	100 vs 100	1,0000	4237 vs 2247	0,0140
	CD56	100 vs 100	0,1007	54182 vs 21139	0,0152
Piktybinės PL vs sveikų donorų PL	CD49d	100 vs 100	0,4428	30192 vs 58090	0,0001
	CD49e	10 vs 23	0,0155	458 vs 575	0,0312
	CD38	100 vs 100	1,0000	17377 vs 62912	0,0001
	CD138	100 vs 100	1,0000	2781 vs 2517	0,9154
	CD168	32 vs 8	0,1700	1468 vs 466	0,0017
CPL– pacientų KČ piktybinės PL vs sveikų donorų PL	CD49d	100 vs 100	0,9360	45322 vs 58090	0,1490
	CD49e	12 vs 23	0,4030	814 vs 575	0,8510
	CD38	100 vs 100	1,0000	21025 vs 62912	0,0001
	CD138	100 vs 100	1,0000	4237 vs 2517	0,0850
CPL+ pacientų KČ piktybinės PL vs CPL	CD49d	100 vs 98	0,0003	24645 vs 19662	0,0083
	CD58	100 vs 96	0,0021	1332 vs 819	0,0001
	CD38	100 vs 100	1,0000	16040 vs 12875	0,1413
	CD138	100 vs 100	1,0000	2247 vs 1480	0,0022
KČ piktybinės PL vs PK CPL	CD49d	100 vs 98	0,0001	30192 vs 19662	0,0010
	CD49e	10 vs 3	0,0005	458 vs 170	0,0001
	CD38	100 vs 100	1,0000	17377 vs 12875	0,0282
	CD138	100 vs 100	1,0000	2781 vs 1480	0,0001
	CD56	100 vs 100	0,4135	30004 vs 12826	0,0184
	CD168	8 vs 3	0,0500	466 vs 327	0,3500

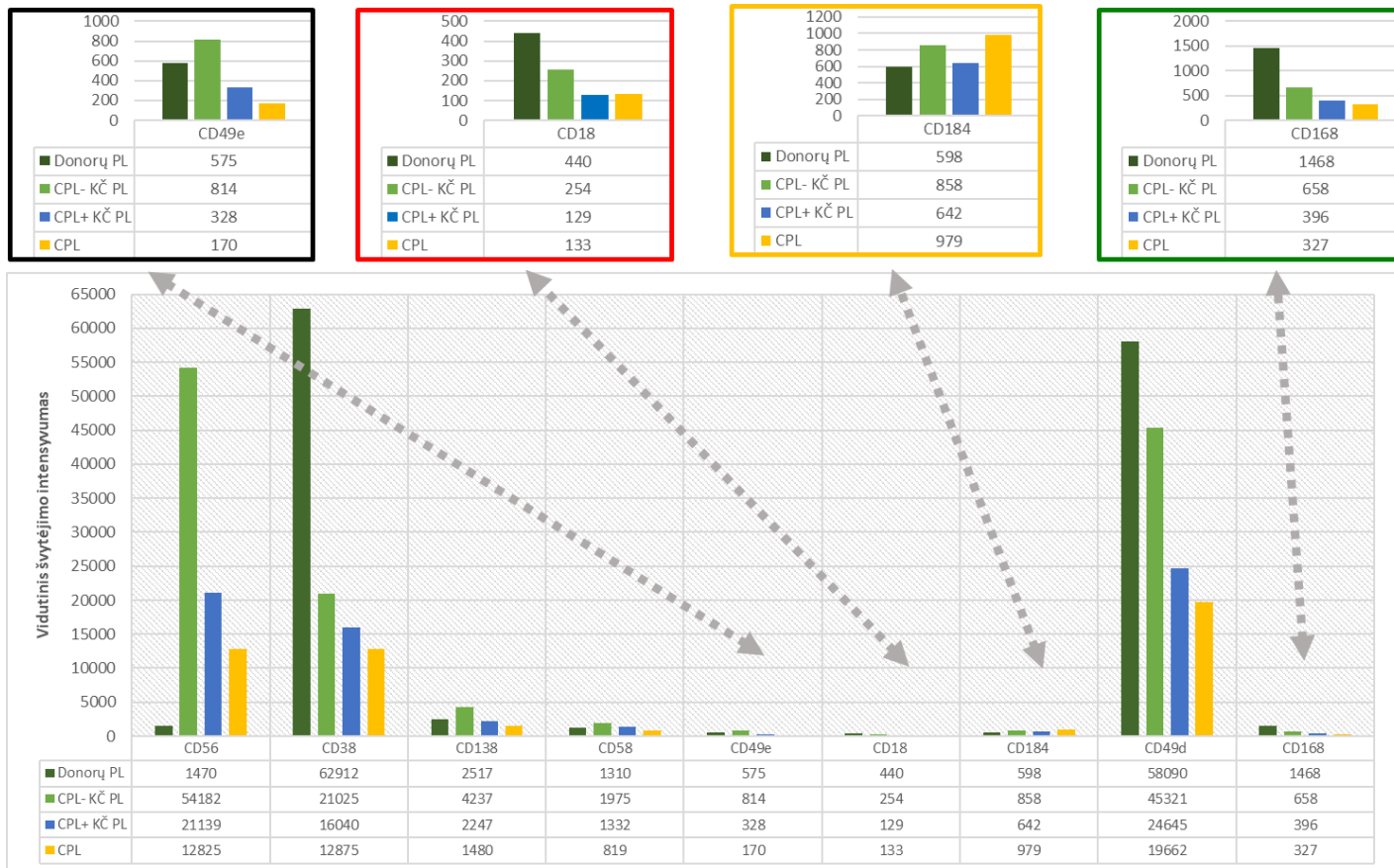
PL – plazminės ląstelės, CPL – cirkuliuojančios PL, KČ – klauči čiulpai. PK – periferinis kraujas. CPL+ - pacientai su aptinkamomis CPL, CPL- - pacientai be aptinkamų CPL.

CPL+ KČ piktybinės PL turėjo daug mažesnę vidutinę ekspresiją pagal MFI šių adhezijos molekulių: CD49d, CD56 ir CD138, palyginti su CPL– KČ piktybinėmis PL (3 pav.).

Buvo nustatyta tendencingai mažėjanti adhezijos žymenų ekspresija – didžiausia adhezijos molekulių ekspresija nustatyta sveikų donorų KČ PL, mažesnė CPL– RRDM pacientų, dar mažesnė CPL+ RRDM KČ piktybinėse PL, o pati mažiausia buvo aptikta pačiose PK tirtose CPL (3 pav.). Didžiausi skirtumai nustatyti lyginant CD38, CD49d ir CD56 adhezijos molekulių MFI. Kitus adhezijos žymenis ekspresavo mažesnis PL procentas, taip pat pačių molekulių ekspresija ląstelėse buvo silpnesnė pagal MFI.

PK CPL turėjo blankesnę ekspresiją šių adhezijos molekulių: CD38, CD49d ir CD138, palyginti su CPL+ RRDM pacientų KČ piktybinėmis PL. CD56 ekspresija buvo mažiausia CPL, tačiau statistiškai patikimas skirtumas buvo pastebimas tik lyginant su CPL– RDMM pacientų KČ piktybinėmis PL. CD58 ekspresija taip pat buvo silpnesnė CPL nei KČ piktybinėse PL (4 lentelė).

Sveikų donorų KČ PL analizės paskirtis buvo išryškinti piktybinių PL adhezijos molekulių ekspresijos skirtumus nuo normalių PL. Sveikų donorų KČ PL turėjo ryškesnę CD38, CD49d, CD49e ir CD168 ekspresiją pagal MFI nei abiejų pacientų grupių piktybinių PL populiacijos. Tačiau lyginant tik CPL– pacientų KČ piktybines PL su sveikų donorų PL nepastebėta statistiškai patikimo CD49e ir CD49d ekspresijos skirtumo – tai galėtų reikšti, kad šių piktybinių PL adhezijos imunofenotipas artimesnis normaliam.



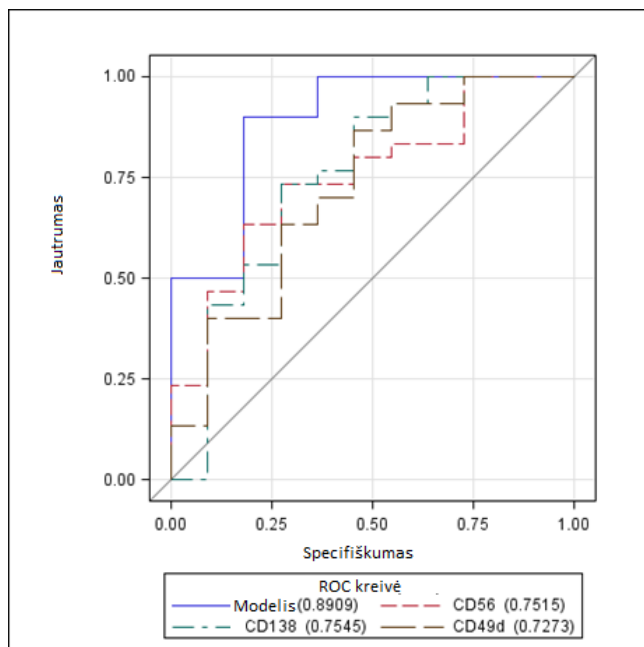
3 paveikslas. Adhezijos molekulių ekspresijos skirtumai tarp skirtingų PL populiacijų.

PL – plazminės ląstelės. CPL – cirkuliuojančios PL. KČ – kaulų čiulpai. CPL– - pacientai be aptinkamų CPL. CPL+ su aptinkamomis CPL.

5 lentelė. Didžiausio tikėtinumų metodas apskaičiuojant, kurie adhezijos žymenys geriausiai nuspėja cirkuliuojančių plazminių aptikimą periferiniame kraujyje

Žymens (pgl. švytėjimo intensyvumą)	ekspresija vidutinį	Įvertis	Standartinė paklaida	Wald Chi kvadratas	p-reiškė
CD45		-0,00008	0,000100	0,5928	0,4413
CD56		-0,00003	0,000014	4,6806	0,0305
CD38		-0,00005	0,000037	2,0278	0,1544
CD138		-0,00071	0,000281	6,3809	0,0115
CD19		-0,00254	0,00171	2,2145	0,1367
CD117		0,000021	0,000063	0,1066	0,7440
CD58		-0,00093	0,000493	3,5818	0,0584
CD49e		-0,00214	0,00118	3,2574	0,0711
CD18		-0,00326	0,00202	2,5985	0,1070
CD184		-0,00074	0,000667	1,2423	0,2650
CD49d		-0,00004	0,000018	5,4396	0,0197
CD44		0,0000008	0,000184	0,0000	0,9967
CD11a		-0,00038	0,000826	0,2167	0,6416
CD168		-0,00023	0,000335	0,4694	0,4933

Taip pat buvo atlikta binarinės logistinės regresijos analizė kiekvieno adhezijos žymens MFI, nustatyta, kurie iš jų patikimiausiai nurodo CPL aptikimo tikėtinumą (5 lentelė). Trys žymenys (CD56, CD138 ir CD49d) parodė geriausią statistinį patikimumą ir buvo panaudoti ROC kreivės modelyje (4 pav.). Kiekvienam iš šių žymenų buvo apskaičiuota ribinė vertė, nurodanti CPL aptikimo tikėtinumą, taip pat jautrumas, specifiškumas ir skiriamoji geba (6 lentelė). Buvo pasiektas patenkinamas modelio bendras plotas po kreive (AUC=0,8909), parodantis, kad šių trijų žymenų ekspresija gerai tinka CPL aptikimui periferiniame kraujyje nuspėti.



4 paveikslas. Trijų adhezijos žymenų ROC kreivės modelis, nurodantis tinkamumą nuspėti CPL aptikimą PK

6 lentelė. Trijų adhezijos žymenų parametrai, parodantys, kaip tiksliai nuspėja CPL aptikimą. Ekspresijos riba MFI. Tyrimo parametrai – jautrumas, specifiškumas, TPV, NPV klaidingai neigiami, klaidingai teigiami rezultatai – procentais.

Ekspresija	Riba	Jautrumas	Specifiškumas	TPV	NPV	Klaidingai Teigiamas	Klaidingai Neigiamas
CD56 MFI	28430	66.7	72.7	87.0	44.4	13.0	55.6
CD138 MFI	3480	83.3	54.5	83.3	54.5	16.7	45.5
CD49d MFI	41925	90.0	45.5	81.8	62.5	18.2	37.5

TPV - teigiama prognostinė vertė (TPV), NPV - neigiama prognostinė vertė. MFI – vidutinis švytėjimo intensyvumas.

Atlikta *Spearman rho* koreliacijos analizė tarp CPL procentinio kiekio PK ir CPL išmatuotų adhezijos molekulių MFI, tačiau nebuvo aptikta statistškai patikimos koreliacijos. Arčiausiai patikimo rezultato buvo neigiamas ryšys tarp CD49e MFI ir CPL procento – mažėjant CD49e ekspresijai, didėja CPL procentas.

4.2. Piktybinių plazminių ląstelių diagnostinio imunofenotipo sąsaja su rizikos veiksniais

4.2.1. Pacientų apibūdinimas

Buvo atrinkti 73 pacientai, kuriems VUL SK diagnozuota DM (7 lentelė) ir kurie atitiko įtraukimo į tyrimą kriterijus (DM diagnozė, diagnozės metu taikytas *EuroFlow* žymenų panelis ir SNP-a kariotipavimas).

7 lentelė. Į tyrimą įtrauktų pacientų charakteristika. Didelės rizikos chromosominės aberacijos – 17p delecija, 1q duplikacija, t(4;14), t(14;16), t(14;20)

Matmuo	Pacientų skaičius (%) <i>n</i> = 73
Vyrai	30 (41,1 %)
Moterys	43 (58,9 %)
R-ISS I stadija	10 (13,7 %)
R-ISS II stadija	42 (57,5 %)
R-ISS III stadija	19 (26,0 %)
m-SMART standartinė rizika	35 (47,9 %)
m-SMART didelė rizika	38 (52,1 %)
Įprastas kariotipas	19 (26,0 %)
Neaptikta didelės rizikos aberacijų	49 (67,1 %)
1 didelės rizikos aberacija	21 (28,8 %)
2 didelės rizikos aberacijos	3 (4,1 %)
IgG	36 (49,3 %)
IgA	15 (20,5 %)
Matmuo	Vidurkis (ribos)
Amžius	67 (42–84)
ECOG būklės vertinimas	1 (0–4)
HgB (g/l)	110 (67–185)
Kreatininas (μmol/l)	92 (38–920)
Beta-2 mikroglobulinas (mg/l)	4,9 (1,38–47,41)
Albuminas (g/l)	40 (15,9–54,7)
LDH (U/l)	199 (104–697)
Ca ²⁺ (mmol/l)	1,22 (1,04–2,61)

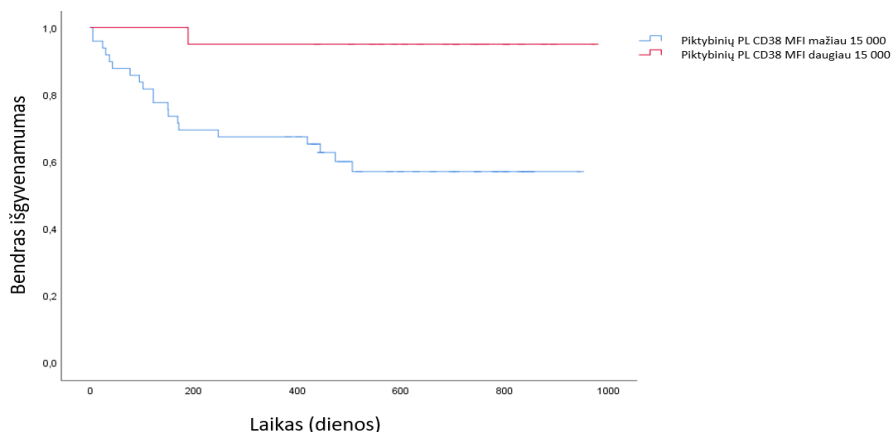
R-ISS – peržiūrėta tarptautinė stadijos nustatymo sistema. M-SMART (mielomos stratifikacijos ir su rizika susijusios terapijos klasifikacija). ECOG - Rytų bendradarbiavimo onkologijos grupės bendros būklės vertinimo skalė.

Kadangi pacientų įtraukimas į tyrimą nebuvo iš anksto numatytas, jų būklė pagal ECOG ir gretutinės ligos buvo sudėtingesnės, nei įprastai įtraukiamų į planinius DM klinikinius tyrimus.

4.2.2. Piktybinių plazminių ląstelių imunofenotipo ir chromosominių aberacijų įtaka išgyvenamumui

Daugumoje kategorijų nenustatyta išgyvenamumo skirtumų, tikėtina, dėl trumpesnio stebėjimo laiko. Vidutinis laikas iki peržiūros buvo 699 dienos. Išgyvenamumas buvo 68,5 % visoje grupėje. Didžiausią išgyvenamumą turintis pogrupis buvo izoliuotą HK turintys pacientai (90 %), tačiau statistškai patikimo skirtumo lyginant su neizoliuotą HK turinčiais pacientais (60 %) nepastebėta ($p > 0,05$).

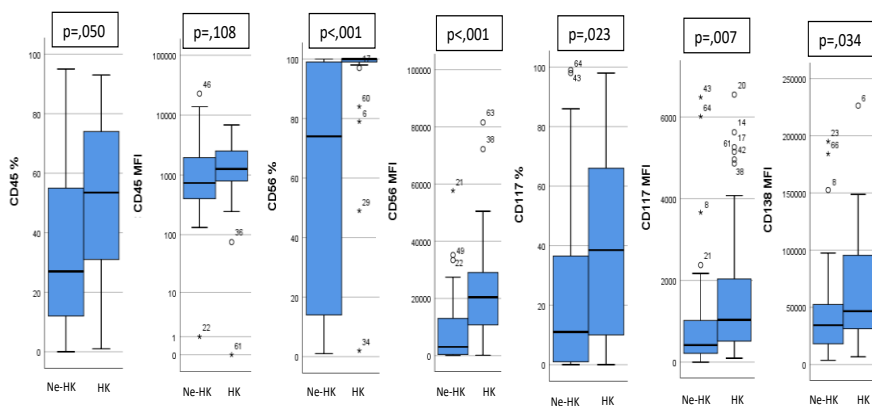
Įdomus išgyvenamumo statistinis ryšys buvo pastebėtas tiriant ryškesnę CD38 ekspresiją turinčius pacientus (5 pav.). Kadangi dalis pacientų gavo gydymą prieš CD38, jie buvo pašalinti iš analizės. Taip pat buvo atlikta koreliacijos analizė tarp CD38 MFI ir kitų parametru, tačiau patikima statistinė koreliacija rasta tik su piktybinių PL kiekiu ir ISS bei R-ISS kategorijomis (9 lentelė). CD38 ekspresija nebuvo statistškai patikimai priklausoma nuo chromosominių aberacijų (8 lentelė). Buvo išskirtos dvi kategorijos pacientų – tie, kurių piktybinių PL CD38 MFI buvo didesnis ir mažesnis nei 15 000. CD38 MFI esant mažesniam nei 15 000, pacientų bendras išgyvenamumas buvo 58,5 %, o MFI esant didesniam nei 15 000, bendras išgyvenamumas buvo 95 %. *Kaplan–Meier log rank* testas rodė statistinį patikimumą ($p = 0,03$). Tai reikštų, kad CD38 yra nuo genetikos nepriklausomas veiksnys, kurios mažesnė ekspresija yra statistiškai susijusi su trumpesniu išgyvenamumu.



5 paveikslas. Pacientų, suskirstytų į grupes atsižvelgiant į CD38 ekspresiją pagal MFI, didesnę ar mažesnę nei 15 000, bendro išgyvenamumo kreivė. MFI – vidutinis švytėjimo intensyvumas. PL – plazminės ląstelės.

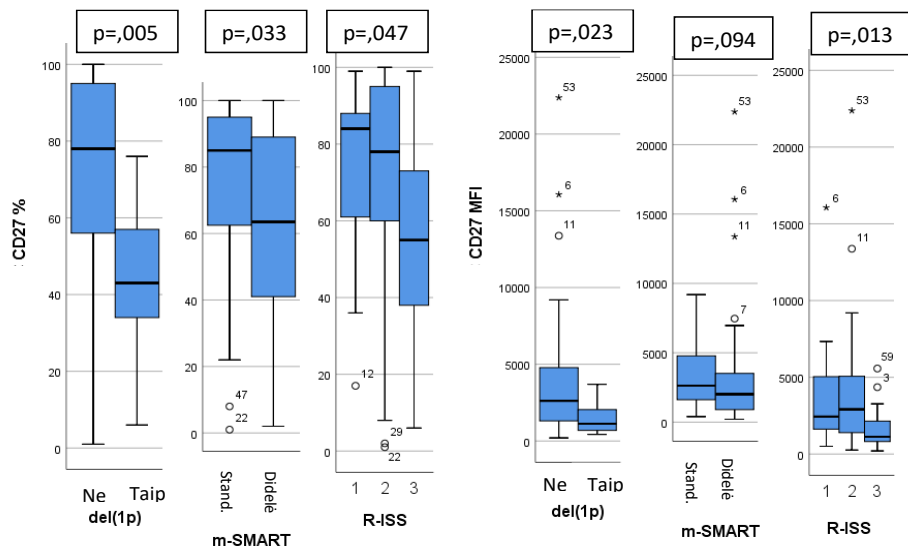
4.2.3. Piktybinių plazminių ląstelių imunofenotipo skirtumai aptikus skirtingas chromosomų aberacijas

Pacientai buvo suskirstyti pagal aptiktas chromosomų aberacijas ir *IGH* geno translokacijas (8 lentelė). 30 pacientų (41 %) turėjo hiperdiploidinį kariotipą (HK), kuris siejamas su standartine ligos rizika. HK turintys pacientai pasižymėjo labai skirtingu piktybinių PL imunofenotipu – ryškesne CD45, CD56, CD117, CD138 ekspresija piktybinėse PL, taip pat didesniu piktybinių PL procentu KČ, nei kiti pacientai (6 pav.). Izoliuotas HK (be kitų chromosominių aberacijų), priešingai, turėjo mažesnę piktybinių PL procentą, taip pat mažesnę piktybinių ir normalių PL santykį (pPL/nPL), lyginant su HK, papildomai turinčiu kitas chromosomines aberacijas.

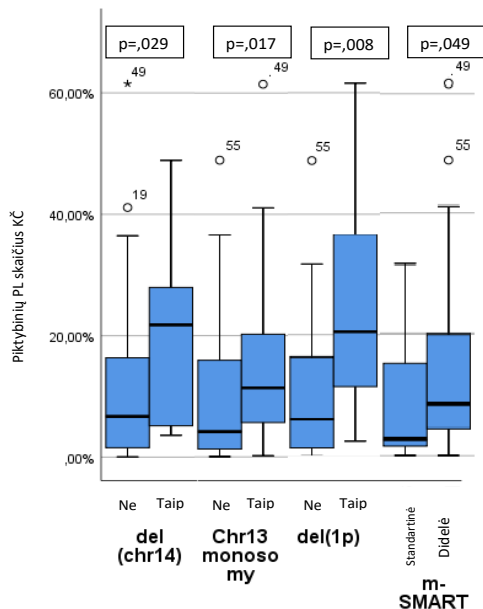


6 paveikslas. Piktybinių PL žymenų ekspresijos palyginimas tarp DM pacientų, kuriems nustatytas hiperdiploidinis kariotipas (HK), ir pacientų, kuriems šis kariotipas nenustatytas (ne-HK). MFI – vidutinis švytėjimo intensyvumas.

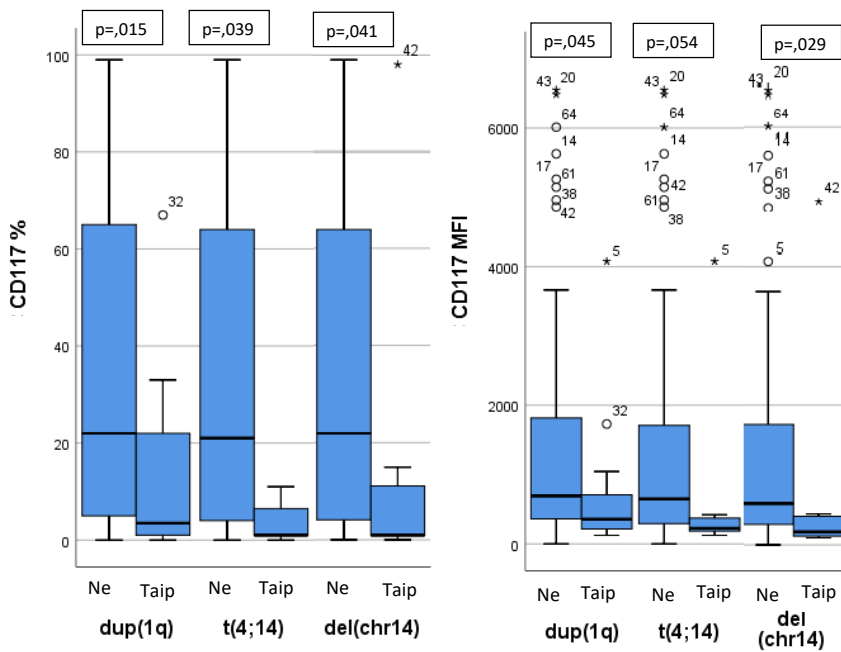
Dažnai į didelės rizikos kategoriją įtraukiamos šios chromosominės aberacijos: 1q duplikacija, 17p delecija, translokacijos t(4;14), t(14;16). Šešiolikai pacientų (22 %) buvo aptikta 1q duplikacija, tačiau nebuvo aptikta su itin didele rizika siejama 1q amplifikacija (>4 kopijų). Pacientų, turinčių 1q duplikaciją, piktybinės PL turėjo blankesnę CD27, CD117 ekspresiją, taip pat didesnę pPL/nPL santykį, mažesnę nPL procentą (8 lentelė). Aštuoniems pacientams buvo nustatyta ir 1q duplikacija, ir HK. Lyginant su HK neturinčiais, tačiau 1q duplikaciją turinčiais pacientais, šiai grupei buvo nustatyta ryškesnė CD117 ekspresija ir didesnis CD56+ T/NK limfocitų procentas.



7 paveikslas. CD27 ekspresijos palyginimas aptikus didelės rizikos chromosominę aberaciją (1p deleciją) ir esant skirtingoms m-SMART (mielomos stratifikacijos ir su rizika susijusios terapijos klasifikacija) ir R-ISS (peržiūrėta tarptautinė stadijos nustatymo sistema) rizikos kategorijoms.



8 paveikslas. Piktybinių PL procento KČ palyginimas nustatius skirtingas chromosomines aberacijas (chr14 delecija, chr13 monosomija, 1p delecija) ir esant skirtingam m-SMART (mielomos stratifikacijos ir su rizika susijusios terapijos klasifikacija) rizikos lygiui.



9 paveikslas. CD117 ekspresijos piktybinėse PL palyginimas, nustačius skirtingas didelės rizikos chromosomines aberacijas – 1q duplikaciją, t(4;14) ir chr14 deleciją. MFI – vidutinis švytėjimo intensyvumas.

8 lentelė. Imunofenotipo, ląstelių procentų palyginimas pagal chromosomines aberacijas pacientų grupėse.

	HK (neizoliuotas) 20 (27 %)	HK (izoliuotas) 10 (14 %)	1q duplikacija 16 (22 %)	Neaptikta 1q duplikacijos 57 (78 %)	t(4;14) 7 (10 %)	t(4;14) neaptikta 66 (90 %)	14 chromosomos monosomija 8 (11 %)	Chr14 monosomijos neaptikta 65 (89 %)	1p delecija 9 (12 %)	1p delecijos neaptikta 64 (88 %)
CD27 %	64	82	62	77	56	77	69,5	74	43* ↓	78* ↑
CD27 MFI	1313	2523	1118* ↓	2532* ↑	1123	2442	2624	2323	1123* ↓	2619* ↑
CD38 MFI	11146	13033	10679	12594	12006	11848	10726	12006	10965	11945
CD45 %	48,5	62,5	32	42	30	41	31,5	41,5	42	40,5
CD45 MFI	1162	1524	1089	900	1089	908	865	919	916	911
CD56 %	100	100	100	98	100	97	95	99	100	97,5
CD56 MFI	19210	21590	11271	9452	11645	8885	6634	11314	11271	9966
CD117 %	31	61	2* ↓	20* ↑	1* ↓	21* ↑	1* ↓	19* ↑	4	21
CD117 MFI	929	1494	326* ↓	657* ↑	225	649	215* ↓	632* ↑	408	649
CD138 MFI	45732	47978	39489	38436	31296	39003	34173	39321	37720	39338
Piktybinių PL % KČ	16,7* ↑	4,1* ↓	7,3	8,4	6,1	7,0	21,8* ↑	7,2* ↓	20,5* ↑	6,0* ↓
Normalių PL % KČ	0,026* ↓	0,068* ↑	0,013* ↓	0,033* ↑	0,012* ↓	0,033* ↑	0,012	0,031	0,012*	0,035* ↑
pPL/nPL santykis	538,2* ↑	71,3* ↓	566,3* ↑	168,5* ↓	317,0	189,0	1145,7* ↑	168,5* ↓	↓ 1938,6 *↑	157,7* ↓
CD56+ T/NK ląstelių %	29,9* ↑	21,4* ↓	25,3	24,6	26,3	24,6	26,8	24,5	32,9* ↑	24,3* ↓
CD27+ T limfocitų %	40* ↓	47* ↑	41	44	41,3	43,9	43,7	43,8	41,3	44,1
B limfocitų %	6,8	11,7	6,8	9,4	11,4	8,6	4,7* ↓	9,4* ↑	5,6	9,1
Beta-2 mikroglobulinas (mg/l)	6,4* ↑	3,3* ↓	5,8	4,5	5,7	4,7	7,4	4,9	14,3* ↑	4,1* ↓
Hemoglobinas (g/l)	97,5* ↓	123* ↑	96,5* ↓	115* ↑	97* ↓	113* ↑	100,5	110	98* ↓	113* ↑

MFI – vidutinis švytėjimo intensyvumas, HK – hiperdiploidinis kariotipas, PL – plazminės ląstelės. pPL – piktybinės PL, nPL – normalios PL, KČ – kaulų čiulpai.

9 lentelė. Imunofenotipo, ląstelių procentų ir laboratorinių rodiklių palyginimas skirtingose pagal chromosomines aberacijas pacientų grupėse

	m-SMART didelė rizika 35 (48 %)	m-SMART standartinė rizik 38 (52 %)	R-ISS stadija			ISS stadija		
			I 10 (14 %)	II 42 (58 %)	III 19 (26 %)	I 25 (34 %)	II 16 (22 %)	III 30 (41 %)
CD27 %	64* ↓	85* ↑	86* ↑	78* ↑	55,00* ↓	74* ↑	94* ↑	57* ↓
CD27 MFI	2017	2626	2442* ↑	2813* ↑	1103* ↓	2531* ↑	3897* ↑	1373* ↓
CD38 MFI	11667	11884	14560* ↑	12783* ↑↓	10238* ↓	14895* ↑	12440* ↑↓	10106* ↓
CD45 %	34	44	36	44	37	36	38	45
CD45 MFI	919	900	794	1129	919	871	972	1006
CD56 %	98,5	98	99	97	99,5	99	93	99
CD56 MFI	10097	11691	15159	6622	11050	11691	9903	9017
CD117 %	13	32	41	6	22	23	4	18
CD117 MFI	451	781	1111	411	691	693	291	613
CD138 MFI	37536	41261	36217* ↑	41261* ↓↑	27662* ↓	40490	38792	32820
Pikybinių PL % KČ	8,4* ↑	2,5* ↓	3,5* ↓	6,8* ↑	14,4* ↑	3,5* ↓	2,6* ↓	16,7* ↑
Normalių PL % KČ	0,022* ↓	0,044* ↑	0,041* ↑	0,034* ↓↑	0,013* ↓	0,042	0,032	0,022
pPL/nPL santykis	317* ↑	88,1* ↓	42* ↓	169* ↑	501* ↑	65,7* ↓	140,6* ↓	435,2* ↑
CD56+ T/NK ląstelių %	26* ↑	23,5* ↓	28,8	24	30	25,9	22,9	28,0
B limfocitų %	6,7	9,7	13,8* ↑	9,4* ↓↑	5,5* ↓	9,9	7,4	5,9
Beta-2 mikroglobulinas (mg/l)	5,8	3,7						
Hemoglobinas (g/l)	99,5* ↓	116* ↑	119,5* ↑	113* ↓↑	94* ↓	124* ↑	118* ↓↑	97* ↓
Albuminas (g/l)	40,1	39,7						

MFI – vidutinis švėtėjimo intensyvumas, HK – hiperdiploidinis kariotipas, KČ – kaulų čiulpai. ISS – tarptautinė stadijos nustatymo sistema, R-ISS – peržiūrėta ISS. m-SMART - mielomos stratifikacijos ir su rizika susijusios terapijos klasifikacija.

Translokacija t(4;14) aptikta 7 pacientams, kurių piktybinių PL CD117 ekspresija buvo silpnesnė, taip pat jie turėjo mažesnę normalių PL procentą (8 lentelė).

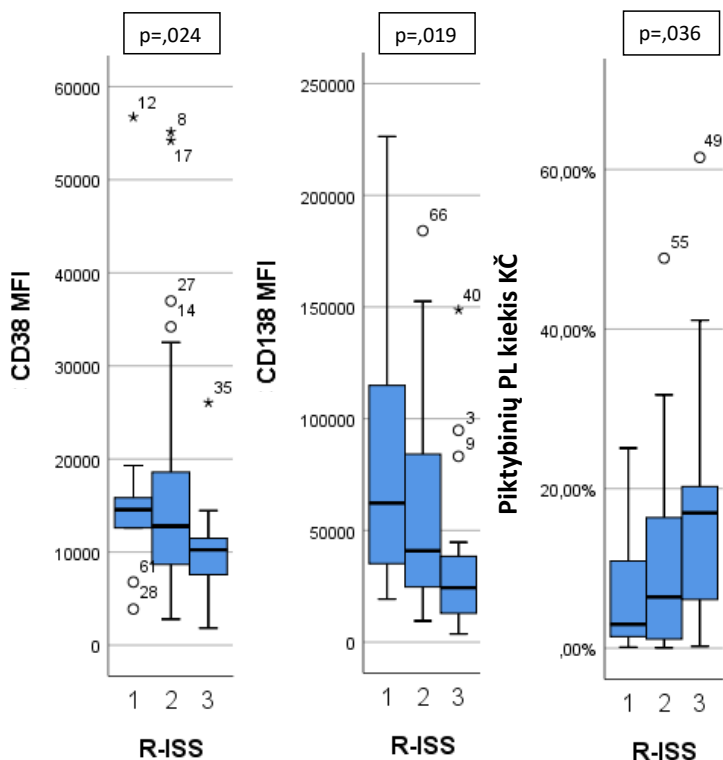
17p delecija aptikta 9 pacientams, tačiau jie neturėjo ženklių imunofenotipo ar ląstelių populiacijų skirtumų, palyginti su kitais pacientais.

Translokacija t(14;16) buvo aptikta vienam pacientui, kaip ir t(14;20), o tai nebuvo pakankamas kiekis statistinei analizei.

Kitos chromosominės aberacijos, kurios gali būti vertinamos kaip didelės rizikos pagal literatūros duomenis, yra 14 chromosomos monosomija arba trumpojo peties delecija (14q delecija), taip pat 13 chromosomos monosomija, 1 chromosomos trumpojo peties delecija (1p delecija).

8 pacientai (11%) turėjo 14 chromosomos monosomiją arba 14q deleciją. Jiems buvo nustatyta blankesnė CD117 ekspresija ir didesnis piktybinių PL procentas KČ (8 lentelė). 23 pacientams buvo nustatyta 13 chromosomos monosomija. Jiems buvo didesnis piktybinių PL procentas ir pPL/nPL santykis. 1p delecija turėjo statistiškai mažesnę CD27 ekspresiją, didesnę pPL procentą ir mažesnę nPL procentą (8 pav.).

DM ligos rizikos vertinimo sistemos, tokios kaip ISS, R-ISS stadija ir m-SMART rizikos kategorijos, taip pat turėjo statistiškai patikimą ryšį su imunofenotipu (9 lentelė). Pacientai, kuriems nustatyta didesnės rizikos ligos stadija pagal ISS, turėjo blankesnę CD27 ir CD38 ekspresiją, didesnę piktybinių PL procentą ir mažesnę normalių PL procentą. Didesnė R-ISS rizikos stadija buvo statistiškai patikimai susijusi su mažesne CD27, CD38 ir CD138 ekspresija piktybinėse PL. Taip pat pastebėti ląstelių subpopuliacijų pokyčiai esant didesnei ligos R-ISS stadijai – didesnis pPL/nPL santykis, mažesnis B limfocitų procentas KČ. Didesnės M-SMART rizikos pacientų piktybinės PL turėjo blankesnę CD27 ekspresiją, didesnę piktybinių PL procentą, didesnę CD56+ T/NK limfocitų procentą.



10 paveikslas. CD38 ir CD138 MFI bei KČ piktybinių PL procento palyginimas esant skirtingiems R-ISS rizikos vertinimo lygiams. MFI – vidutinis švytėjimo intensyvumas. R-ISS – peržiūrėta tarptautinė stadijos nustatymo sistema.

Taip pat buvo vertinama chromosominių pokyčių visuma, remiantis kopijų skaičiaus variacijų suma, skaičiuojama megabazėmis. Tačiau statistiškai patikimų skirtumų nebuvo aptikta nei HK, nei kitose pacientų grupėse.

Dauguma HK pacientų turėjo 3, 5, 7, 9, 11 ar 19 chromosomų trisomijas. Tačiau jokios šių trisomijų kombinacijos ar atskiros trisomijos, ar jų kiekis neturėjo statistinio ryšio su imunofenotipu.

4.3. Minimalios liekamosios ligos imunofenotipo duomenų analizės strategijos harmonizavimas

Aprašysiu darbo grupės, kurioje dirbo specialistai iš užsienio tyrimo centrų ir VUL SK tėkmės citometrijos padalinio, atlikto tyrimo etapus. Lyginant skirtingų tyrimo centrų rezultatus buvo pastebėta, kad bendra analizės strategija sumažina nuo tyrėjo priklausomą variaciją. Taip pat sugebėjome pritaikyti ir įvykdyti priimtą analizės strategiją. Apibrėžėme ląstelių

populiacijas, skirtas KČ ėminio kokybei įvertinti. Tai ypač svarbu sprendžiant apie MLL rezultatų teikimą, kadangi imant KČ yra rizika, kad ėminys bus praskiestas PK, kuriame dažniausiai aptinkamas daug mažesnis kiekis tiriamų ląstelių (116). Taigi kokybės vertinimas turėtų būti neatsiejamas nuo MLL tyrimo rezultatų interpretavimo.

4.3.1. Pirmas etapas: duomenų failų analizė naudojant skirtingose laboratorijose taikomas analizės strategijas

Pirmame etape vertinome šešioliką nuasmenintų duomenų failų, surinktų iš aštuonių pacientų KČ mėginių. Turėjome nuspręsti, ar mėginiuose MLL buvo teigiama ar neigiama, taip pat apskaičiuoti piktybinių PL kiekį mėginyje. Daugumos mėginių vertinimas sutapo lyginant VUL SK ir daugumą darbo grupės dalyvių, tačiau labiausiai nuomonės išsiskyrė dėl mėginio Nr. 5, kurį 65% įvertino kaip teigiamą, kaip ir įvertinome mes. Taip pat privalėjome įvertinti „bendrą ląstelių kiekį“, kuris yra visų aptiktų ląstelių populiacijų procentų skaičiavimo lygties vardiklis. Bendras ląstelių kiekis mėginyje nulemia tyrimo jautrumą. Naudojome bendro ląstelių skaičiaus vertinimo strategiją, pirma apibrėžiančią pavienes ląsteles FSC-A ir FSC-H diagramoje, tuomet įvertinant gyvybingas ląsteles FSC-A ir SSC-A diagramoje, galiausiai apibrėžiant tikėtinus kariocitus diagramoje su SSC-A ir CD45 ekspresija. Per vėlesnes diskusijas mūsų naudojama strategija buvo papildyta rinkimo laiko diagrama, su FSC-A ir laiko ašimis.

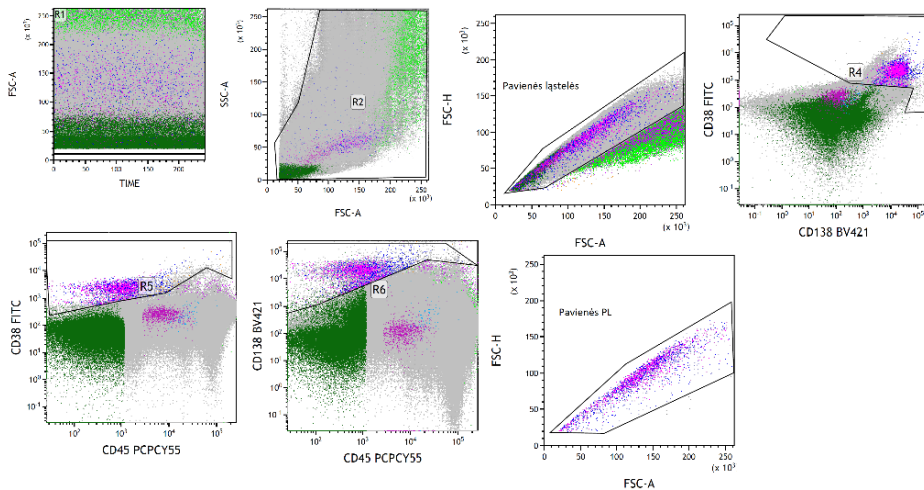
Buvo bendrai nuspręsta keturių pakopų analizės strategija, leidžianti apskaičiuoti „bendrą ląstelių skaičių“, iš kurio dalijami visų kitų ląstelių populiacijų skaičiai, nustatant procentinį jų kiekį. „Bendras ląstelių skaičius“ buvo apibrėžtas kaip visos branduolėtiosios ląstelės (kariocitai). Joms išskirti reikėjo apibrėžti regionus taškineje diagramoje iš dviejų kintamųjų – „Rinkimo laiko“ ir priekinės sklaidos ploto (FSC-A), kad būtų atmesti rinkimo metu registruoti artefaktai, pvz. oro burbulai ar kiti rinkimo trikdžiai. Kitas žingsnis buvo pavienių ląstelių atskyrimas naudojant FSC-A ir FSC-H (priekinės sklaidos aukštį) kaip diagramos kintamuosius. Branduolėtiosios ląstelės buvo atskiriamos naudojant kintamuosius FSC-A ir SSC-A (šoninės sklaidos plotas), taip pat SSC-A ir CD45 raišką, kad būtų atmetos negyvybingos (apoptozinės) ląstelės, šiukšlės ir ląstelių agregatai.

- 1) Pirma apibrėžiamos pavienės ląstelės, atmesti dideli ląstelių agregatai ir šiukšlės, naudojant kelių regionų derinį.
- 2) Stačiakampis regionas apibrėžiamas iš pirmojo regiono ląstelių, sukuriamas diagramoje su FSC-A ir FSC-H. Taip pasirenkamos pavienės ląstelės, atmetami ląstelių agregatai.

- 3) Brėžiamas netaisyklingos formos regionas diagramoje su FSC-A ir SSC-A, siekiant apimti tik gyvybingas ląsteles.
- 4) Ląstelės apibrėžiamos dideliame daugiakampyje regione, kuris apima CD45+ leukocitus, CD45– eritrocitų pirmtakus ir CD45– PL.

Visos ląstelės, patenkančios į aprašytą suminį regioną, yra laikomos „Bendru ląstelių skaičiumi“.

Sulipusių ląstelių atmetimas būtinas pavienių ląstelių analizei, tačiau piktybinės PL gali būti didesnės ir turėti hiperdiploidinį kariotipą, todėl patenka į regioną prie ląstelių agregatų diagramoje su FSC-A ir FSC-H, kuris įprastai atmetamas. Pasiūlėme, kad reikalinga modifikuota analizė, kuri įtrauktų visas PL, net turinčias didesnę nei įprastą FSC-A ir FSC-H santykį. Analizės strategijoje apibrėžiamas regionas, kuris sujungia visas branduolėtas ląsteles, tačiau taip pat regioną, kuriame yra visos PL.



11 paveikslas. Visų pavienių PL parinkimo analizės algoritmas. FSC-A – priekinė šviesos sklaida. SSC-A – šoninė šviesos sklaida.

Sudėtingiausia analizės dalis yra įprastų ir aberantinių PL diferenciacija, kadangi nėra vieno konkretaus DM būdingo imunofenotipo. Dalis normalių PL gali dalinai ekspresuoti žymenis, kurie siejami su piktybinėmis PL, aptinkamomis esant DM. Tokiais atvejais vienintelis atskyrimo būdas yra polikloninė lengvųjų grandžių ekspresija. Kadangi šiuo metu nėra vieno konkretaus analizės algoritmo, kuriuo remdamiesi visi kvalifikuoti tyrėjai galėtų gauti tokius pačius rezultatus, tyrimo dalyviai aptarė kelis skirtingus analizės etapus, leidžiančius atskirti aberantines ir normalias PL.

Atskirdami piktybinių PL populiacijam, pirminę diagramą naudojome su ašimis CD19 ir CD56, kurių taškinėje diagramoje galima aptikti ir

identifikuoti tikėtinas aberantines PL populiacijas. Šioje taškinėje diagramoje išskiriamė tris PL subpopuliacijos – CD19+CD56–, CD19–CD56–, CD19–CD56+. Vėliau pridėjome papildomą regioną CD19+CD56+, kuriame rečiau aptinkamos piktybinės PL. Tuomet naudojome skirtingas dviejų kintamųjų taškines diagramas, kuriose peržiūrėjome visas subpopuliacijos, atkreipiant dėmesį į tikėtiną DM būdingą imunofenotipą. Pirmam mėgintuvėliui naudojamos taškinės diagramos yra: CD38 ir CD117, CD45 ir CD38, CD45 ir CD27, CD81 ir CD27, kuriose patikrinamos visos keturios subpopuliacijos. Tie patys žingsniai kartojami antrame mėgintuvėlyje, kuriam kuriamos diagramos CD45 ir CD38, CD45 ir CD27, cKappa ir cLambda.

Normalios PL dažniausiai turi imunofenotipą CD19+, CD56–, CD45+, CD38+ryš, CD117–, CD81+, CD27+ ir polikloninę lengvųjų grandžių ekspresiją, tačiau galima heterogeniška žymenų CD19, CD56, CD45 ir CD81 ekspresija. Visos ląstelės, kurių žymenų ekspresijos braižas neatitinka normalaus, yra įtariamoms, taigi turi būti atidžiai patikrintos. Reikėtų atkreipti dėmesį, kad skirtingų pacientų piktybinės PL taip pat turi imunofenotipo skirtumų, taigi skirsis ir kiekvienu konkrečiu atveju taikoma strategija.

- 1) Sukuriama taškinė diagrama su kintamaisiais CD56 ir CD19, nubrėžiamas platus, visas PL, išskyrus CD19+, CD56–, apimantis atvirksčios „L“ formos regionas, kuriame retai aptinkamos piktybinės PL (išskyrus atvejus, kai per pirminę apžvalgą šio regiono PL sukėlė įtarimą dėl fenotipo).
- 2) Diagramoje su ašimis CD45 ir CD38 apibrėžiamos visos aberantinės PL, tačiau įtraukiant dalį normalių PL dėl galimai heterogeniškos žymenų ekspresijos.
- 3) Brėžiamas stačiakampis regionas taškinėje diagramoje su ašimis CD45 ir CD117 taip, kad būtų apibrėžtos visos aberantinės PL, tačiau taip pat apibrėžiant nedidelę dalį normalių PL.
- 4) Paskutinis regionas brėžiamas diagramoje su ašimis CD81 ir CD27, kad būtų įtrauktos visos PL, turinčios aberantinį imunofenotipą.
- 5) Paskutinio regiono ląstelės paryškinamos skirtinga spalva, kad būtų galima lengviau koreguoti ankstesnius regionus ir pasiekti galutinį aberantinių PL kiekį (MLL) pirmame mėgintuvėlyje.

Žingsniai kartojami antrame mėgintuvėlyje, pradedant nuo „Visos PL“, kadangi regionai yra vienodi abiejuose mėgintuvėliuose. Atvirksčios „L“ formos regionas brėžiamas ant taškinės diagramos su ašimis CD19 ir CD56.

4.3.2. Antras etapas: pirminės bendros analizės strategijos taikymas

Priėmę pirminį bendrą duomenų analizės algoritmą, iš naujo analizavome tuos pačius aštuonis FCS duomenų failus iš pirmo etapo. Lyginama, ar pasikeitė MLL vertinimas. Naudojant bendrą analizės strategiją, mėginį Nr. 8 iš naujo įvertinome kaip MLL neigiamą. Nepasikeitė skaičius dalyvių, kurie MLL teigiamais laikė mėginius Nr. 1, Nr. 2, Nr. 5, Nr. 6. Dviem dalyviais padaugėjo tų, kurie MLL neigiamais vertino mėginius Nr. 3 ir Nr. 8. Du dalyviai, mėginį Nr. 4 įvertinę kaip MLL teigiamą pirmame etape, pakeitė vertinimą į MLL neigiamą, o vienas iš MLL neigiamo vertinimo – į teigiamą.

4.3.3. Trečias etapas: galutinės bendros duomenų analizės strategijos priėmimas

Ankstesnis pirmo etapo FCS failų peržiūrėjimas galėjo paveikti antro etapo rezultatus, todėl siekiant geriau įvertinti bendrą duomenų analizės strategiją buvo vykdoma dešimties naujų duomenų failų analizė iš DM pacientų, kuriems įtariamas MLL aptikimas. Kaip ir antrame etape, analizavome failus naudodami bendrą duomenų analizės strategiją ir pateikėme savo rezultatus.

Norint empiriškai patikrinti, ar konsensusu priimta duomenų analizės strategija gerina rezultatų pakartojamumą, buvo lyginami visų etapų rezultatai. Mūsų laboratorijos rezultatų variacija buvo panaši į kitų laboratorijų, dauguma matuotų parametru buvo mažiau nei 2 SD nutolę nuo vidurkio (10, 11 lentelės). Bendrai vertinant visas laboratorijas pritaikius strategiją, „Bendro analizuotų ląstelių skaičiaus“ variacija antrame ir trečiame etape buvo daug mažesnė nei pirmame etape. Šis skirtumas išliko išskiriant MLL teigiamų ir neigiamų mėginių analizę. Variacija buvo mažesnė ir lyginant „Visų PL“ skaičių trečiame etape. Atskirai analizuojant teigiamus MLL mėginius, CV labai sumažėjo tarp pirmo ir trečio etapo, o MLL neigiamų mėginių sumažėjo kiekviename etape. Nepastebėta didesnių skirtumų lyginant etapus pagal normalių PL skaičių. Įvedus konsensuso apibrėžimus, labai sumažėjo tyrimo aptikimo ribos ir kokybinio nustatymo ribos variacija, susijusi su dalyviais.

10 lentelė. Aptikimo ribos (LOD) rezultatai VUL SK ir visų tyrimo dalyvių vidurkis, SD ir CV trečiame harmonizacijos tyrimo etape MLL+ ir MLL– mėginiuose

Mėginys	LOD (VUL SK)	LOD vidurkis (SD)	CV, %
MLL+			
001	0,00026	0,00026 ± 0,00002	8,33
003	0,00023	0,00023 ± 0,00001	3,37
006	0,00022	0,00022 ± 0,00001	3,56
007	0,00024	0,00023 ± 0,00001	4,58
010	0,00027	0,00027 ± 0,00001	4,57
MLL–			
002	0,00024	0,00023 ± 0,00001	6,09
004	0,00032	0,00029 ± 0,00002	7,69
005	0,00023	0,00023 ± 0	1,92
008	0,00025	0,00025 ± 0,00002	8,82
009	0,00024	0,00024 ± 0,00001	2,62

MLL – minimali liekamoji liga. MLL+ mėginiai su aptinkama MLL, MLL- - mėginiai su neaptinkama MLL. SD – standartinis nuokrypis. CV – variacijos koeficientas. VUL SK – Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos

11 lentelė. MLL kiekio (proc.) rezultatai VUL SK ir visų tyrimo dalyvių vidurkis, SD ir CV trečiame harmonizacijos tyrimo etape MLL+ ir MLL– mėginiuose

Mėginys	MLL proc. (VUL SK)	MLL proc. vidurkis (SD)	CV, %
MLL+			
001	0,0007	0,0013 ± 0,00072	55,7
003	0,001	0,00196 ± 0,00109	55,78
006	0,0017	0,00203 ± 0,0007	34,8
007	0,0018	0,00239 ± 0,00073	30,66
010	0,0008	0,00086 ± 0,00045	52,69
MLL–			
002	0,0001	0,00004 ± 0,00009	236,02
004	0,0001	0,00485 ± 0,01268	261,35
005	0,0005	0,00023 ± 0,00048	211,23
008	0,0002	0,00007 ± 0,00012	173,89
009	0,0002	0,00253 ± 0,00628	248,83

MLL – minimali liekamoji liga. MLL+ mėginiai su aptinkama MLL, MLL- - mėginiai su neaptinkama MLL. SD – standartinis nuokrypis. CV – variacijos koeficientas. VUL SK – Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos

4.4. Kaulų čiulpu aspiracijos mėginio kokybės vertinimas

Aberantinių PL aptikimas ypač priklauso nuo KČ aspiracijos mėginio kokybės. Norint įvertinti mastocitų ir hematogonų tinkamumą vertinant KČ mėginio kokybę, buvo atlikta regresijos analizė, kuri lygino šių populiacijų kiekį mėginyje ir tyrėjų paskelbtą vertinimą apie mėginio kokybę. Taip pat buvo pastebėta, kad nepaisant to, kaip tyrėjai vertino mėginio kokybę, tačiau ląstelių kiekius nustatė tuos pačius.

Prieš antrą etapą pateikėme siūlymą, kad mėginio kokybei vertinti reikėtų apskaičiuoti bent dviejų KČ aspiracijos mėginiui būdingų ląstelių populiacijų kiekį. Pagrindinis siūlytas kriterijus buvo mastocitų procentas, ir bent vienos iš kraujodaros populiacijų procentas. Šios populiacijos pagal tinkamumą kokybei vertinti bendru sutarymu išsirikiavo taip: hematogonai (B limfocitų pirmtakai), mieloidiniai pirmtakai (prekursoriai), eritroidiniai pirmtakai. Aberantinių PL aptikimas pats savaime nebuvo laikomas geros kokybės KČ mėginio kriterijumi.

Mastocitų identifikacijai tinkamas tik pirmas mėgintuvėlis, kuriame yra reikalingas CD117 žymuo. Kad būtų galima įvertinti mastocitų kiekį, reikalingi du etapai.

- 1) Dviašėje taškinėje diagramoje su kintamaisiais CD81 ir CD117 apibrėžiamas regionas CD117+ryš, CD81+bl. CD81+bl ekspresija leidžia atmesti nespecifinį CD81 žymens jungimą.
- 2) Iš diagramos su SSC-A ir CD45 apibrėžiamas kitas regionas, kuriame parenkamos CD45+, SSC-žemos ląstelės, kurios savo savybėmis atitinka mastocitus. Šis galutinis regionas įvardijamas „Mastocitai“.

Nepaisant skirtumų tarp pirmo ir antro mėgintuvėlių, abiejuose galima aptikti B limfocitų pirmtakų – hematogonų, tačiau naudojant skirtingus analizės etapus. Koreliacijos koeficientas r tarp pirmo ir antro mėgintuvėlių B limfocitų pirmtakų skaičiaus buvo 82,4 %.

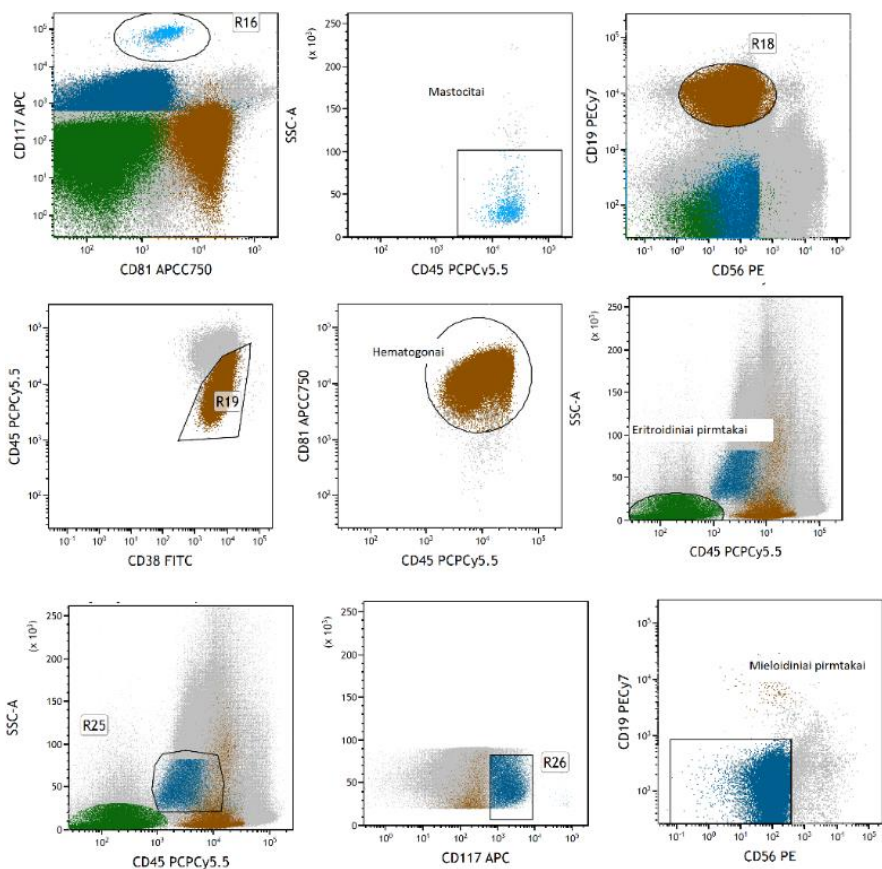
- 1) Pradedant nuo pavienių ląstelių, regionas brėžiamas diagramoje su CD56 ir CD19, kad būtų įtrauktos visos CD19+ B ląstelės ir atmesti CD56+ nespecifinį jungimą turintys atvejai.
- 2) Bbrėžiamas regionas diagramoje su CD38 ir CD45, kuriame CD38+, CD45+bl hematogonai atskiriami nuo brandžių B limfocitų (CD38+bl, CD45+ryš).
- 3) Iš šio regiono tikslinama hematogonų populiacija, diagramoje CD45 ir CD81 apibrėžiant CD45+bl, CD81+ryš hematogonus.
- 4) Diagramoje su SSC ir CD45 apibrėžiamas regionas, kuriame atmetamos SSC-aukštos ląstelės, apibrėžiami tikėtini hematogonai

(CD45+, SSC-žema), kurių skaičius galutinai įvardijamas pirmam mėgintuvėliui.

Pirmas ir antras žingsniai kartojami antrame mėgintuvėliui, taip sukuriamas regionas su CD56 ir CD19, o iš jo – regionas diagramoje CD38 ir CD45. Diagramoje su cLambda ir cKappa išskiriamas lengvųjų grandžių neekspresuojantis regionas. Paskutinis žingsnis – iš pastarojo regiono apibrėžiamas regionas diagramoje su SSC-A ir CD45, kuriame taip pat atmetamos SSC-aukštos ląstelės, ir parenkamas galutinis regionas, kuriame yra visi CD45+, SSC-žemi hematogonai iš antro mėgintuvėlio.

Mieloidiniai pirmtakai gali būti aptikti tik pirmame mėgintuvėlyje, kadangi tam reikalingas CD117 žymuo. Diagramoje su SSC-A ir CD45 brėžiamas netaisyklingas regionas kuriame yra visi atvejai, atitinkantys apibrėžimą SSC-žema, CD45+bl. Iš jo brėžiamas regionas diagramoje su SSC-A ir CD117, kad plačiai apimtų CD117+ ląsteles, į kurias įeina mieloidiniai pirmtakai, įskaitant CD117+het promielocitus.

Eritroidiniai pirmtakai, arba eritrokariocitai, gali būti aptikti abiejuose mėgintuvėliuose, tačiau tyrėjų grupės sprendimas buvo naudoti tik pirmą mėgintuvėlį, kadangi papildomi mėginio paruošimo etapai antrame mėgintuvėlyje (fiksavimas ir permeabilizacija, plovimas) sumažintų branduolėtųjų eritrokariocitų kiekį mėginyje. Tačiau taip pat pažymėta, kad dėl nepakankamos mėginio lizės pirmame mėgintuvėlyje būtų aptiktas per didelis kiekis eritrokariocitų, todėl šiai populiacijai buvo skirta mažiausia svarba vertinant kaulų čiulpų kokybę. Priimta bendra analizės strategija pradedama diagrama su SSC-A ir CD45, apibrėžta iš pavienių ląstelių, tarp kurių nėra PL. Šis regionas naudojamas apibrėžti grupei ląstelių, kurios yra SSC-žemos, CD45– ar CD45+b. Taip išvedamas galutinis pirmame mėgintuvėlyje esančių eritroidinių pirmtakų apibrėžimas.



12 paveikslas. Mastocitų, hematogonų, eritroidinių ir mieloidinių pirmtakų parinkimo analizės algoritmas. FSC-A priekinė šviesos sklaida, SSC-A šoninė šviesos sklaida.

4.4.1.1. Kaulų čiulpų aspiracijos mėginio kokybę apibrėžiančių ląstelių ribinių verčių nustatymas

Bendros duomenų analizės strategijos priėmimas reikšmingai sumažino mastocitų ir hematogonų variaciją tarp pirmo ir antro ar trečio etapų ($p < 0,001$). Šis skirtumas išliko skirstant analizę į MLL teigiamus ir neigiamus mėginius.

Siekiant įvertinti mastocitų, hematogonų ir mieloidinių pirmtakų tinkamumą naudoti kaip kaulų čiulpų aspirato mėginio kokybės kriterijų, buvo atlikta ROC analizė. Geriausias mėginio kokybės kriterijus buvo nustatytas 0,0015 % ar didesnis kiekis mastocitų mėginyje, dalinant iš „bendro ląstelių skaičiaus“ ($p < 0,001$). Pagal bendrą duomenų analizės strategiją, jei aptikta mažiau nei 0,0015 % mastocitų, reikėtų vertinti bent vieną kitą populiaciją – kitu atveju mėginį reikėtų laikyti netinkamu MLL vertinimui. Nors mastocitų

aptikimas reiškia, kad buvo paimtas kokybiškas kaulų čiulpų aspiracijos mėginys, jų aptikimas savaime neparodo, ar mėginys nebuvo prasiskiedęs periferiniu krauju, taip pat ar tiriami kaulų čiulpai hipoplastiški, tai yra turi sumažėjusį ląstelingumą.

Antroje vietoje pagal tinkamumą kokybei vertinti buvo hematogonų procentas, didesnis nei 0,025 ($p < 0,001$). Mieloidinių pirmtakų procentas, didesnis nei 0,146, taip pat gali būti naudojamas mėginio kokybei vertinti. Mažiausiai naudingas kriterijus buvo eritroidinių pirmtakų procentas, didesnis nei 0,754, laikomas mažiausiai tinkamu dėl mažiausio AUC ir galimos eritrocitų lizės įtakos ruošiant mėginius tyrimui.

Norint įvertinti, ar taikant šiuos kriterijus pagerėtų pakartojamumas vertinant mėginio kokybę, KČ mėginius kaip tinkamus, netinkamus ar tarpinius MLL vertinimui priskiriančių tyrėjų procentinė dalis buvo palyginta prieš ir po bendros strategijos priėmimo. Paaiškėjo, kad priėmus bendrus kriterijus sutarimas tarp tyrėjų pagerėjo nuo 72,4 % iki 97,1 %.

5. REZULTATŲ APTARIMAS

5.1. Piktybinių plazminių ląstelių adhezijos imunofenotipo reikšmė CPL formavimuisi

Nors į adhezijos imunofenotipo tyrimą įtrauktų pacientų populiacija buvo gana įvairi, tačiau jiems visiems pasireiškė atsparumas ankstesniems gydymo kursams, taip pat KČ turėjo tėkmės citometrijos metodu aptinkamą MLL kloną, o tai nulėmė prastesnę šios pacientų grupės prognozę – taigi jie buvo svarbi tikslinė grupė klinikiniam tyrimams. Tyrimo metu nustatyta, kad pacientams, turintiems aptinkamas CPL PK, adhezijos žymenų ekspresija piktybinėse PL buvo daug mažesnė, palyginti su CPL PK neturinčiais pacientais. Dar mažesnė ekspresija buvo pastebėta pačiose CPL. Kiti autoriai yra nustatę adhezijos molekulių ekspresijos sumažėjimą, būdingą piktybinėms PL: Arana ir kt. (5) duomenimis, pacientai, turintys itin blankią CD38 ekspresiją, pasižymi trumpesniu laiku iki ligos progresavimo ir mažesniu išgyvenamumu. Nors mes aptikome sumažėjusią CD49d ekspresiją lygindami sveikų donorų KČ PL su RRDM pacientų KČ piktybinėmis PL, kiti autoriai yra paskelbę priešingus rezultatus (145). Taip pat yra nustatyta, kad kai kurios vaistų grupės, pvz. imunomodulatoriai (talidomidas ir jo analogai), gali sumažinti CD49d ekspresiją, o dėl to ir piktybinių PL adheziją prie kaulų čiulpų stromos (130).

Nors CD49d sumažėjimas CPL yra aprašytas (146), mūsų aptiktas skirtumas tarp CPL+ ir CPL– pacientų KČ piktybinių PL nėra anksčiau aprašytas. Taip pat neaprašyta mažėjimo tendencija, kurią mes aptikome lygindami visus tiriamus mėginius: didžiausia ekspresija buvo sveikų donorų KČ, mažėjanti ekspresija – CPL– pacientų piktybinėse PL, CPL+ pacientų piktybinėse PL, o mažiausia – pačiose CPL. Taip pat nustatėme panašiai mažėjančią CD56 ekspresiją CPL, kuri yra minima literatūroje (11, 142), kaip ir nustatyta sumažėjusi CD58 ekspresija, kurią Pojero ir kt. (102) aprašė būtent RRDM pacientams, kurių periferiniame kraujyje aptinkamos CPL.

Paiva ir kt. (75) yra aprašę chemoterapijai atsparius MLL klonus, kurie pasižymėjo didesne CD11a, CD49d, CD49e ir CD44 ekspresija. Mes taip pat nustatėme didesnę CD49e ekspresiją lygindami RRDM pacientų ir sveikų donorų KČ PL, tačiau kitų žymenų ekspresija skyrėsi. Dalis šių žymenų turėjo mažesnę ekspresiją CPL nei KČ piktybinėse PL, o tai sutampa su ankstesniais Paiva ir kt. radiniais (146), kad PK CPL taip pat turėjo mažesnę adhezijos žymenų ekspresiją. Dalis šių skirtumų pabrėžia dvilypę adhezijos molekulių reikšmę – didesnė ekspresija gali nulemti atsparumą gydymui dėl apsauginio

kaulų čiulpų mikroaplinkos poveikio, tačiau mažesnė ekspresija lemia CPL susidarymą ir ligos plitimą bei progresavimą.

Apibendrinant pasakytina, kad mes nustatėme statistiškai reikšmingą adhezijos molekulių sumažėjimą (CD49d, CD49e, CD56, CD138) arba mažėjimo tendenciją (CD38, CD58, CD18, CD168) lygindami CPL+ ir CPL– pacientų KČ piktybines PL, taip pat tendenciją dalies šių adhezijos molekulių ekspresijos sumažėjimą pačiose CPL. Tai reiškia, kad adhezijos molekulių imunofenotipo skirtumai aptinkami jau KČ, prieš piktybinėmis PL paliekant KČ mikroaplinką, o dar didesnis ekspresijos sumažėjimas pastebimas jau periferijoje esančiose CPL. Taip pat pastebėjome, kad CPL– pacientų KČ piktybinių PL ir sveikų donorų PL adhezijos molekulių CD49d ir CD49e ekspresija nesiskiria – ekspresijos tapatumas leidžia nuspėti, kad nesant polinkio formuotis CPL, piktybinės PL turi artimesnį adhezijos imunofenotipą normalioms PL, tai yra ryškesnę adhezijos molekulių ekspresiją. Nustatėme ir tai, kad adhezijos žymenų ekspresija yra labai sumažėjusi, kai CPL aptinkamos PK (CD49d, CD49e, CD56, CD138, CD58). Tai leidžia spėti, kad prieš piktybinėmis PL paliekant kaulų čiulpų mikroaplinką būtinas papildomas adhezijos žymenų ekspresijos sumažėjimas. CPL formavimasis nulemia blogesnę ligos prognozę, agresyvesnį piktybinių PL plitimą ir atsparumą gydymui (133). Atradus konkrečią vertę, kada pradeda formuotis CPL, būtų galima užkirsti kelią šiam procesui, stebėti CPL atsiradimą PK ir esant terapinei naudai modifikuoti gydymą.

5.2. Diagnostinio piktybinių plazminių ląstelių imunofenotipo sąsaja su genetiniais dauginės mielomos rizikos veiksniais

Chromosominių aberacijų svarba yra neabejotina vertinant DM riziką, o tokie metodai kaip SNP-A molekulinis kariotipavimas leidžia išsamiai ir tiksliai vertinti chromosominius pokyčius. Esant įvairios rizikos – didelės ir standartinės – aberacijų deriniams, ne visuomet aiški bendra galutinė prognozė. Antigenų ekspresija piktybinėse PL suteikia naudingos informacijos ir papildo rizikos vertinimą nustatant diagnozę.

Mums pavyko aptikti specifinius, statistiškai reikšmingus piktybinių PL imunofenotipo skirtumus tarp skirtingų didelės ir standartinės rizikos chromosominių aberacijų. Būtent CD27, CD38, CD45, CD56, CD117 ir CD138 blankesnė ekspresija, taip pat padidėjęs piktybinių PL ir normalių PL santykis buvo būdingi didesnės rizikos chromosominėms aberacijoms. Kiti klinikiniai tyrimai anksčiau rodė sąsajas tarp imunofenotipo ir ligos rizikos, tačiau jie buvo prieštaringi ir nepriklausoma imunofenotipo reikšmė ne visada patvirtinta. Nenaudojant vienodų reagentų ir mėginio ruošimo metodų,

ekspresijos lyginimas tarp skirtingų mėginių ir laboratorijų taip pat yra sudėtingas.

Arana ir kt. (5) aprašė CD19+, CD27–, CD38+bl, CD45+, CD81+, CD117– ir CD138+bl kaip žymenų ekspresiją, rodančią blogesnes baigtis, arba trijų žymenų – CD38+bl, CD81+, CD117– derinį kaip rodantį prastą prognozę. Nors mes nenustatėme CD81 ekspresijos pokyčių tarp skirtingų genetinės rizikos kategorijų, tačiau blanki CD27, CD38, CD117 ir CD138 ekspresija mūsų tyrime taip pat buvo siejama su didesnės rizikos genetinėmis aberacijomis.

CD27 blanki ekspresija gali būti aptinkama RRDM pacientams (112), taip pat būdinga progresuojančiai ligai (102). Mes aptikome mažesnę CD27 ekspresiją pacientams, kurie turėjo dvi didesnės rizikos chromosomines aberacijas – 1q duplikaciją ir 1p deleciją, taip pat nustatėme didėjančią CD27 ekspresiją vėlesnėse ISS, R-ISS stadijose ar esant didesnei M-SMART rizikos kategorijai.

Nijhof ir kt. (147) duomenimis, CD38 ekspresija yra susijusi su gydymo daratumumabu (prieš CD38 nukreiptu monokloniniu antikūnu) veiksmingumu. Tačiau mūsų pacientai buvo vertinami prieš gydymą, taigi terapija neturėjo įtakos CD38 ekspresijai, taip pat tik keturi mūsų tiriamieji buvo gydomi daratumumabu. Tačiau CD38 buvo vienintelis žymuo, kurio ekspresija siejosi su išgyvenamumu (iš analizės pašalinus pacientus, gydytus prieš CD38 nutaikytu vaistu). CD38 buvo išskirtas į dvi grupes pagal MFI – mažiau kaip 15 000 ir daugiau kaip 15 000. Didesnės CD38 MFI grupė turėjo daug geresnį išgyvenamumą, kuris, tikėtina, buvo paveiktas ne gydymo, o paties žymens ekspresijos. Žinoma, ankstesniuose tyrimuose CD38 ekspresijos ryšys su išgyvenamumu (kai terapijai nenaudojami prieš CD38 nutaikyti vaistai) dažnai nebūdavo aptinkamas, tačiau plazminėse ląstelėse CD38 ekspresija yra ypač ryški, net jeigu ji tendencingai blankesnė aberantinėse PL. Taigi tikėtina, kad naudojant vienodus reagentų ir tėkmės citometro nustatymus galima tiksliau palyginti CD38 ekspresiją. Arana ir kt. (5) yra įtraukę blankią CD38 ekspresiją į imunofenotipo derinį, rodantį didesnę riziką.

CD45 ekspresija buvo ryškesnė pacientams, kurie turėjo hiperdiploidinį kariotipą. Šis kariotipas siejamas su geresnėmis DM pacientų ligos baigtimis. Tačiau kituose tyrimuose blankesnė CD45 ekspresija buvo siejama su blogesne prognoze. Aberantinės PL dažnai turi blankesnę CD45 ekspresiją, nei normalios PL. Tačiau Arana ir kt. (5) ir Gonsalves ir kt. (148) susiejo teigiamą CD45 ekspresiją su blogesnėmis baigtimis, panašiai kaip parodė ir mūsų atliktas tyrimas.

Apskritai paėmus, HK pacientų aberantinės PL turėjo labai skirtingą imunofenotipą, lyginant su visų kitų grupių pacientais. Didžiausi skirtumai buvo gerokai ryškesnė CD56 ekspresija, taip pat statistiškai ryškesnė CD45, CD117 ir CD138 ekspresija. Dalis šių fenotipo ypatumų buvo pastebėti anksčiau, tačiau mes turėjome galimybę išskirti pacientus, turinčius izoliuotą HK (be kitų chromosominių aberacijų), ir pacientus, turinčius kitas chromosomines aberacijas, siejamas su didesne rizika. Šių kombinuoto HK pacientų KČ papildomai turėjo daug didesnę piktybinių PL ir normalių PL santykį. Kadangi šis santykis taip pat siejamas su didesne rizika, tikėtina, kad izoliuotas HK išsiskiria geresne prognoze, nepaisant fenotipo panašumų su neizoliuotu hiperdiploidiniu kariotipu. CD56 ekspresijos sumažėjimas, priešingai nei pastebėta HK turintiems pacientams, yra siejamas su gydymui vartojamo proteosomų inhibitoriaus bortezomibo efektyvumo sumažėjimu (149), taip pat su prastesne prognoze.

CD117 ekspresija buvo didesnė pacientų, turinčių hiperdiploidinį kariotipą piktybinėse PL, tačiau pacientams, turintiems kitas, didesnės rizikos chromosomines aberacijas, šio žymens ekspresija buvo sumažėjusi. CD117 ekspresija buvo mažesnė pacientams, turintiems 1q duplikaciją, t(4;14) ir 14 chromosomos monosomiją/14q deleciją. CD117 ekspresijos sumažėjimas, taip pat didesnis piktybinių PL ir normalių PL santykis klinikiniuose tyrimuose yra siejamas su trumpesniu laiku iki ligos progresavimo ir trumpesniu bendru išgyvenamumu. Taip pat buvo aprašytas ryšys tarp 17p delecijos, siejamos su didesne rizika, ir sumažėjusios CD117 ekspresijos (18), tačiau mūsų pacientai, turintys 17p deleciją, nepasižymėjo skirtingu PL imunofenotipu.

Taip pat buvo pastebėta skirtinga žymenų ekspresija ne tik rizikos vertinimo kategorijose, kurios apima skirtingus didesnės rizikos genetinius veiksnius, tarp jų translokacijas ir aneuploidiją (R-ISS, m-SMART), tačiau ir tarp rizikos vertinimo sistemų, kuriose nėra genetinių veiksnių (ISS). Pavyzdžiui, CD138 ir CD38 ekspresija, taip pat didesnis piktybinių ir normalių PL santykis buvo pastebėti didesnės rizikos ISS, R-ISS ir m-SMART kategorijose. Mažesnė CD56 ir CD138 ekspresija literatūroje siejama su blogesnėmis baigtimis (5), taip pat su PK aptinkamomis CPL, kurios siejamos su ligos progresavimu (9).

Diagnozuojant DM dažnai aptinkamas sumažėjęs normalių PL kiekis (107), taip pat tai siejama su konkurencija dėl kaulų čiulpų stromos (22). Didesnis piktybinių PL procentas tarp visų PL taip pat siejamas su progresavimu iš RDM į DM (150). Mes nustatėme, kad kai kurios didesnės rizikos chromosomų aberacijos turėjo didesnę piktybinių PL procentą ir (ar) mažesnę normalių PL procentą, kartu didesnę piktybinių ir normalių PL

santykį. Šios kategorijos – neizoliuotas hiperdiploidinis kariotipas, 14 chromosomos monosomija / 14q delecija, 13 chromosomos monosomija, 1p delecija, 1q duplikacija ir t(4;14) – neabejotinai gali būti siejamos su didesne rizika. Taip pat didėjantis piktybinių ir normalių PL santykis buvo pastebimas pačiose rizikos vertinimo sistemose – ISS, R-ISS ir m-SMART. Nustatytas ir sumažėjęs NK ląstelių kiekis esant 1q duplikacijai, o tai yra būtent vienas iš aprašytų DM poveikių KČ mikroaplinkai (151), turintis slopinamąjį poveikį priešvėžiniam imunitetui.

Apibendrinant, specifiniai imunofenotipo bruožai buvo pastebėti piktybinėse PL pacientų, turinčių didesnės rizikos chromosomų aberacijas, taip pat ir naudojant jas taikančias rizikos vertinimo sistemas, pvz. R-ISS, m-SMART, ar net neįtraukiančias jokių genetinių veiksnių, pvz. ISS.

5.3. Minimalios liekamosios ligos imunofenotipo duomenų analizės strategijos harmonizavimas

DM MLL stebėseną rekomenduoja IMWG, kadangi tai leidžia geriau stratifikuoti pacientus gydymo metu ir esant nepakankamam veiksmingumui modifikuoti gydymą. MLL tyrimai šią stebėseną leidžia atlikti patikimiau, nei tokie tradiciniai DM taikomi tyrimai, kaip baltymų elektroforezė, laisvų lengvųjų grandžių santykio matavimas ar citomorfologinis kaulų čiulpų tyrimas (42). Klinikiniai tyrimai yra parodę DM MLL vertę nuspėjant laiką iki ligos recidyvo, taip pat sąsajas su pacientų išgyvenamumu (149, 150). Tėkmės citometrijos metodu pagrįstas DM MLL tyrimas yra pritaikomas daugiau nei 95 % pacientų, jis leidžia greitai ir efektyviai atskirti normalias ir piktybines PL (72). Vienas pagrindinių tėkmės citometrijos metodo pranašumų yra galimybė tuo pačiu tyrimu įvertinti KČ aspiracijos mėginio kokybę, išmatuojant specifines su KČ, ne PK, siejamas ląstelių populiacijas. Siekiant vienodo mėginio kokybės interpretavimo tyrimą atliekant skirtingiems specialistams, būtina harmonizuoti ir šių populiacijų analizę.

Tyrimo sumanymas buvo pakviesti patyrusius tėkmės citometrijos specialistus, kurie dalyvauja ICCS ir ESCCA organizacijų veikloje ir DM MLL tyrimus atlieka kasdienėje praktikoje. Vėliau suburta darbo grupė siekė sukurti bendrą duomenų analizės gairių rinkinį, kuriame būtų išsamiai išdėstyti žingsniai, kuriais vadovaujantis galima aptikti ir apskaičiuoti visas ląstelių populiacijas, reikalingas DM MLL vertinti. Į bendrą duomenų analizės strategiją turėjo būti įtrauktas ir KČ aspiracijos mėginio kokybės vertinimas. Taip pat buvo svarbu atmesti visus kitus tyrimo rezultatus įtaką darančias kintamuosius, išskyrus pačios duomenų analizės skirtumus tarp specialistų. Tam buvo pasitelkti vienodi duomenų failai, gauti iš tikrų DM sergančių

pacientų KČ aspirato mėginių. Visų trijų etapų tikslas buvo palyginti specialistų gaunamus rezultatus, naudojant jų įstaigoje taikomas analizės strategijas, ir palyginti, kaip rezultatai pasikeičia taikant bendrai priimtą duomenų analizės strategiją.

Pirmame etape buvo atpažintos pagrindinės rezultatų išsiskyrimo sritys, kurios buvo aptartos bendrose diskusijose. Iš šių diskusijų kilo nuo duomenų analizės programinės įrangos nepriklausomas protokolas. Šio protokolo tinkamumas buvo patikrintas antrame etape, kai tyrėjai iš naujo išanalizavo pirmame etape naudotus duomenų rinkinius. Po to visus rezultatus peržiūrėjo ir aptarė visi tyrimo dalyviai. Trečiame etape buvo taikomas konsensuso protokolas analizuojant naujus duomenų rinkinius, papildomai atkreipiant dėmesį į KČ aspiracijos mėginio kokybės kriterijus.

Kaip ir tikėtasi, taikant harmonizuotą duomenų analizės metodą pagerėjo rezultatų suderinamumas tarp tyrėjų. Reikšmingiausi skirtumai buvo susiję su „Bendro analizuotų ląstelių skaičiaus“, aptikimo ribos, kiekybinio nustatymo ribos skaičiavimais, taip pat KČ aspiracijos mėginio kokybės kriterijų apibrėžimu.

Galutiniame protokole aprašytos diagramos ir regionų apibrėžimo strategijos pritaikomos visoms rinkoje prieinamoms tėkmės citometrijos duomenų analizės programoms, o tyrėjai turėtų gauti panašius rezultatus, jei analizės instrukcijos yra atidžiai sekamos. Deja, buvo skirtumų tarp tam tikrų tėkmės citometrijos duomenų analizės programų. Būtent *Infinicyt* programinė įranga sujungia abiejų mėgintuvėlių FCS failų duomenis, todėl buvo gaunami skirtingi „Bendro analizuotų ląstelių skaičiaus“, „Bendro PL skaičiaus“, „Bendro aberantinių PL skaičiaus“ ir „B limfocitų pirmtakų skaičiaus“ rezultatai. Buvo nuspręsta sujungti duomenis iš abiejų mėgintuvėlių, kadangi tuomet labai padidėja tyrimo jautrumas – ir aptikimo riba, ir kiekybinio nustatymo riba. Kai kurios ląstelių populiacijos, pvz. mastocitai, mieloidiniai pirmtakai ir eritroidiniai pirmtakai, buvo vertinami tik iš pirmo mėgintuvėlio duomenų, kadangi antrame mėgintuvėlyje nėra CD117, taip pat reikia papildomo ląstelių lizės žingsnio ruošiant mėginį.

Vienas iš skirtinguose tyrimo etapuose nekitusių skaičiavimų, atliktų skirtingų tyrėjų, buvo aptinkamas „Aberantinių PL skaičius“. Tikėtina, kad šių pokyčių nepastebėta, kadangi visi tyrimo dalyviai buvo patyrę tėkmės citometrijos specialistai, gebantys identifikuoti piktybines PL. Nors nepakito pats „Aberantinių PL skaičius“, tačiau labai sumažėjo aberantinių PL procento variacija (MLL procentas), kadangi buvo taikomas daug panašesnis jo apskaičiavimo vardiklis („Bendras analizuotų ląstelių skaičius“). Tai patvirtinto konsensuso metodo patikimumą, nes parodė, jog įmanoma pasiekti pakartojamus rezultatus atliekant rankinę DM MLL FCS failų analizę.

Didžiausia MLL interpretavimo įvairovė buvo susijusi su mėginiais, kuriuose MLL nebuvo aptikta, taip pat mėginiais, kuriuose buvo itin mažas, tačiau aptinkamas piktybinių PL skaičius. Tai parodo, kad reikalingi papildomi tyrimai, siekiantys geriau nustatyti DM MLL ribines vertes – aptikimo ir kiekybinio nustatymo ribas. Tai yra vienas iš būtinų ir itin reikšmingų žingsnių tėkmės citometrijos tyrimų srityje, kad būtų galima pasiekti pakartojamus rezultatus skirtingose laboratorijose, ypač žinant, kad DM MLL yra svarbus gydymo efektyvumo rodiklis, kuris taip pat naudojamas klinikiniuose tyrimuose kaip pagrindinis biologinis parametras ar pakaitinis tikslas vietoje ilgiau užtrunkančių išgyvenamumo matavimų.

Kai kurių mėginių duomenys buvo sunkiau interpretuojami nei kiti. Pacientų duomenys buvo nuasmeninti, informacija apie gydymą nebuvo prieinama, tačiau darbo grupė nusprendė, kad pacientai, tikėtina, gavo prieš CD38 nutaiktą terapiją daratumumabu. Nors šis vaistas yra efektyvus gydant DM, jis apsunkina DM MLL atlikimą dėl sumažėjusios CD38 ekspresijos net šešis mėnesius po gydymo (111). Priimta bendra analizės strategija nebuvo kuriama tikslingai pacientams, gydomiems daratumumabu. Remtis viena CD138/CD45 ekspresija yra neoptimalu, kadangi CD138 ekspresija dažnai yra blanki ir iš dalies sutampa su foniniu ar nespecifiniu švytėjimu, todėl ieškoma alternatyvų tradiciniams su CD38 konjuguotiems fluorochromams – šiuo metu tiriami CD229, CD319 ar VS38c (154). Nepaisant to, konsensuso analizės gairės yra pritaikomos net DM MLL tyrimų reagentų rinkiniams, kuriuose yra alternatyvūs aberantinėms PL pritaikyti antikūnai, skirti aptikti visoms PL. Taip pat B limfocitų pirmtakų aptikimas nepriklauso vien nuo CD38 ekspresijos. Mėginys Nr. 8 trečiame tyrimo etape turėjo pakitusią brandžių B limfocitų populiaciją, kuri ekspresavo CD45, CD38, kappa lengvasias grandis, tačiau neekspresavo CD138. Penki iš septyniolikos dalyvių šią populiaciją laikė teigiama DM MLL. Tai paryškina problemą, kylančią trūkstant klinikinės informacijos apie pacientus, ypač kai kalbama apie didelio jautrumo tėkmės citometrijos tyrimus (155).

DM MLL vertinimui įtaką daro ir KČ aspiracijos mėginio kokybė, todėl mėginio tinkamumo kriterijai yra itin svarbi DM MLL analizės dalis. Mėginio kokybė gali būti paveikta jo surinkimo, gabenimo ar saugojimo iki analizės etapuose. Taip pat DM yra žinoma kaip netolygiai KČ plintanti liga, ir dalis ar netgi visos piktybinės PL gali būti nesurinktos, jei punktuojama kraštinė ar į ligos plitimą neįtraukta KČ sritis. Keblumų kelia ir tai, kad renkant ar ruošiant mėginį dalis PL žūsta, tikėtina, dėl PL trapumo ir prieraišumo prie kaulų čiulpų stromos. MLL procentas gali būti neįvertinimas dėl periferinio kraujo infiltracijos atliekant KČ aspiraciją (77, 108). Šios priežastys, matyt, lemia tai, kad PL kiekis tėkmės citometrijos tyrimuose yra tendencingai

mažesnis, nei suskaičiuojamas citomorfologinio tyrimo metu ar histologiniame KČ trepanato tyrime (156). Tačiau, skirtingai nei kraujo mėginys, KČ mėginys yra sunkiau surenkamas ir brangus, taigi jo pakartotinis ėmimas nėra dažnai atliekamas. Taigi objektyvios ir aiškios gairės, leidžiančios įvertinti ir pranešti apie mėginio kokybę, yra svarbi papildoma informacija, kuri turėtų būti suteikiama kartu su DM MLL rezultatu, kaip MLL tyrimo rezultato užtikrinimas. Kokybės vertinimas turėtų remtis mastocitų, B limfocitų pirmtakų, mieloidinių ir eritroidinių pirmtakų skaičiumi. Šiuo metu nėra aiškių kriterijų, kurie nurodytų apatinę ribą, žemiau kurios DM MLL tyrimo rezultatas nebūtų laikomas patikimu.

Pirmame tyrimo etape nustatyta didelė mėginių kokybės vertinimų įvairovė tarp skirtingų tyrėjų. Šiai problemai spręsti po pirmojo etapo buvo išsiųstas klausimynas, kuriame dalyviai turėjo pagal svarbą išdėstyti kaulų čiulpų ląstelių populiacijas, kurios būtų naudingos pakankamai KČ aspiracijos mėginio kokybei įvertinti. Pagal bendrą sutarimą, pats svarbiausias kriterijus buvo mastocitų aptikimas. Jeigu jų išvis neaptinkama, mėginys turėtų būti laikomas suboptimaliu DM MLL vertinti. Jei mastocitų būtų aptikta, kraujodaros ląstelių – B limfocitų, mieloidinių ar eritroidinių pirmtakų populiacija, daugumos dalyvių nuomone, būtų papildomas kriterijus teigiamai įvertinti mėginio kokybę. Bandyta nustatyti galimas apatinės šių ląstelių populiacijų ribas, naudojant retrospektyvią trečio etapo analizę. Ši analizė taip pat parodė, kad naudojant konsensuso protokolą labai pagerėjo mėginio kokybės vertinimas. Vienintelė kita studija, kurioje buvo pateikti tinkamo analizei KČ aspirato rekomenduojami populiacijų kiekiai, buvo paskelbtas *EuroFlow* grupės tyrimas (86). Mūsų tyrimo nustatytos vertės buvo mažesnės nei Euroflow grupės, tikėtina, dėl nedidelio skaičiaus mėginių, kuriuos analizavo abi grupės. Tikėtina, kad didesnė studija leistų patikslinti tikslinių populiacijų kiekius kokybiškam mėginiui.

Bendrai priimtas duomenų analizės algoritmas, taikomas atliekant DM MLL vertinimą, reikalauja tinkamai atlikti konkrečius žingsnius, leidžiančius nustatyti mėginio kokybę, bendrą analizuotų gyvybingų ląstelių skaičių ir piktybinių PL skaičių. Visi analizės etapai turi būti pateikti gairėse, kurios pritaikomos nepaisant naudojamų konkrečių DM MLL tyrimo reagentų ar įrangos. Šios gairės turi remtis bendrais tėkmės citometrijos principais ir DM MLL analizės ypatumais. Aprašytos gairės prisidėtų prie geresnio DM MLL tyrimų rezultatų suderinamumo, galėtų būti naudojamos biomediciniuose tyrimuose, ypač klinikiniuose vaistų tyrimuose, kuriuose MLL kriterijus taikomas kaip pakaitinis tikslas, taip pat kasdienėje klinikinėje praktikoje, kur MLL gali būti naudojamas gydymo veiksmingumui vertinti.

6. IŠVADOS

1. DM sergančių pacientų KČ piktybinių PL adhezijos molekulių CD49d, CD49e, CD56, CD38, CD138 ekspresijos sumažėjimas nulemia periferinio kraujo CPL formavimąsi. Praktiškai šiuo reiškiniu galima pasinaudoti prognozuojant DM agresyvėjimą, anksti aptinkant ligos plitimo pradžia ir atitinkamai koreguojant ligos gydymo taktiką.

2. Piktybinių PL CD38 ekspresija, silpnesnė nei 15 000 MFI FITC kanale (taikant *EuroFlow* gaires) piktybinių PL CD38 ekspresija yra nepriklausomas veiksnys, susijęs su vėlesne ISS, R-ISS stadija ir trumpesniu DM sergančių pacientų išgyvenamumu. Piktybinių PL žymenų CD27, CD56, CD117 ir CD138 sumažėjusi ekspresija, didesnis piktybinių PL procentas ir mažesnis normalių PL procentas kaulų čiulpuose yra statistiškai reikšmingai susiję su tokiais didelės rizikos chromosominėmis aberacijomis, kaip 1q duplikacija, t(4;14), 14 chromosomos delecija, 1p delecija.

3. Taikant vienodą DM MLL imunofenotipavimo analizės algoritmą, pasiekiamos žemesnės tyrimo metodo aptikimo ribos (LOD) ir nustatymo ribos (LOQ), o KČ aspiracijos mėginio tinkamumo kriterijų sutarimas skirtinguose tyrimų centruose padidėja iki 97,1 %.

4. Mastocitų kiekis didesnis nei 0,0015 %, hematogonų – didesnis nei 0,025 %, mieloidinių pirmtakų – didesnis nei 0,146 %, leidžia įvertinti KČ ėminių kaip tinkamą MLL tyrimui.

7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Diagnostinės ir prognostinės svarbos diagnozuojant dauginę mielomą turi imunofenotipavimas, todėl jis turėtų būti atliekamas kartu su kitais šios ligos diagnostiniais tyrimais. Ypač svarbus CD38 ekspresijos intensyvumas, rodantis patikimą statistinį ryšį su išgyvenamumu. Diagnostinis DM imunofenotipavimas turėtų apimti žymenis, kurių ekspresijos pokyčiai turi įtakos prognozei ir siejami su chromosominėmis aberacijomis – CD27, CD56, CD117, CD138. *EuroFlow* gairės leidžia lyginti piktybinių PL imunofenotipą tarp skirtingų laboratorijų, jei taikomas žymenų ekspresijos kalibravimas naudojant vienodus kalibravimo rutuliukus. Chromosominių aberacijų ištyrimas taikant jautrius metodus, pvz. SNP mikrogardelės molekulinį kariotipavimą, yra ypač svarbus ir leidžia nustatyti genetinę ligos riziką. Taigi, diagnozuojant ligą chromosominių aberacijų ir tėkmės citometrijos tyrimai turėtų būti atliekami kartu.

CPL aptikimas PK yra žinomas blogos prognozės žymuo, CPL aptikimo tyrimai ir jų taikymas klinikinėje praktikoje yra svarbūs, taip pat jie yra mažiau intervencinė KČ aspiracijos alternatyva. Apie CPL susiformavimą gali įspėti KČ piktybinių PL imunofenotipas, taigi į tiriamų žymenų rinkinį turėtų būti įtraukti su adhezija susiję žymenys, pvz. dažniau naudojami CD38, CD56 ir CD138, jų ekspresija turėtų būti vertinama ligos metu ir pažymimas aptiktas ekspresijos sumažėjimas. Tačiau kad būtų galima tiksliau įvertinti prognostinę žymenų pokyčių vertę, reikalingi tolesni tyrimai.

Neginčijamos vertės stebint DM gydymo veiksmingumą turi MLL tyrimas. Siekiant geresnio rezultatų sutarimo tarp skirtingų ši tyrimą atliekančių laboratorijų, ypač kai pacientai įtraukti į klinikinius tyrimus, reikalingos analizės harmonizavimo gairės. Šiuo metu yra prieinamos *EuroFlow* konsorciumo parengtos reagentų, mėginių ir instrumentų paruošimo gairės, tačiau analizės etapas išlieka priklausomas nuo laboratorijoje taikomų metodikų. Analizės harmonizacija susideda iš pačių piktybinių PL identifikavimo, vienodo bendro tiriamų ląstelių kiekio apskaičiavimo, nuo kurio priklauso tyrimo aptikimo riba, taip pat nuo kriterijų, pagal kuriuos vertinama KČ aspiracijos mėginio kokybė. KČ aspiracijos mėginio kokybė svarbi, nes jei imamą KČ mėginį praskiedžia periferinis kraujas, rezultatai tampa mažiau patikimi, taigi neigiamos MLL vertės turi būti vertinamos kritiškai. Įvedus vienodus KČ aspiracijos mėginio kriterijus, būtų galima patikimai lyginti skirtingų laboratorijų gautus MLL rezultatus. Geriausiai KČ aspiracijos mėginiui vertinti tinka nustatytas mastocitų kiekis, tačiau kartu turi būti vertinamas hematogonų ir mieloidinių pirmtakų kiekis.

8. LITERATŪRA

1. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, Van Duin M, Sonneveld P, Mateos MV, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2017;3:1–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.46>
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer* [Internet]. 2018;103:356–87. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.07.005>
3. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2020;95(5):548–67.
4. Gertz MA, Buadi FK. Utility of immunophenotyping of plasma cells in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(2):252–3.
5. Arana P, Paiva B, Cedena MT, Puig N, Cordon L, Vidriales MB, et al. Prognostic value of antigen expression in multiple myeloma: A PETHEMA/GEM study on 1265 patients enrolled in four consecutive clinical trials. *Leukemia* [Internet]. 2018;32(4):971–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2017.320>
6. Lahuerta JJ, Paiva B, Vidriales MB, Cordón L, Cedena MT, Puig N, et al. Depth of response in multiple myeloma: A pooled analysis of three PETHEMA/GEM clinical trials. *J Clin Oncol*. 2017;35(25):2900–10.
7. Bruinink DH op, Oliva S, Rihova L, Schmitz A, Gilestro M, te Marvelde J, et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease assessment in international clinical trials. A feasibility study from the European Myeloma Network. Vol. 106, *Haematologica*. 2021. p. 1496–9.
8. Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on the use of minimal residual disease as a clinical endpoint in multiple myeloma studies. *Eur Med Agency*. 2018;26(28):1–18.
9. Klimienė I, Radzevičius M, Matuzevičienė R, Sinkevič-Belliot K, Kučinskienė ZA, Pečeliūnas V. Adhesion molecule immunophenotype of bone marrow multiple myeloma plasma cells impacts the presence of malignant circulating plasma cells in peripheral blood. *Int J Lab Hematol* [Internet]. 2021 Jun 1;43(3):403–8. Available from: <https://doi.org/10.1111/ijlh.13387>
10. Gundersen MT, Lund T, Moeller HEH, Abildgaard N. Plasma Cell Leukemia: Definition, Presentation, and Treatment. *Curr Oncol Rep*. 2019;21(1).
11. Kraj M, Kopeć-Szlezak J, Poglód R, Kruk B. Flow cytometric immunophenotypic characteristics of plasma cell leukemia. *Folia Histochem Cytobiol*. 2011;49(1):168–82.
12. Marneni N, Chakraborty R. Current Approach to Managing Patients with Newly Diagnosed High-Risk Multiple Myeloma. *Curr Hematol Malig Rep*. 2021;16(2):148–61.

13. Soliman AM, Das S, Teoh SL. Next-generation biomarkers in multiple myeloma: Understanding the molecular basis for potential use in diagnosis and prognosis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14).
14. Perrot A, Lauwers-Cances V, Corre J, Robillard N, Hulin C, Chretien M-L, et al. Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood [Internet].* 2018 Dec 6;132(23):2456–64. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/132/23/2456/40023/Minimal-residual-disease-negativity-using-deep>
15. Bae MH, Park CJ, Kim BH, Cho YU, Jang S, Lee DH, et al. Increased circulating plasma cells detected by flow cytometry predicts poor prognosis in patients with plasma cell myeloma. *Cytom Part B - Clin Cytom.* 2018;94(3):493–9.
16. Peceliunas V, Janiulioniene A, Matuzeviciene R, Zvirblis T, Griskevicius L. Circulating plasma cells predict the outcome of relapsed or refractory multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 2012 Apr;53(4):641–7.
17. Cheng Q, Cai L, Zhang Y, Chen L, Hu Y, Sun C. Circulating Plasma Cells as a Biomarker to Predict Newly Diagnosed Multiple Myeloma Prognosis: Developing Nomogram Prognostic Models. *Front Oncol [Internet].* 2021 Mar 5;11(March):1–13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.639528/full>
18. Guo J, Su J, He Q, Li X, Zhao Y, Gu S, et al. The prognostic impact of multiparameter flow cytometry immunophenotyping and cytogenetic aberrancies in patients with multiple myeloma. *Hematology.* 2016;21(3):152–61.
19. Kalina T, Flores-Montero J, Van Der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia.* 2012;26(9):1986–2010.
20. Soh KT, Came N, Otteson GE, Jevremovic D, Shi M, Olteanu H, et al. Evaluation of multiple myeloma measurable residual disease by high sensitivity flow cytometry: An international harmonized approach for data analysis. *Cytom Part B Clin Cytom [Internet].* 2022 Mar 10;102(2):88–106. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.22053>
21. Euroflow Consortium. EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Sample preparation and staining Version 1.4. <https://EuroflowOrg/Usr/Pub/ProtocolsPhp> [Internet]. 2019;4(Version 1.5):8. Available from: <https://euroflow.org/usr/pub/protocols.php>
22. Paiva B, Pérez-Andrés M, Vídriales M-B, Almeida J, de las Heras N, Mateos M-V, et al. Competition between clonal plasma cells and normal cells for potentially overlapping bone marrow niches is associated with a progressively altered cellular distribution in MGUS

- vs myeloma. *Leukemia* [Internet]. 2011;25(4):697–706. Available from: <https://doi.org/10.1038/leu.2010.320>
23. Nishimoto N, Suematsu S, Kishimoto T. Plasma cell dyscrasias. Vol. 64, *Advances in Immunology*. 1997. 219–281 p.
 24. Padala SA, Barsouk A, Barsouk A, Rawla P, Vakiti A, Kolhe R, et al. Epidemiology, Staging, and Management of Multiple Myeloma. *Med Sci* [Internet]. 2021 Jan 20;9(1):3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33498356>
 25. Fonseca R, Monge J, Dimopoulos MA. Staging and prognostication of multiple myeloma. *Expert Rev Hematol*. 2014;7(1):21–31.
 26. Mikhael JR, Dingli D, Roy V, Reeder CB, Buadi FK, Hayman SR, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: Updated mayo stratification of myeloma and risk-adapted therapy (msmart) consensus guidelines 2013. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2013;88(4):360–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.01.019>
 27. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2012 May 12;12(5):335–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3257>
 28. van Nieuwenhuijzen N, Spaan I, Raymakers R, Peperzak V. From MGUS to multiple myeloma, a paradigm for clonal evolution of premalignant cells. *Cancer Res*. 2018;78(10):2449–56.
 29. Jemal A, Bray F, Ferlay J. Global Cancer Statistics: 2011. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 1999;49(2):1,33-64. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10200776
 30. Watanabonyongcharoen P, Na Nakorn T, Rojnuckarin P, Lawasut P, Intragumtornchai T. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance in Thailand. *Int J Hematol*. 2012;95(2):176–81.
 31. Bianchi G, Anderson KC. Understanding biology to tackle the disease: Multiple myeloma from bench to bedside, and back. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(6):422–44.
 32. Fakhri B, Vij R. Clonal Evolution in Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* [Internet]. 2016 Aug;16(August):S130–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clml.2016.02.025>
 33. Szalat R, Munshi NC. Genomic heterogeneity in multiple myeloma. *Curr Opin Genet Dev*. 2015;30:56–65.
 34. Manier S, Salem K, Glavey S V., Roccaro AM, Ghobrial IM. Genomic aberrations in multiple myeloma. *Cancer Treat Res*. 2016;169:23–34.
 35. Pérez-Persona E, Mateo G, García-Sanz R, Mateos MV, De Las Heras N, De Coca AG, et al. Risk of progression in smouldering myeloma and monoclonal gammopathies of unknown significance: Comparative analysis of the evolution of monoclonal component and multiparameter flow cytometry of bone marrow plasma cells. *Br J*

- Haematol. 2010;148(1):110–4.
36. Landgren O, Weiss BM. Patterns of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma in various ethnic/racial groups: Support for genetic factors in pathogenesis. *Leukemia*. 2009;23(10):1691–7.
 37. Marchica V, Accardi F, Storti P, Mancini C, Martella E, Dalla Palma B, et al. Cutaneous localization in multiple myeloma in the context of bortezomib-based treatment: how do myeloma cells escape from the bone marrow to the skin? *Int J Hematol* [Internet]. 2017 Jan 3;105(1):104–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12185-016-2104-1>
 38. Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2017;14(2):100–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.122>
 39. Schürch CM, Rasche L, Frauenfeld L, Weinhold N, Fend F. A review on tumor heterogeneity and evolution in multiple myeloma: pathological, radiological, molecular genetics, and clinical integration. Vol. 476, *Virchows Archiv*. 2020. 337–351 p.
 40. Rajkumar SV. Multiple Myeloma: Every Year a New Standard? *Hematol Oncol*. 2019;37:62-.
 41. Holstein SA, Richardson PG, Laubach JP, McCarthy PL. Management of relapsed multiple myeloma after autologous stem cell transplant. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2015;21(5):793–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.12.026>
 42. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* [Internet]. 2016 Aug;17(8):e328–46. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30206-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30206-6)
 43. Roodman GD. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Leukemia*. 2009;23(3):435–41.
 44. Rajkumar SV. Multiple Myeloma: 2016 update on Diagnosis, Risk-stratification and Management. *Am J Hematol* [Internet]. 2016;91(7):719–34. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5291298/pdf/nihms783106.pdf>
 45. Landgren O, Rajkumar SV. New developments in diagnosis, prognosis, and assessment of response in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2016 Nov 15;22(22):5428–33. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-16-0866>
 46. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*. 2003;78(1):21–33.

47. Paiva B, Martinez-Lopez J, Vidriales MB, Mateos MV, Montalban MA, Fernandez-Redondo E, et al. Comparison of immunofixation, serum free light chain, and immunophenotyping for response evaluation and prognostication in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2011;29(12):1627–33.
48. Rajkumar SV, Kumar S. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2016;91(1):101–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.11.007>
49. Rajkumar SV, Kumar S. Multiple myeloma current treatment algorithms. *Blood Cancer J* [Internet]. 2020 Sep 28;10(9):94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41408-020-00359-2>
50. Rajkumar SV. CME Information: Multiple Myeloma: 2014 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2014;89(10):998–1009.
51. Joseph NS, Gentili S, Kaufman JL, Lonial S, Nooka AK. High-risk Multiple Myeloma: Definition and Management. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* [Internet]. 2017;17(July):S80–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clml.2017.02.018>
52. Rajan AM, Rajkumar S V. Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood Cancer J* [Internet]. 2015;5(10):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bcj.2015.92>
53. Sawyer JR, Waldron JA, Jagannath S, Barlogie B. Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1995;82(1):41–9.
54. Awada H, Thapa B, Awada H, Dong J, Gurnari C, Hari P, et al. A Comprehensive Review of the Genomics of Multiple Myeloma: Evolutionary Trajectories, Gene Expression Profiling, and Emerging Therapeutics. *Cells* [Internet]. 2021 Aug 2;10(8):1961. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/8/1961>
55. Prideaux SM, Conway O'Brien E, Chevassut TJ. The genetic architecture of multiple myeloma. *Adv Hematol*. 2014;2014.
56. Schmidt TM, Fonseca R, Usmani SZ. Chromosome 1q21 abnormalities in multiple myeloma. *Blood Cancer J* [Internet]. 2021;11(4). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41408-021-00474-8>
57. Sawyer JR. The prognostic significance of cytogenetics and molecular profiling in multiple myeloma. *Cancer Genet* [Internet]. 2011;204(1):3–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2010.11.002>
58. Greipp PR, Miguel JS, Dune BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005;23(15):3412–20.
59. Dispenzieri A, Rajkumar SV, Gertz MA, Fonseca R, Lacy MQ, Bergsagel PL, et al. Treatment of newly diagnosed multiple myeloma

- based on Mayo stratification of myeloma and risk-adapted therapy (mSMART): Consensus statement. *Mayo Clin Proc.* 2007;82(3):323–41.
60. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica.* 2008;93(3):431–8.
 61. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised international staging system for multiple myeloma: A report from international myeloma working group. *J Clin Oncol.* 2015;33(26):2863–9.
 62. Gonsalves WI, Buadi FK, Ailawadhi S, Bergsagel PL, Chanan Khan AA, Dingli D, et al. Utilization of hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of multiple myeloma: a Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus statement. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2019;54(3):353–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41409-018-0264-8>
 63. Goicoechea I, Puig N, Cedena M-T, Burgos L, Cordon L, Vidriales M-B, et al. Deep MRD profiling defines outcome and unveils different modes of treatment resistance in standard- and high-risk myeloma. *Blood* [Internet]. 2021 Jan 7;137(1):49–60. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/137/1/49/461433/Deep-MRD-profiling-defines-outcome-and-unveils>
 64. Buadi FK, Pandey S, Kapoor P, Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia* [Internet]. 2014;28(5):1122–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4000285&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24157580%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4000285%5Cnhttp://www.nature.com/doi/inder/>
 65. Pozzi S, Marcheselli L, Bari A, Liardo E V., Marcheselli R, Luminari S, et al. Survival of multiple myeloma patients in the era of novel therapies confirms the improvement in patients younger than 75 years: A population-based analysis. *Br J Haematol.* 2013;163(1):40–6.
 66. Moreau P, Attal M, Facon T. Frontline therapy of multiple myeloma. *Blood.* 2015;125(20):3076–84.
 67. Quach H, Ritchie D, Stewart AK, Neeson P, Harrison S, Smyth MJ, et al. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma. *Leukemia* [Internet]. 2010 Jan 12;24(1):22–32. Available from: <https://www.nature.com/articles/leu2009236>
 68. Palumbo A, Anderson K. Multiple Myeloma. *N Engl J Med* [Internet]. 2011 Mar 17;364(11):1046–60. Available from:

- <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1011442>
69. van de Donk NWCJ, Janmaat ML, Mutis T, Lammerts van Bueren JJ, Ahmadi T, Sasser AK, et al. Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. *Immunol Rev.* 2016;270(1):95–112.
 70. Moreau P, Attal M, Hulin C, Arnulf B, Belhadj K, Benboubker L, et al. Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet.* 2019;394(10192):29–38.
 71. Kumar SK, Jacobus SJ, Cohen AD, Weiss M, Callander N, Singh AK, et al. Carfilzomib or bortezomib in combination with lenalidomide and dexamethasone for patients with newly diagnosed multiple myeloma without intention for immediate autologous stem-cell transplantation (ENDURANCE): a multicentre, open-label, phase 3, randomise. *Lancet Oncol [Internet].* 2020;21(10):1317–30. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30452-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30452-6)
 72. Maclachlan KH, Came N, Diamond B, Roshal M, Ho C, Thoren K, et al. Minimal residual disease in multiple myeloma: defining the role of next generation sequencing and flow cytometry in routine diagnostic use. *Pathology [Internet].* 2021 Apr;53(3):385–99. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031302521000568>
 73. Paiva B, Vidriales M-B, Cerveró J, Mateo G, Pérez JJ, Montalbán MA, et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood [Internet].* 2008 Nov 15;112(10):4017–23. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/112/10/4017/24567/Multiparameter-flow-cytometric-remission-is-the>
 74. Paiva B, Gutiérrez NC, Rosiñol L, Vidriales M-B, Montalbán M-Á, Martínez-López J, et al. High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustainable complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood [Internet].* 2012 Jan 19;119(3):687–91. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/119/3/687/135110/Highrisk-cytogenetics-and-persistent-minimal>
 75. Paiva B, Corchete LA, Vidriales M-B, Puig N, Maiso P, Rodríguez I, et al. Phenotypic and genomic analysis of multiple myeloma minimal residual disease tumor cells: a new model to understand chemoresistance. *Blood [Internet].* 2016 Apr 14;127(15):1896–906. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/127/15/1896/34829/Phenotypic-and-genomic-analysis-of-multiple>
 76. Martínez-López J, Paiva B, López-Anglada L, Mateos MV, Cedena T,

- Vidriales MB, et al. Critical analysis of the stringent complete response in multiple myeloma: Contribution of sFLC and bone marrow clonality. *Blood*. 2015;126(7):858–62.
77. Paiva B, Van Dongen JJM, Orfao A. New criteria for response assessment: Role of minimal residual disease in multiple myeloma. *Blood*. 2015;125(20):3059–68.
 78. Rawstron AC, Paiva B, Stetler-Stevenson M. Assessment of minimal residual disease in myeloma and the need for a consensus approach. *Cytom Part B Clin Cytom* [Internet]. 2016 Jan;90(1):21–5. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.21272>
 79. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Rawstron AC, Owen RG, Child JA, Thakurta A, et al. Minimal residual disease predicts superior survival in patients with multiple myeloma: a meta-analysis. *JAMA Oncol* [Internet]. 2017 Jan 1;3(1):28. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5943640/pdf/nihms874697.pdf>
 80. Spencer A, Lentzsch S, Weisel K, Avet-Loiseau H, Mark TM, Spicka I, et al. Daratumumab plus bortezomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma: updated analysis of CASTOR. *Haematologica* [Internet]. 2018 Dec;103(12):2079–87. Available from: <http://www.haematologica.org/lookup/doi/10.3324/haematol.2018.194118>
 81. Gambella M, Omedé P, Spada S, Muccio VE, Gilestro M, Saraci E, et al. Minimal residual disease by flow cytometry and allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction in patients with myeloma receiving lenalidomide maintenance: A pooled analysis. *Cancer*. 2019;125(5):750–60.
 82. Cavo M, Gay F, Beksac M, Pantani L, Petrucci MT, Dimopoulos MA, et al. Autologous haematopoietic stem-cell transplantation versus bortezomib–melphalan–prednisone, with or without bortezomib–lenalidomide–dexamethasone consolidation therapy, and lenalidomide maintenance for newly diagnosed multiple myeloma (EMN02/HO95): a mult. *Lancet Haematol* [Internet]. 2020 Jun;7(6):e456–68. Available from: [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(20\)30099-5](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(20)30099-5)
 83. Paiva B, Puig N, Cedena MT, Rosiñol L, Cerdán L, Vidriales MB, et al. Measurable residual disease by next-generation flow cytometry in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2020;38(8):784–92.
 84. Costa LJ, Derman BA, Bal S, Sidana S, Chhabra S, Silbermann R, et al. International harmonization in performing and reporting minimal residual disease assessment in multiple myeloma trials. *Leukemia* [Internet]. 2021 Jan 11;35(1):18–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-020-01012-4>
 85. Avet-Loiseau H, Moreau P, Attal M, Hulin C, Arnulf B, Corre J, et al. Efficacy of daratumumab (DARA) +

- bortezomib/thalidomide/dexamethasone (D-VTd) in transplant-eligible newly diagnosed multiple myeloma (TE NDMM) based on minimal residual disease (MRD) status: Analysis of the CASSIOPEIA trial. *J Clin Oncol* [Internet]. 2019 May 20;37(15_suppl):8017. Available from: https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.8017
86. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, Puig N, García-Sánchez O, Böttcher S, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*. 2017;31(10):2094–103.
 87. Borowitz MJ, Wood BL, Devidas M, Loh ML, Raetz EA, Salzer WL, et al. Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: A report from Children’s Oncology Group study AALL0232. *Blood*. 2015;126(8):964–71.
 88. Büscher M. Flow Cytometry Instrumentation – An Overview. *Curr Protoc Cytom*. 2019;87(1):1–8.
 89. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;37(2):163–76.
 90. Melamed MR. A brief history of flow cytometry and sorting. *Methods Cell Biol*. 2001;63(63):3–17.
 91. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* [Internet]. 2018 Jan 21;120(1):56–61. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpim.40>
 92. Shapiro HM, Telford WG. Lasers for Flow Cytometry: Current and Future Trends. *Curr Protoc Cytom*. 2018;83(1):1.9.1-1.9.21.
 93. Telford WG. Overview of lasers for flow cytometry. Vol. 1678, *Methods in Molecular Biology*. 2018. 447–479 p.
 94. Aebischer D, Galiniak S, Kubrak T, Podgórski R, Bartusik-Aebischer D. General principles of flow cytometry. *Introd to Flow Cytom*. 2019;16(4):1–24.
 95. Radcliff G, Jaroszeski MJ. Basics of flow cytometry. *Methods Mol Biol*. 1998;91:1–24.
 96. Kalina T, Flores-montero J. EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Instrument Setup and Compensation Version 1.2.1 (29 October 2019). *Euroflow SOP*. 2019;1(June):1–20.
 97. Montante S, Brinkman RR. Flow cytometry data analysis: Recent tools and algorithms. *Int J Lab Hematol*. 2019;41(S1):56–62.
 98. Wood JCS. Principles of Gating. *Curr Protoc Cytom*. 1998;3(1):1–12.
 99. Jaroszeski MJ, Radcliff G. Fundamentals of flow cytometry. *Appl Biochem Biotechnol - Part B Mol Biotechnol*. 1999;11(1):37–53.
 100. Wood B, Jevremovic D, Béné MC, Yan M, Jacobs P, Litwin V. Validation of cell-based fluorescence assays: Practice guidelines from the ICSH and ICCS - Part v - performance criteria. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2013;84(5):315–23.
 101. Gupta S, Karandikar NJ, Ginader T, Bellizzi AM, Holman CJ. Flow

- cytometric aberrancies in plasma cell myeloma and MGUS – correlation with laboratory parameters. *Cytom Part B - Clin Cytom.* 2018;94(3):500–8.
102. Pojero F, Casuccio A, Parrino MF, Cardinale G, Colonna Romano G, Caruso C, et al. Old and new immunophenotypic markers in multiple myeloma for discrimination of responding and relapsing patients: The importance of “normal” residual plasma cell analysis. *Cytom Part B - Clin Cytom.* 2015;88(3):165–82.
 103. Zheng W, Liu D, Fan X, Powers L, Goswami M, Hu Y, et al. Potential therapeutic biomarkers in plasma cell myeloma: A flow cytometry study. *Cytom Part B - Clin Cytom.* 2013;84(4):222–8.
 104. Paiva B, Puig N, Cedena MT, De Jong BG, Ruiz Y, Rapado I, et al. Differentiation stage of myeloma plasma cells: biological and clinical significance on behalf of GEM (Grupo Español de MM)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) cooperative study groups Europe PMC Funders Group. *Leukemia.* 2017;31(2):382–92.
 105. Raja KRM, Kovarova L, Hajek R. Review of phenotypic markers used in flow cytometric analysis of MGUS and MM, and applicability of flow cytometry in other plasma cell disorders. *Br J Haematol.* 2010;149(3):334–51.
 106. Calvo KR, McCoy CS, Stetler-Stevenson M. Flow cytometry immunophenotyping of hematolymphoid neoplasia. *Methods Mol Biol.* 2011;699:295–316.
 107. Mendonça de Pontes R, Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Puig N, Pessoa de Magalhães RJ, Corral-Mateos A, et al. B-Cell Regeneration Profile and Minimal Residual Disease Status in Bone Marrow of Treated Multiple Myeloma Patients. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 Apr 3;13(7):1704. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/7/1704>
 108. Roshal M, Flores-Montero JA, Gao Q, Koeber M, Wardrope J, Durie BGM, et al. MRD detection in multiple myeloma: Comparison between MSKCC 10-color single-tube and EuroFlow 8-color 2-tube methods. *Blood Adv.* 2017;1(12):728–32.
 109. Manasanch EE, Salem DA, Yuan CM, Tadgeja N, Bhutani M, Kwok M, et al. Flow cytometric sensitivity and characteristics of plasma cells in patients with multiple myeloma or its precursor disease: influence of biopsy site and anticoagulation method. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2015 May 4;56(5):1416–24. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10428194.2014.955020>
 110. Yoroidaka T, Narita K, Takamatsu H, Fujisawa M, Nakao S, Matsue K. Comparison of minimal residual disease detection in multiple myeloma between the DuraClone and EuroFlow methods. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Dec 27;11(1):11218. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89761-9>

111. Courville EL, Yohe S, Shivers P, Linden MA. VS38 Identifies Myeloma Cells with Dim CD38 Expression and Plasma Cells Following Daratumumab Therapy, Which Interferes with CD38 Detection for 4 to 6 Months. *Am J Clin Pathol*. 2020;153(2):221–8.
112. Tarín F, López-Castaño F, García-Hernández C, Beneit P, Sarmiento H, Manresa P, et al. Multiparameter flow cytometry identification of neoplastic subclones: A new biomarker in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Acta Haematol*. 2019;141(1):1–6.
113. Ise M, Matsubayashi K, Tsujimura H, Kumagai K. Loss of CD38 Expression in Relapsed Refractory Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* [Internet]. 2016;16(5):e59–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clml.2016.02.037>
114. Flanders A, Stetler-Stevenson M, Landgren O. Minimal residual disease testing in multiple myeloma by flow cytometry: major heterogeneity. *Blood*. 2013;122(6):1088–9.
115. Arroz M, Came N, Lin P, Chen W, Yuan C, Lagoo A, et al. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2016;90(1):31–9.
116. Oldaker TA, Wallace PK, Barnett D. Flow cytometry quality requirements for monitoring of minimal disease in plasma cell myeloma. *Cytom Part B Clin Cytom* [Internet]. 2016 Jan;90(1):40–6. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.21276>
117. Stetler-Stevenson M, Paiva B, Stoolman L, Lin P, Jorgensen JL, Orfao A, et al. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytom Part B Clin Cytom* [Internet]. 2016 Jan;90(1):26–30. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.21249>
118. Wood BL. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2016;90(1):47–53.
119. Scott SD, Fletcher M, Whitehouse H, Whitby L, Yuan C, Mazzucchelli S, et al. Assessment of plasma cell myeloma minimal residual disease testing by flow cytometry in an international inter-laboratory study: Is it ready for primetime use? *Cytom Part B Clin Cytom* [Internet]. 2019 May 19;96(3):201–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.21754>
120. Sanoja-Flores L, Flores-Montero J, Puig N, Contreras-Sanfeliciano T, Pontes R, Corral-Mateos A, et al. Blood monitoring of circulating tumor plasma cells by next generation flow in multiple myeloma after therapy. *Blood*. 2019;134(24):2218–22.
121. Gonsalves WI, Rajkumar S V., Dispenzieri A, Dingli D, Timm MM, Morice WG, et al. Quantification of circulating clonal plasma cells via multiparametric flow cytometry identifies patients with smoldering

- multiple myeloma at high risk of progression. *Leukemia*. 2017;31(1):130–5.
122. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*. 1990;61(7):1303–13.
123. Ahsmann E, Lokhorst H, Dekker A, Bloem A. Lymphocyte function-associated antigen-1 expression on plasma cells correlates with tumor growth in multiple myeloma. *Blood*. 1992;79(8):2068–75.
124. Zandecki M, Facon T, Preudhomme C, Canis F, Izydorzyc V, Lovi V, et al. Significance of circulating plasma cells in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 1994;14(5–6):491–6.
125. Pellat-Deceunynck C, Barillé S, Puthier D, Rapp MJ, Harousseau JL, Bataille R, et al. Adhesion Molecules on Human Myeloma Cells: Significant Changes in Expression Related to Malignancy, Tumor Spreading, and Immortalization. *Cancer Res*. 1995;55(16):3647–53.
126. Stauder R, Van Driel M, Schwärzler C, Thaler J, Lokhorst HM, Kreuser ED, et al. Different CD44 splicing patterns define prognostic subgroups in multiple myeloma. *Blood*. 1996;88(8):3101–8.
127. Vincent I, Mehti N. IL-6 regulates CD44 cell surface expression on human myeloma cells. *Leukemia*. 2004;18(5):967–75.
128. Ohwada C, Nakaseko C, Koizumi M, Takeuchi M, Ozawa S, Naito M, et al. CD44 and hyaluronan engagement promotes dexamethasone resistance in human myeloma cells. *Eur J Haematol*. 2008;80(3):245–50.
129. Hatano K, Kikuchi J, Takatoku M, Shimizu R, Wada T, Ueda M, et al. Bortezomib overcomes cell adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma. *Oncogene*. 2009;28(2):231–42.
130. Bolzoni M, Storti P, Bonomini S, Todoerti K, Guasco D, Toscani D, et al. Immunomodulatory drugs lenalidomide and pomalidomide inhibit multiple myeloma-induced osteoclast formation and the RANKL/OPG ratio in the myeloma microenvironment targeting the expression of adhesion molecules. *Exp Hematol [Internet]*. 2013;41(4):387-397.e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2012.11.005>
131. Vij R, Mazumder A, Klinger M, O’dea D, Paasch J, Martin T, et al. Deep sequencing reveals myeloma cells in peripheral blood in majority of multiple myeloma patients. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk [Internet]*. 2014;14(2):131-139.e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clml.2013.09.013>
132. Chakraborty R, Muchtar E, Kumar SK, Jevremovic D, Buadi FK, Dingli D, et al. Serial measurements of circulating plasma cells before and after induction therapy have an independent prognostic impact in patients with multiple myeloma undergoing upfront autologous transplantation. *Haematologica*. 2017;102(8):1439–45.

133. Li J, Wang N, Tesfaluul N, Gao X, Liu S, Yue B. Prognostic value of circulating plasma cells in patients with multiple myeloma: A metaanalysis. *PLoS One*. 2017;12(7):1–13.
134. Cowan AJ, Stevenson PA, Libby EN, Becker PS, Coffey DG, Green DJ, et al. Circulating Plasma Cells at the Time of Collection of Autologous PBSC for Transplant in Multiple Myeloma Patients is a Negative Prognostic Factor Even in the Age of Post-Transplant Maintenance Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant [Internet]*. 2018;24(7):1386–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.02.017>
135. Foulk B, Schaffer M, Gross S, Rao C, Smirnov D, Connelly MC, et al. Enumeration and characterization of circulating multiple myeloma cells in patients with plasma cell disorders. *Br J Haematol*. 2018;180(1):71–81.
136. Sanoja-Flores L, Flores-Montero J, Garcés JJ, Paiva B, Puig N, García-Mateo A, et al. Next generation flow for minimally-invasive blood characterization of MGUS and multiple myeloma at diagnosis based on circulating tumor plasma cells (CTPC). *Blood Cancer J [Internet]*. 2018;8(12). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41408-018-0153-9>
137. Gonsalves WI, Jevremovic D, Nandakumar B, Dispenzieri A, Buadi FK, Dingli D, et al. Enhancing the R-ISS classification of newly diagnosed multiple myeloma by quantifying circulating clonal plasma cells. *Am J Hematol [Internet]*. 2020 Mar 8;95(3):310–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.12.017>
138. Janjetovic S, Lohneis P, Nogai A, Balci D, Rasche L, Jähne D, et al. Clinical and Biological Characteristics of Medullary and Extramedullary Plasma Cell Dyscrasias. *Biology (Basel) [Internet]*. 2021 Jul 6;10(7):629. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-7737/10/7/629>
139. Peng Y, Wu D, Li F, Zhang P, Feng Y, He A. Identification of key biomarkers associated with cell adhesion in multiple myeloma by integrated bioinformatics analysis. *Cancer Cell Int [Internet]*. 2020;20(1):1–16. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01355-z>
140. Desgrosellier JS, Cheresch DA. Integrins in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer [Internet]*. 2010;10(1):9–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2748>
141. Mellors PW, Binder M, Ketterling RP, Greipp PT, Baughn LB, Peterson JF, et al. Metaphase cytogenetics and plasma cell proliferation index for risk stratification in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Adv*. 2020;4(10):2236–44.
142. Muccio VE, Saraci E, Gilestro M, Gattei V, Zucchetto A, Astolfi M, et al. Multiple myeloma: New surface antigens for the characterization of plasma cells in the era of novel agents. *Cytom Part B - Clin Cytom*.

- 2016;90(1):81–90.
143. Uxa S, Castillo-Binder P, Kohler R, Stangner K, Müller GA, Engeland K. Ki-67 gene expression. *Cell Death Differ.* 2021;28(12):3357–70.
 144. Colella S, Yau C, Taylor JM, Mirza G, Butler H, Clouston P, et al. QuantiSNP: an Objective Bayes Hidden-Markov Model to detect and accurately map copy number variation using SNP genotyping data. *Nucleic Acids Res [Internet].* 2007/03/06. 2007 Mar 1;35(6):2013–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17341461>
 145. Waldschmidt JM, Simon A, Wider D, Müller SJ, Follo M, Ihorst G, et al. CXCL12 and CXCR7 are relevant targets to reverse cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2017;179(1):36–49.
 146. Paiva B, Paino T, Sayagues JM, Garayoa M, San-Segundo L, Martín M, et al. Detailed characterization of multiple myeloma circulating tumor cells shows unique phenotypic, cytogenetic, functional, and circadian distribution profile. *Blood.* 2013;122(22):3591–8.
 147. Nijhof IS, Casneuf T, Van Velzen J, Van Kessel B, Axel AE, Syed K, et al. CD38 expression and complement inhibitors affect response and resistance to daratumumab therapy in myeloma. *Blood.* 2016;128(7):959–70.
 148. Gonsalves WI, Timm MM, Rajkumar SVV, Morice WG, Dispenzieri A, Buadi FK, et al. The prognostic significance of CD45 expression by clonal bone marrow plasma cells in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Leuk Res [Internet].* 2016/03/10. 2016 May;44(3):32–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26994849>
 149. Yoshida T, Ri M, Kinoshita S, Narita T, Totani H, Ashour R, et al. Low expression of neural cell adhesion molecule, CD56, is associated with low efficacy of bortezomib plus dexamethasone therapy in multiple myeloma. *PLoS One.* 2018;13(5):1–14.
 150. Rawstron AC, Smith A, de Tute RM, Painter D, Roman E, Owen RG. Validation of Plasma Cell Immunophenotype As a Biomarker to Identify High-Risk Smoldering Myeloma. *Blood.* 2016;128(22):4451–4451.
 151. Ponzetta A, Benigni G, Antonangeli F, Sciumè G, Sanseviero E, Zingoni A, et al. Multiple myeloma impairs bone marrow localization of effector natural killer cells by altering the chemokine microenvironment. *Cancer Res.* 2015;75(22):4766–77.
 152. Rawstron AC, Child JA, De Tute RM, Davies FE, Gregory WM, Bell SE, et al. Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: Impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX study. *J Clin Oncol.* 2013;31(20):2540–7.
 153. Roussel M, Lauwers-Cances V, Robillard N, Hulin C, Leleu X, Benboubker L, et al. Front-Line Transplantation Program With

- Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone Combination As Induction and Consolidation Followed by Lenalidomide Maintenance in Patients With Multiple Myeloma: A Phase II Study by the Intergroupe Francophone du Myélo. *J Clin Oncol* [Internet]. 2014 Sep 1;32(25):2712–7. Available from: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2013.54.8164>
154. Soh KT, Tario JD, Hahn TE, Hillengass J, McCarthy PL, Wallace PK. Methodological considerations for the high sensitivity detection of multiple myeloma measurable residual disease. *Cytom Part B Clin Cytom* [Internet]. 2020 Mar;98(2):161–73. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.21862>
155. Sommer U, Eck S, Marszalek L, Stewart JJ, Bradford J, McCloskey TW, et al. High-sensitivity flow cytometric assays: Considerations for design control and analytical validation for identification of Rare events. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2021;100(1):42–51.
156. Al-Quran SZ, Yang L, Magill JM, Braylan RC, Douglas-Nikitin VK. Assessment of bone marrow plasma cell infiltrates in multiple myeloma: the added value of CD138 immunohistochemistry. *Hum Pathol* [Internet]. 2007 Dec;38(12):1779–87. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
157. Mateo G, Castellanos M, Rasillo A, Gutiérrez NC, Montalbán MA, Martín ML, et al. Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2005;11(10):3661–7.
158. Cherian S, Hedley BD, Keeney M. Common flow cytometry pitfalls in diagnostic hematopathology. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2019;96(6):449–63.

9. DARBO APROBACIJA

Darbo rezultatai paskelbti tarptautiniuose mokslo leidiniuose, pristatyti nacionalinėse ir tarptautinėse mokslinėse konferencijose.

Straipsniai disertacijos tema:

1. **Radzevičius M**, Dirsė V, Klimienė I, Matuzevičienė R, Kučinskienė ZA, Pečeliūnas V. Multiple Myeloma Immunophenotype Related to Chromosomal Abnormalities Used in Risk Assessment. *Diagnostics*. 2022;12(9):2049. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12092049>. Citavimo rodiklis – 3,992.
2. Soh KT, Came N, Otteson GE, Jevremovic D, Shi M, Olteanu H, Natoni A, Lagoo A, Theakston E, Óskarsson JP, Gorniak M, Grigoriadis G, Arroz M, Fletcher M, Lin P, Ludwig P, Tembhare P, Matuzeviciene R, **Radzevicius M**, Kay S, Chen W, Cabrita C, Wallace PK. Evaluation of multiple myeloma measurable residual disease by high sensitivity flow cytometry: An international harmonized approach for data analysis. *Cytometry B Clin Cytom*. 2022 Mar;102(2):88–106. doi: 10.1002/cyto.b.22053. Epub 2022 Jan 10. Citavimo rodiklis – 3,248.
3. Klimienė I, **Radzevičius M**, Matuzevičienė R, Sinkevič-Belliot K, Kučinskienė ZA, Pečeliūnas V. Adhesion molecule immunophenotype of bone marrow multiple myeloma plasma cells impacts the presence of malignant circulating plasma cells in peripheral blood. *Int J Lab Hematol*. 2021 Jun;43(3):403–408. doi: 10.1111/ijlh.13387. Epub 2020 Nov 13. Citavimo rodiklis – 3,450.

Straipsniai, iš dalies susiję su disertacijos tema:

1. Matuzevičius B, Jonauskaitė G; Janulis V; Karčiauskaitė D, Stoškus M, **Radzevičius M**, Janiulionienė A, Matuzevičienė R. Ūminėmis mieloidinėmis leukemijomis sergančių pacientų blastų biožymenų raiškos ypatumai. *Laboratorinė medicina*. Vilnius: Lietuvos laboratorinės medicinos draugija. ISSN 1392-6470. 2021, t. 23, Nr. 4(90), p. 187–197.
2. Janeliūnienė M, Janiulionienė A, Barzinskienė, A, Taškūnaitė D, **Radzevičius M**, Montrimaitė M, Matuzevičienė R, Karčiauskaitė D. Applicability of flow cytometry for the diagnostics of myelodysplastic

syndromes. *Laboratorinė medicina: Lietuvos laboratorinės medicinos draugija*. ISSN 1392-6470. 2018, t. 20, Nr. 3, p. 183–188.

Pranešimai:

1. **Radzevičius M.** Multiple myeloma immunophenotype related to genetic aberrancies used in risk stratification. XVI Baltijos šalių laboratorinės medicinos kongresas. Talinas, Estija. 2022 m. rugsėjo 22–24 d.
2. **Radzevičius M** (pranešėjas), Dirsė V, Klimienė I, Matuzevičienė R, Žvirblis T, Kučinskienė ZA., Pečeliūnas V. Multiple myeloma immunophenotype related to chromosomal aberrancies used in risk stratification. Inovacijų laboratorinėje hematologijoje tarptautinis simposiumas ISLH 2022. Hibridinis renginys. Bolonija, Italija. 2022 m. rugsėjo 7–10 d.
3. **Radzevičius M** (pranešėjas), Klimienė I, Matuzevičienė R, Kučinskienė ZA., Pečeliūnas V. Presence of circulating plasma cells is related to adhesion molecule expression. 5-toji Tarptautinė evoliucinės medicinos konferencija. 2022 m. rugpjūčio 24–27 d.
4. **Radzevičius M.** Minimalios liekamosios ligos tyrimai ir naujos kartos tėkmės citometrija. Konferencija „Biomedicininė diagnostika 2022 m.: mokslas ir praktika. Nuotolinė konferencija. 2022 m. gegužės 5 d.
5. **Radzevičius M.** Experience with MM MRD in our clinical laboratory: theory and practice. Cytognos, S.L. Internetinis seminaras. 2021 m. kovo 30 d.
6. **Radzevičius M** (pranešėjas), Klimienė I, Pečeliūnas V, Matuzevičienė R, Kučinskienė ZA. Adhezijos molekulių ekspresija mielominės ligos plazminėse ląstelėse. 12-oji Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“, Kaunas, Lietuva, 2019 m. gruodžio 11 d. Pranešimas įvertintas I vieta.
7. **Radzevičius M.** Tėkmės citometrijos vaidmuo hematologijos laboratorijoje. Mokslinė-praktinė konferencija „Procesai iki tyrimų ir kiti aktualūs šiandieninės laboratorinės medicinos klausimai“. Vilnius, Lietuva. 2019 m. balandžio 9 d.
8. **Radzevičius M.** (pranešėjas), Matuzevičienė R. Review of Lithuanian T Acute Lymphoblastic Leukemia Flow Cytometric Cases Registered on the NOPHO Database. 36-oji metinė Šiaurės šalių vaikų onkohematologų draugijos (NOPHO) konferencija. Vilnius, Lietuva. 2018 m. birželio 1–5 d.

Stażuotės:

1. 5-oji tarptautinė citometrijos vasaros mokykla. Organizuoja Europos klinikinės ląstelių analizės draugija (ESCCA). Valencija, Ispanija. 2017 m. liepos 3–7 d.

10. SUMMARY

ABBREVIATIONS

AL	Amyloid light chain
AUC	Area under curve
BM	Bone marrow
CD	Cluster of differentiation
CPC	Circulating plasma cells
CR	Complete response
CRAB	Calcium, renal insufficiency, anemia, bone lesions
CV	Coefficient of variation.
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
FISH	Fluorescence in-situ hybridization
FC	Flow cytometry
FCS	Flow cytometry standard
FSC	Forward scatter.
GEP	Gene expression profiling
HK	Hyperdiploid karyotype
Ig	Immunoglobulin
IgH	Immunoglobulin heavy chain
IL	Interleukin
IMWG	International Myeloma Working Group
ISS	International Staging System
LDH	Lactate dehydrogenase
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
MDE	Myeloma defining event
MFI	Mean fluorescence intensity
MGUS	Monoclonal gammopathy of undetermined significance
MRD	Minimal residual disease
MM	Multiple myeloma
MMPC	Malignant plasma cells
m-SMART	Stratification for Myeloma and Risk-Adapted Therapy
NGF	Next-generation flow cytometry
NGS	Next-generation sequencing
nPC	Normal plasma cells
PCR	Polymerase chain reaction
PB	Peripheral blood
PC	Plasma cells

R-ISS	Revised international staging system
RRMM	Relapsed/refractory multiple myeloma
SMM	Smoldering multiple myeloma
ROC	Receiver operating characteristic.
sCR	Stringent complete response
SCT	Stem cell transplant
SD	Standard deviation
SSC	Side scatter.
SNP-a	Single nucleotide polymorphism array
VUH SK	Vilnius University Hospital Santaros Klinikos

1. INTRODUCTION

1.1. Significance of the thesis

Multiple myeloma (MM) is a disease of malignant plasma cells (PCs) proliferating in the bone marrow (BM). PCs are the end stage of B lymphocyte maturation, and malignant PCs (MM PCs) are their neoplastic counterpart (1). MM is the third most common hemato-oncological disease in Lithuania, making up more than 10% of cases of hematological malignancies (2). A lot of progress has been made in MM treatment, as more than 50% of MM patients may achieve complete response (CR) to treatment (3). However, it remains incurable despite methods such as stem cell transplantation (SCT) (4). Monitoring of patients, including methods as such minimal residual disease (MRD) measurement, is still necessary long term due to possibility of relapse (5).

The research I will describe here encompasses a few closely related topics. First of all, the role of immunophenotype during diagnosis. For MM patients, initial evaluation includes assessing overall health, as well as disease biology related factors, for which biochemical, hematological and genetic assays are used (6). While FC can be used to confirm presence of malignant PCs during MM diagnosis (7), immunophenotype may have a larger role – protein expression measured by FC has shown relation to disease prognosis (8). Due to genetic heterogeneity of MM, additional risk assessment methods could provide improved criteria for categorization. Relationship between immunophenotype and chromosomal aberrancies have been investigated (9). Due to strives in flow cytometry (FC) harmonization, using standard MM panels allows for better comparison of antigen expression between different patients, over time, and between different institutions (10).

When MM is resistant to treatment, it is classified as relapsing and/or refractory MM (RRMM) (11). Patients with RRMM patients often have MM PCs detectable outside the BM. They can be detected in the peripheral blood (PB) by FC, as circulating plasma cells (CPCs). Changes in malignant PC immunophenotype that may determine formation of CPCs are important in determining MM prognosis and monitoring the disease. A particularly aggressive form of this is plasma cell leukemia, where a large number of malignant PCs are found in the PB (12). The exit of PCs outside the BM to be related to adhesion molecules, which can be measured using FC (13).

In cases of treatment resistance and disease progression, mechanism such as CPC formation can be important in prognosis and treatment choice (14), which is closely related to measurable expression of adhesion molecules. CPCs are increasingly discussed in both MM diagnosis and prognosis determination. CPC detection could be a way of early warning for treatment resistance, and could be used to guide therapy (15). Additionally, since CPCs are measured in the PB, this is less invasive than BM aspiration, and could be used as a screening step before MRD (16). Adhesion molecule expression is thought to be closely relation to CPC formation, however there are still questions about precise significance of adhesion molecules (11). Flow cytometry enables measurement of adhesion immunophenotype both in the BM, and in the PB malignant PCs.

FC is widely used to monitor MRD (17,18). MRD is a concept of measuring small amounts of residual malignant cells in the milieu they proliferate – bone marrow, blood, or other body fluids. However, to improve MRD, assay harmonization is necessary (19). There is value in improving reliability of MM MRD assay results, when performed by FC, through improvement and harmonization of data analysis. Harmonization of data analysis means reaching a consensus gating strategy for both the MRD and factors that help establish quality of BM aspirate. Harmonization improves assay sensitivity and repeatability, allowing for comparison between different laboratories or clinical trials (20). Long term monitoring through immunophenotype analysis and detection is employed via MRD, even in lower risk disease (21). Recommendations by expert groups, such as the Euroflow consortium, provide information on reagent panel standardization (10), however additional factors that would reduce variation of results could be related to investigators, and differences in knowledge and experience (22). By eliminating factors like sample preparation and instrumentation, differences in data analysis could be isolated and improved. Reducing variation of results is important, especially when MRD status is used in both routine practice and clinical trials(23)(24).

1.2. Aim of the thesis

The aim was to evaluate how malignant PC immunophenotyping can be used in determining MM prognosis, mechanisms of resistance to treatment through CPC formation, as well as harmonization of data analysis when MRD is evaluated by flow cytometry(25)

1.3. Objectives

1. Investigate BM malignant PC adhesion molecule immunophenotype and its role in the formation of CPCs.
2. Determine which features of malignant PC immunophenotype at diagnosis are related to prognosis, by their relation to chromosomal aberrancies currently used in risk assessment.
3. Evaluate the effect of immunophenotype data analysis strategy on investigator dependent variability of MM MRD results.
4. To establish which BM aspirate sample properties, as analyzed using flow cytometry, best reflect on sample collection quality.

1.4. Thesis statements to be defended

1. Malignant PC adhesion molecule immunophenotype changes in the BM determines MM progression and CPC formation in the PB.
2. Malignant PC diagnostic immunophenotype has features related to chromosomal aberrancies used in risk assessment.
3. Harmonization of flow cytometry data analysis improves repeatability of MM MRD assay results.
4. Harmonization of flow cytometry data analysis establishes criteria for BM aspirate sample quality assessment.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Malignant plasma cell immunophenotyping

BM samples were prepared and collected on an 8 color (10 parameter) flow cytometer, BD *FACSCanto II* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), which was able to detect fluorochromes in the channels V450, Pacific Orange, FITC, PE, PerCP-Cy5,5, APC, Pe-Cy7 and APC-H7, as well as FSC and SSC characteristics. Bone marrow samples were collected in K2-EDTA *Vacutainer* tubes (BD, Plymouth, UK). All samples were prepared using whole blood lysis methods, stained both for surface and cytoplasmic markers.

Antigens with characteristic expression by PCs and MM PCs were used, with markers CD38, CD138 and CD45 used for PC identification, gating cells according to expected immunophenotype and light scatter characteristics. MM PCs express dim CD38, CD45, CD27 and CD81, as well as aberrantly express CD117 and restricted cytoplasmic light chains (kappa or lambda). Because different expression of these markers is possible on malignant PCs, sequential gating, in diagrams combining expression of two markers, was used to evaluate different combinations, such as CD38⁺dim and CD45⁻, CD81⁻ and CD117⁺, CD27⁺dim and CD45⁻, allowing for wider range of expression.

When the stained samples were collected, standard FCS files were created and analyzed on BD *FACSDiva* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) software. Both normal and malignant PCs were identified by gating, marker expression was evaluated as both percentage of positive cells and mean expression by MFI.

2.2. Determining adhesion immunophenotype

Malignant PCs may be detectable in the PB of MM patients; however, this can vary between patients and change throughout the course of treatment. Both normal and malignant PCs express adhesion molecules, which are used to attach to the BM stroma(26). It is not completely clear if loss of adhesion molecules determines CPC formation(13). The primary goal of this study was determining how changes in BM MM PC immunophenotype influence the formation and detection of CPCs in PB.

Adult (>18 years old) MM patients were included in the study, with the criteria of RRMM diagnosis, according to EBMT criteria – having >5% malignant PCs in the BM after at least one course of treatment. Healthy donor BM was used as a control of adhesion molecule expression in normal PCs. Exclusion criteria were solitary plasmacytoma, plasma cell leukemia and diagnosis of other cancers. All patients were treated in VUH SK throughout 2013 – 2015. Both BM and PB samples were obtained as part of routine examination, after informed consent was obtained. 41 RRMM patients and 14 healthy donors were included in the study.

Both BM MM PCs and PB CPCs were stained, both from RRMM patients and healthy donors. The following fluorochrome combinations were used:

1. CD45-V450/CD138-Pacific Orange/CD38-FITC/CD168-PE/
CD19-PerCP-Cy5.5/kappa-APC/CD56-Pe-Cy7/lambda-APC-H7;
2. CD45-V450/CD138-Pacific Orange/CD19-FITC/CD49e-PE/
CD49d-PerCP-Cy5.5/CD44-APC/CD56-Pe-Cy7/CD38-APC-H7;
3. CD45-V450/CD138-Pacific Orange/CD58-FITC/CD18-PE/

CD19-PerCP-Cy5.5/CD11a-APC/CD56-Pe-Cy7/CD38-APC-H7;
4. CD45-V450/CD138-Pacific Orange/CD19-FITC/CD184-PE/
CD34-PerCP-Cy5.5/CD117-APC/CD56-Pe-Cy7/CD38-APC-H7.

Samples were collected on a *FACSCanto II* flow cytometer, using *FACSDiva* v.6.1.3 software. Malignant PCs were identified with a combination of CD38, CD45 and CD138, with gates drawn widely to include lower expression. Debris and doublets were separated using FSC, SSC and CD45. A modified European Myeloma Net method was employed. Malignant PCs and CPCs were separated from normal PCs using CD38, CD45 and CD19 decreased expression and CD56 increased expression. The level of detection was ~0,01%.

Adhesion molecule (CD11a, CD18, CD44, CD49d, CD49e, CD58, CD168, CD184) expression was analyzed on MM patient BM malignant PCs, PB CPCs and healthy donor BM normal PCs, both by expression percentage and MFI.

2.3. Determining malignant plasma cell immunophenotype at diagnosis

The objective of this subsequent study was investigating diagnostic MM PC immunophenotype and its relationship to specific high-risk chromosomal aberrancies, which can determine prognosis (27). These aberrancies are used in estimation methods like R-ISS and m-SMART (28). The product of chromosomal aberrancies and other genetic changes may be found in changed protein expression, so we hypothesized that a flow cytometry panel meant to differentiate normal and malignant PCs may elucidate these changes (8), especially when standardized reagents, sample preparation and instrument settings are used, allowing for easier comparison.

73 patients diagnosed with MM during 2019-2020 at VUH SK were included in the study, with the criteria that they were both analyzed using the MM-MRD panel and SNP-a microarray molecular karyotyping, at diagnosis. Adult (>18 years old) patients were included if they were diagnosed according to IMWG criteria, didn't have plasma cell leukemia or weren't actively receiving treatment for other cancer.

All data available at diagnosis was collected and anonymized before statistical analysis. ISS, R-ISS and m-SMART risk was determined, and flow cytometry data was analyzed. Since MM PC S-phase wasn't available (as specified in m-SMART), high KI-67 (>10%) was used as a substitute (29).

CD138+ plasma cells were selected using magnetic beads, prior to SNP-a molecular karyotyping. All cases were analyzed using Infinium HD whole genome sequencing, using HumanCytoSNP-12 BeadChip (illumine Inc, San

Diego, CA). Samples were prepared and analyzed using routine protocol by the manufacturer.

All patients FC analysis was performed on FACSCanto II, using FACSDiva v9.0. Samples were prepared according to *Euroflow* recommendations, and stained with *Multiple Myeloma Minimal Residual Disease* kit (Cytognos, Salamanca, Spain). Malignant PCs were identified and debris separated as previously described. Expression of CD27, CD81, CD117, CD19, CD45, CD56 was analyzed on malignant PCs by percentage and MFI. Level of detection was 20 events. Since expression was not normally distributed, non-parametric tests were performed – Mann-Whitney U for groups with two categories, Kruskal-Wallis for groups with more than two categories.

2.4. Harmonization of minimal residual disease data analysis

Harmonization of data analysis is important for result comparison between different laboratories. Differences between MRD methodologies have existed for a long time, and these include sample preparation, combination of fluorochromes, but also include data analysis and result presentation. The purpose of this specific study was establishing an analysis algorithm, which would provide similar results, independent of investigator or software used, eliminating a variation which results from different gating strategies, which may differ between even investigators with a lot of experience (30). For this purpose, the same files were analyzed by different investigators, from different institutions. In total, 17 laboratories, including the VUH SK flow cytometry team, returned results, participated in discussions surrounding gating strategies and determination of BM sample quality.

In the first two stages of the study, 8 files from routine MM-MRD assays were analyzed by all labs. Samples were prepared using two tubes, each using a combination of 8 fluorochromes. The panels included fluorochromes for PC identification CD45-PCPCy5.5, CD19-PECy7, CD56-PE, CD38-FITC, CD138-BV421 and CD27-BV510. The first tube included frequently aberrant CD117-APC and CD81-APCH7, the second tube clonality measurement via cKappa-APC and cLambda-APC-C750. In the final stage, we analyzed 10 new samples, while using the final consensus gating strategy.

During the first stages we employed our own laboratory gating strategy and provided the following populations: “Total analyzed cells”, “Normal PCs”, “Aberrant PCs”, “MRD percentage”, “Level of detection”, “Level of quantification”, along with other cell populations, including mastocytes, hematogones, myeloid and erythroid precursors. We decided which samples were MRD positive or negative, or inconclusive, as well as sample quality by

BM specific cell populations. We discussed our results from the first stage during an online meeting with the working group, providing feedback and helping draft a consensus strategy.

In the second stage, we reanalyzed FCS files received during the first stage using the new consensus analysis strategy. After the second stage, we discussed the improvement in results, especially cell populations relevant to BM sample quality.

After the final consensus strategy was decided, we analyzed 10 new files, implementing with the final consensus strategy in BD FACSDiva software, as well as Kaluza (v. 2.1) and Infinicyt (v. 2.0). We decided to use Kaluza software for the final results, due to good file compatibility and ability to easily reuse sequential gating templates.

2.5. Statistical data analysis

In every analyzed cell population, surface and cytoplasmic antigen expression was measured by percentage of positive cells and mean expression by MFI. All variables were checked for normal distribution using Shapiro-Wilk test. If normal distribution wasn't found, nonparametric tests were applied. Percentage positive expression and MFI did not show normal distribution, so the Mann-Whitney U test was used when comparing two groups, and Kruskal-Wallis test was used for variables with more than two categories. When determining adhesion molecules that best predict CPC presence in PB, we used a logistic regression model, applying Wald Chi square to determine whether independent variables were significant. For comparing survival, we used Kaplan-Meier log rank test. The primary statistical tool to compare MRD analysis results between laboratories was the coefficient of variation (CV). Results were compared between all stages. CV percent was calculated by dividing the standard of deviation (SD) from the mean and multiplying by 100 percent. To calculate cell populations best able to determine sample quality, as well as for predicting CPC presence, ROC curves were made for each population or marker. AUC were calculated, with an ideal population having an AUC of 1,00, and a non-informative population an AUC of 0,5. Statistical significance for all tests was chosen as $p < 0,05$.

3. RESULTS

3.1. Impact of malignant plasma cell adhesion immunophenotype on circulating plasma cell formation

41 RRMM patients were included in the study, along with 14 healthy donors as controls. Mean age of donors was 26,5, with 13 women and 1 man. RRMM age was higher at 72 (55 – 81), with 22 women and 19 men, however the purpose of healthy donor BM PCs was to determine normal adhesion molecule expression, independent of age.

Table 1. Characteristics of patient groups with detectable (CPC+) and undetectable (CPC-) circulating plasma cells (CPCs)

Parameter	CPC+ group median (range)	CPC- group median (range)	p-value (Mann-Whitney U test)
Group size	30	11	
Age	71 (55 - 81)	72 (68 - 81)	0.156
Hgb (g/L)	99 (70 - 137)	109 (86-136)	0.204
Platelet number (x10 ⁹ /L)	135 (58 – 226)	199 (113-261)	0.010
Plasma protein (g/L)	87,4 (61,8 - 126,2)	80,6 (63,2 - 104,4)	0.495
Albumin (g/L)	39,5 (22,7-57,8)	34,9 (27,9 - 58,9)	0.571
M protein (g/L)	32,6 (1,44 - 66,5)	21,9 (4,73 - 49)	0.824
Creatinine (µmol/L)	87 (57 - 393)	77 (61 - 157)	0.717
B2-microglobulin (mg/L)	5,2 (2,33 - 23,1)	5,8 (2,5 - 14,3)	0.805
Ca ²⁺ (mmol/l)	1,25 (1,04 - 1,78)	1,15 (1,08 - 1,43)	0.329
BM PC (microscopy) (%)	27,5 (5,5 - 79)	16 (1 - 61)	0.116
LDH (U/L)	207 (103 - 1796)	185 (123 - 291)	0.717

Previous lines of treatment	2 (1 - 7)	3 (1 - 4)	0.717
ASCT	19/30	3/11	
Treatment with proteasome inhibitors	22/30	3/11	
Treatment with immunomodulators	20/30	11/11	

BM PC – bone marrow plasma cells. ASCT – autologous stem cell transplant.

Some adhesion molecules are part of the immunophenotype that allows for PC identification, but were analyzed as part of the adhesion immunophenotype (CD38, CD138 and CD56). Mean CPC detected was 0,79 (SD \pm 1.309), median 0.1505 (Q1 0.024; Q3 0.901), with a range of CPCs being 0,0069% - 4,71%.

The main point of comparison in the study was two groups of patients – those with detectable CPCs (CPC+) and undetectable CPCs (CPC-) (table 1). Their BM malignant PC immunophenotype was compared, specifically the expression of adhesion molecules.

Table 2. Comparison of adhesion molecule expression between different plasma cell populations

Cell populations compared	Adhesion molecule	Expression %	Wilcoxon <i>p</i> value	Expression MFI	Wilcoxon <i>p</i> value
		Median		Mean	
CPC- vs CPC+ patient BM MMPCs	CD49d	100 vs 100	0,5820	45322 vs 24645	0,0284
	CD49e	12 vs 9	0,0464	814 vs 328	0,0800
	CD38	100 vs 100	1,0000	21025 vs 16040	0,1154
	CD138	100 vs 100	1,0000	4237 vs 2247	0,0140
	CD56	100 vs 100	0,1007	54182 vs 21139	0,0152
BM MMPCs vs healthy donor BM PCs	CD49d	100 vs 100	0,4428	30192 vs 58090	0,0001
	CD49e	10 vs 23	0,0155	458 vs 575	0,0312
	CD38	100 vs 100	1,0000	17377 vs 62912	0,0001
	CD138	100 vs 100	1,0000	2781 vs 2517	0,9154
	CD168	32 vs 8	0,1700	1468 vs 466	0,0017
CPC- patient BM MMPCs vs healthy donor BM PCs	CD49d	100 vs 100	0,9360	45322 vs 58090	0,1490
	CD49e	12 vs 23	0,4030	814 vs 575	0,8510
	CD38	100 vs 100	1,0000	21025 vs 62912	0,0001
	CD138	100 vs 100	1,0000	4237 vs 2517	0,0850
CPC+ patient BM MMPCs vs PB CPCs	CD49d	100 vs 98	0,0003	24645 vs 19662	0,0083
	CD58	100 vs 96	0,0021	1332 vs 819	0,0001
	CD38	100 vs 100	1,0000	16040 vs 12875	0,1413
	CD138	100 vs 100	1,0000	2247 vs 1480	0,0022
All patients BM MMPCs vs CPCs	CD49d	100 vs 98	0,0001	30192 vs 19662	0,0010
	CD49e	10 vs 3	0,0005	458 vs 170	0,0001
	CD38	100 vs 100	1,0000	17377 vs 12875	0,0282
	CD138	100 vs 100	1,0000	2781 vs 1480	0,0001
	CD56	100 vs 100	0,4135	30004 vs 12826	0,0184
	CD168	8 vs 3	0,0500	466 vs 327	0,3500

CPC – circulating plasma cells. BM – bone marrow, PCs – plasma cells, MMPCs – malignant PCs. CPC+ - patients with detectable CPCs, CPC- - patients with undetectable CPCs.

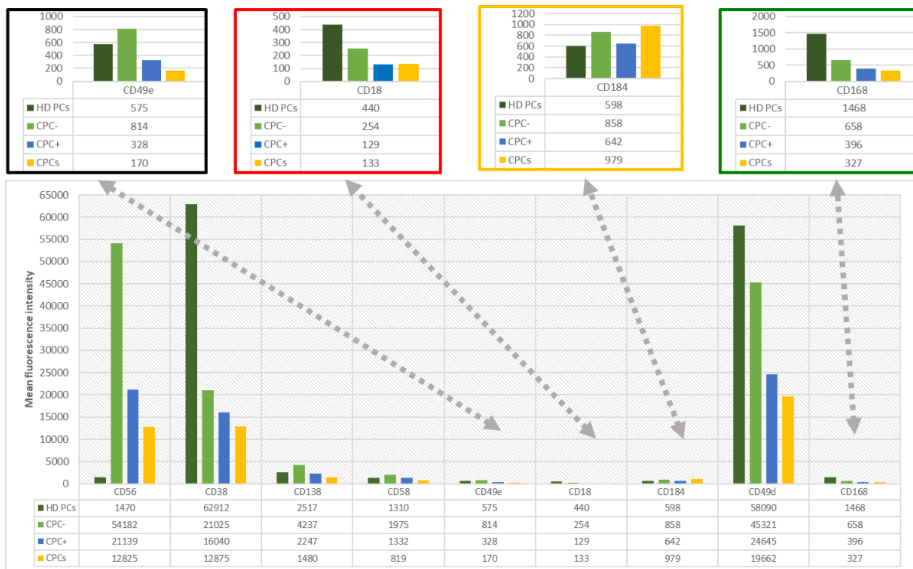


Figure 1. Difference in adhesion molecule expression between different plasma cells (PC) populations. HD PCs – healthy donors normal bone marrow (BM) PCs. CPC+ – malignant BM PCs of patients with detectable circulating PCs (CPCs). CPC- – malignant BM PCs of patients without detectable CPCs.

There was a significant trend of adhesion molecule expression decrease – with highest expression found in healthy donor PCs, lower in CPC- BM MMPCs, even lower in CPC+ BM MMPCs and lowest in PB CPCs (figure 1). These differences were clearest when comparing expression of CD38, CD49d and CD56. Other adhesion molecules showed similar differences (CD18, CD168, CD49e), however had dim expression or were expressed by a smaller percentage of cells.

CPCs in the PB had lower expression of CD38, CD49d and CD138 – when compared to CPC+ BM malignant PCs (table 2). CPCs also had lower CD56 and CD58 expression when compared to RRMM BM malignant PCs overall (table 2).

Healthy donor PCs were used as controls of normal adhesion molecule expression. They had highest expression of CD38, CD49d, CD49e and CD168. However, CPC- BM malignant PCs had no statistical difference, when compared to healthy donor PCs, in CD49d and CD49e expression, meaning these patients had the closest to normal adhesion immunophenotype.

Table 3. Analysis of maximum likelihood estimates for adhesion molecules, in predicting circulating plasma cells presence in peripheral blood.

Analysis of Maximum Likelihood Estimates					
Parameter	DF	Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	p-value
CD45 MFI	1	-0.00008	0.000100	0.5928	0.4413
CD56 MFI	1	-0.00003	0.000014	4.6806	0.0305
CD38 MFI	1	-0.00005	0.000037	2.0278	0.1544
CD138 MFI	1	-0.00071	0.000281	6.3809	0.0115
CD19 MFI	1	-0.00254	0.00171	2.2145	0.1367
CD117 MFI	1	0.000021	0.000063	0.1066	0.7440
CD58 MFI	1	-0.00093	0.000493	3.5818	0.0584
CD49e MFI	1	-0.00214	0.00118	3.2574	0.0711
CD18 MFI	1	-0.00326	0.00202	2.5985	0.1070
CD184 MFI	1	-0.00074	0.000667	1.2423	0.2650
CD49d MFI	1	-0.00004	0.000018	5.4396	0.0197
CD44 MFI	1	7.572E-7	0.000184	0.0000	0.9967
CD11a MFI	1	-0.00038	0.000826	0.2167	0.6416
CD168 MFI	1	-0.00023	0.000335	0.4694	0.4933

MFI – mean fluorescence intensity. DF – degrees of freedom. Significant findings highlighted in green.

Binary logistic regression analysis was performed to determine which adhesion molecule expression was best at predicting CPC detection (table 3). Three markers (CD56, CD138 and CD49d) had the best fit, and were used in constructing a ROC curve (figure 2). A very satisfactory AUC for the model was achieved (AUC=0,8909). Each of these markers had cut-offs calculated for predicting CPC presence, as well as sensitivity, specificity positive and negative predictive value (table 4).

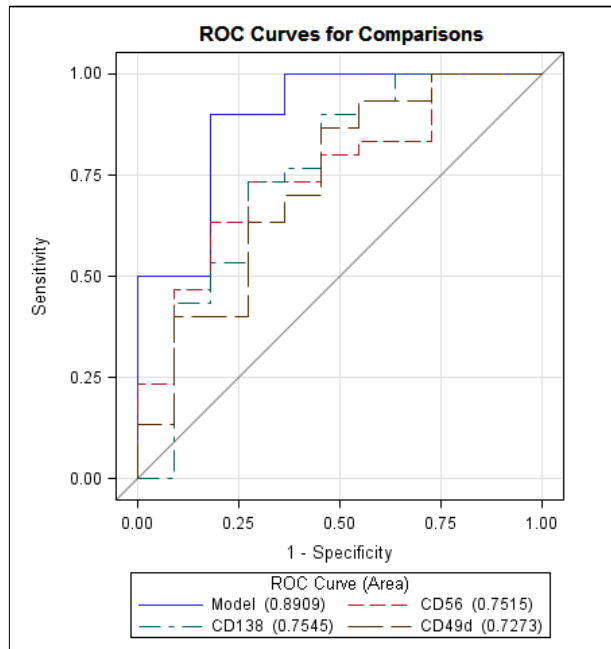


Figure 2. Area under ROC Curve for CD138, CD56 and CD49d when predicting circulating plasma cell detection.

Table 4. Cut-offs, sensitivity and specificity for CD56, CD138 and CD49d when predicting CPC presence in PB.

Variable	Cut-off	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	False Positive	False Negative
CD56 MFI	28430	66.7	72.7	87.0	44.4	13.0	55.6
CD138 MFI	3480	83.3	54.5	83.3	54.5	16.7	45.5
CD49d MFI	41925	90.0	45.5	81.8	62.5	18.2	37.5

MFI – mean fluorescence intensity. PPV – positive predictive value. NPV – negative predictive value.

Additional analysis was performed to see if CPC percentage concentration correlated with adhesion molecule expression (using Spearman *rho*), however no statistically significant correlation was detected. The closest marker to significant correlation was the inverse relationship between lower CD49e expression by MFI and higher CPC percentage.

3.2. Malignant plasma cell immunophenotype is related to chromosomal aberrancies used in risk assessment

73 patients diagnosed and treated for MM at VUH SK, that fit inclusion criteria (diagnosis of MM according to IMWG, Euroflow FC panel and SNP-a karyotyping at diagnosis performed), were selected for analysis (Table 5).

Table 5. Study population characteristics. High risk aberrancies – 17p deletion, 1q duplication, t (4;14), t (14;16), t (14;20).

Characteristic	Patients (%) <i>n</i> = 73
Male	30 (41,1 %)
Female	43 (58,9 %)
R-ISS stage 1	10 (13,7 %)
R-ISS stage 2	42 (57,5 %)
R-ISS stage 3	19 (26,0 %)
m-SMART standard risk	35 (47,9 %)
m-SMART high risk	38 (52,1 %)
Normal karyotype	19 (26,0 %)
No high-risk aberrancies	49 (67,1 %)
1 high-risk aberrancy	21 (28,8 %)
2 high-risk aberrancies	3 (4,1 %)
IgG	36 (49,3%)
IgA	15 (20,5%)
Characteristic	Median (range)
Age	67 (42 - 84)
ECOG evaluation	1 (0 - 4)
HgB (g/L)	110 (67 - 185)
Creatinine (μmol/l)	92 (38 - 920)
Beta-2-microglobulin (mg/l)	4,9 (1,38 - 47,41)
Albumin (g/l)	40 (15,9 - 54,7)
LDH (U/l)	199 (104 - 697)
Ca ²⁺ (mmol/l)	1,22 (1,04 - 2,61)

Most immunophenotypic markers had no statistical association with overall survival, possibly due to shorter follow-up time (average 699 days). Overall survival was 68,5% in the entire group. The highest survival was in the group of patients with isolated hyperdiploid karyotype (HK) (90%), however the difference wasn't statistically significant when compared to all patients with non-isolated HK ($p > 0,05$). One interesting correlation was between CD38 and survival. CD38 MFI was also checked for correlation with

other parameters, but the only correlation was with percentage of MMPCs in bone marrow and ISS/R-ISS stage (figure 8), with no correlations with high risk chromosomal aberrancies by themselves (table 6). Two categories of patients were separated according CD38 expression – those with BM MMPC CD38 MFI above or below 15 000 (figure 3). 15 000 was chosen as close to the mean for the entire patients group. Those with CD38 MFI below 15 000 had survival of 58,5%, those CD38 MFI above 15 000 had survival of 95%, with a significant Kaplan-Meier log rank test ($p=0,03$).

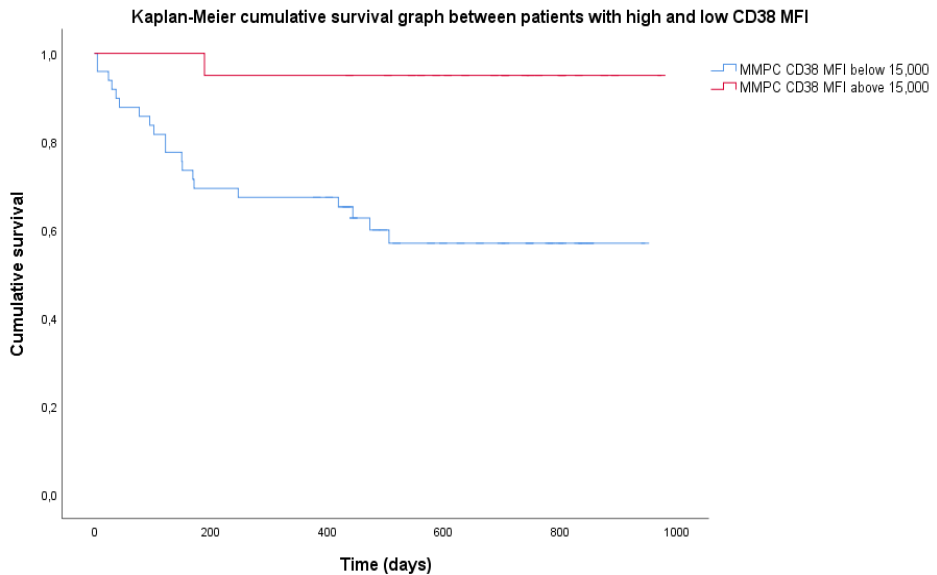
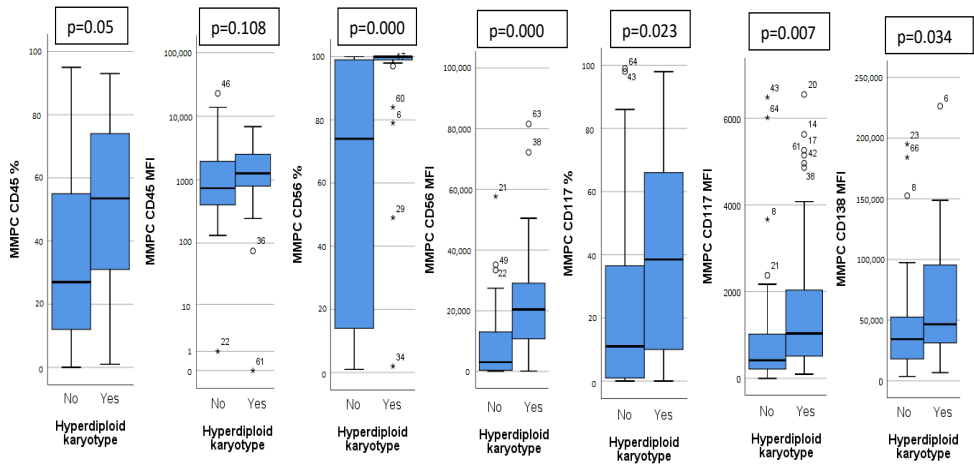


Figure 3. Survival differences in patients with CD38 MFI above and below 15 000. MFI – mean fluorescence intensity. MMPC – BM malignant PCs.

Patients were divided according to chromosomal aberrancies or translocations detected. 30 patients (41%) had HK, associated with standard risk. They had higher expression of CD45, CD56, CD117, CD138 on PCs, as well as higher malignant PC percentage, especially in non-isolated HK.

Figure 4. Malignant PC immunophenotype comparison between patients with hyperdiploid and non hyperdiploid MMPC karyotype



MMPC – bone marrow malignant PCs. MFI – mean fluorescence intensity.

Chromosomal aberrancies commonly acknowledged as high-risk are 1q duplication, 17p deletion, translocations t(4;14), t(14;16).

16 patients (22%) had 1q duplication. Patients with 1q duplication had malignant PC with lower CD27, CD117 expression, as well as higher aberrant/normal PC ratio (table 6). In general, lower CD27 expression (figure 5) and lower CD117 (figure 7) expression was related to higher risk factors.

8 patients had 1q duplication in addition to HK. When compared to isolated 1q duplication, patients with combination HK and 1q had higher CD117 expression.

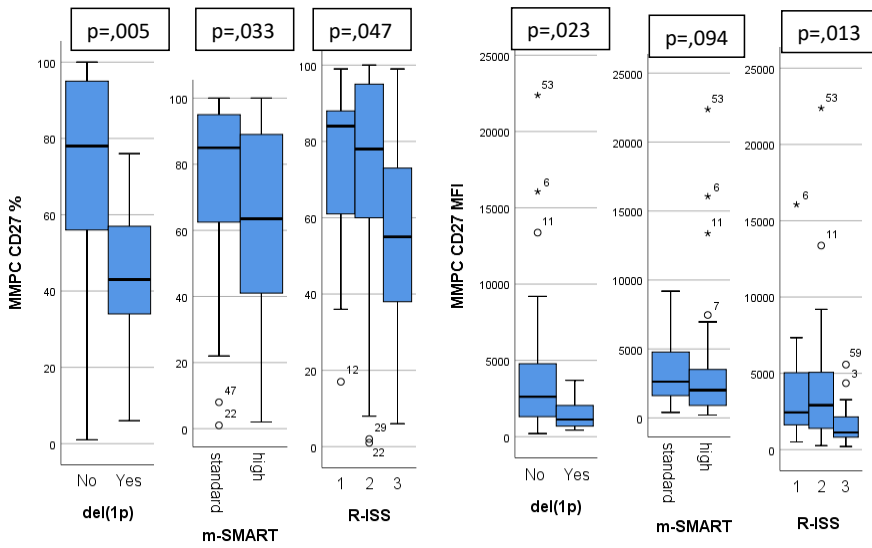


Figure 5. CD27 expression comparison between 1p deletion and different categories of m-SMART and R-ISS.

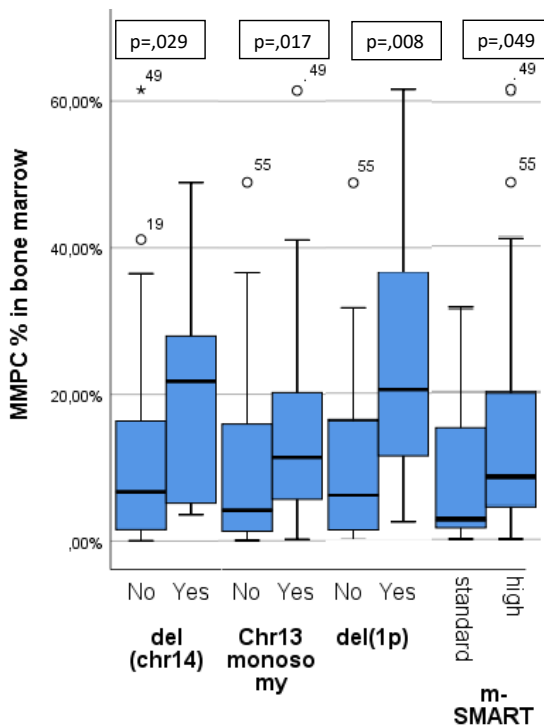


Figure 6. Malignant PC (MMPC) percentage in bone marrow comparison between chr14 deletion, chr13 deletion, 1p deletion and m-SMART categories.

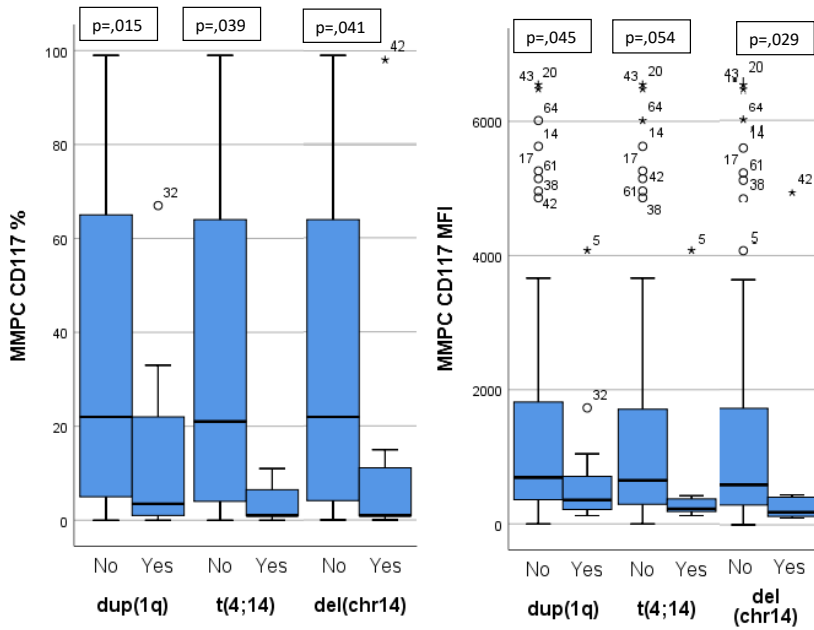


Figure 7. CD117 expression comparison between 1q duplication, t (4;14), and chr14 deletion. MMPC – malignant BM PCs.

Table 6. Comparison of immunophenotype, cell populations and laboratory assays between different chromosome aberrancies.

	HK (non-isolated) 20 (27%)	HK (isolated)10 (14%)	1q duplication 16 (22%)	No 1q duplication 57 (78%)	t(4;14) 7 (10%)	t(4;14) not detected 66 (90%)	Chr14 deletion 8 (11%)	No chr14 deletion 65 (89%)	1p deletion 9 (12%)	1p deletion not detected 64 (88%)
CD27 %	64	82	62	77	56	77	69,5	74	43*↓	78*↑
CD27 MFI	1313	2523	1118*↓	2532*↑	1123	2442	2624	2323	1123*↓	2619*↑
CD38 MFI	11146	13033	10679	12594	12006	11848	10726	12006	10965	11945
CD45 %	48,5	62,5	32	42	30	41	31,5	41,5	42	40,5
CD45 MFI	1162	1524	1089	900	1089	908	865	919	916	911
CD56 %	100	100	100	98	100	97	95	99	100	97,5
CD56 MFI	19210	21590	11271	9452	11645	8885	6634	11314	11271	9966
CD117 %	31	61	2*↓	20*↑	1*↓	21*↑	1*↓	19*↑	4	21
CD117 MFI	929	1494	326*↓	657*↑	225	649	215*↓	632*↑	408	649
CD138 MFI	45732	47978	39489	38436	31296	39003	34173	39321	37720	39338
Malignant PC% BM	16,7*↑	4,1*↓	7,3	8,4	6,1	7,0	21,8*↑	7,2*↓	20,5*↑	6,0*↓
Normal PC% BM	0,026*↓	0,068*↑	0,013*↓	0,033*	0,012*↓	0,033*↑	0,012	0,031	0,012*↓	0,035*↑
Malignant/normal PC ratio	538,2*↑	71,3*↓	566,3*↑	168,5*	317,0	189,0	1145,7*	168,5*	1938,6*↑	157,7*↓
CD56+ T/NK cell%	29,9*↑	21,4*↓	25,3	24,6	26,3	24,6	26,8	24,5	32,9*↑	24,3*↓
CD27+ T cell%	40*↓	47*↑	41	44	41,3	43,9	43,7	43,8	41,3	44,1
B lymphocyte %.	6,8	11,7	6,8	9,4	11,4	8,6	4,7*↓	9,4*↑	5,6	9,1
Beta-2-microglobulin (mg/l)	6,4*↑	3,3*↓	5,8	4,5	5,7	4,7	7,4	4,9	14,3*↑	4,1*↓
Hemoglobin (g/L)	97,5*↓	123*↑	96,5*↓	115*↑	97*↓	113*↑	100,5	110	98*↓	113*↑

HK- hyperdiploid karyotype. MFI – mean fluorescence intensity. BM – bone marrow. Arrows indicated decrease or increase, statistically significant findings highlighted and marked with*

Table 7. Comparison of immunophenotype, cell populations and laboratory assays between different MM staging and risk scoring systems

	m-SMART high risk 35 (48%)	m-SMART standard risk 38 (52%)	R-ISS stage			ISS stage		
			1 10 (14%)	2 42 (58%)	3 19 (26%)	1 25 (34%)	2 16 (22%)	3 30 (41%)
CD27 %	64* ↓	85* ↑	86* ↑	78* ↑	55,00* ↓	74* ↑	94* ↑	57* ↓
CD27 MFI	2017	2626	2442* ↑	2813* ↑	1103* ↓	2531* ↑	3897* ↑	1373* ↓
CD38 MFI	11667	11884	14560* ↑	12783* ↑↓	10238* ↓	14895* ↑	12440* ↓↑	10106* ↓
CD45 %	34	44	36	44	37	36	38	45
CD45 MFI	919	900	794	1129	919	871	972	1006
CD56 %	98,5	98	99	97	99,5	99	93	99
CD56 MFI	10097	11691	15159	6622	11050	11691	9903	9017
CD117 %	13	32	41	6	22	23	4	18
CD117 MFI	451	781	1111	411	691	693	291	613
CD138 MFI	37536	41261	36217* ↑	41261* ↓↑	27662* ↓	40490	38792	32820
Malignant PC% BM	8,4* ↑	2,5* ↓	3,5* ↓	6,8* ↑	14,4* ↑	3,5* ↓	2,6* ↓	16,7* ↑
Normal PC% BM	0,022* ↓	0,044* ↑	0,041* ↑	0,034* ↓↑	0,013* ↓	0,042	0,032	0,022
Malignant/normal PC ratio	317* ↑	88,1* ↓	42* ↓	169* ↑	501* ↑	65,7* ↓	140,6* ↓	435,2* ↑
CD56+ T/NK cell%	26* ↑	23,5* ↓	28,8	24	30	25,9	22,9	28,0
B lymphocyte %.	6,7	9,7	13,8* ↑	9,4* ↓↑	5,5* ↓	9,9	7,4	5,9
Beta-2-microglobulin (mg/l)	5,8	3,7						
Hemoglobin (g/L)	99,5* ↓	116* ↑	119,5* ↑	113* ↓↑	94* ↓	124* ↑	118* ↓↑	97* ↓
Albumin (g/L)	40,1	39,7						

HK- hyperdiploid karyotype. MFI – mean fluorescence intensity. BM – bone marrow. Arrows indicated decrease or increase, statistically significant findings highlighted and marked with *

Translocation t(4;14) was detected in 7 patients (10 %), they had lower CD117 expression, as well as lower normal PC percentage (table 6). 17p deletion was detected in 9 patients, however had no statistically significant relationship to immunophenotype. Translocations t(14;16) and t(14;20) were both detected in 1 patient each, insufficient for statistical analysis.

Other chromosomal aberrancies described in literature as higher risk include chromosome 14 monosomy or deletion of 14q, as well as chromosome 13 monosomy and 1p deletion.

14q deletion or chr14 monosomy was detected in 8 patients (11%) and was related to dim CD117 expression and higher malignant PC percentage (table 6). In general, higher percentage of malignant PCs was related to higher risk (figure 6).

23 patients (32%) had chromosome 13 monosomy. They had higher malignant PC percentage and MMPC/normal PC ratio (figure 5). 1p deletion was related to lower CD27 expression, higher MMPC and lower normal PC percentage (table 6).

Risk assessment methods such as ISS, R-ISS and m-SMART also were related to immunophenotype, showing lower CD27, CD38, CD138 expression, higher malignant PC percentage and lower normal PC percentage (table 7).

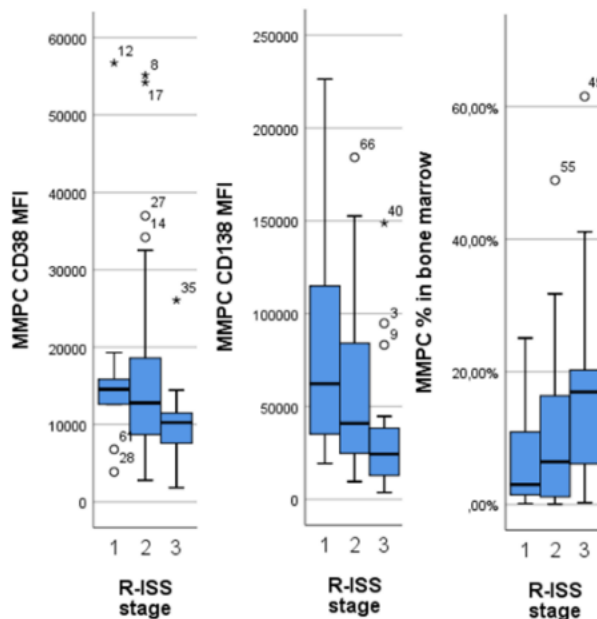


Figure 8. CD38 and CD138 MFI, malignant PC percentage in different R-ISS categories

3.3. Multiple myeloma minimal residual disease analysis strategy harmonization

During the first stage, 8 patient data files, collected after BM sample preparation, were analyzed individually in separate centers. Participants were asked to determine whether the samples were MRD positive or negative, as well as to calculate the MRD percentage, along with additional populations related to BM aspirate quality.

At VUL SK, we have long used and adopted steps to first gate singlet cells, living cells, as well as general, wide gates for primary isolation of PCs, such as a triangular gate on CD45-dim and CD38+bright cells, as well as plots with parameters SSC/CD38 and SSC/CD138. This increases the preliminary population to be checked for presence of malignant PCs.

After the first stage, an online meeting has held, during which sources of variance were discussed, and solutions proposed. These were included in the final gating strategy.

A four-stage strategy was decided for determining total cells analyzed:

- 1) Gating of a continuously acquired sample on FSC-A vs Time plot, where cell aggregates and air bubbles would be excluded.
- 2) Gate singlet cells on a plot of FSC-A and FSC-H.
- 3) A polygonal gate on a plot of FSC-A and SSC-A, to gate living cells.
- 4) The final population would be gated on a plot of SSC-A and CD45, to include both CD45+ and CD45- events.

All cells falling in the final region would be labeled “Total analyzed cells”.

Plasma cells are gated on a plot of CD38 vs CD138, CD38 vs CD45, CD138 vs CD45, however due to plasma cells being larger and having different FSC characteristics, singlet cells gating is modified and drawn more broadly to include all PCs.

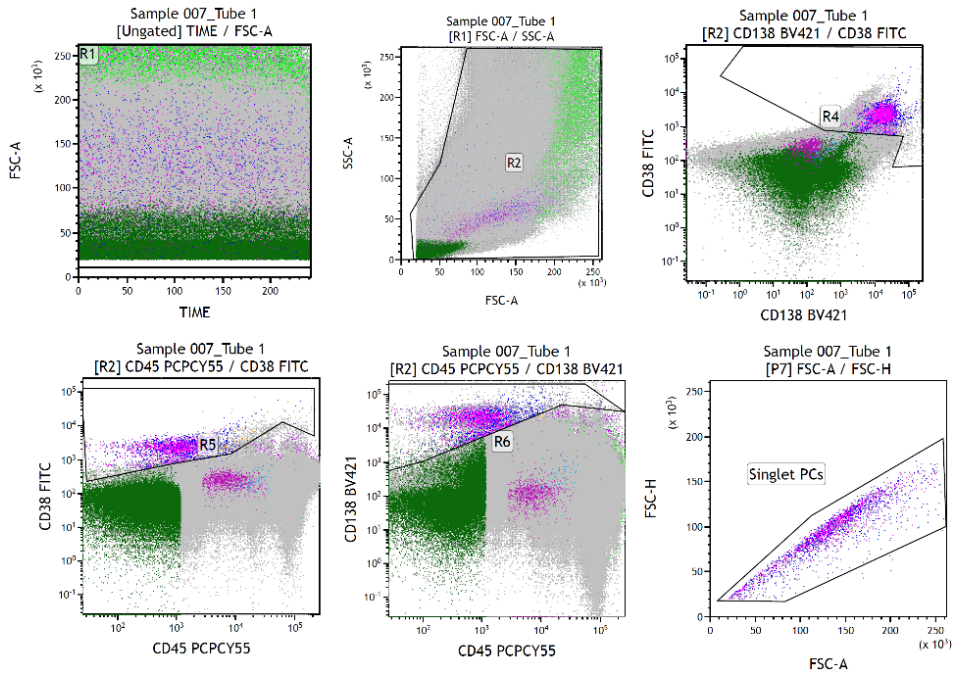


Figure 9. Gating strategy for total plasma cells (PCs).

The hardest part of the MM-MRD analysis is differentiation of normal and aberrant PCs. A large combination of gates is needed, and there is no single immunophenotype that determines malignancy. A carefully considered gating strategy, that is followed closely, could allow for more repeatable results. A combination of these gates is used in the first tube: CD38 and CD117, CD45 and CD38, CD45 and CD27, CD81 and CD27, and all subpopulations in the combination of CD19 and CD56 are looked through for suspicious aberrant populations. The same steps are repeated in the second tube, with the combinations: CD45 and CD38, CD45 and CD27, cKappa and cLambda.

Normal PCs usually have the phenotype CD19+, CD56-, CD45+, CD38+bright, CD117-, CD81+, CD27+ and polyclonal light chain expression, however more heterogenous expression of CD19, CD56, CD45 and CD81 has to be allowed. All cell populations that deviate from this have to be examined carefully.

The gating strategy described below is generalized, with some changes due to differences in phenotype for each patient.

- 1) A scatter plot is created with CD56 and CD19. All cells from previously gated all PCs are put on the plot. A region is drawn to include likely aberrant PCs (not CD56-, CD19+ cells)

- 2) Out of the previous gate, on a plot of CD38 and CD45 cells are selected to include CD38 and CD45 dim aberrant PCs.
- 3) The next gate is drawn on a plot of CD45 and CD117, to include CD45-, CD117+ events.
- 4) The final gate is drawn to include CD81 and CD27 dim events. These cells are highlighted and labeled MRD.

Some modifications are needed for tube 2, due to the lack of CD81 and CD117, so cells gated with a suspect phenotype are checked for light chain clonality. Cells with clonal light chain expression are labeled MRD.

After this gating strategy was adopted, files from the first stage were reanalyzed, in the second stage. After this, particular attention was paid to differences in populations used to determine BM sample quality.

Third stage was the final one, and included analyzing FCS files from 10 more patients, which weren't analyzed previously, using the new consensus strategy. In the third stage, agreement about MRD status was 81,8% ($\pm 11,6\%$), which was similar to both stage one ($83,8\% \pm 15,0\%$) and stage two ($85,3\% \pm 13,7\%$).

Our results for determining LOD and MRD were close to the group average in the third stage (tables 8, 9), less than 2 SD from the average.

Table 8. LOD results for VUL SH and group average, as well as CV, in the third stage of the trial

Sample	LOD (VUL SH)	LOD vidurkis (SD)	CV, %
MRD+			
001	0,00026	$0,00026 \pm 0,00002$	8,33
003	0,00023	$0,00023 \pm 0,00001$	3,37
006	0,00022	$0,00022 \pm 0,00001$	3,56
007	0,00024	$0,00023 \pm 0,00001$	4,58
010	0,00027	$0,00027 \pm 0,00001$	4,57
MRD-			
002	0,00024	$0,00023 \pm 0,00001$	6,09
004	0,00032	$0,00029 \pm 0,00002$	7,69
005	0,00023	$0,00023 \pm 0$	1,92
008	0,00025	$0,00025 \pm 0,00002$	8,82
009	0,00024	$0,00024 \pm 0,00001$	2,62

Table 9. MRD results for VUL SH and group average, as well as CV, in the third stage of the trial

Sample	MRD, % (VUL SH)	MRD, % (average+SD)	CV, %
MRD+			
001	0,0007	0,0013 ± 0,00072	55,7
003	0,001	0,00196 ± 0,00109	55,78
006	0,0017	0,00203 ± 0,0007	34,8
007	0,0018	0,00239 ± 0,00073	30,66
010	0,0008	0,00086 ± 0,00045	52,69
MRD-			
002	0,0001	0,00004 ± 0,00009	236,02
004	0,0001	0,00485 ± 0,01268	261,35
005	0,0005	0,00023 ± 0,00048	211,23
008	0,0002	0,00007 ± 0,00012	173,89
009	0,0002	0,00253 ± 0,00628	248,83

Other populations than MRD were also checked for increased repeatability. With the consensus analysis method, there was decreased variation in total cells analyzed in the second and third stage. Total cells analyzed is very important, especially in negative MRD determination, as it determines the level of detection of an MRD assay.

The consensus strategy significantly decreased variation in mastocyte and hematogone percentage between the first the final two stages ($p < 0,001$). This applied to both MRD positive and negative samples.

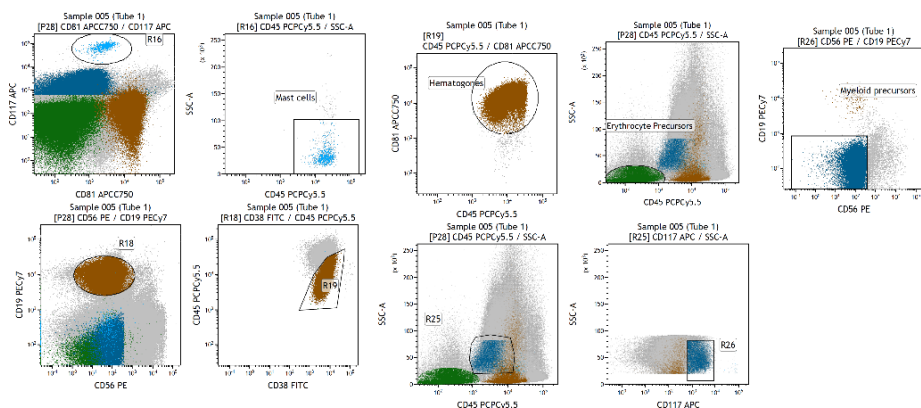


Figure 10. Gating strategy for mastocytes, hematogones, myeloid and erythroid precursors.

ROC analysis was performed to determine which populations, and at what cut-offs, were best used to determine BM sample quality. The best criterium was decided to be 0,0015% or more mastocytes detected in the sample ($p < 0,001$). If there are less than 0,0015% mastocytes detected, at least one other population should be checked. If it was below the cut-off as well, sample should be considered unreliable for MRD detection, and this should be noted in the final laboratory report.

The second most reliable population was determined to be hematogones, with a cut-off value of more than 0,025% ($p < 0,001$). Myeloid precursors detected more than 0,146% could also be used to determine sample quality. The least useful population was determined to be erythroid precursors, with a cut-off value of 0,754%. After adoption of these criteria for sample quality, agreement between participants as to sample quality being good enough to determine MRD rose from 72,4% to 97,1%.

4. DISCUSSION

4.1. Impact of adhesion immunophenotype on circulating plasma cell detection

Patients who are resistant to previous treatment are a good target for clinical studies. This group of patients had a worse prognosis, due to a detectable MRD clone in the BM. However, even then they had distinct differences in BM malignant PC immunophenotype, depending on whether CPCs were detectable. And it was also clear that CPC immunophenotype itself is distinct – with lower expression of adhesion molecules. Some of these differences, such as decreased CD38 expression, have been associated with worse prognosis (31). Some authors have also found contradictory results, such as increased CD49d expression (32). It has also been noted that some treatment, such as immunomodulators, decreases CD49d expression, which decreases adherence to BM stroma (33).

While CD49d decrease in CPCs has been described (34), the difference that can be detected already in the bone marrow is a novel finding, along with the gradual decrease of some adhesion markers in specific PC populations. Similar changes, which we saw in CD56, have also been described (34), as well as changes in CD58 expression (35). Paiva et al. (36) described chemotherapy resistant MRD clones, which have increased expression of CD11a, CD49d, CD49e and CD44. We saw increased expression of CD49e for example, when compared to healthy donor PCs, however in general this shows the dual function of adhesion molecules – increased expression may

increase resistance to treatment, while decreased expression encourages disease spread (34).

In summary, we found statistically significant decrease in adhesion molecules - CD49d, CD49e, CD56 and CD138, as well as a decreasing tendency of CD38, CD58, CD18 and CD168, when comparing the BM malignant PCs of CPC- and CPC+ MM patients. A further decrease was seen in CPCs themselves. This shows that changes in adhesion immunophenotype are present before the CPCs enter the PB and are likely necessary to exit the BM environment. We also noted that expression of CD49d and CD49e didn't differ significantly between CPC- patient BM PCs and healthy donor PCs, meaning these patients have malignant PCs that are closer to normal PCs, and are less likely to disseminate. CPCs had even lower expression of CD49d, CD49e, CD56, CD138, CD58 than BM malignant PCs, showing the loss of adhesion molecules is continuous and is directed towards extramedullary spread. All these changes can be used for identifying patients with higher risk of progression as well as to potentially direct therapy that influences adhesion molecule expression.

4.2. Malignant plasma cell immunophenotype is related to chromosomal aberrancies used in risk assessment

Chromosomal aberrancies are important in determining MM disease stage and prognosis, and methods such as molecular karyotyping vis SNP arrays allow for precise and thorough examination of these changes. However, when a combination of different risk aberrancies is detected, clear prognosis may be difficult, and it is possible for MMPC immunophenotype to provide additional data for categorization.

We found specific, statistically significant differences in malignant PC immunophenotype, which were related to different high-risk chromosomal aberrancies. In general, downregulation of CD27, CD38, CD45, CD56, CD117 and CD138 expression was related to high-risk aberrancies, as well as higher ratio between malignant/normal PCs in MM patient BM. Other authors have noted different immunophenotypes being found in different genetic aberrancies, however a clear link to risk hasn't always been established, also made more difficult by differences in markers being tested. Arana et al. (31) described CD19+, CD27-, CD38+dim, CD45+, CD81+, CD117- and CD138+dim as a combination of markers with worse prognosis, particularly a combination of three markers – CD38+dim, CD81+, CD117-. We also CD38 downregulation associated with shorter overall survival. While we didn't find differences in CD81 expression between different chromosomal aberrancies,

low expression of CD27, CD117 and CD138 was related to high-risk aberrancies in our study. CD27 dim expression has been associated with RRMM patients (37), as well as progressive disease (35), and we found low CD27 expression in 1q duplication and 1p deletion, as well as higher risk categories of ISS, R-ISS and m-SMART. Nijhof et al. (38) wrote about importance of CD38 expression when daratumumab treatment is considered, however few of our selected patients received daratumumab, yet CD38 expression was related to survival in those that didn't. While CD38 expression hasn't conclusively been shown as an independent risk factor, dim CD38 has been linked to worse prognosis (28). We found decreased CD45 expression in some high-risk categories - Gonsalves et al (39) had associated CD45 to worse prognosis previously, however CD45 expression remains unclear in association to risk, in different studies.

Patients with standard-risk associated hyperdiploid karyotype had a distinct immunophenotype – markedly increased CD56, as well as higher CD45, CD117 and CD138 ekspresija expression. Isolated HK also showed lower malignant/normal PC ratio, which we found correlated with lower risk. In general, HK can ameliorate high-risk aberrancies, however isolated HK appears to have a better prognosis. Lower CD56 expression, for example, has been linked to worse effectiveness of proteasome inhibitors, such as bortezomib (40).

MM patients often have lower normal PC counts at diagnosis, which is related to competition for the BM stroma (41). Larger percentages of malignant PCs are also related to progression from SMM to MM (25). We found that high risk aberrancies had higher malignant/normal PC ratio, specifically 14q deletion/chr14 monosomy, chr13 monosomy, 1p deletion, 1q duplication, t(4;14) and non-isolated HK (especially compared to isolated HK). The malignant/normal PC ratio, as well as some immunophenotype differences, were seen in the risk estimation methods themselves, including ISS, R-ISS and m-SMART. To sum up, specific immunophenotypic features can be linked to high-risk genetic aberrancies, and higher risk categories in MM patients at diagnosis. These features are shared among some high-risk categories, and a profile of immunophenotype features could provide additional data in determining prognosis.

4.3. Harmonization of minimal residual disease gating strategy

MM MRD monitoring is recommended by the IMWG, because it allows better patient stratification and monitoring during treatment. MRD can be more accurate than traditional MM monitoring methods, such as

electrophoresis, free light chain assays or BM aspirate microscopy (41). Clinical trials have shown the usefulness of MM MRD results in predicting patient overall survival and time to progression (3). MM MRD based on flow cytometry has wide applicability, in more than 95% of patients, and allows for quick differentiation between normal and aberrant PCs (23). It also allows determination of BM quality, which is useful when a sample may be diluted by PB, and an MRD negative result may not be reliable.

Harmonization of analysis strategy, especially cell population gating, that is independent of fluorochromes used, or instrumentation, allows different investigators to achieve similar results, both in MRD and in assessing BM aspirate sample quality (42). Importantly, it also highlights that CD38 reduction hinders standard gating, as CD38 expression is reduced up to six months after therapy (43). Information about daratumumab use should be provided along with an MRD assay order (44). Another possible solution is use of CD38 independent reagents or alternative gating strategies (such as CD138/CD45). There are also antibodies being developed that are not affected by daratumumab (CD229, CD319 and VS38c).

MRD percentage can be underestimated due to BM aspirate dilution by peripheral blood (45,46). Due to this dilution, as well as other problems, such as viability and adhesion properties of PCs, the number of malignant PCs is consistently lower than in the trephine biopsy, or even morphological evaluation of the aspirate (47). Quality criteria such as mastocytes, hematogones, myeloid and erythroid precursors are very important in determining whether a sample is representative of the bone marrow, and there should be further studies in determining cut-offs for these populations. The only other study that tries to provide these cut-off is a study by the Euroflow group (17). A larger study might provide more reliable cut-offs to use universally.

To sum up, the gating strategy harmonization for FC MM MRD assays provides more consistent results of the MRD itself, and better evaluation of the BM aspirate sample, which is very important when considering the reliability and comparability of results.

5. CONCLUSIONS

1. Decreased expression of adhesion molecules CD49d, CD49e, CD56, CD38 and CD138 on MM patient BM MMPCs determines PB CPC formation. This can be used in practice to predict MM progression associated with increased CPC detection.

2. MM patient MMPC CD38 expression less than 15,000 by MFI in the FITC channel (when Euroflow guidelines are followed) is related to higher ISS and R-ISS stage and shorter survival, independent of chromosomal aberrancies. Lower expression of CD27, CD56, CD117 and CD138 expression is related to higher BM malignant PC percentage and lower normal PC percentage, as well as related to higher risk chromosomal aberrancies, such as 1q gain, t(4;14), chr14 deletion, 1p deletion.
3. Using a harmonized MM MRD data analysis algorithm, the agreement between different experts when determining level of detection, level of quantification and BM aspirate criteria is increased up to 97,1%.
4. Mastocyte percentage above 0,0015%, B cell precursor percentage above 0,025% and myeloid precursor percentage above 0,146% are the best criteria in determining BM aspirate quality for MRD analysis.

6. SOURCES

1. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, Van Duin M, Sonneveld P, Mateos MV, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2017;3:1–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.46>
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer* [Internet]. 2018;103:356–87. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.07.005>
3. Roussel M, Lauwers-Cances V, Robillard N, Hulin C, Leleu X, Benboubker L, et al. Front-Line Transplantation Program With Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone Combination As Induction and Consolidation Followed by Lenalidomide Maintenance in Patients With Multiple Myeloma: A Phase II Study by the Intergroupe Francophone du Myélo. *J Clin Oncol* [Internet]. 2014 Sep 1;32(25):2712–7. Available from: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2013.54.8164>
4. Krishnan A, Vij R, Keller J, Dhakal B, Hari P. Moving Beyond Autologous Transplantation in Multiple Myeloma: Consolidation, Maintenance, Allogeneic Transplant, and Immune Therapy. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2016;(36):210–21.
5. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2020;95(5):548–67.
6. Rajkumar SV, Kumar S. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2016;91(1):101–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.11.007>

7. Gertz MA, Buadi FK. Utility of immunophenotyping of plasma cells in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(2):252–3.
8. Guo J, Su J, He Q, Li X, Zhao Y, Gu S, et al. The prognostic impact of multiparameter flow cytometry immunophenotyping and cytogenetic aberrancies in patients with multiple myeloma. *Hematology*. 2016;21(3):152–61.
9. Mateo G, Castellanos M, Rasillo A, Gutiérrez NC, Montalbán MA, Martín ML, et al. Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2005;11(10):3661–7.
10. Kalina T, Flores-Montero J, Van Der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26(9):1986–2010.
11. Klimienė I, Radzevičius M, Matuzevičienė R, Sinkevič-Belliot K, Kučinskienė ZA, Pečeliūnas V. Adhesion molecule immunophenotype of bone marrow multiple myeloma plasma cells impacts the presence of malignant circulating plasma cells in peripheral blood. *Int J Lab Hematol* [Internet]. 2021 Jun 1;43(3):403–8. Available from: <https://doi.org/10.1111/ijlh.13387>
12. Gundesen MT, Lund T, Moeller HEH, Abildgaard N. Plasma Cell Leukemia: Definition, Presentation, and Treatment. *Curr Oncol Rep*. 2019;21(1).
13. Kraj M, Kopeć-Szlezak J, Poglód R, Kruk B. Flow cytometric immunophenotypic characteristics of plasma cell leukemia. *Folia Histochem Cytobiol*. 2011;49(1):168–82.
14. Bae MH, Park CJ, Kim BH, Cho YU, Jang S, Lee DH, et al. Increased circulating plasma cells detected by flow cytometry predicts poor prognosis in patients with plasma cell myeloma. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2018;94(3):493–9.
15. Peceliunas V, Janiulioniene A, Matuzeviciene R, Zvirblis T, Griskevicius L. Circulating plasma cells predict the outcome of relapsed or refractory multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2012 Apr;53(4):641–7.
16. Cheng Q, Cai L, Zhang Y, Chen L, Hu Y, Sun C. Circulating Plasma Cells as a Biomarker to Predict Newly Diagnosed Multiple Myeloma Prognosis: Developing Nomogram Prognostic Models. *Front Oncol* [Internet]. 2021 Mar 5;11(March):1–13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.639528/full>
17. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, Puig N, García-Sánchez O, Böttcher S, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*. 2017;31(10):2094–103.
18. Lahuerta JJ, Paiva B, Vidriales MB, Cerdón L, Cedena MT, Puig N, et al. Depth of response in multiple myeloma: A pooled analysis of three

- PETHEMA/GEM clinical trials. *J Clin Oncol*. 2017;35(25):2900–10.
19. Bruinink DH op, Oliva S, Rihova L, Schmitz A, Gilestro M, te Marvelde J, et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease assessment in international clinical trials. A feasibility study from the European Myeloma Network. Vol. 106, *Haematologica*. 2021. p. 1496–9.
 20. Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on the use of minimal residual disease as a clinical endpoint in multiple myeloma studies. *Eur Med Agency*. 2018;26(28):1–18.
 21. Perrot A, Lauwers-Cances V, Corre J, Robillard N, Hulin C, Chretien M-L, et al. Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* [Internet]. 2018 Dec 6;132(23):2456–64. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/132/23/2456/40023/Minimal-residual-disease-negativity-using-deep>
 22. Soh KT, Came N, Otteson GE, Jevremovic D, Shi M, Olteanu H, et al. Evaluation of multiple myeloma measurable residual disease by high sensitivity flow cytometry: An international harmonized approach for data analysis. *Cytom Part B Clin Cytom* [Internet]. 2022 Mar 10;102(2):88–106. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.22053>
 23. Maclachlan KH, Came N, Diamond B, Roshal M, Ho C, Thoren K, et al. Minimal residual disease in multiple myeloma: defining the role of next generation sequencing and flow cytometry in routine diagnostic use. *Pathology* [Internet]. 2021 Apr;53(3):385–99. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031302521000568>
 24. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, Van Der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908–75.
 25. Rawstron AC, Smith A, de Tute RM, Painter D, Roman E, Owen RG. Validation of Plasma Cell Immunophenotype As a Biomarker to Identify High-Risk Smoldering Myeloma. *Blood*. 2016;128(22):4451–4451.
 26. Desgrosellier JS, Cheresch DA. Integrins in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2010;10(1):9–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2748>
 27. Mellors PW, Binder M, Ketterling RP, Greipp PT, Baughn LB, Peterson JF, et al. Metaphase cytogenetics and plasma cell proliferation index for risk stratification in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Adv*. 2020;4(10):2236–44.
 28. Mikhael JR, Dingli D, Roy V, Reeder CB, Buadi FK, Hayman SR, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: Updated mayo stratification of myeloma and risk-adapted therapy

- (msmart) consensus guidelines 2013. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2013;88(4):360–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.01.019>
29. Uxa S, Castillo-Binder P, Kohler R, Stangner K, Müller GA, Engeland K. Ki-67 gene expression. *Cell Death Differ*. 2021;28(12):3357–70.
 30. Cherian S, Hedley BD, Keeney M. Common flow cytometry pitfalls in diagnostic hematopathology. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2019;96(6):449–63.
 31. Arana P, Paiva B, Cedena MT, Puig N, Cordon L, Vidriales MB, et al. Prognostic value of antigen expression in multiple myeloma: A PETHEMA/GEM study on 1265 patients enrolled in four consecutive clinical trials. *Leukemia* [Internet]. 2018;32(4):971–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2017.320>
 32. Waldschmidt JM, Simon A, Wider D, Müller SJ, Follo M, Ihorst G, et al. CXCL12 and CXCR7 are relevant targets to reverse cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2017;179(1):36–49.
 33. Bolzoni M, Storti P, Bonomini S, Todoerti K, Guasco D, Toscani D, et al. Immunomodulatory drugs lenalidomide and pomalidomide inhibit multiple myeloma-induced osteoclast formation and the RANKL/OPG ratio in the myeloma microenvironment targeting the expression of adhesion molecules. *Exp Hematol* [Internet]. 2013;41(4):387–397.e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2012.11.005>
 34. Paiva B, Paino T, Sayagues JM, Garayoa M, San-Segundo L, Martín M, et al. Detailed characterization of multiple myeloma circulating tumor cells shows unique phenotypic, cytogenetic, functional, and circadian distribution profile. *Blood*. 2013;122(22):3591–8.
 35. Pojero F, Casuccio A, Parrino MF, Cardinale G, Colonna Romano G, Caruso C, et al. Old and new immunophenotypic markers in multiple myeloma for discrimination of responding and relapsing patients: The importance of “normal” residual plasma cell analysis. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2015;88(3):165–82.
 36. Paiva B, Corchete LA, Vidriales M-B, Puig N, Maiso P, Rodriguez I, et al. Phenotypic and genomic analysis of multiple myeloma minimal residual disease tumor cells: a new model to understand chemoresistance. *Blood* [Internet]. 2016 Apr 14;127(15):1896–906. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/127/15/1896/34829/Phenotypic-and-genomic-analysis-of-multiple>
 37. Tarín F, López-Castaño F, García-Hernández C, Beneit P, Sarmiento H, Manresa P, et al. Multiparameter flow cytometry identification of neoplastic subclones: A new biomarker in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Acta Haematol*. 2019;141(1):1–6.

38. Nijhof IS, Casneuf T, Van Velzen J, Van Kessel B, Axel AE, Syed K, et al. CD38 expression and complement inhibitors affect response and resistance to daratumumab therapy in myeloma. *Blood*. 2016;128(7):959–70.
39. Gonsalves WI, Timm MM, Rajkumar SVV, Morice WG, Dispenzieri A, Buadi FK, et al. The prognostic significance of CD45 expression by clonal bone marrow plasma cells in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Leuk Res* [Internet]. 2016/03/10. 2016 May;44(3):32–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26994849>
40. Yoshida T, Ri M, Kinoshita S, Narita T, Totani H, Ashour R, et al. Low expression of neural cell adhesion molecule, CD56, is associated with low efficacy of bortezomib plus dexamethasone therapy in multiple myeloma. *PLoS One*. 2018;13(5):1–14.
41. Paiva B, Pérez-Andrés M, Vídriales M-B, Almeida J, de las Heras N, Mateos M-V, et al. Competition between clonal plasma cells and normal cells for potentially overlapping bone marrow niches is associated with a progressively altered cellular distribution in MGUS vs myeloma. *Leukemia* [Internet]. 2011;25(4):697–706. Available from: <https://doi.org/10.1038/leu.2010.320>
42. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* [Internet]. 2016 Aug;17(8):e328–46. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30206-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30206-6)
43. Courville EL, Yohe S, Shivers P, Linden MA. VS38 Identifies Myeloma Cells with Dim CD38 Expression and Plasma Cells Following Daratumumab Therapy, Which Interferes with CD38 Detection for 4 to 6 Months. *Am J Clin Pathol*. 2020;153(2):221–8.
44. Sommer U, Eck S, Marszalek L, Stewart JJ, Bradford J, McCloskey TW, et al. High-sensitivity flow cytometric assays: Considerations for design control and analytical validation for identification of Rare events. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2021;100(1):42–51.
45. Rawstron AC, Paiva B, Stetler-Stevenson M. Assessment of minimal residual disease in myeloma and the need for a consensus approach. *Cytom Part B Clin Cytom* [Internet]. 2016 Jan;90(1):21–5. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.21272>
46. Manasanch EE, Salem DA, Yuan CM, Tadgeja N, Bhutani M, Kwok M, et al. Flow cytometric sensitivity and characteristics of plasma cells in patients with multiple myeloma or its precursor disease: influence of biopsy site and anticoagulation method. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2015 May 4;56(5):1416–24. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10428194.2014.955020>
47. Al-Quran SZ, Yang L, Magill JM, Braylan RC, Douglas-Nikitin VK. Assessment of bone marrow plasma cell infiltrates in multiple

myeloma: the added value of CD138 immunohistochemistry. *Hum Pathol* [Internet]. 2007 Dec;38(12):1779–87. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>

7. THESIS APPROVAL

Study results were published in international scientific journals, as well as presented in national and international conferences.

Articles on the dissertation topic:

1. **Radzevičius M**, Dirsė V, Klimienė I, Matuzevičienė R, Kučinskienė ZA, Pečeliūnas V. Multiple Myeloma Immunophenotype Related to Chromosomal Abnormalities Used in Risk Assessment. *Diagnostics*. 2022; 12(9):2049. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12092049>. Citavimo rodiklis – 3,992.
2. Soh KT, Came N, Otteson GE, Jevremovic D, Shi M, Olteanu H, Natoni A, Lagoo A, Theakston E, Óskarsson JP, Gorniak M, Grigoriadis G, Arroz M, Fletcher M, Lin P, Ludwig P, Tembhare P, Matuzeviciene R, **Radzevicius M**, Kay S, Chen W, Cabrita C, Wallace PK. Evaluation of multiple myeloma measurable residual disease by high sensitivity flow cytometry: An international harmonized approach for data analysis. *Cytometry B Clin Cytom*. 2022 Mar;102(2):88-106. doi: 10.1002/cyto.b.22053. Epub 2022 Jan 10. Citavimo rodiklis – 3,248
3. Klimienė I, **Radzevičius M**, Matuzevičienė R, Sinkevič-Belliot K, Kučinskienė ZA, Pečeliūnas V. Adhesion molecule immunophenotype of bone marrow multiple myeloma plasma cells impacts the presence of malignant circulating plasma cells in peripheral blood. *Int J Lab Hematol*. 2021 Jun;43(3):403-408. doi: 10.1111/ijlh.13387. Epub 2020 Nov 13. Citavimo rodiklis – 3,450.

Articles partly related to the dissertation topic:

1. Matuzevičius B, Jonauskaitė G; Janulis V; Karčiauskaitė D, Stoškus M, **Radzevičius M**, Janiulionienė A, Matuzevičienė R. Ūminėmis mieloidinėmis leukemijomis sergančių pacientų blastų biožymenų raiškos ypatumai. *Laboratorinė medicina*. Vilnius : Lietuvos laboratorinės medicinos draugija. ISSN 1392-6470. 2021, t. 23, Nr. 4(90), p. 187-197.

2. Janeliūnienė M, Janiulionienė A, Barzinskienė, A, Taškūnaitė D, **Radzevičius M**, Montrimaitė M, Matuzevičienė R, Karčiauskaitė D. Applicability of flow cytometry for the diagnostics of myelodysplastic syndromes. *Laboratorinė medicina : Lietuvos laboratorinės medicinos draugija*. ISSN 1392-6470. 2018, t. 20, Nr. 3, p. 183-188.

Presentations:

1. **Radzevičius M**. Multiple myeloma immunophenotype related to genetic aberrancies used in risk stratification. XVI Baltic Congress In Laboratory Medicine. Talin, Estonia. September 22 – 24th, 2022.
2. **Radzevičius M**(presenter), Dirsė V, Klimienė I, Matuzevičienė R, Žvirblis T, Kučinskienė Z.A., Pečeliūnas V. Multiple myeloma immunophenotype related to chromosomal aberrancies used in risk stratification. XXXVth International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology. Bologna, Italy. September 7-10th, 2022.
3. **Radzevičius M**(presenter), Klimienė I, Matuzevičienė R, Kučinskienė Z. A., Pečeliūnas V. Presence of circulating plasma cells is related to adhesion molecule expression. 5th International Conference of Evolutionary Medicine. Vilnius, Lithuania August 24-27th 2022.
4. **Radzevičius M**. Minimalios liekamosios ligos tyrimai ir naujos kartos tėkmės citometrija. Online conference „Biomedicininė diagnostika 2022 m.: mokslas ir praktika. May 5th 2022.
5. **Radzevičius M**. Experience with MM MRD in our clinical laboratory: theory and practice. Cytognos, S.L. organized webinar. March 30th 2021.
6. **Radzevičius M**(presenter), Klimienė I, Pečeliūnas V, Matuzevičienė R, Kučinskienė Z. A. Adhezijos molekulių ekspresija mielominės ligos plazminėse ląstelėse. 12th Lithuanian junior scientist conference „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“, Kaunas, Lithuania. December 11th 2019. Awarded 1st place.
7. **Radzevičius M**. Tėkmės citometrijos vaidmuo hematologijos laboratorijoje. Scientifi-practical conference „Procesai iki tyrimų ir kiti aktualūs šiandieninės laboratorinės medicinos klausimai“. Vilnius, Lithuania. April 9th, 2019.
8. **Radzevičius M**.(presenter), Matuzevičienė R. Review of Lithuanian T Acute Lymphoblastic Leukemia Flow Cytometric Cases Registered on the NOPHO Database. 3th annual NOPHO conference. Vilnius, Lithuania. June 1-5th 2018.

Training:

1. 5-th International Cytometry Summer School. Organized by ESCCA. Valencia, Spain. July 3-7th 2017.

11. PADĖKA

Noriu padėkoti žmonėms, be kurių pagalbos ir paramos šio darbo nebūčiau galėjęs pabaigti.

Pirmiausia dėkoju savo darbo vadovei, gerb. prof. Zitai Aušrelei Kučinskienei, kuri mane skatino ir palaikė per visus doktorantūros studijų metus. Profesore, Jūsų patarimai, pastabos, kantrybė ir supratingumas buvo neįkainojami.

Ypatingai noriu padėkoti dr. Rėdai Matuzevičienei, kuri iškilus sunkumams rašant darbą visuomet ištiesdavo pagalbos ranką, įkvėpdavo ieškoti gerų minčių ir skatino tobulėti.

Taip pat noriu padėkoti savo darbo konsultantui dr. Valdui Pečeliūnui už visą indėlį, pagalbą ir patarimus, padėjusius man nuodugniau suprasti šio tyrimo sritį.

Dėkoju savo kolegoms iš VUL SK hematologijos ir bendrosios citologijos laboratorijos, kurie man visada padėdavo dalindamiesi savo žiniomis, patarimais ir idėjomis. Jūsų pagalba ir palaikymas šio darbo metu buvo nepaprastai vertingi.

Taip pat dėkoju kolegoms iš VU MF padėjusius man eiti šiuo mokslo keliu.

Dėkoju ir savo mylimai šeimai – žmonai Viktorijai ir sūnui Dovydui, kurie visada man suteikia jėgų, Mamai už gerus patarimus, Sesei už palaikymo žodžius ir amžiną atilsį Močiutei, kuri manimi visuomet tikėjo ir nė akimirkos neabejojo mano sėkme. Jų nuostabi parama ir geras žodis padėjo sunkiausiomis akimirkomis.

Dar kartą noriu padėkoti visiems buvusiems šalia, be Jūsų padrąsinimo šio kelio pabaigos nebūčiau galėjęs įsivaizduoti.

12. CURRICULUM VITAE

Asmeniniai duomenys:

Mantas Radzevičius

Gimimo data: 1989-08-17

Adresas: Rinktinės g. 38B – 43, Vilnius

E. paštas: mantas.radzevicius@mf.vu.lt

Tel. nr. +370 656 87976

Išsilavinimas

- 2008 – 2014 m. Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas (VU MF), medicinos magistro laipsnis, bei gydytojo kvalifikacija.
- 2014 – 2018 m. Laboratorinės medicinos rezidentūra, gydytojas rezidentas Vilniaus universitetinėje ligoninėje Santaros klinikose (VUL SK).
- 2017 – 2023 m. Doktorantūros studijos Vilniaus universitete.

Darbo patirtis

- 2015 – 2018 m. medicinos gydytojas VUL SK.
- 2018 – 2023 m. laboratorinės medicinos gydytojas Hematologijos ir bendrosios citologijos laboratorijoje, Laboratorinės medicinos centre, VULSK. Veiklos sritis – tėkmės citometrijos tyrimai.
- 2015 – 2023 m. jaunesnysis asistentas VU MF. Dėstymo sritis – žmogaus fiziologija, medicinos studentams lietuvių ir anglų k.

Narystė organizacijose

- Lietuvos laboratorinės medicinos draugija (LLMD), Europos klinikinės chemijos ir laboratorinės medicinos federacija (EFLM).

Konferencijos ir pranešimai

- 2016 m. Europos klinikinės ląstelių analizės draugijos (European Society of Clinical Cell Analysis - ESCCA) kasmetinė konferencija Edinburge, JK.
- 2016 m. Tarptautinės laboratorinės hematologijos draugijos (International Society for Laboratory Hematology – ISLH) konferencija Milane, Italijoje.
- 2017 m. ESCCA 5-toji tarptautinė vasaros mokykla, hematologijos kursas.
- 2018 m. ESCCA kasmetinė konferencija Valencijoje, Ispanijoje.
- 2018 m. 36-oji kasmetinė Šiaurės šalių pediatriinės hematologijos ir onkologijos (Nordic Society for Pediatric Hematology and Oncology – NOPHO) konferencija Vilniuje. Pranešimas: „Review of Lithuanian T Acute Lymphoblastic Leukemia Flow Cytometric Cases Registered on the NOPHO Database“.

- 2019 m. balandžio 9 d. Tėkmės citometrijos vaidmuo hematologijos laboratorijoje. Mokslinė – praktinė konferencija „Procesai iki tyrimų ir kiti aktualūs šiandieninės laboratorinės medicinos klausimai“.
- 2019 m. Jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis“, Lietuvos sveikatos mokslų universitete (LSMU), Kaunas.
- 2021 m. kovo 30 d. Pranešimas: „Experience with MM MRD in our clinical laboratory: theory and practice“. Cytognos, S.L. Internetinis seminaras.
- 2022 m. gegužės 5 d. Pranešimas „Minimalios liekamosios ligos tyrimai ir naujos kartos tėkmės citometrija“. Konferencija „Biomedicininė diagnostika 2022 m.: mokslas ir praktika.
- 2022 m. rugpjūčio 24-27 d. Pranešimas: „Presence of circulating plasma cells is related to adhesion molecule expression“. 5-toji Tarptautinė evoliucinės medicinos konferencija, Vilnius.
- 2022 m. rugsėjo 22 – 24 d. Pranešimas „Multiple myeloma immunophenotype related to genetic aberrancies used in risk stratification“. XVI Baltijos šalių laboratorinės medicinos kongresas. Talinas, Estija.

Mokslo projektai

- Šiaurės šalių pediatriinės hematoonkologijos projektas NOPHO, jungtinio ALLTogether projekto dalis.

Apdovanojimai

- Geriausias 2019 m. 12-osios jaunųjų mokslininkų konferencijos BIOATEITIS: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos pranešimas „Adhezijos molekulių raiška mielomine liga sergančių pacientų plazminėse ląstelėse“.

Domėjimosi sritys

- Klinikinė ląstelių analizė, tėkmės citometrijos taikymas hematoonkologinių ir kitų susirgimų diagnostikoje, gydymo sekime.

13. PRIEDAI

1 PRIEDAS. Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas atlikti biomedicininį tyrimą „Imunomoduliacinių vaistų poveikio mielomine liga sergančių pacientų imuninės kontrolės žymenų ekspresijai vertinimas“.



VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS
VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININIŲ TYRIMĄ

2018-10-02 Nr.158200-18/10-1070-570

Tyrimo pavadinimas:

Imunomoduliacinių vaistų poveikio mielomine liga sergančių pacientų imuninės kontrolės žymenų ekspresijai vertinimas

Protokolo Nr.: 2018-CHECK
Versija: V.2
Data: 2018 09 27

Informuoto asmens sutikimo forma: 2
2018 09 27

Pagrindinis tyrėjas: **Zita Aušrelė Kučinskienė**


Ištaigos pavadinimas: Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas
Biomedicinos mokslų institutas, Fiziologijos, biochemijos,
mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedra
Adresas: Santariškių g. 2, Vilnius

Leidimas galioja iki: **2023 10**

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 158200-2018/10), vykusio 2018 m. spalio 2 d. sprendimu.

Pirmininkas



 prof. dr. (HP) Saulius Vosylus

Viešoji įstaiga
Universiteto g. 3
01513 Vilnius

Duomenys kaupiami ir saugomi
Juridinių asmenų registre
Kodas 211950810

Fakulteto duomenys:
M. K. Čiurlionio g. 21/27, 03101 Vilnius
Tel. (8 5) 239 8700, el. p. mf@mf.vu.lt
www.mf.vu.lt

Komiteto duomenys:
M. K. Čiurlionio g. 21/27, 03101 Vilnius
Tel. (8 5) 268 6998, el. p. rbtek@mf.vu.lt
www.mf.vu.lt/content/vrbtek/naujienos

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 14 egz.