

## **BADANIE CHOROBY RESZTKOWEJ U CHORYCH NA SZPICZAKA MNOGIEGO. CZ. II. ANALIZA MARKERÓW MOLEKULARNYCH**

MINIMAL RESIDUAL DISEASE ASSESSMENT IN MULTIPLE  
MYELOMA PATIENTS. PART II. MOLECULAR MARKERS ANALYSIS

Małgorzata ROKICKA, Tigran TOROSIAN

Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych AM w Warszawie

*Streszczenie:* Wprowadzenie nowoczesnych metod leczenia chorych na MM wiąże się z koniecznością poszukiwania lepszych technik oceny choroby resztkowej (MRD, ang. *minimal residual disease*) umożliwiających wczesne rozpoznanie i leczenie nawrotu choroby. Najczęściej stosuje się metody fenotypowania i cytometrii przepływowej oraz różne rodzaje ilościowego i jakościowego PCR. W artykule przedstawiono wady i zalety oraz zastosowanie kliniczne różnych metod badania MRD u chorych na MM.

*Słowa kluczowe:* szpiczak mnogi, choroba resztkowa, PCR, PCR w czasie rzeczywistym.

*Summary:* Introducing of the new methods of treatment of MM patients is connected with necessity of searching for more sophisticated methods of MRD evaluation and earlier diagnosis and treatment of relapse. The most often used methods are the fenotyping with flow cytometry and different types of qualitative and quantitative PCR. The merits and drawbacks of different method MRD evaluation are described.

*Key words:* Multiple myeloma, minimal residual disease, PCR, real time PCR.

### **WPROWADZENIE**

Szpiczak mnogi (MM, ang. *myeloma multiplex*) jest nowotworem, charakteryzującym się niekontrolowanym rozrostem plazmocytów. Choroba poddaje się leczeniu standardową chemioterapią, jednak niemożliwe jest za pomocą tej metody całkowite wyleczenie MM. Po leczeniu konwencjonalnym średni czas przeżycia chorych wynosi 30 miesięcy. Zastosowanie wysokodawkowanej chemioterapii wspomaganiej przeszczep-

pieniem autologicznych komórek macierzystych pozyskanych ze szpiku (ABMT z ang. *autologous bone marrow transplantation*) lub z krwi obwodowej (PBSCT z ang. *peripheral blood stem cell transplantation*) poprawiło wyniki leczenia – częściej udaje się uzyskać całkowitą remisję choroby, wydłużył się czas przeżycia chorych bez objawów choroby oraz czas ich całkowitego przeżycia. Jednak nadal nieuchronny jest nawrót choroby.

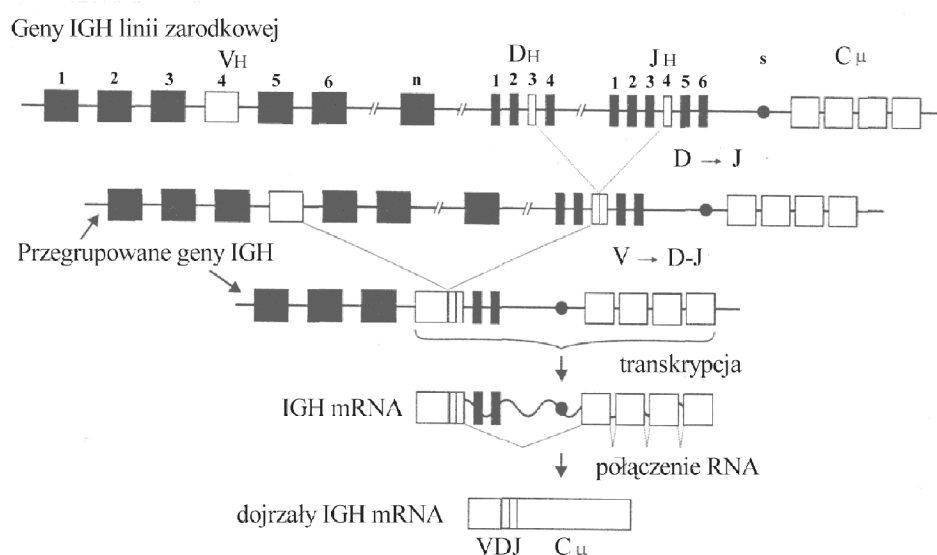
Postępy terapii MM stwarzają pilną potrzebę opracowania metod badania obecności MRD w celu monitorowania odpowiedzi na różne typy leczenia oraz analizy materiału przeszczepianego pod kątem zanieczyszczenia komórkami nowotworowymi. Badanie MRD może mieć również istotne znaczenie w poznaniu patofizjologii i biologii choroby.

### **ANALIZA MARKERÓW MOLEKULARNYCH. ZASTOSOWANIE JAKOŚCIOWEJ REAKCJI ŁAŃCUCHOWEJ POLIMERAZY (PCR) W BADANIU MRD U CHORYCH NA MM**

Układ odporności jest zdolny do rozpoznawania i odpowiedzi na szeroką gamę antygenów dzięki ogromnej zmienności przeciwciał produkowanych przez limfocyty B, a zwłaszcza różnorodności miejsc wiążących antygen w Ig. O swoistym rozpoznawaniu różnych antygenów decydują części zmienne łańcuchów ciężkich i lekkich Ig. Zróżnicowanie odpowiedzi immunologicznej jest pochodną rekombinacji genowych oraz ich dodatkowym przegrupowaniem w okresie transkrypcji materiału genetycznego.

Proces generowania zmienności przeciwciał jest niezwykle złożony. W okresie wczesnych etapów różnicowania komórek układu odpornościowego, każdy odcinek zmienny Ig jest kodowany przez dwa lub więcej segmenty genu, połączone ze sobą w procesie przegrupowania DNA kodującego Ig. Domena zmienna łańcucha Ig jest kodowana przez gen złożony z sekwencji dla części zmiennej (*V* ang. *variable*), różnorodności (*D* ang. *diversity*), i łączącej (*J* ang. *joining*). Proces rekombinacji genów dla łańcucha ciężkiego Ig zaczyna się od połączenia genu *D* z *J*, następnie jest przyłączany gen *V*. Uproszczony schemat organizacji genów dla Ig przedstawiono na rycinie 1. Dodatkowa modyfikacja budowy Ig zwiększająca jej różnorodność zachodzi między innymi poprzez: delecje niektórych nukleotydów w łańcuchu DNA, nieprecyzyjne łączenie się egzonów oraz dodawaniu na złączach VDJ sekwencji kilkunukleotydowych kodujących dodatkowe aminokwasy.

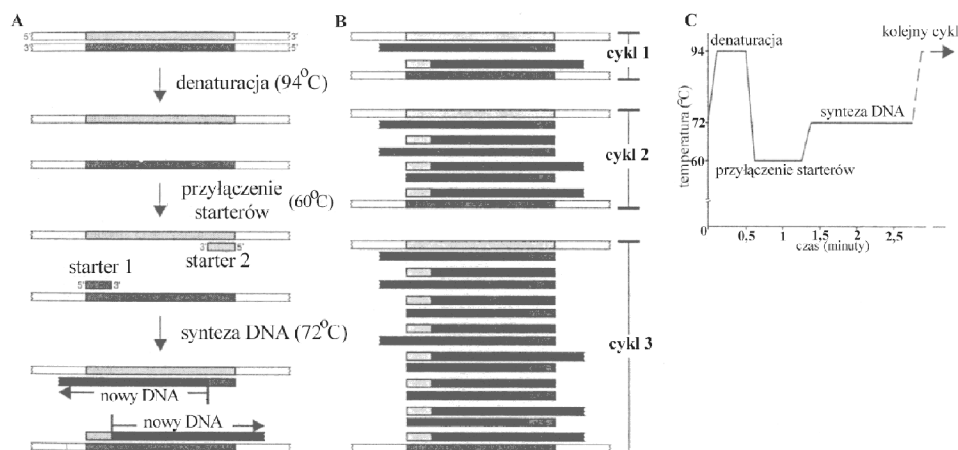
Repertuar swoistości Ig może być dodatkowo zwiększony i adaptowany po ekspozycji limfocytów na różne antygeny. Proces ten nosi nazwę mutacji somatycznych, kiedy nieliczne geny linii zarodkowej dają początek wielu zmutowanym genom w czasie życia osobnika podczas cięcia i łączenia nici DNA do wolnych końców. Ponadto mogą przyłączać się również dodatkowe nukleotydy, a wiele różnych fragmentów genów może podlegać rekombinacji przed utworzeniem genu *V*. Mutacje somatyczne oraz rekombinacje somatyczne są czasem spotykane również w niektórych nowotworach



RYCINA 1. Schemat przegrupowania genów dla ludzkiego genu IgH, w tym przypadku DH3 jest w pierwszym etapie przyłączony do IH4. Następnie VH4 przyłącza się do DH3-JH4

układu chłonnego. Odcinek łączący J w powstałym w taki sposób łańcuchu Ig jest niepowtarzalny, charakterystyczny osobniczo, bywa porównywany do linii papilarnych. Jest on typowy nie tylko dla każdego limfocytu oraz również dla nowotworu wywodzącego się z układu chłonnego. Jest on, zatem idealnym celem badania MRD za pomocą technik molekularnych, np. najbardziej popularnej PCR, w których stosuje się swoiste sondy o budowie komplementarnej do poszukiwanego nieprawidłowego odcinka genu [29].

Technika PCR umożliwia wybiórczą amplifikację określonego regionu DNA [32] i polega na przeprowadzeniu wielu cykli syntezy DNA z wykorzystaniem starterów flankujących określony odcinek DNA. Warunkiem wykonania badania jest znajomość sekwencji nukleotydów ograniczających powielany odcinek DNA tak, aby można było syntetyzować dwa komplementarne startery o długości ok. 20 nukleotydów. Typowa reakcja obejmuje 30 powtarzających się cyklicznie etapów: termicznej denaturacji powielanego DNA, wiązania starterów z matrycą i syntezy DNA (ryc. 2). Analiza produktów PCR polega na ich uwidocznieniu poprzez elektroforezę w żelach agarozowych lub poliakrylamidowych oraz ocenie wielkości amplifikowanego DNA przez porównanie względem wzorca. Zwiększone ilości powielanego fragmentu DNA, w którym występuje poszukiwana mutacja lub polimorfizm otrzymane w następstwie reakcji, służą do dalszej analizy badanego materiału genetycznego za pomocą technik, takich jak np. badanie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR RFLP, ang. *restriction fragment length polymorphism*) lub klonowanie i sekwencjonowanie materiału genetycznego [27]. Niektóre z nich, znajdujące zastosowanie w badaniu MRD u chorych na MM, będą przedmiotem dalszego omówienia.



RYCINA 2. Schemat przebiegu reakcji PCR: A – Fazy reakcji PCR przebiegają w różnych temperaturach: w 94°C – DNA podlega denaturacji, w 60°C – przyłączenie starterów do nici DNA, 72°C – synteza DNA przy udziale Taq polimerazy. W pierwszym cyklu reakcji amplifikacji ulega cała nić DNA i powstaje tak zwany długi produkt. B – W następnych cyklach matrycą staje się tzw. długi produkt DNA, po amplifikacji powstają „krótkie produkty PCR”. Każdy cykl podwaja liczbę produktów PCR. C – Zależność przebiegu reakcji od temperatury. Każdy cykl trwa 5–10 min, zależnie od wielkości produktu PCR

Najlepszym markerem molekularnym dla MM jest odcinek genu zawierający informację o budowie łańcucha ciężkiego Ig. Charakteryzuje się on największą różnorodnością w zakresie sekwencji biblioteki egzonów V-D, D-J. Jest to tak zwany odcinek nadzmienny – CDR 3 (ang. *chain determining region 3*) genu dla Ig. Brisco i wsp. opracowali najczęściej stosowaną, do dziś bardzo popularną technikę PCR umożliwiającą amplifikację regionu CR 3 o budowie unikalnej dla każdego indywidualnego przypadku MM [4]. Badania PCR wykonano na materiale genetycznym uzyskanym z różnych nowotworowych linii komórkowych, przy użyciu starterów komplementarnych do tzw. uzgodnionych (z ang. *consensus*) sekwencji odcinków V- i J-genu dla łańcucha ciężkiego Ig. Billadeau i wsp. udoskonaliли tę technikę konstruując tzw. ASO-PCR (z ang. *allele specific oligonucleotide*) [2]. Autorzy przeprowadzili badania rearanżacji regionu CDR3 w materiale genetycznym uzyskanym z komórek szpiku pobranego od chorych na MM i inne nowotworowe wywodzące się z układu chłonnego. Metodą ASO-PCR wykryto także komórki nowotworowe we krwi obwodowej u chorych na MM [7]. Owen i wsp. [23] zwiększyli możliwość wykrywania MRD w materiale genetycznym z komórek szpiku chorych poprzez zastosowanie zestawów różnych kombinacji starterów. I tak spektrum poszukiwanych rearanżacji genów rozszerzono badając zarówno odcinki genu CDR3, jak i CDR2 oraz CDR1, a jednocześnie poszukiwano nieprawidłowości w różnych częściach odcinka J. Zestawienie metod badania MRD u chorych na MM opartych na technikach PCR zawarto w tabeli 1.

Technologie molekularne wykrywania MRD u chorych na MM oparte na PCR są swoiste, czułe i specyficzne jednak nie są pozbawione wad. W 60–70% przypadków

TABELA 1. Najczęściej stosowane warianty metody jakościowego PCR w badaniu MRD u chorych na MM (PCR służy do amplifikacji DNA, potem są stosowane inne sposoby analizy molekularnej)

Metoda	Opis	Rodzaj poszukiwanej rearanzacji	Literatura
PCR	Bezpośrednia amplifikacja <i>in vitro</i> określonych fragmentów DNA, sekwencjonowanie	CDR3	Brisco i wsp. [4]
PCR-ASO	Hybrydyzacja oligonukleotydów specyficznych dla allelu z produktem PCR, sekwencjonowanie	CDR3, Fr 3, Fr1f, Fr2, Fr1 con, JH con, JH3, JH6	Billadeau D. i wsp. Owen R.G i wsp. Cremer FW [2,23]
PCR wewnętrzne ( <i>nested</i> )	Zastosowanie dwu par starterów druga para wewnętrznie do pierwszej	CDR3, VDJ	Voena i wsp.[31]
DNA <i>finger-printing</i>	Identyfikacja prostych powtórzeń oligonukleotydowych	CDR3	Bird i wsp. [3]
PCR-GS ( <i>gene scanning</i> )	Bezpośrednia amplifikacja DNA, sekwencjonowanie analiza za pomocą programu Gene Scan	CDR3/JH con	Galimberti S. i wsp. [13]
<i>Heteroduplex</i> PCR	Wykrywanie nie w pełni komplementarnych nici DNA (niesparowanych)	FR3, FR2 i JH	Garcia-Sanz i wsp [14]
RT-PCR-odwrocone PCR	Izolacja RNA, uzyskiwanie c DNA do przeprowadzenia PCR	FR 1	Aubin i wsp. [1]

nie udaje się uzyskać amplifikacji za pomocą par uzgodnionych starterów odcinka genu dla Ig, który uległ rearanzacji ze względu na wysoką częstość występowania somatycznych hypermutacji w komórkach nowotworowych [1,23]. ASO - PCR jest uważane za najczulszą metodę molekularną wykrywania MRD, jednak wymaga bardzo dużego wkładu pracy. Ponadto badanie to nie daje możliwości rozróżnienia pomiędzy komórkami MM a limfocytami B zawierającymi klonalną rearanzację genów. Z tego względu jej przydatność jest ograniczona. W interpretacji badania PCR należy liczyć się z możliwością otrzymania fałszywie negatywnych wyników zależnych od niereprezentatywnej próbki materiału, nierównomiernego rozproszenia komórek nowotworowych w szpiku oraz rzadko spotykaną, ale jednak możliwą zmianę pierwotnej budowy DNA w przebiegu ewolucji klonalnej choroby.

Badanie MRD za pomocą PCR u chorych na MM znalazło jednak różnorodne zastosowanie kliniczne. Techniki molekularne mogą służyć do badania materiału przeszczepowego. Vescio i wsp. [30] udowodnili, że komórki krwiotwórcze uzyskane z krwi obwodowej charakteryzują się mniejszym zanieczyszczeniem komórkami nowotworowymi w porównaniu z komórkami szpiku chorych na MM, co stanowi

potwierdzenie założeń teoretycznych. Z tego względu w praktyce nie wykonuje się autologicznych zabiegów przeszczepiania komórek szpiku chorych na MM. Preparaty PBSC są jednak zawsze, chociaż w różnym stopniu, zanieczyszczone komórkami MM. W celu wyeliminowania zanieczyszczenia tymi komórkami próbowano izolować czystą populację komórek CD34+ odpowiadającą wielopotencjalnym komórkom macierzystym z preparatów PBSC przez sortowanie lub specjalne techniki separacji. Cremer i wsp. [10] wykazali za pomocą techniki ASO-PCR, że w populacji komórek CD34+ uzyskanych z produktów leukaferoz od chorych na MM nie stwierdza się produktów amplifikacji genów dla Ig specyficznych dla MM, natomiast są one obecne we frakcji komórek CD19+. Skrajnie różne wyniki przedstawili Martinelli i wsp. Stwierdzili oni bowiem, że izolacja komórek CD34+ z produktów leukaferoz prowadzi do istotnego, szacowanego na 3 log, zmniejszenia ilości komórek MM, natomiast nie jest możliwe całkowite ich usunięcie [22].

Lemoli i wsp. przedstawili wyniki leczenia wysokodawkowaną chemioterapią wspomaganą autoprzeszczepieniem selekcionowanych komórek macierzystych CD34+ u 31 chorych z rozpoznaniem MM. Nie stwierdzono różnic w częstości uzyskiwania remisji na poziomie klinicznym i molekularnym oraz w czasie trwania remisji w porównaniu z grupą chorych leczonych niemodyfikowanym PBSCT [20]. Wstępne dane wskazują, że zastosowanie jako materiału przeszczepowego komórek CD34 nie poprawia wyników leczenia MM. Corradini i wsp. opublikowali wyniki terapii za pomocą APSCT chorych na MM, u których monitorowano molekularnie MRD po zabiegu. We wszystkich przypadkach, w których jako źródło komórek przeszczepowych stosowano materiał PCR dodatni, wykrywano MRD po zabiegach APBSCT [8].

Badania molekularne MRD przeprowadzano także w stosunkowo dużej grupie chorych na MM leczonych za pomocą przeszczepienia allogenicznego szpiku. Bird i wsp. [3] stwierdzili, że negatywizacja PCR następuje w rok po zabiegu i jest trwała, co przemawia za możliwością całkowitego wyleczenia MM metodą przeszczepiania allogenicznych komórek krwiotwórczych. W materiale klinicznym opracowanym przez Cavo i wsp. całkowitą eliminację MRD po alloprzeszczepieniu zanotowano tylko w części przypadków [5,6]. Martinelli i wsp. wykazali z kolei, że można osiągnąć remisję molekularną u 50% chorych leczonych allotransplantacją komórek krwiotwórczych, występuje ona szybciej u chorych po podaniu PBSCT – po około 6 miesiącach, natomiast po podaniu komórek szpiku po roku. W piśmiennictwie przeważa pogląd, że istnieje prawdopodobnie grupa chorych na MM, u których jest możliwe całkowite zniszczenie klonu komórek nowotworowych [21].

Określenie przydatności jakościowego badania MRD za pomocą PCR pozostaje na razie kwestią przyszłości. Wykazano, że nawet w przypadkach negatywnego wyniku PCR u chorych na MM mogą wystąpić wczesne nawroty choroby, czyli uzyskanie wyniku negatywnego badania MDR za pomocą PCR ma ograniczone znaczenie prognostyczne. Badanie jakościowe PCR u chorych na MM nie pozwala też przewidzieć, jaki będzie kliniczny przebieg choroby po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych [25,28].

Ocena ilościowa MRD za pomocą PCR, ze względu na większą czułość budzi większe nadzieje co do przydatności w ustalaniu rokowania i doborze leczenia.

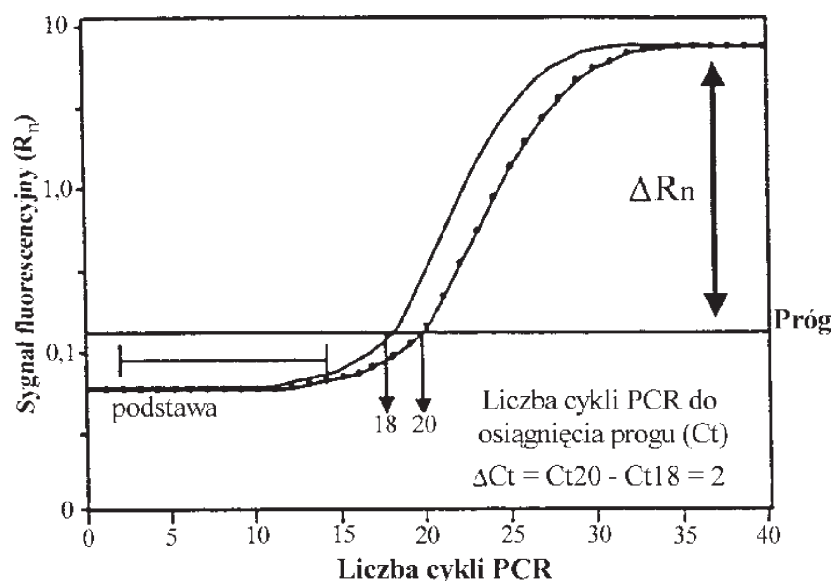


Zastosowanie techniki półilościowej ASO - PCR w badaniu chorych na MM opracował Cremer i wsp. [9]. Badanie liczby komórek nowotworowych w seryjnie pobieranych próbkach szpiku od chorych na MM pozwala zidentyfikować grupę chorych o złym rokowaniu, ponieważ po wysokodawkowanej chemioterapii nadal wykrywa się u nich komórki klonogenne MM w podobnej liczbie jak przed chemioterapią [11]. Można także wyróżnić grupę chorych o dobrym rokowaniu charakteryzującą się wyraźną redukcją masy komórek MM zwłaszcza po pierwszym kursie wysokodawkowanego melfalanu wspomaganego przeszczepieniem PBST. Badanie półilościowe ASO PCR zastosowano do oszacowania wpływu chemioterapii na komórki klonogenne MM zawarte w subpopulacji limfocytów o fenotypie CD19+ [18]. Wykazano, że postęp choroby w przypadkach MM ściśle wiąże się z ekspansją klonu komórek nowotworowych identyfikowanych zarówno w subpopulacji komórek CD19+, jak i CD19-. Przetrwałe, odporne na leczenie komórki MM odpowiedzialne za nawrót i uogólnienie choroby znajdują się głównie w obrębie frakcji o fenotypie CD19+. Komórki klonogenne MM wykrywa się również we frakcji limfocytów CD20+, przetrwałych po chemioterapii wysokimi dawkami, co stwarzałoby w przyszłości możliwość stosowania w leczeniu choroby przeciwciał anty CD20 [26].

## ILOŚCIOWE BADANIE MRD-PCR W CZASIE RZECZYWISTYM

Po raz pierwszy opisano metodę ilościowego badania PCR w czasie rzeczywistym w 1993 r. [17]. Metoda ta polega na pomiarze produktu reakcji amplifikacji w czasie rzeczywistym, tzn. w okresie, w którym amplifikacja DNA w reakcji PCR przebiega wykładniczo (faza *plateau*) [16]. Dokonywanie pomiarów w tym właśnie okresie jest istotne, ponieważ umożliwia przeprowadzenie wstecznej ekstrapolacji koniecznej dla określenia początkowej ilości DNA matrycowego. Podstawowym parametrem w tym typie badania jest wartość tzw. progu cyklu (*Ct*, ang. *Cycle threshold*). *Ct* oznacza liczbę cykli PCR konieczną dla wyemitowania sygnału fluorescencyjnego przekraczającego tzw. wartość progową oznaczającą generację sygnału większego niż fluorescencja tła. Wartość *Ct* jest wprost proporcjonalna do ilości początkowego DNA matrycowego. Służy do obliczenia poziomu ekspresji mRNA lub pomiaru liczby kopii DNA za pomocą specjalnego oprogramowania komputerowego. Hipotetyczny wykres reakcji wraz z objaśnieniami przedstawiono na rycinie 3. W metodzie PCR w czasie rzeczywistym stosuje się obecnie różne metody generowania sygnału fluorescencyjnego. Najczęściej wykorzystywana jest metoda 5'-nukleazowa, w której światło fluorescencyjne powstaje po przecięciu znakowanej fluoresceiną cząsteczki na końcu 5' specyficznego nukleotydu. Opisana reakcja jest w pełni zautomatyzowana. Na rynku są dostępne urządzenia zwane termocyklerami wyposażone w oprogramowanie ułatwiające uzyskiwanie i interpretację wyników.

PCR w czasie rzeczywistym zastosowano do badania ilościowego MRD u chorych na MM w 1998 r. Użyto starterów, podobnie jak w klasycznym PCR, swoistych dla genu dla regionu nadzmiennego Ig CDR3 i V IgH. Przeprowadzono badania próbek



RYCINA 3. Przykładowy wykres reakcji PCR w czasie rzeczywistym wprowadzający podstawowe pojęcia, związane z tą techniką. Wykres reakcji amplifikacji przedstawia zależność natężenia sygnału fluorescencyjnego w stosunku do liczby cykli. Podstawa jest definiowana jako cykle, w których powstaje sygnał, ale jego natężenie jest poniżej czułości instrumentu wykrywającego. Pomiar sygnału jest używany dla wyznaczenia progu. Wartość progową oblicza się jako 10 x odchylenie standardowe średniego sygnału podstawowego. Sygnał fluorescencyjny o natężeniu przekraczającym próg jest uważany za rzeczywisty sygnał konieczny do określenia progu cyklu ( $C_t$ ) dla badanej próbki. Z definicji  $C_t$  jest to kolejny cykl PCR, w którym sygnał fluorescencyjny przekracza minimalny poziom jego wykrywania. Na wykresie dwie linie: ciągła i kropkowana oznaczają przebieg reakcji dla dwu różnych produktów. Przecięcie ciągłej odpowiada 18 cyklom PCR, a kropkowanej – 20 cyklom PCR. Stwierdza się zatem różnicę dwu cykli pomiędzy dwoma produktami –  $DCt = 2$ . Uwzględniając wykładniczy typ reakcji PCR  $DCt$  może być przekształcony do postaci linearnej – 2 ( $DCt$ ), czyli różnica syntezy produktów wynosi 4

szpiku i PBSC uzyskanych u chorych na MM przed i seryjnie po leczeniu chemioterapią. Wykazano, że metoda jest powtarzalna, czuła oraz umożliwia ilościowe badanie MRD [15]. Rasmussen i wsp. opracowali technikę oznaczania ilościowego MRD za pomocą tzw. technologii TaqMan opartej na badaniu ASO PCR. Zastosowano startery komplementarne do typowego markeru klonalnego w MM – regionu nadzmiennego CDR3 oraz VDJ. Badania wykonano u 7 chorych po leczeniu autologicznym PBSCT. Wykazano, że technologia jest czuła i specyficzna. Autorom udało się wykryć komórki MM w przypadkach, w których inne badania wskazywały na całkowitą remisję, co udowadnia jej niezwykłą użyteczność [24]. Właśnie przypadki całkowitej remisji MM rozpoznawane na podstawie klasycznych kryteriów oraz jakościowych badań molekularnych stanowią docelowo grupę chorych, u której badanie MRD metodą PCR ilościowego wydaje się mieć największe zastosowanie w przyszłości w celu ustalenia wskazań do dalszego leczenia [12].

PCR w czasie rzeczywistym może również służyć do badania zanieczyszczenia komórkami klonogennymi MM materiału przeszczepowego. Ladetto i wsp. badali obecność komórek MM w materiale przeszczepowym uzyskanym ze szpiku lub z krwi obwodowej u chorych



na MM poddanych dwukrotnie mobilizacji. Wykorzystano startery komplementarne dla regionu nadmiennego CDR3 lub V IgH. Wykazano, że materiał przeszczepowy uzyskany z krwi obwodowej jest mniej zanieczyszczony komórkami nowotworowymi w porównaniu ze szpikiem po pierwszym kursie mobilizacyjnym chemioterapii. Materiał pobierany z różnych leukaferoz nie różni się istotnie pod względem zanieczyszczenia komórkami MM. Stwierdzono, że powtarzanie kursów chemioterapii mobilizacyjnej ma niewielkie znaczenie w uzyskaniu redukcji liczby komórek nowotworowych w materiale przeszczepowym. Stwierdzono także, znaczne różnice w ilościowej ocenie MRD za pomocą PCR w czasie rzeczywistym i cytometrii przepływowej. Należy przypuszczać, że komórki o fenotypie CD38<sup>++</sup> uznawane za typowe dla MM tylko w części należą do klonu nowotworowego, ponieważ badanie PCR w czasie rzeczywistym wykazywało mniejszy stopień MRD niż ocena za pomocą cytometrii [19].

PCR w czasie rzeczywistym jest nowoczesną metodą oceny MRD u chorych na MM, której przydatność zweryfikuje najbliższa przyszłość. Ma ona niewątpliwe zalety w postaci wysokiej czułości, powtarzalności oraz wygody w wykonaniu zwłaszcza w porównaniu z metodami półilościowymi PCR, które wymagają badania MRD w wielu rozcieńczeniach. Seryjne badanie MRD tą metodą może służyć do ustalenia wskazań do wczesnego wdrożenia leczenia w momencie, kiedy nawrót choroby jest jeszcze niemożliwy do rozpoznania innymi metodami. Wadami są wysoka cena termocyklerów i odczynników, a zwłaszcza sond znakowanych fluoresceiną.

## UWAGI KOŃCOWE

W polskich warunkach nadal najważniejsze jest przeprowadzanie rzetelnej oceny efektów leczenia za pomocą klasycznych kryteriów EBMT. Nie unikniemy jednak, wprowadzając nowoczesne metody leczenia MM, konieczności nowoczesnego badania poziomu MRD. Przedstawiony powyżej przegląd piśmiennictwa na ten temat pokazuje, jak dużo nowoczesnych metod jest do dyspozycji. Najbardziej przydatna wydaje się technika fenotypowania i cytometrii przepływowej, której czułość można zwiększyć prostymi technikami bramkowania. W przyszłości konieczne będzie zapewne badanie MRD za pomocą PCR w czasie rzeczywistym. Jest to jedyny sposób wczesnego wykrycia progresji MM po PBSCT i ustalenia wskazań do zastosowania leczenia.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] AUBIN J, DAVI F, NUGUYEN-SALOMON F, LEBOEUF D, DEBERT C, TAHER M. Description of a novel FR1 IgH PCR strategy and its comparison with three other strategies for the detection of clonality in B cell malignancies. *Leukemia* 1995; **9**: 471–476.
- [2] BILLADEAU D, BLACKSTADT M, GREIPP P, KYLE RA, OKEN MM, KAY N, VAN NESS B. Analysis of B-lymphoid malignancies using allele-specific polymerase chain reaction: a technique for sequential quantitation of residual disease. *Blood* 1991; **78**: 3021–3029.
- [3] BIRD JM, RUSSELL NH, SAMSON D. Minimal residual disease after bone marrow transplantation for multiple myeloma: for cure in long-term survivors. *Bone Marrow Trans* 1993; **12**: 651–654.

- [4] BRISCO MJ, TAN LW, ORSBORN AM, MORLEY AA. Development of highly sensitive assay, based on the polymerase chain reaction, for rare B-lymphocyte clones in a polyclonal population. *Br J Haematol* 1990; **75**: 193–167.
- [5] CAVO M, TERRAGANA C, MARTINELLI G, RONCONI S, ZAMAGNI E, TOSI P, LEMOLI RM, BENNI M, PAGLIANI G, BANDINI G, TURA S. Molecular monitoring of minimal residual disease in patients in long-term complete remission after allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Blood* 2000; **96**: 355–357.
- [6] CAVO M, TERRAGANA C, MARTINELLI G, RONCONI S, ZAMAGNI E, TOSI E, LEMOLI RM, BENNI M, PAGLIANI G, BANDINI G, TURA S. Molecular monitoring of minimal residual disease in patients in long-term complete remission after allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Blood* 2000; **96**: 355–357.
- [7] CORRADINI P, VOENA C, OMEDE P, ASTOLFI M, BOCCADORO M, DALLA-FAVERA R. Detection of circulating tumor cells in multiple myeloma by a PCR-based method. *Leukemia* 1993; **7**: 1879–1882.
- [8] CORRADINI P, VOENA C, TARELLA C, ASTOLFI M, LADETTO M, PALUMBO A, VAN LINT M, BACIGALUPO A, SANTORO A, MUSSO M, MAJOLINO I, BOCCADORO M, PILERI A. Molecular and clinical remission in multiple myeloma: role of autologous and allogeneic transplantation of hematopoietic cells. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 208–215.
- [9] CREMER FW, KIEL C, WALLMEIER M, GOLDSMITH H, MOOS M. A quantitative PCR assay for detection of low amounts of malignant cells in multiple myeloma. *Ann Oncol* 1997; **8**: 633–636.
- [10] CREMER FW, KIEL K, SUCKER C, WACKER J, ATZBERGER A, HAAS R, GOLDSCHMIDT H, MOOS M. A rationale for positive selection of peripheral blood stem cells in multiple myeloma: highly purified CD34+ cell fractions of leukapheresis products do not contain malignant cells. *Leukemia* 1997; **11** Suppl. 5: S41–46.
- [11] CREMER FW, EHRBRECHT E, KIEL K, BENNER A, HEGENBART U, HO AD, GOLDSCHMIDT H, MOOS M. Evaluation of the kinetics of the bone marrow tumor load in the course of sequential high-dose therapy assessed by quantitative PCR as a predictive in patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2000; **26**: 851–858.
- [12] FENK R, AK M, KOBBE G, STEIDL U, ARNOLD C, KORTH HUNERLITURKOGLU A, ROHR UP, KLISZEWSKI S, BERNHAN HAAS R, KRONENWETT R. Levels of minimal residual disease detected by quantitative molecular monitoring herald relapse in patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2004; **89**: 557–566.
- [13] GALIMBERTI S, BRIZZI F, MAMELI M, PETRINI M. An advantageous method to evaluate IgH rearrangement and its role in minimal residual disease detection. *Leuk Res* 1999; **23**: 921–929.
- [14] GARCIA-SNAZ R, LOPEZ-PEREZ R, LANGERAK AW, GONZALES D, CHILLON MC, BALANZATEGUI A, MATEOS MV, ALAEJOS I, GONZALES M, VAN DONGEN JJ, SAN MIGUEL JF. Heteroduplex PCR analysis of rearranged immunoglobulin genes for clonality assessment in multiple myeloma. *Haematologica* 1999; **84**: 328–335.
- [15] GERARD CJ, OLSSON K, RAMANATHAN R, READING C, HANANIA EG. Improved quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using real-time polymerase chain reaction and plasmid-DNA complementarity determining region III standards. *Canc Res* 1998; **58**: 3957–3964.
- [16] GIZINGER DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002; **30**: 503–512.
- [17] HOGUCHI R, FOCKLER C, DOLLINGER G, WATSON R. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993; **11**: 1026–1031.
- [18] KIEL K, CREMER FW, ROTTENBURGER C, KALLMEYER C, EHRBRECHT E, ATZBERGER A, HEGENBART U, GOLDSCHMIDT H, MOOS M. Analysis of circulating tumor cells in patients with multiple myeloma during the course of high-dose therapy with peripheral stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl* 1999; **23**: 1019–1027.
- [19] LADETTO M, OMEDE P, SAMETTI S., DONOVAN J.W, ASTOLFI M, DRANDI D, VOLPATO F, GIACONE L, GIARETTA F, PALUMBO A, BRUNO B, PILERI A, GRIBBEN JG, BOCCADORO M. Real time polymerase chain reaction in multiple myeloma: Quantitative analysis of tumor contamination of stem cell harvests. *Exp Haematol* 2002; **30**: 529–536.
- [20] LEMOLLI RM, MARTINELLI G, ZAMAGNI E, MOTTA MR, RIZZI S, TERRAGANA C, RONDELL RONCONI S, CURTI A, BONIFAZI F, TURA S, CAVO M. Engraftment, clinical, and molecular follow-up of patients with multiple myeloma who were reinfused with highly purified CD34+ cells to support single or tandem high-dose chemotherapy. *Blood* 2000; **95**: 2234–2239.

- [21] MARTINELLI G, TERRAGANA C, ZAMAGNI E, RONCONI S, TOSI P, LEMOLI R, BANDINI G, TESTONI N, AMABILE M, OTTAVIANI E, BUONAMICI S, SOVERINI S, MONTEFUSCO V, DE VIVO A, BONIFAZI F, TURA S, CAVO M. Polymerase chain reaction-based detection of minimal residual disease in multiple myeloma patients receiving allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2000; **85**: 930–934.
- [22] MARTINELLI G, TERRAGANA C, LEMOLI RM, CAVO M, BENNI M, MOTTA MR, AMABILE M, OTTAVIANI E, TESTONI N, DE VIVO A, TURA S. Clinical and molecular follow-up by amplification of the CDR-III IgH region in multiple myeloma patients after autologous transplantation of hematopoietic CD34+ stem cells. *Haematologica* 1999; **84**: 397–404.
- [23] OWEN RG, JOHNSON RJ, RAWSTRON AC, EVANS PA, JACK A, SMITH GM, CHILD JA, MORGAN GJ. Assessment of IgH PCR strategies in multiple myeloma. *J Clin Pathol* 1996; **49**: 672–675.
- [24] RASMUSSEN T, POULSEN TS, HONORE L, JOHNSEN HE. Quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using an allele-specific real-time PCR assay. *Exp Haematol* 2000; **28**: 1039–1045.
- [25] RASMUSSEN T. The presence of circulating clonal CD19 cells in multiple myeloma. *Leuk Lymph* 2001; **42**: 1359–1366.
- [26] ROTTENBURGER CH, KIEL K, BOSING T, CREMER FW, MOLDENHUEER G., HO AD, GOLDSCHMIDT H, MOSS M. Clonotypic CD20+ and CD19+ B cells in peripheral blood of patients with multiple myeloma post high-dose therapy and peripheral blood stem cell transplantation. *Br J Haematol* 1999; **106**: 545–552.
- [27] SŁOMSKI R, NAPIERAŁA D, KWIATKOWSKA J. Reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR) w badaniach naukowych i diagnostyce molekularnej. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 195–217.
- [28] SWEDIN A, LENHOFF S, OLOFSSON T, THURESSON B, WESTIN J. Clinical utility of immunoglobulin heavy gene rearrangement identification for tumor cell detection in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1998; **103**: 1145–1151.
- [29] VAN DONGEN JM, SZCZEPAŃSKI T, LANGERAK AW, PONGERS-WILLEMSE MJ. Detection of minimal residual disease in lymphoid malignancies. W: Degos L, Linch DC. Löwenberg B Martin Dunitz [red.] Textbook of malignant haematology. 1999: 685–724.
- [30] VESCOIO RA, HAN EJ, SCHILLER GJ, LEE JC, WU CH, CAO J, SHIN J, KIM A, LICHTENSTEIN AK, BERENSON JR. Quantitative comparison of multiple myeloma tumor contamination in bone marrow harvest and leukapheresis autografts. *Bone Marrow Transpl* 1996; **18**: 103–110.
- [31] VOENA C, LADETTO M, ASTOLFI M, PROVAN D, GRIBBEN JG, BOCCADORO M, PILERI A, CORRADINI P. A novel nested-PCR strategy for detection of rearranged immunoglobulin heavy-chain genes in B cell tumors. *Leukemia* 1997; **11**: 1793–1798.
- [32] WHITE TJ, ARNHEIM N, ERLICH HA. The polimerase chain reaction. *Trends Genet* 1989; **5**: 185–189.

*Redaktor prowadzący – Jan Żeromski*

*Otrzymano: 01.10.2004 r.*

*Przyjęto: 04.03.2005 r.*

*ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa*