

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Valdas Pečeliūnas

**PLAZMINIŲ LĄSTELIŲ IMUNOFENOTIPINĖS ANALIZĖS
REIŠMĖ
VERTINANT MIELOMINĖS LIGOS RIZIKĄ IR ATSAKĄ Į GYDYMĄ**

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, medicina (06 B)

Vilnius, 2011

Disertacija rengta 2006 – 2011 metais Vilniaus universitete

Vidaus ligų, šeimos medicinos ir onkologijos klinikoje.

Mokslinis vadovas:

Doc. dr. Laimonas Griškevičius (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai,
medicina – 07 B)

Konsultantas:

Doc. dr. Rėda Matuzevičienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai,
medicina – 07 B)

TURINYS

SANTRUMPOS	6
1. ĮVADAS	9
1.1. Problemos aktualumas	9
1.2. Darbo tikslas	12
1.3. Darbo uždaviniai	13
1.4. Darbo mokslinis naujumas ir svarba	14
1.5. Ginamieji teiginiai	15
2. LITERATŪROS APŽVALGA	16
2.1. Mielominė liga	16
2.1.1. Bendrybės ir istorinė apžvalga	16
2.1.2. Epidemiologija	18
2.1.3. Etiologija	19
2.1.4. Patogenezė	19
2.1.5. Klinika	21
2.1.6. Diagnostika	22
2.1.7. Stadizacija ir rizikos vertinimas	23
2.1.8. Mielominės ligos gydymas	25
2.1.9. Atsako į gydymą vertinimas	29
2.2. Tėkmės citometrija	33
2.2.1. Tėkmės citometrijos metodo apžvalga	33
2.2.2. Tėkmės citometrijos taikymas tiriant mielominę ligą	38
2.2.3. Plazminių ląstelių imunofenotipavimui naudojami žymenys	39
2.2.4. Tėkmės citometrijos taikymas mielominės ligos klinikinėje praktikoje	42
2.2.5. Cirkuliuojančios plazminės ląstelės	45
2.2.6. Cirkuliuojančių plazminių ląstelių prognostinė reikšmė	46
2.2.7. Plazminių ląstelių imunofenotipavimo sunkumai	47
3. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODIKA	49
3.1. Tyrimo sumanymas	49
3.2. Tiriamieji	51

3.3. Tiriamosios populiacijos pasirinkimo pagrindimas	51
3.4. Plazminių ląstelių imunofenotipavimas: tĕkmĕs citometrijos metodika	54
3.5. Statistiniai metodai	57
4. TYRIMO REZULTATAI	59
4.1. Tiriamųjų charakteristikos	59
4.2. Sveikų donorų kaulų čiulpų plazminių ląstelių subpopuliacijų kiekybinĕs charakteristikos	60
4.3. Sveikų donorų atipinio imunofenotipo KĈPL subpopuliacijų palyginimas su ML pacientų piktybinių KĈPL subpopuliacijomis	63
4.4. Sveikų donorų cirkuliuojanĈios plazminĕs ląstelĕs	67
4.5. Periferiniame kraujyje cirkuliuojanĈių plazminių ląstelių subpopuliacijų nustatymo kriterijai	68
4.6. Piktybinių cirkuliuojanĈių plazminių ląstelių kiekybinĕs charakteristikos ir kinetika po I-ojo chemoterapijos kurso	69
4.7. Piktybinių cirkuliuojanĈių plazminių ląstelių prognostinĕ reikĕmĕ ...	72
4.7.1. Ankstyvos ligos progresijos prognozavimas remiantis piktybinių cirkuliuojanĈių plazminių ląstelių kinetika	72
4.7.2. Standartinių atsako kriterijų ir piktybinių cirkuliuojanĈių plazminių ląstelių kinetikos palyginimas	75
4.7.3. Piktybinių cirkuliuojanĈių plazminių ląstelių nustatymo prieš gydymą prognostinĕ reikĕmĕ	75
4.8. Mielomine liga serganĈių pacientų normalių plazminių ląstelių kiekybinĕs charakteristikos	80
4.9. Normalių plazminių ląstelių nustatymo mielomine liga sergantiems pacientams prognostinĕ reikĕmĕ	81
4.9.1. Normalios cirkuliuojanĈios plazminĕs ląstelĕs	81
4.9.2. nKĈPL subpopuliacijos klinikinĕ reikĕmĕ	83
5. TYRIMO REZULTATŲ APTARIMAS	85
5.1. Plazminių ląstelių imunotipavimo metodikos optimizavimas	86

5.1.1.	Kaulų čiulpų plazminės ląstelės	86
5.1.2.	Cirkuliuojančios plazminės ląstelės	90
5.2.	Cirkuliuojančių plazminių ląstelių prognostinė reikšmė	91
5.3.	Normalių plazminių ląstelių identifikavimo ML pacientams klinikinė reikšmė	94
6.	IŠVADOS	99
7.	PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS	100
8.	DISERTACIJOS TEMA PASKELBTŲ DARBŲ SĄRAŠAS	101
8.1.	Straipsniai leidiniuose įtrauktuose į Mokslinės informacijos instituto (ISI) sąrašą	101
8.2.	Straipsniai Lietuvos recenzuojamuose periodiniuose leidiniuose ...	101
8.3.	Kitos publikacijos	101
9.	LITERATŪROS SĄRAŠAS	102
10.	PRIEDAI	122

SANTRUMPOS

AG	antigenas
AK	antikūnas
AL	su imunoglobulino lengvosiomis grandimis susijusi amiloidozė
BI	bendras išgyvenamumas
BMP-2	kaulo morfogenetinis baltymas-2 (angl. Bone morphogenetic protein)
CD	diferenciacijos grupė (angl. Cluster of differentiation)
CPL	cirkuliuojančios (periferiniame kraujyje) plazminės ląstelės pCPL- piktybinės CPL nCPL – normalios CPL
CRAB	akronimas: kalcis, inkstai, anemija, kaulai (angl. calcium, renal, anemia, bone)
DDT	didelių dozių chemoterapija
Dkk-1	dickkopf homolog-1 baltymas
DS	Durie-Salmon stadizacijos sistema
FISH	fluorescentinė in situ hibridizacija
FSC	tiesinė šviesos spindulio sklaida (angl. forward scatter)
GEP	Genų raiškos profiliavimas (angl. Gene expression profiling)
HGF	hepatocitu augimo faktorius
IFM	imunofluorescentinė mikroskopija
Ig	imunoglobulinas
Il	interleukinas

IMWG	tarptautinė mielominės ligos darbo grupė (angl. International Myeloma Working Group)
ISS	Tarptautinė stadizacijos sistema (angl. International Staging System)
KČ	kaulų čiulpai
KČPL	kaulų čiulpų plazminės ląstelės aKČPL – CD138+/CD38+/CD19-/CD56+ subpopuliacija nKČPL – CD138+/CD38+/CD1+/CD56- subpopuliacija dnKČPL – CD138+/CD38+/CD19-/CD56- subpopuliacija dtKČPL – CD138+/CD38+/CD19+/CD56+ subpopuliacija p(a)KČPL – CD138+/CD38+/CD19-/CD56+ monokloninė/maligninė subpopuliacija p(dn)KČPL – CD138+/CD38+/CD19-/CD56+ monokloninė/maligninė subpopuliacija
KKLT	kamieninių kraujodaros ląstelių transplantacija
LDH	laktatdehidrogenazė
LG	lengvosios grandinės
LIP	laikas iki progresijos
LLG	laisvos lengvosios grandinės
MIP-1 α	makrofagų uždegiminis baltymas – 1 α (angl. macrophages inflammatory protein)
ML	mielominė liga
MLL	minimali liktinė liga
MNRG	monokloninė neaiškios reikšmės gamapatija
MP	melfalanas ir prednizolonas

MPV	melfalanas, prednizolonas ir bortezomibas
MPT	melfalanas, prednizolonas ir talidomidas
MRT	magnetinio rezonanso tomografija
PET	pozitronų emisijos tomografija
PGR	polimerazių grandininė reakcija
PI	pasikliautinis intervalas
PK	periferinis kraujas
PL	plazminės ląstelės
RA	recidyvavusi ar atspari gydymui (mielominė liga)
RANKL	branduolio faktoriaus kapa-B receptoriaus aktyvatorius (angl. receptor activator of nuclear factor kapa-B)
RML	rusenanti mielominė liga
SD	sveiki donorai
SSC	šoninė šviesos sklaida (angl. side scatter)
TC	tėkmės citometrija
TNF	tumoro nekrozės faktorius
VAD	vinkristinas, adriamicinas ir deksametazonas
VEGF	kraujagyslių endotelio augimo faktorius (angl. vascular endothelial growth factor)
VFI	vidutinis fluorescencijos intensyvumas

1. ĮVADAS

1.1. Problemos aktualumas

Mielominė liga (ML) yra galutinės B limfocitų diferenciacijos stadijos ląstelių – plazmocitų, piktybinė liga. Tarptautinės vėžio tyrimų agentūros (PSO padalinys) duomenimis, tai antras pagal dažnumą kraujodaros organų navikas, sudarantis 0,8% visų navikų ir daugiau kaip 10% kraujo sistemos navikų (1). 1969 metais gyd. R. Alexanian su kolegomis publikavo duomenis apie pirmąjį efektyvų mielominės ligos gydymo metodą – melfalano chemoterapiją (2). Nepaisant daugelio klinikinių studijų efektyvesnio gydymo nei melfalano ir prednizolono derinys nepavyko rasti net tris dešimtmečius. Tik pastarąjį dešimtmetį, ML gydymui pritaikius didelių dozių chemoterapiją (DDT), naujos kartos negenotoksinius vaistus (proteosomų inhibitorius, imunomodulatorius) buvo pasiektas ženklus gydymo efektyvumo pagerėjimas ir pacientų išgyvenamumo pailgėjimas (3-6).

Didžiulė pastarojo meto pažanga ML gydymo srityje, vaistų turinčių naują veikimo mechanizmą įdiegimas, stipriai paveikė ML klinikinę praktiką, iškėlė naujų klausimų. Darbai, aprašyti šioje disertacijoje, atlikti sprendžiant 2 pastaruosiu metu iškilusius iššūkius: naujų ML prognostinių biožymenų paieška ir ankstyvas gydymo efektyvumo vertinimas.

Mielominė liga pasižymi dideliu klinikinės eigos heterogeniškumu. Atskirų ML pacientų išgyvenamumas skiriasi dešimtis kartų – nuo kelių mėnesių susirgus plazminių ląstelių leukemija, iki dešimties ir daugiau metų indolentinės ligos atveju. Ligos biologijos, prognostinių faktorių supratimas yra labai svarbus identifikuojant rizikos grupes, parenkant gydymo taktiką. 1975 m. vienas žymiausių XX a. mielominės ligos ekspertų B.G. Durie su kolegomis pasiūlė Durie-Salmon (DS) stadizacijos sistema, kuri rėmėsi daugiausiai ligos masę atspindinčiais parametrais (7). Ši sistema buvo plačiai naudojama tris dešimtmečius. ML gydymui pradėjus taikyti DDT, DS sistema

pasirodė nepakankamai prognostiškai reikšminga (8,9). 2005 m. tarptautinė ekspertų grupė vadovaujama P.R. Greipp'o (dalyvaujant B. G. Durie) pristatė ML biologiją atspindinčių žymenų – albumino ir $\beta 2$ mikroglobulino vertinimu paremtą Tarptautinę stadizacijos sistema – ISS (angl. International Staging System) (9). ISS pagrįsta 10750 ML pacientų stebėsenos duomenimis, gerai atspindi pacientų gydytų DDT prognozę. Tačiau ir naujoji ISS sistema turi trūkumų. Nepakanka duomenų, dėl šios sistemos prognostinės reikšmės, gydymui taikant naujuosius vaistus (10). ISS stadija daliai ML pacientų neatspindi ligos rizikos (11). ISS taipogi netinkama recidyvavusios ML rizikos vertinimui (10). Pastaruoju metu aktyviai ieškoma naujų biožymenų, atspindinčių ML prognozę naujųjų vaistų eroje, padedančių identifikuoti rizikos grupes. Yra sukaupta nemažai duomenų apie genetinių ML faktorių prognostinę įtaką. 2009 m. Tarptautinė mielominės ligos darbo grupė (IMWG) pirmą kartą pateikė klinikinei praktikai pritaikytas rekomendacijas dėl genetinių veiksnių nustatymo vertinant ML riziką (12,13). Pastaruoju metu ML rizikos vertinimui pradėtas taikyti ir tėkmės citometrijos (TC) metodas. 2008 m. publikuoto A.C. Rawstron vadovaujamos ekspertų grupės bendro sutarimo dokumente apibrėžtas TC naudojimas ML rizikos vertinimui (14). ML rizikos nustatymui rekomenduota tirti normalių ir piktybinių plazminių ląstelių santykį kaulų čiulpuose, imunofenotipinių žymenų raišką (CD117, CD28 ir kt.). Periferiniame kraujyje cirkuliuojančių plazminių ląstelių (CPL) nustatytą TC metodu prognostinė reikšmė įvardinta kaip perspektyvi klinikinių tyrimų sritis. Plazminių ląstelių leukemija diagnozuojama aptikus didelį CPL kiekį yra pati agresyviausia, pasižyminti kraštutinai bloga prognoze ML forma (15,16). Mayo (JAV) klinikos mokslininkų grupė nustatė, kad net ir minimalaus kiekio CPL aptikimas yra nepriklausomas blogos prognozės žymuo gydymui taikant DDT (17). Iki šiol nėra pateikta duomenų apie CPL nustatymo prognostinę reikšmę pacientams gydomiems naujaisiais vaistais ir recidyvavusia mielomine liga sergantiems pacientams. Mes įvertinome CPL nustatymo prognostinę reikšmę pažengusia mielomine liga sergantiems pacientams gydytiems chemoterapija derinyje su proteosomų inhibitoriais.

Šiuo metu klinikinėje praktikoje naudojami bent 6 skirtingą veikimo mechanizmą turintys ML gydymo metodai (įprastinė chemoterapija (alkilinantys, antraciklinai), gliukokortikoidai, proteosomų inhibitoriai, imunomodulatoriai, didelių dozių chemoterapija, alogeninė KKLТ) (18). Išsiplėtęs ML gydymo arsenalas iškėlė tinkamiausio gydymo metodo parinkimo kriterijų klausimą. Iki šiol šioje srityje pasiekta labai nedaug. 2010 m. H. Avet-Loiseau išanalizavęs IFM 2005 studijos duomenis nustatė, kad pacientams turintiems translokaciją (4;14) gydymas bortezomibu gali prailginti išgyvenamumą. Pacientams turintiems 17 chromosomos deleciją joks standartinis gydymas nesumažina blogos prognozės, todėl IMWG ekspertai šiuo metu jiems siūlo taikyti alogeninę kaulų čiulpų transplantaciją (19,20). Šios rekomendacijos pritaikomos tik mažai daliai ML pacientų (~15%), ir yra paremtos tik kelių klinikinių tyrimų duomenimis. Nesant aiškių efektyviausio gydymo parinkimo kriterijų labai svarbus tampa ankstyvas atsako į gydymą vertinimas. Anksti nustačius skiriamam gydymui atsparią ligą, galima taikyti alternatyvų gelbstintį gydymą ir taip išgelbėti pacientą nuo neigiamų ligos progresijos pasekmių, veltui neieškoti materialinių resursų, skiriant brangius, tačiau neefektyvius vaistus. Deja, šiuo metu nėra metodo, kuris anksčiau nei praėjus 2 – 3 mėn. nuo gydymo pradžios galėtų identifikuoti atsparius gydymui atvejus. Standartiniai ML atsako į gydymą vertinimo metodai remiasi surogatinio ligos masės žymens - paraproteino kinetika (21). Dėl ilgo skilimo pusperiodžio paraproteino kinetika pasižymi inercija ir atsakas vertinamas ne anksčiau, kaip po 2 – 3 mėn. nuo gydymo pradžios. Tiesioginis ligos masės vertinimas, tiriant kaulų čiulpų plazmines ląsteles, praktiškai nepasiteisino dėl židininio piktybinių plazminių ląstelių infiltracijos pobūdžio, KČ aspirato atskiedimo periferiniu krauju, invazyvumo (14,22). Sergant ML periferiniame kraujyje aptinkamos cirkuliuojančios piktybinės plazminės ląstelės (pCPL) susijusios su kaulų čiulpų piktybiniu klonu (23-25). Britų mokslininkas A.C. Rawstron su kolegomis nustatė, kad taikant efektyvų gydymą pCPL kiekis mažėja (26). Mes iškėlėme hipotezę, kad pCPL galėtų būti naudojamos, kaip tiesioginis ligos masės ir aktyvumo žymuo, vertinant atsaką į gydymą ir anksti

išaiškinant gydymui atsparius atvejus. Kadangi pCPL yra piktybinio ML klono dalis, jų kinetika neturėtų paraproteinui būdingos inercijos. Tirdami periferinį kraują siekėme išvengti aukščiau paminėtų KČ vertinimo trūkumų.

Nors TC gana seniai taikoma plazminių ląstelių imunofenotipavimui, tačiau iki šiol liko neaiškumų skiriant normalias ir piktybines plazmines ląsteles. Prieštarinai vertinamas CD45 žymens vaidmuo identifikuojant piktybinius plazmocitus (24,27). Iki šiol atliktuose CPL klinikiniuose tyrimuose (Mayo klinikos grupė, A.C. Rawstron grupė), CD45 žymuo naudotas piktybinių CPL identifikavimui, tačiau 2008 m. publikuotame ekspertų bendro sutarimo dokumente, nerekomenduota šio žymens vartoti piktybiškumo nustatymui. Mažai žinoma apie normalius plazmocitus atipiškai ekspresuojančius CD19 ir CD56 žymenis (28-30). Normalių ir piktybinių plazminių ląstelių proporcijos turi priešingą prognostinę reikšmę, todėl atliekant tyrimą reikėjo TC metodologijos patikimai diferencijuojančios normalias ir piktybines plazmines ląsteles. Dėl šios priežasties tyrimui naudojome naują iki tol neaprašytą imunofenotipinių žymenų derinį, apimančią svarbiausius plazminių ląstelių identifikavimo (CD138, CD38, CD45), atipiškumo (CD19, CD20 ir CD56) ir kloniškumo (kappa ir lambda intracitoplazminės lengvosios grandinės) žymenis. Svarbi tyrimo dalis buvo sveikų donorų plazminių ląstelių imunofenotipo tyrimas. Tirdami sveikas žmones siekėme patikslinti normalių PL imunofenotipines sąlybes bei nustatyti normalių ir piktybinių periferiniame kraujyje aptinkamų CPL subpopuliacijų kriterijus.

1.2. Darbo tikslas

Įvertinti plazminių ląstelių imunofenotipavimo tėkmės citometrijos metodu reikšmę, nustatant pažengusios mielominės ligos ankstyvą atsaką į gydymą ir prognozę.

1.3. Darbo uždaviniai

- 1.3.1.** Įvertinti sveikų donorų periferinio kraujo ir kaulų čiulpų plazminių ląstelių sinchroninę CD19, CD56 ir CD45 žymenų raišką.
- 1.3.2.** Ištirti sveikų donorų plazminių ląstelių subpopuliacijų, pasižyminčių atipine CD19 ir CD56 žymenų raiška, kiekybines ir imunofenotipines savybes bei palyginti jas su mielomine liga sergančių pacientų piktybinių plazminių ląstelių subpopuliacijomis.
- 1.3.3.** Nustatyti periferiniame kraujyje cirkuliuojančių normalių ir piktybinių plazminių ląstelių subpopuliacijų imunofenotipinius kriterijus.
- 1.3.4.** Įvertinti piktybinių cirkuliuojančių plazminių ląstelių nustatymo prieš gydymą prognostinę reikšmę pacientams, sergantiems pažengusia mielomine liga.
- 1.3.5.** Išanalizuoti piktybinių cirkuliuojančių plazminių ląstelių kinetiką po pirmojo chemoterapijos kurso, jos reikšmę, nustatant atsparumą skiriamam gydymui bei prognozuojant ligos išeitį.
- 1.3.6.** Ištirti mielomine liga sergančių pacientų periferiniame kraujyje cirkuliuojančių normaliu plazminių ląstelių kiekybines charakteristikas ir prognostinę reikšmę reikšmę
- 1.3.7.** Nustatyti normalių ir piktybinių kaulų čiulpų plazminių ląstelių santykio vertę prognozuojant pažengusios mielominės ligos išeitį

1.4. Darbo mokslinis naujumas ir svarba

Į klinikinę praktiką įdiegėme naują plazminių ląstelių tėkmės citometrijos metodiką pritaikę iki tol nenaudotą imunofenotipinių žymenų derinį. Optimizavome imunofenotipinę normalių ir piktybinių plazminių ląstelių diferenciaciją. Pritaikę naująją imunofenotipavimo metodiką pirmieji aprašėme sveikų žmonių plazminių ląstelių subpopuliacijas atipiškai ekspresuojančias CD19 ir CD56 žymenis.

Sukūrėme ankstyvo atsako į gydymą vertinimo metodą, pagrįsta periferiniame kraujyje cirkuliuojančių plazminių ląstelių kinetikos pobūdžio po pirmojo chemoterapijos kurso nustatymu. Įrodėme, jog šis metodas anksčiau nei standartiniai, gali nustatyti gydymui atsparius mielominės ligos atvejus. Mūsų duomenis patvirtinus didesnėse studijose, metodas galėtų būti naudojamas klinikinėje praktikoje gydant pažengusią mielominę ligą.

Nustatėme, kad piktybinių cirkuliuojančių plazminių ląstelių aptikimas prieš gydymą yra nepalankios prognozės žymuo pažengusia mielomine liga sergantiems pacientams. Šis žymuo atlikus papildomus tyrimus galėtų būti naudojamas gydymo taktikos nustatymui.

Mes pirmieji aprašėme mielomine liga sergančių pacientų periferinio kraujo normalių plazminių ląstelių subpopuliacijos kiekybines charakteristikas, kinetiką gydymo metu. Nustatėme, kad kaulų čiulpų plazminių ląstelių imunitipavimas prognostiškai informatyvesnis nei mikroskopavimas.

1.5. Ginamieji teiginiai

1.5.1. Mūsų naudota 6 spalvų, 2 mėgintuvėlių tėkmės citometrijos metodologija leidžia atskirti normalias ir piktybines periferinio kraujo plazmines ląsteles.

1.5.2. Sveikų donorų kaulų čiulpuose aptinkamos atipine CD19 ir CD56 žymenų ekspresija pasižyminčios plazminių ląstelių subpopuliacijos.

1.5.3. Piktybinių cirkuliuojančių plazminių ląstelių nustatymas prieš gydymą susijęs su agresyvesne pažengusios mielominės ligos eiga.

1.5.4. Piktybinių cirkuliuojančių plazminių ląstelių kinetikos pobūdžio po pirmojo chemoterapijos kurso vertinimas padeda anksčiau, nei standartiniai metodai, nustatyti skiriamam gydymui atsparius ir turinčius didelę ankstyvos progresijos riziką mielominės ligos atvejus.

1.5.5. Mielomine liga sergančių pacientų periferinio kraujo ir kaulų čiulpų normalių plazminių ląstelių įvertinimas taikant tėkmės citometrijos metodą teikia kliniškai reikšmingos informacijos.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Mielominė liga

2.1.1. Bendrybės ir istorinė apžvalga

Mielominė liga yra piktybinė plazminių ląstelių liga, kuriai būdinga klinikinė pentada:

- 1) anemija;
- 2) monokloninis baltymas aptinkamas serume ir/ar šlapime;
- 3) kaulų osteolizės židiniai, destruktijos ir skausmai;
- 4) hiperkalcemija;
- 5) inkstų nepakankamumas.

Ši liga yra antra pagal dažnumą hematoonkologinė patologija (sudaro > 10% visų kraujo sistemos navikinių susirgimų). Mielominės ligos klinikinė eiga labai heterogeniška: nuo rusenančios eigos, kai negydoma liga kelis metus neprogresuoja iki plazminių ląstelių leukemijos kai, net intensyviai gydomų pacientų išgyvenamumas skaičiuojamas mėnesiais. Ligos substratas yra plazminės ląstelės – galutinės diferenciacijos stadijos B limfocitai. Šios ląstelės žmogaus organizme užtikrina humoralinį imunitetą sintezuodamos ir sekretuodamos antikūnus – baltymines molekules dar vadinamas imunoglobulinais, dalyvaujančias imuniniame atsake ir atpažįstančias organizmui svetimas molekules – antigenus (31). Įprastai plazminės ląstelės aptinkamos kaulų čiulpuose. Jų proliferacija, išgyvenamumas glaudžiai susijęs su kaulų čiulpų mikroaplinka (32). Paskutinėje (2008 m.) Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) klasifikacijoje ML skirtas tik vienas kodas (C90.0), nors klinikiniai tyrimai atskleidžia didelę etiopatogenezinę ligos įvairovę (33). Manoma, kad daugumai pacientų mielominė liga išsivysto iš ikivėžinio susirgimo – monokloninės neaiškios reikšmės gamapatijos (MNRG). MNRG yra labai paplitusi patologija tarp vyresnio amžiaus žmonių. Ištyrus 21463

žmonių iš Olmstedo apygardos (Minesotos valstija, JAV) kraujo mėginius nustatyta, kad 3,2% vyresnių kaip 50 metų ir 5,2% vyresnių nei 70 metų žmonių sirgo MNRG (34). Įrodyta, kad MNRG evoliucionuoja į mielominę ligą apytiksliai 1% pacientų per metus laiko (35).

Pirmasis 1844 metais mielomine liga sergantį pacientą aprašė gyd. S. Solley naudodamas kaulų minkštumo ligos pavadinimą (*mollities ossium*) (36). Aprašyta pacientė – 39 metų moteris Sarah Newbury. Ją vargino silpnumas ir daugybiniai kaulų lūžiai. Moteris mirė praėjus 4 metams nuo simptomų pradžios. Atliekant autopsiją nustatyta, kad kaulų čiulpai buvo užpildyti raudona substancija, sudaryta iš didelių apvalių ar ovalių ląstelių turinčių 1 ar 2 branduolius. Gyd. S. Solley manė, kad liga iš esmės buvo uždegiminis procesas, kuris prasidėjo nuo kraujagyslių „žalojančio poveikio“ – „absorbuojančio žemės medžiagą iš kaulų ir išskiriančio ją per inkstus į šlapimą“. 1850 metais gyd. W. Macintyre (vienas iš tuo metu žinomiausių Londono gydytojų) su gyd. H. Bence Jones aprašė mielomine liga sergančio paciento šlapimo baltymo sąvybę kaitinant šlapimą iškristi į nuosėdas ir toliau kylant temperatūrai vėl ištirpti (37). Mokslininko garbei šlapime aptinkamas paraproteinas iki šiol vadinamas Bens Džonso baltymu. Pirmasis terminą daugybinė mieloma (angl. *multiple myeloma*) pavartojo gyd. J. von Rustizky 1873 metais (38). Svarbus ir gyd. O. Kahler indėlis. Jis, 1889 m. aprašydamas ligos atvejį, apibendrino tuometines žinias ir išskyrė mielominę ligą kaip atskirą nozologinį vienetą (36). Nuo to laiko, retkarčiais, kaip mielominės ligos sinonimas vartojamas ir terminas – Kahlerio liga. Plazminės ląstelės morfologija detalai aprašė R. Y. Cajal 1895 metais (39). Pirmasis efektyvus ML gydymo metodas atrastas nuo ligos aprašymo praėjus daugiau kaip 100 metų. 1958 metais buvo pirmą kartą aprašytas sarkolizino efektyvumas gydant ML (40). Po 4 metų D. Bergsagel su kolegomis paskelbė duomenis apie melfalano efektyvumą: 8 iš 24 pacientų gydytų melfalanų buvo pasiektas ligos pagerėjimas (41). 1969 metais Alexanian R. su kolegomis publikavo duomenis įrodančius klasikinės melfalno ir prednizolono chemoterapijos schemas

efektyumą (2). Ši schema iki šiol naudojama praktikoje vyresnių pacientų gydymui. Jaunesnių pacientų ML gydymo efektyvumą labai pagerino autologinės kamieninių kraujodaros ląstelių transplantacijos taikymas. Pirmoji sėkminga transplantacija ML pacientui aprašyta 1983 m., po dešimtmečio ši procedūra jau buvo taikoma gana plačiai (42). Lietuvoje pirmoji autologinė kamieninių kraujodaros ląstelių transplantacija atlikta 2001 metais VUL "SK" (gyd. I. Trociuko vadovaujamas kolektyvas). Pacientė iki šiol gyva ir šiuo metu neturi jokių ligos simptomų. Pastarąjį dešimtmetį mielominės ligos gydymo technologijos vystėsi labai sparčiai, pradėti naudoti nauji vaistai tokie, kaip talidomidas, lenalidomidas, bortezomibas, tobulėjo KKLТ technologijos, aktyviai tiriamas sumažinto intensyvumo alogeninės KKLТ pritaikymas. Klinikinėse studijose vidutinis jaunesnių ML pacientų išgyvenamumas siekia 10 ir daugiau metų (4,43). Taip pat aiškėja, kad mielominė liga gali būti išgydoma, nes taikant alogeninę KKLТ daugiau nei trečdalis pacientų gali pasiekti ilgalaikį (>5-6 metų) išgyvenamumą be jokių ligos atsinaujinimo požymių (44,45).

2.1.2. Epidemiologija

ML yra antras pagal paplitimą kraujo vėžinis susirgimas. Dažniau sergama tik ne Hodžkino limfoma. ML sudaro apie 0,8% visų vėžio atvejų ir 0,9% mirčių nuo vėžio. Sergamumas ML vakarų pasaulyje yra apie 4 – 4,5 atvejo 100000 žmonių (46,47). Lietuvoje kasmet nustatoma apie 120 naujų ML atvejų, suserga apytiksliai 4 iš 100000 gyventojų (neskelbti duomenys). Nustatyta reikšminga sergamumo ML rasinė ir lytinė predispozicija. Vyrų serga kiek dažniau nei moterys, vyrų : moterų santykis 1.4 : 1. Juodaodžių afrikiečių sergamumas yra dvigubai didesnis nei kaukaziečių rasės ir siekia 9,5 iš 100000 (48). Žemiausi sergamumo rodikliai yra tarp azijiečių (49). Medianinis ML pacientų amžius Lietuvoje diagnozės nustatymo metu - 71 metai (2005 – 2006 metų neskelti duomenys). Šiuo metu manoma, kad ML beveik be išimčių išsivysto iš ikivėžinio susirgimo MNRG (50). MNRG yra

labai paplitusi patologija tarp vyresnio amžiaus žmonių, ji nustatoma ~ 3% vyresnių kaip 50 metų žmonių ir >5% vyresnių nei 70 metų žmonių (50).

2.1.3. Etiologija

Konkreči mielominę ligą sukelti priežastis nėra nustatyta. Aplinkos faktorių įtakos reikšmė nėra vienareikšmiškai įrodyta. Manoma, kad iš aplinkos faktorių mielominės ligos išsivystymui didžiausia įtaka turi jonizuojantis spinduliavimas (51), tačiau japonų išgyvenusių po atominės bombos sprogo stebėjimo tyrimai nenustatė ženkliu padidėjusio sergamumo ML (52). Kiti potencialūs aplinkos etiologiniai ML faktoriai yra rūkymas, kancerogeninių medžiagų, tokių kaip sunkieji metalai, pesticidai, benzenas ir kt. poveikis (51,53-56). Nustatyti ženklius tarprasiniai sergamumo mielomine liga skirtumai, išliekantys nepriklausomai nuo aplinkos faktorių rodo, kad ML išsivystymą lemia ne vien aplinkos faktoriai, bet ir paveldimi genetiniai veiksniai. Šį teiginį patvirtina aprašyti šeiminiai ML atvejai (57,58).

2.1.4. Patogenezė

Manoma, kad daugumai pacientų mielominė liga išsivysto iš ikivėžinio susirgimo – monokloninės neaiškios reikšmės gamapatijos (MNRG). Neseniai paskelbti 77469 sveikų suaugusių žmonių perspektyvinės vėžio stebėsenos studijos duomenys. ML diagnozė stebėjimo metu nustatyta 71 tiriamajam. Ištyrus ikidiagnostinius mėginius, visiems pacientams patvirtinta nuo kelių iki keliolikos metų prieš ML diagnozę jau buvusi MNRG (50).

Genetinių ligos veiksnių tyrimai patvirtino palaipsnio ligos progresavimo modelį. Plazminės ląstelės yra postgerminaciniai B limfocitai. Šios diferenciacijos stadijos ląstelėse jau būna įvykęs Ig molekulę koduojančių genų persitvarkymai – V(D)J persitvarkymas, IgH nustatymas (angl. switch recombination), somatinės hipermutacijos. Šie genų persitvarkymo mechanizmai užtikrina imunoglobulino molekulių didžiulę įvairovę (46). ML išsivystymą daugiausia nulemia somatinių mutacijų metu įvykstančios genų persitvarkymo klaidos sąlygojančios mutavusio klonų padidėjusį proliferacinį

aktyvumą ir atsparumą apoptozei (59,60). Pastaruoju metu genetinis ML išsivystymo mechanizmas intensyviai tiriamas. 2006 metais paskelbta pirmoji mielominės ligos genetinė klasifikacija, 2009 metais – ekspertų bendro sutarimo rekomendacijos, apimančios naujausius duomenis apie ML genetinius veiksnius, tyrimo metodus bei kliniškes rekomendacijas (13,61). Manoma, kad IgH translokacijos ir aneuploidija yra pirminės genetinės anomalijos, inicijuojančios ML. Vienas iš labiausiai paplitusių genolinių ML išsivystymo mechanizmų, būdingas nehiperdiploidinio kariotipo ML pacientams (apie 1/2 visų ligonių) yra chromosominės translokacijos įtraukiančios imunoglobulino sunkiosios grandies geną (IgH) esantį 14q32 lokuse ir proto-onkogeną (62). Translokacija sąlygoja proto-onkogeno hiperekspresiją ir ciklinų D1, D2, D3 ar MMSET (angl. myeloma Set domain) ir FGFR3 genų aktyvaciją (63-65). Paprastai šių genolinių anomalijų nepakanka, kad išsivystytų kliniškai aktyvi ML. Patologiniam PL klonui būdingas genetinis nestabilumas, sąlygojantis genetinę kloninę evoliuciją – naujų translokacijų, taškinių mutacijų atsiradimą (įtraukiant c-myc, RAS, p-53), kas nulemia tolesnę ligos malignizaciją (66).

Paprastai (išskyrus PL leukemijos atvejus), net ir kloniniai, piktybiniai plazmocitai iki terminalinių ligos stadijų išlieka priklausomi nuo KČ stromos ląstelių, proliferaciją ir išgyvenamumą reguliuojančių citokinų (iš čia kyla jautrumas gydymui negenotoksiniais vaistais – imunomodulatoriais) (67). Piktybinės plazminės ląstelės pačios aktyviai sekretuoja citokinus ir skatina KČ mikroaplinkos ląsteles (KČ stromos ląsteles, osteoklastus, osteoblastus) sekretuoti biologiškai aktyvias medžiagas, tokias kaip: interleukinas-6 (IL-6), branduolio faktoriaus kappa B receptoriaus aktyvatorius (NFkappaB), panšus į insuliną augimo faktorius (IGF-1), kraujagyslių endotelio augimo faktorius (VEGF), tumoro nekrozės faktorius alfa (TNF-alfa) makrofagų uždegiminis baltymas – 1 α (MIP-1 α), dickkopf homolog-1 (dkk-1))(68-70). Šie citokinai užtikrina piktybinių plazmocitų išgyvenamumą, proliferaciją, angiogenezę, atsparumą gydymui bei nulemia klinikinius ligos simptomus, tokius kaip kaulinis sindromas, anemija (71).

2.1.5. Klinika

Mielominės ligos kliniką gerai apibūdina plačiai žinomas akronimas – CRAB (angl. – calcium, renal, anaemia, bone). Nors ir nėra patognominio ML būdingo klinikinio simptomo, tačiau daugumai pacientų vyrauja skausminis sindromas, sąlygotas kaulinių destruktijų. Anemija diagnozės metu retai būna gili. Inkstų nepakankamumas dažniausiai ilgai išlieka kliniškai nebylus dėl vyraujančio intersticinio pažeidimo tipo – diurezė būna praktiškai nesutrikusi, todėl inkstų nepakankamumas išaiškėja tik laboratoriskai įvertinus inkstų f-ją.

Skirtingai nuo daugumos vėžinių susirgimų, mielominės ligos klinikiniai simptomai daugiausia nulemti piktybinių plazminių ląstelių biologinio aktyvumo (sekretuojamų citokinų, imunoglobulinų), o ne tūrinio piktybinių ląstelių efekto.

Sergantiems ML pakitusi citokinų homeostazė (padidėjusi Il-6, dkk-1, MIP-1 α RANKL, sumažėjusi osteoprotegrino koncentracija) sąlygoja osteoklastų aktyvaciją ir osteoblastų supresiją, dėl to vystosi lokali ir sisteminė osteoporozė, kaulinės destruktijos, hiperkalcemiją (72,73).

Anksčiau manyta, kad ML pacientams anemijos išsivystymą nulemia KČ infiltracija ir padidėjusio onkotinio slėgio sąlygota hemodiliucija. Pastaruoju metu pateikti duomenys įrodo, kad anemijos išsivystymo mechanizmas yra analogiškas lėtinių ligų anemijai ir yra sąlygotas pakitusios KČ citokinų homeostazės. Didžiausią reikšmę su ML susijusios anemijos išsivystymui turi hepcidiną stimuliuojančių medžiagų Il-6 ir BMP-2 sekrecijos padidėjimas (74,75).

Inkstų f-jos nepakankamumas ML diagnozės metu nustatomas apie 50% pacientų, o sunkus IFN nustatomas 3 – 12% pacientų (76,77). Mielominio inksto patogenezėje svarbiausia vietą užima Ig LG sukeliama cilindrinė nefropatija, kai LG jungiasi su Tamm-Horsfall baltymu sudarydamos inkstų kanalėlių cilindrų. Svarbus ir LG sąlygotas proksimalinių kanalėlių

pažeidimas dėl epitelinio – mezenchiminio virsmo (78,79). Inkstų pakenkimą potencijuoja lydinti hiperkalcemija bei hiperurikemija.

Daugiau nei 90% ligos atvejų piktybinės plazminės ląstelės aktyviai produkuoja imunoglobulinus ar jų dalis (dažniausiai lengvasias grandines). Didelė imunoglobulinų koncentracija kartais gali sąlygoti hiperviskoziteto sindromą. AK jungiantis su krešumo krešumo faktoriais gali išsivystyti koagulopatija. ML sergantiems pacientams būdingas imunodeficitas, vadinamoji „imuninė parėzė“, dėl sutrikusios normalių imunoglobulinų sekrecijos. Apie 1/3 pacientų ligos eigoje išsivysto plazmocitomas. Kiti, retesni su mielomine liga susiję klinikiniai simptomai yra: AL amiloidozė, periferinė neuropatija, autoimuniniai sindromai, karščiavimas.

2.1.6. Diagnostika

ML diagnostika grindžiama monokloninio imunoglobulino ir ligos substrato – padidėjusio kloninių plazminių ląstelių kiekio KČ nustatymu (80). Paskutinėje PSO onkohematologinių ligų klasifikacijoje atsisakyta kiekybinių PL infiltracijos ir paraproteino kriterijų. Šiuo metu galiojantys PSO ML diagnostiniai kriterijai (reikalingi visi trys):

- 1 Monokloninis baltymas nustatytas kraujo serume ir/ar šlapime.
- 2 Kloninės plazminės ląstelės kaulų čiulpuose arba plazmocitoma.
- 3 Su ML susijęs organų ir/ar audinių pažeidimas (CRAB simptomai).

Ig kiekis, KČ PL infiltracijos bei CRAB simptomų vertinimas leidžia skirti MNRG, rusenančią mielomą ir mielominę ligą (1 lentelė). PL kloniškumas klinikinėje praktikoje dažniausiai nustatomas imunohistochemiškai ištyrus LG ekspresiją. Sudėtingesniais atvejais (nesekretuojanti ML, reaktyvios būklės) diferencinei diagnostikai naudojami imunologiniai (netipinio imunofenotipo, kloniškumo nustatymui – tėkmės citometrija), genetiniai (pasikartojančių genetinių anomalijų, IgH kloniškumo nustatymui – klasikinė citogenetika, FISH, PGR) metodai.

2.1.7. Stadizacija ir rizikos vertinimas

Mielominės ligos stadizacijai ilgus metus buvo taikoma Durie-Salmon (DS) sistema (7). Sparčiai keičiantis gydymo galimybėms labai sumažėjo šios stadizacijos sistemos prognostinė reikšmė. Nors DS sistema dar taikoma praktiniame darbe, ją baigia išstumti labai paprasta ir prognostiškai reikšminga Tarptautinė stadizacijos sistema – ISS (angl. International Staging System) (9). ISS stadijos nustatymui naudojami tik 2 parametrai daugiausiai atspindintys biologinę ligos agresyvumą – β_2 -mikroglobulinas ir albuminas. (2 lentelė). Klinikinėse studijose šiuo metu praktiškai be išimčių naudojama ISS sistema. ISS stadizacija išlieka prognostiškai reikšminga gydymui taikant DDT su autologine KKL. Iki šiol nėra pateikta pakankamai duomenų patvirtinančių ISS reikšmingumą pacientams gydomiems taikinių terapiją (proteosomų inhibitorius, imunomodulatorius) (5). Naujai diagnozuotos ML prognozės vertinimui, kartu su ISS stadija, vis plačiau pradedami taikyti genetiniai faktoriai. Ekspertų bendru sutarimu, taikant FISH metodą, visus pacientus rekomenduojama iširti dėl del17p ir t(4;14) genetinių anomalijų, lemiančių nepalankią prognozę (13). Plačiai žinomi ir kiti prognostiniai žymenys, tokie kaip: cirkuliuojančių plazminių ląstelių nustatymas mikroskopuojant ir taikant TC metodą (plačiau bus aptartas vėliau), LDH, hematologiniai parametrai (hemoglobinas, trombocitai, limfocitai), Ig klasė. Pastaruoju metu klinikinėse studijose nustatyta didelė genų raiškos analizės mikrogardelių metodu (GEP – ang. gene expression profiling) prognostinė vertė (81). Šis metodas dėl sudėtingumo ir brangumo klinikinėje praktikoje iki šiol netaikomas.

1 lentelė Monokloninės neaiškios reikšmės gamapatijos (MNRG), rusenančios ir simptominės mielominės ligos diferencinė diagnostika

MNRG	Rusenanti (besimptomė) mielominė liga	Simptominė mielominė liga
<p>M-proteinai serume <30 g/l</p> <p>Kloninių plazminių ląstelių kaulų čiulpuose <10 % ir nedidelė plazminių ląstelių infiltracija trepanobiopate (jeigu atlikta)</p>	<p>M-proteino serume >30 g/l</p> <p>ir /arba</p> <p>Kloninių plazminių ląstelių kaulų čiulpuose >10 %</p>	<p>M-proteinai serume ir (arba) šlapime**</p> <p>Plazminės ląstelės (kloninės) kaulų čiulpuose arba biopsijos būdu patvirtinta plazmocitoma</p>
<p>Nėra su mielomine liga susijusio organų ar audinių pažeidimo (įskaitant kaulų čiulpų nepakankamumą) požymių</p> <p>Nėra kitokio B limfoproliferacinio susirgimo arba lengvųjų grandžių amiloidozės, arba kitokio audinių pažeidimo, susijusio su lengvosiomis, sunkiosiomis grandimis ar imunoglobulinais*</p>	<p>Nėra su mielomine liga susijusio organų ar audinių pažeidimo (įskaitant kaulų čiulpų nepakankamumą) požymių</p>	<p>Su mielomine liga susijęs organų ar audinių pažeidimas (įskaitant kaulų čiulpų nepakankamumą)</p>

*Su AL amiloidu ir IgM M-proteinu susiję neurologiniai sindromai vertinami kaip monokloninės gamapatijos, susijusios su specifiniais sindromais, pavyzdžiai

** Diagnozei patvirtinti nereikia konkretaus kiekio. Nedideliame procentui ligonių nebūna tyrimais aptinkamo M-proteino serume arba šlapime, tačiau būna su mielomine liga susijęs organų pažeidimas ir padidėjęs kaulų čiulpų plazminių ląstelių kiekis (nesekretuojanti mielominė liga)

2 lentelė Tarptautinė stadizacijos sistema (ISS)

Stadija	Kriterijai
I	β_2 -mikroglobulino koncentracija serume < 3,5 mg/l ir albumino koncentracija serume > 3,5 g/dl
II	Nei I, nei III
III	β_2 -mikroglobulino koncentracija serume > 5,5 mg/l

2.1.8. Mielominės ligos gydymas

Iki šiol manoma, kad mielominė liga neišgydoma, tačiau per pastarąjį dešimtmetį pasiekta didžiulė pažanga šioje srityje. Klinikinių tyrimų duomenys rodo, kad beveik pusė jaunesnių pacientų taikant šiuolaikinį gydymą išgyvena 10 ir daugiau metų (4,43). Daliai šių pacientų liga nereciduoja ir tai leidžia manyti, kad jie yra praktiškai pasveikę (angl. operationally cured) (82).

Šiuolaikinio mielominės ligos gydymo evoliucijoje galima išskirti 3 svarbiausius etapus:

1MP schemos pritaikymas (1969) (2)

2 Didelių dozių chemoterapija su autoKKLT (1996) (83)

3 Naujų vaistų – taikinių terapijos, atsiradimas (1999 – 2005) (84-86)

Dabartinis ML gydymas suderina patirtį ir žinias įgytas šių etapų metu. Didelių dozių terapija su auto KKLT pasižymi labai geru efektyvumu ir santykinai nedideliu toksiškumu (su metodu siejamas mirtingumas paprastai neviršija 2-3 proc). Trys randomizuoti tyrimai įrodė, kad DDT pagerina bendrą išgyvenamumą (83,87,88). DDT su autoKKLT jau 15 metų išlieka standartiniu gydymu jaunesniems nei 65 metai pacientams (89). Prieš DDT ligos masės redukcijai skiriama indukcinė ~ 3 mėn. trukmės chemoterapija. Nuo 1990 metų standartinė indukcinė chemoterapija buvo VAD (90), tačiau šiuo metu jau

sukaupta pakankamai įrodymu, kad talidomido, bortezomibo, lenalidomido deriniai su gliukokortikoidais ir/ar klasikiniiais citotoksiniais preparatais sąlygoja geresnį atsaką (91-93). Klinikinių tyrimų duomenimis efektyviausios chemoterapijos schemas yra VTD, VD, PAD, CTD, RD (18). Šiuo metu, dėl sąlyginai trumpo stebėjimo laikotarpio, dar nepakanka įrodymų, kad šios chemoterapijos schemas reikšmingai pagerintų bendrą išgyvenamumą, tačiau dėl ženkliai geresnio atsako lygio naujų vaistų ir klasikinės citotoksinės chemoterapijos deriniai praktiškai išstūmė VAD schemą iš klinikinės praktikos. Po didelių dozių chemoterapijos pasiekus gerą atsaką (\geq LGDR) tolesnis gydymas neskiriamas iki ligos recidyvo. Klinikiniai tyrimai rodo, kad pacientų, kurių atsakas į gydymą nebuvo geras, prognozę galėtų pagerinti palaikomasis gydymas talidomidu ar II-oji DDT su autoKKLT, tačiau ši gydymo taktika nėra standartinė (94,95). Šiuo metu atliekamos klinikinės studijos vertina įvairias konsolidacinio ir palaikomojo gydymo formas taikant naujuosius vaistus. Preliminarūs rezultatai rodo, kad palaikomasis gydymas gali pailginti laiką iki progresijos, pagerinti atsako lygį, tačiau dar nėra paskelbta duomenų patvirtinančių išgyvenamumo pailgėjimą (96,97).

Vyresniems nei 65 metų amžiaus ar turintiems sunkių gretutinių susirgimų pacientams didelių dozių chemoterapija nėra pranašesnė už standartinių dozių chemoterapiją dėl didesnio su gydymu susijusių mirčių kiekio. Keturis dešimtmečius „auksiniu“ gydymo standartu, vyresniems nei 65 metai pacientams, buvo MP chemoterapija (2). Atlikti randomizuoti klinikiniai tyrimai parodė, kad prie MP chemoterapijos pridėjus naują vaistą – bortezomibą ar talidomidą pasiekiamas geresnis atsakas ir pailgėja išgyvenamumas. Šiuo metu vyresnių pacientų I-osios eilės gydymo standartinės schemas remiantis randomizuotų tyrimų duomenimis yra MPT ir MPV (98,99).

Nors gydymo efektyvumas pastaraisiais metais ženkliai padidėjo, tačiau didžiajai daliai pacientų liga po pradinio gydymo recidyvuoja. Vieningo II-osios ir tolesnių gydymo eilių standarto nėra. Jei atsakas į pirmos eilės gydymą

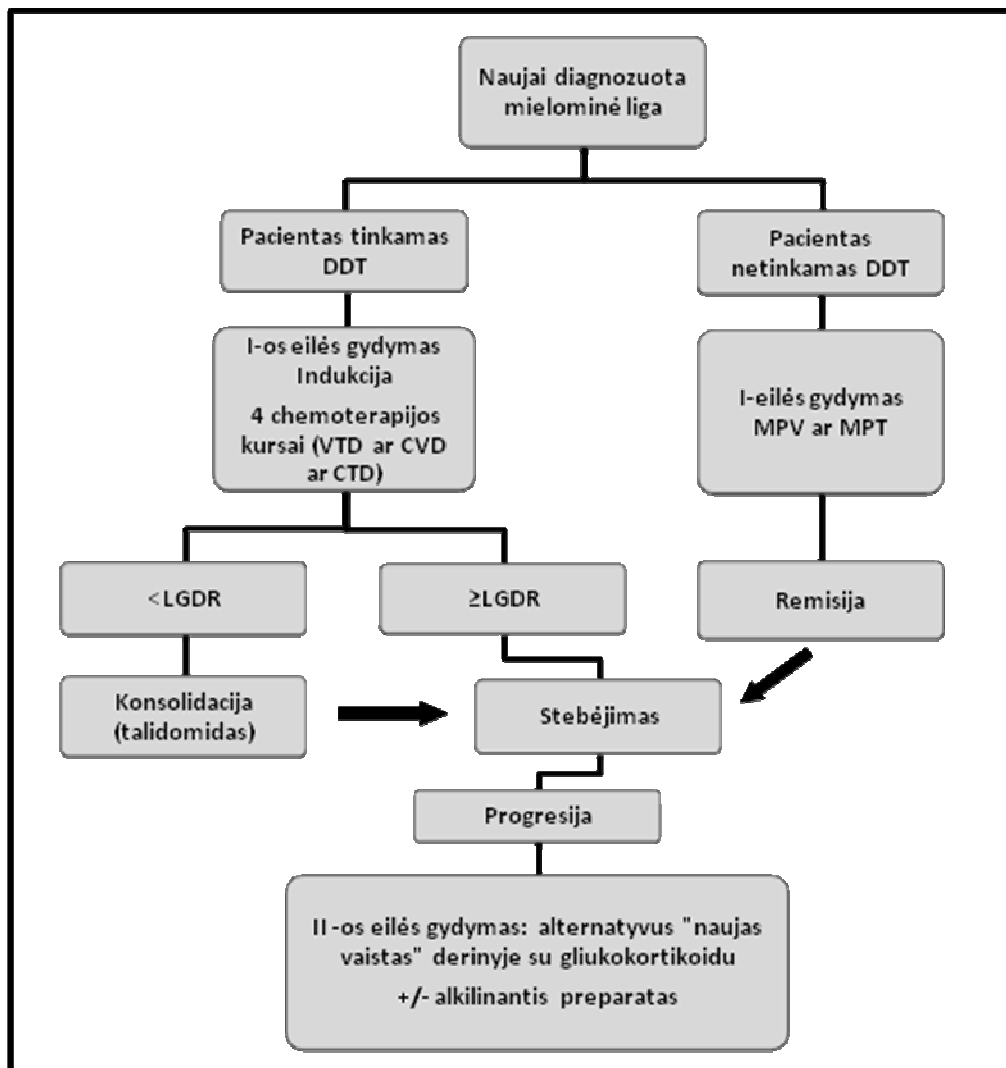
buvo geras ir truko bent 1,5 – 2 metus, rekomenduojama kartoti pradinį gydymą, priešingu atveju, skiriama alternatyvi chemoterapija naudojant kitą naują vaistą ar jų derinius (18). Mielominės ligos gydymo algoritmas pateiktas 1 pav.

Eksperimentiniai gydymo metodai.

Alogeninė KKLТ. Pilno intensyvumo alogeninė KKLТ sąlygoja nepriimtinau aukštą su gydymu susijusį mirtingumą, siekiantį iki 50% (45). Pastaruoju metu taikant auto/mini-alo tandeminę transplantaciją pavyko ženkliai sumažinti gydymo toksiškumą. Taikant mini-alo KKLТ apie 30% pacientų pasiekia ilgalaikį išgyvenamumą be progresijos ir galimai pasveiksta nuo ligos (44,100,101). Nors iki šiol aloKKLТ nėra standartinis ML gydymas, tačiau tęsiamos klinikinės studijos siekiant optimizuoti šio potencialiai kuratyvaus metodo taikymą gydant ML.

Nauji medikamentai. Šiuo metu aktyviausiai vykdomi naujųjų – neogenotoksinių vaistų tyrimai. Ankstyvųjų fazių klinikiniai tyrimai rodo, kad naujieji proteosomų inhibitorių ir imunomoduliatorių klasės vaistai – carfilzomibas ir pomalidomidas efektyvumu gali lenkti šiuo metu naudojamus vaistus (102,103). Tiriamos ir naujų vaistų klasių pasižyminčių unikaliu veikimo mechanizmu preparatai, tokie kaip karščio-šoko baltymų inhibitoriai, histono deacilazės inhibitoriai, farnesyltransferazės inhibitoriai, monokloniniai antikūniai prieš citokinus ir plazmocitų antigenus (anti CD38, anti Il-6) (71).

1 pav. Mielominės ligos gydymo algoritmas



VTD – bortezomibas, talidomidas, deksametazonas, CVD – ciklofosfamidai, bortezomibas, deksametazonas, CTD – ciklofosfamidai, talidomidas, deksametazonas, MPT – melfalanas, prednizolonas, talidomidas, MPV – melfalanas, prednizolonas, bortezomibas, LGDR – labai gera dalinė remisija (M-proteino redukcija $\geq 90\%$), DDT – didelių dozių chemoterapija. Pacientas tinkamas DDT kai jo biologinis amžius neviršija 65 metų ir neturi sunkaus (>II laipsnio) organų nepakankamumo, išskyrus inkstų nepakankamumą.

2.1.9. Atsako į gydymą vertinimas

Atsako į gydymą, ligos progresijos nustatymas klinikinėje praktikoje daugiausiai remiasi paraproteino koncentracijos kitimu. Plačiausiai naudojamos atsako į gydymą vertinimo sistemos - EBMT (angl. European Group for Blood and Bone Marrow Transplant) ir IURC (angl. International Uniform Response Criteria). Šios sistemos daugiausiai remiasi paraproteino kiekio kitimo vertinimu (21,104) (3 lentelė). Šiame tyrime naudojome EBMT atsako į gydymą kriterijus (atsižvelgėme į 2006 m. publikuotus išaiškinimus).

Paraproteino koncentracijos kitimas gana gerai atspindi ligos masės dinamiką yra paprastai įvertinamas, nereikalauja invazinių procedūrų. Patologinio baltymo koncentracijos nustatymui plačiausiai naudojamos metodikos yra serumo ir šlapimo baltymų elektroferezė (EF), imunofiksacija, Ig kiekio tyrimas nefelometrijos būdu. Pastaruoju metu sparčiai į praktiką diegiamas laisvų lengvųjų grandžių nustatymas (105). Kiti standartiniai parametrai svarbūs atsako vertinimui yra KČ plazminių ląstelių infiltracija nustata taikant šviesos mikroskopiją, imunohistochemiją, tėkmės citometriją, plazmocitomų dydis įvertintas radiologiniai metodais.

Šiuolaikinės atsako vertinimo sistemos turi ir trūkumų:

- 1 Ilgas paraproteino gyvavimo pusperiodis
- 2 Sudėtingas oligosekrecinės/nesekretuojančios ML vertinimas
- 3 Gana mažas jautrumas
- 4 Neveiksmingos, kai dėl mielominės ligos evoliucijos atsiranda nesekretuojantis/oligosekrecinis PL klonas.

Pagrindinė problema yra inertiška paraproteino dinamika, nes Ig molekulės pasižymi ilgu serumo gyvavimo pusperiodžiu, kurio trukmė 2 - 21 diena (46). Dėl šios priežasties atsako negalima patikimai įvertinti anksti. Nuo gydymo pradžios iki atsako vertinimo turi praeiti bent 2 - 3 mėn.

3 lentelė Atsako į gydymą ir neigiamų įvykių kriterijai

Atsakas/įvykis	Atsako/įvykio kriterijai ¹
Pilna remisija (PR)	<ul style="list-style-type: none"> • Serume ir šlapime imunofiksacija neigiama. Nėra jokių minkštųjų audinių plazmacitomų. Plazminių ląstelių kaulų čiulpuose yra $\leq 5\%$²
Dalinė remisija (DR)	<ul style="list-style-type: none"> • $\geq 50\%$ serumo M-proteino redukcija. Šlapimo M-proteino $\geq 90\%$ redukcija ir/arba < 200 mg per 24 h. • Jeigu serumo ir šlapimo M-proteinai yra neišmatuojami, tai vietoj M-proteino kriterijaus yra matuojamas skirtumo tarp įtrauktų ir neįtrauktų laisvų lengvųjų grandinių (LLG). Dalinę remisiją atitinka skirtumo sumažėjimas $\geq 50\%$. • Jeigu serumo ir šlapimo M-proteinai bei LLG yra neišmatuojami, tokiu atveju vertinama kaulų čiulpų plazminių ląstelių (KČPL) infiltracija. PR konstatavimui turi būti pasiekta $\geq 50\%$ KČPL redukcija, kai prieš gydymą KČPL infiltracija buvo $\geq 30\%$. • Šalia jau išvardintų kriterijų turi būti konstatuota $\geq 50\%$ minkštųjų audinių plazmocitomų redukcija.
Minimalus atsakas (MA)	<ul style="list-style-type: none"> • 25-49% serumo M-proteino redukcija. Šlapimo M-proteino 50-89% redukcija (sumažėjimas ≥ 200 mg per 24 h.). • 25-49% minkštųjų audinių plazmocitomų redukcija. • Jei M-proteinai neišmatuojami 25-49% KČPL redukcija.
Stabili liga (SD)	<ul style="list-style-type: none"> • Neatitinka PR, DR, MA ar PL kriterijų.
Ligos progresija (PL) ³	<ul style="list-style-type: none"> • Padidėjimas $\geq 25\%$ nuo pradinio dydžio: <ul style="list-style-type: none"> - serumo M-proteinai (absoliutus padidėjimas turi būti ≥ 5 g/l⁴) - ir/arba šlapimo M-proteinai (absoliutus padidėjimas turi būti ≥ 200 mg/24 h); - ir/arba KČPL infiltracija (turi būti $\geq 10\%$⁵); • Tik pas pacientus su neišmatuojamu serumo ir šlapimo M-proteinu: skirtumo tarp įtrauktos ir neįtrauktos LLG padidėjimas $\geq 25\%$ nuo pradinio dydžio (absoliutus padidėjimas turi būti > 100 mg/l). • Aiškiai įrodytas naujų kaulų pažeidimų ar plazmacitomų atsiradimas arba aiškiai įrodytas jau egzistuojančių kaulų pažeidimo židinių ar plazmacitomų padidėjimas. • Hiperkalcemijos aiškiai susijusios su plazminių ląstelių

	neoplazija išsivystymas (koreguotas serumo kalcis >2.65 mmol/l).
Klinikinis recidyvas ³	<ul style="list-style-type: none"> • Tiesioginiai progresuojančios ligos požymiai ir/ar organų taikinių pažeidimas (CRAB)⁴. Ši kategorija nenaudojama vertinant laiką iki progresijos ar išgyvenamumą be įvykių, bet nurodoma čia, kadangi gali būti vertinama atskirais atvejais, taipogi yra svarbi klinikinėje praktikoje. • Klinikinis ligos recidyvas konstatuojama, kai nustatomas vienas ar keli iš žemiau išvardintų kriterijų: <ul style="list-style-type: none"> - Aiškiai įrodytas naujų kaulų pažeidimų ar minkštųjų audinių plazmacitomų atsiradimas; - Aiškiai įrodytas jau egzistuojančių kaulų pažeidimo židinių ar minkštųjų audinių plazmacitomų padidėjimas. Aiškus padidėjimas apibrėžiamas kaip 50% (mažiausiai 1 cm.) pažeidimo skersmens padidėjimas; - Hiperkalcemija (2.65 mmol/l); - Hemoglobino sumažėjimas ≥ 20 g/l; - Kreatinino koncentracijos padidėjimas ≥ 177 mikro- mol/l.
Recidyvas po buvusios pilnos remisijos	<p>Kategorija naudojama tik nustatant išgyvenamumą be ligos.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bet kuris kriterijus iš žemiau išvardintų: <ul style="list-style-type: none"> - Iš naujo atsiradęs serumo ar šlapimo M-proteinas, atliekant imunofiksaciją ar elektroforezę. - KČPL infiltracijos $\geq 5\%$ išsivystymas.⁵ - Bet kokių kitų progresijos požymių išsivystymas (pvz. nauja plazmacitoma, litinis kaulų pažeidimas, hiperkalcemija ar kt)

¹Visų atsako kategorijų patvirtinimui reikalingi du paeiliui atlikti tyrimai prieš pradėdant taikyti, bet kokį naują gydymą; visų atsako kategorijų patvirtinimui neturi būti nustatyta jokių esamų skeleto pažeidimų progresijos požymių ar naujų pažeidimų atsiradimo naujai atliktose rentgenografijose. Radiologiniai tyrimai nėra būtini atsako kategorijų patvirtinimui.

²Patvirtinimui pakartotinės trepanobiopsijos nereikia.

³Visų recidyvo kategorijų patvirtinimui turi būti paeiliui atlikti 2 patvirtinantys tyrimai prieš pradėdant taikyti naują gydymą.

⁴Progresuojančios ligos nustatymui reikia M-proteino padidėjimo ≥ 10 g/l jei pradinis M-proteino lygis buvo ≥ 50 g/l.

⁵Recidyvo po buvusios CR patvirtinimui užtenka 5% KČPL padidėjimo, kai tuo tarpu kitais atvejais turi būti 10%.

Organizme egzistuoja fiziologinė Ig recirkuliacijos sistema (106). Ig molekulė patenka į ląstelės vidų pinocitozės būdu. Ląstelėje Ig Fc fragmentas jungiasi su FcRn (angl. neonatal FC receptor), apsaugančiu nuo proteolizės, bei yra grąžinama į cirkuliaciją (107). Ši sistema geba grąžinti į cirkuliaciją tik ribotą Ig molekulių kiekį ir esant didelėms paraproteino koncentracijoms jos poveikis mažas, tačiau mažėjant paraproteino kiekiui, jo plazmos pusperiodis dėl recirkuliacijos eksponentiškai ilgėja. Kai kuriais atvejais patologinių Ig koncentracija mažėja dar kelis mėn. pabaigus gydymą.

Atsako vertinimas remiantis plazminių ląstelių kiekiu kaulų čiulpuose turi daug trūkumų ir naudojamas tik kaip pagalbinis metodas. Pirmiausiai piktybinių PL išsidėstymas KČ yra židininis ir jų kiekis kinta priklausomai nuo paėmimo vietos. Aspiruojant KČ dėl nehomogeniško PL plitimo, adhezijos prie KČ stromos bei atskiedimo periferiniu krauju, PL koncentracija aspirate ženkliai varijuoja (14,22). KČ trepanobiosija tikslesnė už aspiraciją, tačiau atsako vertinimui praktiškai nenaudojama dėl sudėtingumo ir invazyvumo.

Nuo 2000 metų atsako vertinimui į praktiką pradėtas diegti laisvų lengvųjų grandžių (LLG) nustatymo metodas (108). Tiriant LLG naudojami polikloniniai AK prieš Ig lengvųjų grandžių epitopą, kuris esant lengvajai grandžiai susijungusiai su sunkiąja grandimi būna paslėptas. Tokiu būdu paraproteinas aptinkamas ir tais atvejais, kai piktybiniai plazmocitai nesekretuoja sunkiųjų grandžių. LLG tyrimo jautrumas didesnis už EF ir panašus į imunofiksacijos tyrimą. Svarbus LLG pranašumas prieš IF yra kiekybinis vertinimas, kai tuo tarpu IF vertinama dichotomiškai (teigiama ar neigiama). IURC sistema ir IMWG ekspertų bendras sutarimas numato LLG naudojimą atsako vertinimui nesekretuojančios ar oligosekrecinės ligos atveju, kai serumo paraproteino koncentracija mažesnė nei 10 g/l o šlapimo paraproteino < 0,2 g/24 val. (105). LLG serumo pusperiodis, lyginant su pilna Ig molekule, yra labai trumpas – kappa LLG 2 – 4 val., o lambda LLG 3 – 6 val. (109). Siekiant išnaudoti šį privalumą atlikti keli klinikiniai tyrimai taikant LLG ankstyvo atsako į gydymą vertinimui. Buvo nustatyta, kad LLG atsakas vertintas po 2 mėn. nuo gydymo pradžios koreliuoja su maksimaliu atsaku

(110). LLG santykio normalizacija po 1 ar 2 gydymo kursų susijusi su ilgesniu LIP ir didesniu pilnų remisijų kiekiu (111). Kito tyrimo duomenimis ankstyva (po 2 ar 3 gydymo kursų) LLG santykio normalizacija buvo susijusi su trumpesniu LIP ir BI. Šio tyrimo autoriai savo radinius pagrindė tuo, kad agresyvios eigos ML paprastai greičiau sureaguoja į gydymą, tačiau po to anksti ima progresuoti ir lemia nepalankias išėitis (112). IMWG ekspertų bendru sutarimu nuspręsta, kad egzistuojantys duomenys yra prieštaringi ir šiuo metu nepakanka įrodymų, jog LLG gali būti naudojama ankstyvam atsako į gydymą vertinimui (105).

Pastaruoju metu paskelbta klinikinių tyrimų duomenų apie vaizdinių metodų – MRT, PET skenavimo naudojimą ML atsako į gydymą vertinimui (113,114). Pateikti duomenys rodo, kad tai yra informatyvūs tyrimo metodai, kurie ateityje gali tapti standartiniais.

2.2. Tėkmės citometrija

2.2.1. Tėkmės citometrijos metodo apžvlga

Metodo užuomazgos atsirado dar 1953 metais, kai buvo sukurta pirmoji ląstelių tėkmės analizės sistema. W. H. Coulter užpatentavo metodą pagrįstą elektrinės varžos pokyčių registravimu ląstelių suspencijai tekant pro angą (115). Elektrinės varžos pokytis buvo proporcingas ląstelės dydžiui, tai leido klasifikuoti ląsteles pagal jų dydį. Metodas iki šiol naudojamas hematologiniuose analizatoriuose. 1965 L. A. Kamensky su kolegomis įdiegė šviesos signalo pokyčių registravimu pagrįsta ląstelių suspensijos analizės metodą (116). XX amžiaus 7 – ojo dešimtmečio pabaigoje ląstelių tėkmės analizei buvo pasitelktas imunofluorecensijos registravimas. Imunofluorecensijos metodo esmė – specifinio taikinio pažymėjimas fluorescuojančia medžiaga, panaudojant antigeno-antikūno reakciją. Fluorescuojančiu dažu pažymėta antikūno molekulė jungiasi prie šiam antikūnui specifiško antigeno, taip „nudažydamas“ tikslines biologines

struktūras. 1968 metais Vokietijos mokslininkai W. Dittrich ir W. Gohde sukūrė pirmąjį tėkmės citometrijos prietaisą, veikiantį imunofluorescencijos principu – impulsicifotometrą ICP 11 (117). Šis prietaisas registravo ląstelių fluorescencijos intensyvumą, kuris priklausė nuo fluorescentinių dažų kiekio susikaupusio ląstelėje. Netrukus buvo sukurtos ir pirmosios komercinės automatizuotos imunofluorescentinės tėkmės citometrijos sistemos. Metodo vystymąsi ypatingai paskatino elektroninių skaičiavimo mašinų (kompiuterių) gebančių apdoroti didžiulius informacijos kiekius tobulėjimas (118,119). Dabartinis angliškas metodo pavadinimas „flow cytometry” visuotinai vartojamas nuo 1988 metų. Lietuviškai šis metodas dažniausiai vadinamas – tėkmės citometrija, rečiau naudojamas lietuviškas atitikmuo – srautinė citometrija.

Tėkmės citometrijos metodikos esminis principas yra dalelių suspencijos srauto švirkštimas pro lazerio skleidžiamą šviesos spindulį, jutiklių sistemai registruojant lazerio spindulio pokyčius bei fluorescentinę emisiją (46,120-122). Tėkmės citometrijos prietaisą sudaro keturios glaudžiai susijusios dalys – skysčių sistema, šviesos šaltinis, šviesos signalo registravimo ir duomenų kaupimo bei analizės (elektroninė) sistemos (2 pav.):

1 Skysčių sistema sukuria ląstelių ar dalelių suspencijos tėkmę. Šis srautas nukreipiamas į susikirtimo tašką su šviesos spinduliu. Svarbiausias reikalavimas srautui – jame ląstelės turi išsidėstyti eile ir į susikirtimo tašką su lazerio spinduliu patekti po vieną. Procesas, kurio metu suformuojama sluoksninė ląstelių suspencijos tėkmė (angl. laminar flow) vadinamas hidrodinaminio fokusavimu. Ląstelių suspencija išvirkščinama kaip ašinė srovė į apgaubiantį skysčių srautą. Keičiant ašinio ir gaubiančio skysčių srautų slėgius reguliuojama ašinės srovės apimtis ir pasiekama, kad ląstelės tėkmėje išsidėstytų eilėje po vieną. Galiausiai purkštukas nukreipia suformuotą srautą į susikirtimą su šviesos spinduliu. Galutinio skysčių srauto skersmuo paprastai būna apie 70 μm skersmens. Per sekundę šviesos spindulį kerta apie 1000 dalelių. Hidrodinaminio fokusavimo nustatymai

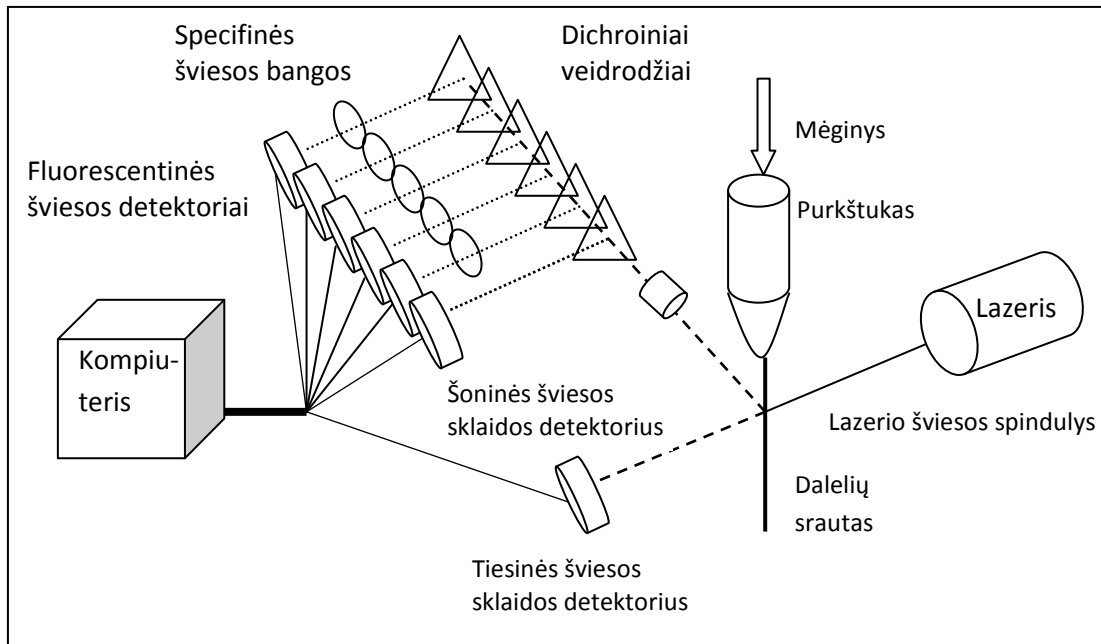
gali kisti priklausomai nuo tiriamosios suspencijos hidrodinaminių savybių, tiriamųjų dalelių dydžio.

2 Tėkmės citometruose šviesos spindulio generavimui dažniausiai naudojami specifinio šviesos bangos ilgio lazeriai: 488nm (mėlynas), 633 – 637nm (raudonas), 405 – 407nm (violetinis), ir 514nm (žalias). Skirtingus fluorescuojančius dažus maksimaliai sužadina specifinio bangos ilgio šviesa. Daugiau skirtingo bangos ilgio lazerių turintis tėkmės citometras, gali analizuoti daugiau skirtingų fluorescentinių signalų. Šviesos spindulys būna nukreiptas statmenai skysčio srautui.

3 Šviesos signalus, skleidžiamus šviesos spindulį kertančių ląstelių, registruoja šviesos jutiklių sistema. Jutikliai paverčia šviesos energiją elektros impulsu. Gaunama kokybinė ir kiekybinė informacija, nes generuojamas elektros signalas proporcingas šviesos energijos kiekiui. Šviesą į jutiklius nukreipia veidrodžių ir filtrų sistema atitinkamai atspindinčių ar praleidžiančių tik specifinio bangos ilgio šviesą. Ši sistema įgalina skirtingo bangos ilgio fluorescentinę emisiją nukreipti į skirtingus jutiklius ir tokiu būdu leidžia atskirai analizuoti kelių fluorescentinių dažų vienu metu skleidžiamą spinduliotę. Tėkmės citometrijos aparatai turintys kelių spalvų lazerius ir sudėtingą šviesos filtravimo sistemą, vienu metu gali analizuoti iki 18 skirtingų fluorescentinių dažų skleidžiamą šviesą ir vienu metu vertinti iki 18 imunologinių ląstelės parametrų (120).

4 Duomenų kaupimo ir analizės sistema jutiklių generuojamus elektros impulsus paverčia į skaitmeninius signalus, kuriuos kaupia atmintyje. Sukaupiai informacijai analizuoti ir pateikti naudojama programinė įranga. Dažniausiai informacija pateikiama histogramų ir taškinių diagramų (angl. dot plot) pavidalu. Histogramos X ašyje paprastai vaizduojamas šviesos emisijos intensyvumas, o Y ašyje ląstelių skaičius. Dvimatės taškinės diagramos vaizduoja vienos ląstelės dviejų skirtingų parametrų reikšmes (fluorescencijos intensyvumą) o kiekvienas taškas atitinka vieną ląstelę.

2 pav. Tėkmės citometro principinė schema



Tėkmės citometrijos aparatai paprastai pateikia trijų rūšių informaciją apie tiriamą ląstelę: tiesinę, šoninę šviesos sklaidą bei fluorescencijos intensyvumą. Analizuojamas fluorescentinių signalų kiekis priklauso nuo tėkmės citometro galimybių. Dauguma šiuolaikinių medicininėje praktikoje naudojamų tėkmės citometrų vienu metu geba analizuoti šviesos sklaidą ir 4-6 skirtingus fluorescentinius signalus.

Tiesinės ir šoninės šviesos sklaidos jautriai registruoja to bangos ilgio šviesą, kokią generuoja šviesos šaltinis. Tiesinė šviesos spindulio sklaidą (angl. forward scatter (FSC)) registruojama daviklio esančio mažu kampu prieš šviesos šaltinį. Tiesinė šviesos sklaidą atspindi ląstelės dydį. Šoninės šviesos sklaidos (angl. side scatter (SSC)) jautriai išsiskiria statmenai šviesos šaltiniui. Šoninė šviesos sklaidą daugiausiai priklauso nuo ląstelės vidinės struktūros sudėtingumo – granulių kiekio, branduolio formos. Šie du parametrai taškinėje diagramoje gali pakankamai tiksliai suklasifikuoti kraujo ląsteles į tris populiacijas – limfocitų (mažiausi ~ 8 μm ir tolygiausios struktūros), monocitų (dideli ~ 14 μm , vidutiniško sudėtingumo vidinė struktūra) ir neutrofilų (dideli ~ 12 μm , intensyviai granulėta struktūra).

Imunofluorescentiniai žymenys naudojami detalesnei ląstelių populiacijų analizei. Naudodami su antikūniais sujungtus fluorescuojančius dažus galime kokybiškai ir kiekybiškai įvertinti daugybę parametrų, pradedant ląstelės paviršiaus ir intracitoplazminiais struktūriniais elementais, chromosomų analize, baigiant ląstelės funkcijomis ir gyvybingumu.

Fluorescuojančių žymenų pagrindas yra molekulės turinčios fluoroforo. Fluoroforas – tai molekulės dalis ar maža molekulė gebanti absorbuoti specifinio bangos ilgio šviesą ir išspinduliuoti kitokio bangos ilgio šviesą. Dažniausiai naudojami fluoroforai: fluoresceino izotiocianatas (FITC), fikoeritinas (PE), peridininio chlorofilo baltymas (PerCP), cianino derivatai (Cy5, Cy7), alofikocianinas (APC). Tėkmės citometrijoje naudojamų fluoroforų kombinacijos parenkamos siekiant išvengti išspinduliuojamo spektro persidengimo (tai priklauso nuo aparate sumontuoto lazerio, filtrų)

Medicinoje, ypač eksperimentinėje, tėkmės citometrijos taikymas labai platus. Šis metodas plačiai taikomas imunologijos, onkologijos, infektologijos, hematologijos mokslinių tyrimų srityje. Klinikinėje praktikoje tėkmės citometrai plačiausiai naudojami hematologijos srityje: kraujo ligų diagnostikai, ligos eigos stebėjimui ir atsako į gydymą vertinimui, prognozės nustatymui (120). Vertinant paviršiaus antigenus galima nustatyti ląstelės kilmę (pvz. CD3 antigenas būdingas T limfocitams), diferenciacijos stadiją ar atpažinti patogeninį imunofenotipą (pvz CD5+/CD23+ būdingas LLL B limfocitams, ar CD55-/CD59- eritrocitų ir leukocitų imunofenotipas sergant paroksizmine naktine hemoglobinurija), svarbų diagnozės nustatymui. Didelis metodo jautrumas ir specifiškumas išnaudojamas stadizacijos metu, kai reikia įvertinti ligos išplitimą kaulų čiulpuose, patologinėse skysčio sankaupose, smegenų skystyje. TC naudojama gydymo efekto vertinimui ir yra vienas svarbiausių metodų minimalios liktinės ligos stebėsenai sergant kraujo ligomis (123,124). TC padeda įvertinti patologinio klonu ląstelių prognozei ar gydymui svarbių žymenų raišką. Pavyzdžiui, esant žymiai CD33 ekspresijai ant

mieloidinių blastų, gydymui galima skirti anti CD33 monokloninį antikūną, tačiau toks gydymas neskiriamas, nesant žymens ekspresijos (121,125).

2.2.2. Tėkmės citometrijos taikymo tiriant mielominę ligą raida

Plazminių ląstelių imunotipavimas naudojant tėkmės citometrijos metodą pradėtas taikyti prieš 3 dešimtmečius. Pradinės tėkmės citometrijos studijos rėmėsi DNR kiekio įvertinimu. Buvo išnaudojama DNR ypatybė jungtis su fluoroforais (126). Šios studijos neturėjo didesnės klinikinės reikšmės.

Plazminių ląstelių imunotipavimas ėmė sparčiau vystytis, kai buvo pradėti naudoti monokloniniai antikūnai konjuguoti su fluoroforais, leidusiai vertinti ląstelių membranos struktūras ir intracitoplazminius žymenis. Devintame XX a. dešimtmetyje atrastas specifinis PL žymuo CD38 (OKT 10) (127). XX a. paskutiniajame dešimtmetyje buvo atrasti tokie plazminių ląstelių žymenys kaip CD138, CD56 (128,129). Visų pirma tai lėmė labai specifiško brandžių plazminių ląstelių imunofenotipo nustatymą – CD138+/CD38+, leidusio tiksliai apsibrėžti plazminių ląstelių populiaciją. Gana tiksliai imunofenotipiškai apibūdinta piktybinių plazminių ląstelių populiacija – CD138+/CD38+/CD19-/CD56+ (130), pradėta skirti normalias ir piktybines plazmines ląsteles (131). TC metodikai vystantis iškilo nemažai neaiškumų. Geras pavyzdys tam iliustruoti būtų CD45 žymens raiškos interpretavimo evoliucija. CD45 žymens hipoekspresija, ilgą laikotarpį dalies tyrėjų buvo vartojama piktybinių plazminių ląstelių identifikavimui (17,24,28,132). Tuo pat metu kiti autoriai demonstruodavo, šio žymens polimorfišką ekspresiją tiriant ir normalius, ir piktybinius plazmocitus (133). Šiuo metu ekspertai sutaria, kad CD45 neturi būti naudojamas normalių ir piktybinių PL atskyrimui (14). Iki šiol nevienareikšmiškai vertinama normalių PL CD19 ir CD56 žymenų ekspresija (30,134).

Išsamios ir kliniškai svarbios mielominės ligos tyrimo metodologijos taikant tėkmės citometriją (naudojant 4 splavų TC modelius) buvo publikuotos gana neseniai – 2005, 2006 metais (134,135). TC įgaunant vis didesnę

mokslinę ir klinikinę reikšmę, 2008 metais Europos mielominės ligos tinklo (European Myeloma Network) organizacijos ekspertai parengė ir publikavo plazminių ląstelių tyrimo tėkmės citometru metodologines rekomendacijas (14). Šios rekomendacijos aiškiai apibrėžė tėkmės citometrijos naudojimo tiriant ML indikacijas, galimybes, nurodė kai kuriuos trūkumus ir ateities studijų kryptis. Viena iš ekspertu sutarimu nurodytų sričių, kur turėtų būti atliekami TC klinikiniai tyrimai - cirkuliuojančių plazminių ląstelių klinikinė reikšmė.

2.2.3. Plazminių ląstelių imunofenotipiniai žymenys

CD38 yra ląstelės transmembraninis glikoproteinas, jam priskiriamos kelios funkcijos (vadinamasis daugiadarbis baltymas (angl. moonlighting protein): NAD-glikohidrolazė, ADP-ribozės ciklazė, ciklinės ADP-ribozės hidrolazė (136). CD38 neturi specifiškumo vienai ląstelių linijai, jis aptinkamas ant daugelio organizmo ląstelių: imuninių ląstelių (T limfocitų, B limfocitų, NK ląstelių, plazminių ląstelių), kitų hemopoetinių ląstelių (eritrocitų, monocitų, trombocitų) (137). Šį baltymą taip pat ekspresuoja miocitai, kraujagyslių endotelio, inkstų proksimalinių kanalėlių, skydliaukės ląstelės (46). Plazminės ląstelės nuo kitų kraujo ląstelių skiriasi tuo, kad ekspresuoja labai daug CD38 antigeno. CD38 žymens raiška ženkliai didėja B limfocitų plazmocitinės diferenciacijos metu todėl yra vadinamas diferenciacijos antigenu (133,138). Šis žymuo aptinkamas praktiškai ant visų normalių ir piktybinių PL (gali skirtis tik raiškos intensyvumas), todėl yra naudojamas pirminiam apibrėžimui, kaip PL identifikavimo žymuo (14).

CD138 – heparano sulfato proteoglikanas, sindekanas-1 (gr. syndecan ~ sulipės). Šis žymuo veikia, kaip tarpląstelinės adhezijos molekulė, augimo faktorių (APRIL, interleukino 6 (IL-6), fibroblastų augimo faktoriaus (FGF), hepatocitų augimo faktoriaus (HGF) ir kt.) koreceptorius (139,140). Svarbu, kad CD138 yra labai specifiškas plazmocitams. Jokios kitos kraujodaros ląstelės neekspresuoja CD138. Šis žymuo taipogi gali būti traktuojamas kaip

diferenciacijos molekulė, nes jo raiška atsiranda tik po plazmablastinės diferenciacijos stadijos ir ryškėja plazmocitams bręstant (133). Šis žymuo poroje su CD38 yra dažniausiai naudojama ir ekspertų bendru sutarimu rekomenduota žymenų kombinacija plazminių ląstelių pirminiam apibrėžimui (angl. gating) (14,134,141).

CD45 yra leukocitų bendrasis antigenas. Jis randamas ant visų hemopoetinių ląstelių, išskyrus trombocitus ir eritrocitus. Tai yra baltyminis fermentas tirozino fosfatazė, dalyvaujantis įvairiose ląstelės funkcijose. T ir B limfocituose šis fermentas svarbus antigeno sąlygoto signalo perdavimui ir ląstelės aktyvacijai (142). CD45 raiška plazmocitui bręstant mažėja. Įrodytas CD45 žymens ekspresijos ir plazmocitų gebėjimo proliferuoti tiesioginis ryšys (143). Diferenciacijos metu CD45 ekspresija mažėja, kartu mažėja ir gebėjimas proliferuoti veikiant IL-6. Subrendusi ilgai gyventi normali PL praktiškai neturi CD45 žymens ekspresijos, neproliferuoja, pasižymi aukšta BCL2 raiška ir būna atspari apoptozei. Piktybiniai CD45- plazmocitai sergant ML, kaip ir normalios PL, būna atsparūs apoptozei, tačiau išlaiko proliferacinį aktyvumą priklausomą nuo IGF-1 (144,145). Nustatyta, kad ML su žemiausia CD45 ekspresija turi blogesnę prognozę (27). Svarbu, kad CD45 raiška plazmocitų populiacijose yra skirtinga t.y. dalis plazminių ląstelių turi žymią CD45 ekspresiją o dalis žemą (133). Piktybinės plazminės ląstelės turi polinkį į žemesnę CD45 ekspresiją, tačiau dėl raiškos polimorfiškumo šio žymens nerekomenduojama naudoti skiriant normalias ir piktybines PL (14,146).

CD19 yra bendras B limfocitų žymuo. Jis aptinkamas ant įvairių diferenciacijos stadijų B limfocitų – pradedant nuo limfoblastų, baigiant didele dalimi plazmocitų. Šis baltymas veikia kaip B limfocito receptoriaus koreceptorius ir dalyvauja antigeno stimuliuojamo signalo perdavime (147,148). Plazmocitų diferenciacijos metu dalis plazminių ląstelių CD19 raišką praranda (149). Tiksliai normalių CD19- plazmocitų populiacijos reikšmė nėra pilnai aiški. Šis žymuo labai retai būna ekspresuojamas ant mielomine liga sergančiųjų piktybinių plazminių ląstelių (<1-5%) todėl derinyje su kitais

žymenimis (pirmiausiai su CD56) naudojamas atskiriant normalias ir piktybines plazmines ląsteles (14,134).

CD56 – nervų ląstelių adhezijos molekulė (neural cell adhesion molecule - NCAM) (150). Atlieka adhezijos tarp ląstelių funkciją, padeda ląstelei tvirtintis prie tarpląstelinės medžiagos. Šis žymuo daugiausiai ekspresuojamas nervinio audinio ląstelių. Tarp kraujodaros ląstelių CD56 ekspresija pasižymi NK ląselės ir T limfocitai (151). CD56 žymens raiška gali būti aptinkama ant kai kurių navikinių ląstelių – limfomų, neuroendokrininių navikų, smulkialąstelinio plaučių vėžio, ūminės mieloleukemijos ir kt. Dalies autorių duomenimis normalūs plazmocitai šio žymens neekspresuoja, tačiau kiti autoriai nurodo, jog nedidelė normalių plazminių ląstelių dalis pasižymi CD56 raiška (129,152-154). Piktybiniai plazmocitai priešingai nei normalūs, mielominės ligos atveju dažnai ekspresuoja CD56 žymenį. Atipinė CD56 žymens raiška naudojama mielominės ligos diagnozei nustatyti, taip pat kaip jau minėta derinyje su CD19 – skirti normalius ir piktybinius plazmocitus (14,134). Nustatyta, kad CD56 hiperekspresija taikant standartinių dozių chemoterapiją susijusi su nepalankia prognoze, tačiau taikant DDT nepalankios prognostinės įtakos nenustatyta (155,156).

Imunoglobulinų (Ig) lengvosios grandys (LG). LG yra B limfocitų sekretuojamų imunoglobulino molekulių struktūrinė dalis. Būna dviejų tipų – kappa arba lambda. B limfocitų ankstyvos diferenciacijos metu (pre-B limfocitų stadija), vyksta genų atsakingų už Ig sintezę persitvarkymai ir vienas iš šio proceso etapų yra LG tipo pasirinkimas (angl. light chain switch recombination). To pasekoje, konkretus B limfocitas gali sekretuoti tik vieno tipo Ig LG (157). Ši ypatybė plačiai naudojama nustatant B limfocitinių ir plazmocitinių neoplazijų kloniškumą (158,159). Plazminių ląstelių paviršiuje imunoglobulino molekulių raiška yra silpna. Didžiausia Ig LG koncentracija būna plazminių ląstelių citoplazmoje. Atliekant tėkmės citometrijos tyrimus intracitoplazminių Ig LG nustatymas kartu su kitomis imunofenotipinėmis aberacijomis naudojamas kloniškumo patvirtinimui ir yra labai svarbus skiriant

piktybines ir normalias ląsteles (160). Intracitoplazminių Ig LG aptikimui reikalinga ląstelės sienelės permeabilizacija ir žymenų fiksacija, todėl, kai kuriais atvejais stebimi ląstelės membranos žymenų raiškos pasikeitimai galintys apsunkinti duomenų analizę (161,162).

Kiti žymenys. Plazminių ląstelių identifikavimui, piktybinių plazminių ląstelių imunofenotipinėms aberacijoms nustatyti dėl skirtingo ekspresijos lygio ant normalių ir piktybinių PL dar naudojami CD27, CD81, CD20, CD127, CD28, CD200 žymenys (14,146,163-165). Dėl prognostinės reikšmės, be jau paminėto CD45, dar vertinama ir CD56, CD117, CD28, CD23 bei CD33 žymenų raiška (143,166-169).

2.2.4. Tėkmės citometrijos taikymas mielominės ligos klinikinėje praktikoje

Iki pastarojo meto klinikinėje praktikoje mielominės ligos tyrimui TC nebuvo plačiai naudojama. Tai lėmė kelios priežastys:

1 TC specifiškumo trūkumas - patologinės plazminės ląstelės (mielominės ligos kloniniai plazmocitai) neturi patognominio imunofenotipo;

2 Specifiški ir gana jautrūs įprastiniai diagnostikos ir ligos atsako vertinimo metodai (paraproteino analizė, imunohistochemija, gana specifiška maligninių plazminių ląstelių morfologija);

3 Dėl menko gydymo efektyvumo (ypatingai iki dešimto XX a. dešimtmečio pabaigos), retai būdavo gaunamos gilios ML remisijos, ir pilnai pakakdavo standartinių atsako vertinimo metodų jautrumo.

4 Tyrimui naudojam medžiaga – kaulų čiulpų aspiratas, nėra idealus mielominės ligos kinetikos vertinimui. Aspirato sudėtis priklauso nuo atskiedimo periferiniu krauju, židininio plazminių ląstelių išsidėstymo, jų adhezijos prie KČ stromos (14,170).

Pastaruoju metu TC taikymas mielominės ligos praktikoje užima vis svarbesnę vietą. Svarbiausi faktoriai paskatinę platesnį TC taikymą tiriant mielominę ligą buvo TC metodologijos specifiškumo ir ML gydymo efektyvumo padidėjimas. TC metodologijos specifiškumas tiriant plazmines ląsteles išaugo tobulėjant TC technikai ir sukaupus daugiau žinių apie plazminių ląstelių imunofenotipą. Atsiradus tėkmės citometrams gebantiems analizuoti 6 ir daugiau spalvų, ženkliai padidėjo galimybės specifiškai atskirti normalias ir piktybines plazmines ląsteles (171-173). Sparčiai progresuojant mielominės ligos gydymo technologijoms vis dažniau pasiekama pilna remisija, kuomet peržengiama įprastinių atsako vertinimo metodų, pagrįstų paraproteino nustatymu, jautrumo riba. Prieš dešimtmetį vyresniems pacientams PR būdavo pasiekama išskirtinai retais atvejais (<5%). Skiriant šiuolaikinę chemoterapiją, net vyresniems pacientams, kuriems netaikoma didelių dozių chemoterapija, pilna remisija pasiekama apie 30% atvejų. Šiuo metu klinikiniuose tyrimuose taikant „naujuosius vaistus“ (taikinių terapiją) ir DDT daugiau kaip ½ jaunesnių pacientų pasiekia pilną remisiją (22,92,98,174-176). Pastaruoju metu vykdomi intensyvūs tyrimai siekiant surasti geriausią metodą minimalios liktinės ligos nustatymui. PGR metodas ML MLL tyrimui klinikinėje praktikoje plačiau netaikomas. Šis metodas nors ir yra kiek jautresnis už TC, tačiau daliai pacientų dėl specifinių žymenų trūkumo negali būti taikomas, be to yra brangus ir užima daug laiko (177,178). Dėl didelio jautrumo, plataus prieinamumo ir galimybės metodą pritaikyti beveik visiems pacientams, TC tapo pasirinkimo metodu tiriant ML minimalią liktinę ligą (MLL). Pastaruoju metu paskelbti kelių klinikinių tyrimų duomenys rodantys MLL nustatymo (taikant TC) pranašumą prieš standartinius metodus (179). Ispanų atliktas tyrimas parodė, kad neigiama MLL prognostiškai palankesnė nei neigiama imunofiksacija (180). Kita studija patvirtino, kad TC metodu nustatyta remisija susijusi su ilgesniu laiku iki progresijos nei LLG santykio normalizacija grįstos griežtos PR (angl. stringent complete remission) patvirtinimas (181).

Svarbi praktinio TC taikymo sritis yra monokloninių gamapatijų rizikos nustatymas. Rizikos vertinimas remiasi imunofenotipinių žymenų raiškos tyrimu, normalių ir piktybinių KČ PL santykio įvertinimu, periferiniame kraujyje cirkuliuojančių aberantinių PL kiekio nustatymu. 2008 metais paskelbti didelės klinikinės studijos duomenys. Ištyrus 685 ML pacientus nustatyta, kad CD28 žymens raiška ir CD117 žymens raiškos nebuvimas buvo susijęs su agresyvesne ligos eiga bei sutrumpėjusiu išgyvenamumu (166). Yra duomenų, kad CD45 kaip ir CD56 sumažėjusi raiška turi neigiamą prognostinę reikšmę (143,152,155,168). Pavienės studijos pademonstravo tokių žymenų, kaip CD23, CD27, CD33, CD200 raiškos nustatymo prognostinę įtaką (167,169,182,183). Normalių ir piktybinių PL santykis kaulų čiulpuose gali padėti diferencijuoti ML nuo MNRG, bei įvertinti ligos prognozę pacientams, sergantiems naujai nustatyta mielomine liga. Pastebėta, kad didesnė išlikusi normalių PL proporcija kaulų čiulpuose susijusi su indolentine ligos eiga (184). > kaip 3% išlikusių normalių KČ PL padeda atskirti MNRG nuo ML (173,185). TC šiuo metu yra pasirinkimo metodas nustatant ML pacientų CPL kiekį. Klinikinė CPL nustatymo reikšmė bus aptarta vėliau. Taikant TC galima atskirti normalias ir piktybines PL, todėl metodas naudojamas klinikinėje praktikoje diferencijuojant reaktyvias plazmocitozes nuo piktybinės PL proliferacijos.

TC klinikinio panaudojimo sritys apibendrintos 2008 metais ekspertų bendro sutarimo rekomendacijose. Dokumente nurodytos 4 klinikinio TC taikymo sritys tiriant mielominę ligą ir kitas monoklonines gamapatijas (14):

1 Diferencinė diagnostika tarp ML, monokloninės neaiškios reikšmės gamapatijos (MNRG) ir reaktyvių būklių;

2 ML prognozės nustatymas (pvz. CD45/CD56/CD117/CD28 ekspresijos vertinimas, CPL nustatymas, normalių/piktybinių KČ PL santykio vertinimas);

3 MNRG ir rusenančios ML rizikos vertinimas;

4 Minimalios liktinės ligos nustatymas po gydymo ir griežtos pilnos remisijos (angl. Stringent complete remission) nustatymas.

2.2.5. Cirkuliuojančios plazminės ląstelės

Brandžios plazminės ląstelės žmogaus organizme gyvena kaulų čiulpuose. Sveikų žmonių periferiniame kraujyje naudojant įprastinius metodus (tepinėlis ir hematologinis analizatorius) paprastai plazminių ląstelių neaptinkama. Naudojant jautresnius metodus ar atliekant ląstelių koncentracijos procedūras randamas labai mažas kiekis plazminių ląstelių – mažiau nei 1 iš 1000 periferinio kraujo leukocitų (186). Paprastai tai yra ankstyvos diferenciacijos stadijos plazminės ląstelės migruojančios iš periferinių limfoidinių organų į KČ. Jų kiekis ženkliai padidėja tik esant reaktyvioms būklėms (pvz. infekcija, po vakcinacijos) (153,186,187). Reaktyvios plazminės ląstelės pasižymi nebrandžiu imunofenotipu, gebėjimu proliferuoti.

Išsivysčius plazminių ląstelių neoplazijai plazminių ląstelių aptikimas periferiniame kraujyje yra gerai žinomas blogos prognozės žymuo (46). Dar 1962 metais pastebėta, kad pas dalį pacientų sergančių mielomine liga mikroskopijos būdu periferiniame kraujyje galima aptikti plazminių ląstelių (188). Tobulėjant tyrimų metodologijoms ir atsiradus galimybei įvertinti kloniškumą, buvo nustatyti cirkuliuojantys kloniniai B limfocitai plazminių ląstelių neaplazijomis sergančių pacientų kraujyje (189). Paskutiniame XX a. dešimtmetyje didelį darbą vystant piktybinių cirkuliuojančių plazminių ląstelių nustatymo metodologijas, tirdami jų klinikinę reikšmę atliko Mayo (JAV) klinikos mokslininkų grupė. Naudodami imunofluorescentinės mikroskopijos metodą (IFM) jie įrodė, kad didesnis kloninių CPL kiekis susijęs su didesniu ligos aktyvumu (190). Analogiškus rezultatus taikydami IFM metodą gavo ir prancūzų mokslininkai (191). Kloninių CPL aptikimui Mayo klinikos mokslininkų grupė be IFM, taipogi panaudojo ir 3 spalvų TC, ASO-PGR metodus, juos palygino (132,192). 1997m. britų mokslininkų grupė taikydama

3 spalvų TC ir IgH-PGR metodus ištyrė 288 mielomine liga sergančius pacientus. Jie konstatavo, kad TC metodologija savo jautrumu ir specifiškumu prilygo PGR metodui, tačiau lenkė pastarąjį paprastumu ir platesniu taikymu. Britai nustatė, kad taikant gydymą CPL kiekis turėjo polinkį mažėti o esant ligos recidyvui vėl didėjo. Tačiau studija turėjo trūkumų – naudota TC metodologija nebuvo pakankamai jautri skiriant normalias ir malignines PL. Piktybiškumo nustatymui naudota žema CD45 žymens raiška, kuri kaip vėliau buvo įrodyta būdinga ir daliai normalių PL. Atliekant TC nebuvo vertinamas PL kloniškumas pagal lengvųjų grandžių kappa ir lambda ekspresiją (26). Paskutiniame XX a. dešimtmetyje smarkiai patobulėjo CPL aptikimo metodika, buvo nustatytas ryšys tarp monokloninių gamapatijų stadijos ir CPL aptikimo, tačiau tuo metu dar nebuvo aiškiai nustatyta prognostinė CPL aptikimo reikšmė (132,191).

2.2.6. Cirkuliuojančių plazminių ląstelių prognostinė reikšmė

Mayo klinikos (JAV) grupės mokslininkai tęsė anksčiau pradėtas studijas ir pateikė įrodymų, kad CPL aptikimas taikant IFM, TC metodologijas susijęs su blogesne monokloninių gamapatijų prognoze. 1996 metais publikuotame straipsnyje pateikti duomenys apie 254 pacientus, kuriems naujai diagnozuota mielominė liga. Nustatyta, kad prieš gydymą IFM metodu įvertintas CPL kiekis buvo nepriklausomas bendro išgyvenamumo prognostinis žymuo (193). Taikydami tą patį tyrimo metodą, Mayo grupės mokslininkai įrodė CPL aptikimo nepalankią prognostinę reikšmę ir kitoms plazminių ląstelių neoplazijoms – pirminei AL amiloidozei ir MGUS (194,195). Didelė studija publikuota 2005 metais perspektyviniu būdu vertino CPL nustatymo prognostinę įtaką pacientams prieš gydymą didelių dozių chemoterapija ir autologine kamieninių kraujodaros ląstelių transplantacija. Ištyrus 302 pacientus buvo patvirtinta, kad ≥ 10 CPL aptikimas tarp 50000 branduolėtų periferinio kraujo ląstelių yra nepriklausomas sutrumpėjusio bendro išgyvenamumo žymuo (24). Šioje studijoje taikyta TC metodologija nepasižymėjo dideliu jautrumu ir specifiškumu, nes buvo tirta tik 50000

branduolėtų, ląstelių. Piktybinių CPL aptikimui taikyti CD38 ir CD45 žymenys gana nespecifiški. Toliau analizuojant šios studijos duomenis buvo nustatyta, kad citogenetinės anomalijos ir CPL aptikimas yra nepriklausomi trumpesnio išgyvenamumo žymenys. Remiantis šiais duomenimis buvo pasiūlyta nauja prognostinė sistema, apjungiant citogenetines anomalijas bei CPL nustatymą. Ši sistema buvo prognostiškai reikšminga, vertinant pacientų, kuriems taikomas gydymas DDT, BI ir OS (17). Deja iki šiol kitose klinikinėse studijose šios sistemos tinkamumas nebuvo patikrintas.

Keli klinikiniai tyrimai atlikti siekiant įvertinti CPL ryšį su biologinėmis mielominės ligos savybėmis. Ištyrus 110 pacientų buvo įrodytas tiesioginis ryšys tarp padidėjusios CPL koncentracijos ir angiogenezės. Pas pacientus su didesniu CPL kiekiu buvo nustatytas statistiškai reikšmingai didesnis mikrokraujagyslių tankis KČ trepanobiopatuose (196). Kitoje 2007 metais publikuotoje studijoje nustatyta, kad pas visus pacientus turinčius prognostiškai nepalankią t(4;14) buvo aptiktos CPL, kai tuo tarpu tarp neturinčių šios translokacijos pacientų, CPL aptiktos tik 1/3 atvejų (197). Taip pat buvo aptiktas ryšys tarp CPL kiekio bei PL proliferacijos indekso (24), metaplazinio KČ infiltracijos plazminėmis ląstelėmis pobūdžio (198).

Paskutinėse apžvalgose ir ekspertų bendro sutarimo dokumentuose pažymima, kad CPL vertinimas yra perspektyvi klinikinių tyrimų sritis. Atlikti klinikiniai tyrimai įrodė, jog CPL gali būti naudojamos kaip nepriklausomas žymuo prognozuojant pacientų išgyvenamumą (14,141). Tačiau iki šiol CPL tyrimo metodologiją nėra standartizuota, trūksta žinių apie CPL prognostinę įtaką įvairioms pacientų grupėms. Iki šiol nėra charakterizuotos normalios mielomine liga sergančiųjų pacientų CPL, jų prognostinė reikšmė. Neįvertinta CPL kinetikos gydymo metu prognostinė reikšmė.

2.2.7. Plazminių ląstelių imunofenotipavimo sunkumai

Tėkmės citometrijos metodu tiriant plazmines ląsteles daug sunkumų sukelia jų imunofenotipinis polimorfiškumas. Atliekant imunofenotipinį tyrimą

plazmines ląsteles gana gerai apibrėžia CD38 ir CD138 žymenys, tik dalis jaunesnių PL (plazmablastų), neturi CD138 ekspresijos. Šių žymenų raiškos intensyvumas retai būna pakitęs ir neoplazijų atvejais. Kartu su CD138 ir CD38 vertinant ir CD45 žymenį, PL gali būti identifikuojamos praktiškai visais atvejais (14). Metodologiniai neaiškumai ir kontraversijos kyla aprašant plazminių ląstelių (normalių ir piktybinių) subpopuliacijas. Tikslus subpopuliacijų identifikavimas tiriant plazminių ląstelių neoplazijas yra būtinas, nes visais atvejais kaulų čiulpuose kartu su vėžinėmis ląstelėmis gyvuoja ir normalūs plazmocitai. Jų reikšmė tyrimo tikslumui nėra didelė, kai ligos masė yra didelė ir normalios PL sudaro iki kelių procentų visų plazmocitų. Tais atvejais, kai ligos masė yra maža (MLL tyrimas pasiekus remisiją po gydymo MNRG, pirminė AL amiloidozė, plazmocitoma su minimaliu KČ įtraukimu), normalių PL neteisingas vertinimas gali ženkliai iškreipti rezultatus. Per pastaruosius 15 metų literatūroje buvo aprašomi įvairuojantys, o kartais ir prieštaringi PL subpopuliacijų imunofenotipai. Skiriant normalias ir piktybines PL dažniausiai vertinami CD56 ir CD19 žymenys, dalis autorių rekomenduoja naudoti ir CD45 (14,141). Didelė dalis tyrėjų sumažėjusią CD45 žymens raišką PL subpopuliacijoje laiko tiesioginiu piktybiškumo įrodymu, nors lygiagrečiai pateikiami duomenys, kad CD45 raiška gali būti įvairi tiek piktybinių, tiek normalių PL subpopuliacijose (24,26,138,172,199). Neaiškumų iškyla ir vertinant normalių PL CD19 bei CD56 raišką. Daugelis autorių nurodo šių žymenų nehomogenišką ekspresiją ant normalių plazminių ląstelių - iki trečdaliao normalių PL neekspresuoja CD19, o 10-25% PL gali turėti CD56 raišką (29,131,134,141). Tačiau CD19-/CD56+ imunofenotipas klinikinėse studijose dažnai vienareikšmiškai pateikiamas kaip maligninis (177,185). Mūsų duomenimis iki šiol literatūroje nėra pateikta duomenų apie sveikų žmonių plazminių ląstelių subpopuliacijos, turinčios CD19-/CD56+ imunofenotipą kiekybines charakteristikas, biologinę reikšmę, palyginimą su analogiško imunofenotipo piktybinėmis ląstelėmis.

3. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODIKA

3.1. Tyrimo sumanymas

Tai analitinis stebėjimo tyrimas. Siekta patikrinti hipotezę, jog cirkuliuojančių plazminių ląstelių kinetikos vertinimas leistų anksčiau nei standartiniai metodai nustatyti atsaką į gydymą ir identifikuoti atsparius gydymui pacientus. Cirkuliuojančių periferiniame kraujyje plazminių ląstelių koncentraciją tyrėme prieš skirdami pirmąjį chemoterapijos kursą ir prieš antrąjį chemoterapijos kursą (3 pav.). Antrąjį CPL tyrimą atlikome pirmąją II-o chemoterapijos kurso dieną. Tuo metu normali kraujodara jau būdavo regeneravusi ir PK sudėtis buvo panaši, kaip ir pirmojo CPL tyrimo metu. Atskirai vertinome normalias CPL (nCPL) ir piktybines CPL (pCPL). Pirmojo ir antrojo CPL tyrimų rezultatai buvo lyginami tarpusavyje. Planuodami tyrimą nusprendėme suskirstyti pacientus į grupes pagal pCPL pokyčius po pirmojo chemoterapijos kurso. Pasirinkome skirstymą į 3 grupes remdamiesi klinicine patirtimi ir TC metodo ypatybėmis:

I grupė – tai pacientai, kuriems pirmojo ir antrojo tyrimo metu pCPL nebus nustatytos, t.y. bus mažiau nei tyrimo jautrumo riba

II grupė – pacientai, kurių pCPL po pirmojo gydymo kurso sumažėjo. pCPL sumažėjimas nustatomas, kai pCPL proporcija po gydymo buvo bent 50% mažesnė nei prieš gydymą. Šis slenkstinis dydis pasirinktas atsižvelgiant į TC metodologines ypatybes bei vengiant nespecifinių rezultatų.

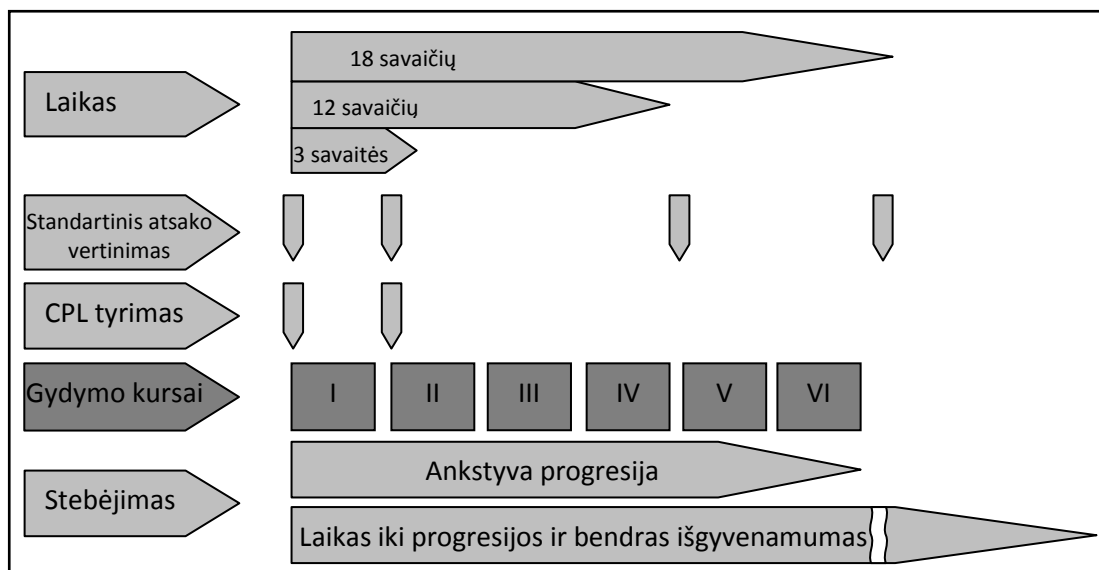
III grupė – pacientai, kurių pCPL po pirmojo gydymo kurso nekito ar padidėjo, t.y. visi pacientai nepasiekę bent 50% pCPL sumažėjimo po pirmojo gydymo kurso.

Pacientai buvo tiriami dėl ligos progresijos požymių prieš kiekvieną chemoterapijos kursą ir kas tris mėnesius stebėjimo periodu. Buvo atliekamas klinikinis ištyrimas, paraproteino, inkstų funkcijos, kalcio, kraujo rodiklių

laboratoriniai tyrimai. Pilnas ištyrimas, reikalingas EBMT atsako kategorijos nustatymui (esant būtinybei atliekant kaulų čiulpų ir radiologinius tyrimus), buvo atliekamas po pirmojo, po ketvirtojo kurso ir baigus gydymą.

Svarbiausia užduotis buvo identifikuoti didelės rizikos pacientus, sergančius agresyvia ir atsparia skiriamam gydymui mielomine liga, t.y. pacientus su aptinkamomis pCPL, kurių kiekis gydymo metu nemažėja (3 grupė). Pacientus, kuriems pCPL nebus aptiktos abiejų tyrimų metu, nutarėme išskirti į atskirą grupę. Šis sprendimas buvo paremtas klinicine logika ir leido atskirti agresyvia bei indolentine mielomine liga sergančius pacientus. Indolentinės eigos mielomine liga sergantys pacientai turi labai palankią prognozę, net ir stebint atsparumą gydymui – gerai žinomas nereaguojančios į gydymą ir neprogresuojančios ML fenomenas (angl. nonresponding, nonprogressing) (200,201). Tikėjomės, jog šių pacientų periferiniame kraujyje pCPL nebus aptinkamos ir jie pateks į pirmąją grupę. Pacientai patenkantys į antrąją grupę, kuriems gydymo metu pCPL mažėja, kliniškai apibūdinami kaip sergantys agresyvia, tačiau jautria skiriamam gydymui ML. Lygiagrečiai su eksperimentiniu metodu (TC), atsako į gydymą vertinimui (taip pat ir progresijos patvirtinimui), kaip „auksinis standartas“ buvo naudojami EBMT kriterijai. Šie kriterijai daugiausia remiasi paraproteino kiekio kitimu (3 lentelė) (21). Atsako į gydymą vertinimui naudojant standartinius kriterijus, medianinis laikas iki pirmojo atsako nustatymo yra 6 savaitės (84). Atsako į gydymą vertinimas tiriant pCPL turi pranašumą lyginant su standartiniu metodu. Pirmiausia - pCPL kinetika nepasižymi paraproteinui būdinga inercija (31), tai leidžia atsaką įvertinti anksčiau. Antra – galimybė atskirti indolentinės eigos geros prognozės ir agresyvios klinikinės eigos ML.

3 pav. Tyrimo eiga



CPL – cirkuliuojančios plazminės ląstelės

3.2. Tiriamieji

Pacientai buvo įtraukiami į studiją jei atitiko įtraukimo kriterijus:

- 3.2.1. Suaugę pacientai –18 metų amžiaus ir vyresni;
- 3.2.2. Sergantys recidyvavusia ar asparia gydymui (nustatyta remiantis EBMT kriterijais (21)) mielomine liga;
- 3.2.3. Iki tol dėl mielominės ligos skirta bent 1 eilės chemoterapija
- 3.2.4. Planuojamas gydymas VUL „SK“ chemoterapija su bortezomibu (bortezomibo monoterapija, bortezomibo/deksametazono schema, bortezomibo/deksametazono/doksorubicino schema) ar VAD (vinkristinas/deksametazonas/doksorubicinas);
- 3.2.5. Pasirašė informuoto asmens sutikimo formą.

Įtrauktiems pacientams gydymą skyrė ir gydymo taktiką nustatė gydantis gydytojas.

Sveiki kaulų čiulpų donoriai (SD) įtraukti į tyrimą kaip kontrolinė grupė. SD į studiją buvo įtraukiamas kai pasirašydavo asmens sutikimo formą. Paraproteinemijos ekskliudavimui buvo atliekamas imunofiksacijos tyrimas. Papildomos intervencijos sveikiems donorams nebuvo atliekamos. Kaulų čiulpų aspiracija jiems atlikta kaip standartinio ištyrimo dalis prieš kamieninių kraujodaros ląstelių donavimą. Į tyrimą įtraukėme 11 SD – penkias moteris ir šešis vyrus. Medianinis SD amžius buvo 43 metai (19 – 74).

3.3. Tiriamosios populiacijos pasirinkimo pagrindimas

Į tyrimą suplanavome įtraukti 40 recidyvavusia, ar atsparia prieš tai skirtam gydymui, mielomine liga sergančių pacientų. Sprendimo motyvai aptarti žemiau.

Dėl pastaraisiais metais atsiradusių ypač efektyvių vaistų, didžioji dalis (~90%) pirmos eilės gydymą gaunančių pacientų (sergantys naujai diagnozuota ML) pasiekia klinikinį atsaką ir ligos progresija gydymo metų pasitaiko retai (202-204). Į tyrimą įtraukus šiuos pacientus hipotezės patikrinimui būtų reikalinga labai didelė pacientų imtis. Tiriant pacientus, gaunančius pirmos eilės gydymą, dėl ilgos pirmosios remisijos būtų reikalingas ilgas stebėjimas nustatant LIP ir BI. Įvertinus pacientų srautus VUL „SK“, tyrimas tokiu atveju užtruktų apie 10 metų. Klinikinis šio tyrimo aktualumas nebūtų didelis, nes kaip jau minėta anksčiau atsparumas šiuolaikiniam pirmos eilės gydymui yra gana retas.

Gydant RA ML pacientus chemoterapija su bortezomibu apie 30% pacientų būna atsparūs gydymui (84,205,206). Tai leidžia sumažinti tiriamųjų imtį ~ 5 kartus, lyginant su pirmosios gydymo eilės pacientais. RA ML pacientų gydomų moderniais vaistais medianinis laikas iki progresijos nustatytas klinikinėse studijose būna iki 1 metų, o naujai diagnozuotų ML pacientų, gydytų pirmos eilės chemoterapija siekia 3 metus ir daugiau (207,208).

Klinikinė tyrimo reikšmė taipogi didesnė tiriant RA ML sergančius pacientus, kadangi atsparumo gydymui dažnis yra gerokai didesnis nei pirmos gydymo eilės atveju. Recidyvavusios ar atsparios prieš tai skirtam gydymui mielominės ligos gydymui gali būti taikomi bent 5 – 6 skirtingi gydymo būdai (18,209). Gydymo taktikos parinkimas yra menkai apibrėžtas. Antros ir tolesnės eilės gydymas skiriamas daugiausiai atsižvelgiant į vaistų toksiškumą ir prieš tai skirtą gydymą. Nėra atrasti biologiniai žymenys, kurie leistų patikimai prognozuoti ar anksti nustatyti atsparumą skiriamam gydymui. Skiriant neefektyvų gydymą šiems pacientams gresia ligos progresijos sąlygotos komplikacijos. Jos gali lemti letalias išeitas. Taip pat veltui eikvojami materialiniai resursai skiriant brangius, tačiau neefektyvius, vaistus. Anksti nustatčius atsparumą gydymui padidėja galimybė taikyti alternatyvų, potencialiai veiksmingą gydymą.

Teoriškai apskaičiavome tyrimo galią naudodami hipotetinius parametrus. Vertinome eksperimentinio metodo taikymą ankstyvos progresijos prognozavimui. Taikytas dvipusis reikšmingumo lygmuo $p=0,05$. Remdamiesi klinikine praktika nustatėme pageidautinus eksperimentinio metodo jautrumo ir specifiškumo lygmenis atitinkamai 80% ir 80%. Įvertinus anksčiau atliktus tyrimus tikėjomės, kad gydymo metu progresuos 30% RA ML pacientų. Naudodami Harvardo Universiteto mokslininkų (Cambridge, JAV) parengtą internetinę imties dydžio skaičiuoklę (210) apskaičiavome, kad naudojant aukščiau nustatytas sąlygas ir įtraukus 20 pacientų, tyrimo galia būtų 71% o įtraukus 40 pacientų pasiektų 97%.

Taip pat apskaičiavome imties dydžio įtaką „laiko iki įvykio“ tipo studijos statistinei galiai. Naudojome šias hipotetines prielaidas: pacientų įtraukimo į tyrimą trukmė 24 mėn., medianinė stebėjimo trukmė 18 mėn., medianinis laikas iki progresijos 10 mėn., teigiamo testo rezultato santykinė rizika (angl. hazard ratio) – 2,5. Apskaičiavome, kad įtraukus 20 pacientų tyrimo galia aptinkant statistiškai reikšmingus rezultatus būtų 68%, o įtraukus 40 pacientų pasiektų 93%.

Kadangi iki šiol nebuvo atlikti panašūs tyrimai, naudojome naują TC metodiką, imties dydį apskaičiavome remdamiesi hipotetiniais parametrais. Įtraukę 20 pacientų, nusprendėme atlikti tarpinę statistinę analizę ir patikslinti galutinį imties dydį. Tarpinė statistinė analizė patvirtino tyrimo perspektyvumą, todėl nuspręsta tęsti tyrimą įtraukiant 40 pacientų.

3.4. Plazminių ląstelių imunofenotipavimas: tėkmės citometrijos metodika

Norint atskirai analizuoti aCPL ir nCPL viename mėginyje buvo reikalinga labai jautri ir specifiška TC metodologija. Iki pradedant mūsų tyrimą PL tirti daugiausia naudota 4 spalvų TC metodologija pasižyminti dideliu jautrumu, tačiau ribotu specifiškumu atskiriant normalias ir piktybines PL (134,211). Siekdami didesnio specifiškumo tyrimui parengėme naują PL imunotipavimo metodologiją. Tyrimui panaudojome tėkmės citometrijos aparatą gebantį analizuoti 6 spalvas. Tai leido mums viename mėgintuvėlyje panaudoti žymenų derinius, užtikrinančius optimalų PL identifikavimą, imunofenotipinių aberacijų nustatymą ir kloniškumo įvertinimą. Optimizuodami naująją TC metodiką, planavome iširti sveikų kamieninių kraujodaros ląstelių donorų PK ir KČ plazmines ląsteles.

KČ ir PK mėginiai buvo imami į K₂ – EDTA Vacutainer mėgintuvėlį (BD, Plymouth). Mėginiai buvo ruošiami naudojant viso kraujo lizavimo metodiką, siekiant išlaikyti nepakitusias, lyginant su pradiniu mėginiu, ląstelių populiacijų proporcijas. Mes nenaudojome Fikoli gravitacinės ląstelių atskyrimo ir koncentracijos procedūros dėl galimų paklaidų vertinant mažas ląstelių populiacijas (134,172,211).

Plazminių ląstelių imunotipavimui mes naudojome ląstelių paviršiaus žymenis ir intracitoplazminį imunoglobulinų lengvųjų grandžių dažymą. Ląstelių sienelių permeabilizavimas buvo atliekamas Fix/Perm (BD, San Chosé) reagentais (212). Mes pasirinkome intracitoplazminių lengvųjų grandžių vertinimą kloniškumo analizei, nes plazminių ląstelių diferenciacijos

stadijoje jų ekspresija žymiai intensyvesnė už ląstelės paviršiaus lengvųjų grandžių raišką (31). Priklausomai nuo naudojamo antikūnų tipo, visi mėginiai buvo dažomi su izotipiniais kontroliniais antikūnais tam, kad įvertinti slenkstinį fluorescencinio signalo intensyvumą kiekvienam fluorochromui ir nespecifinį nusidažymą.

Mėginiai buvo inkubuojami dažymui 2 mėgintuvėliuose naudojant šiuos žymenų derinius (FITC / PE / PerCP-Cy-5.5 / APC / PE-Cy7 / APC-Cy7): CD56 / CD138 / CD45 / CD19 / CD38 / CD20 ir cLambda / cKappa / CD138 / CD38 / CD56 / CD19. Visi monokloniniai antikūnai buvo pagaminti BD, San Chosė išskyrus CD19-APC, pagamintą Pharmingeno, Palo Alte (Pharmingen, Palo Alto). Mūsų pasirinktas žymenų derinys visiškai atitiko vėliau publikuoto Europos mielominės ligos tinklo (European Myeloma Network (EMN)) ekspertų bendro sutarimo rekomendacijas (14). Mėginiai buvo analizuojami FACSCanto 6 spalvų tėkmės citometru aprūpintu FACSDiVa v6.1.2 duomenų surinkimo ir apdorojimo programine įranga (BD, San Chosė, JAV).

Ląstelės iš mėgintuvėlio buvo analizuojamos, kol baigdavosi mėginys ar pasiekus maksimalų numatytą bendrą gyvų ląstelių (BGL) kiekį – 1×10^6 . Analizuojant duomenis, teigiama žymens raiška būdavo buvo nustatoma, kai juo nusidažydavo bent 20% tiriamos populiacijos ląstelių (29). Atskirais atvejais analizuota ir mažesnė žymens raiška.

Plazminių ląstelių imunofenotipas buvo nustatomas šia tvarka: ląstelės buvo apibrėžiamos (angl. gating) pagal CD138 ir CD38 raišką ir dar kartą patikrinamos pagal šių žymenų raiškos ir šoninės šviesos sklaidos intensyvumą. Vėliau vertintas apibrėžtų plazminių ląstelių CD19 ir CD56 žymenų raiškos intensyvumas ir buvo išskiriamos 4 plazminių ląstelių subpopuliacijos:

1. CD19+/CD56- – normalios plazminės ląstelės (nPL);
2. CD19-/56+ – aberantinės plazminės ląstelės (aPL);

3. CD19-/CD56- – dvigubai neigiamos plazminės ląstelės (dnPL);

4. CD19+/CD56+ – dvigubai teigiamos plazminės ląstelės (dtPL).

Kaulų čiulpų mėginiuose aptiktas 4 plazminių ląstelių subpopuliacijas atitinkamai įvardijome kaip aKČPL, nKČPL, dnKČPL ir dtKČPL. Piktybinės ML pacientų plazminių ląstelių populiacijos buvo žymimos p raide (pKČPL). Tais atvejais, kai buvo svarbus tikslus piktybinės populiacijos imunofenotipas, buvo naudojamas dvigubas žymėjimas – p(a)KČPL, p(dn)KČPL. Kadangi sveikų žmonių periferiniame kraujyje cirkuliuojančių plazminių ląstelių imunofenotipinė sudėtis pagal CD19 ir CD56 žymenų raišką buvo gana vienalytė, jų aprašymui naudojome paprastesnę sistemą: CD19+/CD56- – normalios cirkuliuojančios plazminės ląstelės (nCPL), aberantine žymenų raiška (CD19-/CD56±) pasižyminti monokloninė cirkuliuojančių plazminių ląstelių subpopuliacija buvo įvardijama kaip piktybinė - pCPL.

Kiekviena iš naujai apibrėžtų subpopuliacijų buvo atskirai vertinamos pagal CD45 ir CD20 žymenų švytėjimo intensyvumą. Siekiant užtikrinti tyrimo specifiškumą, minimalus ląstelių kiekis KČ ir PK plazminių ląstelių populiacijai apibrėžti buvo atitinkamai nustatytas kaip 100 ir 20 (14,213). Mažesnės plazminių ląstelių populiacijos nevertintos ir tyrime buvo aprašomos kaip neigiamos.

Iki šiol prieštaringai vertinama CD45 žymens raišką plazminių ląstelių subpopuliacijose (14,24). Mūsų tyrime CD45 žymens ekspresija buvo atskirai vertinta visose nustatytyose PL subpopuliacijose, siekiant nustatyti žymens tinkamumą normalių ir piktybinių plazminių ląstelių diferencijavimui. Pagal vidutinį CD45 žymens fluorescencijos intensyvumą (VFI) PL subpopuliacijos buvo suklasifikuotos šia tvarka: VFI žemesnė nei izotipinės kontrolės, 0 – 1 log aukštesnė nei izotipinės kontrolės, 1 – 2 log aukštesnė nei izotipinės kontrolės, 2 – 3 log aukštesnė nei izotipinės kontrolės ir atitinkamai žymėta kaip CD45-, CD45+, CD45++ ir CD45 +++ (5 pav.).

Ląstelių membranos permeabilizacija tiriant intracitoplazminę imunoglobulino lengvųjų grandžių raišką sąlygoja ląstelės paviršiaus žymenų raiškos pokyčius lyginant su nepermeabilizuotomis ląstelėmis (161,162). Dėl šios priežasties kiekybinės ir imunofenotipinės PL subpopuliacijų charakteristikos buvo analizuojamos remiantis duomenimis surinktais iš mėgintuvėlio be ląstelės membranos permeabilizacijos. Kitas mėgintuvėlis buvo naudojamas imunoglobulino lengvųjų grandžių raiškos nustatymu pagrįstai PL subpopuliacijų kloniškumo analizei (5 pav.). PL subpopuliacija buvo vertinama kaip kloninė, kai nustatytas kapa/lambda imunoglobulino lengvųjų grandžių santykis būdavo $> 4:1$ arba $< 1:3$ (14,134). PL subpopuliacija buvo vertinama kaip piktybinė remiantis paviršiaus žymenų aberantine ekspresija bei intracitoplazminių lengvųjų grandžių monokloniškumo nustatymu.

Plazminių ląstelių kiekybinės charakteristikos pateiktos kaip PL ir bendro gyvybingų ląstelių (BGL) kiekio santykis.

3.5. Statistiniai metodai

Tyrimo metu surinktų duomenų statistinė analizė atlikta naudojant statistinių programų paketu **SPSS v. 17.0**. Kiekybinių kintamųjų aprašymui naudoti **medianos** ir **vidurkio** rodikliai. Duomenų sklaidos apibūdinimui, atitinkamai – **imties plotis** (angl. range) ir **vidutinis kvadratinis nuokrypis** (angl. standart deviation).

Grupių tarpusavio palyginimui naudojome **Vilkoksono ranginį kriterijų** (angl. Wilcoxon signed ranks test), **Kruskalio-Voliso testą** (Kruskal-Wallis test) ar **chi-kvadrat metodą** atsižvelgdami į duomenų pobūdį (kiekybiniai ar kategoriniai) ir lyginamų grupių kiekį.

Ryšiu tarp požymiu nustatyti **vertinome Spirmano ranginį koreliacijos koeficientą** (angl. Spearman correlation coefficient) . Koreliacija vertinta kaip silpna ($r < 0,3$), vidutinė ($r 0,3-0,6$), stipri ($r > 0,6$).

Tyrime naudoti 2 laiko iki įvykio parametrai – **bendras išgyvenamumas** (BI) ir **laikas iki progresijos** (LIP). BI apibrėžtas kaip laiko intervalas tarp paciento įtraukimo į studiją ir mirties, gyvųjų pacientų duomenys buvo cenzūruojami paskutinio apsilankymo momentu. Laikas iki progresijos apibrėžtas kaip laiko intervalas tarp įtraukimo į studiją ir pagal EBMT kriterijus nustatytos ligos progresijos. Pacientui mirus iki išsivystant ligos progresijai, duomenys buvo cenzūruojami mirties metu.

Ankstyvą progresiją (AP) apibrėžėme kaip ligos progresiją prasidėjusią per 126 dienas nuo gydymo pradžios, t.y. nebaigus suplanuoto gydymo (šeši 21 dienos trukmės chemoterapijos kursai).

Laiko iki įvykio kreivės sukurtos taikant **Kaplano - Mejerio** (Kaplan - Meier) metodą. Skirtumai tarp kreivių vertinti naudojant **log-rank** testą. Daugialypei laiko iki įvykio analizei naudotas **Kokso proporcingos rizikos modelis** (angl. Cox's proportional hazards model).

pCPL kinetikos metodikos jautrumą ir specifiškumą identifikuojant atsparius skiriamam gydymui ML atvejus nustatėme naudodami **ROC** (angl. Receiver operating characteristic) metodą.

Daugiamatė faktorių susijusių su AP analizė buvo atlikta pritaikius **binarinės regresijos** (angl. logistic regression) modelį. Dėl santykinai mažos imties galutinis regresijos modelis sudarytas pasitelkus **tiesioginės laipsniškos atrankos** (stepwise forward (Wald)) metodą.

4. TYRIMO REZULTATAI

4.1. Tiriamųjų charakteristikos

42 suaugę pacientai sergantys recidyvavusia ar atsparia gydymui mielomine liga ir pasirašę informuoto asmens sutikimo formą buvo įtraukti į perspektyvinę studiją. Medianinis RA ML pacientų amžius buvo 59 metai. Pacientų duomenys apibendrinti 1 lentelėje. 39 pacientai buvo gydyti chemoterapija su bortezomibu (2 – bortezomibo monoterapija, 35 – bortezomibo ir deksametazono deriniu, 2 bortezomibo deksametazono ir doksorubicino deriniu), 3 pacientai gydyti VAD polichemoterapija (vinkristinas, doksorubicinas ir deksametazonas). 13 pacientų po gelbstinčiosios chemoterapijos skirtas konsolidacinis gydymas didelių dozių chemoterapija su autologine periferinių kamieninių kraujodaros ląstelių transplantacija (PKKLT). Medianinis stebėjimo laikas – 21 mėn. (1-49). Stebėjimo metu 35 pacientams patvirtinta ligos progresija, 25 pacientai mirė. Apskaičiuotas medianinis BI buvo 31 mėn. (95% PI 13,7 –47,7) o LIP – 8 mėn. (95% PI 7,3 – 9,7).

Į tyrimą įtraukėme 11 sveikų kaulų čiulpų donorų. Medianinis sveikų donorų (SD) amžius buvo 47 metai (19-47). Įtraukti 6 vyrai ir 5 moterys. Tirti donoriai neturėjo jokių su plazminių ląstelių patologija susijusių simptomų. Visų SD serumo imunofiksacijos tyrimas buvo neigiamas.

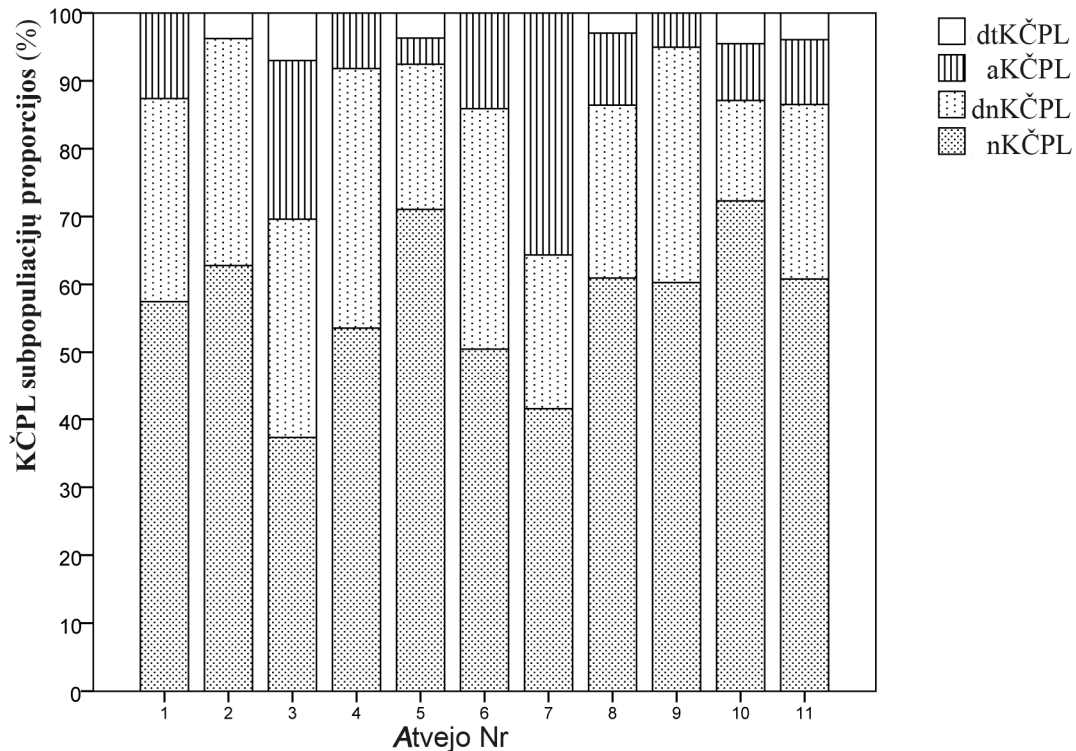
4 lentelė Pacientų charakteristikos

Pacientų skaičius		42
Amžiaus mediana (plotis)		57 (39-74)
Vyrai / moterys		27/15
M-proteino tipas	Ig G N (%)	26 (61.9%)
	Ig A N (%)	6 (14.3%)
	Ig D N (%)	2 (4.8%)
	Lengvųjų grandinių var. N (%)	3 (7.1%)
	Nesekretuojanti/oligosekrecinė N (%)	5 (11.9%)
Albuminas g/l (plotis)		43.3 (24.4 – 53.0)
Inkstų nepakankamumas (kreatininas > 177 µmol/l) N(%)		6 (14.3)
Hemoglobinas g/l (plotis)		113 (72-153)
Hiperkalcemija (Ca ⁺⁺ > 1.3 mmol/l)		7 (16,7%)
β2 mikroglobulinas mg/l (plotis)		4.01 (1.99 – 45.4)
Medianinis laikas nuo diagnozės mėn. (plotis)		25 (3-172)
Ankstesnio gydymo eilės N (plotis)		2 (1-5)
Anksčiau taikyta didelių dozių chemoterapija N (%)		16 (38.1%)

4.2. Sveikų donorų KČPL subpopuliacijų kiekybinės charakteristikos

TC metodu nustatyta medianinė KČ PL procentinė dalis sveikų donorų mėginiuose buvo 0,34% (0,1 – 0,84%). CD19/CD56 lange plazminės ląstelės buvo linkusios formuoti 4 atskiras subpopuliacijas su gana ryškia riba tarp CD19- ir CD19+ , bei laipsniškesniu perėjimu nuo CD56 neigiamų prie CD56 žymenį ekspresuojančių PL (5 pav.). nKČPL ir dnKČPL subpopuliacijos buvo aptiktos visuose mėginiuose, t.y. visais atvejais viršijo nustatytą minimalią 100 ląstelių ribą. aKČPL subpopuliacija nustatyta 10 iš 11 tirtų SD. dtKČPL buvo aptinkamos rečiausiai ir sudarė „teigiamas“ subpopuliacijas tik pas 6 SD (4 pav.).

4 pav. Pagal CD19 ir CD56 raišką apibrėžtų plazminių ląstelių subpopuliacijų proporcijos* sveikų donorų kaulų čiulpuose.



*subpopuliacijos dalis tarp visų aptiktų plazminių ląstelių

dtKČPL – dvigubai teigiamos kaulų čiulpų plazminės ląstelės

(*CD19+/CD56+*), *dnKČPL* – dvigubai neigiamos kaulų čiulpų plazminės

ląstelės (*CD19-/CD56-*), *aKČPL* – “aberantinės” kaulų čiulpų plazminės

ląstelės (*CD19-/CD56+*), *nKČPL* – “normalios” kaulų čiulpų plazminės

ląstelės (*CD19+/CD56-*)

CD138+/38+/CD19+/CD56- ląstelės (*nKČPL*) įprastai įvardijamos kaip imunofenotipiškai normalios plazminės ląstelės (14,131), mūsų tyrime buvo didžiausia SD KČPL subpopuliacija. Medianinė šių ląstelių dalis tarp visų aptiktų plazmocitų buvo 60,3% (37,3 – 72,3). Svarbus radinys buvo tas, kad pas 2 SD šios ląstelės sudarė mažiau kaip pusę visų KČPL.

CD138+/38+/CD19-/CD56+ žymenų raiška pasižymintys plazmocitai (*aKČPL*) vertinami kaip atipiniai. Tokia ląstelės paviršiaus žymenų raiška yra

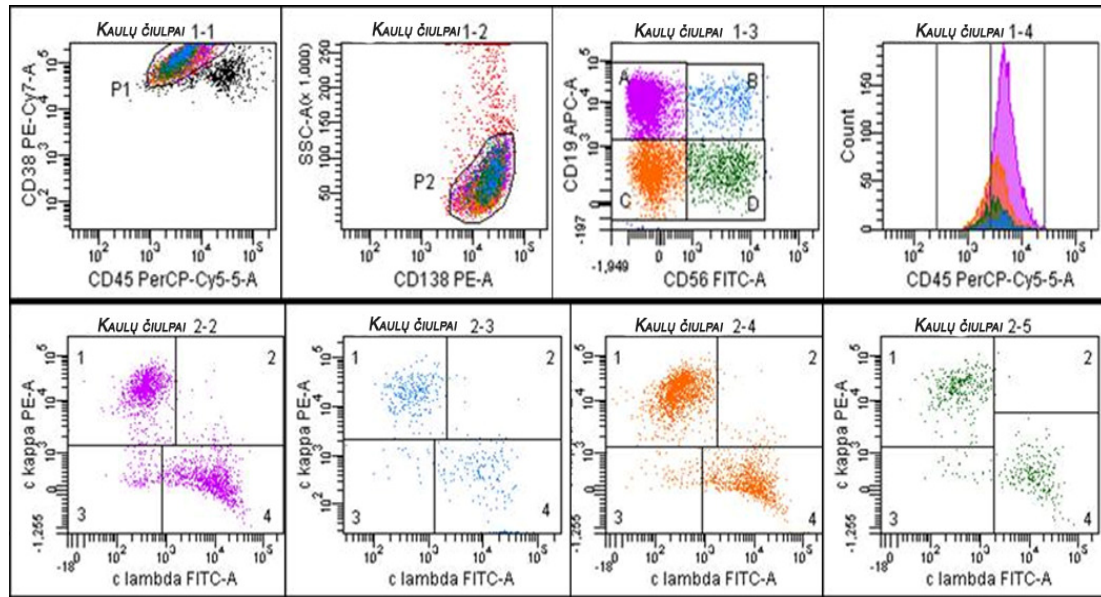
būdinga mielominę ligą sukeliančiam piktybinių plazmocitų klonui (14). Mes nustatėme, kad ši imunofenotipą turinčių KČPL subpopuliaciją viršijo 100 ląstelių pas 10 iš 11 SD. Vienintelio donoro, kurio aKČPL subpopuliacija vertinta kaip neigiama, KČ mėginyje buvo aptikta 70 tokių ląstelių. Medianinė aKČPL dalis tarp visų KČPL buvo 9,6% (0 – 35,7), o medianinis aptiktų CD19-/CD56+ ląstelių skaičius siekė 218 (70 – 983). Pas 2 SD aKČPL sudarė > 20% visų KČPL.

CD138+/38+/CD19-/CD56- (dnKČPL) imunofenotipas taip pat yra atipinis ir būdingas piktybiams plazmocitams (nustatomas ~ ¼ mielominės ligos atvejų (214)). Ši KČPL subpopuliacija buvo antra pagal dydį pas mūsų tirtus SD, jos medianinė dalis tarp visų KČPL buvo 29,9% (14,8 – 38,3). 10 iš 11 atvejų pas SD ši subpopuliacija viršijo kliniškai svarbią 20% ribą.

CD138+/38+/CD19+/CD56+ (dtKČPL) subpopuliacija buvo mažiausia ir rečiausiai aptinkama. Tik 6 SD turėjo 100 ląstelių viršijančią dtKČPL subpopuliaciją. Medianinė šios subpopuliacijos ląstelių dalis tarp visų nustatytų PL buvo 3% (0 – 7). Šis imunofenotipas nebūdingas piktybinėms plazminėms ląstelėms, todėl TC praktikoje dtKČPL subpopuliacija nesukelia sunkumų diferencijuojant normalias ir piktybines PL.

Siekdami įrodyti, jog mūsų aptiktos atipinio imunofenotipo PL nėra kloninės mes ištyrėme kappa ir lambda lengvųjų grandžių intracitoplazminę raišką visose vertintose subpopuliacijose. Nustatėme, kad visos analizuotos SD KČPL subpopuliacijos buvo polikloninės (1 pav.). Medianinis intracitoplazmiškai nustatytų lengvųjų kappa/lambda grandžių santykis nKČPL, aKČPL, dnKČPL ir dtKČPL subpopuliacijose buvo atitinkamai 1,3 (1 – 2,4), 1,8 (0,9 – 2,9), 1,9 (1,7 – 2,7) ir 1,2 (0,9 – 1,4).

5 pav. Sveikų donorų kaulų čiulpų plazminių ląstelių imunofenotipinė analizė.



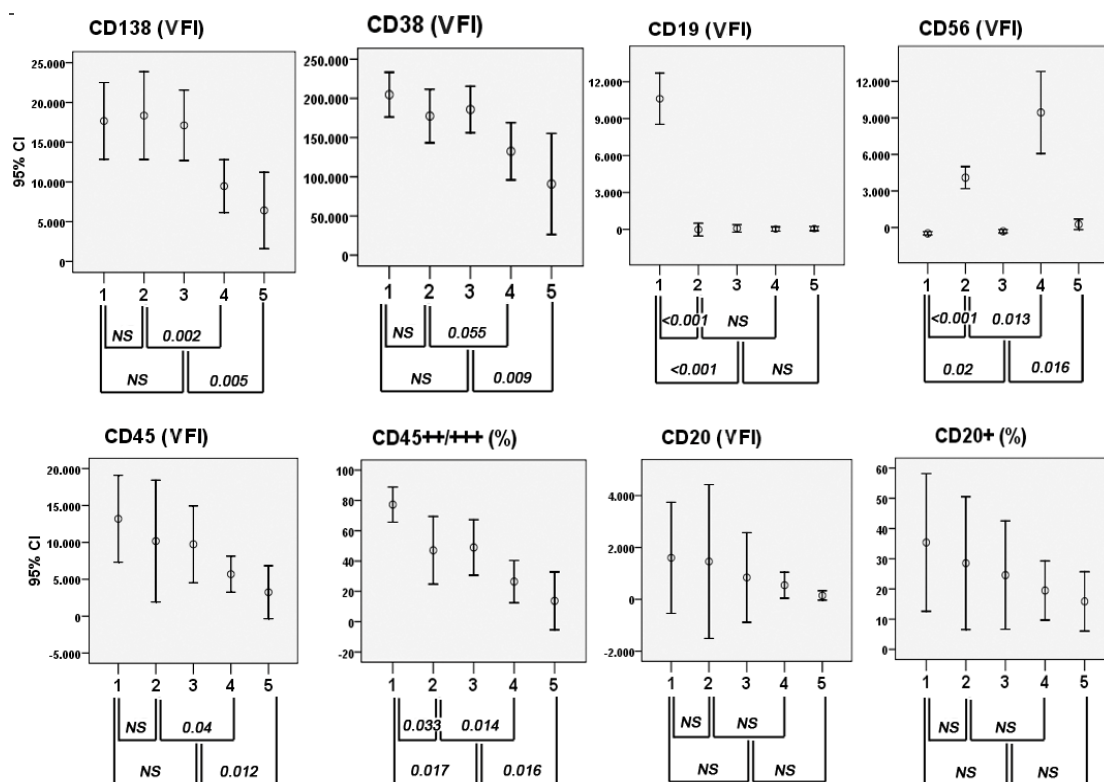
Plazminės ląstelės buvo apibrėžtos pagal CD138 ir 38 raišką (KČ 1-1 ir 1-2 vaizdai). KČ vaizde 1-4 matoma skirtingų subpopuliacijų CD45 žymens raiška. Vėliau įvertinus šių ląstelių CD19 ir CD56 žymenų raišką apibrėžtos 4 plazminių ląstelių subpopuliacijos: A (nKČPL), B (dtKČPL), C (dnKČPL) ir D (aKČPL) (KČ vaizdas 1-3). Įvertinta 4 subpopuliacijų intracitoplazminė kappa ir lambda lengvųjų grandžių raiška (visose subpopuliacijose polikloninė) (KČ vaizdai nuo 2-2 iki 2-5).

4.3. Sveikų donorų atipinio imunofenotipo KČPL subpopuliacijų palyginimas su ML pacientų piktybinių KČPL subpopuliacijomis

Mes palyginome SD aKČPL ir dnKČPL subpopuliacijų imunofenotipines savybes su ML pacientų atitinkamą imunofenotipą turinčiomis monokloninių KČPL populiacijomis. Lygindami šias subpopuliacijas siekėme rasti ląstelės paviršiaus žymenų ekspresijos skirtumus ant normalių ir piktybinių PL turinčių analogišką CD19 ir CD56 raišką. Lyginome CD138, CD38, CD19, CD56, CD45 ir CD20 žymenų vidutinį fluorescencijos intensyvumą (VFI) bei CD20 ir CD45 žymenis ekspresuojančių plazminių ląstelių proporciją. SD nKČPL subpopuliacija buvo pasirinkta palyginimui kaip referentinė normalų imunofenotipą turinčių PL subpopuliacija (6 pav.).

aKČPL ir dnKČPL subpopuliacijos buvo nustatytos atitinkamai pas 10/11 ir 11/11 SD. Iš 42 į studiją įtrauktų ML pacientų, duomenys apie tirtų žymenų VFI buvo prieinami 27. Toliau lyginome šių ML pacientų ir SD KČPL subpopuliacijas. Tarp 27 tirtų ML pacientų 21 turėjo monokloninę (m)aKČPL ir 6 (m)dnKČPL subpopuliaciją.

Pav. 6 Sveikų donorų ir mielomine liga sergančių pacientų kaulų čiulpų plazminių ląstelių žymenų raiškos charakteristikų palyginimas



Grafikuose pavaizduotas kaulų čiulpų plazminių ląstelių (KČPL) subpopuliacijose nustatytas žymenų ekspresijos vidutinio fluorescencijos intensyvumo (VFI) arba subpopuliacijos ląstelių ekspresuojančių žymenų vidutinės proporcijos (%) vidurkių pasikliautinųjų intervalų paklaidų diagramos (angl. error bar). 1 – sveikų donorų (SD) nKČPL; 2 – SD aKČPL; 3 – SD dnKČPL; 4 – ML pacientų P(a)KČPL; 5 – ML pacientų p(dn)KČPL

CD138

Šis žymuo aptinkamas praktiškai ant visų PL. Jo ekspresija didėja plazminei ląstelei bręstant (133,138). Mūsų studijoje tirtose SD KČPL subpopuliacijose CD138 raiška ženkliau nesiskyrė. Kloninės p(a)KČPL ir p(dn)KČPL ML pacientų subpopuliacijos pasižymėjo statistiškai reikšmingai žemesniu VFI nei atitinkamos sveikų donorų KČPL subpopuliacijos. Šie mūsų radiniai prieštarauja anksčiau skelbtiems duomenims, kur nustatyta piktybinių PL CD138 žymens hiperekspresija (153).

CD38

Literatūroje nurodoma, jog piktybinių PL CD38 raiška yra mažesnė nei normalių PL (14,153,215). Tarp mūsų tirtų PL subpopuliacijų mažiausias CD38 žymens VFI buvo nustatytas piktybinėse ML pacientų KČPL subpopuliacijose. Tačiau SD aKČPL ir dnKČPL subpopuliacijos taipogi turėjo žemesnės CD38 raiškos tendenciją lyginant su SD nKČPL subpopuliacija. Turint omenyje šį radinį, CD38 žymens sumažėjusi ekspresija neturėtų būti vertinama kaip PL piktybiškumo žymuo.

CD19

Šio žymens raiška buvo vienodai žema SD aKČPL, dnKČPL bei ML pacientų (m)aKČPL ir (m)dnKČPL subpopuliacijose. Vienintelė SD nKČPL subpopuliacija turėjo homogeniškai aukštą CD19 VFI. Taigi CD19 žymuo puikiai išskiria SD nKČPL iš kitų subpopuliacijų, tačiau negali diferencijuoti netipine žymenų raiška pasižyminčių normalių ir piktybinių PL.

CD56

CD56 žymens VFI buvo reikšmingai didesnis kloninėse ML pacientų subpopuliacijose, negu atitinkamose SD KČPL subpopuliacijose. Žymi CD56 hiperekspresija gali būti vertingu piktybiškumo požymiu, kai piktybinė PL populiacija turi p(a)KČPL imunofenotipą (CD19-/56+). Tais atvejais, kai piktybinė subpopuliacija turi p(dn)KČPL imunofenotipą, kiek intensyvesnė už

normalios SD dnKČPL subpopuliacijos CD56 žymens raiška, neturi praktinės reikšmės, nes CD19/CD56 diagramoje piktybinė p(dn)KČPL populiacija visiškai persidengia su normaliomis dnKČPL ir aKČPL subpopuliacijomis.

CD45

Piktybinėms PL būdinga blanki CD45 žymens raiška, tačiau vertinant atskirus ML atvejus piktybinės populiacijos plazmocituose šio žymens raiška gali būti gana skirtinga (172). SD aKČPL ir dnKČPL subpopuliacijose CD45 VFI buvo kiek mažesnis nei referentinėje SD nKČPL subpopuliacijoje, tačiau skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas. Vertindami ryškiai teigiamai CD45 žymenį (++/+++) ekspresuojančių plazminių ląstelių dalį tarp visų subpopuliacijos plazminių ląstelių nustatėme, kad nKČPL subpopuliacijoje jų buvo reikšmingai daugiau nei kitose SD KČPL subpopuliacijose. ML pacientų piktybinių plazmocitų CD45 žymens VFI ir ryškiai žymenį ekspresuojančių ląstelių dalis subpopuliacijoje buvo dar mažesnė. Visose tirtose SD ir ML pacientų KČPL subpopuliacijose CD45 raiška buvo gana heterogeniška – nuo neigiamos iki ryškiai teigiamos.

Apibendrinami šiuos radinius, mes manome, kad CD45 žymuo netinkamas skirti normalias ir piktybines KČPL. Mažesnė šio žymens raiška normaliose aKČPL ir dnKČPL subpopuliacijose lyginant su SD nKČPL subpopuliacija gali netgi klaidinti.

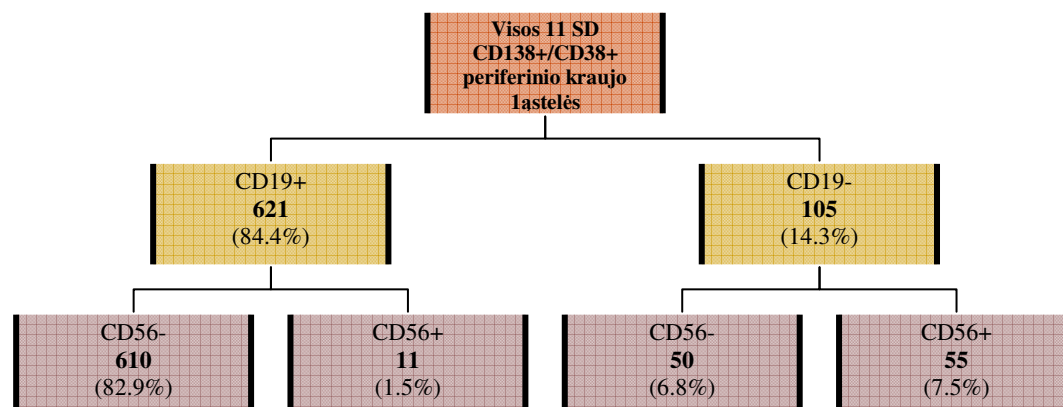
CD20

Literatūroje skelbti prieštaringi duomenys apie normalių PL CD20 žymens raišką (146,164). Mūsų tyrime skirtingų tiriamųjų mėginiuose šio žymens raiška buvo gana skirtinga. Aiškių CD20 raiškos tendencijų skirtumo SD ir ML pacientų piktybinių KČPL subpopuliacijose mes nenustatėme. Tirtose PL subpopuliacijose CD20 žymens VFI ir ląstelių proporcija ekspresuojanti žymenį statistiškai reikšmingai nesiskyrė. Mūsų nustatyta medianinė CD20+ ląstelių dalis piktybinėse KČPL subpopuliacijose buvo 11.7% (2-90%) ir atitiko anksčiau skelbtus duomenis (6).

4.4. Sveikų donorų cirkuliuojančios plazminės ląstelės

Naudodami analogišką TC metodologiją ištyrėme 11 SD periferinio kraujo mėginius. Medianinis tirtų BGL skaičius buvo 520940 (348810 – 1000000). Analizavome visas CD138+/CD38+ ląsteles. Pas 9 iš 11 SD pirminiame CD138/CD38 lange nustatėme daugiau nei 20 ląstelių, tik 1 SD turėjo > 100 CPL. Medianinė CPL proporcija tarp BGL skaičiaus buvo 0,006% (0 – 0,074%). Visų nustatytų CPL imunofenotipo struktūrinė schema pavaizduota 4 pav. Didžioji dauguma aptiktų CPL – 82,2%, turėjo normalų imunofenotipą (CD19+/CD56-) atitinkančią žymenų raišką. Pas 7 SD buvo aptiktos normalaus imunofenotipo ≥ 20 ląstelių turinčios CPL subpopuliacijos (nCPL). Pas vieną iš šių SD dar buvo nustatyta CD19-/CD56- subpopuliacija (dnCPL), turinti 28 ląsteles, tačiau ši subpopuliacija sudarė tik 8,4% visų, pas šį SD aptiktų CPL ir nepasiekė klasikinio 20% slenksčio, naudojamo teigiamos žymenų ekspresijos ląstelių subpopuliacijoje nustatymui. Pas SD neaptikome CD19-/CD56+ (aCPL) imunofenotipą turinčių CPL subpopuliacijų. 4 SD neturėjo nė vienos CPL subpopuliacijos turinčios bent 20 ląstelių. 6 iš 7 aptiktų nCPL subpopuliacijų CD45 žymens raiška buvo intensyvi (++/+++), o vienoje – blanki (+).

7 pav. Sveikų donorų periferinio kraujo CD138+/CD38+ ląstelių imunofenotipo struktūrinė schema



4.5. Periferiniame kraujyje cirkuliuojančių plazminių ląstelių subpopuliacijų nustatymo kriterijai

20 ląstelių yra minimalus TC metodu apibrėžiamos populiacijos dydis tiriant retas populiacijas ir siekiant priimtino rezultatų variabiliškumo (134,213,216). 100 ląstelių minimali riba naudojama kaulų čiulpų PL analizei užtikrina didesnę duomenų specifiškumą, tačiau ją naudojant nebūtų galima įvertinti CPL subpopuliacijų dėl pernelyg mažo jautrumo. Didesnio bendro ląstelių skaičiaus analizė nebūtų praktiška, nes prailgintų tyrimo atlikimo laiką ir proporcingai didintų nespecifinių signalų kiekį. Įvairūs ląstelių koncentracijos didinimo metodai didina ir tyrimo paklaidą. Remdamiesi SD CPL analize nustatėme, kad minimalus 20 ląstelių skaičius subpopuliacijai apibrėžti yra optimalus metodo jautrumui. Pas 7 iš 11 SD taikant šį slenkstinį dydį buvo nustatyta nCPL ląstelių subpopuliacija. Svarbu, kad šiose nCPL subpopuliacijose nustatyta intracitoplazminių LG raiška, kuri buvo polikloninė. Pas du iš keturių SD turinčių < 20 CD138+/CD38+ ląstelių, tirtose ląstelėse LG raiška apskritai nenustatyta. Šis radinys patvirtina minimalaus 20 ląstelių slenkščio populiacijos nustatymui reikalingumą. Pas 1 SD buvo rasta >20 ląstelių turinti CD19-/CD56- CPL subpopuliacija, kuri sudarė tik 8,4% visų CPL. Taškinėje diagramoje šios ląstelės aiškios atskiros subpopuliacijos neformavo ir buvo pagrindinės nCPL populiacijos periferinė dalis. Nors minimalus 20 ląstelių kiekis CPL subpopuliacijos nustatymui, yra optimalus metodo jautrumui užtikrinti, tačiau gali lemti sumažėjusį specifiškumą. Siekdami optimalaus specifiškumo, nustatėme papildomą kriterijų piktybinei CPL subpopuliacijai apibrėžti: atskira CPL subpopuliacija sudaro $>20\%$ visų aptiktų CPL. Nustatyti minimalią slenkstinę aberantinį imunofenotipą ekspresuojančių PL proporciją, tiriant MLL, rekomendavo ir A.C. Rawstron (134).

Remdamiesi tyrimo metu gautais ir anksčiau aptartais, literatūroje pateikiamais duomenimis, nustatėme piktybinės CPL (pCPL) subpopuliacijos kriterijus:

1 Būtinai kriterijai:

- a) CPL subpopuliacija pasižymi netipine CD19 ir CD56 žymenų raiška, būdinga piktybinėms PL – CD19-/CD56+ ar CD19-/CD56- (14,131,153);
- b) turi ≥ 20 CD138+/CD38+ plazminių ląstelių (134,216);
- c) sudaro $\geq 20\%$ visų aptiktų CD138+/CD38+ plazminių ląstelių.

2 Papildomi kriterijai (pageidautina):

- a) pasižymi monoklonine intracitoplazminių LG raiška – kappa/lambda yra $<1/3$ ar $>4/1$ (134).

Normalios CPL (nCPL) subpopuliacijos nustatymo kriterijai:

1 Būtinai kriterijai:

- a) CPL subpopuliacija pasižymi tipine CD19 ir CD56 raiška CD19+/CD56- (nCPL) (138,153);
- b) turi ≥ 20 CD138+/CD38+ plazminių ląstelių (134,213,216).

2 Papildomi kriterijai (pageidautina):

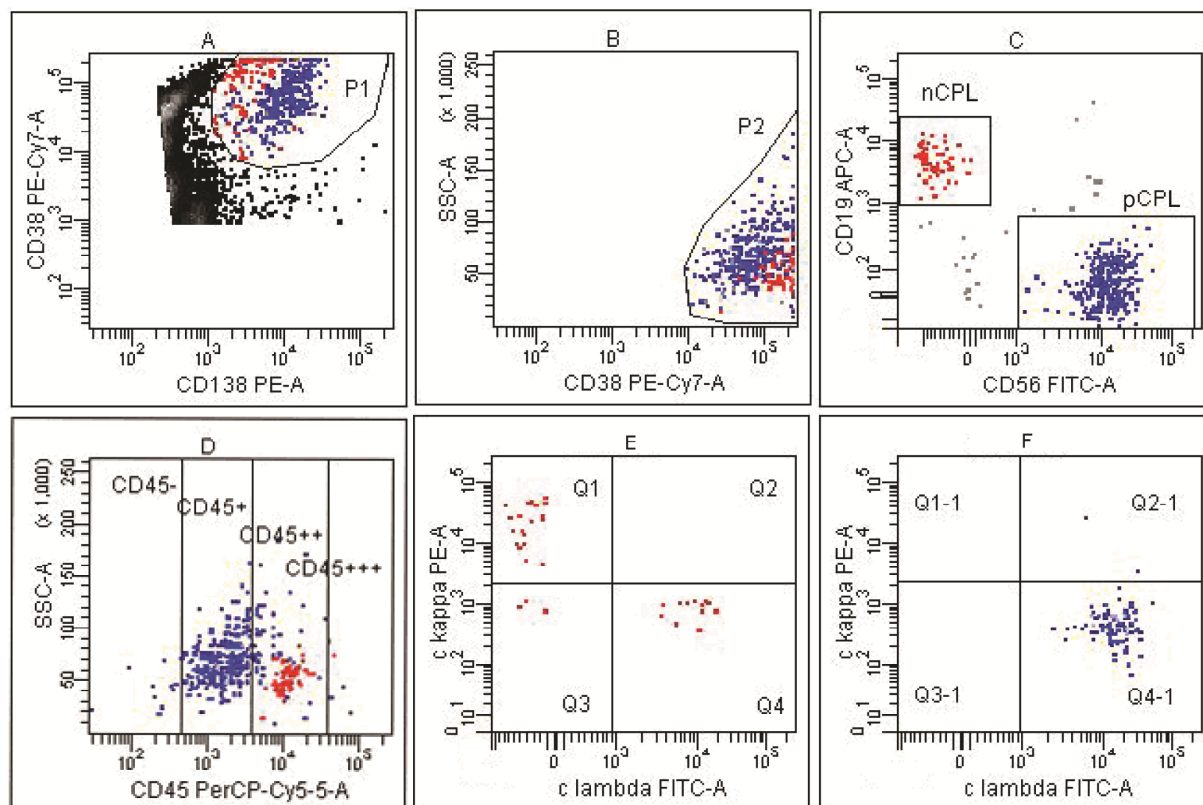
- a) Pasižymi poliklonine intracitoplazminių LG raiška – kappa/lambda yra $> 1/3$ ar $< 4/1$ (134);
- b) Pasižymi intensyvia CD45 žymens raiška (138,186).

4.6. Piktybinių cirkuliuojančių plazminių ląstelių (pCPL) kiekybinės charakteristikos ir kinetika po I-ojo chemoterapijos kurso

Remdamiesi anksčiau nustatytais kriterijais vertinome ML pacientų periferinio kraujo CPL subpopuliacijas (8 pav.). Prieš gydymą pCPL subpopuliacija buvo aptinkama pas 24 iš 42 (57,1%) ML sergančių pacientų. Po pirmojo gydymo kurso pCPL buvo aptiktos pas 22 pacientus (52,4%). Naudojant iš anksto nustatytus pCPL kinetikos vertinimo kriterijus, pacientai buvo suskirstyti į 3 grupes: pacientai, kurių mėginiuose pCPL neaptiktos nei prieš gydymą, nei po gydymo (I grupė, N15), pacientai, kuriems po pirmojo chemoterapijos kurso pCPL kiekis sumažėjo bent 50% (II grupė, N14) ir

pacientai, kurių pCPL nesumažėjo ar padidėjo po pirmojo chemoterapijos kurso (III grupė, N13). Skirtingų grupių pacientų charakteristikos pateiktos 5 lentelėje. II-osios ir III-iosios grupės pacientų pCPL kinetika pavaizduota 9 pav.

8 pav. Mielomine liga sergančio paciento periferinio kraujo plazminių ląstelių imunofenotipinė analizė.



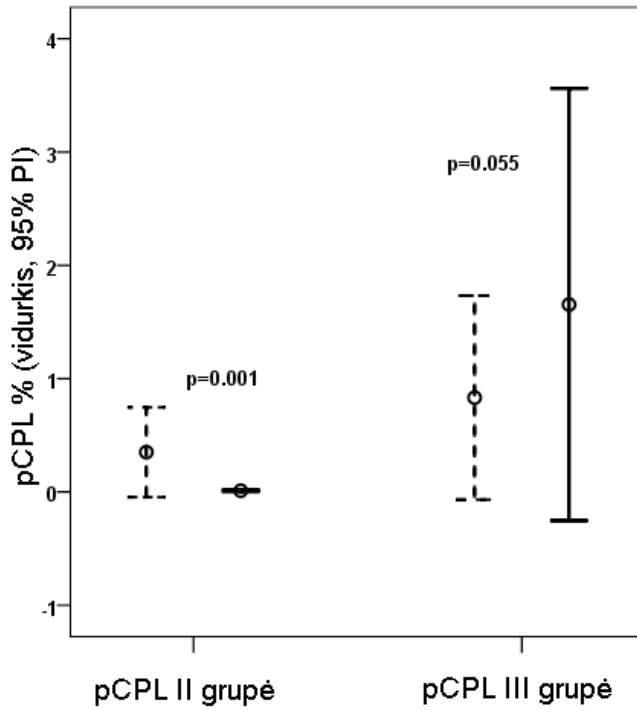
Periferiniame kraujyje plazminės ląstelės buvo identifikuojamos pagal CD138 ir CD38 raišką (A), kartu patikrinant šoninę šviesos sklaidą (SSC) prieš CD38 (B). Įvertinta apibrėžtų plazminių ląstelių CD19, CD56 ir CD45 žymenų raiška, taip apibrėžiant normalių (nCPL) ir piktybinių (pCPL) plazminių ląstelių subpopuliacijas (C, D). Intracitoplazminių lengvųjų grandžių analizė patvirtino nCPL subpopuliacijos polikloniškumą (E) ir pCPL subpopuliacijos monokloniškumą (F).

5 lentelė Skirtingų pCPL kinetikos grupių pacientų charakteristikos

		pCPL kinetikos grupės			
		I	II	III	P
Pacientų skaičius, N		15	14	13	
Amžius, mediana (plotis)		56(39-72)	62 (49-73)	56 (45-74)	0.23
Gydymo eilės, mediana (plotis)		2 (1-4)	2 (1-4)	2 (1-5)	0.53
Ankstesnė DDT, N		5	4	7	0.37
Mėnesiai nuo diagnozės, mediana (plotis)		26 (6-172)	21 (3-147)	37 (3-84)	0.56
β 2 mikroglobulinas, mmol/l, mediana (plotis)		2.49 (2.0-9.96)	3.86 (2.2-45.4)	4.9 (2.3-12.9)	0.07
Albuminas g/l, mediana (plotis)		44.7 (36.1-50.1)	40.0 (32.1-53.0)	43.1 (24.4-50.9)	0.13
Hemoglobinas g/l, mediana (plotis)		117 (96-153)	110 (76-141)	121 (72-140)	0.34
Trombocitai 10 ⁹ /l, mediana (plotis)		250 (108-344)	173 (12-408)	157 (19-322)	0.1
KČPL %, mediana (plotis)		12.5 (0.5-48)	10.3 (0-65)	27.5 (0.5-89)	0.15
Kreatininas, mcmol/l, mediana (plotis)		84 (52-292)	93.5 (44-540)	87 (64-267)	0.68
Ca ⁺⁺ , mmol/l, mediana (plotis)		1.21 (1.12-1.3)	1.26 (1.21-1.58)	1.25 (1.1-1.95)	0.12
Chemoterapijos schema	BD	12	10	13	0.62
	B	1	1	0	
	PAD	1	1	0	
	VAD	1	2	0	
EBMT atsakas po I-ojo chemoterapijos kurso	PL	0	0	3	0.11
	SL	5	3	4	
	MA	4	4	4	
	DR	5	6	1	
Ankstyva progresija		1(6.7%)	0 (0%)	11 (84.6%)	<0.001

I-oji grupė – pacientai, kuriems piktybinės cirkuliuojančios plazminės ląstelės (pCPL) neaptiktos nei prieš gydymą, nei po pirmojo chemoterapijos kurso; II-oji grupė – pacientai, kuriems pCPL proporcija po pirmojo chemoterapijos kurso sumažėjo; III-oji grupė – pacientai, kurių pCPL proporcija po pirmojo chemoterapijos kurso nesumažėjo ar padidėjo. DDT – didelių dozių chemoterapija; B – bortezomibas; BD – bortezomibas, deksametazonas; VAD – vincristinas, doksorubicinas, deksametazonas; PAD – bortezomibas, doksorubicinas, deksametazonas; PL – progresuojanti liga; SL – stabili liga, MA – minimalus atsakas; DR – dalinė remisija; DDT – didelių dozių chemoterapija.

9 pav. II-osios ir III-iosios pCPL kinetikos grupių pacientų, piktybinių cirkuliuojančių plazminių ląstelių proporcijos prieš gydymą ir po pirmojo chemoterapijos kurso



pCPL proporcija prieš gydymą – punktyrinė linija; pCPL proporcija po I-ojo chemoterapijos kurso – ištisinė linija; PI – pasikliautinis intervalas.

4.7. Piktybinių cirkuliuojančių plazminių ląstelių prognostinė reikšmė

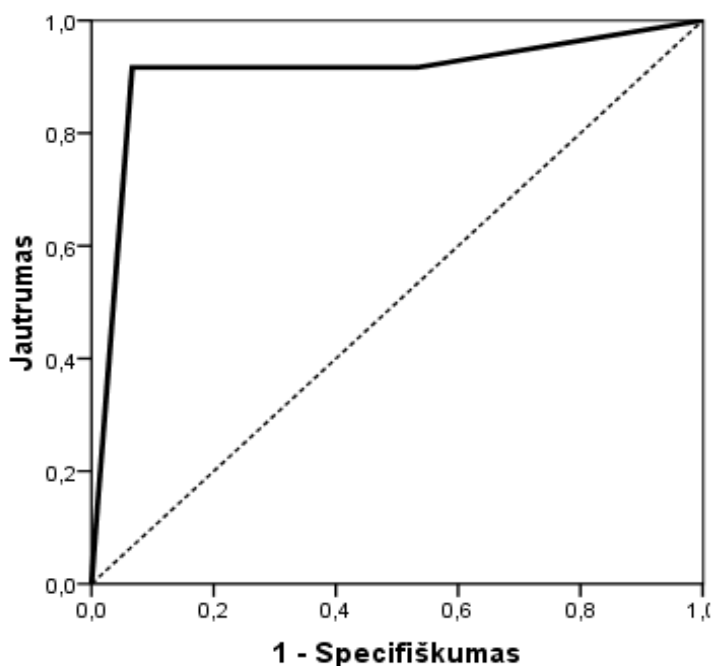
4.7.1. Ankstyvos progresijos prognozavimas remiantis pCPL kinetika

Siekėme patikrinti hipotezę, jog pCPL kiekio nesumažėjimas po pirmojo chemoterapijos kurso identifikuoja pacientus turinčius agresyvią ir atsparią skiriamam gydymui mielominę ligą (ar vieną iš piktybinių plazmocitų klonų). Kliniškai šie pacientai atpažįstami pagal ankstyvą ligos progresiją, kuri gali prasidėti gydymo fone. Mes apibrėžėme ankstyvą progresiją (AP), kaip ligos progresiją nustatytą pagal standartinius EBMT kriterijus (21) ir prasidėjusią iki

suplanuoto gydymo pabaigos, t.y. per 126 dienas nuo gydymo pradžios (šešių 21 dienos chemoterapijos kursų trukmė). AP patvirtinta 12 iš 42 (28,6%) įtrauktų į studiją pacientų. AP nustatyta 11 (84,6%) III-iosios grupės pacientų ir tik 1 pacientui nepatekusiam į III-iają grupę (5 lent.).

ROC analizė atskleidė, kad pCPL nesumažėjimas po pirmojo chemoterapijos kurso (III pacientų grupė) gali prognozuoti AP su 91,7% jautrumu ir 93,3% specifiškumu. ROC testo plotas po kreive buvo 0,91 ($p < 0,001$) (10 pav.).

10 pav. Ankstyvos progresijos prognozavimas remiantis piktybinių plazminių ląstelių kinetika – ROC kreivė.



Siekdami įvertinti metodo nepriklausomumą nuo kitų rizikos faktorių taikėme binarinės regresijos metodą. Vienmatė analizė parodė, kad ankstyvą progresiją reikšmingai įtakojo tik pCPL kinetikos grupė (6 lentelė). Atliekant daugiamatę analizę, tiesioginės laipsniškos atrankos metodas atrinko vienintelį faktorių statistiškai reikšmingai susijusį su AP – pCPL kinetikos grupes. III-

iosios grupės pacientams nustatytas AP išsivystymo šansų santykis (angl. odds ratio), palyginus su I-ąja grupe, buvo 77 (95% PI 6.2-963.7, $p < 0.001$). I ir II grupių pacientams AP išsivystymo rizika patikimai nesiskyrė. Analizuodami binarinės regresijos klasifikacines lenteles nustatėme, kad pacientams su aptinkamomis pCPL, pCPL2/pCPL1 santykis $> 0,807$ su didžiausiu jautrumu ir specifiškumu (atitinkamai 100% ir 93,8%) prognozavo AP (pCPL1 ir pCPL2 yra atitinkamai pCPL kiekis prieš gydymą ir po pirmojo kurso).

6 Lentelė Vienmatė ankstyvos progresijos rizikos faktorių analizė

Kintamasis	Beta	P reikšmė	Šansų santykis	95% PI
pCPL grupė	-	0,003	-	-
pCPL grupė = 0	Atskaitos kategorija			
pCPL grupė = 1	-10.8272	0,962	0,000	0,000
pCPL grupė = 2	4.3438	0,001	77,000	6,15 - 963,74
β_2 -mikroglobulinas	0,0106	0,823	1,011	0,92 - 1,11
Kreatininas	0.0011	0.764	1.001	0.99 - 1.01
Plazmocitų (%) mielogramoje	2,0220	0,144	7,553	0,50 - 114,05
Ekstramedulinė liga	1.0982	0,224	2,999	0,51 - 17,59
Hemoglobinas	-0.0096	0,585	0,990	0,96 - 1,03
Gydymo eilės	0.2223	0,443	1,249	0,71 - 2,20
Albuminas	-0.0450	0,437	0,956	0,85 - 1,07
Laikas nuo diagnozės	-0.0059	0,592	0,994	0,97 - 1,02
Amžius	-0.0209	0,598	0,979	0,91 - 1,06

PI - pasikliautinis intervalas; pCPL – piktybinės cirkuliuojančios plazminės ląstelės

4.7.2. Standartinių atsako kriterijų ir pCPL kinetikos palyginimas

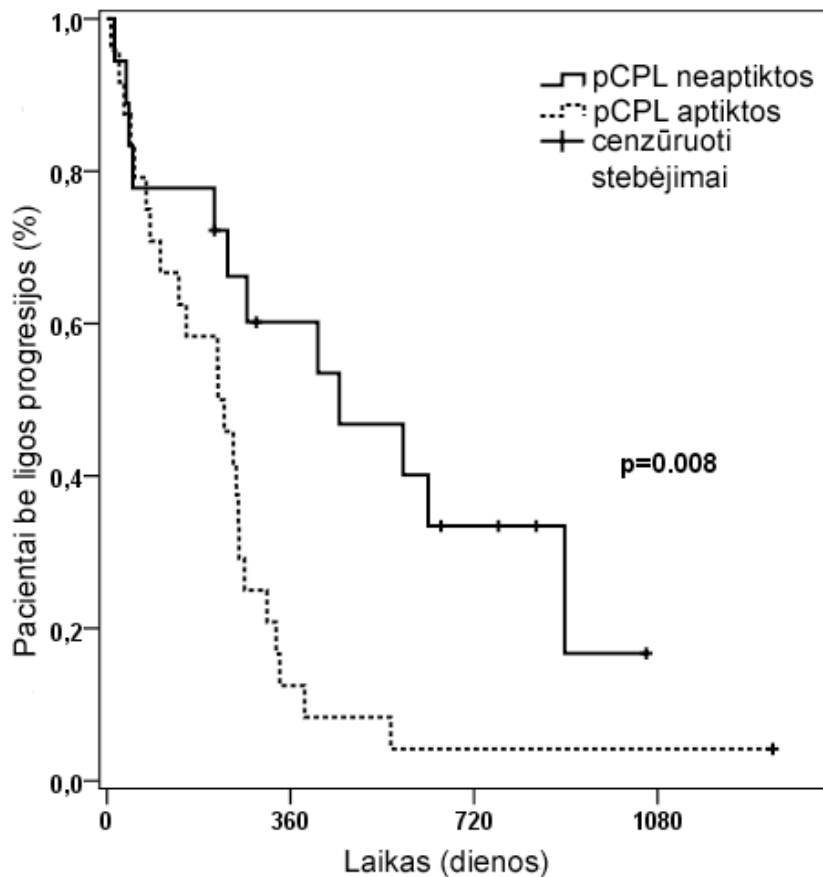
Atsako vertinimas pagal EBMT kriterijus mūsų tyrime naudotas kaip "auksinis standartas". Mes nustatinėjome atsako į gydymą kategorijas naudodami šiuos kriterijus po pirmojo chemoterapijos kurso, po 3 mėn. nuo gydymo pradžios, baigus gydymą (ar po 6 mėn.) arba atsiradus ligos progresijos požymių. Atsako į gydymą nebuvimas po pirmojo chemoterapijos kurso, nustatytas pagal standartinius kriterijus (pasiektas mažiau nei minimalus atsakas), nebuvo statistiškai reikšmingas susijęs su AP (χ^2 , $p=0.2$). 5 iš 12 (41,7%) pacientų, kuriems vėliau buvo nustatyta AP, po pirmojo chemoterapijos kurso pasiekė \geq minimalų atsaką (EBMT) (5 lentelė). Pacientų skirstymas į grupes pagal pCPL kinetiką neturėjo reikšmingos koreliacijos su EBMT atsako kategorija nustatyta po I-ojo chemoterapijos kurso (r -0,28, $p=0,09$), tačiau reikšmingai koreliavo su atsako kategorijomis pasiektomis po 3 mėn., po viso gydymo ir geriausia nustatyta atsako kategorija (r reikšmės atitinkamai -0.51, -0.64, -0.51, p reikšmės – 0.001, <0.001, 0.001). Geriausias pasiektas atsakas į gydymą I ir II pCPL kinetikos grupių pacientams buvo identiškas – atitinkamai 80,0% ir 86,7% šių grupių pacientų pasiekė \geq dalinę remisiją. Tuo tarpu tarp III grupės pacientų DR pasiekė tik 1 pacientas.

4.7.3. Piktybinių cirkuliuojančių plazminių ląstelių nustatymo prieš gydymą prognostinė reikšmė

Mes įvertinome pCPL nustatymo prieš gydymą bei pCPL kinetikos, kaip atsako į pirmąjį chemoterapijos kursą, prognostinę vertę.

Pacientų, kuriems prieš gydymą buvo aptiktos pCPL medianinis LIP buvo 218 dienų, kai tuo tarpu pacientų, kuriems pCPL neaptiktos medianinis LIP buvo 456 dienos ($p=0,008$) (11 pav.). BI šiose ML pacientų grupėse reikšmingai nesiskyrė ($p=0,16$).

11 pav. Pacientų su aptinkamomis ir neaptinkamomis pCPL laikas iki progresijos

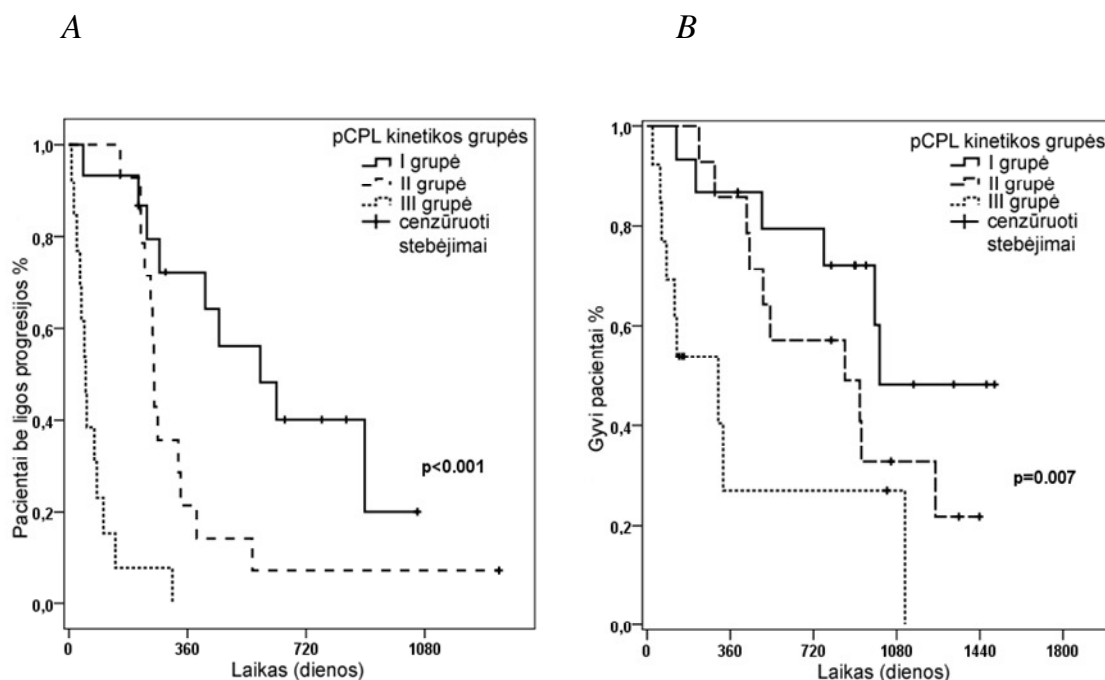


I, II ir III pCPL kinetikos grupėse medianinis LIP buvo atitinkamai 581, 258 ir 51 diena ($p < 0.001$, bendras palyginimas) (12 A pav.). Atliktas dvipusis (angl. – pairwise) palyginimas – I grupė prieš II grupę, I grupė prieš III grupę ir II grupė prieš III grupę. LIP skirtumai išliko statistiškai reikšmingai skirtingi (p reikšmės atitinkamai 0,02, $< 0,001$ ir $< 0,001$).

Kadangi 13 pacientų po gelbstinčios chemoterapijos taikyta konsolidacija didelių dozių chemoterapija ir autologine kamieninių kraujodaros ląstelių transplantacija galėjo įtakoti LIP trukmę ir sąlygoti klaidingus analizės rezultatus, mes pakartojome skaičiavimus prieš tai cenzūravę stebėjimus transplantacijos atlikimo dieną. Po perskaičiavimo LIP išliko statistiškai reikšmingai skirtingas ($p < 0,001$, bendras palyginimas).

Nustatytas BI I, II ir III pCPL kinetikos grupėse atitinkamai buvo 1006, 856 ir 308 ($p=0,007$ bendras palyginimas) (12 B pav.). Atliekant porinę analizę nustatyta, kad išgyvenamumo skirtumai buvo reikšmingi tarp I ir III bei II ir III pacientų grupių (atitinkamai $p=0,009$ ir $0,036$).

12 pav. Trijų pCPL kinetikos grupių pacientų laikas iki progresijos (A) ir bendras išgyvenamumas (B)



Įvertinome atsako nustatyto po pirmojo chemoterapijos kurso pagal EBMT kriterijus prognostinę vertę. Pacientus pagal pasiektą EBMT atsako lygį suskirstėme į dvi grupes: \geq minimalus atsakas (N 15) ir $<$ minimalus atsakas (N 24). 3 pacientų negalėjome įvertinti po pirmojo chemoterapijos kurso dėl medicininių aplinkybių (ekstramedulinė, oligosekrecinė liga). Nei BI, nei LIP statistiškai reikšmingai šiose grupėse nesiskyrė (p reikšmės atitinkamai 0,65 ir 0,32).

Taikydami Kokso proporcingos rizikos nustatymo metodą įvertinome ir kitus rizikos veiksnius, galėjusius įtakoti BI ir LIP. Atlikę vienmatę analizę nustatėme, kad pCPL kinetikos grupė, kreatinino ir β_2 -mikroglobulino

koncentracija reikšmingai įtakojo ir LIP ir BI. KČ PL % buvo susijęs tik su LIP (7 lentelė), o hemoglobino koncentracija ir ekstramedulinės ligos buvimas – BI (8 lentelė). Daugiamatė analizė naudojant tiesioginės laipsniškos atrankos metodą, nustatė tik 2 nepriklausomus rizikos faktorius reikšmingai įtakančius LIP ir BI – kreatinino koncentracija prieš gydymą ir pCPL grupės (9 lentelė). Dėl mažo pacientų skaičiaus daugiamaatės analizės rezultatai turėtų būti vertinami atsargiai.

7 lentelė Vienmatė laiko iki progresijos rizikos faktorių analizė

Kintamasis	Beta	P reikšmė	Santykinė rizika	95% PI
pCPL grupė	-	<0,001	-	-
pCPL grupė = 0	Atskaitos kategorija			
pCPL grupė = 1	0,9899	0,029	2,691	1,11 - 6,55
pCPL grupė = 2	2,8351	<0,001	17,032	6,01 - 48,25
β₂mikroglobulinas	0,0385	0,040	1,039	1,002 - 1,08
Kreatininas	0,0032	0,048	1,003	1 - 1,01
Plazmocitų (%) mielogramoje	1,994	0,020	6,917	1,35 - 35,48
Ekstramedulinė liga	0,6779	0,137	1,97	0,81 - 4,82
Hemoglobinas	-0,0144	0,179	0,986	0,97 - 1,01
Gydymo eilės	-0,074	0,67	0,929	0,662 – 1,304
Albuminas	0,0253	0,449	0,975	0,91 - 1,04
Laikas nuo diagnozės	-0,0053	0,297	0,995	0,99 - 1,01
Amžius	0,0016	0,935	1,002	0,97 - 1,04

PI - pasikliautinis intervalas; pCPL – piktybinės cirkuliuojančios plazminės ląstelės

8 lentelė Vienmatė bendro išgyvenamumo rizikos faktorių analizė

Kintamasis	Beta	P reikšmė	Santykinė rizika	95 % PI
pCPL grupė	-	0,013	-	-
pCPL grupė = 0	Atskaitos kategorija			
pCPC grupė = 1	0,6348	0,219	1,887	0,69 - 5,2
pCPL grupė = 2	1,5632	0,004	4,774	1,65 - 13,79
β₂ mikroglobulinas	0,0488	0,018	1,050	1,01 - 1,09
Kreatininas	0.0055	0.002	1.005	1.002 - 1.009
Plazmocitų (%) mielogramoje	1.3685	0,140	3,929	0,64 - 24,2
Ekstramedulinė liga	1.0178	0,033	2,767	1,09 - 7,05
Hemoglobinas	-0.0251	0,038	0,975	0,95 - 0,999
Gydymo eilė	-	0.42	1.171	0.8 - 1.72
Albuminas	-0.0182	0,623	0,982	0,91 - 1,06
Laikas nuo diagnozės	-0.008	0,285	0,992	0,98 - 1,01
Amžius	-0.0253	0,269	0,975	0,93 - 1,02

PI - pasikliautinis intervalas; pCPL – piktybinės cirkuliuojančios plazminės ląstelės

9 lentelė Daugiamatė laiko iki progresijos ir bendro išgyvenamumo rizikos faktorių analizė

	Laikas iki progresijos		Bendras išgyvenamumas	
	Santykinė rizika (95% PI)	p reikšmė	Santykinė rizika (95% PI)	p reikšmė
pCPL grupė		<0.001		0.005
I	Atskaitos grupė			
II	2.2 (0.8-5.8)	0.12	1.6 (0.51-5.0)	0.43
III	17.4 (5.8-52.4)	<0.01	5.8 (1.8-17.9)	0.003
Kreatininas	1.005 (1.001 - 1.008)	0.019	1.006 (1.002 - 1.01)	0.002

PI - pasikliautinis intervalas; pCPL – piktybinės cirkuliuojančios plazminės ląstelės

4.8. Mielomine liga sergančių pacientų normalių plazminių ląstelių kiekybinės charakteristikos

Duomenys apie imunofenotipiškai normalias PK plazmines ląsteles (CD19+/CD56-) gauti iš 40 ML pacientų. 2 ML atvejai buvo netinkami analizei: 1 pacientas turėjo į CD19+/CD56- diagramos dalį plintančias monoklonines piktybines ląsteles persidengiančias su nPL subpopuliacija, 1ML pacientui trūko duomenų apie nPL.

Mikroskopuojant kaulų čiulpų tepinėlių plazminės ląstelės nustatytos 39 iš 40 atvejų (pacientas su neaptiktomis PL turėjo vyraujančią ekstramedulinę ligą). Mikroskopuojant nustatyta medianinė KČPL proporcija buvo 12,5% (0 – 89).

Tėkmės citometrijos metodu PL aptikome visų 40 pacientų KČ mėginiuose. Didžioji dauguma aptiktų ląstelių turėjo aberantinę žymenų raišką ir buvo monokloninės pagal lengvųjų grandžių ekspresiją. Medianinė nustatyta šių ląstelių proporcija buvo 8% (0,05 – 87,9).

32 ML pacientai turėjo aptinkamą (>100 ląstelių) nKČPL subpopuliaciją. Šios subpopuliacijos medianinė proporcija buvo – 0,04% (0-1,51). nKČPL subpopuliacija pas ML pacientus buvo mažesnė nei pas tirtus SD (10 lentelė).

Periferiniame kraujyje cirkuliuojančios plazminės ląstelės prieš skiriant gydymą buvo aptiktos 33 atvejais iš 40 (82,5%). Pas 23 pacientus (57,5%) mes

aptikome cirkuliuojančių imunofenotipiškai normalių PL subpopuliaciją (nCPL). Pas pacientus su aptinkamomis CPL, nCPL kiekis buvo apytiksliai 1log mažesnis nei pCPL – nCPL vidutinė proporcija buvo $0,025 \pm 0,034\%$ o pCPL – $0.72 \pm 1.2\%$. nCPL subpopuliacijos dydis ir aptikimo dažnis pas ML pacientus ir SD nesiskyrė (10 lentelė).

10 lentelė nCPL ir nKČPL subpopuliacijos* (CD19+/CD56-) subpopuliacijos pas sveikus donorus ir ML pacientus.

		nCPL (CD19+CD56-)	nKČPL (CD19+CD56-)
ML pacientai N40	Vidurkis	0,015%	0.11%
	Mediana	0.006%	0.04%
Mano-Vitnio testas		p=0.48	p=0.001
Sveiki donorai N11	Vidurkis	0,01%	0.21%
	Mediana	0.003%	0.20%

* Subpopuliacijų dydis nurodytas kaip proporcija tarp visų mėginyje aptiktų gyvybingų ląstelių

ML – mielominė liga

nCPL – (CD19+/CD56-) cirkuliuojančios plazminės ląstelės

nKČPL – (CD19+/CD56-) kaulų čiulpų plazminės ląstelės

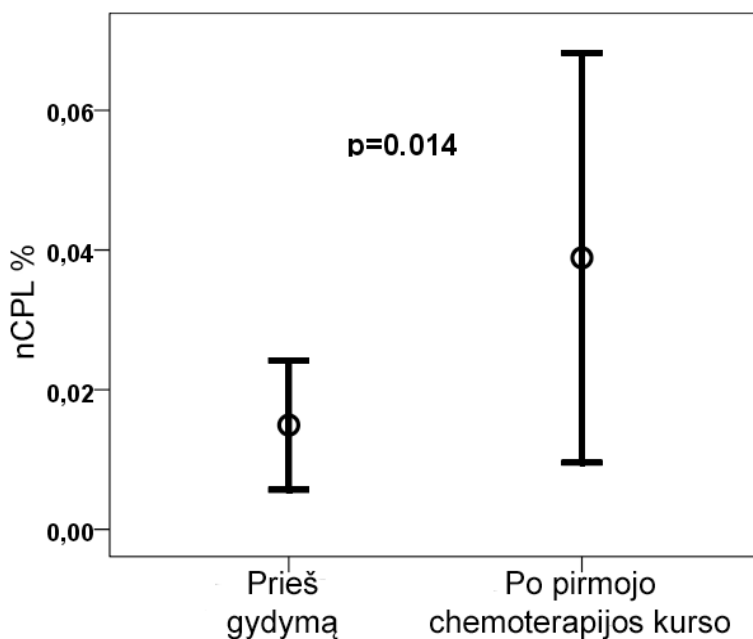
4.9. Normalių plazminių ląstelių nustatymo mielomine liga sergantiems pacientams prognostinė reikšmė

4.9.1. Normalios cirkuliuojančios plazminės ląstelės

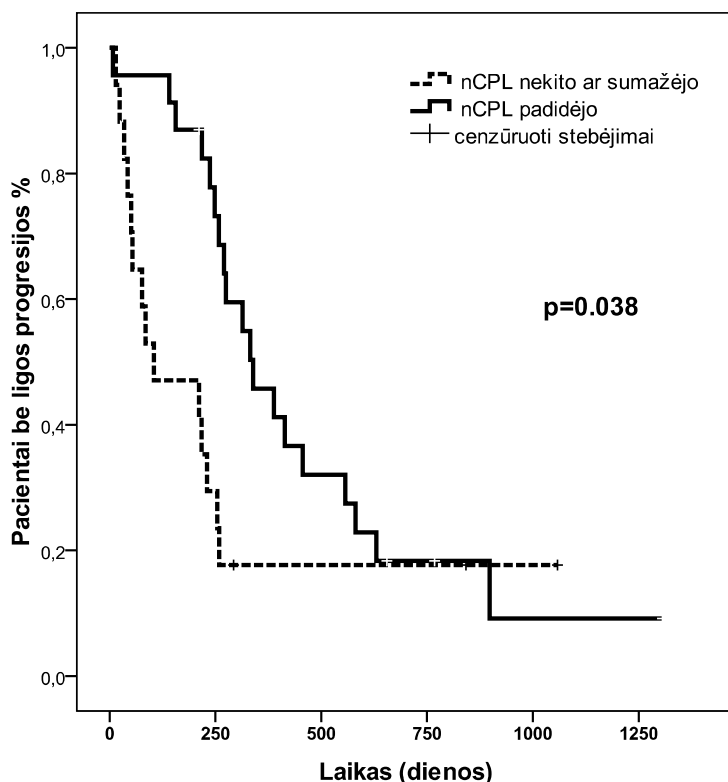
nCPL subpopuliacijos aptikimas prieš gydymą nebuvo reikšmingai susijęs nei su ligos mase (KČPL infiltracija tiriant TC ar mikroskopuojant), nei su biologiniais ligos aktyvumo parametrais (β_2 -mikroglobulino, albumino, hemoglobino koncentracija, inkstų f-ja). nCPL nustatymas neturėjo prognostinės įtakos LIP ir BI. Mes nustatėme tik vidutinio stiprumo atvirkštinę koreliaciją su paciento amžiumi ($r=-0,34$, $p=0,03$).

Atsižvelgdami į pCPL kinetikos įvertinimo prognostinį reikšmingumą įvertinome ir nCPL kinetikos nustatymo klinikinę reikšmę. nCPL medianinė proporcija po pirmojo gydymo kurso padidėjo: prieš gydymą buvo 0,006%, po gydymo – 0,013% ($p=0,014$) (Pav. 9). Nustatyta, kad pacientai, kurių nCPL po pirmojo chemoterapijos kurso padidėjo turėjo ilgesnį LIP nei pacientai, pas kuriuos nCPL nebuvo aptiktos ar gydant jų kiekis mažėjo: medianinis nustatytas LIP atitinkamai 339 ir 105 dienos ($p=0,038$) (Pav. 10). BI šiose grupėse patikimai nesiskyrė.

13 pav. Normalių cirkuliuojančių plazminių ląstelių (nCPL) kinetika po pirmojo chemoterapijos kurso.



14 pav. Laikas iki progresijos pacientų grupėse su skirtinga nCPL kinetika



4.9.2. nKČPL subpopuliacijos klinikinė reikšmė

Įvertinome nKČPL subpopuliacijos dydžio ir RA ML pacientų LIP ir BI trukmės ryšį. 5 pacientų su vyraujančiu ekstrameduliniu ligos komponentu neįtraukėme į analizę, nes tais atvejais KČ radiniai neatspindėjo ligos aktyvumo. Remdamiesi anksčiau paskelbtais tyrimais, kur tirti naujai diagnozuota ML sergantys žmonės, vertinome pKČPL/nKČPL santykį. Suskirstėme pacientus į dvi grupes pagal nustatytą medianinį pKČPL/nKČPL santykį – 225. LIP ir BI buvo ilgesnis pas pacientus su didesne nKČPL dalimi. Medianinis nustatytas LIP atitinkamai 414 ir 230 dienos ($p=0,019$) o medianinis BI nepasiektas ir 533 dienos ($p=0,038$) (15 pav.). Ligos aktyvumo ir rizikos veiksnių charakteristikos buvo palankesnės pacientų su didesne nKČPL proporcija grupėje: mažesnė β_2 -mikroglobulino koncentracija ($p=0,006$), mažesnė KČPL infiltracija mikroskopuojant ($p=0,019$), žemesnė jonizuoto kalcio koncentracija ($p=0,045$), didesnis hemoglobino kiekis ($p=0,03$), daugiau trombocitų ($p=0,002$). Siekdami patvirtinti pKČPL/nKČPL

santykio prieš gydymą kaip nepriklausomo prognostinio žymens vaidmenį taikėme Kokso proporcingos rizikos nustatymo metodą. Į regresijos modelį įtraukėme tokius faktorius kaip paciento amžius, ligos trukmė, taikytų gydymo eilių skaičius, albumino, hemoglobino, trombocitų kiekis, KČPL kiekį nustatytą mikroskopuojant. Tiesioginės laipsniškos atrankos metodas patvirtino pKČPL/nKČPL santykio nepriklausomą prognostinę įtaką LIP ir BI trukmei (p reikšmės atitinkamai 0,014 ir 0,003).

5. TYRIMO REZULTATŲ APTARIMAS

Tyrimai aprašyti šiame darbe atlikti siekiant patikrinti hipotezę, jog cirkuliuojančių plazmių ląstelių kinetika gali būti naudojama, kaip biologinis žymuo, ankstyvam gydymo efekto vertinimui bei atsparumo gydymui prognozavimui. ML sergančių pacientų PL populiacija yra chimera sudaryta iš normalių ir piktybinių PL (184,217-219). Normalių ir piktybinių ląstelių kinetika gydymo metu skirtinga – piktybinės ląstelės yra jautresnės chemoterapijai už normalias. Po chemoterapijos pasiekus ligos remisiją piktybinės ląstelės nebeaptinkamos, o normalių plazminių ląstelių kiekis normalizuojasi. Šis procesas vadinamas imunine rekonstitucija (187,219,220). Savo tyrime tyrėme plazminių ląstelių kiekybinius pokyčius po vieno chemoterapijos kurso. Kadangi piktybinės ir normalios plazminės ląstelės skirtingai reaguoja į citotoksinę chemoterapiją, reikėjo metodo galinčio atskirai ir kiekybiškai įvertinti normalių ir piktybinių PL subpopuliacijas viename mėginyje. CPL nustatymo metodo jautrumas turėjo siekti ne mažiau, nei 10^{-4} , nes CPL koncentracija labai maža (24,26). Mes pasirinkome tėkmės citometriją, kaip geriausiai atitinkantį aukščiau minėtus reikalavimus metodą. Pagrindinė iškilusi problema buvo ta, kad iki šiol vertinant cirkuliuojančias plazmines ląsteles naudotos TC metodologijos turėjo trūkumų. Taikant ≤ 4 spalvų TC metodologiją nebuvo įmanoma sinchroniškai vertinti žymenų svarbių PL apibrėžimui, raiškos aberacijų bei kloniškumui nustatymui. PL piktybiškumo apibūdinimui naudotas CD45 žymuo, nebuvo apibrėžiamas minimalus vertintinos ląstelių populiacijos dydis (24,26,221,222). Šie faktoriai stipriai įtakojo TC metodologijos specifiškumą. Mes PL tyrimui naudojome naują, iki tol neaprašytą TC metodologiją. Siekdami užtikrinti specifišką normalių ir piktybinių PL atskyrimą ištyrėme kontrolinės sveikų žmonių grupės kaulų čiulpų ir periferinio kraujo plazmines ląsteles, naudodami tą patį TC metodą. Apibendrinę iki šiol paskelbtų tyrimų informaciją ir savo gautus duomenis parengėme kaulų čiulpų ir periferinio kraujo PL subpopuliacijų nustatymo kriterijus.

5.1. Plazminių ląstelių imunotipavimo metodikos optimizavimas

5.1.1. Kaulų čiulpų plazminės ląstelės

Mes ištyrėme sveikų donorų KČ PL subpopuliacijas sinchroniškai vertindami CD19 ir CD56 raišką. Šie žymenys ekspertų bendru sutarimu rekomenduojami naudoti normalių ir piktybinių plazminių ląstelių atskyrimui (14). Tačiau normalus plazminių ląstelių imunofenotipas iki šiol nėra vienareikšmiškai apibrėžtas. Yra žinoma, kad normalių KČ PL CD19 ir CD56 žymenų ekspresija gali būti heterogeniška (7,9), tačiau kasdieninėje praktikoje ir netgi klinikiniuose tyrimuose normalus PL imunofenotipas aprašomas vienareikšmiškai – CD19+/CD56- (28,221,223,224). Literatūroje nėra paskelbta duomenų, apie CD19-/CD56+ imunofenotipą turinčių normalių PL subpopuliaciją. Mūsų nuomone tokia situacija susiklostė dėl to, jog dauguma tyrimų iki šiol buvo atlikti naudojant TC metodologiją galinčią vienu metu analizuoti iki 4 spalvų. Tik TC metodologija galinti vienu metu įvertinti tiesinę bei šoninę šviesos sklaidą ir bent 6 spalvas suteikia galimybę naudoti tinkamą žymenų derinį reikalingą PL identifikavimui ir CD19/CD56 žymenų analizei, kartu įvertinant LG ekspresiją kloniškumo nustatymui (225).

Mažesnės sveikų žmonių PL subpopuliacijos menkai tyrinėtos ir dėl kitos priežasties – skirtinga žymens ekspresija mažesnėje nei 20% ląstelių populiacijos dalyje paprastai atskirai neaprašoma (29). Taigi, jei nPL vertinama kaip vientisa ląstelių populiacija, žymenų ekspresijos nuokrypiai < 20 % būtų nevertintini. Yra paskelbta duomenų rodančių, kad CD138/CD38 apibrėžiama normalių PL subpopuliacija yra heterogeniška, pasižymi skirtingu diferenciacijos laipsniu, adhezijos faktorių raiška, proliferaciniu potencialu (133,186). Šie skirtumai rodo, kad CD138/CD38 apibrėžiamas normalias PL reiktų vertinti kaip atskirų subpopuliacijų sumą o ne vientisą populiaciją. MLL tyrimas ML pacientams taip pat pagrįstas PL subpopuliacijų analize. Tiriant MLL imunofenotipiškai skirtingos (piktybinės/aberantinės) KČ PL populiacijos apibrėžimui naudojamas ne 20% populiacijos ląstelių skirtingos

žymens raiškos kriterijus, tačiau kitas slenkstinis dydis – minimalus 100 ląstelių kiekis (14). Šis kriterijus – empirinis. Ekspertu bendru sutarimu – 100 ląstelių subpopuliacija yra pakanakama, patikimai ir specifiškai įvertinti imunofenotipą užtikrina žemą vidinį testo variabiliškumą ir pasiekia 1:10000 tyrimo jautrumą reikalingą minimalios liktinės ligos tyrimui. Mūsų tirtų sveikų donorų KČ mėginiuose vidutiniškai aptikome apie 3000 plazminių ląstelių. Vertinant aptiktas PL kaip vientisą populiaciją ir naudojant 20% populiacijos dydžio slenkstį žymens ekspresijos vertinimui, mažiausiai 600 PL turėtų pasižymėti skirtinga žymenų raiška, kad išskirtume ją kaip imunofenotipiškai atskirą populiaciją. Šis skaičius 6 kartus viršija MLL populiacijos nustatymo slenkstinį dydį. Dėl skirtingų imunofenotipo analizės principų vertinant ML sergančių pacientų PL subpopuliacijas (tiriant MLL) ir sveikų žmonių PL, kyla klaidingos duomenų interpretacijos grėsmė kasdieninėje praktikoje ir atliekant klinikinius tyrimus. Mūsų duomenimis iki šiol nebuvo ištirtos sveikų žmonių KČ PL, imunofenotipiškai skirtingos PL subpopuliacijos nustatymui naudojant minimalų 100 ląstelių slenkstį.

2010 m. E. Canizzo su kolegomis aprašė normalių PL imunofenotipą naudodami modernią 6-8 spalvų TC metodologiją (29). Jie nustatė, kad normalių PL populiacijoje CD19 ir CD56 žymenis gali ekspresuoti atitinkamai 61- 100% ir 0 – 45% ląstelių. Tačiau jie neanalizavo sinchroninės šių žymenų ekspresijos PL subpopuliacijose. Mūsų tyrimo rezultatai patvirtina, kad minėtų žymenų raiška yra polimorfiška. Mes nustatėme dar mažesnę CD19 žymens ekspresiją visoje normalių KČ PL populiacijoje (mediana 61,3% (44,2 – 77,1)). Mūsų nustatyta CD56 žymens ekspresija buvo panaši į anksčiau skelbtą (mediana 13,5% (5.7 – 41.8) (29,226). Pagrindinis tyrimo akcentas buvo sinchroninės šių žymenų raiškos vertinimas. CD19/CD56 diagramoje KČ PL formavo 3 – 4 atskiras subpopuliacijas, o ne vieną populiaciją su periferiniu (išcentrinu) išplitimu. Svarbu tai, kad SD KČ PL turinčios aberantinį imunofenotipą (CD19-/CD56+ ir CD19-/CD56-) sudarė beveik pusę visų aptiktų PL.

Naudodami 100 ląstelių slenkstinį dydį mes galėjome identifikuoti visas 4 KČ PL subpopuliacijas apibrėžiamas pagal skirtingą CD19 ir CD56 žymenų raišką pas 5 iš 11 sveikų donorų. Pas 5 SD dtKČPL ir pas 1 SD aKČPL subpopuliacija buvo mažesnės už pasirinktą aptikimo slenkstį, tačiau net ir šiais atvejais nedidelės keliasdešimt ląstelių turinčios aberantinės subpopuliacijos būdavo stebimos. Tikėtina, kad naudojant kiek jautresnį tyrimo metodą 4 skirtingą CD19/CD56 žymenų raišką turinčios subpopuliacijos būtų aptinkamos pas visus sveikus žmones.

Sunku patikimai atskirti aKČPL ir dnKČPL subpopuliacijas aptinkamas pas SD nuo atitinkamą imunofenotipą turinčių ML pacientų piktybinių PL vertinant vien CD žymenis be LG restrikcijos analizės. Mes nustatėme labai panašią CD56 ir CD19 žymenų raišką atitinkamose piktybinių ir normalių PL subpopuliacijose. CD45, CD38 ir CD20 žymenų ekspresijos tyrimas taip pat pasirodė mažai reikšmingas diferencijuojant normalias ir piktybines aKČPL ir dnKČPL subpopuliacijas. SD aKČPL ir dnKČPL subpopuliacijų CD45, CD38 ir CD20 žymenų raiškos tendencijos buvo analogiškos piktybinėms PL lyginant jas su klasikinį normalų imunofenotipą (CD19+/CD56-) ekspresuojančia SD nKČPL subpopuliacija.

Svarbu įvertinti LG raišką atskirose KČPL subpopuliacijose, nes polikloninis fonas gali maskuoti nedidelę monokloninę populiaciją kai kloniškumas vertinamas iškart visoje PL populiacijoje. Kai kurie ekspertai rekomenduoja subpopuliacijos kloniškumą analizuoti, tik diagnostiniame mėginyje (14). Kadangi atskiros normalių PL subpopuliacijos pagal CD žymenų raišką panašios į piktybines, mūsų nuomone MLL analizė gali būti netiksli, jei LG raiška analizuojama tik diagnostiniame mėginyje, o tolesnis stebėjimas atliekamas tiriant tik CD žymenis.

Mūsų radiniai patvirtina A.C. Rawstron ir kolegų teiginį, jog pas sveikus žmones CD19- KČPL yra galutinės diferenciacijos stadijos ilgai gyvenančios PL (227). Galutinę diferenciacijos fazę rodo ryški CD138 ekspresija ir mažą

proliferacinį aktyvumą atspindinti žema CD45 raiška (133,227,228). Žema CD20 raiška taip pat siejama su PL brandumu (133). CD19 galėtų būti vertinamas kaip PL diferenciacijos žymuo, nes jo ekspresija mažėja PL brandimo metu (138). Sergant mielomine liga piktybiniai plazmocitai praktiškai niekada neekspresuoja šio žymens. CD19+ plazminės ląstelės gali būti aptinkamos mažiau brandžių PL navikinių susirgimų atvejais. Neseniai W. G. Morice su kolegomis paskelbė duomenis, kad CD138+/CD38+/CD19+ kloniniai plazmocitai nustatomi pas Waldenstromo makroglobulinemija / limfoplazmocitine limfoma sergančius pacientus (229). Remiantis šiais duomenimis CD19+/CD56- PL tiksliau būtų galima apibūdinti kaip ankstyvas (nebrandžias), o ne kaip normalias PL.

CD56 žymens ekspresijos reikšmė ant normalių PL nėra pilnai išaiškinta. Mes nustatėme, kad SD aKČPL ir dnKČPL subpopuliacijos imunofenotipiškai skyrėsi tik pagal CD56 žymenį, kitų žymenų raiška nesiskyrė. Šis teiginys tinka ir kalbant apie atitinkamas piktybines ML pacientų KČ PL subpopuliacijas. Pagrindinė CD56 molekulės f-ja yra adhezija. ML atvejais, kai piktybinės PL ekspresuoja CD56 būna labiau išreikšti kaulų pažeidimai, tuo tarpu CD56- ML atvejai susiję su ekstrameduliniu ligos plitimu (152,214,230). Intensyvesnę CD56 žymens raišką aptikome ant SD CD19- normalių plazmocitų. Šį radinį galėtume sieti su faktu, jog normalių, brandžių – ilgai gyvenančių (CD19-) plazminių ląstelių gyvavimo vieta žmogaus organizme yra kaulų čiulpai. Negalima atmesti ir hipotezės, jog CD56+ plazminių ląstelių proporcija sveikų žmonių kaulų čiulpų mėginiuose gali būti nustatoma klaidingai maža, nes šį žymenį ekspresuojančios PL gali būti atsparesnės aspiracijai.

Neseniai spaudoje paskelbti duomenys, kad lėtine mieloleukemija (LML) sergančių pacientų kaulų čiulpuose buvo aptiktos aberantinės (CD19-/CD56+) plazminės ląstelės. Autoriai padarė išvada, kad imatinibas – vaistas skiriamas LML gydymui, gali indukuoti aberantinių PL atsiradimą ir sąlygoti malignizaciją (30). Mūsų duomenys rodo, kad „aberantinis“ (CD19-/CD56+)

imunofenotipas yra normalus ir gali būti aptinkamas pas sveikus žmones. Skirtingi autoriai nurodo, kad CD19- PL gali sudaryti iki 30 – 39% visų sveiko žmogaus kaulų čiulpų plazminių ląstelių (29,131,134,141). Mūsų duomenimis CD19- PL atskirais atvejais gali sudaryti daugiau nei pusę visų KČ PL ir sąlygoti klaidingą duomenų interpretaciją.

4.9.3. Cirkuliuojančios plazminės ląstelės

Mes ištyrėme 11 sveikų donorų periferinio kraujo plazmines ląsteles. PK plazminių ląstelių sudėtis pagal vertintų žymenų raišką buvo ženkliai homogeniškesnė nei KČ PL. Didžioji dauguma aptiktų CPL turėjo „klasikinį“ normalų, mūsų anksčiau apibrėžta kaip „ankstyvą“ PL imunofenotipą – CD138+/CD38+/CD19+/CD56-/kappa+/lambda+. Mūsų duomenys sutapo su anksčiau skelbtais tyrėjų duomenimis (138,153). Šio imunofenotipo PL apibūdinamos kaip ankstyvos PL migruojančios iš periferinių limfoidinių organų į KČ ar reaktyvios trumpai gyvenančios PL .

Iki šiol atliktuose klinikiniuose tyrimuose vertinant ML pacientų CPL, nebuvo apibrėžiamas slenkstinis minimalus cirkuliuojančių plazminių ląstelių kiekis populiacijos nustatymui (17,24). Mūsų nuomone pavienių nustatytų ląstelių įtraukimas į analizę labai sumenkina tyrimo specifiškumą, padidina vidinį testo variabiliškumą. Šie efektai ypač nepageidaujami lyginant porinius mėginius. Naudojant klasikinį 100 ląstelių slenkstį nebūtų užtikrintas pakankamas tyrimo jautrumas CPL analizei, kadangi CPL kiekis PK yra labai mažas. Remdamiesi retų įvykių analizės metodologija, taikant tėkmės citometrijos metodą, bei PL imunitipavimo metodologijomis (134,213,216), mes pasirinkome minimalų 20 ląstelių slenkstį „teigiamos“ PL subpopuliacijos identifikavimui. Mažiau nei 20 specifinio imunofenotipo ląstelių nebuvo vertinamos kaip subpopuliacija. Ištyrę SD PK plazmines ląsteles nustatėme, kad 20 ląstelių slenkstinis dydis buvo optimalus užtikrinant reikalingą tyrimo jautrumą. Kadangi mūsų kontrolinė SD grupė buvo maža, tyrimo specifiškumui padidinti, vengdami klaidingai teigiamo piktybinės PL

subpopuliacijos identifikavimo, tais atvejais, kai neįmanoma įrodyti PL subpopuliacijos monokloniškumo pagal LG raišką, nustatėme papildomą kriterijų atskiros piktybinės CPL subpopuliacijos nustatymui – atskira piktybinė CPL populiacija nustatoma tik kai aberantiškai CD56 ir/ar CD19 žymenis ekspresuojanti CPL subpopuliacija yra didesnė nei 20% visų aptiktų CPL. Kloniškumo analizė vertinant LG ekspresiją labai mažose CPL subpopuliacijose yra techniškai sudėtinga ir ne visuomet įmanoma. Piktybinės CPL populiacijos identifikavimui monokloninę LG ekspresiją naudojome tik kaip papildomą kriterijų.

5.2 Cirkuliuojančių plazminių ląstelių prognostinė reikšmė

Piktybinių CPL aptikimas PK yra gerai žinomas neigiamas prognostinis faktorius naujai nustatyta ML (231). Netgi labai mažas CPL kiekis aptiktas naujai nustatyta ML sergantiems pacientams panaudojus TC ar imunofluorescencijos metodą yra susijęs su blogesnėmis ligos išieitimis (17,24,190,193). pCPL kiekis daugiau siejamas su agresyvia liga (aukštas proliferacijos indeksas, dažnesnės citogenetinės anomalijos, aktyvi angioneogenezė), nei su didesne ligos mase (17,196). Mūsų tyrimas atskleidė, kad pCPL aptikimas prieš gydymą išlieka neigiamu prognostiniu žymeniu ir pacientams sergantiems RA ML. Tiriamieji su aptinkamomis pCPL turėjo statistiškai reikšmingai trumpesnę LIP. Bendras išgyvenamumas abiejose grupėse patikimai nesiskyrė, to priežastimi galėjo būti efektyvaus gelbstinčio gydymo taikymas ir trumpas stebėjimo laikas. Šio prognostinio žymens nustatymas yra svarbus, nes sparčiai keičiantis ML gydymo metodikoms kyla neaiškumų vertinant RA ML riziką. Naujai nustatytos ligos rizikos vertinimo kriterijai tokie kaip ISS stadija nepakankamai gerai atspindi recidyvavusios ligos riziką, o duomenų apie kitus rizikos faktorius yra mažai (10).

A.C. Rawstron'as su kolegomis atlikę kartotinus matavimus ML pacientams nustatė, kad CPL kiekis didėja esant ligos progresijai, kai tuo tarpu pacientams taikant efektyvų gydymą CPL kiekis pradeda mažėti (26). Šie

duomenys paskatino mus įvertinti pCPL kinetiką, kaip ML atsako į gydymą žymenį. Atlikdami perspektyvinį tyrimą siekėme iširti ar pCPL kiekio kitimas po pirmojo chemoterapijos kurso galėtų būti naudojamas ML atsparumo skiriamam gydymui nustatymui. Pagal iš anksto nustatytus pCPL kinetikos vertinimo kriterijus pacientai buvo suskirstyti į 3 grupes. Į pirmąją grupę pateko pacientai, kuriems pCPL nebuvo nustatytos nei prieš gydymą nei po pirmojo chemoterapijos kurso (buvo mažiau nei tyrimo jautrumo riba). Šių pacientų liga buvo indolentinės eigos. Nors pirmosios grupės pacientų pasiektas atsakas į gydymą statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo II grupės pacientų, tačiau jie turėjo ilgesnį LIP. Kiti autoriai nurodo, kad ML pacientai, kuriems pCPL nenustatomos lyginant su pacientais, kuriems pCPL aptinkamos turi žemesnę beta 2 mikroglobulino koncentraciją, mažesnę PL proliferacinę aktyvumą ir jiems rečiau aptinkamos nepalankios genetinės anomalijos (20). Antrajai grupei priskirti pacientai, kuriems po pirmojo chemoterapijos kurso stebėtas pCPL mažėjimas. Šių pacientų ML buvo jautri skiriamam gydymui. 13 iš 14 (92,9%) antrosios grupės pacientų buvo pasiektas bent minimalus atsakas, nei vienam šios grupės pacientui nenutatyta ligos progresija gydymo metu. Nepaisant gero atsako į gydymą, ML klinikinė eiga šioje pacientų grupėje buvo agresyvesnė nei pirmosios grupės pacientų.

Svarbiausias šio tyrimo radinys buvo galimybė identifikuoti trečią ML pacientų grupę. Šių pacientų pCPL kiekis po pirmojo kurso nekito ar padidėjo, kas atspindėjo ML atsparumą skiriamam gydymui. Net 10 iš 12 pacientų patekusių į šią grupę buvo nustatyta ankstyva progresija, t.y. ML progresija buvo patvirtinta dar gydymo metu. Medianinis trėčiosios grupės pacientų BI buvo labai trumpas ir siekė tik 10 mėn. AP nustatyta tik vienam pacientui nepatekusiam į trečiąją grupę. Šiam pacientui pCPL nebuvo aptiktos nei prieš gydymą, nei po pirmojo gydymo kurso. Po pirmojo kurso šis pacientas pasiekė minimalų atsaką pagal EBMT kriterijus. Tęsiant gydymą, mes nustatėme labai didelį pCPL kiekį paciento PK. Netrukus buvo patvirtinta ligos progresiją pagal EBMT kriterijus ir pacientas mirė. Mes spėjame, kad įvyko agresyvi

ligos transformacija, sąlygojusi ML progresiją ir letalią išeičių. CPL kinetika po pirmojo chemoterapijos kurso šiuo atveju neleido nuspėti atsparumo gydymui, nes mėginių paėmimo metu agresyvaus transformuoto plazmocitų klonas dar galėjo nebūti arba šis klonas buvo labai mažas.

Svarbu paminėti, kad 5 pacientams iš trečios pCPL kinetikos grupės, kuriems nustačius ankstyvą ligos progresiją buvo skirtas alternatyvus gelbstintis gydymas (chemoterapija su talidomidu ar atraciklinu), pasiektas stabilus ligos pagerėjimas. Šie duomenys leidžia manyti, kad atsparumas gydymui identifikuotas tiriant pCPL kinetiką, gali būti įveiktas skiriant alternatyvų gydymą. Svarbu, kad pCPL kinetikos vertinimas leidžia prognozuoti atsparumą skiriamam gydymui dar neišsivysčius klinikinei ligos progresijai ir su ja susijusiomis komplikacijomis. Mes nustatėme, kad pCPL2/pCPL1 santykis $>0,8$ patikimiausiai identifikavo pacientus, kuriems grėisė ankstyva ligos progresija. Šis santykis galėtų būti naudojamas ateityje atliekant pCPL kinetikos tyrimus.

Ankstyvą atsaką į gydymą, pasiektą po pirmojo chemoterapijos kurso įvertinome ir naudodami EBMT kriterijus (21). EBMT atsakas nustatytas po pirmojo gydymo kurso nebuvo prognostiškai reikšmingas vertinant pacientų LIP, BI bei AP. Mes manome, kad yra 2 pagrindinės priežastys lėmusios skirtingą prognostinį pCPL kinetikos ir EBMT kriterijais pagrįsto ankstyvo atsako į gydymą vertinimo potencialą. Pirmoji būtų – paraproteino kinetikos inertiškumas, dėl ko atsakas nustatomas praėjus kelioms savaitėms po pasiekto ligos masės sumažėjimo (31). Kita priežastis, galėtų būti piktybinių plazmocitų kloninis heterogeniškumas (232,233). Paraproteino kinetikos vertinimu pagrįsti atsako į gydymą nustatymo metodai yra jautriausi daug paraproteino sekretuojančių plazmocitų kiekybiniais pokyčiams, kai tuo tarpu pCPL kinetika atspindi klonų, „paleidžiančių“ į cirkuliaciją daugiausiai pCPL, masės pokyčius. Didėjantis pCPL kiekis yra patvirtintas blogos prognozės žymuo, tuo tarpu plazmocitų produkuojamo paraproteino kiekis nesiejamas su ligos agresyvumu ir bloga prognoze, ir vertinamas tik kaip ligos masės surogatinis

žymuo (24). Taigi nustatydami pCPL kinetiką mes vertinome ne bendrą ligos masės pokytį, tačiau agresyvaus klonu kinetiką. Šiuos svarstymus galime pagrįsti praktikoje gerai žinomu faktu, kad neretai ML progresija būna be lydinčio paraproteino kiekio didėjimo. Mūsų studijoje taipogi 4 pacientams buvo stebėta diskordantiška paraproteino ir pCPL kiekio dinamika – po pirmojo gydymo kurso buvo nustatyta mažėjanti paraproteino koncentracija (pasiiekta minimalaus atsako EBMT kategorija), tačiau didėjo pCPL proporcija. Vėliau visiems 4 pacientams patvirtinta ankstyva progresija.

LLG pasižymi trupu gyvavimo plazmoje pusperiodžiu ir pastaruoju metu yra tiriamas kaip ankstyvo atsako į gydymą žymuo (105,110,112). Šiuo metu LLG reikšmė vertinant ankstyvą atsaką į gydymą lieka neaiški, literatūroje paskelbti prieštaringi duomenys. LLG pranašesnis už standartinį paraproteino tyrimą (EF) dėl trumpo plazmos pusperiodžio, tačiau iš esmės abu metodai atspindi tik paraproteiną sekretuojančių klonų kinetiką ir negali selektyviai vertinti agresyviojo klonu, kuris dažniausiai ir nulemia ligos progresija. Šiuos svarstymus reiktų patikrinti ateities tyrimuose lygiagrečiai analizuojant LLG ir pCPL kaip ankstyvo atsako žymenis.

Mūsų studija turi trūkumų. Pirmiausiai tyrimoje pacientų imtis buvo gana mažą. Pacientų gydymui naudoti keli protokolai. Tačiau didžioji dauguma pacientų – 39 (93%) buvo gydyti chemoterapija su bortzomibu. Taipogi norėtume pažymėti, kad nei vienas pacientas iš trečios pCPL grupės nebuvo gydytas VAD chemoterapija, kuri galėtų būti nepakankamai efektyvi agresyvios ligos atveju (208).

4.10. Normalių plazminių ląstelių identifikavimo ML pacientams klinikinė reikšmė

Sveikų žmonių periferiniame kraujyje aptinkamas labai mažas kiekis polikloninių plazminių ląstelių turinčių CD138+/CD38+/CD19+/CD56- imunofenotipą. Šios ankstyvos diferenciacijos fazės pre-plazminės ląstelės migruoja iš periferinių limfoidinių organų į kaulų čiulpus (133,138).

Periferiniame kraujyje taip pat aptinkamos trumpai gyvuojančios ir imunoglobulinus sekretuojančios plazminės ląstelės (133,153). CPL kiekis pas sveikus žmones padidėja reaktyvių būklių metu (pvz. infekcija, vakcinacija). Reaktyvių plazmocitų kiekio padidėjimas yra aprašytas ir kraujodaros regeneracijos metu po chemoterapijos (138,187). Normalių plazmocitų gyvavimo laikas periferiniame kraujyje yra trumpas, nes jie migruoja į kaulų čiulpus ar įvyksta apoptozė (133,153,186). Mūsų duomenimis, mes pirmieji įvertinome periferinio kraujo normalių plazminių ląstelių prognostinę svarbą mielomine liga sergantiems pacientams.

Periferiniame sveikų donorų kraujyje mes aptikome tikrai imunofenotipiškai normalias (CD138+/CD38+/CD19+/CD56-) poliklonines pagal LG raišką CPL populiacijas. CD19- CPL buvo aptinkamos tik kaip sporadinės ląstelės ir neformavo subpopuliacijų. nCPL proporcijos buvo labai panašios pas tirtus ML pacientus ir SD. Pas ML pacientus mes nenustatėme sąsajų tarp aptikto nCPL kiekio ir ligos masės bei aktyvumo parametrų. nCPL proporcija turėjo tik silpną atvirkščią koreliaciją su paciento amžiumi. Šis radinys sutampa su neseniai skelbtais A. Caraux ir kolegų duomenimis, kad pas sveikus žmones CPL kiekis senstant linkęs mažėti (234). Mūsų tyrime dalyvavusių ML pacientų su aptinkamomis ir neaptinkamomis nCPL prognozė nesiskyrė. Tačiau pacientų, kuriems nCPL kiekis po pirmojo chemoterapijos kurso padidėjo, LIP buvo ilgesnis nei tų, kuriems nCPL sumažėjo ar buvo neaptinkamos. Didėjantis nCPL kiekis gali būti susijęs su hemopoetine rekonstitucija po chemoterapijos ir gali atspindėti geresnį imuninį reaktyvumą (187). Šie radiniai sutampa su kitų tyrimų duomenimis rodančiais, kad didesnė normalių PL proporcija kaulų čiulpuose po gydymo yra susijusi ilgesniu išgyvenamumu be progresijos ir geresniu humoralinio imuniteto atsistatymu (219,220). Mūsų metodologija nustatytų nCPL ir pCPL subpopuliacijų biologinį skirtingumą pabrėžia priešinga šių ląstelių kinetikos prognostinė vertė, nes pCPL kiekio didėjimas po chemoterapijos, skirtingai nuo nCPL, buvo išskirtinai blogos prognozės žymuo. Mūsų studijos duomenimis

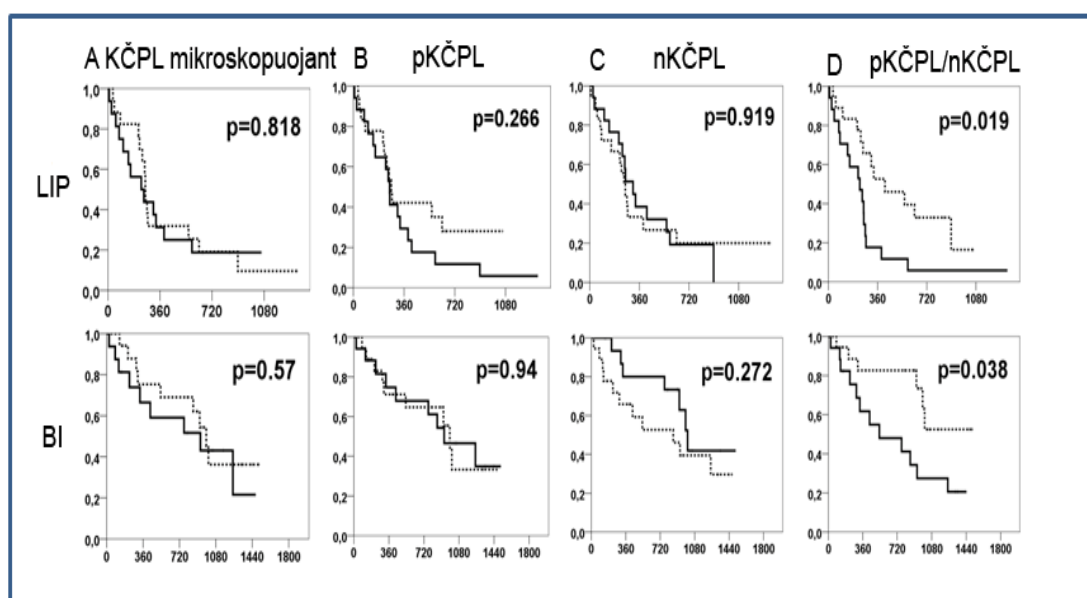
periferinė plazminių ląstelių produkcija pas ML pacientus nėra ženkliau sutrikusi.

Normalių KČ PL vertinimas ML pacientams taikant šiuolaikinę TC metodologiją yra problemiškas. Mūsų tyrimas parodė, jog patikimai galima įvertinti tik vyraujančią CD19+/CD56- nKČPL subpopuliaciją, kai tuo tarpu CD19- normalių KČPL subpopuliacijos dėl imunofenotipinės interferencijos su piktybinėmis PL įvertinti praktiškai neįmanoma. Nepaisant šių trūkumų atliktos klinikinės studijos nustatė, kad normalių KČ PL aptikimas yra svarbus piktybinių plazminių ląstelių ligų prognostinis žymuo (184,185,218-220). Mes taip pat įvertinome ML pacientų CD19+/CD56- polikloninę PL subpopuliaciją (nKČPL). ML pacientų nKČPL subpopuliacija buvo ženkliai sumažėjusi lyginant su analogiška SD subpopuliacija. Vertindami šiuos duomenis manome, kad ML pacientams būdinga imunoparezė susijusi daugiausia su normalių KČ PL depresija.

B. Paiva su kolegomis neseniai paskelbė didelės studijos, kurioje buvo įvertinta normalių KČPL prognostinė reikšmė, duomenis. Tirti 594 pacientai sergantys naujai diagnozuota ML. Nustatyta, kad pacientai pas kuriuos normalios KČPL sudarė $\geq 5\%$ visų KČPL turėjo palankesnes mielominės ligos charakteristikas, geresnes ligos išėtis (184). Nors normalių KČPL proporcija šiame tyrime lygia dalimi priklausė nuo piktybinių ir normalių KČPL kiekio, autoriai aiškiai nepademonstravo ar su normaliomis KČPL susietos ligos charakteristikos yra nepriklausomos nuo aptiktų piktybinių KČPL kiekio. Mes tyrėme pažengusia ML sergančius pacientus, kas paaiškintų mažesnę aptiktų normalių KČPL kiekį. Vertindami normalių KČPL prognostinę įtaką padalinome pacientus į dvi grupes pagal nustatytą pKČPL/nKČPL medianinę proporciją. Pacientai, kuriems buvo nustatyta didesnė nKČPL proporcija turėjo ilgesnį LIP ir BI (15 pav. D). Naudodami tą patį dichotomizacijos metodą, mes suskirstėme pacientus į grupes pagal kaulų čiulpuose mikroskopiškai aptiktų plazminių ląstelių medianinį kiekį ir TC metodu aptiktų pKČPL bei nKČPL medianas (15 pav. A - C). Įvertinę LIP ir BI naujai sudarytose pacientų grupėse

statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatėme. Iš visų 4 vertintų parametru, geriausiai ligos prognozę atspindėjo pKČPL/nKČPL santykis, kuris sumavo abiejų faktorių teikiamą prognostinę informaciją. Svarbu, kad šis santykis pasirodė svarbesnis nei tradiciniu mikroskopijos būdu įvertinta KČ plazmocitozė. Reiktų pažymėti ir tai, kad atliekant KČ PL imunofenotipinę analizę labai svarbu įvertinti ne vien piktybinių PL populiaciją tačiau ir nKČPL subpopuliaciją. Daugiamatė analizė naudojant Kokso proporcingos rizikos modelį patvirtino nepriklausomą prognostinę pKČPL/nKČPL santykio reikšmę bendram išgyvenamumui ir laikui iki ligos progresijos.

15 pav. Kaulų čiulpų plazminių ląstelių analizės metodų palyginimas



ML pacientų KČ mėginiuose plazminių ląstelių proporcija įvertinta naudojant šviesos mikroskopiją ir tėkmės citometriją (TC). Tėkmės citometrijos metodu įvertinti 3 parametrai: normalių nKČPL (CD19+/CD56-) proporcija, piktybinių plazmocitų proporcija pKČPL (CD19-/56+ ar CD19-/56-) ir nKČPL/pKČPL santykis. Pacientai suskirstyti į 2 grupes pagal kiekvieno iš nustatytų parametru medianinę vertę. Ištinė linija žymi pacientų su didesne vertinto parametro verte bendrą išgyvenamumą (BI) ar laiką iki progresijos (LIP), brūkšninė linija – pacientų su mažesne parametro verte LIP ir BI.

Apibendrinant: mes nustatėme, kad nCPL populiacija išlieka ženkliau nepakitus pas pažengusia mielomine liga sergančius pacientus. Geresnis imuninis reaktyvumas, mūsų tyrime apibūdintas kaip nCPL padidėjimas po chemoterapijos, buvo susijęs su pailgėjusiu LIP. pKČPL/nKČPL rodiklis yra prognostiškai svarbus pažengusia ML sergantiems pacientams. Mūsų duomenys, kartu su B. Paiva duomenimis rodo, kad KČPL analizė taikant daugiaparametrinę TC metodiką yra pranašesnė už KČ mėginių mikroskopavimą tiek naujai nustatyta, tiek pažengusia ML sergantiems pacientams.

6. IŠVADOS

1. Sveikų donorų kaulų čiulpuose aptinkamos >100 ląstelių turinčios ir aberantine CD19 bei CD56 žymenų ekspresija pasižyminčios polikloninės plazminių ląstelių populiacijos: CD19-/56+ ir/ar CD19-/CD56-.
2. CD19, CD56, CD45, CD20, CD38 žymenų ekspresijos skirtumai ant sveikų žmonių polikloninių bei mielomine liga sergančių žmonių piktybinių CD19-/56+ ir CD19-/CD56- plazminių ląstelių subpopuliacijų yra nepakankami, kad užtikrintu šių populiacijų atskyrimą. Tais atvejais, kai atipinė plazmocitų populiacija yra maža, būtinas lengvųjų grandžių ekspresijos vertinimas monokloniškumui patvirtinti.
3. Kontrolinės sveikų asmenų grupės periferinio kraujo mėginiuose nenustatėme aberantine CD19 ir CD56 žymenų raiška pasižyminčių plazminių ląstelių subpopuliacijų, kurios turėtų daugiau nei 20 ląstelių ir/ar sudarytų > 20% visų aptiktų CD138+/CD38+ plazminių ląstelių.
4. Piktybinių CPL aptikimas prieš gydymą yra nepalankus prognostinis žymuo pacientams sergantiems atsparia gydymui ar recidyvavusia mielomine liga. pCPL aptikimas prieš gydymą šiems pacientams buvo susijęs su statistiškai reikšmingai trumpesniu LIP ($p=0,008$).
5. pCPL proporcijos nesumažėjimas po I-ojo chemoterapijos kurso yra susijęs su ligos atsparumu skiriamam gydymui, ir yra nepriklausomas labai blogos prognozės žymuo. pCPL kinetika geriau nei standartiniai atsako vertinimo kriterijai po pirmojo chemoterapijos kurso identifikuoja pacientus atsparius gydymui ir prognozuoja ankstyvą progresiją.
6. nCPL proporcijos didėjimas po pirmojo gydymo kurso susijęs su palankia prognoze. Pacientų, kurių nCPL proporcija didėjo, LIP buvo statistiškai reikšmingai ilgesnis nei pacientų su sumažėjusia ar neaptinkama nCPL subpopuliacija ($p=0,038$).

7. Kaulų čiulpų mėginio imunofenotipavimas pažengusia mielomine liga sergantiems pacientams yra prognostiškai informatyvesnis nei mikroskopavimas. Nustatėme, jog didėjantis piktybinių KČPL/ nKČPL santykis yra statistiškai reikšmingas, nepriklausomas sutrumpėjusio LIP bei BI žymuo, tačiau mikroskopuojant nustatyta kaulų čiulpų plazminių ląstelių proporcija nebuvo prognostiškai reikšminga.

7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

1. Tiriant kaulų čiulpų plazmines ląsteles tėkmės citometrijos metodu, kuomet piktybinis plazmocitų klonas yra mažas (pvz. MLL vertinimas), CD19 ir CD56 žymenų aberantinės ekspresijos nepakanka piktybinio plazmocitų klono identifikavimui. Patikimam kaulų čiulpų plazminių ląstelių piktybiškumo nustatymui kartu su minėtų žymenų aberantine ekspresija turėtų būti nustatyta monokloninė lengvųjų grandžių raiška.
2. Gydant pažengusia mielomine liga sergančius pacientus tikslinga vertinti pCPL kiekį prieš gydymą, bei pCPL kinetiką pirmojo kurso metu. Nustačius, jog pCPL proporcija nekinta ar didėja tikslinga skirti alternatyvų gydymą.
3. Kaulų čiulpų plazminių ląstelių imunofenotipavimas taikant tėkmės citometrijos metodą teikia prognostiškai svarbesnės informacijos nei mikroskopavimas. Imunotipavimas taikant tėkmės citometriją turėtų būti pasirinkimo metodas tiriant kaulų čiulpų mėginius pažengusia mielomine liga sergantiems pacientams prieš gydymą.

8. DISERTACIJOS TEMA PASKELBTŲ DARBŲ SĄRAŠAS

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

Peceliunas V, Janiulioniene A, Matuzeviciene R, Griskevicius L. Six color flow cytometry detects plasma cells expressing aberrant immunophenotype in bone marrow of healthy donors. *Cytometry B Clin Cytom.* 2011 Apr 6 [Elektroninė publikacija prieš spausdinant]

8.2. Straipsniai Lietuvos recenzuojamuose periodiniuose leidiniuose (Index Copernicus)

Peceliunas V, Janiulioniene A, Matuzeviciene R, Griskevicius L. Flow Cytometric Detection of Immunophenotypically Normal Plasma Cells in Multiple Myeloma Patients Provides Clinically Important Information. *Laboratorinė medicina* 2011; 13, 2(50): 59–64.

8.3. Kitos publikacijos

1. Peceliunas V, Janiulioniene A, Matuzeviciene R, Griskevicius L. Circulating plasma cells (CPCs) predict the outcome of relapsed or refractory multiple myeloma (RR MM) [abstract]. *Haematologica* 2010; 95(Suppl 2):396, abs. 0954
2. Peceliunas V, Matuzeviciene RK, Janeliuniene M, Griskevicius L, Kucinskiene ZA. Evaluation of Circulating Plasma Cell Count Kinetics in the Treatment of Relapsed/Refractory Myeloma. *Cytom Part B-Clin Cy.* 2008; **74B**(6): 409-10, abs.
3. Peceliunas V, Janiulioniene A, Matuzeviciene R, Zvirblis T, Griskevicius L. Circulating plasma cells predict the outcome of relapsed or refractory multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma.* [Pateiktas spaudai].

9. LITERATŪROS ŠARAŠAS

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
2. Alexanian R, Haut A, Khan AU, Lane M, McKelvey EM, Migliore PJ, Stuckey WJ, Jr., Wilson HE. Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *JAMA* 1969;208:1680-5.
3. Harousseau JL. Ten years of improvement in the management of multiple myeloma: 2000-2010. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2010;10:424-42.
4. Brenner H, Gondos A, Pulte D. Recent major improvement in long-term survival of younger patients with multiple myeloma. *Blood* 2008;111:2521-6.
5. Kastritis E, Zervas K, Symeonidis A, Terpos E, Delimbassi S, Anagnostopoulos N, Michali E, Zomas A, Katodritou E, Gika D and others. Improved survival of patients with multiple myeloma after the introduction of novel agents and the applicability of the International Staging System (ISS): an analysis of the Greek Myeloma Study Group (GMSG). *Leukemia* 2009;23:1152-7.
6. San-Miguel JF, Dimopoulos MA, Stadtmauer EA, Rajkumar SV, Siegel D, Bravo ML, Olesnyckyj M, Knight RD, Zeldis JB, Harousseau JL and others. Effects of lenalidomide and dexamethasone treatment duration on survival in patients with relapsed or refractory multiple myeloma treated with lenalidomide and dexamethasone. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011;11:38-43.
7. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975;36:842-54.
8. Barlogie B, Jagannath S, Desikan KR, Mattox S, Vesole D, Siegel D, Tricot G, Munshi N, Fassas A, Singhal S and others. Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 1999;93:55-65.
9. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA and others. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23:3412-20.
10. Munshi NC, Anderson KC, Bergsagel PL, Shaughnessy J, Palumbo A, Durie B, Fonseca R, Stewart AK, Harousseau JL, Dimopoulos M and others. Consensus recommendations for risk stratification in multiple myeloma: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 2. *Blood* 2011;117:4696-700.
11. Waheed S, Shaughnessy JD, van Rhee F, Alsayed Y, Nair B, Anaissie E, Szymonifka J, Hoering A, Crowley J, Barlogie B. International staging system and metaphase cytogenetic abnormalities in the era of

- gene expression profiling data in multiple myeloma treated with total therapy 2 and 3 protocols. *Cancer* 2011;117:1001-9.
12. Avet-Loiseau H. Role of genetics in prognostication in myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:625-35.
 13. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, Morgan G, Van Ness B, Chesi M, Minvielle S and others. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009;23:2210-21.
 14. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, Dalva K, Fuhler G, Gratama J, Hose D and others. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008;93:431-8.
 15. Sher T, Miller KC, Deeb G, Lee K, Chanan-Khan A. Plasma cell leukaemia and other aggressive plasma cell malignancies. *Br J Haematol* 2010;150:418-27.
 16. Drake MB, Iacobelli S, van Biezen A, Morris C, Apperley JF, Niederwieser D, Bjorkstrand B, Gahrton G. Primary plasma cell leukemia and autologous stem cell transplantation. *Haematologica* 2010;95:804-9.
 17. Dingli D, Nowakowski GS, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Rajkumar SV, Greipp PR, Litzow MR, Gastineau DA, Witzig TE and others. Flow cytometric detection of circulating myeloma cells before transplantation in patients with multiple myeloma: a simple risk stratification system. *Blood* 2006;107:3384-8.
 18. Ludwig H, Beksac M, Blade J, Boccadoro M, Cavenagh J, Cavo M, Dimopoulos M, Drach J, Einsele H, Facon T and others. Current multiple myeloma treatment strategies with novel agents: a European perspective. *Oncologist* 2010;15:6-25.
 19. Lokhorst H, Einsele H, Vesole D, Bruno B, San Miguel J, Perez-Simon JA, Kroger N, Moreau P, Gahrton G, Gasparetto C and others. International Myeloma Working Group consensus statement regarding the current status of allogeneic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2010;28:4521-30.
 20. Avet-Loiseau H, Leleu X, Roussel M, Moreau P, Guerin-Charbonnel C, Caillot D, Marit G, Benboubker L, Voillat L, Mathiot C and others. Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del(17p). *J Clin Oncol* 2010;28:4630-4.
 21. Blade J, Samson D, Reece D, Apperley J, Bjorkstrand B, Gahrton G, Gertz M, Giralt S, Jagannath S, Vesole D. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant. *Br J Haematol* 1998;102:1115-23.
 22. Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H. The role of complete response in multiple myeloma. *Blood* 2009;114:3139-46.

23. Billadeau D, Van Ness B, Kimlinger T, Kyle RA, Therneau TM, Greipp PR, Witzig TE. Clonal circulating cells are common in plasma cell proliferative disorders: a comparison of monoclonal gammopathy of undetermined significance, smoldering multiple myeloma, and active myeloma. *Blood* 1996;88:289-96.
24. Nowakowski GS, Witzig TE, Dingli D, Tracz MJ, Gertz MA, Lacy MQ, Lust JA, Dispenzieri A, Greipp PR, Kyle RA and others. Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2005;106:2276-9.
25. Kovarova L, Buresova I, Buchler T, Suska R, Pour L, Zahradova L, Penka M, Hajek R. Phenotype of plasma cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Neoplasma* 2009;56:526-32.
26. Rawstron AC, Owen RG, Davies FE, Johnson RJ, Jones RA, Richards SJ, Evans PA, Child JA, Smith GM, Jack AS and others. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol* 1997;97:46-55.
27. Kumar S, Rajkumar SV, Kimlinger T, Greipp PR, Witzig TE. CD45 expression by bone marrow plasma cells in multiple myeloma: clinical and biological correlations. *Leukemia* 2005;19:1466-70.
28. San Miguel JF, Gutierrez NC, Mateo G, Orfao A. Conventional diagnostics in multiple myeloma. *Eur J Cancer* 2006;42:1510-9.
29. Cannizzo E, Bellio E, Sohani AR, Hasserjian RP, Ferry JA, Dorn ME, Sadowski C, Bucci JJ, Carulli G, Preffer F. Multiparameter immunophenotyping by flow cytometry in multiple myeloma: The diagnostic utility of defining ranges of normal antigenic expression in comparison to histology. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78:231-8.
30. Carulli G, Cannizzo E, Ottaviano V, Cervetti G, Buda G, Galimberti S, Barate C, Marini A, Petrini M. Abnormal phenotype of bone marrow plasma cells in patients with chronic myeloid leukemia undergoing therapy with Imatinib. *Leuk Res* 2010;34:1336-9.
31. Paraskevas F. Effector Mechanisms in Immunity. In: Greer JP, editor. *Wintobe's Clinical Hematology*. 11th ed. Volume I. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p 527 - 603.
32. Raab MS, Anderson CK. Basic Biology of Plasma Cell Dyscrasias Focus on the Role of the Tumor Microenvironment. In: Lonial S, editor. *Myeloma Therapy Pursuing the Plasma Cell*, Contemporary Hematology. Atlanta: Humana Press; 2008. p 23-41.
33. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood* 2008;112:4384-99.
34. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Offord JR, Dispenzieri A, Katzmann JA, Melton LJ, 3rd. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006;354:1362-9.

35. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Remstein ED, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ, 3rd. Long-term follow-up of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2003;102:3759-64.
36. Kyle RA, Steensma DP. History of multiple myeloma. *Recent Results Cancer Res* 2011;183:3-23.
37. Macintyre W. Case of Mollities and Fragilitas Ossium, accompanied with urine strongly charged with animal matter. *Med Chir Trans* 1850;33:211-32.
38. von Rustizky J. Multiples myelom. *Deutsche Zeitschrift fur Chirurgie* 1873;3:162 - 172.
39. Kyle RA. Multiple myeloma: an odyssey of discovery. *Br J Haematol* 2000;111:1035-44.
40. Blokhin N, Larionov L, Perevodchikova N, Chebotareva L, Merkulova N. [Clinical experiences with sarcolysin in neoplastic diseases]. *Ann N Y Acad Sci* 1958;68:1128-32.
41. Bergsagel DE, Sprague CC, Ross SW. Evaluation of new chemotherapeutic agents in the treatment of multiple myeloma. I. Plan of study. *Cancer Chemother Rep* 1962;21:69-74.
42. McElwain TJ, Powles RL. High-dose intravenous melphalan for plasma-cell leukaemia and myeloma. *Lancet* 1983;2:822-4.
43. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, Zeldenrust SR, Dingli D, Russell SJ, Lust JA and others. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 2008;111:2516-20.
44. Bruno B, Rotta M, Patriarca F, Mordini N, Allione B, Carnevale-Schianca F, Giaccone L, Sorasio R, Omede P, Baldi I and others. A comparison of allografting with autografting for newly diagnosed myeloma. *N Engl J Med* 2007;356:1110-20.
45. Barlogie B, Kyle RA, Anderson KC, Greipp PR, Lazarus HM, Hurd DD, McCoy J, Moore DF, Jr., Dakhil SR, Lanier KS and others. Standard chemotherapy compared with high-dose chemoradiotherapy for multiple myeloma: final results of phase III US Intergroup Trial S9321. *J Clin Oncol* 2006;24:929-36.
46. Wintrobe MM, Greer JP. *Wintrobe's clinical hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
47. Becker N. Epidemiology of multiple myeloma. *Recent Results Cancer Res* 2011;183:25-35.
48. Blattner WA, Jacobson RJ, Shulman G. Multiple myeloma in South African blacks. *Lancet* 1979;1:928-9.
49. Bowden M, Crawford J, Cohen HJ, Noyama O. A comparative study of monoclonal gammopathies and immunoglobulin levels in Japanese and United States elderly. *J Am Geriatr Soc* 1993;41:11-4.
50. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, Dispenzieri A, Kumar S, Clark RJ, Baris D and others.

- Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009;113:5412-7.
51. Riedel DA, Pottern LM. The epidemiology of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1992;6:225-47.
 52. Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A, Kamada N, Dohy H, Matsuo T, Matsui T and others. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res* 1994;137:S68-97.
 53. Vlaanderen J, Lan Q, Kromhout H, Rothman N, Vermeulen R. Occupational benzene exposure and the risk of lymphoma subtypes: a meta-analysis of cohort studies incorporating three study quality dimensions. *Environ Health Perspect* 2011;119:159-67.
 54. Adami J, Nyren O, Bergstrom R, Ekblom A, Engholm G, Englund A, Glimelius B. Smoking and the risk of leukemia, lymphoma, and multiple myeloma (Sweden). *Cancer Causes Control* 1998;9:49-56.
 55. Fritschi L, Siemiatycki J. Lymphoma, myeloma and occupation: results of a case-control study. *Int J Cancer* 1996;67:498-503.
 56. Bergsagel DE, Wong O, Bergsagel PL, Alexanian R, Anderson K, Kyle RA, Raabe GK. Benzene and multiple myeloma: appraisal of the scientific evidence. *Blood* 1999;94:1174-82.
 57. Grosbois B, Jegou P, Attal M, Payen C, Rapp MJ, Fuzibet JG, Maigre M, Bataille R. Familial multiple myeloma: report of fifteen families. *Br J Haematol* 1999;105:768-70.
 58. Lynch HT, Sanger WG, Pirruccello S, Quinn-Laquer B, Weisenburger DD. Familial multiple myeloma: a family study and review of the literature. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1479-83.
 59. Chng WJ, Glebov O, Bergsagel PL, Kuehl WM. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:571-96.
 60. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2002;2:175-87.
 61. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, Epstein J, Yaccoby S, Sawyer J, Burington B and others. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 2006;108:2020-8.
 62. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J, Jr. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* 2005;106:296-303.
 63. Bergsagel PL, Kuehl WM. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene* 2001;20:5611-22.
 64. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, Leyvraz S, Michallet M, Yakoub-Agha I, Garderet L and others. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood* 2007;109:3489-95.

65. Tassone P, Tagliaferri P, Rossi M, Gaspari M, Terracciano R, Venuta S. Genetics and molecular profiling of multiple myeloma: novel tools for clinical management? *Eur J Cancer* 2006;42:1530-8.
66. Bergsagel PL, Kuehl WM. Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma. *Immunol Rev* 2003;194:96-104.
67. Teo SK. Properties of thalidomide and its analogues: implications for anticancer therapy. *AAPS J* 2005;7:E14-9.
68. Sprynski AC, Hose D, Kassambara A, Vincent L, Jourdan M, Rossi JF, Goldschmidt H, Klein B. Insulin is a potent myeloma cell growth factor through insulin/IGF-1 hybrid receptor activation. *Leukemia* 2010;24:1940-50.
69. Jourdan M, Moreaux J, Vos JD, Hose D, Mahtouk K, Abouladze M, Robert N, Baudard M, Reme T, Romanelli A and others. Targeting NF-kappaB pathway with an IKK2 inhibitor induces inhibition of multiple myeloma cell growth. *Br J Haematol* 2007;138:160-8.
70. Bommert K, Bargou RC, Stuhmer T. Signalling and survival pathways in multiple myeloma. *Eur J Cancer* 2006;42:1574-80.
71. Boyd KD, Davies FE, Morgan GJ. Novel drugs in myeloma: harnessing tumour biology to treat myeloma. *Recent Results Cancer Res* 2011;183:151-87.
72. Terpos E, Dimopoulos MA, Sezer O, Roodman D, Abildgaard N, Vescio R, Tosi P, Garcia-Sanz R, Davies F, Chanan-Khan A and others. The use of biochemical markers of bone remodeling in multiple myeloma: a report of the International Myeloma Working Group. *Leukemia* 2010;24:1700-12.
73. Terpos E, Moulopoulos LA, Dimopoulos MA. Advances in imaging and the management of myeloma bone disease. *J Clin Oncol* 2011;29:1907-15.
74. Katodritou E, Dimopoulos MA, Zervas K, Terpos E. Update on the use of erythropoiesis-stimulating agents (ESAs) for the management of anemia of multiple myeloma and lymphoma. *Cancer Treat Rev* 2009;35:738-43.
75. Maes K, Nemeth E, Roodman GD, Huston A, Esteve F, Freytes C, Callander N, Katodritou E, Tussing-Humphreys L, Rivera S and others. In anemia of multiple myeloma, hepcidin is induced by increased bone morphogenetic protein 2. *Blood* 2010;116:3635-44.
76. Clark AD, Shetty A, Soutar R. Renal failure and multiple myeloma: pathogenesis and treatment of renal failure and management of underlying myeloma. *Blood Rev* 1999;13:79-90.
77. Knudsen LM, Hippe E, Hjorth M, Holmberg E, Westin J. Renal function in newly diagnosed multiple myeloma--a demographic study of 1353 patients. The Nordic Myeloma Study Group. *Eur J Haematol* 1994;53:207-12.

78. Pote A, Zwizinski C, Simon EE, Meleg-Smith S, Batuman V. Cytotoxicity of myeloma light chains in cultured human kidney proximal tubule cells. *Am J Kidney Dis* 2000;36:735-44.
79. Li M, Hering-Smith KS, Simon EE, Batuman V. Myeloma light chains induce epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubule epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:860-70.
80. Swerdlow SH. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008. 439 p. p.
81. Shaughnessy JD, Jr., Zhan F, Burington BE, Huang Y, Colla S, Hanamura I, Stewart JP, Kordsmeier B, Randolph C, Williams DR and others. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood* 2007;109:2276-84.
82. Powles R, Sirohi B, Singhal S, Treleaven J, Kulkarni S, Horton C, Dearden C, Mehta J. 10-year survival in myeloma: Have the results improved in the last decade? *Blood* 2003;102:689a-690a.
83. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, Casassus P, Maisonneuve H, Facon T, Ifrah N and others. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *Intergroupe Francais du Myelome. N Engl J Med* 1996;335:91-7.
84. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, Harousseau JL, Ben-Yehuda D, Lonial S, Goldschmidt H and others. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med* 2005;352:2487-98.
85. Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, Munshi N, Anaissie E, Wilson C, Dhodapkar M and others. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 1999;341:1565-71.
86. Richardson PG, Schlossman RL, Weller E, Hideshima T, Mitsiades C, Davies F, LeBlanc R, Catley LP, Doss D, Kelly K and others. Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood* 2002;100:3063-7.
87. Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, Brown J, Drayson MT, Selby PJ. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003;348:1875-83.
88. Palumbo A, Bringhen S, Petrucci MT, Musto P, Rossini F, Nunzi M, Lauta VM, Bergonzi C, Barbui A, Caravita T and others. Intermediate-dose melphalan improves survival of myeloma patients aged 50 to 70: results of a randomized controlled trial. *Blood* 2004;104:3052-7.
89. Blade J, Rosinol L, Cibeira MT, Rovira M, Carreras E. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma beyond 2010. *Blood* 2010;115:3655-63.

90. Alexanian R, Barlogie B, Tucker S. VAD-based regimens as primary treatment for multiple myeloma. *Am J Hematol* 1990;33:86-9.
91. Rajkumar SV, Rosinol L, Hussein M, Catalano J, Jedrzejczak W, Lucy L, Olesnyckyj M, Yu Z, Knight R, Zeldis JB and others. Multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2008;26:2171-7.
92. Cavo M, Tacchetti P, Patriarca F, Petrucci MT, Pantani L, Galli M, Di Raimondo F, Crippa C, Zamagni E, Palumbo A and others. Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus dexamethasone as induction therapy before, and consolidation therapy after, double autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: a randomised phase 3 study. *Lancet* 2010;376:2075-85.
93. Kumar SK, Flinn I, Noga SJ, Hari P, Rifkin R, Callander N, Bhandari M, Wolf JL, Gasparetto C, Krishnan A and others. Bortezomib, dexamethasone, cyclophosphamide and lenalidomide combination for newly diagnosed multiple myeloma: phase 1 results from the multicenter EVOLUTION study. *Leukemia* 2010;24:1350-6.
94. Attal M, Harousseau JL, Facon T, Guilhot F, Doyen C, Fuzibet JG, Monconduit M, Hulin C, Caillot D, Bouabdallah R and others. Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003;349:2495-502.
95. Attal M, Harousseau JL, Leyvraz S, Doyen C, Hulin C, Benboubker L, Yakoub Agha I, Bourhis JH, Garderet L, Pegourie B and others. Maintenance therapy with thalidomide improves survival in patients with multiple myeloma. *Blood* 2006;108:3289-94.
96. McCarthy PL, Owzar K, Anderson KC, Hofmeister CC, Hurd DD, Hassoun H, Giralt S, Stadtmauer EA, Richardson PG, Weisdorf DJ and others. Phase III Intergroup Study of Lenalidomide Versus Placebo Maintenance Therapy Following Single Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation (AHSCT) for Multiple Myeloma: CALGB 100104. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2010;116:37-.
97. Attal M, Lauwers Vc, Marit G, Caillot D, Facon T, Hulin C, Moreau P, Mathiot C, Roussel M, Payen C and others. Maintenance Treatment with Lenalidomide After Transplantation for MYELOMA: Final Analysis of the IFM 2005-02. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2010;116:310-.
98. Mateos MV, Richardson PG, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, Spicka I, Petrucci MT, Palumbo A and others. Bortezomib plus melphalan and prednisone compared with melphalan and prednisone in previously untreated multiple myeloma: updated follow-up and impact of subsequent therapy in the phase III VISTA trial. *J Clin Oncol* 2010;28:2259-66.
99. Facon T, Mary JY, Hulin C, Benboubker L, Attal M, Pegourie B, Renaud M, Harousseau JL, Guillermin G, Chaletteix C and others.

- Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet* 2007;370:1209-18.
100. Rosinol L, Perez-Simon JA, Sureda A, de la Rubia J, de Arriba F, Lahuerta JJ, Gonzalez JD, Diaz-Mediavilla J, Hernandez B, Garcia-Frade J and others. A prospective PETHEMA study of tandem autologous transplantation versus autograft followed by reduced-intensity conditioning allogeneic transplantation in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2008;112:3591-3.
 101. Bjorkstrand B, Iacobelli S, Hegenbart U, Gruber A, Greinix H, Volin L, Narni F, Musto P, Beksac M, Bosi A and others. Tandem Autologous/Reduced-Intensity Conditioning Allogeneic Stem-Cell Transplantation Versus Autologous Transplantation in Myeloma: Long-Term Follow-Up. *J Clin Oncol* 2011.
 102. Vij R, Siegel DS, Kaufman JL, Jakubowiak AJ, Stewart AK, Jagannath S, Kukreti V, Le MH, Bennett MK, Wang M and others. Results of an ongoing open-label, phase II study of carfilzomib in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma (R/R MM). *ASCO Meeting Abstracts* 2010;28:8000.
 103. Lacy MQ, Allred JB, Gertz MA, Hayman SR, Detweiler Short K, Buadi F, Dispenzieri A, Kumar S, Greipp PR, Lust JA and others. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone in myeloma refractory to both bortezomib and lenalidomide: comparison of two dosing strategies in dual-refractory disease. *Blood* 2011.
 104. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Blade J, Barlogie B, Anderson K, Gertz M, Dimopoulos M, Westin J, Sonneveld P and others. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:1467-73.
 105. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, Miguel JS, Ludwig H, Hajek R, Palumbo A, Jagannath S, Blade J, Lonial S and others. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009;23:215-24.
 106. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 2007;7:715-25.
 107. Low S, Mezo A. Inhibitors of the FcRn:IgG Protein-Protein Interaction. *The AAPS Journal* 2009;11:432-434.
 108. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell AR, Kyle RA. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem* 2002;48:1437-44.
 109. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Harvey TC, Drayson MT. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet* 2003;361:489-91.
 110. Dispenzieri A, Zhang L, Katzmann JA, Snyder M, Blood E, DeGoey R, Henderson K, Kyle RA, Oken MM, Bradwell AR and others. Appraisal

- of immunoglobulin free light chain as a marker of response. *Blood* 2008;111:4908-15.
111. Orłowski R, Sutherland H, Blade J, Miguel JS, Hajek R, Nagler A, Sonneveld P, Spencer A, Robak T, Mundle S and others. Early Normalization of Serum Free Light Chain Is Associated with Prolonged Time to Progression Following Bortezomib {+/-} Pegylated Liposomal Doxorubicin Treatment of Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2007;110:2735-.
 112. van Rhee F, Bolejack V, Hollmig K, Pineda-Roman M, Anaissie E, Epstein J, Shaughnessy JD, Jr., Zangari M, Tricot G, Mohiuddin A and others. High serum-free light chain levels and their rapid reduction in response to therapy define an aggressive multiple myeloma subtype with poor prognosis. *Blood* 2007;110:827-32.
 113. Elliott BM, Peti S, Osman K, Scigliano E, Lee D, Isola L, Kostakoglu L. Combining FDG-PET/CT with laboratory data yields superior results for prediction of relapse in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2011;86:289-98.
 114. Fenchel M, Konaktchieva M, Weisel K, Kraus S, Brodoefel H, Claussen CD, Horger M. Early response assessment in patients with multiple myeloma during anti-angiogenic therapy using arterial spin labelling: first clinical results. *Eur Radiol* 2010;20:2899-906.
 115. Coulter WH. High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. *Proc Natl Electron Conf*; 1956; Chicago. p 1034 - 1040. (*Proc Natl Electron Conf*).
 116. Kamensky LA, Melamed MR, Derman H. Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis. *Science* 1965;150:630-1.
 117. Dittrich W, Gohde W. [Impulse fluorometry of single cells in suspension]. *Z Naturforsch B* 1969;24:360-1.
 118. Spyropoulos B. 50 years LASERS: in vitro diagnostics, clinical applications and perspectives. *Clin Lab* 2011;57:131-42.
 119. Giaretti W. Origins of ... flow cytometry and applications in oncology. *J Clin Pathol* 1997;50:275-7.
 120. Givan AL. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol* 2011;699:1-29.
 121. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem* 2000;46:1221-9.
 122. Snow C. Flow cytometer electronics. *Cytometry A* 2004;57:63-9.
 123. Nagler A, Condiotti R, Rabinowitz R, Schlesinger M, Nguyen M, Terstappen LW. Detection of minimal residual disease (MRD) after bone marrow transplantation (BMT) by multi-parameter flow cytometry (MPFC). *Med Oncol* 1999;16:177-87.
 124. Buccisano F, Maurillo L, Spagnoli A, Del Principe MI, Fraboni D, Panetta P, Ottone T, Consalvo MI, Lavorgna S, Bulian P and others. Cytogenetic and molecular diagnostic characterization combined to postconsolidation minimal residual disease assessment by flow

- cytometry improves risk stratification in adult acute myeloid leukemia. *Blood* 2010;116:2295-303.
125. Paraskevas F. Clinical Flow Cytometry. In: Greer JA, editor. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Volume 11: Lippincott Williams&Wilkins; 2004. p 99 - 130.
 126. Barlogie B, Alexanian R, Gehan EA, Smallwood L, Smith T, Drewinko B. Marrow cytometry and prognosis in myeloma. *J Clin Invest* 1983;72:853-61.
 127. Van Camp B, Thielemans C, Dehou MF, De Mey J, De Waele M. Two monoclonal antibodies (OKIa1 and OKT10) for the study of the final B cell maturation. *J Clin Immunol* 1982;2:67S-74S.
 128. Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul* 1989;1:27-35.
 129. Van Camp B, Durie BG, Spier C, De Waele M, Van Riet I, Vela E, Frutiger Y, Richter L, Grogan TM. Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell-associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood* 1990;76:377-82.
 130. Harada H, Kawano MM, Huang N, Harada Y, Iwato K, Tanabe O, Tanaka H, Sakai A, Asaoku H, Kuramoto A. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 1993;81:2658-63.
 131. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Blade J, Gonzalez M, Garcia-Sanz R, Lopez-Berges C, Moro MJ, Hernandez J, Escribano L and others. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol* 1998;152:1655-65.
 132. Witzig TE, Meyers C, Therneau T, Greipp PR. A prospective study of CD38/45 flow cytometry and immunofluorescence microscopy to detect blood plasma cells in patients with plasma cell proliferative disorders. *Leuk Lymphoma* 2000;38:345-50.
 133. Pellat-Deceunynck C, Bataille R. Normal and malignant human plasma cells: proliferation, differentiation, and expansions in relation to CD45 expression. *Blood Cells Mol Dis* 2004;32:293-301.
 134. Rawstron AC. Immunophenotyping of plasma cells. *Curr Protoc Cytom* 2006;Chapter 6:Unit6 23.
 135. Mateo Manzanera G, San Miguel Izquierdo JF, Orfao de Matos A. Immunophenotyping of plasma cells in multiple myeloma. *Methods Mol Med* 2005;113:5-24.
 136. Lund FE, Muller-Steffner H, Romero-Ramirez H, Moreno-Garcia ME, Partida-Sanchez S, Makris M, Oppenheimer NJ, Santos-Argumedo L, Schuber F. CD38 induces apoptosis of a murine pro-B leukemic cell line by a tyrosine kinase-dependent but ADP-ribosyl cyclase- and NAD glycohydrolase-independent mechanism. *Int Immunol* 2006;18:1029-42.
 137. Ferrero E, Malavasi F. Human CD38, a leukocyte receptor and ectoenzyme, is a member of a novel eukaryotic gene family of

- nicotinamide adenine dinucleotide+-converting enzymes: extensive structural homology with the genes for murine bone marrow stromal cell antigen 1 and aplysian ADP-ribosyl cyclase. *J Immunol* 1997;159:3858-65.
138. Medina F, Segundo C, Campos-Caro A, Gonzalez-Garcia I, Brieva JA. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* 2002;99:2154-61.
 139. Mahtouk K, Cremer FW, Reme T, Jourdan M, Baudard M, Moreaux J, Requirand G, Fiol G, De Vos J, Moos M and others. Heparan sulphate proteoglycans are essential for the myeloma cell growth activity of EGF-family ligands in multiple myeloma. *Oncogene* 2006;25:7180-91.
 140. De Vos J, Hose D, Reme T, Tarte K, Moreaux J, Mahtouk K, Jourdan M, Goldschmidt H, Rossi JF, Cremer FW and others. Microarray-based understanding of normal and malignant plasma cells. *Immunol Rev* 2006;210:86-104.
 141. Paiva B, Almeida J, Perez-Andres M, Mateo G, Lopez A, Rasillo A, Vidriales MB, Lopez-Berges MC, Miguel JF, Orfao A. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78:239-52.
 142. Trowbridge IS, Thomas ML. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 1994;12:85-116.
 143. Robillard N, Pellat-Deceunynck C, Bataille R. Phenotypic characterization of the human myeloma cell growth fraction. *Blood* 2005;105:4845-8.
 144. Descamps G, Gomez-Bougie P, Venot C, Moreau P, Bataille R, Amiot M. A humanised anti-IGF-1R monoclonal antibody (AVE1642) enhances Bortezomib-induced apoptosis in myeloma cells lacking CD45. *Br J Cancer* 2009;100:366-9.
 145. Descamps G, Pellat-Deceunynck C, Szpak Y, Bataille R, Robillard N, Amiot M. The magnitude of Akt/phosphatidylinositol 3'-kinase proliferating signaling is related to CD45 expression in human myeloma cells. *J Immunol* 2004;173:4953-9.
 146. Raja KR, 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;149:334-51.
 147. Pesando JM, Bouchard LS, McMaster BE. CD19 is functionally and physically associated with surface immunoglobulin. *J Exp Med* 1989;170:2159-64.
 148. Otero DC, Anzelon AN, Rickert RC. CD19 function in early and late B cell development: I. Maintenance of follicular and marginal zone B cells requires CD19-dependent survival signals. *J Immunol* 2003;170:73-83.
 149. Pecelionas V, Janiulioniene A, Matuzeviciene R, Griskevicius L. Six color flow cytometry detects plasma cells expressing aberrant

- immunophenotype in bone marrow of healthy donors. *Clinical Cytometry: Part B* 2011;In press.
150. Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* 1989;169:2233-8.
 151. Warren HS. Cd56. *J Biol Regul Homeost Agents* 2000;14:317-21.
 152. Pellat-Deceunynck C, Barille S, Puthier D, Rapp MJ, Harousseau JL, Bataille R, Amiot M. Adhesion molecules on human myeloma cells: significant changes in expression related to malignancy, tumor spreading, and immortalization. *Cancer Res* 1995;55:3647-53.
 153. Bataille R, Jego G, Robillard N, Barille-Nion S, Harousseau JL, Moreau P, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 2006;91:1234-40.
 154. Van Riet I, De Waele M, Remels L, Lacor P, Schots R, Van Camp B. Expression of cytoadhesion molecules (CD56, CD54, CD18 and CD29) by myeloma plasma cells. *Br J Haematol* 1991;79:421-7.
 155. Sahara N, Takeshita A. Prognostic significance of surface markers expressed in multiple myeloma: CD56 and other antigens. *Leuk Lymphoma* 2004;45:61-5.
 156. Hundemer M, Klein U, Hose D, Raab MS, Cremer FW, Jauch A, Benner A, Heiss C, Moos M, Ho AD and others. Lack of CD56 expression on myeloma cells is not a marker for poor prognosis in patients treated by high-dose chemotherapy and is associated with translocation t(11;14). *Bone Marrow Transplant* 2007;40:1033-7.
 157. Reth M, Hombach J, Wienands J, Campbell KS, Chien N, Justement LB, Cambier JC. The B-cell antigen receptor complex. *Immunol Today* 1991;12:196-201.
 158. Batata A, Shen B. Diagnostic value of clonality of surface immunoglobulin light and heavy chains in malignant lymphoproliferative disorders. *Am J Hematol* 1993;43:265-70.
 159. Babusikova O, Stevulova L. Analysis of surface and cytoplasmic immunoglobulin light/heavy chains by flow cytometry using a lysed-whole-blood technique: Implications for the differential diagnosis of B-cell malignancies. *Neoplasma* 2004;51:422-30.
 160. Lewis RE, Cruse JM, Pierce S, Lam J, Tadros Y. Surface and cytoplasmic immunoglobulin expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Exp Mol Pathol* 2005;79:146-50.
 161. Stewart JC, Villasmil ML, Frampton MW. Changes in fluorescence intensity of selected leukocyte surface markers following fixation. *Cytometry A* 2007;71:379-85.
 162. Gujral S, Tembhare P, Badrinath Y, Subramanian PG, Kumar A, Sehgal K. Intracytoplasmic antigen study by flow cytometry in hematology neoplasm. *Indian J Pathol Microbiol* 2009;52:135-44.

163. Olteanu H, Harrington AM, Hari P, Kroft SH. CD200 expression in plasma cell myeloma. *Br J Haematol* 2011;153:408-11.
164. Robillard N, Avet-Loiseau H, Garand R, Moreau P, Pineau D, Rapp MJ, Harousseau JL, Bataille R. CD20 is associated with a small mature plasma cell morphology and t(11;14) in multiple myeloma. *Blood* 2003;102:1070-1.
165. Guikema JE, Hovenga S, Vellenga E, Conradie JJ, Abdulahad WH, Bekkema R, Smit JW, Zhan F, Shaughnessy J, Jr., Bos NA. CD27 is heterogeneously expressed in multiple myeloma: low CD27 expression in patients with high-risk disease. *Br J Haematol* 2003;121:36-43.
166. Mateo G, Montalban MA, Vidriales MB, Lahuerta JJ, Mateos MV, Gutierrez N, Rosinol L, Montejano L, Blade J, Martinez R and others. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J Clin Oncol* 2008;26:2737-44.
167. Sahara N, Ohnishi K, Ono T, Sugimoto Y, Kobayashi M, Takeshita K, Shigeno K, Nakamura S, Naito K, Tamashima S and others. Clinicopathological and prognostic characteristics of CD33-positive multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2006;77:14-8.
168. Damgaard T, Knudsen LM, Dahl IM, Gimsing P, Lodahl M, Rasmussen T. Regulation of the CD56 promoter and its association with proliferation, anti-apoptosis and clinical factors in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2009;50:236-46.
169. Buonaccorsi JN, Kroft SH, Harrington AM, Vantuinen P, Olteanu H. Clinicopathologic analysis of the impact of CD23 expression in plasma cell myeloma with t(11;14)(q13;q32). *Ann Diagn Pathol* 2011.
170. Harousseau JL, Palumbo A, Richardson PG, Schlag R, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, Kentos A, Cavo M, Golenkov A and others. Superior outcomes associated with complete response in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with nonintensive therapy: analysis of the phase 3 VISTA study of bortezomib plus melphalan-prednisone versus melphalan-prednisone. *Blood* 2010;116:3743-50.
171. de Tute RM, Jack AS, Child JA, Morgan GJ, Owen RG, Rawstron AC. A single-tube six-colour flow cytometry screening assay for the detection of minimal residual disease in myeloma. *Leukemia* 2007;21:2046-9.
172. Morice WG, Hanson CA, Kumar S, Frederick LA, Lesnick CE, Greipp PR. Novel multi-parameter flow cytometry sensitively detects phenotypically distinct plasma cell subsets in plasma cell proliferative disorders. *Leukemia* 2007;21:2043-6.
173. Frebet E, Abraham J, Genevieve F, Lepelley P, Daliphard S, Bardet V, Amsellem S, Guy J, Mullier F, Durrieu F and others. A GEIL flow cytometry consensus proposal for quantification of plasma cells: application to differential diagnosis between MGUS and myeloma. *Cytometry B Clin Cytom* 2011;80:176-85.

174. Nair B, van Rhee F, Shaughnessy JD, Jr., Anaissie E, Szymonifka J, Hoering A, Alsayed Y, Waheed S, Crowley J, Barlogie B. Superior results of Total Therapy 3 (2003-33) in gene expression profiling-defined low-risk multiple myeloma confirmed in subsequent trial 2006-66 with VRD maintenance. *Blood* 2010;115:4168-73.
175. Palumbo A, Bringhen S, Rossi D, Cavalli M, Larocca A, Ria R, Offidani M, Patriarca F, Nozzoli C, Guglielmelli T and others. Bortezomib-melphalan-prednisone-thalidomide followed by maintenance with bortezomib-thalidomide compared with bortezomib-melphalan-prednisone for initial treatment of multiple myeloma: a randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 2010;28:5101-9.
176. Pineda-Roman M, Zangari M, Haessler J, Anaissie E, Tricot G, van Rhee F, Crowley J, Shaughnessy JD, Jr., Barlogie B. Sustained complete remissions in multiple myeloma linked to bortezomib in total therapy 3: comparison with total therapy 2. *Br J Haematol* 2008;140:625-34.
177. Lioznov M, Badbaran A, Fehse B, Bacher U, Zander AR, Kroger NM. Monitoring of minimal residual disease in multiple myeloma after allo-SCT: flow cytometry vs PCR-based techniques. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:913-6.
178. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, Martinez J, Mateo G, Martinez P, Ribera JM, Hernandez JM, Lahuerta JJ, Orfao A and others. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica* 2005;90:1365-72.
179. Chanan-Khan AA, Giralt S. Importance of achieving a complete response in multiple myeloma, and the impact of novel agents. *J Clin Oncol* 2010;28:2612-24.
180. Paiva B, Vidriales MB, Cervero J, Mateo G, Perez JJ, Montalban MA, Sureda A, Montejano L, Gutierrez NC, Garcia de Coca A and others. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood* 2008;112:4017-23.
181. Paiva B, Martinez-Lopez J, Vidriales MB, Mateos MV, Montalban MA, Fernandez-Redondo E, Alonso L, Oriol A, Teruel AI, de Paz R and others. Comparison of immunofixation, serum free light chain, and immunophenotyping for response evaluation and prognostication in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2011;29:1627-33.
182. Moreau P, Robillard N, Jego G, Pellat C, Le Gouill S, Thoumi S, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Bataille R. Lack of CD27 in myeloma delineates different presentation and outcome. *Br J Haematol* 2006;132:168-70.
183. Moreaux J, Hose D, Reme T, Jourdan E, Hundemer M, Legouffe E, Moine P, Bourin P, Moos M, Corre J and others. CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2006;108:4194-7.

184. Paiva B, Vidriales MB, Mateo G, Perez JJ, Montalban MA, Sureda A, Montejano L, Gutierrez NC, Garcia de Coca A, de las Heras N and others. The persistence of immunophenotypically normal residual bone marrow plasma cells at diagnosis identifies a good prognostic subgroup of symptomatic multiple myeloma patients. *Blood* 2009;114:4369-72.
185. Perez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, Garcia-Sanz R, Mateos MV, de Coca AG, Galende J, Martin-Nunez G, Alonso JM, de Las Heras N and others. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood* 2007;110:2586-92.
186. Jego G, Robillard N, Puthier D, Amiot M, Accard F, Pineau D, Harousseau JL, Bataille R, Pellat-Deceunynck C. Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood* 1999;94:701-12.
187. Jego G, Avet-Loiseau H, Robillard N, Moreau P, Amiot M, Harousseau J, Pellat-Deceunynck C, Bataille R. Reactive plasmacytoses in multiple myeloma during hematopoietic recovery with G- or GM-CSF. *Leuk Res* 2000;24:627-30.
188. Ginsberg DM. Circulating plasma cells in multiple myeloma. A method for detection and review of the problem. *Ann Intern Med* 1962;57:843-6.
189. Pettersson D, Mellstedt H, Holm G, Bjorkholm M. Monoclonal blood lymphocytes in benign monoclonal gammopathy and multiple myeloma in relation to clinical stage. *Scand J Haematol* 1981;27:287-93.
190. Witzig TE, Kyle RA, O'Fallon WM, Greipp PR. Detection of peripheral blood plasma cells as a predictor of disease course in patients with smoldering multiple myeloma. *Br J Haematol* 1994;87:266-72.
191. Zandecki M, Facon T, Preudhomme C, Canis F, Izydorchuk V, Lovi V, Hammad M, Bauters F, Cosson A. Significance of circulating plasma cells in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 1994;14:491-6.
192. Witzig TE, Kimlinger TK, Ahmann GJ, Katzmann JA, Greipp PR. Detection of myeloma cells in the peripheral blood by flow cytometry. *Cytometry* 1996;26:113-20.
193. Witzig TE, Gertz MA, Lust JA, Kyle RA, O'Fallon WM, Greipp PR. Peripheral blood monoclonal plasma cells as a predictor of survival in patients with multiple myeloma. *Blood* 1996;88:1780-7.
194. Pardanani A, Witzig TE, Schroeder G, McElroy EA, Fonseca R, Dispenzieri A, Lacy MQ, Lust JA, Kyle RA, Greipp PR and others. Circulating peripheral blood plasma cells as a prognostic indicator in patients with primary systemic amyloidosis. *Blood* 2003;101:827-30.
195. Kumar S, Rajkumar SV, Kyle RA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Lust JA, Gertz MA, Greipp PR, Witzig TE. Prognostic value of circulating plasma cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *J Clin Oncol* 2005;23:5668-74.

196. Kumar S, Witzig TE, Greipp PR, Rajkumar SV. Bone marrow angiogenesis and circulating plasma cells in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2003;122:272-4.
197. Chandesris MO, Soulier J, Labaume S, Crinquette A, Repellini L, Chemin K, Malphettes M, Fieschi C, Asli B, Uzunhan Y and others. Detection and follow-up of fibroblast growth factor receptor 3 expression on bone marrow and circulating plasma cells by flow cytometry in patients with t(4;14) multiple myeloma. *Br J Haematol* 2007;136:609-14.
198. Rawstron A, Barrans S, Blythe D, Davies F, English A, Pratt G, Child A, Morgan G, Jack A. Distribution of myeloma plasma cells in peripheral blood and bone marrow correlates with CD56 expression. *Br J Haematol* 1999;104:138-43.
199. Pope B, Brown R, Gibson J, Joshua D. The bone marrow plasma cell labeling index by flow cytometry. *Cytometry* 1999;38:286-92.
200. Blade J, Rosinol L, Garcia-Sanz R, Lahuerta J, Hernandez M, Sureda A, de la Rubia J, Besalduch J, Garcia-Larana J, San Miguel J. A PETHEMA study of high-dose therapy/stem cell support (HDT), including tandem transplant, in primary refractory multiple myeloma (MM): Identification of two populations with different outcomes. *ASCO Meeting Abstracts* 2007;25:8021.
201. Barlogie B, Anaissie E, Haessler J, van Rhee F, Pineda-Roman M, Hollmig K, Alsayed Y, Epstein J, Shaughnessy JD, Jr., Crowley J. Complete remission sustained 3 years from treatment initiation is a powerful surrogate for extended survival in multiple myeloma. *Cancer* 2008;113:355-9.
202. Kumar S, Flinn IW, Richardson PG, Hari P, Callander NS, Noga SJ, Stewart AK, Glass J, Rifkin RM, Wolf JL and others. Novel Three- and Four-Drug Combination Regimens of Bortezomib, Dexamethasone, Cyclophosphamide, and Lenalidomide, for Previously Untreated Multiple Myeloma: Results From the Multi-Center, Randomized, Phase 2 EVOLUTION Study. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2010;116:621-.
203. Baltathakis I, Terpos E, Delimpasi S, Liapis K, Panitsas F, Kastritis E, Christoforidou A, Pouli A, Tsatalas K, Dimopoulos MA and others. The Combination of the Proteasome Inhibitor Bortezomib with Doxorubicin and Dexamethasone (PAD Regimen) as Front-Line Therapy In Newly Diagnosed, High-Risk Multiple Myeloma: Results of a Phase II Prospective Multicenter Study. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2010;116:3052-.
204. Palumbo A, Falco P, Benevolo G, Rossi D, Carella AM, Guglielmelli T, Rocci A, De Paoli L, Grasso M, Siez MLM and others. A Multicenter, Open Label Study of Oral Lenalidomide and Prednisone (RP) Followed by Oral Lenalidomide Melphalan and Prednisone (MPR) and Oral Lenalidomide Maintenance In Newly Diagnosed Elderly Multiple Myeloma Patients. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2010;116:1940-.

205. Hrusovsky I, Emmerich B, von Rohr A, Voegeli J, Taverna C, Olie RA, Pliskat H, Frohn C, Hess G. Bortezomib retreatment in relapsed multiple myeloma - results from a retrospective multicentre survey in Germany and Switzerland. *Oncology* 2010;79:247-54.
206. Palumbo A, Gay F, Brinthen S, Falcone A, Pescosta N, Callea V, Caravita T, Morabito F, Magarotto V, Ruggeri M and others. Bortezomib, doxorubicin and dexamethasone in advanced multiple myeloma. *Ann Oncol* 2008;19:1160-5.
207. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster M, Irwin D, Stadtmauer E, Facon T, Harousseau JL, Ben-Yehuda D, Lonial S, Goldschmidt H and others. Extended follow-up of a phase 3 trial in relapsed multiple myeloma: final time-to-event results of the APEX trial. *Blood* 2007;110:3557-60.
208. Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H, Marit G, Caillot D, Mohty M, Lenain P, Hulin C, Facon T, Casassus P and others. Bortezomib plus dexamethasone is superior to vincristine plus doxorubicin plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: results of the IFM 2005-01 phase III trial. *J Clin Oncol* 2010;28:4621-9.
209. Dingli D, Rajkumar SV. How best to use new therapies in multiple myeloma. *Blood Rev* 2010;24:91-100.
210. Schoenfeld DA.
http://hedwig.mgh.harvard.edu/sample_size/fisher/fishapp.html.
Cambridge; 2010.
211. Manzanera GM, San Miguel Izquierdo JF, Matos AO. Immunophenotyping of Plasma Cells in Multiple Myeloma. Volume 113; 2005. p 5-24.
212. Groeneveld K, te Marvelde JG, van den Beemd MW, Hooijkaas H, van Dongen JJ. Flow cytometric detection of intracellular antigens for immunophenotyping of normal and malignant leukocytes. *Leukemia* 1996;10:1383-9.
213. Subira D, Castanon S, Aceituno E, Hernandez J, Jimenez-Garofano C, Jimenez A, Jimenez AM, Roman A, Orfao A. Flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid samples and its usefulness in routine clinical practice. *Am J Clin Pathol* 2002;117:952-8.
214. Pellat-Deceunynck C, Barille S, Jego G, Puthier D, Robillard N, Pineau D, Rapp MJ, Harousseau JL, Amiot M, Bataille R. The absence of CD56 (NCAM) on malignant plasma cells is a hallmark of plasma cell leukemia and of a special subset of multiple myeloma. *Leukemia* 1998;12:1977-82.
215. Olteanu H, Wang HY, Chen W, McKenna RW, Karandikar NJ. Immunophenotypic studies of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *BMC Clin Pathol* 2008;8:13.
216. Escribano L, Diaz-Agustin B, Lopez A, Nunez Lopez R, Garcia-Montero A, Almeida J, Prados A, Angulo M, Herrero S, Orfao A. Immunophenotypic analysis of mast cells in mastocytosis: When and

- how to do it. Proposals of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA). *Cytometry B Clin Cytom* 2004;58:1-8.
217. Paiva B, Perez-Andres M, Vidriales MB, Almeida J, de las Heras N, Mateos MV, Lopez-Corral L, Gutierrez NC, Blanco J, Oriol A and others. 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* 2011;25:697-706.
 218. Perez-Persona E, Mateo G, Garcia-Sanz R, Mateos MV, de Las Heras N, de Coca AG, Hernandez JM, Galende J, Martin-Nunez G, Barez A and others. 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;148:110-4.
 219. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R, Ashcroft AJ, Patmore R, Drayson MT, Owen RG, Jack AS, Child JA, Morgan GJ. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood* 2002;100:3095-100.
 220. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G, Blade J, Lopez-Berges C, Caballero D, Hernandez J, Moro MJ, Fernandez-Calvo J, Diaz-Mediavilla J and others. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood* 2002;99:1853-6.
 221. Schneider U, van Lessen A, Huhn D, Serke S. Two subsets of peripheral blood plasma cells defined by differential expression of CD45 antigen. *Br J Haematol* 1997;97:56-64.
 222. Sezer O, Heider U, Zavrski I, Possinger K. Differentiation of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma using flow cytometric characteristics of plasma cells. *Haematologica* 2001;86:837-43.
 223. Iqbal MS, Otsuyama K, Shamsasenjan K, Asaoku H, Kawano MM. CD56 expression in human myeloma cells derived from the neurogenic gene expression: possible role of the SRY-HMG box gene, SOX4. *Int J Hematol* 2010;91:267-75.
 224. Harrington AM, Hari P, Kroft SH. Utility of CD56 immunohistochemical studies in follow-up of plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol* 2009;132:60-6.
 225. Wulleme S, Robillard N, Richebourg S, Eveillard M, Lode L, Avet-Loiseau H. A Single-Tube Seven-Colour Flow Cytometry Assay for Detection of Minimal Residual Disease In Myeloma. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2010;116:1688-.
 226. Perez-Andres M, Almeida J, Martin-Ayuso M, Moro MJ, Martin-Nunez G, Galende J, Borrego D, Rodriguez MJ, Ortega F, Hernandez J and

- others. Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment. *Leukemia* 2005;19:449-55.
227. Rawstron A, Fenton JA, Gonzalez D, Davies FE, O'Connor SJ, Richards S, Jack A, Owen RG, Morgan G, Child JA. Accurate prediction of outcome for patients with IgG and IgA monoclonal gammopathy of unknown significance using flow cytometry. *Haematologica* 2005;90.
228. Lin P, Owens R, Tricot G, Wilson CS. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol* 2004;121:482-8.
229. Morice WG, Chen D, Kurtin PJ, Hanson CA, McPhail ED. Novel immunophenotypic features of marrow lymphoplasmacytic lymphoma and correlation with Waldenstrom's macroglobulinemia. *Mod Pathol* 2009;22:807-16.
230. Ely SA, Knowles DM. Expression of CD56/neural cell adhesion molecule correlates with the presence of lytic bone lesions in multiple myeloma and distinguishes myeloma from monoclonal gammopathy of undetermined significance and lymphomas with plasmacytoid differentiation. *Am J Pathol* 2002;160:1293-9.
231. Chng WJ, Bergsagel PL. Biology-Based Classification and Staging of Multiple Myeloma. In: Lonial S, editor. *Myeloma Therapy Contemporary Hematology*. Atlanta: Humana Press; 2008. p 41 - 56.
232. Lopez-Corral L, Gutierrez NC, Vidriales MB, Mateos MV, Rasillo A, Garcia-Sanz R, Paiva B, San Miguel JF. The progression from MGUS to smoldering myeloma and eventually to multiple myeloma involves a clonal expansion of genetically abnormal plasma cells. *Clin Cancer Res* 2011;17:1692-700.
233. Bernardeschi P, Pirrotta MT, Montenora I, Giustarini G, Ferreri MI, Simi P, Fiorentini G. Clonal evolution at leukemic relapse of multiple myeloma (secondary plasma cell leukemia) responding to re-treatment with bortezomib-based therapy. A case record. *Leuk Res* 2010;34:e104-5.
234. Caraux A, Klein B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler GM, Bos NA, Johnsen HE, Orfao A, Perez-Andres M. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells. *Haematologica* 2010;95:1016-20.

Original Article

Six Color Flow Cytometry Detects Plasma Cells Expressing Aberrant Immunophenotype in Bone Marrow of Healthy Donors

Valdas Peceliunas,^{1,2*} Ausra Janiulioniene,³ Reda Matuzeviciene,^{3,4} and Laimonas Griskevicius^{1,2}

¹Hematology, Oncology, and Transfusion Medicine Center, Vilnius University Hospital Santariskiu Clinics, Santariskiu 2, 08661, Vilnius, Lithuania

²Clinics of Internal, Family Medicine, and Oncology, Faculty of Medicine, Vilnius University M. K. Ciurlonio 21, 03101, Vilnius, Lithuania

³Laboratory Diagnostics Centre, Vilnius University Hospital Santariskiu Clinics, Santariskiu 2, 08661, Vilnius, Lithuania

⁴Physiology, Biochemistry, and Laboratory Medicine Department, Faculty of Medicine, Vilnius University M. K. Ciurlonio 21, 03101, Vilnius, Lithuania

Background: Both normal and malignant plasma cell (PC) populations can be identified using modern flow cytometry (FC) technique in multiple myeloma (MM) patients. Expression of CD19 and CD56 markers is heterogenous on bone marrow PCs of healthy individuals. Little is known about immunophenotypically aberrant (CD19⁻/CD56⁺) PCs subpopulation of healthy people.

Methods: Using six color FC, we analyzed PCs in BM samples of 11 healthy donors (HD) and compared their immunophenotypic properties with clonal PC populations from MM patients.

Results: Both immunophenotypically normal (CD19⁺/CD56⁻) and aberrant (CD19⁻/CD56⁺) PC populations could be detected in 10 of 11 HDs' BM samples and constituted the median of 60.3% (37.3–72.3) and 9.6% (0–35.7) of BM PCs, respectively. CD19, CD56, CD38, CD45, and CD20 marker expression characteristics were of little value discriminating clonal PCs of MM patients from immunophenotypically aberrant PCs of healthy donors.

Conclusions: Our findings suggest that aberrant immunophenotype is common in BM PCs of healthy people. Improvements in FC methodology to separate normal and malignant PCs remain an open area for future investigations. © 2011 International Clinical Cytometry Society

Key terms: myeloma; flow cytometry; plasma cell immunophenotype; normal plasma cells

How to cite this article: Peceliunas V, Janiulioniene A, Matuzeviciene R, Griskevicius L. Six color flow cytometry detects plasma cells expressing aberrant immunophenotype in bone marrow of healthy donors. *Cytometry Part B* 2011; 00B: 000-000.

The BM PC population in MM patients is a chimera composed of both malignant (clonal) and normal plasma cells. Both populations may be identified using multi-parameter FC (1,2). The main immunophenotypic features used to recognize malignant PCs are dim expression of CD38, hypoexpression of CD19 and CD45, hyperexpression of CD56, and clonal expression of intracytoplasmic light chains (3,4). Normal PCs express high levels of CD38 and CD138, and are usually CD19 and CD45 positive and CD56 negative (4–6). The main markers recommended for discrimination between

the normal and malignant CD138/38 positive PC population currently are CD19 and CD56 (4).

It was reported that CD19 and CD56 expression is heterogeneous on normal PCs of healthy individuals: up

*Correspondence to: Valdas Peceliunas, Vilnius University Hospital Santariskiu Clinics, Santariskiu 2, 08661, Vilnius, Lithuania.

E-mail: valdas.peceliunas@santa.lt

Received 22 August 2010; Revision 18 March 2011; Accepted 30 March 2011

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/cyto.b.20601

Flow Cytometric Detection of Immunophenotypically Normal Plasma Cells in Multiple Myeloma Patients Provides Clinically Important Information

Valdas Pecelionas^{1,2}
Ausra Janulioniene³
Reda Matuzeviciene^{3,4}
Laimonas Griskevicius^{1,2}

¹Hematology, Oncology and Transfusion Medicine Center, Vilnius University Hospital Santariskiu Clinics, Santariskiu 2, 08661, Vilnius, Lithuania
E-mail: valdas.pecelionas@santa.lt

²Clinics of Internal, Family Medicine and Oncology, Faculty of Medicine, Vilnius University, M. K. Ciurlionio 21, 03101, Vilnius, Lithuania

³Laboratory Diagnostics Centre, Vilnius University Hospital Santariskiu Clinics, Santariskiu 2, 08661, Vilnius, Lithuania

⁴Physiology, Biochemistry and Laboratory Medicine Department, Faculty of Medicine, Vilnius University M. K. Ciurlionio 21, 03101, Vilnius, Lithuania

Summary

Background. With the advent of multiparameter flow cytometry (FC) it became possible simultaneously analyze normal and malignant plasma cells (PC) in multiple myeloma (MM) patients. There is some data that residual normal bone marrow plasma cells (nBMPC) is of prognostic significance in plasma cells dyscrasias. There is no data about clinical value of immunophenotypically normal peripheral blood circulating plasma cells (nCPC).

Material and methods. In this study we evaluated clinical significance of normal plasma cells detection by FC in peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) compartments of refractory or relapsed (RR) multiple myeloma (MM) patients. For sample analysis we used 2 tubes stained with antibody combinations CD56/CD138/CD45/CD19/CD38/CD20 and cLambda/cKappa/CD138/CD19/CD38/CD45.

Results. PB and BM samples taken at the same time from 40 relapsed/refractory MM patients and 11 healthy controls (HC) were analyzed. We were able to detect nCPC and nBMPC subpopulation in 57.5% and 90% of MM patients, respectively. We did not find any clinical significance of nCPC detection at baseline, however increase of nCPC in response to treatment was associated with prolonged time to progression (TTP). We also showed that proportion of residual nBMPC to all BMPC is of prognostic significance in advanced MM patients.

Conclusions. Our finding supports clinical value of nPC identification for advanced MM patients, and use of FC rather than light microscopy for BMPC compartment analysis before treatment.

Keywords: myeloma, immunophenotyping, prognosis.

INTRODUCTION

In the last few years flow cytometry (FC) became an important tool for evaluation of multiple myeloma in especially in diagnosis, prognosis and response to treatment [1]. This method was shown to be valuable in analysis of minimal residual disease (MRD) after treatment [2–4]. Growing interest to flow cytometry is determined by re-

cent remarkable improvements in myeloma treatment efficacy. There is an increasing number of high quality remissions beyond sensitivity level of conventional methods used for response definition. Immunophenotypical characteristic of malignant plasma cells (PC) also was shown to be of prognostic significance [5, 6]. With the improvement of FC technology became possible to simultaneously identify

ASMENS INFORMAVIMO APIE DALYVAVIMĄ KLINIKINIAME TYRIME FORMA

2007 03 01

TYRIMO PAVADINIMAS

Ankstyvo atsako į ligos gydymą vertinimas bei minimalios liktinės ligos tyrimas mielomine liga sergantiems pacientams, taikant tėkmės citometrijos metodą. T reguliacinių limfocitų populiacijos tyrimas mielomine liga sergantiems pacientams.

TYRIMO TIKSLAS IR METODAI

1 Ankstyvas gydymo efektyvumo nustatymas.

Dėl mielominės ligos Jums bus skiriamas gydymas pagal įprastines gydymo metodikas. Mielominės ligos atsakas į gydymą standartiškai Lietuvoje ir pasaulyje vertinamas tiriant pataloginį baltymą (imunoglobuliną ar jo dalis), kurį gamina piktybinės ligos ląstelės. Kadangi šio baltymo apykaita organizme yra lėta, ligos atsaką į gydymą galima vertinti tik po 3 mėnesių po gydymo pradžios.

Mūsų tyrimo vienas iš tikslų yra ankstyvas gydymo efektyvumo vertinimas praėjus 3-4 savaitėms nuo gydymo pradžios. Mes tirsime kraujyje esančias ligos ląsteles prieš gydymą ir praėjus 3-4 savaitėms nuo gydymo pradžios. Tuo tikslu iš venos Jums bus du kartus paimta po 7ml (vienas nepilnas valgomas šaukštas) kraujo. Papildomai į veną durti nereikės nes kraujas bus paimamas kartu su kitais Jums reikalingais kraujo mėginiais. Paimtas kraujas bus tiriamas modernia ir labai jautria metodika, leidžiančia nustatyti labai mažus mielominės ligos ląstelių kiekius.

2 Viso gydymo kurso efektyvumo tikslesnis vertinimas.

Viso gydymo kurso efektas pagal priimtus pasaulyje standartus šiuo metu vertinamas tiriant pataloginį baltymą ir nustatant kaulų čiulpuose esančių mielominės ligos ląstelių kiekį. Kaulų čiulpai tiriami mikroskopu. Tiriant šiais metodais, po gydymo daliai ligonių nebenustatoma nei pataloginio baltymo, nei mielominės ligos ląstelių kaulų čiulpuose, tačiau yra moksliskai įrodyta, kad visos mielominės ligos ląstelės nesunaikinamos ir liga po kurio laiko atsinaujins. Mes planuojame papildomai tirti kaulų čiulpus po gydymo apytiksliai 500 kartų jautresniu metodu nei mikroskopavimas ir tiksliau įvertinti Jūsų ligos gydymo efektą. Bus tiriamas tas pats kaulų čiulpų mėginys, kuris paimamas mikroskopijai, todėl papildoma kaulų čiulpų punkcija nebus atliekama.

3 Imuninį atsaką slopinančių ląstelių (T reguliacinių limfocitų) kiekio nustatymas, sergant mielomine liga ir jų reikšmės mielominės ligos prognozei vertinimas.

Tyrimo metu planuojame nustatyti Jūsų kraujyje esančių imuninių ląstelių vadinamų T reguliaciniais limfocitais kiekį. Įrodyta jog šių ląstelių pagrindinė funkcija yra pernelyg stipraus imuninio atsako slopinimas. Pastaruoju metu yra gauta mokslinių įrodymų, jog T reguliaciniai limfocitai gali skatinti navikinio proceso vystymąsi organizme, tačiau neaiški jų reikšmė mielominės ligos atveju. Gydymo metu ir baigus gydymą apytiksliai 1 metų laikotarpyje, Jums papildomai bus paimti 5

mėgintuvėliai po 7ml kraujo iš venos. Kraujas bus imamas kartu su kitais Jums reikalingais kraujo mėginiais todėl papildomai durti adatos į veną nereikės.

Kadangi Jums dėl mielominės ligos nuspręsta skirti gydymą, mes prašome Jus tapti tyrimo dalyviu. Dalyvavimas tyrime niekaip neįtakos Jūsų gydymo taktikos, Jums nebus skiriami papildomi vaistai. Gydymo metu ir 6 mėnesius po gydymo šalia įprastų tyrimų Jums papildomai bus paimti 7 mėgintuvėliai kraujo.

Norime, kad jūs suprastumėte, jog Jums nebus skiriamas joks papildomas vaistas. Viskas bus daroma kaip įprastinio gydymo metu, tik papildomai atliekami keli tyrimai.

TYRIMO DALYVIAI

Tyrimo dalyviais gali tapti asmenys, kuriems dėl mielominės ligos skiriamas gydymas. Tyrimo dalyviu tampama perskaičius paciento informavimo formą (kurią dabar skaitote) ir pasirašius sutikimo dokumentą.

TYRIMO EIGA IR ATLIEKAMOS PROCEDŪROS

- Pasirašę sutikimą dalyvauti tyrime, Jūs tapsite tyrimo dalyviu.
- Tada Jūsų būklę įvertins tyrimą vykdančias gydytojas (apžiūrės, pamatuos kraujospūdį, pulso dažnį, temperatūrą, paklaus apie persirgtas ligas, naudojamus vaistus, negalavimus, kuriuos jaučiate ar kada jautėte).
- Prieš pradėdant gydymą, bei vėliau, gydymo eigoje (prieš antrąjį, ketvirtąjį chemoterapijos kursą), kartu su kitais Jums reikalingais tyrimais, bus paimama apie 7 - 14 ml kraujo iš venos. Iš viso bus paimta nuo 5 iki 7 mėgintuvėlių po 7 ml. kraujo. Papildomai durti adatos į veną nereikės, nes kraujo mėginiai reikalingi tyrimui bus imami kartu su kitais Jums reikalingais tyrimais.
- Prieš pradėdant gydymą ir vėliau gydymo efekto vertinimui paėmus kaulų čiulpų mėginius įprastiems tyrimams (mikroskopijai), jie be to dar bus ištiriami labai jautriu metodu – tėkmės citometrija. Papildomai durti į kaulą nereikės.
- Baigus visus numatytus gydymo kursus ir po 1, 3 bei 6 mėnesių atvykus pasitikrinti pas hematologą, Jums papildomai bus paimta po 1 mėgintuvėlių kraujo kartu su kitais Jums reikalingais tyrimais bei reikės susitikti su tyrimą vykdančiu gydytoju, kuris įvertins Jūsų ligos būklę, peržiūrės medicininę dokumentaciją (ambulatorinę kortelę ar ligos istoriją).
- Dalis tyrimui reikalingų duomenų bus paimama iš Jūsų medicininės dokumentacijos (ambulatorinės kortelės ar ligos istorijos), tai daroma siekiant išvengti Jums jau atliktų tyrimų kartojimo.

TYRIMO NAUDA JO DALYVIAMS BEI VISUOMENEI

Jums bus atlikti papildomi tyrimai, kurių dėka daugiau sužinosime apie Jūsų ligos gydymo rezultatus. Tikimės, kad gauti duomenys ateityje Jums ir kitiems pacientams sergantiems mielomine liga padės parinkti tinkamiausią gydymą.

Tyrimo metu tikimės daugiau sužinoti apie T reguliacinius limfocitus bei jų įtaką mielominės ligos gydymo rezultatams.

Ateityje įgytos žinios gali padėti, kuriant naujus mielominės ligos gydymo metodus.

GALIMI TYRIMO NEPATOGUMAI IR PAŠALINIAI POVEIKIAI

Tyrimo metu jokių papildomų nepatogumų neturėtumėte patirti, nes kraujo bei kaulų čiulpų mėginių paėmimo laikas suderintas su įprastine tvarka gydymo metu atliekamais tyrimais. Jokių papildomų invazinių tyrimų Jums nebus atliekama. Jums nereikės papildomai važiuoti patikrinimui pas tyrimą vykdančią gydytoją baigus numatytą gydymą, nes atvykimo laikai suderinti su įprastiniais pasitikrinimais pas gydytoją hematologą.

KONTAKTAI (KUR KREIPTIS IŠKILUS KLAUSIMAMS)

Gyd. _____ Jums paaiškino apie šį tyrimą ir į visus klausimus atsakė. Jei Jūs turite bet kokių kitų klausimų apie tyrimą, tyrimo dalyvio teises dėl informacijos galite paskambinti gyd. Valdui Pečeliūnui tel. 8 620 78312, Dr. Laimonui Griškevičiui tel. 8 5 2365 029; ar į tyrimo būstinę VU “Santariškių klinikų” Hematologijos skyrių telefonu: 8 5 2365 085. Į šiuos asmenis galite kreiptis iškilus bet kokiems klausimams susijusiems su tyrimu.

Jei Jūs turite klausimų dėl savo dalyvavimo tyrime, jūs galite susisiekti su:

Dr. E. Gefenu, Lietuvos Bioetikos komiteto pirmininku, tel./faks. 8 5 2124565.

SAVANORIŠKAS DALYVAVIMAS

Jūsų sprendimas dalyvauti šiame tyrime yra savanoriškas. Jūs galite pasirinkti dalyvauti ar nedalyvauti šiame tyrime. Jūs taip pat galite pasitraukti iš jo bet kuriuo metu. Jei Jūs pasirinksite nedalyvauti ar pasitraukti bet kuriuo metu, Jūs neprarasite to gydymo, kokį turite teisę gauti ir tai neįtakos tolimesnės Jūsų medicininės priežiūros. Jei Jūs nuspręsite pasitraukti iš tyrimo, Jums apie tai tereikia pasakyti savo gydytojui. *Jei pasitrauksite iš tyrimo, visa informacija apie Jūsų dalyvavimą pasiliks tyrimo dalimi ir bus apdorota kartu su kitais tyrimo duomenimis.*

DALYVIO PASITRAUKIMAS IŠ TYRIMO

Bet kuriuo metu dėl šių priežasčių Jūsų dalyvavimas tyrime gali būti nutrauktas su ar be Jūsų leidimo:

- Jūs nusprendėte pasitraukti iš tyrimo.
- Jūs nesilaikote tyrimo dalyvio instrukcijų.
- Tyrimo tyrėjas nuspręso, kad tikslinga apriboti ar nutraukti tyrimą.

TIRIAMUJU IŠLAIDOS

Jums nereikės mokėti nė už vieną šiam klinikiniam tyrimui reikalingą tyrimą.

TYRIMO DALYVIŲ KONFIDENCIALUMO APSAUGA

Jūs turite teisę į privatumą, ir viskas, ką mes sužinosime apie Jus šiame tyrime, išliks konfidencialu, remiantis galiojančiais įstatymais. Tyrimo rezultatai gali būti paskelbti

moksliniame pranešime, žurnale ar knygoje, neskelbiant Jūsų pavardės. Tyrimo duomenis spausdinant medicininėje literatūroje ar techniniais tikslais, vardai ir/ar kiti pacientus identifikuojantys duomenys nebus panaudoti.