

# Роль и место проточной цитометрии в диагностике и мониторинге минимальной остаточной болезни при множественной миеломе

И.В. Гальцева, Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов, У.Л. Джулакян, Л.П. Менделеева

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4а

Контакты: Гальцева Ирина Владимировна [irinagaltseva@gmail.com](mailto:irinagaltseva@gmail.com)

За последние 20 лет подходы к терапии множественной миеломы претерпели значительные изменения, и частота достижения ремиссии заболевания увеличилась. Использование новых диагностических методов позволило более достоверно оценивать ответ на терапию и прогнозировать возникновение рецидива: аллель-специфичная полимеразная цепная реакция, секвенирование нового поколения, многоцветная проточная цитометрия позволяют обнаруживать минимальную остаточную болезнь (МОБ) с чувствительностью от  $10^{-5}$  до  $10^{-6}$ . Оценка МОБ с помощью проточной цитометрии — динамично развивающееся направление исследований. Задачами многоцентровых исследований, использующих проточную цитометрию в качестве инструмента для поиска МОБ при множественной миеломе, являются стандартизация, увеличение чувствительности и специфичности данного метода. Цель публикации — представление данных о методах, применяющихся для мониторинга МОБ и достижений в области проточной цитометрии.

**Ключевые слова:** множественная миелома, иммунофенотипирование, проточная цитометрия, минимальная остаточная болезнь

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-2-80-94

## Flow cytometry in the diagnosis and monitoring of minimal residual disease in multiple myeloma

I.V. Galtseva, Y.O. Davydova, N.M. Kapranov, U.L. Julakyan, L.P. Mendeleeva

Hematological Research Center, Ministry of Health of Russia; 4a Noviy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia

Over the past 20 years, approaches to the therapy of multiple myeloma have undergone significant changes, and frequency of achieving remission of the disease increased. The new diagnostic methods allowed evaluating the more deep therapy response and predicting the relapse: allele-specific polymerase chain reaction, next generation sequencing, multicolor flow cytometry may detect a minimal residual disease (MRD) with a sensitivity of  $10^{-5}$  to  $10^{-6}$ . Evaluation of MRD by flow cytometry is a dynamically developing direction of research. The aim of multicenter investigations using flow cytometry for MRD-searching in multiple myeloma is standardization, increasing the sensitivity and specificity of this method. The article presents data on the methods used in monitoring MRD, as well as advances in flow cytometry.

**Keywords:** multiple myeloma, immunophenotyping, flow cytometry, minimal residual disease

### Введение

Множественная миелома (ММ) — злокачественное заболевание, характеризующееся клональной пролиферацией в костном мозге (реже в экстрамедуллярных очагах) аномальных плазматических клеток (ПК), которые секретируют моноклональный протеин (М-протеин) в форме иммуноглобулинов IgG, -A, -D и -E и / или их моноклональные к и λ свободные легкие цепи (СЛЦ). Частота встречаемости ММ, по данным 2013 г., составляет 0,8 % от всех случаев заболевания злокачественными новообразованиями [1], более 10 % от случаев гемобластозов [2] и, по разным данным, 3,5–6 случаев на 100 тыс. населения в год [3].

Согласно классификации лимфопролиферативных заболеваний Всемирной организации здравоохранения (пересмотра 2008 г.), необходимыми критериями для диагностики ММ являются: наличие

М-протеина в сыворотке и / или моче, пролиферация в костном мозге (КМ) моноклональных ПК или наличие плазмцитомы, а также повреждение органов и тканей. В 2014 г. международной рабочей группой по ММ (International Myeloma Working Group, IMWG) были пересмотрены критерии для установления диагноза ММ и дифференциальной диагностики между ММ и другими заболеваниями, связанными с клональной пролиферацией ПК [4] (табл. 1).

За последние 20 лет быстро развивались новые подходы к лечению ММ. Появление и применение современных лекарственных средств, «направленных» противоопухолевых агентов, введение трансплантации аутологичных стволовых клеток крови (аутоТСКК) вызвали проведение многочисленных мультицентровых интернациональных клинических исследований. Новые подходы в терапии диктовали необходимость в универсальной системе критериев оценки ответа

**Таблица 1.** Диагностические критерии множественной миеломы и других заболеваний, связанных с клональной пролиферацией плазматических клеток, предложенные международной рабочей группой по множественной миеломе (IMGW), 2014 г.

**Table 1.** Diagnostic criteria for multiple myeloma and other diseases associated with clonal plasma cells proliferation, proposed by the international multiple myeloma working group (IMGW), 2014

Заболевание Disease	Критерии Criteria
Не-IgM — моноклональная гаммапатия неясного генеза  Non-IgM monoclonal gammopathy of unknown origin	Соответствие <b>всем</b> критериям: <ul style="list-style-type: none"> <li>Наличие М-протеина (не IgM) в сыворотке менее 30 г/л.</li> <li>Уровень клональных плазматических клеток (ПК) в костном мозге (КМ) менее 10 %.</li> <li>Отсутствие CRAB-симптомов: гиперкальциемии, почечной недостаточности, анемии и поражения костей</li> </ul> All criteria required: <ul style="list-style-type: none"> <li>Presence of M-protein (not IgM) in serum less than 30 g /L.</li> <li>Clonal plasma cells (PC) in bone marrow (BM) less than 10 %.</li> <li>Absence of CRAB-symptoms: hypercalcemia, renal failure, anemia and bone damage</li> </ul>
Тлеющая (асимптоматическая) множественная миелома  Asymptomatic multiple myeloma	Соответствие <b>всем</b> критериям: <ul style="list-style-type: none"> <li>Наличие М-протеина (IgG или -A) в сыворотке не менее 30 г/л <b>или</b> моче не менее 500 мг/сут <b>и / или</b> в клональных ПК в КМ (10–60 %).</li> <li>Отсутствие амилоидоза или признаков, определяющих миелому</li> </ul> All criteria required: <ul style="list-style-type: none"> <li>Presence of M-protein (IgG or IgA) in serum not less than 30g/L or in urine not less than 500 mg/day <b>and/or</b> clonal PC in BM (10–60 %).</li> <li>Absence of amyloidosis or myeloma criteria</li> </ul>
Множественная миелома  Multiple myeloma	Соответствие <b>обоим</b> критериям: <ul style="list-style-type: none"> <li>Присутствие клональных ПК в КМ не менее 10 % либо подтвержденная биопсией костная или экстрамедуллярная плазмацитома.</li> <li>Присутствие <b>хотя бы 1</b> из признаков, определяющих миелому: <ul style="list-style-type: none"> <li>CRAB-симптомы <ul style="list-style-type: none"> <li>гиперкальциемия: уровень сывороточного кальция более чем на 0,25 ммоль/л (&gt;10 мг/л) превышает верхнюю границу нормы <b>или</b> более 2,75 ммоль/л (&gt;110 мг/л),</li> <li>почечная недостаточность: клиренс креатинина менее 40 мл/мин или уровень сывороточного креатинина более 177 мкмоль/л (&gt;20 мг/л),</li> <li>анемия: уровень гемоглобина более чем на 20 г/л ниже предела нормы <b>или</b> менее 100г/л,</li> <li>поражения костей: <b>1</b> <b>или</b> более остеолитических повреждений по данным радиогрaфии скелета, компьютерной томографии (КТ) или позитронно-эмиссионной томографии с компьютерной томографией;</li> </ul> </li> <li>клонaльных ПК в КМ не менее 60 %;</li> <li>соотношение вовлеченных сывороточных свободных легких цепей (СЛЦ) к невовлеченным СЛЦ не менее 100 (вовлеченных СЛЦ не менее 100 мг/л);</li> <li>более 1 очагового поражения (по крайней мере 5 мм) по данным магнитно-резонансной томографии (МРТ)</li> </ul> </li> </ul> Both criteria required: <ul style="list-style-type: none"> <li>Clonal PC in the BM not less than 10 % <b>or</b> biopsy-proven bone or extramedullary plasmacytoma.</li> <li>At least 1 of the myeloma criteria: <ul style="list-style-type: none"> <li>CRAB-symptoms: <ul style="list-style-type: none"> <li>Hypercalcemia: the serum calcium level is more than 0.25 mmol/L (&gt;10 mg/L) above the upper normal limit (UNL) or more than 2.75 mmol/L (&gt;110 mg/L),</li> <li>renal failure: creatinine clearance less than 40 ml/min or serum creatinine level more than 177 μmol/L (&gt;20 mg/L),</li> <li>anemia: the hemoglobin level is more than 20 g/L below the norm limit or less than 100 g/L,</li> <li>bone involvement: 1 or more osteolytic lesions from skeleton radiographs, computed tomography (CT), or positron emission tomography with computed tomography;</li> </ul> </li> <li>clonal PCs in BM not less than 60 %;</li> <li>the ratio of involved serum free light chains (FLC) to uninvolved FLC not less than 100 (involved FLC not less than 100 mg/L);</li> <li>more than 1 focal lesion (at least 5 mm) by magnetic resonance imaging (MRI)</li> </ul> </li> </ul>
IgM — моноклональная гаммапатия неясного генеза  IgM monoclonal gammopathy of unknown origin	Соответствие <b>всем</b> критериям: <ul style="list-style-type: none"> <li>Уровень моноклонального IgM в сыворотке менее 30 г/л.</li> <li>Лимфоплазматическая инфильтрация КМ менее 10 %.</li> <li>Отсутствие анемии, конституциональных симптомов, гипервязкости, лимфаденопатии или гепатоспленомегалии, которые могут свидетельствовать о наличии лимфопролиферативного заболевания</li> </ul> All criteria required: <ul style="list-style-type: none"> <li>Serum monoclonal IgM level less than 30 g/L.</li> <li>Lymphoplasmatic infiltration of BM less than 10 %.</li> <li>Absence of anemia, constitutional symptoms, hyperviscosity, lymphadenopathy or hepatosplenomegaly, which may indicate the presence of lymphoproliferative disease</li> </ul>

Заболевание Disease	Критерии Criteria
Моноклональная гаммапатия неясного генеза легких цепей  Light chains monoclonal gammopathy of unknown origin	Соответствие <b>всем</b> критериям: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ненормальное соотношение СЛЦ (<math>&lt;0,26</math> или <math>&gt;1,65</math>).</li> <li>• Увеличение количества соответствующей вовлеченной легкой цепи (увеличение <math>\kappa</math>-СЛЦ при соотношении более 1,65, увеличение <math>\lambda</math>-СЛЦ при соотношении менее 0,26).</li> <li>• Отсутствие тяжелых цепей при иммунофиксации.</li> <li>• Отсутствие CRAB-симптомов.</li> <li>• Наличие клональных ПК в КМ менее 10 %.</li> <li>• Наличие М-протеина в моче менее 500 мг/сут</li> </ul> All criteria required: <ul style="list-style-type: none"> <li>• The abnormal ratio of FLC (<math>&lt;0.26</math> or <math>&gt;1.65</math>).</li> <li>• Increase in the number of involved light chain (increase in <math>\kappa</math>-FLC at a ratio more than 1.65, increase in <math>\lambda</math>-FLC at a ratio more than 0.26).</li> <li>• Absence of heavy chains by immunofixation.</li> <li>• Absence of CRAB-symptoms.</li> <li>• Clonal PCs in BM less than 10 %.</li> <li>• M-protein in urine less than 500 mg/day</li> </ul>
Солидная плазмочитома  Solid plasmacytoma	Соответствие <b>всем</b> критериям: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Наличие поражения костей или мягких тканей клональными ПК, доказанное с помощью биопсии.</li> <li>• Отсутствие клональных ПК в КМ.</li> <li>• Отсутствие других поражений костей (по данным МРТ или КТ) за исключением первичного очага.</li> <li>• Отсутствие CRAB-симптомов</li> </ul> All criteria required: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Biopsy-proven bone or soft tissue lesion by clonal PCs</li> <li>• Absence of clonal PCs in BM</li> <li>• Absence of other bone lesions (according to MRI or CT scan) except for the primary focus</li> <li>• Absence of CRAB-symptoms</li> </ul>
Солидная плазмочитома с минимальным вовлечением КМ  Solid plasmacytoma with minimal BM involvement	Соответствие <b>всем</b> критериям: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Наличие поражения костей или мягких тканей клональными ПК, доказанное с помощью биопсии.</li> <li>• Наличие клональных ПК в КМ менее 10 %*.</li> <li>• Отсутствие других поражений костей (по данным МРТ или КТ), за исключением первичного очага.</li> <li>• Отсутствие CRAB-симптомов</li> </ul> All criteria required: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Biopsy-proven bone or soft tissue lesion by clonal PCs</li> <li>• Clonal PCs in BM less than 10 %*</li> <li>• Absence of other bone lesions (according to MRI or CT scan) except for the primary focus</li> <li>• Absence of CRAB-symptoms</li> </ul>

\*Если клональных ПК в КМ не менее 10 %, заболевание классифицируется как множественная миелома.

\*If clonal PC in BM not less than 10 %, the disease is classified as multiple myeloma.

на проводимую терапию, которую и разработала международная рабочая группа по миеломе в 2006 г., определив 4 глубины ремиссии по степени уменьшения количества клональных ПК в КМ, М-протеина в сыворотке и моче, изменению соотношения СЛЦ и сокращению размеров мягкотканых компонентов (табл. 2) [5]. Использование таких лекарственных препаратов, как талидомид, леналидомид и бортезомиб, и применение высокодозной химиотерапии (ВДХТ) с последующей аутоТСКК позволили достичь значительного увеличения общей выживаемости (ОВ). Медиана ОВ в периоды с 1971 по 1996 г. и с 1996 по 2006 г. выросла с 29,9 до 44,8 мес [6], а в период с 2006 по 2010 г. достигла 6,1 года [7]. По данным

А. Palumbo и соавт. [8] и Р. Sonneveld и соавт. [9], ОВ составила более 80 % при использовании в терапии новых лекарственных препаратов и аутоТСКК. Лечение новыми препаратами привело к увеличению частоты достижения полной ремиссии (ПР) по сравнению с применением только ВДХТ с аутоТСКК даже у пациентов старше 65 лет и у пациентов с высоким риском и рефрактерным течением ММ. Однако, несмотря на достижение ПР в более чем 30 % случаев при ММ, у большей части пациентов развивается рецидив.

Стало очевидно, что понятий «полная ремиссия» и даже «строгая полная ремиссия» (сПР) (табл. 2) недостаточно для выделения групп пациентов с хорошим

**Таблица 2.** Категории ответа на терапию множественной миеломы в соответствии с данными международной рабочей группы по множественной миеломе в 2006 и 2011 гг.

**Table 2.** Categories of therapy response in multiple myeloma patients according to data of the international multiple myeloma working group in 2006-2011

Категория ответа (год) Categories of response ( year)	Критерии ответа Criteria of response
Полная ремиссия (2006) Complete remission (2006)	Отрицательные данные по иммунофиксации сыворотки и мочи, <b>и</b> исчезновение мягкотканых компонентов/плазмодитом, <b>и</b> менее 5 % плазматических клеток в костном мозге (КМ) Negative immunofixation on the serum and urine <b>and</b> disappearance of any soft tissue plasmacytomas <b>and</b> less than 5 % plasma cells in bone marrow (BM)
Строгая полная ремиссия (2006) Stringent complete remission (2006)	К критериям полной ремиссии добавляются: нормальное соотношение свободных легких цепей (СЛЦ) <b>и</b> отсутствие клональных плазматических клеток (ПК), выявляемых методами иммуногистохимии или иммунофлюоресценции (2–4-цветной проточной цитометрией) Complete remission as defined above plus: normal free light chains (FLC) ratio <b>and</b> absence of clonal plasma cells (PC) by immunohistochemistry or immunofluorescence (2-4 color flow cytometry)
Очень хорошая частичная ремиссия (2006) Very good partial response (2006)	М-протеин, детектируемый в сыворотке или моче методом иммунофиксации, но не методом электрофореза, <b>или</b> редукция 90 % и более М-протеина в сыворотке и уровень М-протеина в моче менее 100 мг/сут Serum and urine M-protein detectable by immunofixation but not on electrophoresis <b>or</b> 90 % or greater reduction in serum M-protein plus urine M-protein less than 100 mg/day
Частичная ремиссия (2006) Partial response (2006)	Редукция М-протеина в сыворотке не менее 50 % и редукция М-протеина в суточной моче не менее 90 % или менее 200 мг/сут. Если М-протеин в сыворотке и моче неизмерим, то вместо критерия об уровне М-протеина используют критерий снижения не менее 50 % в разнице между уровнями вовлеченных и невовлеченных свободных легких цепей. Если неизмеримы ни М-протеин, ни СЛЦ, используют критерий редукции не менее 50 % ПК в КМ, если исходный уровень составлял не менее 30 %. В добавление к указанным критериям требуется сокращение не менее 50 % в размерах мягкотканых плазмодитом, если обнаруживались в дебюте Not less than 50 % reduction of serum M-protein and reduction in 24-h urinary M-protein by 90 % or to less than 200 mg/day. If the serum and urine M-protein are unmeasurable, a 50 % decrease in the difference between involved and uninvolved FLC levels is required in place of the M-protein criteria. If serum and urine M-protein are unmeasurable, and serum free light assay is also unmeasurable, 50 % reduction in PC in BM is required in place of M-protein, if baseline bone marrow plasma cell percentage was not less than 30 %. In addition to the above listed criteria, if present at baseline, a 50 % reduction in the size of soft tissue plasmacytomas is also required
Имунофенотипическая полная ремиссия (2011) Immunophenotypic complete remission (2011)	К критериям строгой полной ремиссии добавляется отсутствие фенотипически aberrантных (клональных) ПК среди не менее 1 млн проанализированных клеток костного мозга методом МПЦ (≥4 маркеров) Stringent complete remission as defined above plus: Absence of phenotypically aberrant (clonal) PC among at least 1 million analyzed bone marrow cells by MFC method (≥4 markers)
Молекулярная полная ремиссия (2011) Molecular complete remission (2011)	К критериям полной ремиссии добавляется негативный результат аллель-специфичной полимеразной цепной реакции с чувствительностью 10 <sup>-5</sup> Complete remission as defined above plus: Negative result of allele-specific polymerase chain reaction with a sensitivity of 10 <sup>-5</sup>

ответом на лечение и низким риском прогрессии заболевания. Появилась необходимость в более глубокой оценке полноты ремиссии.

Как известно, при лечении лейкозов (в частности, острого лимфобластного) глубина ответа на терапию оценивается с помощью высокочувствительных

методов, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и многоцветная проточная цитометрия (МПЦ), позволяющих установить наличие остаточного опухолевого клона. Остаточная популяция аномальных клеток является причиной развития рецидива в дальнейшем, и это состояние называют минимальной

остаточной болезнью (МОБ). Оценка МОБ является важным критерием для установления глубины ремиссии, широко используется в клинической практике для стратификации на группы риска и прогноза. ММ не стала исключением. В 2011 г. в критерии для установления диагноза ММ и дифференциальной диагностики между ММ и другими заболеваниями международной рабочей группой по ММ были добавлены понятия иммунофенотипической и молекулярной ремиссии, которые устанавливаются по наличию МОБ методами МПЦ и аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (АС-ПЦР) соответственно (табл. 2) [10].

#### **Методы детекции минимальной остаточной болезни и оценки полноты ремиссии при множественной миеломе и их сравнение**

##### **Морфологическое исследование пунктата костного мозга**

Морфологическое исследование КМ — наиболее распространенный метод определения опухолевой нагрузки при ММ. Одним из критериев ПР является наличие менее 5 % ПК в пунктате КМ. Морфологическое исследование должно проводиться в комплексе с иммунохимическими методами анализа.

В работе С. Chee и соавт. [11] было показано, что исследования уровня только СЛЦ недостаточно для установления ПР, так как у 10 % пациентов с нормальным соотношением СЛЦ в мазке КМ обнаруживалось более 5 % ПК. В группе из 92 пациентов с отрицательными данными (по результатам иммунохимического исследования) у 13 (14 %) пациентов в мазке пунктата КМ обнаруживалось более 5 % ПК. У них ОВ была значимо ниже, чем у пациентов, имеющих менее 5 % ПК в КМ (5,7 и 7,9 года соответственно).

##### **Иммунохимическое исследование сыворотки и мочи**

Измерение количества М-протеина, СЛЦ в сыворотке и моче с помощью методов электрофореза и иммунофиксации является доступным методом для диагностики и мониторинга ответа на лечение при ММ. За последнее десятилетие определение СЛЦ в сыворотке стало рутинным анализом. Соотношение СЛЦ является независимым прогностическим фактором на этапе диагностики ММ, позволяющим оценить агрессивное течение заболевания [12]. Однако оценка МОБ с помощью исследования количества СЛЦ не позволяет достоверно разделить пациентов на группы риска. Так, по данным J. Martínez-López и соавт. [13], из 94 пациентов с ПР 69 (73 %) больных достигли сПР, но достоверных различий по времени до прогрессии в группах ПР и сПР выявлено не было (медиана 53 и 62 мес для групп с ПР и сПР соответственно). Аналогичные данные были получены и в исследовании L. Lopez-Anglada и соавт. [14], в которое были включены 130 пациентов.

В исследовании В. Paiva и соавт. [15] показано, что среди 260 пациентов с ММ, проходивших терапию по протоколу GEM05>65y, 43 % достигли ПР, 30 % —

сПР и 30 % — иммунофенотипической ремиссии (ИР). При этом не было значимых различий в показателях выживаемости среди пациентов с ПР и сПР, однако у пациентов с ИР отмечались более длительные безрецидивная выживаемость (БРВ) и время до прогрессии заболевания в сравнении с пациентами как с ПР, так и с сПР. Кроме того, у части пациентов с ИР сохранялись положительные результаты иммунофиксации, но в последующем М-протеин у этих пациентов не определялся.

Среди пациентов с позитивным статусом МОБ были больные в периоде ПР (отрицательные результаты исследования методом иммунофиксации), у которых в дальнейшем обнаруживалось повторное возникновение М-протеина в ранние сроки после терапии (медиана — 3 мес). Аналогичная ситуация была у пациентов в периоде сПР, но с позитивным статусом МОБ, у которых прогрессия заболевания регистрировалась через 13 мес после индукционной терапии [15].

##### **Цитогенетическое исследование**

Наиболее значимыми независимыми параметрами, влияющими на время до прогрессии заболевания и ОВ, являются цитогенетические аберрации, выявленные с помощью метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), наличие ИР и возраст пациентов до 60 лет [16].

Найденные в дебюте заболевания хромосомные поломки определяют риск ММ. Минимальный набор для определения прогноза заболевания с помощью метода FISH включает транслокации t(4;14)(p16;q32), t(14;16)(q32;q23) и делецию del17p13 с частотой встречаемости 13 %, 3 % и 12 % соответственно. Расширенное исследование включает также транслокацию t(11;14)(q13;q32) (частота 15 %), делецию del13q (частота 46 %), аномалии хромосомы 1, например gain1q (частота 38 %) [17]. К высокому риску ММ относятся t(4;14), t(14;16) или del(17p), остальные хромосомные аномалии определяют стандартный цитогенетический риск [18].

Выявление МОБ с помощью FISH-исследования имеет свои ограничения в связи с малым количеством остаточных ПК, оставшихся после терапии, и недостаточно высокой чувствительностью метода FISH ( $10^{-2}$ – $10^{-3}$ ), которая только на порядок выше чувствительности морфологического исследования ( $10^{-1}$ ).

##### **Аллель-специфичная полимеразная цепная реакция**

В основе метода лежит выявление клона опухолевых ПК посредством детекции специфической перестройки варибельного региона генов иммуноглобулина. При нормальном созревании В-клетки происходит реаранжировка сегментов V, D и J в комплексе генов Ig (*IgH*, *IgK* и *IgL*), которые кодируют множество варибельных доменов молекул иммуноглобулинов. Случайные инсерции и делеции в местах слияний V (D) J-сегментов создают крайне высокое разнообразие регионов, специфичных для каждой



В-клетки, в том числе и опухолевой. Эти регионы слияния, идентифицируемые в миеломных клетках каждого пациента, используются как опухолеспецифичные мишени для проектирования аллель-специфичных (или пациент-специфичных) праймеров. С 1990-х годов для детекции клональных перестроек применялась гнездовая ПЦР и позднее количественная ПЦР в режиме реального времени.

Недостатками АС-ПЦР являются технические сложности и невозможность применения метода в ряде лабораторий. В работе N. Puig и соавт. [19] АС-ПЦР была применима лишь в 42 % случаев при ММ, хотя в работе M. Sarasquete и соавт. [20] – в 75 % случаев. Однако при ряде модификаций, описанных в исследовании R. Silvennoinen и соавт., применимость АС-ПЦР достигла 100 % [21]. Кроме того, молекулярные методы не учитывают генетическую гетерогенность и клональную селекцию, которая может привести к элиминации субварианта клона в процессе лечения заболевания [22].

#### **Секвенирование нового поколения**

Метод секвенирования нового поколения (СНП) основан на применении консенсусного набора праймеров (не пациент-специфичных), который позволяет амплифицировать и в дальнейшем секвенировать все реаранжированные сегменты генов Ig в образце ( $\geq 10^5$ ). Метод показал применимость более чем в 90 % случаев с ММ и чувствительность не менее  $10^{-6}$ .

В дебюте заболевания детектируется клональная реаранжировка гена Ig, которая используется как мишень для нахождения признаков МОБ в образцах в последующих точках исследования [23, 24]. Частота встречаемости искомого клонотипа рассчитывается как число его последовательностей, деленное на общее число последовательностей в образце.

В работе Martínez-López и соавт. [23] 133 пациента были поделены на 3 группы: с высоким ( $\geq 10^{-3}$ ), средним ( $10^{-3} - 10^{-5}$ ) и низким ( $< 10^{-5}$ ) уровнями МОБ. Выделенные группы пациентов значимо отличались по времени до прогрессии заболевания (27, 48 и 80 мес соответственно).

Недостатком метода СНП является только относительная количественная оценка МОБ, т.е. доля клональной реаранжировки пересчитывается по отношению ко всем поликлональным перестройкам генов Ig и зависит от присутствия В-клеток, количество которых варьирует в зависимости от проведенного лечения. В таком случае доля остаточных клеток с клональной реаранжировкой может быть высокой, несмотря на низкое значение их абсолютного количества. Однако метод показал возможность оценки МОБ в периферической крови пациентов с ММ, что является малоинвазивным методом диагностики [25].

#### **Магнитно-резонансная томография всего тела, метод позитронно-эмиссионной томографии, совмещенной с компьютерной томографией**

Магнитно-резонансная томография (МРТ), позитронно-эмиссионная томография, совмещенная

с компьютерной томографией (ПЭТ/КТ) не являются методами детекции МОБ в привычном смысле. Однако вследствие высокой частоты экстрамедуллярных рецидивов чувствительные визуализирующие инструментальные методы позволяют переоценить полноту ремиссии [26].

МРТ всего тела является наиболее чувствительным неинвазивным визуализирующим методом детекции очагов в костях позвоночника, дает полную информацию о степени и характере повреждения мягких тканей и характере инфильтрации КМ (очаговая, диффузная и др.). Следует отметить, что в течение нескольких месяцев после терапии очаговые повреждения могут оставаться и визуализироваться у пациентов как с хорошим ответом, так и без ответа на терапию. Это связано с наличием реактивных (отек, гематома) и остаточных очагов, содержащих погибшие опухолевые клетки, что может вносить несоответствия между серологическим ответом и МРТ-опосредованной оценкой полноты ремиссии. Учитывая такие особенности, рекомендуется проводить МРТ с интервалом в 3 мес после окончания терапии [27].

Метод ПЭТ/КТ позволяет оценить метаболическую активность (захват)  $^{18}\text{F}$ -флюордезоксиглюкозы (ФДГ) опухолевыми клетками в экстра- и интрамедуллярных очагах, локализовать их анатомически и распознать очаги остеодеструкции. Было показано, что сохранение аномального захвата ФДГ клетками после ВДХТ и / или аутоТСКК является неблагоприятным прогностическим фактором [28]. Среди 192 пациентов, получивших терапию талидомидом/дексаметазоном с последующей аутоТСКК и у которых сохранялось поражение тканей (подтвержденное методом ПЭТ/КТ), были короче ОВ и беспрогрессивная выживаемость (БПВ) [29]. В работе E. Zamagni и соавт. [30] с включением 192 пациентов было показано, что наличие очагов на ПЭТ-исследовании после ауто-ТСКК является значимым параметром и ОВ и время до прогрессии в ПЭТ-позитивных и ПЭТ-негативных группах больных значимо отличаются. Кроме того, 23 % пациентов, достигших ПР, вошли в ПЭТ-позитивную группу. Это свидетельствует о том, что с помощью ПЭТ можно определять более глубокую ремиссию. Однако этот метод может давать как ложно-положительные, так и ложно-отрицательные результаты в случае наличия инфекционных или воспалительных процессов [31]. Сравнение методов МРТ всего тела с ПЭТ/КТ показало, что ПЭТ/КТ имеет сходную с МРТ чувствительность, но более высокую специфичность.

#### **Многоцветная проточная цитометрия**

Многоцветная проточная цитометрия (МПЦ) – метод, основанный на анализе параметров светорассеяния и интенсивности флуоресценции отдельных клеток. Флуоресцентный сигнал появляется в случае связывания клетки с меченым флуорохромным красителем моноклональным антителом (МАТ), специфичным к белковым структурам клетки. С помощью

Таблица 3. Сравнительная характеристика основных методов детекции минимальной остаточной болезни

Table 3. Comparative characteristics of the minimal residual disease detection methods

Характеристики Characteristics	Многоцветная проточная цитометрия Multicolor flow cytometry	Аллель-специфичная полимеразная цепная реакция Allele-specific polymerase chain reaction	Секвенирование нового поколения Next generation sequencing
Применимость, % случаев множественной миеломы Applicability, % of MM cases	≈100 %	42–75 %	≈90 %
Необходимость в диагностическом (первичном) исследовании Necessity in diagnostic (primary) examination	Важно, но не обязательно Important, but not necessary	Обязательно Required	Обязательно Required
Время получения результата Time to obtained results	2–3 ч 2–3 hours	3–4 нед для идентификации мишени, для последующих точек — не менее 5 дней 3–4 weeks to identify of target, for subsequent points not less than 5 days	≥7 дней ≥7 days
Количественная оценка Quantitative assessment	Есть (прямая, точная) Yes (direct, exact)	Есть Yes	Есть Yes
Чувствительность Sensitivity	$10^{-4}$ - $10^{-5}$	$10^{-5}$ - $10^{-6}$	$10^{-6}$
Необходимость в свежем образце Necessity of fresh sample	Обязательно (не более 48 ч) Required (no more than 48 hours)	Нет No	Нет No
Характеристика качества образца Sample quality characteristic	Есть Yes	Нет No	Нет No
Стандартизация метода Standardization of method	Нет окончательной стандартизации No final standardization	Есть Yes	Нет данных No data

МПЦ можно дифференцировать ПК от других ядродержащих клеток КМ и провести анализ экспрессируемых антигенов ПК в целях выявления неопластической популяции. Это позволяет использовать МПЦ как для инициальной диагностики ММ, так и для мониторинга МОБ (табл. 3). С помощью МПЦ появляется возможность подсчитать долю этих клеток от всех ПК и от всех ядродержащих клеток в образце.

К достоинствам этого метода исследования МОБ относятся: одновременная идентификация и характеристика одиночных миеломных ПК, исследование большого количества ядродержащих клеток в течение нескольких часов, количественная оценка МОБ [16, 19], комбинированное определение поверхностных и внутриклеточных маркеров и применимость метода в большинстве случаев с ММ. Кроме того, МПЦ позволяет оценить качество материала: констатация значительной примеси периферической крови в аспирате КМ помогает исключить ложноотрицательные результаты [32].

Актуальность проблемы, связанной с поиском МОБ и выявлением прогностической значимости

и влияния статуса МОБ на ОВ и БРВ, не подвергается сомнению. За последнее 10-летие количество публикаций, посвященных выявлению МОБ при ММ, возросло в 4 раза. Первое место по количеству занимают статьи, посвященные МПЦ (рис. 1).

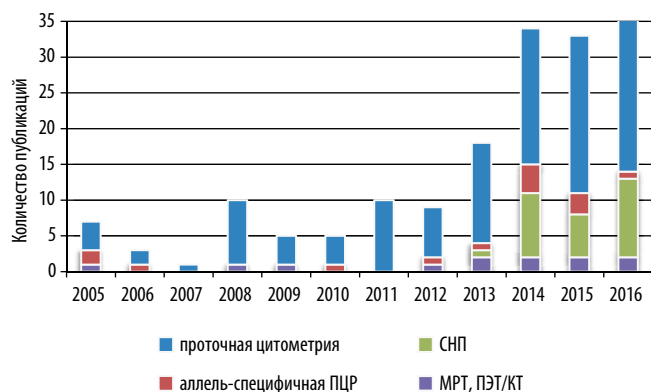
Далее нами будет подробно разобраны детали метода МПЦ как в мониторинге МОБ, так и в первичной диагностике ММ.

**Проточная цитометрия в диагностике и мониторинге минимальной остаточной болезни при множественной миеломе.** Роль метода МПЦ в диагностике моноклональных гаммапатий заключается в выполнении 3 задач:

1) первичной диагностики, основанной на подсчете числа ПК и определении доли фенотипически аномальных и / или моноклональных ПК;

2) идентификации прогностических факторов, в частности риска прогрессии моноклональной гаммапатии неясного генеза (МГНГ) и бессимптомной ММ на основе доли аномальных и нормальных ПК;

3) количественного определения МОБ, используемого для оценки эффективности лечения и прогноза исхода заболевания [5, 33].



**Рис. 1.** Количество публикаций, в том числе обзорных статей, посвященных мониторингу минимальной остаточной болезни при множественной миеломе методами многоцветной проточной цитометрии и аллель-специфичных олигонуклеотидов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), секвенирования нового поколения (СНП), а также с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) и позитронно-эмиссионной томографии, совмещенной с компьютерной (ПЭТ/КТ), с 2005 по 2016 г. (учитывались статьи, представленные в электронной базе данных PubMed)

Fig. 1. The number of publications, including review articles, related to minimal residual disease monitoring in multiple myeloma patients using the multicolor flow cytometry, allele-specific oligonucleotides by polymerase chain reaction (PCR), new generation sequencing (NGS) and with the use of magnetic resonance imaging (MRI) and positron emission tomography, combined with computed tomography (PET/CT) methods from 2005 to 2016 (only articles presented in the electronic database PubMed)

**Первичная диагностика множественной миеломы с помощью метода многоцветной проточной цитометрии.** Первичная диагностика ММ включает обязательный подсчет ПК в мазке аспирата КМ и в трепанобиоптате с помощью иммуногистохимического исследования. Показано, что процент ПК, подсчитанный в трепанобиоптате, выше, чем подсчитанный в мазке КМ, что связано с фиброзом и адгезией ПК, препятствующих аспирации миеломных клеток. Доля ПК, определенная с помощью МПЦ, как правило, на порядок ниже, чем доля ПК и в мазке КМ, и в биоптате. Это связано, во-первых, с тем, что ПК начинают крайне быстро погибать после разобщения их со стромой КМ [34], и, во-вторых, со значительным разведением образца кровью вследствие того, что в большинстве центров 1-я порция КМ используется для мазков, для цитометрического же исследования берут 2-ю или даже 3-ю порцию КМ [33, 35].

Иммунофенотипирование ПК помогает в диагностике редких случаев IgM-варианта ММ, несекретирующей формы ММ и первичного амилоидоза [33].

Следует принять во внимание, что значительная доля аномальных ПК (более 97 % от всех ПК в КМ) характерна для ММ, меньшее их количество (менее 97 %) может соответствовать МГНГ, хотя окончательный диагноз зависит от морфологического исследования и клинических признаков [33]. У пациентов с МГНГ в большинстве (>80 %) случаев доля нормальных клеток превышает 5 %. У пациентов с симптоматической формой ММ лишь в небольшом проценте

случаев (<15 %) обнаруживается более 5 % нормальных ПК [36].

Дополнительной задачей первичной диагностики ММ является определение aberrантного иммунофенотипа, а именно сочетания аномально-экспрессирующихся поверхностных антигенов, которое может в дальнейшем облегчить и улучшить поиск остаточных миеломных клеток.

**Идентификация прогностических факторов, в частности риска прогрессии моноклональной гаммапатии неясного генеза и бессимптомной множественной миеломы, на основе доли аномальных и нормальных плазматических клеток.** Для пациентов с МГНГ и бессимптомной формой ММ с высоким соотношением аномальных к нормальным ПК характерен высокий риск прогрессии в ММ [37, 38].

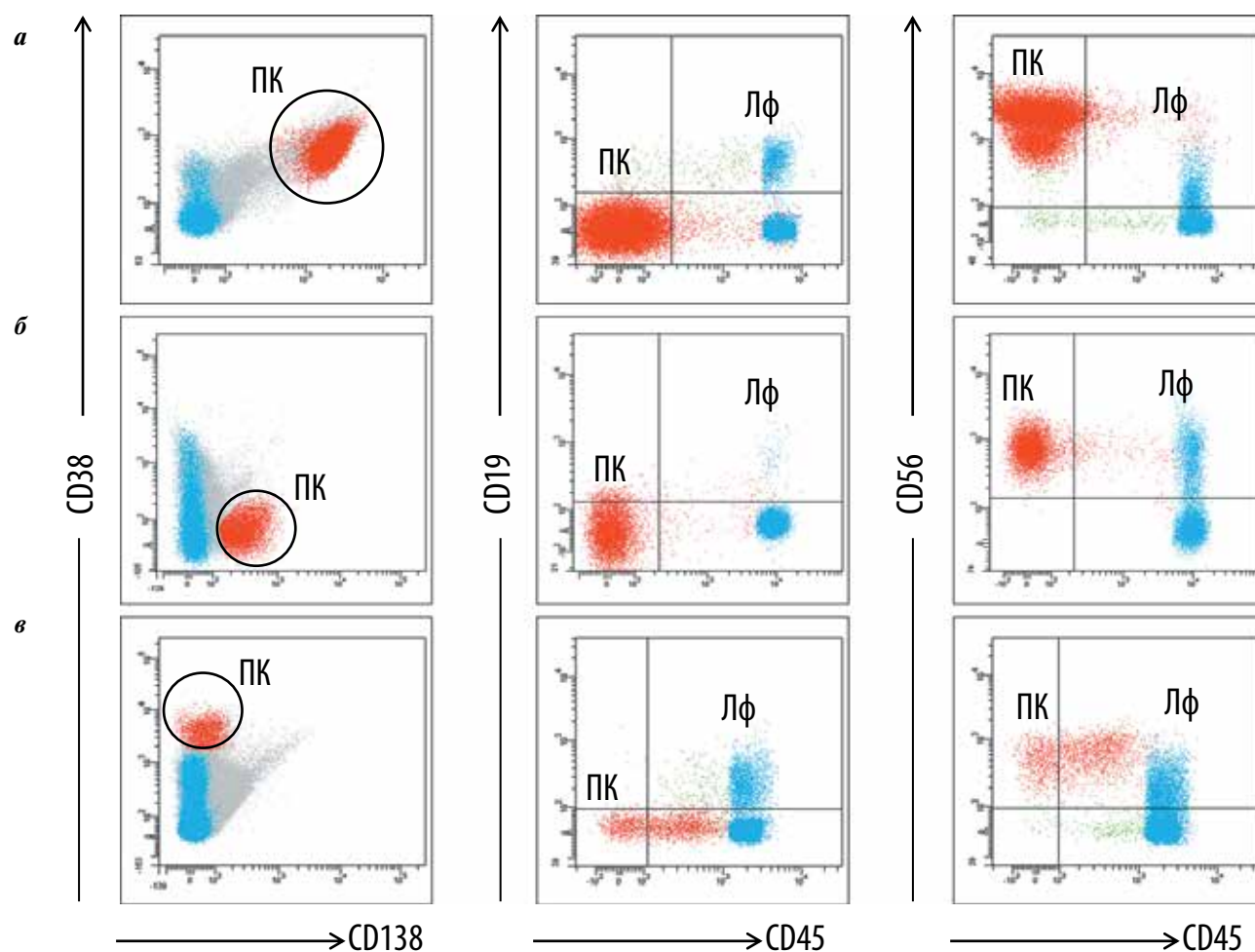
Показано, что, в случае если доля нормальных ПК по отношению ко всем ПК не более 5 %, вероятность прогрессирования в симптоматическое заболевание в течение 5 лет у пациентов с МГНГ и тлеющей ММ выше и составляет 25 % (против 5 %,  $p < 0,001$ ) и 64 % (против 8 %,  $p < 0,001$ ) соответственно. Пациенты с симптоматической ММ, у которых доля нормальных ПК превышает 5 %, имеют более высокий уровень гемоглобина (121 г/л против 106 г/л,  $p < 0,001$ ), низкий процент ПК в КМ (2 % против 13 %,  $p < 0,001$ ) и более низкую концентрацию М-компонента (20 г/л против 40 г/л,  $p < 0,001$ ) [39].

**Иммунофенотипирование плазматических клеток.** Основой применения МПЦ в первичной диагностике ММ и МОБ является возможность детектирования аномальных ПК. Неопластические ПК идентифицируются по рестрикции легких цепей Ig, а также по специфическому сочетанию aberrантной экспрессии поверхностных антигенов.

Первым этапом иммунофенотипического анализа является идентификация ПК. Наилучшим способом решения данной задачи служит одновременное использование маркеров CD138, CD38 и CD45 в комбинации с показателями светорассеяния. CD138 (синдекан-1) — это специфический маркер ПК, который экспрессируется и на миеломных, и на нормальных ПК. Однако на плазмобластах (незрелых ПК) экспрессия CD138 менее интенсивна или отсутствует. CD38 — это неспецифический маркер, который экспрессируется на многих лейкоцитах, но наибольшая плотность его экспрессии обнаруживается на ПК [40].

Встречаются редкие случаи ММ, при которых ПК имеют «омоложенный» иммунофенотип CD138dim (dim — низкая плотность экспрессии антигена)/CD45<sup>+</sup> или плазмобластный иммунофенотип CD138-/CD45<sup>++</sup> [41]. Описаны крайне редкие случаи ММ с отсутствием CD38 на ПК [42]. Нам встретились случаи отсутствия на ПК и CD138, и CD38, при этом ПК также имели аномальную экспрессию CD56, на них отсутствовал маркер CD19, экспрессия CD45 была вариативной, клональность клеток была подтверждена





**Рис. 2.** Экспрессия антигенов CD138 и CD38 на плазматических клетках (ПК) при множественной миеломе. Лимфоциты (Лф) представлены на диаграммах в качестве внутреннего контроля для маркеров CD19 и CD56: а – миеломные ПК с иммунофенотипом CD138<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>; б – миеломные ПК с отсутствием CD38, иммунофенотип: CD138<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>; в – ПК при ММ с «омоложенным» иммунофенотипом CD138<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>

**Fig. 2.** CD138 and CD38 antigens expression on PC in MM patients. Lymphocytes are represented in the diagrams as an internal control for CD19 and CD56: а – myeloma PC with immunophenotype CD138<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>; б – myeloma PC with absence of CD38 and immunophenotype: CD138<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>; в – myeloma PC with immunophenotype CD138<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>.

по рестрикции легких цепей Ig (рис. 2). Потеря CD138 и CD38 миеломными клетками может происходить в ходе лечения [43]. Также есть данные, что отсутствие CD138 на ПК может быть связано с гипоксией клеток [44].

Определение клональности ПК важно для первичной диагностики ММ, что позволяет дифференцировать моноклональные неопластические ПК от поликлональных реактивных клеток со схожим иммунофенотипом. Однако определение клональности при оценке МОБ имеет меньшую практическую значимость. Это связано с тем, что большая часть ПК после лечения – нормальные и являются поликлональными, поэтому исследование лишь цитоплазматических κ- и λ-легких цепей иммуноглобулинов без изучения поверхностных маркеров не позволит достоверно оценить наличие МОБ [33].

Нет универсального поверхностного маркера, который позволил бы провести дифференцировку

аномальных и нормальных ПК. Существует список наиболее информативных маркеров, аномальная экспрессия которых встречается при ММ (табл. 4).

**Рекомендации к подготовке проб и проведению анализа.** Для первичной диагностики ММ и мониторинга МОБ исследуют аспират КМ. В качестве антикоагулянтов допустимо применение этилендиаминтетрауксусной кислоты и гепарина натрия. Использование цитрата натрия снижает жизнеспособность клеток, что нежелательно. Максимальное время хранения образцов составляет 48 ч от момента взятия материала. Приемлемым считается хранение как при комнатной температуре, так и при 4–8 °С. К признакам сомнительного качества образцов относятся гемолиз, наличие сгустков, большой объем аспириата КМ, свидетельствующий о чрезмерном разведении периферической кровью (>2 мл), и исследования такого материала необходимо избегать [46].

**Таблица 4.** Список наиболее информативных антигенов для детекции aberrantных плазматических клеток при множественной миеломе (адаптировано из [45])

**Table 4.** List of the most informative antigens for detection of aberrant plasma cells in multiple myeloma (adapted from [45])

Антиген Antigen	Профиль нормальной экспрессии плазматических клеток костного мозга Profile of normal expression in bone marrow plasma cells	Профиль аномальной экспрессии Profile of abnormal expression	Доля аномальной экспрессии среди случаев множественной миеломы, % The proportion of abnormal expression among multiple myeloma cases, %
CD38	Высокая плотность экспрессии (high) High density of expression (high)	Положительная, но плотность экспрессии ниже (dim) Positive, but the expression density is lower (dim)	80
CD45	Гетерогенная — от отрицательной (до 6 %) до положительной Heterogeneous — from negative (<6 %) to positive	Отрицательная Negative	80
CD19	Положительная (но до 33 % от всех ПК могут быть CD19-) Positive (but up to 33 % of all PCs can be CD19-)	Отрицательная Negative	96
CD56	Отрицательная (но до 10–15 % могут быть CD56dim) Negative (but up to 10–15 % can be CD56dim)	Высокая плотность экспрессии High density of expression	60–75
CD117	Отрицательная (0 %) Negative (0 %)	Положительная Positive	30–32
CD20	Отрицательная (но до 4 % CD20dim) Negative (but up to 4 % CD20dim)	Положительная Positive	17–30
CD28	Отрицательная (но до 15 % CD28dim) Negative (but up to 15 % CD28dim)	Высокая плотность экспрессии High density of expression	15–45
CD27	Яркая (100 %) Positive (100 %)	Слабая/отрицательная Low/negative	40–68
CD81	Положительная (100 %) Positive (100 %)	Слабая/отрицательная Low/negative	55
CD200	Слабоположительная Weakly positive	Высокая плотность экспрессии High density of expression	≥70
CD33	Отрицательная (но до 6 % CD33dim) Negative (but up to 6 % CD33dim)	Слабая/положительная Low/positive	18

Для выделения лейкоцитов рекомендуется до окрашивания проводить лизис эритроцитов с помощью раствора с хлоридом аммония. Выделение мононуклеаров с помощью центрифугирования в градиенте плотности с использованием фикола не рекомендуется, так как это может привести к вариабельному увеличению или уменьшению доли ПК, кроме того, фиколл ускоряет потерю CD38 и CD138 с поверхности ПК, что ухудшает дальнейший процесс анализа данных [47, 48].

По рекомендациям М. Stetler-Stevenson и соавт. [48] при конструировании панели для детекции МОБ в каждую пробирку должны быть включены МАТ к антигенам дифференцировки CD19, CD38, CD45 и CD138 и проанализированы маркеры CD27, CD56, CD81 и CD117. Нужно заметить, что исследование рестрикции внутриклеточных легких цепей иммуноглобулинов в 97 % случаев не дает дополнительной

полезной информации, поэтому для рутинной диагностики проводить его не рекомендуется. Однако соотношение κ/λ может помочь в прояснении атипичных случаев, когда анализ только поверхностных маркеров вызывает затруднения в интерпретации данных, при этом рестрикция легких цепей оценивается в выбранной потенциально аномальной фракции ПК. Надежная панель МАТ для 6-цветной проточной цитометрии, показавшая эффективность в крупномасштабных клинических испытаниях (Myeloma IX, X и первые 2000 пациентов в Myeloma XI), указана в табл. 5.

Наиболее часто встречаемые aberrации поверхностных антигенов при ММ включают: отрицательную экспрессию CD45 и CD19, высокую плотность экспрессии CD56 и сниженную экспрессию CD38. Оценка комбинации только этих маркеров позволяет идентифицировать аномальные ПК более чем в 90 % случаев ММ [39].

**Таблица 5.** Панель моноклональных антител для мониторинга минимальной остаточной болезни при множественной миеломе для 6-цветного проточного цитометра

**Table 5.** Monoclonal antibodies panel for monitoring a minimal residual disease in multiple myeloma patients for a 6-color flow cytometer

№ пробирки	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PC7	APC	APC-C750
1-я	CD27	CD56	CD19	CD38	CD138	CD45
2-я	CD81	CD117	CD19	CD38	CD138	CD45

**Примечание.** Здесь и в табл. 6: APC — аллофикоцианин, APC-C750 — аллофикоцианин-цианин 750, Cy7 — цианин 7, Cy5.5 — цианин 5.5, FITC — флуоресцеинизотиоцианат, PE — фикоэритрин, PerCP — перидинин-хлорофилл протеин.

**Note.** Here and in table 6: APC — allophycocyanin, APC-C750 — allophycocyanin-cyanine 750, Cy7 — cyanine 7, Cy5.5 — cyanine 5.5, FITC — fluoresceinisoithiocyanate, PE — R-phycoerythrin, PerCP — peridinin-chlorophyll protein.

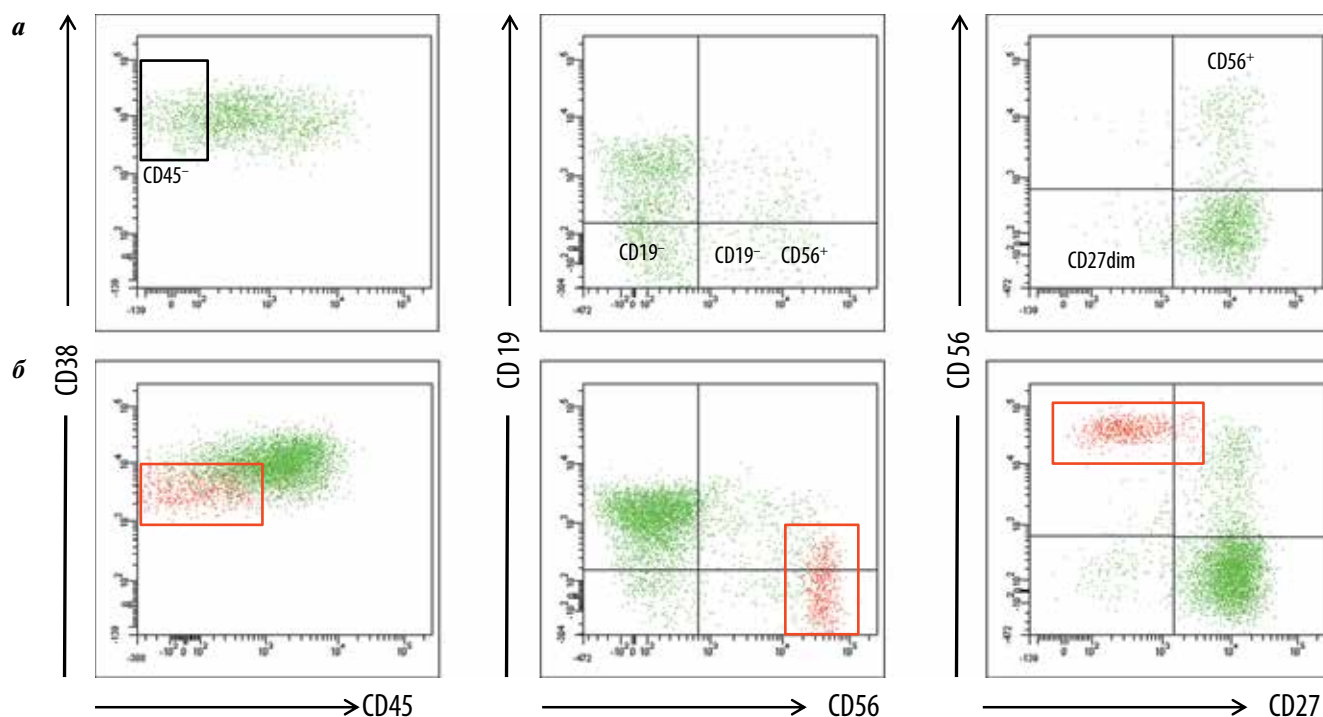
Однако при анализе большого количества ядродержащих клеток (>1 млн) показано, что ПК здоровых доноров могут быть CD19<sup>+</sup> и / или CD56<sup>+</sup> со сниженной экспрессией CD45, а также гетерогенны по экспрессии CD28 [48, 49]. С другой стороны, аномальные клетки обладают более гомогенной экспрессией антигенов, могут иметь сниженную экспрессию CD81, CD27 и экспрессировать CD117, что никогда не наблюдается на нормальных ПК. Исследование этих дополнительных, более специфичных антигенов помогает улучшить дифференциацию нормальных и миеломных ПК. Для того чтобы утверждать, что найденная популяция ПК аномальна, необходимо наличие на данных клетках не менее 2 aberrантно-экспрессируемых маркеров [48].

Анализ большого количества клеток является важным моментом в оценке МОБ. В руководстве EMN (The European Myeloma Network) 2008 указана достаточная клинически значимая чувствительность — 0,01 % [33]. Для достижения такой чувствительности необходимо проанализировать не менее 500 тыс. ядродержащих клеток КМ, считая минимальной популяцией аномальных ПК 30–50 клеток с aberrантным иммунофенотипом. Однако появляются новые данные о том, что применение новых высокоэффективных протоколов лечения ведет к снижению МОБ до значений менее 0,01 %. Для повышения чувствительности метода МПЦ до 0,001 % необходимо увеличение количества анализируемых ядродержащих клеток до 3–5 млн, но это может привести к затруднениям, связанным с уменьшением специфичности. В таком случае увеличивается число нормальных ПК, иммунофенотип которых «пересекается» с аномальным фенотипом миеломных клеток: CD19<sup>+</sup>, CD45<sup>low</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD27<sup>low</sup>, CD28<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD200<sup>bright</sup> [50] (рис. 3). Поэтому проведение высокочувствительного и специфичного анализа возможно только при применении не менее чем 8-цветной проточной цитометрии [45].

Панель для 8-цветной проточной цитометрии разработана Euroflow Consortium (табл. 6). Пробирка № 2 исследуется, если необходимо подтвердить клональность ПК с фенотипическими отклонениями.

Заключение по оценке МОБ должно включать: долю всех ПК от ядродержащих клеток, долю ПК с aberrантным иммунофенотипом от всех ПК, а также уровень чувствительности, достигнутый при анализе. Если среди всех просчитанных ядродержащих клеток удалось обнаружить более 50 миеломных клеток, то делается заключение о наличии МОБ, при этом указывается процент обнаруженных аномальных ПК от всех ядродержащих клеток. Если обнаружены 30–50 миеломных клеток, то делается заключение о наличии МОБ, однако точная количественная оценка не может быть дана, так как достигнут предел детекции МОБ (30 aberrантных клеток), но не достигнут предел воспроизводимого подсчета (50 миеломных клеток). Если в образце не найдено даже 30 миеломных клеток, для того чтобы дать заключение об отсутствии МОБ, необходимо оценить качество образца КМ, а именно степень разведения периферической кровью. К признакам значительного разведения КМ кровью относятся: отсутствие или низкое содержание нормальных ПК, В-клеточных и миелоидных предшественников, тучных клеток, эритрокариобластов. Сильно разведенный периферической кровью КМ является неадекватным материалом для оценки МОБ, поэтому данная информация также должна отражаться в заключении [48].

**Исследование прогностической значимости минимальной остаточной болезни методом многоцветной проточной цитометрии в разных протоколах терапии множественной миеломы.** Прогностическая значимость оценки наличия МОБ показана в крупных клинических исследованиях. В исследовании испанской группы PETHEMA с включением 295 пациентов, которые получали терапию по протоколу GEM2000 (ВДХТ с последующей аутоТСКК), оценка МОБ проводилась на 100-й день после проведения аутоТСКК. БПВ у МОБ-негативных пациентов была выше, чем у МОБ-позитивных (медиана 71 мес против 37 мес,  $p < 0,001$ ), как и ОВ (медиана не достигнута против 89 мес,  $p = 0,002$ ). В данном исследовании использовали 4-цветную проточную цитометрию с уровнем чувствительности по крайней мере 0,01 % [51].



**Рис. 3.** Экспрессия антигенов CD38, CD19, CD56, CD45 на нормальных и миеломных плазматических клетках (ПК): а – ПК здорового донора: минорные субпопуляции ПК с иммунофенотипом CD19<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD27dim, «имитирующим» иммунофенотип миеломных клеток; б – на фоне нормальных выделены ПК, формирующие остаточную популяцию с aberrантным иммунофенотипом CD38dim/CD45<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>/CD27dim

Fig. 3. CD38, CD19, CD56 and CD45 antigens expression on normal and myeloma PC: а – PC of healthy donor: minor PC subpopulations with immunophenotype CD19<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD27dim, "simulating" the immunophenotype of myeloma cells; б – Among normal PCs, PCs that form a residual population with an aberrant immunophenotype CD38dim/CD45<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>/CD27dim are isolated

**Таблица 6.** Панель моноклональных антител для детекции минимальной остаточной болезни при множественной миеломе для 8-цветной проточной цитометрии

Table 6. Monoclonal antibodies panel for detection of a minimal residual disease in multiple myeloma patients

№ пробирки	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PC7	APC	APC-C750	V450	BV510
1-я	CD38 (клон L38)	CD56 (клон C5.9),	CD45 (клон HI30)	CD19 (клон J3-119)	CD117 (клон 104D2)	CD81 (клон M38,)	CD138 (клон MI15)	CD27 (клон O323)
2-я	CD38 (клон L38)	CD56 (клон C5.9)	CD45 (клон HI30)	CD19 (клон J3-119)	cIgκ (поликло- нальные, Dako)	cIgλ (поликло- нальные, Dako)	CD138 (клон MI15)	CD27 (клон O323)

**Примечание.** V450 – краситель violet 450, BV510 – краситель brilliant violet 510.

Note. V450 – violet 450, BV510 – brilliant violet 510.

По результатам исследования Medical Research Council Myeloma IX, отсутствие МОБ на 100-й день после аутоТСКК (с предшествующей ВДХТ) является благоприятным признаком. БПВ и ОВ у пациентов с МОБ-негативным статусом длительнее, чем у пациентов с выявленной МОБ (БПВ: 28,6 мес против 15,5 мес,  $p < 0,001$ ; ОВ: 80,6 мес против 59 мес,  $p = 0,018$ ) [52].

В работе Rawstron и соавт. [52] показано, что среди пациентов, получавших неинтенсивную индукцион-

ную терапию по 2 различным режимам, 14,5 % достигли МОБ-негативного статуса. В то же время были выявлены различия между лечением с помощью режима МР (мелфалан и преднизолон) и СТДa (циклофосфамид, талидомид, дексаметазон, ослабленный режим). Доля МОБ-негативных пациентов, получавших терапию МР, была ниже, чем доля получавших СТДa (3 % против 26 %,  $p < 0,001$ ) [52].

При применении интенсивных режимов терапии у 19 % пациентов в конце фазы индукции МОБ отсутст-



вовала; при применении режима СТД (циклофосфамид, талидомид, дексаметазон) МОБ-негативных пациентов было 25 %, при применении CVAD (циклофосфамид, винкристин, доксорубин, дексаметазон) — 13 % ( $p = 0,004$ ). После проведения аутоТСКК доля пациентов с недетектируемой МОБ составила 62,2 %. Также были обнаружены значимые отличия в наличии МОБ после аутоТСКК (100-й день) при сравнении 2 индукционных режимов: МОБ-негативны были 71 % пациентов, леченных по режиму СТД, и только 54 % среди пациентов, получавших CVAD ( $p < 0,001$ ) [52].

Применение поддерживающей терапии талидомидом после проведения ВДХТ и аутоТСКК позволяет достигнуть и сохранить МОБ-негативный статус. Среди пациентов, которые имели МОБ на 100-й день после аутоТСКК, МОБ-негативного статуса достигли 27,6 % получавших поддерживающую терапию и 3,4 % не получавших ее ( $p = 0,025$ ). Среди пациентов, которые не имели МОБ на 100-й день после аутоТСКК, МОБ-негативный статус сохранили 96 % получавших поддерживающую терапию и 68,8 % не получавших ее ( $p = 0,026$ ). В исследовании Myeloma IX использовали 6-цветную проточную цитометрию с чувствительностью 0,01 % (обнаруживали 30–50 миеломных клеток, составляющих дискретную популяцию, на 500 тыс. ядродержащих клеток КМ) [52].

В исследовании Intergroupe Francophone du Myelome МОБ-негативного статуса по окончании курса достигли 68 % пациентов, при этом ни у кого из них в течение 3 лет не зарегистрировано рецидива (100 % БРВ). В данном исследовании использовали 7-цветную проточную цитометрию с чувствительностью

0,0025 % (минимум 50 аберрантных клеток на 2 млн ядродержащих клеток) [53].

### Заключение

Новые подходы в терапии ММ улучшили эффективность проводимого лечения, что привело к удлинению общей и безрецидивной выживаемости у пациентов с ММ, а также увеличили частоту достижения ПР. Стандартные подходы к оценке ремиссии (морфологическое и иммунохимическое исследования) не позволили выявить достоверные отличия между группами пациентов с ПР и сПР по таким параметрам, как ОВ и БРВ. Было показано, что у 1/3 больных, достигших ПР, развивается рецидив. Это обусловлено наличием МОБ — состояния, при котором в крайне низком количестве персистирует популяция опухолевых клеток, способная в дальнейшем привести к развитию рецидива. Несмотря на высокую частоту применимости МПЦ в диагностике и мониторинге МОБ при ММ, данный метод является нестандартизованным, а его чувствительность и специфичность зависят от используемой панели МАТ, проточных цитометров с разными характеристиками и выбранных стратегий гейтирования. Увеличение количества анализируемых антигенов, использование по крайней мере 8-цветной проточной цитометрии позволяет провести высокоспецифичный и точный анализ с чувствительностью около 0,001 %.

Показано, что клиренс остаточных клеток у больных ММ потенциально достижим и является важным независимым прогностическим фактором. В перспективе исследование МОБ в рамках определенных протоколов лечения может помочь в принятии адекватных решений на этапе поддерживающей терапии после ВДХТ.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2014;136(5):e359–86. DOI: 10.1002/ijc.29210. PMID: 25220842.
2. Rajkumar S., Kyle R. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2005;80(10):1371–82. DOI: 10.4065/80.10.1371. PMID: 16212152.
3. Rajkumar S., Kumar S. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2016;91(1):101–19. DOI: 10.1016/j.mayocp.2015.11.007. PMID: 26763514.
4. Rajkumar S., Dimopoulos M., Palumbo A. et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15(12):e538–48. DOI: 10.1016/s1470-2045(14)70442-5. PMID: 25439696.
5. Durie B., Harousseau J., Miguel J. et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20(9):1467–73. DOI: 10.1038/sj.leu.2404284. PMID: 16855634.
6. Kumar S., Rajkumar S., Dispenzieri A. et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 2008;111(5):2516–20. DOI: 10.1182/blood-2007-10-116129. PMID: 17975015.
7. Rajkumar S. Myeloma today: Disease definitions and treatment advances. *Am J Hematol* 2015;91(1):90–100. DOI: 10.1002/ajh.24236. PMID: 26565896.
8. Palumbo A., Cavallo F., Gay F. et al. Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2014;371(10):895–905. DOI: 10.1056/nejmoa1402888. PMID: 25184862.
9. Sonneveld P., Goldschmidt H., Rosinol L. et al. Bortezomib-based versus nonbortezomib-based induction treatment before autologous stem-cell transplantation

- in patients with previously untreated multiple myeloma: a meta-analysis of phase III randomized, controlled trials. *J Clin Oncol* 2013;31(26):3279–87. DOI: 10.1200/jco.2012.48.4626. PMID: 23897961.
10. Rajkumar S., Harousseau J., Durie B. et al. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood* 2011;117(18):4691–95. DOI: 10.1182/blood-2010-10-299487. PMID: 21292775.
11. Chee C., Kumar S., Larson D. et al. The importance of bone marrow examination in determining complete response to therapy in patients with multiple myeloma. *Blood* 2009;114(13):2617–8. DOI: 10.1182/blood-2009-01-198788. PMID: 19641191
12. Kyrtonis M., Vassilakopoulos T., Kafasi N. et al. Prognostic value of serum free light chain ratio at diagnosis in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2007;137(3):240–3. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06561.x. PMID: 17408464.
13. Martínez-López J., Paiva B., Lopez-Anglada L. et al. Critical analysis of the stringent complete response in multiple myeloma: contribution of sFLC and bone marrow clonality. *Blood* 2015;126(7):858–62. DOI: 10.1182/blood-2015-04-638742. PMID: 26089396.
14. Lopez-Anglada L., Cueto-Felgueroso C., Mateos M.V. et al. Usefulness of Serum-Free-Light-Chains-Ratio (SFLCR) and Serum Heavy-Light-Chains-Ratio (SHLCR) in multiple myeloma in the context of three GEM / Pethema clinical trials. *Blood* 2015; 126(23), 2962. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/126/23/2962>
15. Paiva B., Martínez-López J., Vidriales M. et al. Comparison of Immunofixation, Serum Free Light Chain, and Immunophenotyping for Response Evaluation and Prognostication in Multiple Myeloma. *J Clin Oncol* 2011; 29(12):1627–33. DOI: 10.1200/jco.2010.33.1967. PMID: 21402611.
16. Paiva B., Gutierrez N., Rosinol L. et al. High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood* 2011;119(3):687–91. DOI: 10.1182/blood-2011-07-370460. PMID: 22128143
17. Kuiper R., van Duin M., van Vliet M. et al. Prediction of high- and low-risk multiple myeloma based on gene expression and the International Staging System. *Blood* 2015;126(17):1996–2004. DOI: 10.1182/blood-2015-05-644039. PMID: 26330243.
18. Fonseca R., Bergsagel P., Drach J. et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009;23(12):2210–21. DOI: 10.1038/leu.2009.174. PMID: 19798094.
19. Puig N., Sarasquete M., Balanzategui A. et al. Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. *Leukemia* 2013;28(2):391–7. DOI: 10.1038/leu.2013.217. PMID: 23860448.
20. Sarasquete M.E., García-Sanz R., González D. et al. 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(10),1365–72. PMID: 16219573.
21. Silvennoinen R., Lundan T., Kairisto V. et al. Comparative analysis of minimal residual disease detection by multiparameter flow cytometry and enhanced ASO RQ-PCR in multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2014;4(10):250. DOI: 10.1038/bcj.2014.69. PMID: 25303369
22. Fulciniti M., Munshi N., Martínez-López J. Deep Response in Multiple Myeloma: A Critical Review. *Biomed Res Int* 2015;2015:1–7. DOI: 10.1155/2015/832049. PMID: 26783530.
23. Martínez-López J., Lahuerta J., Pepin F. et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* 2014;123(20):3073–9. DOI: 10.1182/blood-2014-01-550020. PMID: 24646471.
24. Faham M., Zheng J., Moorhead M. et al. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012;120(26):5173–80. DOI: 10.1182/blood-2012-07-444042. PMID: 23074282.
25. Kord N., Mailankody S., Roschewski M. et al. Minimal residual disease (MRD) testing in newly diagnosed multiple myeloma (MM) patients: a prospective head-to-head assessment of cell-based, molecular, and molecular-imaging modalities. *Blood* 2014; 124(21):2105.
26. Dimopoulos M., Terpos E., Comenzo R.L. et al. International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple Myeloma. *Leukemia* 2009; 1545–56. DOI: 10.1038/leu.2009.89. PMID: 19421229.
27. Hillengass J., Ayyaz S., Kilk K. et al. Changes in magnetic resonance imaging before and after autologous stem cell transplantation correlate with response and survival in multiple myeloma. *Haematologica* 2012;97(11):1757–60. DOI: 10.3324/haematol.2012.065359. PMID: 22689673.
28. Usmani S., Mitchell A., Waheed S. et al. Prognostic implications of serial 18-fluoro-deoxyglucose emission tomography in multiple myeloma treated with total therapy 3. *Blood* 2013;121(10):1819–23. DOI: 10.1182/blood-2012-08-451690. PMID: 22689673.
29. Caers J., Withofs N., Hillengass J. et al. The role of positron emission tomography-computed tomography and magnetic resonance imaging in diagnosis and follow up of multiple myeloma. *Haematologica* 2014;99(4):629–37. DOI: 10.3324/haematol.2013.091918. PMID: 24688111.
30. Zamagni E., Patriarca F., Nanni C. et al. Prognostic relevance of 18-F FDG PET/CT in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with up-front autologous transplantation. *Blood* 2011;118(23):5989–95. DOI: 10.1182/blood-2011-06-361386. PMID: 21900189.
31. Bartel T., Haessler J., Brown T. et al. F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the context of other imaging techniques and prognostic factors in multiple myeloma. *Blood* 2009;114(10):2068–76. DOI: 10.1182/blood-2009-03-213280. PMID: 19443657.
32. Loken M., Chu S., Fritschle W. et al. Normalization of bone marrow aspirates for hemodilution in flow cytometric analyses. *Cytometry* 2009;76B(1):27–36. DOI: 10.1002/cyto.b.20429. PMID: 18548614.
33. Rawstron A., Orfao A., Beksac M. et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008;93(3):431–8. DOI: 10.3324/haematol.11080. PMID: 18268286.
34. Hartmann L., Biggerstaff J., Chapman D. et al. Detection of genomic abnormalities in multiple myeloma: the application of FISH analysis in combination with various plasma cell enrichment techniques. *Am J Clin Pathol* 2011;136(5):712–20. DOI: 10.1309/ajcpf7nflw8uajep. PMID: 22031309.
35. Ely S., Biran N., Chari A. What we mean when we talk about MRD in myeloma. A review of current methods. Part 1 of a two-part series. *Curr Hematol Malig Rep* 2014;9(4):379–88. DOI: 10.1007/s11899-014-0238-x. PMID: 25277219.
36. Paiva B., Vidriales M., Mateo G. et al. 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(20):4369–72.  
DOI: 10.1182/blood-2009-05-221689.  
PMID: 19755674.
37. Rawstron A.C., Fenton J.A.L., Gonzalez D. et al. High-risk MGUS: Identification by immunophenotype, karyotype, and clonal homogeneity. *Blood* 2003;102(11):36A–7A.
  38. Perez-Persona E., Vidriales M., Mateo G. et al. 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(7):2586–92.  
DOI: 10.1182/blood-2007-05-088443.  
PMID: 17576818.
  39. Paiva B., Almeida J., Pérez-Andrés M. et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry* 2010; 239–52.  
DOI: 10.1002/cyto.b.20512.  
PMID: 20155853.
  40. Rihova L., Muthu Raja K., Calheiros Leite L. et al. Immunophenotyping in Multiple Myeloma and Others Monoclonal Gammopathies. In: *Multiple Myeloma – A Quick Reflection on the Fast Progress*. Ed. R. Hajek. Epub: 2013.  
DOI: 10.5772/55938.
  41. Reid S., Yang S., Brown R. et al. Characterisation and relevance of CD138-negative plasma cells in plasma cell myeloma. *Int J Lab Hematol* 2010;32(6 Pt 1):e190–6.  
DOI: 10.1111/j.1751-553x.2010.01222.x.  
PMID: 20201998.
  42. Bataille R., Jégo G., Robillard N. et al. 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(9), 1234–40.  
PMID: 16956823.
  43. Ise M., Matsubayashi K., Tsujimura H., Kumagai K. Loss of CD38 Expression in Relapsed Refractory Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2016; 16(5): 59–64.  
DOI: 10.1016/j.clml.2016.02.037.  
PMID: 26997107.
  44. Kawano Y. Hypoxia reduces CD138 expression and induces an immature and stem cell-like transcriptional program in myeloma cells. *Int J Oncol* 2013; 43(6):1809–16.  
DOI: 10.3892/ijo.2013.2134.  
PMID: 24126540.
  45. Flores-Montero J., de Tute R., Paiva B. et al. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytometry* 2015;90(1):61–72.  
DOI: 10.1002/cyto.b.21265.  
PMID: 26100534.
  46. Stetler-Stevenson M., Davis B., Wood B., Braylan R. 2006 Bethesda International Consensus Conference on Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia. *Cytometry* 2007;72B(S1):S3.  
DOI: 10.1002/cyto.b.20362.  
PMID: 17803189.
  47. Kumar S., Kimlinger T., Morice W. Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010;23(3):433–51.  
DOI: 10.1016/j.beha.2010.09.002.  
PMID: 21112041.
  48. Stetler-Stevenson M., Paiva B., Stoolman L. et al. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytometry* 2015;90(1):26–30.  
DOI: 10.1002/cyto.b.21249.  
PMID: 25907102.
  49. 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* 2011;80(5):318–23.  
DOI: 10.1002/cyto.b.20601.  
PMID: 21634008.
  50. Liu D., Lin P., Hu Y. et al. Immunophenotypic heterogeneity of normal plasma cells: comparison with minimal residual plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol* 2012;65(9):823–9.  
DOI: 10.1136/jclinpath-2012-200881.  
PMID: 22685235.
  51. Paiva B., Vidriales M., Cervero J. et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood* 2008;112(10):4017–23.  
DOI: 10.1182/blood-2008-05-159624.  
PMID: 18669875.
  52. Rawstron A., Child J., de Tute R. et al. Minimal Residual Disease Assessed by Multiparameter Flow Cytometry in Multiple Myeloma: Impact on Outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *J Clin Oncol* 2013;31(20):2540–7.  
DOI: 10.1200/jco.2012.46.2119.  
PMID: 23733781.
  53. Roussel M., Lauwers-Cances V., Robillard N. et al. Front-Line Transplantation Program With Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone Combination As Induction and Consolidation Followed by Lenalidomide Maintenance in Patients With Multiple Myeloma: A Phase II Study by the Intergroupe Francophone du Myelome. *J Clin Oncol* 2014; 32(25):2712–7.  
DOI: 10.1200/jco.2013.54.8164.  
PMID: 25024076.