

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616-006.448-085.277.3]-07:616.419-018.1

Менделеева Л.П.¹, Ахундова Ф.М.², Наумова Е.В.³, Гальцева И.В.¹, Покровская О.С.¹,
Соловьев М.В.¹, Грибанова Е.О.¹, Кузьмина Л.А.¹, Паровичникова Е.Н.¹, Савченко В.Г.¹

ИММУНОФЕНОТИП ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ НА ФОНЕ ВЫСОКОДОЗНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ И ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

¹ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия;

²«Республиканская клиническая больница им. акад. М.А. Миркасимова» Минздрава Азербайджана,
AZ1122, г. Баку, Азербайджан;

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России,
125993, г. Москва, Россия

Цель работы – изучить иммунофенотип плазматических клеток костного мозга у больных множественной миеломой (ММ) до и после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) и определить частоту достижения отсутствия минимальной резидуальной болезни (МРБ)-негативности в результате проведенного лечения.

Материал и методы. Иммунофенотипирование плазматических клеток костного мозга выполнили 17 больным ММ в возрасте от 43 до 62 лет (медиана возраста 55 лет), с помощью 4-цветной проточной цитофлуориметрии на аппарате Cytomics FC 500 ("Beckman Coulter", США). В работе использовали панель моноклональных антител CD138/CD38/CD45/CD19/CD117/CD56. Всего было подсчитано 200 000–500 000 событий в исходном гейте по FS против SS, плазматические клетки выделяли в «гейте» CD138/CD38. МРБ-негативность определяли в случае достижения порогового значения менее 0,01%. Всего было проанализировано 37 образцов костного мозга от 17 больных. Иммунофенотипирование выполняли: до 1-й ауто-ТГСК, после 1-й ауто-ТГСК и после 2-й ауто-ТГСК.

Результаты и обсуждение. Во всех образцах костного мозга плазматические клетки характеризовались экспрессией обоих маркеров CD138/CD38, а также слабой экспрессией CD45 или ее отсутствием (CD45^{dim/neg}). Иммунофенотип плазматических клеток, представленный тремя маркерами CD19, CD117, CD56, изменялся на различных этапах лечения. При сравнении и анализе количественной экспрессии аберрантных маркеров перед и после 1-й ауто-ТГСК отмечалось статистически значимое их снижение (аберрантных плазматических клеток). У 6 (35,3%) из 17 больных удалось достичь МРБ-негативности после 1-й ауто-ТГСК. Иммунофенотипирование с помощью проточной цитофлуориметрии является высокочувствительным методом, позволяющим выявлять экспрессию аберрантных маркеров плазматических клеток, а также проследить их в динамике на фоне интенсивной терапии. В результате проведенного исследования была подтверждена эффективность высокодозной химиотерапии с последующей ауто-ТГСК. В процессе лечения выявлена гетерогенность аберрантной экспрессии плазматических клеток.

Ключевые слова: множественная миелома; иммунофенотипирование; проточная цитофлуориметрия; плазматические клетки; аберрантная экспрессия; трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток; минимальная резидуальная болезнь.

Для цитирования: Менделеева Л.П., Ахундова Ф.М., Наумова Е.В., Гальцева И.В., Покровская О.С., Соловьев М.В., Грибанова Е.О., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г. Иммунофенотип плазматических клеток костного мозга больных множественной миеломой на фоне высокодозной химиотерапии и после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток. *Гематология и трансфузиология*. 2017; 62(1): 4-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2017-62-1-4-8>

Mendeleeva L.P., Akhundova F.M., Naumova E.V., Galtseva I.V., Pokrovskaya O.S., Soloviev M.V.,
Gribanova E.O., Kuzmina L.A., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G.

IMMUNOPHENOTYPE OF BONE MARROW PLASMA CELLS IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA DURING HIGH-DOSE CHEMOTHERAPY AND AFTER AUTOLOGOUS STEM CELL TRANSPLANTATION

National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation;

Academician M.A. Mirgasimov Republic Clinical Hospital, Baku, AZ1122, Republic of Azerbaijan;

Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, 125993, Russian Federation

The aim of the study is to investigate the immunophenotype of bone marrow plasma cells in patients with multiple myeloma (MM) before and after the transplantation of autologous hematopoietic stem cells (autologous HSCT), and to assess response to the treatment determine the frequency of the lack of achievement of minimal residual disease (MRD) negativity as a result of the treatment.

Material and methods. Immunophenotyping of marrow plasma cells was performed in 17 MM patients aged from 43 to 62 years (median age 55 years). Four color flow cytometry (Cytomics FC unit 500, "Beckman Coulter", USA) and the panel of monoclonal antibodies CD138/CD38/CD45/CD19/CD117/CD56 were used. In total, there were estimated 200,000–500,000 events in the initial Gate for forward scatter (FS) vs side scatter (SS). Plasma cells were isolated in Gate CD138/CD38. MRD-negativity was determined as the

achievement of threshold value less than 0.01%. 37 bone marrow samples from 17 patients were analyzed. Immunophenotyping was performed before the 1st autologous HSCT, after the 1st autologous HSCT and after the 2nd autologous HSCT.

Results and discussion. In all samples bone marrow plasma cells were characterized by the expression of both CD138/CD38 markers and weak expression or absence of expression of CD45 (CD45^{dim/neg}). The immunophenotype of plasma cells was presented by three markers CD19, CD117, CD56 and varied at different stages of the treatment. The analysis of the quantitative expression of aberrant markers before and after the 1st autologous HSCT revealed a statistically significant reduction of aberrant plasma cells. In 6 (35.3%) of 17 patients MRD-negativity was successfully achieved after the 1st autologous HSCT.

Conclusion. Immunophenotyping by flow cytometry is a highly sensitive method. It permit to detect the expression of aberrant markers of plasma cells, to obtain their changes during the therapy. The efficacy of high-dose chemotherapy with following autologous HSCT was confirmed. The heterogeneity of aberrant expression of plasma cells was found.

Key words: multiple myeloma; immunophenotyping; flow cytometry; plasma cells; aberrant expression; transplantation of autologous hematopoietic stem cells; Minimal residual disease.

For citation: Mendeleva L.P., Akhundova F.M., Naumova E.V., Galtseva I.V., Pokrovskaya O.S., Soloviev M.V., Gribanova E.O., Kuzmina L.A., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G. Immunophenotype of bone marrow plasma cells in patients with multiple myeloma during high-dose chemotherapy and after autologous stem cell transplantation. *Hematology and Transfusiology. Russian Journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2017; 62(1): 4-8. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2017-62-1-4-8>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 06 September 2016

Accepted 10 February 2017

В течение последних 10–15 лет в лечении множественной миеломы (ММ) достигнуты значимые положительные результаты. Этому способствовало углубленное изучение биологии заболевания, а также внедрение в клиническую практику высокодозных трансплантационных методик и новых лекарственных препаратов (ингибиторов протеасом, иммуномодуляторов, моноклональных антител), обладающих механизмом биологически направленного воздействия на опухолевые клетки.

Многоцентровые проспективные рандомизированные клинические исследования представили убедительные данные, подтверждающие возможность получения глубокого и длительного противоопухолевого ответа у больных ММ при использовании современных инновационных методов лечения. Применение трехпрепаратных схем на основе бортезомиба с последующей высокодозной химиотерапией и трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) у больных с впервые выявленной ММ обеспечивает 5-летнюю общую выживаемость (ОВ) и выживаемость без прогрессии (ВБП) 70 и 42% больным соответственно [1].

У больных ММ старшей возрастной группы, не являющихся кандидатами на ауто-ТГСК, применение схемы VMP (бортезомиб+мелфалан+преднизолон) сопровождается 46% вероятностью 5-летней ОВ [2], а при использовании леналидомида в сочетании с низкими дозами преднизолона вероят-

ность 2-летней ОВ может достигать 91% [3]. Более ранними работами было показано наличие четкой зависимости показателей выживаемости больных ММ от глубины достигнутого противоопухолевого ответа. ОВ и ВБП были статистически значимо выше у больных, достигших в результате специфической терапии полной ремиссии (ПР) или очень хорошей частичной ремиссии (ОХЧР), чем у больных с частичным ответом или стабилизацией заболевания [4–10].

Р. Кароог и соавт. [11] оценили влияние строгой ПР на показатели времени до прогрессии и ОВ у больных ММ после ауто-ТГСК. Оказалось, что вероятность 5-летней ОВ больных, достигших строгой ПР, равняется 91% по сравнению с 53% у больных без строгой ПР. Поскольку определение «строгая ПР» включало в себя, помимо стандартных критериев ПР, отсутствие клональных клеток в костном мозге, подтвержденное иммуногистохимическим или иммунофлуоресцентным методами [12], можно считать, что авторы определяли значение и влияние минимальной резидуальной болезни (МРБ) на результаты лечения ММ.

Используя метод проточной цитофлуориметрии, Н. Ли и соавт. [13] исследовали костный мозг 47 больных ММ до и после ауто-ТГСК. Целью исследования являлось обнаружение плазматических клеток с нормальным и aberrantным иммунофенотипом с последующим ретроспективным анализом зависимости результатов лечения от наличия резидуальных опухолевых клеток. С помощью 4-цветной проточной цитометрии были изучены плазматические клетки, которые экспрессировали CD38, CD45, CD56, CD19-антигены. Оказалось, что наиболее часто встречавшимся (у 51% больных) aberrantным иммунофенотипом был CD56⁺/CD45⁺/CD19⁻. При этом были выявлены статистически значимые различия ВБП больных в зависимости от содержания aberrantных плазматических клеток в костном мозге. Если у больных перед ауто-ТГСК количество клеток с aberrantным фенотипом было менее 1,8%, то 2-летняя ВБП была практически в 2 раза выше, чем у больных с количеством aberrantных клеток более 1,8% ($p = 0,017$). Однако показатели ОВ в этих двух группах больных не различались ($p = 0,081$).

А. Равстрон и соавт. [14] представили результаты исследования МРБ у 378 больных ММ. Методом мультипараметрической проточной цитометрии с использованием 6-цветной панели антител к антигенам CD138, CD45, CD38, CD19, CD56, CD27 был исследован костный мозг после завершения индукционного этапа лечения и после ауто-ТГСК. МРБ-негативный статус выявляли у 19% больных уже после индукционной терапии и у 62,2% больных после ауто-ТГСК. Авторы от-

Для корреспонденции:

Ахундова Фидан Мустафа кызы, врач-гематолог в отделении гематологии Республиканской клинической больницы им. акад. М.А. Миркасимова, AZ1122, г. Баку, Азербайджан. E-mail: rf-fina@yandex.ru.

For correspondence:

Akhundova F.M., MD, Doctor of the Hematology Department of Republican Clinical Hospital named after Academician M.A. Mirgasimov, Baku, AZ1122, Azerbaijan. E-mail: rf-fina@yandex.ru.

Information about authors:

Mendeleva L.P., <http://orcid.org/0000-0002-4966-8146>;
Akhundova F.M., <http://orcid.org/0000-0003-2892-5331>;
Naumova E.V., <http://orcid.org/0000-0001-5829-9138>;
Galtseva I.V., <http://orcid.org/0000-0002-8490-6066>;
Pokrovskaya O.S., <http://orcid.org/0000-0002-8657-4990>;
Soloviev M.V., <http://orcid.org/0000-0002-7944-6202>;
Gribanova E.O., <http://orcid.org/0000-0002-4155-7820>;
Kuzmina L.A., <http://orcid.org/0000-0001-6201-6276>;
Parovichnikova E.N., <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>;
Savchenko V.G., <http://orcid.org/0000-0001-8188-5557>

метили, что медиана как ВБП, так и ОВ была статистически значимо выше у больных, достигших в результате лечения МРБ-негативности: 28,6 мес против 15,5 мес (для ВБП; $p < 0,001$) и 80,6 мес против 59 мес (для ОВ; $p = 0,0183$). При этом наилучшие показатели ВБП (медиана 44,2 мес; $p < 0,001$) наблюдались у больных, которые достигли МРБ-негативности уже после индукционной терапии, в то время как различий в продолжительности ОВ в зависимости от времени достижения МРБ-негативности (до или после ауто-ТГСК) выявить не удалось ($p = 0,16$). Еще одно важное заключение сделали авторы: поддерживающая терапия талидомидом после ауто-ТГСК способствовала увеличению продолжительности ВБП только у тех больных, у которых после ауто-ТГСК сохранялся МРБ-позитивный статус, и среди них у 28% больных удалось достичь МРБ-негативности. Основываясь на представленных материалах, можно предположить, что МРБ-статус, определяемый до и после ауто-ТГСК, будет способствовать разработке индивидуализированной последовательной терапевтической тактики, а именно решению вопроса о проведении консолидирующей и/или поддерживающей терапии, ее длительности и выбору лекарственных препаратов.

Испанская группа GEM/PETHEMA [15], изучая МРБ-статус у больных ММ после ауто-ТГСК методом мультипараметрической проточной цитометрии, также подтвердила, что МРБ-негативность является наиболее важным прогностическим фактором для ВБП.

Британская группа MRC [16] в результате своих исследований пришла к заключению, что МРБ-статус у больных ММ обладает таким же прогностическим значением по отношению к ОВ, как и критерии, указанные в Международной системе стадирования (ISS) [17], за исключением цитогенетических маркеров, которые считаются самыми важными прогностическими факторами.

Современная методика оценки МРБ с использованием проточной цитометрии была разработана EuroFlow Консорциумом при поддержке Международной организации по изучению миеломы (International Myeloma Foundation) и является методом выбора для точного, высокочувствительного и автоматизированного мониторинга ММ. Согласовано, что для надежного выявления различий между нормальными и клональными костно-мозговыми плазматическими клетками необходимо одновременно учитывать как маркеры, идентифицирующие плазматические клетки (CD38/CD138), так и специфические маркеры CD19, CD27, CD45, CD56, CD81, CD117 [18].

В то же время следует учитывать, что иммунофенотип нормальных плазматических клеток характеризуется высокой гетерогенностью, обусловленной многоэтапным процессом их созревания.

Наиболее часто иммунофенотип нормальных плазматических клеток может быть представлен как CD38⁺bright, CD138⁺bright, CD19⁺, CD45⁺, CD20⁻, CD27⁺, CD28⁻, CD56⁻, CD81⁺, CD117⁻, CD200^{+/+}, поликлональное соотношение CyIgk/CyIgλ. В то же время небольшая часть (менее 30%) нормальных плазматических клеток может экспрессировать антигены CD19⁻, CD45^{-/low}, CD20⁺, CD27^{low}, CD28⁺, CD56⁺, CD200^{bright/low}. В противоположность aberrantный иммунофенотип опухолевых плазматических клеток может быть представлен многочисленными комбинациями следующих антигенов: CD38^{low/dim}, CD19⁻, CD45⁻, CD20⁺, CD27^{-/low}, CD28⁺, CD56^{+/bright}, CD81^{-/low}, CD117⁺, CD200^{bright} в ассоциации с моноклональным CyIgk или CyIgλ [19].

Общепринятая методика определения резидуальных опухолевых миеломных клеток с помощью мультипараметрической проточной цитометрии позволяет за короткое время одновременно идентифицировать и характеризовать большое количество плазматических клеток, базируясь на множестве параметров, а также произвести количественную оценку различных клеточных популяций и уровня экспрессии поверхностных и внутриклеточных антигенов.

Цель исследования – изучить иммунофенотип плазматических клеток костного мозга (КМ) у больных ММ до и после ауто-ТГСК и определить частоту достижения МРБ-негативности в результате проведенного лечения.

Материал и методы

Пациенты, вошедшие в исследование, проходили лечение в научно-клиническом отделении химиотерапии гемобластозов и трансплантации костного мозга ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России (Москва) в период с октября 2009 г. по сентябрь 2012 г. В исследование включены 17 больных ММ (6 мужчин и 11 женщин) в возрасте от 43 до 62 лет (медиана возраста 55 лет, квартильный разброс 6 лет). Диагноз множественной миеломы устанавливали в соответствии с критериями, разработанными Международной рабочей группой по изучению миеломы (IMWG, 2014) [20]. Индукционную терапию проводили бортезомибосодержащими курсами. При недостаточном противоопухолевом ответе применяли схемы, включавшие леналидомид, мелфалан. Различия в схемах индукционной терапии были обусловлены чувствительностью опухоли к препаратам, а также тем, что большинство больных получали индукционную терапию в других лечебных учреждениях Москвы и городов России.

После завершения индукционного этапа лечения всем больным выполняли мобилизацию циклофосфаном + гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (ЦФ + Г-КСФ) и сбор стволовых клеток крови. Через 2–6 мес после мобилизации была выполнена высокодозная химиотерапия с использованием мелфалана в дозе 200 мг/м² с последующей однократной ($n = 13$) или двойной ($n = 4$) трансплантацией ауто-ТГСК. Ответ на лечение оценивали в соответствии с критериями, разработанными IMWG (2016) [21]. После трансплантации 10 (58,8%) из 17 больных проводили поддерживающую терапию бортезомибом.

Исследование иммунофенотипа плазматических клеток выполняли методом 4-цветной проточной цитофлюориметрии на цитометре Cytomics FC500 (“Beckman Coulter”, США) на кафедре клинической лабораторной диагностики Российской медицинской академии последиplomного образования.

При иммунофенотипировании плазматических клеток использовали панель моноклональных антител (“Beckton Dickinson”) к антигенам CD138 FITC/CD38 PE/CD45 PC7/CD19 PerCP, CD138 FITC/CD38 PE/CD45 PC7/CD117 PerCP Cy5.5, CD138 FITC/CD38 PerCP-Cy 5.5/CD45 PC7/CD56 PE в соответствии с протоколом А. Rawston [22]. Материалом исследования являлся КМ объемом не менее 2 мл, стабилизированный К₂-ЭДТА. Всего было проанализировано 37 образцов КМ.

Исследование популяции плазматических клеток КМ было основано на последовательном гейтировании (гейт от англ. «gate» – ворота, т.е. введение логических ограничений в протокол исследования; под термином «гейтирование» мы понимаем зону анализа популяции клеток с заданными характеристиками) SS против FS, SS против CD45, «гейт» CD138/CD38, в котором оценивали экспрессию CD19, CD117, CD56. Было подсчитано от 200 000–500 000 событий, среди которых выявляли от 20 до 50 событий в «гейте» CD138⁺/CD38⁺. МРБ-негативность определяли в случае достижения порогового значения менее 0,01%.

Для анализа данных использовали программное обеспечение CXP Analysis, а для сбора данных – CXP Cytometer. Иммунофенотипирование плазматических клеток КМ выполняли после завершения индукционной терапии (перед 1-й ауто-ТГСК), через 2–8 мес после 1-й ауто-ТГСК и через 12–18 мес после 2-й трансплантации.

Статистическую обработку результатов проводили в программе Dell Statistica 13.1. Для связанных выборок использовали *t*-критерий, для подсчета медианы – критерий Вилкоксона.

Результаты

Во всех образцах КМ плазматические клетки характеризовались экспрессией обоих маркеров CD138/CD38, а также слабой экспрессией CD45 или ее отсутствием (CD45^{dim/neg-}).

Перед 1-й ауто-ТГСК иммунофенотип плазматических клеток у 9 (56,2%) из 16 больных характеризовался экспрессией всех трех маркеров CD19⁺/CD117⁺/CD56⁺. Только у 1 больного наблюдалось отсутствие экспрессии маркеров CD19/CD117/CD56.

Перед трансплантацией CD19⁺/CD117⁺/CD56⁺-иммунофенотип плазматических клеток был выявлен у 3 больных. Экспрессия двух маркеров и отсутствие одного маркера CD19⁺/CD117⁺/CD56⁺ наблюдалось у 3 больных (см. рисунок, а).

При исследовании КМ методом проточной цитофлюориметрии через 2–8 мес после 1-й ауто-ТГСК были отмечены некоторые изменения иммунофенотипа плазматических клеток.

Наиболее часто встречающимся иммунофенотипом как до, так и после 1-й трансплантации был фенотип CD19⁺/CD117⁺/CD56⁺, отмеченный у 8 (47%) из 17 больных. Отсутствие всех трех маркеров на этом этапе лечения наблюдалось у 5 (29%) из 17 больных. У 2 больных иммунофенотип плазматических клеток характеризовался экспрессией одного aberrантного маркера CD56 и отсутствием CD19 и CD117. Иммунофенотип плазматических клеток CD19⁺/CD117⁺/CD56⁺, определявшийся перед 1-й ауто-ТГСК, не был выявлен после трансплантации. Однако после 1-й трансплантации было отмечено появление двух новых разновидностей иммунофенотипа плазматических клеток CD19⁺/CD117⁺/CD56⁺ и CD19⁺/CD117⁺/CD56⁻, не определявшихся перед 1-й ауто-ТГСК, каждый из которых выявлялся у 1 больного (см. рисунок, б).

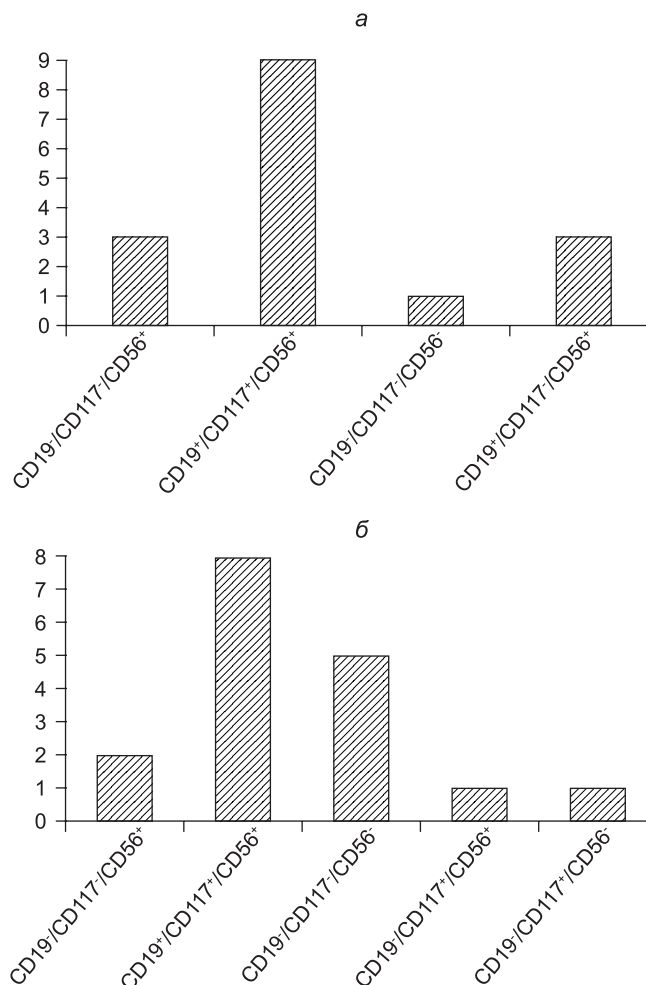
Поскольку экспрессия маркера CD19 может присутствовать или отсутствовать в популяции нормальных и опухолевых плазматических клеток [18], изучение изменений иммунофенотипа плазматических клеток в нашем исследовании основывалось на анализе сочетаний aberrантных маркеров CD117/CD56. В табл. 1 представлен иммунофенотип плазматических клеток до и после трансплантации у больных ММ. Перед 1-й ауто-ТГСК у 9 больных выявлялась экспрессия на плазматических клетках двух aberrантных маркеров CD117 и CD56, у 6 больных – экспрессия маркера CD56 и отсутствие CD117, у 1 больного – отсутствие обоих aberrантных маркеров CD117 и CD56. У 10 больных экспрессия aberrантных маркеров после 1-й трансплантации не менялась, однако у 6 больных отмечались изменения в их экспрессии (см. табл. 1). У 5 больных исчезла экспрессия CD56, у 2 больных утрачена экспрессия CD117, у 2 больных обнаружена вновь появившаяся экспрессия CD117.

Динамическое исследование иммунофенотипа плазматических клеток костного мозга через 12–18 мес после 2-й ауто-ТГСК выполнено только у 4 больных, из них у 3 не выявлено экспрессии ни одного из aberrантных маркеров (CD117/CD56), также отмечалось отсутствие экспрессии маркера CD19. Однако при исследовании перечисленных маркеров на предыдущих этапах лечения наблюдалась экспрессия одного или двух aberrантных маркеров в иммунофенотипе каждого больного, и только у 1 больной после 2-й трансплантации отмечалась экспрессия одного aberrантного маркера CD56 и отсутствие CD19 и 117, хотя на предыдущих этапах лечения (до и после 1-й ауто-ТГСК) иммунофенотип значимо различался и был представлен в виде CD19⁺/CD117⁺/CD56⁺ (см. табл. 1).

В табл. 2 представлены результаты подсчета процента плазматических клеток и aberrантных плазматических клеток костного мозга среди всех просчитанных событий. До 1-й ауто-ТГСК медиана и среднее содержание плазматических клеток (CD138⁺/CD38⁺) составило 0,8% и $0,827 \pm 0,148\%$, среди них aberrантные плазматические клетки составляли 92,1% (медиана) и $74,356 \pm 8,427\%$ (средняя). При этом aberrантные плазматические клетки в пересчете от всех событий составляли 0,4% (медиана) и $0,588 \pm 0,12\%$ (средняя). Лишь в одном случае по данным проточной цитофлуориметрии в результате индукционной терапии была достигнута МРБ-негативность.

После 1-й трансплантации все исследуемые показатели (общее количество плазматических клеток и количество aberrантных плазматических клеток) статистически значимо снизилось. Медиана и среднее содержание плазматических клеток (CD138⁺/CD38⁺) составило 0,43% и $0,559 \pm 0,116\%$ (средняя), среди них aberrантные плазматические клетки составили 26,32% (медиана) и $43,66 \pm 10,84\%$ (средняя). При этом aberrантные плазматические клетки в пересчете от всех событий составили 0,06% (медиана) и $0,339 \pm 0,134\%$ (средняя). У 6 больных ММ была отмечена МРБ-негативность.

Таким образом, метод проточной цитофлуориметрии является высокочувствительным, позволяю-



Иммунофенотипическая характеристика плазматических клеток.

а – перед 1-й ауто-ТГСК; б – через 2–4 мес после 1-й ауто-ТГСК.

Таблица 1

Иммунофенотип плазматических клеток на различных этапах лечения

№ пациента	Иммунофенотипическая характеристика плазматических клеток		
	перед 1-й ауто-ТГСК	после 1-й ауто-ТГСК	после 2-й ауто-ТГСК
1	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁻	-
2	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁻	-
3	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	-
4	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	-
5	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	-
6	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	-
7	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	-
8	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁻	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁻
9	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁻	-
10	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁻
11	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	-
12	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁻
13	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺
14	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁻	-
15	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	-
16	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁻	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁻	-
17	-	CD19 ⁺ /CD117 ⁺ /CD56 ⁺	-

Примечание. Минус – исследование не проводили.

Таблица 2

Изменение содержания плазматических и aberrантных плазматических клеток в костном мозге после 1-й ауто-ТГСК

Исследуемый параметр	Количество ПК CD138 ⁺ /CD38 ⁺ от общего числа событий, %	Количество А-ПК от общего количества CD138 ⁺ /CD38 ⁺ , %	Количество А-ПК от общего количества событий, %
Перед 1-й ауто-ТГСК:			
разброс значений	0,2–2,06	13–100	0–1,47
$M \pm m$	0,827 $\pm$ 0,148	74,356 $\pm$ 8,427	0,588 $\pm$ 0,12
медиана (квартильный разброс)	0,8 (0,895)	92,1 (41,95)	0,4 (0,79)
После 1-й ауто-ТГСК:			
разброс значений	0,04–1,59	0–100	0–1,59
$M \pm m$	0,559 $\pm$ 0,116	43,66 $\pm$ 10,84	0,339 $\pm$ 0,134
медиана (квартильный разброс)	0,43 (0,57)	26,32 (100)	0,06 (0,43)
p (от $M \pm m$) (t -критерий для связанных выборок)	$p_1 = 0,0366$	$p_2 = 0,0075$	$p_3 = 0,0359$
p (от медианы) (критерий Вилкоксона)	$p_4 = 0,0245$	$p_5 = 0,0159$	$p_6 = 0,0468$

Примечание. ПК – плазматический клетки; А-ПК – aberrантные плазматические клетки.

щим не только выявлять наличие aberrантных плазматических клеток, но и проследивать их динамику на фоне интенсивной терапии. Результаты нашего исследования, полученные с помощью иммунофенотипирования, подтвердили значимый противоопухолевый эффект мелфалана в высоких дозах с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток. Кроме того, подтверждена выраженная гетерогенность фенотипа миеломных клеток, изменяющегося в процессе лечения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

- Покровская О.С., Менделеева Л.П., Урнова Е.С., Гапонова Т.В., Гальцева И.В., Кузьмина Л.А. и др. Роль полной и очень хорошей частичной ремиссии в сохранении выживаемости без признаков прогрессии после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток у больных множественной миеломой. *Гематология и трансфузиология*. 2012; 3(Прил.): 72.
- Покровская О.С., Менделеева Л.П., Капланская И.Б., Грибанова Е.О., Варламова Е.Ю., Обухова Т.Н. и др. Ангиогенез в костном мозге больных множественной миеломой на различных этапах высокодозной химиотерапии. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2010; 4: 347–53.

Остальные источники литературы см. в References.

REFERENCES

- Reed C.B., Reece D.E., Kukreti V., Mikhael J.R., Chen C., Trudel S., et al. Long-term with cyclophosphamide, bortezomib and dexamethasone induction therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 2014; 167(4): 563–5. doi: 10.1111/bjh.13004.
- San Miguel J.F., Schlag R., Khuageva N.K., Dimopoulos M.A., Shpilberg O., Kropff M., et al. Persistent overall survival benefit and no increased risk of second malignancies with bortezomib-melphalan prednisone versus melphalan-prednisone in patients with previously untreated multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31(4): 448–55. doi: 10.1200/JCO.2012.41.6180.
- Rajkumar S.V., Jacobus S., Callander N.S., Fonseca R., Vesole D.H., Williams M.E., et al. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomized controlled trial. *Lancet Oncol.* 2010; 11(1): 29–37. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70284-0.
- Alexanian R., Weber D., Giral S., Dimopoulos M., Delasalle K., Smith T., Champlin R. Impact of complete remission with intensive therapy in patients with responsive multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant.* 2001; 27(10): 1037–43.
- Alvares C.L., Davies F.E., Horton C., Patel G., Powles R., Sirohi B., et al. Long-term outcomes of previously untreated myeloma patients: responses to induction chemotherapy and high-dose melphalan incorporated within a risk stratification model can help to direct the use of novel treatments. *Br. J. Haematol.* 2005; 129(5): 607–14.
- O'Shea D., Giles C., Terpos E., Perz J., Politou M., Sana V., et al. Predictive factors for survival in myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation: a single-centre experience in 211 patients. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 37(8): 731–7.
- Krejci M., Buchler T., Hajek R., Svobodnik A., Krivanova A., Pour L., et al. Prognostic factors for survival after autologous transplantation: a single centre experience in 133 multiple myeloma patients. *Bone Marrow Transplant.* 2005; 35(2): 159–64. doi:10.1038/sj.bmt.1704728.
- Pokrovskaya O.S., Mendeleva L.P., Urnova E.S., Gaponova T.V., Galtseva I.V., Kuzmina L.A., et al. The role of complete and very good partial

- remission in preservation of progression free survival after autologous stem cell transplantation among multiple myeloma patients. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2012; 3(Suppl); 72 (abstr.). (in Russian)
- Pokrovskaya O.S., Mendeleva L.P., Kaplanskaya I.B., Griбанова E.O., Varlamova E.Yu., Obukhova T.N., et al. Bone marrow angiogenesis in patients with multiple myeloma in different phases of high-dose therapy. *Clinical oncohematology. Fundamental investigations and clinical practice. Russian journal (Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamentalnie issledovaniya i klinicheskaya praktika)*. 2010; 4: 347–53. (in Russian)
- Pokrovskaya O., Mendeleva L., Alekseeva I., Gaponova T., Urnova E., Griбанова E. Treatment of multiple myeloma with autologous stem cell transplantation: a long-term observation. *Bone Marrow Transplant.* 2011; 46(Suppl.1): P906 [poster]. Materials of the congress. http://www.congex.ch/2011/ebmt2011/pdf/ebmt2011_final_programme.pdf
- Kapoor P., Kumar S.K., Dispenzieri A., Lacy M.Q., Buadi F., Dingli D., et al. Importance of achieving stringent complete response after autologous stem-cell transplantation in multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31(36): 4529–35. doi: 10.1200/JCO.2013.49.0086.
- Kyle R.A., Rajkumar S.V. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2009; 23(1): 3–9. doi:10.1038/leu.2008.291.
- Liu H., Yuan C., Heinerich J., Braylan R., Chang M., Wingard J., Moreb J. Flow cytometric minimal residual disease monitoring in patients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: a retrospective study. *Leuk. Lymphoma*. 2008; 49(2): 306–14. doi: 10.1080/10428190701813018.
- Rawstron A.C., Child J.A., de Tute R.M., Davies F.E., Gregory W.M., Bell S.E., 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): 250–7. doi: 10.1200/JCO.2012.46.2119.
- Paiva B., Vidriales M.B., Cerveró J., Mateo G., Pérez J.J., Montalbán M.A., et al. GEM (Grupo Español de MM)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) Cooperative Study Groups. 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.
- Rawstron A.C., Gregory W.M., de Tute R.M., Davies F.E., Bell S.E., Drayson M.T., et al. Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: independent prediction of survival benefit per log reduction. *Blood*. 2015; 125(12): 1932–5. doi:10.1182/blood-2014-07-590166.
- Greipp P.R., San Miguel J., Durie B.G., Crowley J.J., Barlogie B., Bladé J., et al. International staging system for multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23(15): 3412–20.
- Paiva B., van Dongen J.J., Orfao A. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. *Blood*. 2015; 125(20): 3059–68. doi: 10.1182/blood-2014-11-568907.
- Arroz M., Came N., Lin P., Chen W., Yuan C., Lagoo A., et al. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2016; 90(1): 31–9. doi: 10.1002/cyto.b.21228.
- Rajkumar S.V., Dimopoulos M.A., Palumbo A., Blade J., Merlini G., Mateos M.V., 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.
- Kumar S., Paiva B., Anderson K.C., Durie B., Landgren O., Moreau P., et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2016; 17(8): e328–46. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30206-6.
- Rawstron A.C. Immunophenotyping of plasma cells. *Curr. Protoc. Cytom.* 2006; Ch. 6: Unit 6.23. OnLine. doi:10.1002/0471142956.cy0623s36.

Поступила 17.11.16

Принята к печати 10.02.17