

Исследование минимальной остаточной болезни методом многоцветной проточной цитофлуориметрии у больных множественной миеломой после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток

И.В. Гальцева, Л.П. Менделеева, Ю.О. Давыдова, М.В. Соловьев, Н.М. Капранов,
Л.А. Кузьмина, Е.О. Грибанова, Т.В. Гапонова, В.Г. Савченко

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

Контакты: Ирина Владимировна Гальцева irinagaltseva@gmail.com

В связи с внедрением высокодозной химиотерапии с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) в схемы лечения множественной миеломы (ММ) увеличилась частота достижения полной ремиссии, а также общая и безрецидивная выживаемость. Однако количество рецидивов ММ остается высоким, что связано с персистенцией остаточных опухолевых клеток, т.е. с наличием минимальной остаточной болезни (МОБ). Одним из методов диагностики МОБ является многоцветная проточная цитофлуориметрия (МПЦ), позволяющая определять миеломные плазматические клетки (ПК) в костном мозге по их аномально экспрессирующимся антигенам.

Целью нашего исследования было определение МОБ методом МПЦ до и после аутоТГСК, частоты достижения МОБ-негативного статуса в период полной ремиссии (ПР) на +100-й день после аутоТГСК, анализ частоты встречаемости аномальной экспрессии ряда антигенов на миеломных клетках. В исследование были включены 40 пациентов с ММ в ПР на +100-й день после аутоТГСК. Показано, что наиболее часто встречающимися aberrациями ПК были: аномальное отсутствие CD19 и CD27, сниженная экспрессия CD38 и аномальное наличие CD56. Было установлено достоверное снижение доли аномальных ПК после аутоТГСК: еще 20 % пациентов приобрели МОБ-негативный статус, у 10 % отмечено снижение количества аномальных ПК в среднем на порядок. Данные анализа вероятности развития иммунохимического рецидива показали, что самый плохой прогноз был у пациентов с МОБ-позитивным статусом до и после проведения аутоТГСК. В ходе мониторинга МОБ в течение 3–18 мес были выявлены иммунофенотипические рецидивы с последующим развитием рецидива иммунохимического. Исследование МОБ в динамике является более информативным, чем исследование на одном этапе терапии, что может способствовать выбору более адекватной тактики лечения множественной миеломы в каждом конкретном случае.

Ключевые слова: множественная миелома, минимальная остаточная болезнь, проточная цитофлуориметрия

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-2-62-69

Study of minimal residual disease by multicolor flow cytometry in multiple myeloma after autologous hematopoietic stem cell transplantation

I.V. Galtseva, L.P. Mendeleeva, Y.O. Davydova, M.V. Solov'ev, N.M. Kapranov,
L.A. Kuzmina, E.O. Gribanova, T.V. Gaponova, V.G. Savchenko

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

The frequency of achieving complete remission, as well as overall and disease-free survival, in multiple myeloma (MM) had increased due to introduction in MM treatment regimens of high-dose chemotherapy with following autologous hematopoietic stem cell transplantation (ASCT). However the number of relapses remains high, caused by persistence of residual tumor cells, i.e., the presence of minimal residual disease (MRD). One of the methods for MRD study is multicolor flow cytometry (MFC) where abnormal expression of surface antigens on myeloma plasma cells (PC) is determined. The aim of our study was to investigate the MRD by MFC before and after ASCT, the frequency of MRD-negative status achievement in complete remission (CR) patients at +100 days after ASCT and the frequency of abnormal expressed antigens on myeloma plasma cells. The study included 40 MM patients in CR at +100 days after ASCT and showed that the most common aberrations of PC were: abnormal absence of CD19 and/or CD27, decreased expression of CD38 and abnormal presence of CD56. The proportion of myeloma PCs from all bone marrow cells decreased significantly after ASCT: 20 % of patients acquired MRD-negative status, 10 % had a decrease in the number of abnormal PCs by one fold. Analysis of probability of immunochemical relapse showed that the worst prognosis was in patients with MRD-positive status before and after ASCT. During the MRD monitoring within 3-18 months, MRD-relapses were detected with the subsequent development of immunochemical relapse. The detection MRD in the dynamics is more informative than the study at only one step of therapy. It may help to select more adequate treatment for patient with multiple myeloma in each specific case.

Keywords: multiple myeloma, minimal residual disease, flow cytometry

Введение

Множественная миелома (ММ) — опухолевое заболевание кроветворной ткани, характеризующееся клональной пролиферацией аномальных плазматических клеток (ПК) в костном мозге (КМ) и/или экстрамедуллярных очагах и секрецией моноклонального парапротеина. ММ составляет приблизительно 1 % среди всех злокачественных и 13 % среди гемопоэтических опухолей. В 2011 г. Международная рабочая группа по множественной миеломе сформулировала критерии для оценки ответа на терапию на основании количества ПК в пунктате КМ, наличия моноклональных иммуноглобулинов в сыворотке периферической крови и моче, соотношения свободных легких цепей (СЛЦ), характеристики остаточных очагов, определяемых с помощью компьютерной томографии (КТ) [1–3].

В процессе лечения ММ оптимальным является достижение полной ремиссии (ПР): количество ПК в КМ менее 5 %, отсутствие моноклональных парапротеинов в сыворотке периферической крови и моче, нормализация соотношения СЛЦ, отсутствие экстрамедуллярных очагов, установленное методом КТ [3]. В связи с внедрением в протоколы терапии новых эффективных лекарственных препаратов, таких как бортезомиб, талидомид, леналидомид, а также с проведением высокодозной химиотерапии (ВДХТ) с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) увеличилась частота достижения ПР. Несмотря на это, количество рецидивов при ММ остается высоким, что связано с сохранением небольшого количества остаточных опухолевых клеток, не выявляемых рутинным морфологическим методом. Это состояние называется минимальной остаточной болезнью (МОБ).

Диагностика МОБ осуществляется высокотехнологичными методами, такими как многоцветная (не менее чем 6-цветная) проточная цитофлуориметрия (МПЦ), аллель-специфичная ПЦР и секвенирование, с чувствительностью исследования до 10^{-5} – 10^{-6} . В 2011 г. Международной рабочей группой по миеломе введено понятие иммунофенотипической ремиссии, которая устанавливается в период ПР и определяется как отсутствие аномальных ПК среди 1 млн и более проанализированных клеток КМ методом МПЦ. Основой выявления МОБ с помощью метода МПЦ является определение аномального иммунофенотипа миеломных ПК. Аномальный иммунофенотип — это сочетание экспрессии определенных маркеров дифференцировки (CD — clusters of differentiation), не характерное для нормальных ПК, но определяемое на миеломных ПК [4–7]. В 2016 г. Международной рабочей группой по множественной миеломе обращено внимание на необходимость сочетания поиска опухолевых клеток в КМ или крови с применением высокочувствительных методов (МПЦ или секвенирование нового поколения — СНП) и остаточных

очагов поражения с помощью визуализирующих методов: позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и ПЭТ/КТ. Введены следующие понятия:

1) устойчивый МОБ-негативный статус (отсутствие МОБ, подтвержденное методами МПЦ и / или) СНП и визуализирующими методами в течение как минимум 1 года);

2) МОБ-негативность, определяемая методами МПЦ и СНП с чувствительностью 10^{-5} или выше;

3) МОБ-негативность, определенная методами МПЦ и / или СНП, и исчезновение очагов поражения, подтвержденное методами ПЭТ-КТ [8].

Важным этапом консолидации ремиссии является ВДХТ с последующей аутоТГСК, приводящая к повышению общей и безрецидивной выживаемости у больных с ММ.

Цель нашего исследования — определение МОБ методом МПЦ у пациентов с ММ до и после аутоТГСК, а также определение частоты достижения МОБ-негативного статуса у пациентов в период ПР после аутоТГСК на +100-й день и анализ частоты встречаемости аномальной экспрессии ряда антигенов на миеломных ПК.

Материалы и методы

Пациенты. В исследование, проведенное на базе ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, были включены 40 пациентов с подтвержденной ММ, которые получали терапию бортезомиб-содержащими курсами. Мобилизация гемопоэтических стволовых клеток крови проводилась циклофосфаном в дозе 4 г/м² с последующим введением гранулоцитарного колониестимулирующего ростового фактора в дозе 5 мг/кг/сут. Режим кондиционирования (ВДХТ) перед аутоТГСК включал мелфалан (200 мг/м²). У всех пациентов (18 мужчин и 22 женщины в возрасте от 35 до 66 лет с медианой возраста 55 лет) была достигнута ПР на +100-й день после аутоТГСК: отсутствие секреции моноклонального парапротеина в моче и сыворотке, нормализованное соотношение СЛЦ, отсутствие внекостномозговых компонентов и менее 5 % ПК в КМ. У каждого пациента исследовали МОБ методом МПЦ в пунктате КМ, проводили иммунохимическое исследование мочи и сыворотки периферической крови до аутоТГСК, через 100 дней после аутоТГСК, а также через каждые последующие 3 мес.

Иммунохимическое исследование. Включало электрофоретическое исследование белков с иммунофиксацией и количественное определение СЛЦ методом Freelite. Иммунохимическим рецидивом считали любое количество вновь определяемого моноклонального парапротеина в сыворотке или моче.

Проточная цитофлуориметрия. К пунктату КМ объемом 0,5 мл добавляли 4,5 мл разведенного 1:10 раствора, лизирующего эритроциты, PharmLyse (BD Biosciences, США) и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Клетки осаждали цент-

рифугированием при 400g в течение 3 мин 30 с, затем отмывали в растворе CellWash (BD Biosciences, США). Для окрашивания моноклональными антителами в пробирки отбирали не менее (3×10^6) клеток. Использовали следующие моноклональные антитела (меченные флуорохромными красителями, все – производства BD Biosciences) к антигенам: CD38 FITC (клон HIT2), CD138 PE (клон Mi15), CD19 PerCP-Cy5.5 (клон J21C1), CD45 APC-Cy7 (клон 2D1), CD56 PE-Cy7 (клон NCAM16.2), CD27 APC (клон L128), CD28 APC (клон CD28.2). Инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте, от несвязавшихся антител отмывали раствором CellWash. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD Biosciences, США).

Цитометрический анализ. Для достижения максимальной чувствительности (0,001 %) осуществляли сбор (2×10^6) событий. Цитометрический анализ включал 2 этапа: 1) идентификацию всей популяции ПК в образце по экспрессии на поверхности клеток CD38, CD138, CD45 и параметрам прямого и бокового светорассеяния; 2) дифференциацию миеломных ПК от нормальных. Миеломными считали ПК, на которых обнаруживали не менее 2 признаков аномальной экспрессии антигенов: отсутствие CD19 или CD45, сниженную экспрессию CD38, наличие CD56 или CD28, отсутствие или сниженную экспрессию CD27 [7].

Анализ, в котором не удалось найти популяцию аномальных ПК из 20 и более клеток и при отсутствии признаков значительного разведения КМ периферической кровью, считали отрицательным. Положительным анализ признавали в случае, когда обнаруживалась популяция аномальных ПК из 20 и более событий. В этом случае подсчитывалась доля (%) аномальных ПК от всех клеток КМ, выделенных по показателям прямого и бокового светорассеяния, а не от всех CD45-положительных событий (лейкоцитов). Данный способ был выбран в связи с наличием в КМ CD45-негативных ядросодержащих клеток – эритрокариоцитов, учет которых необходим для адекватной количественной оценки МОБ.

Статистический анализ. Проводился с помощью программного дополнения XLSTAT для Microsoft Excel. Для проверки достоверности различий между выборками парных измерений применяли критерий Вилкоксона. Построение кривых выживаемости осуществляли методом Каплана–Майера.

Результаты

За основу была взята тактика 6-цветного проточно-цитометрического анализа [7], примеры которого приведены на рис. 1. Не всегда анализ был простым, так как имеются особенности экспрессии определенных антигенов (CD19, CD56, CD27, CD45, CD38 и CD28) на поверхности нормальных и миеломных ПК. Популяция нормальных ПК гетерогенна и среди

этих клеток могут встречаться субпопуляции с отсутствием CD19, наличием CD56 или CD28, что затрудняет дифференцировку нормальных и миеломных ПК. В таких случаях использовались дополнительные маркеры CD45, CD38 и CD27.

Проведен анализ частоты встречаемости аномально экспрессирующихся антигенов: aberrантное отсутствие CD19 было отмечено в 100 % случаев, CD45 не присутствовал на миеломных ПК в 86 %, CD56 экспрессировался в 66 % случаев, сниженная экспрессия CD38 отмечена в 65 % случаев. Аномальная экспрессия CD28 обнаруживалась в 45 % случаев, а аномальное отсутствие или сниженная экспрессия CD27 – в 73 % случаев (рис. 2).

До проведения ВДХТ у 18 (45 %) из 40 пациентов, у которых была подтверждена ПР на +100-й день после аутоТГСК, МОБ не выявлялась, у 22 (55 %) определялись аномальные ПК в количестве 0,003–2,3 % (медиана – 0,016 %) от всех ядросодержащих клеток. После аутоТГСК на +100-й день МОБ-негативный статус зафиксирован у 25 (62,5 %) из 40 пациентов, аномальные ПК определялись у 15 (37,5 %) пациентов в количестве 0,001–0,192 % (медиана – 0,008 %).

У 17 из 18 пациентов после проведения аутоТГСК сохранился МОБ-негативный статус, и только у 1 пациента были обнаружены миеломные клетки в количестве 0,001 % от ядросодержащих клеток. Еще 8 пациентов приобрели МОБ-негативный статус на +100-й день после аутоТГСК. У 10 пациентов доля миеломных клеток уменьшилась после аутоТГСК в 2–64 раза (в среднем в 13 раз). У 4 пациентов количество аномальных ПК не изменилось после аутоТГСК и составило от 0,004 % до 0,1 % (табл. 1). С использованием критерия Вилкоксона была подтверждена гипотеза об уменьшении количества аномальных ПК после проведения ВДХТ с аутоТГСК ($p = 0,002$).

Динамический мониторинг МОБ с частотой в 3 мес проведен у 36 из 40 пациентов. У 4 пациентов была исследована МОБ методом МПЦ только через 100 дней после проведения аутоТГСК. У 5 пациентов наблюдение длилось 3 мес, у 11 – 6 мес, у 8 – 9 мес, у 4 – 12 мес, у 3 – 15 мес и у 5 – 18 мес (табл. 2).

В период мониторинга МОБ был обнаружен иммунофенотипический рецидив у 7 (35,3 %) из 17 пациентов с МОБ-негативным статусом до и после аутоТГСК на +100-й день. Также иммунофенотипический рецидив обнаружился у 2 (25 %) из 8 пациентов, достигших МОБ-негативного статуса после проведения аутоТГСК на +100-й день (до аутоТГСК у данной группы пациентов выявлялись аномальные ПК). У 3 из этих 9 пациентов с иммунофенотипическим рецидивом подтвердили иммунохимический рецидив.

У 2 пациентов не было выявлено аномальных ПК ни на одном из этапов мониторинга МОБ после аутоТГСК, но был зафиксирован иммунохимический рецидив через 3 и 12 мес после проведения аутоТГСК.

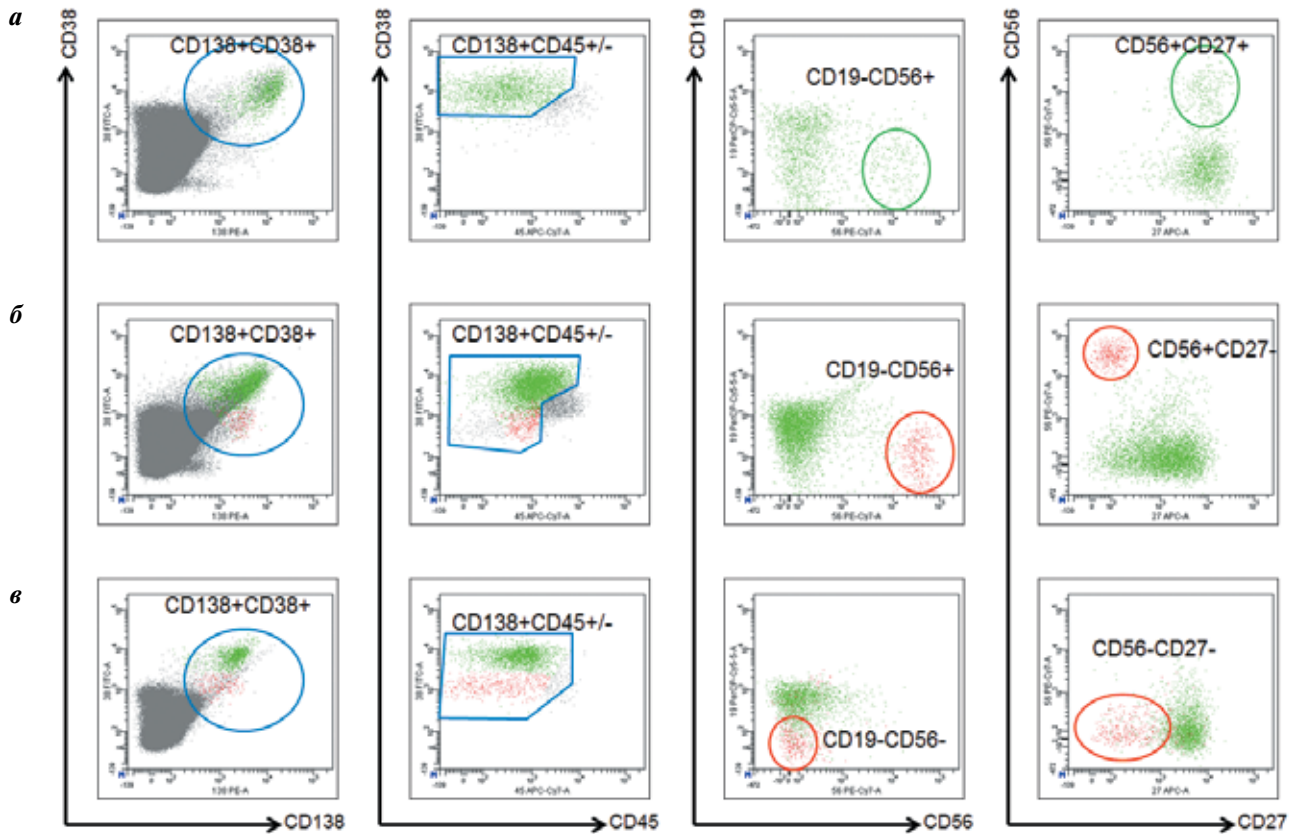


Рис. 1. Примеры точечных диаграмм цитометрического анализа плазматических клеток (ПК): а – ПК здорового донора. Диаграммы CD38 vs CD138 и CD38 vs CD45 используются для четкого отделения ПК от других клеток. На диаграммах CD19 vs CD56 и CD56 vs CD27 большинство нормальных ПК имеют иммунофенотип CD19⁻CD56⁻CD27⁺ и небольшие субпопуляции CD19⁻, CD56⁺ и CD27⁻; б – пример выявления у пациента с множественной миеломой аномальных ПК (выделены красным цветом) с иммунофенотипом CD19⁻CD56⁺CD27⁻ со сниженной экспрессией CD38 и положительной экспрессией CD45; в – пример выявления миеломных ПК (выделены красным цветом) с иммунофенотипом CD19⁻CD56⁻CD27⁻ со сниженной экспрессией CD38 и гетерогенной экспрессией CD45

Fig. 1. Examples of cytometric point diagrams of plasma cells (PC): а – PCs of a healthy donor. Diagrams CD38 vs CD138 and CD38 vs CD45 are used to clearly separate the PC from other cells. The CD19 vs CD56 and CD56 vs CD27 diagrams show that most normal PCs have CD19⁻CD56⁻CD27⁺ immunophenotype, but there are small subpopulations of CD19⁻, CD56⁺ and CD27⁻; б – an example of anomalous PC in MM patient (red) with CD19⁻CD56⁺CD27⁻ immunophenotype with reduced CD38 expression and positive CD45 expression; в – an example of myeloma PCs (red) with CD19⁻CD56⁻CD27⁻ immunophenotype with reduced CD38 expression and heterogeneous CD45 expression

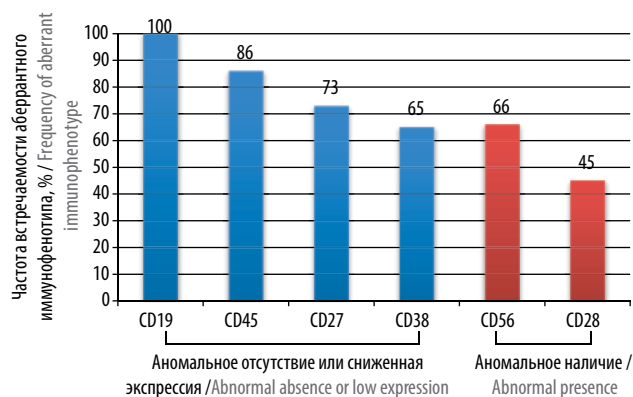


Рис. 2. Частота встречаемости аномально-экспрессирующихся антигенов на миеломных плазматических клетках

Fig. 2. Frequency of anomalous-expressed antigens on myeloma plasma cells

На этих же этапах диагностики у данных пациентов методом КТ был определен новый очаг специфического поражения.

В группе пациентов ($n = 15$), у которых МОБ определялась на +100-й день после аутоТГСК, в период динамического исследования МОБ отмечалось постепенное нарастание доли аномальных ПК. Впоследствии иммунохимический рецидив обнаружили в течение 3–12 мес у 5 пациентов.

Выполнены исследования МОБ у 31 больного на следующих этапах мониторинга: до аутоТГСК, на +100-й день, через 3 и 6 мес после аутоТГСК (рис. 3). Среди них были: 15 пациентов с МОБ-негативным статусом до и после аутоТГСК, 5 пациентов, достигших МОБ-негативного статуса после аутоТГСК, и 10 пациентов, у которых аномальные ПК выявлялись до и после аутоТГСК. После проведения аутоТГСК доля аномальных ПК на +100-й день статистически значимо снижалась ($p = 0,0021$), но в период дальнейшего наблюдения отмечалось постепенное нарастание доли аномальных ПК ($p = 0,0134$).

Динамика изменения доли аномальных ПК не у всех 40 пациентов оказалась однонаправленной

Таблица 1. Распределение пациентов в зависимости от изменения количества аномальных плазматических клеток (ПК) на +100-й день после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) по сравнению с исследованием до аутоТГСК

Table 1. The distribution of patients, depending on the number of abnormal plasma cells (PCs) at day +100 after autologous hematopoietic stem cells transplantation (ASCT), compared with the number before ASCT

МОБ на +100-й день после аутоТГСК MRD on day +100 after ASCT	МОБ до аутоТГСК MRD before ASCT	
	МОБ ⁺ , n = 22 MRD ⁺ , n = 22	МОБ ⁻ , n = 18 MRD ⁻ , n = 18
МОБ ⁺ , n = 15 MRD ⁺ , n = 15	14 В том числе: МОБ↓ – 10 МОБconst – 4 14 Of them: MRD↓ – 10 MRDconst – 4	1
МОБ ⁻ , n = 25 MRD ⁻ , n = 25	8	17

Примечание. Здесь и в табл. 2: МОБ – минимальная остаточная болезнь, МОБ⁺ и МОБ⁻ – минимальная остаточная болезнь с позитивным и негативным статусом соответственно; МОБ↓ – количество аномальных ПК снизилось после аутоТГСК; МОБconst – количество аномальных ПК не изменилось после аутоТГСК.

Note. MRD – minimal residual disease, MRD⁺ and MRD⁻ – minimal residual disease with positive and negative status, respectively; MRD↓ – the number of abnormal PCs decreased after ASCT; MRDconst – the number of anomalous PCs did not change after ASCT

Таблица 2. Распределение пациентов по минимальной остаточной болезни (МОБ) при динамическом мониторинге на разных сроках наблюдения

Table 2. The distribution of patients according to minimal residual disease in dynamic monitoring during different periods of observation

Время проведения исследования Time of MRD detection	Число пациентов, n Number of patients, n	Число пациентов с МОБ, n (%) The number of patients with MRD, n (%)	
		МОБ ⁺ MRD ⁺	МОБ ⁻ MRD ⁻
До аутоТГСК Before ASCT	40	22 (55,0)	18 (45,0)
На +100-й день On day +100	40	15 (37,5)	25 (62,5)
Через 3 мес After 3 month	36	14 (38,9)	22 (61,1)
Через 6 мес After 6 month	31	11 (35,5)	20 (64,5)
Через 9 мес after 9 month	20	9 (45,0)	11 (55,0)
Через 12 мес After 12 month	12	6 (50,0)	6 (50,0)
Через 15 мес After 15 month	8	3 (37,5)	5 (62,5)
Через 18 мес After 18 month	5	3 (60,0)	2 (40,0)

Примечание. АутоТГСК – трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток.

Note. ASCT – autologous hematopoietic stem cells transplantation.

и равномерной. У 6 из них положительный МОБ-статус в следующей точке исследования сменился на негативный (у одного – на +3 мес, у четырех – на +6 мес и у одного – на +15 мес). У 3 из них в дальнейшем вновь была выявлена МОБ.

Также нами проведен анализ вероятности развития иммунохимического рецидива в зависимости от МОБ-статуса. Вероятность его развития была ниже в группе пациентов, у которых МОБ не выявлялась перед аутоТГСК (медиана не достигнута vs 476 дней в группе

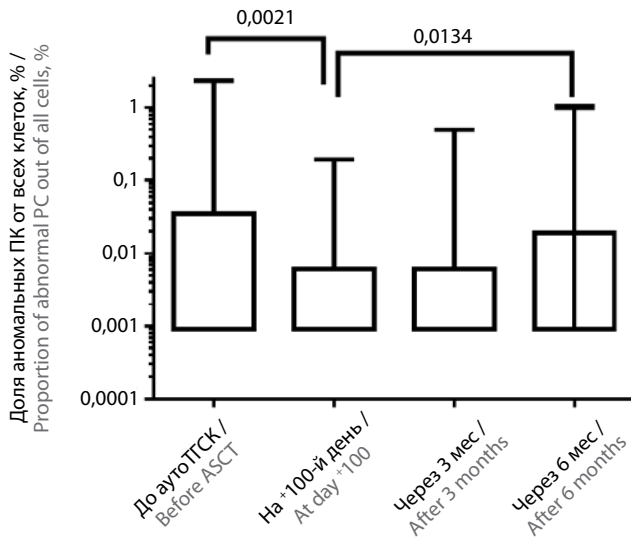


Рис. 3. Доля аномальных плазматических клеток (ПК) у 31 пациента до трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) и после нее на +100-й день и через 3 и 6 мес
Fig. 3. Proportion of abnormal plasma cells (PC) in 31 patients before autologous hematopoietic stem cells transplantation (ASCT), at day +100, 3 and 6 months after ASCT

МОБ⁺ перед аутоТГСК, $p = 0,0155$) (рис. 4а) или был МОБ-негативный статус на +100-й день после аутоТГСК (медиана не достигнута vs 517 дней в группе МОБ⁺ на +100-й день, $p = 0,0241$) (см. рис. 2б). Анализируя данные, мы выделили 3 группы пациентов: в I группе аномальных ПК не было ни до, ни после аутоТГСК; во II группе аномальные ПК выявлялись только до или только после аутоТГСК; в III группе имелся МОБ-позитивный статус до и после аутоТГСК. Представленные кривые свидетельствуют о том, что наибольшая вероятность развития иммунохимического рецидива была у пациентов с выявляемыми ПК до и после аутоТГСК (медианы в группах I и II не достигнуты vs 517 дней в группе III, $p = 0,0171$) (рис. 4в).

Обсуждение результатов

В процессе накопления опыта по оценке МОБ с помощью МПЦ были выбраны обязательные анти-

гены (CD38, CD138, CD45, CD19, CD56), включение которых в исследование является необходимым. С помощью данного набора маркеров можно обнаружить МОБ в 80 % случаев с чувствительностью до 0,01 % [7]. Однако нами было показано, что при исследовании КМ у пациентов с ПР доля выявляемых аномальных ПК часто ниже 0,01 %. У 8 из 15 пациентов с детектируемой МОБ на +100-й день после аутоТГСК доля аномальных ПК варьировала от 0,001 до 0,008 %, и только у 7 она составляла 0,01 % и выше. Очевидно, что детекция МОБ оптимальна при увеличении чувствительности хотя бы до 0,001 %, однако это ведет к тому, что начинают определяться нормальные ПК с иммунофенотипом, «имитирующим» миеломные ПК: CD45⁻, CD19⁻ и/или CD56⁺ (см. рис. 1а). Поэтому для сохранения специфичности и повышения достоверности результатов требуется исследование дополнительных маркеров на поверхности ПК, таких как CD27, CD28, CD117, CD20, CD81, CD200 и др.

Полученные нами данные о частоте встречаемости различных aberrаций экспрессии антигенов на остаточных аномальных ПК согласуются с данными зарубежных публикаций, в которых встречаются:

- сниженная экспрессия CD38 – в 80 % случаев (согласно нашим результатам, в 65 %),
- отсутствие CD19 и CD45 – соответственно в 96 и 80 % случаев (по нашим данным, в 100 и 86 %),
- экспрессия CD56 и CD28 – соответственно в 60–75 и 15–45 % случаев (по нашим данным, в 66 и 45 %),
- отсутствие CD27 – в 40–68 % случаев (по нашим данным, в 73 %) [9].

В 2014–2015 гг. в качестве дополнительного маркера для отличия нормальных ПК от миеломных нами был выбран маркер CD28. Однако в международных рекомендациях по диагностике МОБ при ММ, опубликованных в 2015 г. [7], маркер CD28 не применялся, но при этом обязательным для исследования был антиген CD27, поэтому в 2016 г. мы изменили панель моноклональных антител и заменили анти-CD28 на анти-CD27.

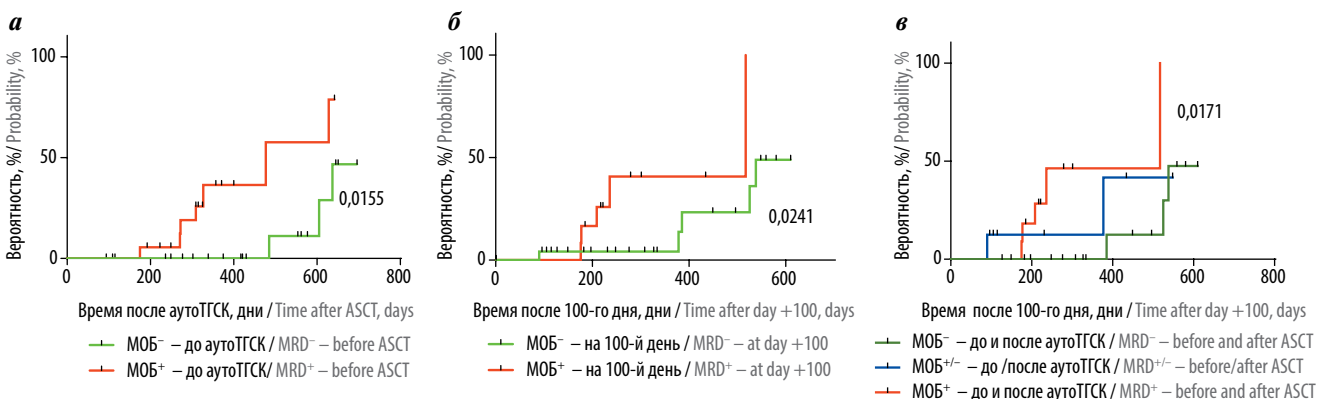


Рис. 4. Вероятность развития иммунохимического рецидива в зависимости от наличия минимальной остаточной болезни: а – до трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК), б – на +100-й день после аутоТГСК; в – до и после аутоТГСК
Fig. 4. Probability of immunochemical relapse development depending on the presence of MRD: а – before autologous hematopoietic stem cells transplantation (ASCT), б – on day+100 after ASCT, в – before and after ASCT

По нашим данным, аберрантная экспрессия CD27 встречалась чаще по сравнению с CD28 (73 % vs 45 % соответственно). Кроме того, CD28 встречается и на ПК здоровых доноров, что увеличивает риск получения ложноположительных результатов. В КМ здоровых доноров часто могут быть обнаружены ПК, соэкспрессирующие CD28 и CD56, но экспрессии CD56 на ПК с отсутствующей экспрессией CD27 в норме не встречается (см. рис. 1а). Использование в качестве дополнительного маркера CD27 является более предпочтительным, чем CD28, так как он позволяет достовернее установить опухолевую природу ПК, особенно для миеломных ПК с отсутствием CD19 и наличием экспрессии CD56 (см. рис. 1б). При отсутствии экспрессии CD56 на миеломных клетках детектировать МОБ становится труднее, в этом случае помогает не только CD27, но и сниженная экспрессия CD38 на миеломных ПК по сравнению с нормальными ПК (см. рис. 1в). Но при наличии положительной экспрессии CD27 и / или CD38 дифференцировать малое количество миеломных клеток практически невозможно, для этого требуется исследование дополнительных маркеров, таких как CD81 и CD117, а также применение не менее чем 8-цветного проточного цитофлуориметра.

Основная часть нашей работы была посвящена исследованию МОБ после аутоТГСК и дальнейшему мониторингу МОБ у пациентов с ММ каждые 3 мес. Данные исследований S.Y. Kristinsson и соавт. [10] и S.K. Kumar и соавт. [11] показали, что проведение ВДХТ увеличивает частоту достижения ПР, удлиняет время до прогрессирования заболевания и общую выживаемость [3, 11].

В нашем исследовании было показано, что 8 (36,4 %) из 22 пациентов, у которых выявлялись аномальные ПК до аутоТГСК, достигли МОБ-негативного статуса на +100-й день после аутоТГСК, а у 10 (45,4 %) отмечено снижение доли аномальных ПК на порядок. Среди 18 больных, у которых аномальные ПК не выявлялись методом МПЦ до ВДХТ, 17 (94,4 %) пациентов сохранили МОБ-негативный статус после аутоТГСК на +100-й день.

Таким образом, доказано, что проведение ВДХТ с последующей аутоТГСК приводит к достоверному снижению доли аномальных ПК ($p = 0,002$), способствует достижению МОБ-негативного статуса или сохраняет его, если аномальные ПК не выявлялись до проведения ВДХТ.

В ходе динамического мониторинга МОБ установлено, что у пациентов с выявленной МОБ после аутоТГСК (на +100-й день) отмечалось постепенное увеличение доли аномальных ПК с течением времени, у 5 из них впоследствии развился иммунохимический рецидив. У 8 из 25 пациентов с МОБ-негативным статусом на +100-й день после аутоТГСК (независимо от наличия МОБ до ВДХТ) появились аномальные ПК, причем у 3 из этих 8 также подтвердился рецидив секреции патологического парапротеина. Мониторинг

МОБ помогает оценить динамику опухолевой популяции, что позволяет использовать данный подход как дополнительный фактор, влияющий на принятие решения о проведении поддерживающей терапии после аутоТГСК.

В период всего наблюдения МОБ не выявлялась у 2 пациентов, однако возник рецидив секреции моноклонального парапротеина. Вероятно, это было связано с тем, что у них развились новые специфические очаги поражения, подтвержденные данными КТ. Возникновение и сохранение внекостномозговых очагов поражения является ограничением применения метода МПЦ для оценки МОБ, так как материалом для исследования служит пунктат КМ. Поэтому целесообразно периодическое обследование пациентов визуализирующими методами, такими как КТ, ПЭТ или МРТ. При применении этих методов будет возможно проведение «нацеленной» пункции и аспирации материала из очага поражения для подтверждения опухолевой природы клеток.

Таким образом, несмотря на то что выполнение аутоТГСК приводит к снижению доли аномальных миеломных ПК, с течением времени у ряда пациентов количество миеломных ПК постепенно увеличивается и развивается сначала иммунофенотипический, а затем и иммунохимический рецидив.

Сохранение аномальных ПК на всех этапах терапии является неблагоприятным фактором. В исследовании В. Paiva и соавт. [4] 5-летняя выживаемость без прогрессии была значимо выше (62 % vs 30 %, $p < 0,001$) в группе пациентов с МОБ-негативным статусом, достигнутым на +100-й день после аутоТГСК, по сравнению с теми пациентами, у которых МОБ выявлялась, при этом у всех пациентов была ПР. В этом же исследовании показана возможность применения МОБ-статуса до и после аутоТГСК в качестве фактора прогноза. Пациенты, у которых МОБ определялась и до, и после аутоТГСК, имели наихудший прогноз вследствие химиорезистентности (медиана выживаемости без прогрессии – 40 мес). МОБ-позитивные до аутоТГСК пациенты в случае приобретения МОБ-негативного статуса после аутоТГСК были отнесены к группе промежуточного риска (медиана выживаемости без прогрессии – 71 мес). Пациенты, которые достигли раннего ответа до аутоТГСК, у которых МОБ не выявлялись ни до аутоТГСК, ни после, имели благоприятный прогноз (медиана выживаемости без прогрессии не достигнута) [4]. Эти данные соотносятся с результатами, полученными в нашей работе. При анализе вероятности развития иммунохимического рецидива наихудший прогноз был в группе пациентов с МОБ-позитивным статусом до и после аутоТГСК.

У ряда (15 %) пациентов была обнаружена неравномерная динамика в изменении доли аномальных ПК: положительный МОБ-статус сменялся негативным и наоборот. Возможно, это было связано с тем,

что поражение КМ у данных пациентов было очаговым и результат исследования зависел от места, где была проведена пункция КМ. Известно также, что 2 из этих пациентов была проведена поддерживающая терапия (леналидомид или бортезомиб). Не исключено, что поддерживающая терапия также могла способствовать элиминации ранее обнаруживаемых миеломных ПК. Данные клинических исследований Medical Research Council Myeloma IX trial подтвердили, что поддерживающая терапия талидомидом помогла 28 % пациентов приобрести МОБ-негативный статус [12].

Заключение

Можно сказать, что высокочувствительный метод МПЦ позволяет детектировать миеломные клетки в КМ у пациентов, достигших ПР. Проведение ВДХТ

с последующей аутоТГСК способствует клиренсу опухолевой массы и сохранению МОБ-негативного статуса, который был достигнут у пациентов до аутоТГСК. По данным анализа вероятности развития иммунохимического рецидива, самый плохой прогноз был в группе пациентов с МОБ-позитивным статусом до и после аутоТГСК. Более полную информацию предоставляет динамическое исследование количества аномальных ПК на протяжении лечения. Введение визуализирующих методов исследования в стандартное обследование пациентов позволяет выявлять экстрамедуллярные поражения. Сочетание МПЦ и КТ или ПЭТ, или МРТ позволяет наиболее полно оценить глубину ответа на терапию. Результаты этих исследований могут способствовать выбору более адекватной тактики лечения ММ в каждом конкретном случае.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Менделеева Л.П., Вотякова О.М., Покровская О.С. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению множественной миеломы. Гематология и трансфузиология 2016;61(2):1–24. [Mendeleeva L.P., Votyakova O.M., Pokrovskaya O.S. et al. National clinical guidelines for the diagnosis and treatment of multiple myeloma. Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and transfusiology, 2016;61(2):1–24 (In Russ.)]. DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1.
2. 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):538–48. DOI: 10.1016/s1470-2045(14)70442-5. PMID: 25439696.
3. Покровская О.С., Менделеева Л.П., Урнова Е.С. и др. Мобилизация аутологичных гемопоэтических клеток с использованием высоких доз циклофосфана и Г-КСФ у больных множественной миеломой. Вестник гематологии 2009;5(2):33–4. [Pokrovskaya O.S., Mendeleeva L.P., Urnova E.A. et al. Autologous hematopoietic cells mobilization using high doses of cyclophosphamide and G-CSF in patients with multiple myeloma. Vestnik gematologii = Bulletin of Hematology, 2009;5(2):33–4 (In Russ.)].
4. 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.
5. 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 B Clin Cytom 2010;78(4):239–52. DOI:10.1002/cyto.b.20512. PMID: 20155853.
6. 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
7. Stetler-Stevenson M., Paiva B., Stoolman L. et al. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. Cytometry B Clin Cytom. 2015;90(1):26–30. DOI:10.1002/cyto.b.21249. PMID: 25907102
8. Rajkumar S.V. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. Am J Hematol 2016;91(7):719–34. DOI: 10.1002/ajh.24402. PMID: 27291302
9. 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 B Clin Cytom 2015;90(1):61–72. DOI:10.1002/cyto.b.21265. PMID: 26100534
10. Kristinsson S.Y., Landgren O., Dickman P.W. et al. Patterns of survival in multiple myeloma: a population-based study of patients diagnosed in Sweden from 1973 to 2003. J Clin Oncol 2007;25(15):1993–9. DOI: 10.1200/JCO.2006.09.0100. PMID: 17420512.
11. Kumar S. K., Rajkumar S.V., 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.
12. 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.