

ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА

УДК 616–006

Периодическое научное издание. Выходит дважды в год

Основан в 2006 году
1/2012 том 10

Учредитель: РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН (лаборатория иммунологии гемопоэза)

ГЛАВНЫЕ РЕДАКТОРА Н.Н. ТУПИЦЫН, G. JANOSSY
Ответственный секретарь А.В. Моженкова

Редакционная коллегия:

З.Г. Кадагидзе (зам. главного редактора)
Е.Г. Турнянская (Москва)
Е.В. Артамонова (Москва)
Ж. Брошье (Франция)
Дж. Вижденес (Франция)
Л.Ю. Гривцова (Москва)
Дж. Джаносси (Великобритания)
И.С. Долгополов (Москва)
Т.Н. Заботина (Москва)
А.М. Ковригина (Москва)
А.М. Копылов (Москва)
Л.В. Мазурок (Курган)
А.А. Михайлова (Москва)
Д.Ш. Османов (Москва)
А.И. Павловская (Москва)
С.В. Петров (Казань)
Б.В. Пинегин (Москва)
А.В. Попа (Москва)
Н.А. Пробатова (Москва)
Р.М. Рамазанова (Казахстан)
И.Н. Серебрякова (Москва)
Г.С. Тумян (Москва)
С.А. Тюлядин (Москва)
А.В. Филатов (Москва)
М.А. Френкель (Москва)
С.А. Шинкарев (Липецк)
Е.Н. Шолохова (Москва)
А.А. Ярилин (Москва)

Адрес редакции: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24
Тел./факс: +7(499)324-90-69
E-mail: imhaemo_hi@ronc.ru, www.ronc.ru/imhaemo_hi

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору за соблюдением законодательства в сфере массовых коммуникаций и охране культурного наследия.

Свидетельство ПИ № ФС 77-23551 от 06.03.2006

Свидетельство Эл № ФС 77-24174 от 19.04.2006

Подписано в печать 07.05.2010. Формат 60×90/8.
Бумага офсетная. Гарнитура «Times New Roman».
Печать офсетная.
Уч.-изд. листов 5,5. Тираж 1000 экз.

Подписной индекс № 36915

Отпечатано в типографии «Огни Москвы»

Тираж 1000 экз.

При перепечатке материалов ссылка на
«Иммунологию гемопоэза» обязательна
Издательская группа РОНЦ
Координатор: Е.Г. Турнянская. Макет: Б.Б. Крюков

HAEMATOPOIESIS IMMUNOLOGY

UDK 616–006

Semi-annual scientific oncoimmunological periodicals

Founded in 2006
1/2012 vol. 10

Founder: State N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center
affiliated to the Russian Academy of Medical Sciences, Russian
Federation (H/Ematopoiesis Immunology Laboratory)
EDITORS-IN-CHIEF N.N.TUPITSYN, G. JANOSSY
Executive secretary A.V. Mozhenkova

Editorial Board:

Z.G. Kadagidze (Deputy Editor-in-Chief)
E.G. Turnianskaia (Moscow)
E.V. Artamonova (Moscow)
J. Brochier (France)
G. Wijdenes (France)
L.U. Grivtsova (Moscow)
G. Janossy (UK)
I.S. Dolgoplov (Moscow)
T.N. Zabolina (Moscow)
A. M. Kovrigina (Moscow)
A.M. Kopilov (Moscow)
L.V. Mazurok (Kurgan)
A.A. Mikhailova (Moscow)
D.Ch. Osmanov (Moscow)
A.I. Pavlovskaja (Moscow)
S. V. Petrov (Kazan)
B.V. Pinegin (Moscow)
A.V. Popa (Moscow)
N.A. Probatova (Moscow)
R.M. Ramazanova (Kazakhstan)
I.N. Serebriakova (Moscow)
G.S. Tumian (Moscow)
S.A. Tuliandin (Moscow)
A.V. Filatov (Moscow)
M.A. Frenkel (Moscow)
S.A. Shinkarev (Lipetzsk)
E.N. Sholokhova (Moscow)
A.A. Iarilin (Moscow)

Address of Editorial Office: 24, Kashirskoye sh., Moscow, Russian
Federation, 115478. Tel/fax: +7(499)324-90-69
E-mail: imhaemo_hi@ronc.ru
www.ronc.ru/imhaemo_hi

The journal is registered at the Federal Agency of Press and Mass-media of Russian Federation.

License № ФС 77-23551 от 06.03.2006

License № ФС 77-24174 от 19.04.2006

Zip-code № 36915
Published «Ogny Moskvy»
Print-run 1000 copies

No reproduction is permitted without reference to Journal
Hematopoiesis immunolog
Coordinator: E.G. Turnyanskaya. Design: B.B. Krukov

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОТ РЕДАКТОРА

Jean-François Rossi

INTERLEUKIN-6 AS A THERAPEUTIC TARGET FOR DYSIMMUNE DISEASE AND CANCER.....	8
--	----------

*Б. Паива, М.Б. Видриалес, Х. Алмейда, А. Лопес,
М.-К. Лопес-Вергес, А. Орфао, Х. Бладе,
Х.Х. Лагуерта, Х.Ф. Сан-Мигуель*

ОЦЕНКА ЭФФЕКТА ЛЕЧЕНИЯ ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ: КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МОНИТОРИНГА МОЗ.....	34
--	-----------

Катерин Аликс-Панабиер, Клаус Пантел

ВЫЯВЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА Д ИССЕМИНИРУЮЩИХ РАКОВЫХ КЛЕТОК ПРИ СОЛИДНЫХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ.....	78
--	-----------

Зуева Е.Е., Русанова Е.Б., Ramon Simon

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОГО СИНДРОМА МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ. СКРИНИНГ.....	94
--	-----------

IX РОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ (программа).....	
---	--

**Организация IX Российской с международным участием конференции
«Иммунология гемопоэза» и публикация материалов издания
в «Иммунологии гемопоэза» поддержаны Российским фондом фундамен-
тальных исследований грант № 11-04-06037-г**

CONTENTS**FROM THE EDITOR***Jean-François Rossi*

INTERLEUKIN-6 AS A THERAPEUTIC TARGET FOR DYSIMMUNE DISEASE AND CANCER.....	8
--	----------

*Bruno Paiva, María-Belén Vidriales, Julia Almeida, Gema Mateo,
Antonio López, María-Consuelo López-Berges, Alberto Orfao,
Joan Blade, Juan-Jose Lahuerta, Jesús F. San Miguel*

RESPONSE ASSESSMENT IN MULTIPLE MYELOMA: CLINICAL SIGNIFICANCE OF MRD MONITORING.....	34
--	-----------

Catherine Alix-Panabières, PhD. Klaus Pantel

DETECTION AND CHARACTERIZATION OF DISSEMINATING CANCER CELLS IN PATIENTS WITH SOLID EPITHELIAL MALIGNANCIES.....	78
---	-----------

**Organization of IX Russian Conference with international participation
"Immunology of hematopoietic and publication of publications
in "Immunology hematopoiesis" supported by the Russian Foundation for Basic
Research grant number 11-04-06037-g**

ОТ РЕДАКТОРА

В свое время я высказал идею издания журнала на двух языках – русском и английском – по причине того, что в лаборатории иммунологии гемопоэза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН выполняются хорошие работы, но до публикации на английском «руки не доходят» – просто очень много текущей диагностической и консультативной работы. Первые номера журнала выходили именно в таком формате – завершённые работы лаборатории издавались на русском и английском языках. Однако с течением времени конференция «Иммунология гемопоэза» стала приобретать все более и более международный характер. И для нас стало большой честью и неожиданностью, что иностранные ученые первой величины охотно предоставляли свои статьи для публикации в «Иммунологии гемопоэза/Haematopoiesis Immunology». Возникла уникальная ситуация, когда не только российские ученые «прорубили окно в Европу» к англоязычному читателю, но и, напротив, иностранные ученые впервые увидели свои тексты на кириллице, а россияне смогли читать их статьи на русском. Диалог оказался продуктивным, мнения не всегда совпадали, и журнал отражал градус накала, публикуя дискуссии. Примером явилась плодотворная дискуссия между А.М. Поповым (Екатеринбург) и Дарио Кампана (США). И хотя к единству мнений прийти не удалось, дискуссия была чрезвычайно полезна для читателей, в первую очередь тех, кто занимается проточно-цитометрической диагностикой гемобластозов.

В этом году мы несколько изменили формат конференции и привлекли большее число клиницистов онкогематологов и онкологов с тем, чтобы современные аспекты иммунодиагностики опухолей были более востребованы клиникой. Наряду с традиционными онкогематологическими вопросами, в программу включена секция по циркулирующим опухолевым клеткам, на которой с докладами выступят ведущие специалисты в данной области профессор Klaus Pantel (Германия) и Catherine Alix-Panabieres (Франция). Да и формат онкогематологической секции конференции изменился – мы с нетерпением ждем доклад профессора Jean-Francois Rossi о роли ИЛ-6 в опухолевой прогрессии и применении анти-ИЛ-6 в лечении множественной миеломы. Клиническое значение оценки резидуальных опухолевых клеток при множественной миеломе осветит в своем докладе Bruno Paiva (Испания) – член наиболее авторитетной в данном вопросе исследовательской и клинической группы, руководимой профессором J. San Miguel. Разумеется, все перечисленные докладчики представили статьи, которые мы с удовольствием публикуем в «Иммунологии гемопоэза/Haematopoiesis Immunology» №1 за 2012 год. Программа конференции 8 июня 2012 г – в конце данного номера.

*Главный редактор журнала «Иммунология гемопоэза»
Заслуженный деятель науки России, профессор*

Н.Н. Тупицын

FROM THE EDITOR

Once I put forward the idea of a journal in two – Russian and English languages, because the Haematopoiesis Immunology Laboratory of the N.N. Blokhin Cancer Research Center made good work but we had never time to publish our reports in English due to a large amount of routine diagnostic and consultation activities. The first issues of the journal were just in that format: the laboratory completed works were published in Russian and in English. However the Haemopoiesis Immunology conference was acquiring more and more international nature with time. And it was a great honor and surprise for us that top foreign scientists gave their articles readily to be published in the Haematopoiesis Immunology journal. We found ourselves in a unique situation when it was not only Russian scientists who “made their way to Europe” and to English-speaking readers, but also foreign researchers saw their texts in Cyrillic letters for the first time while the Russians could read them in Russian. The dialogue was very fruitful, opinions often differed, and the journal managed to show the heat of the discussion by publishing the opponents’ arguments. Take for example the useful discussion between A.M. Popov (Ekaterinburg) and Dario Campana (USA). Notwithstanding the fact that the opponents failed to come to a common opinion the discussion appeared very inter-esting for our readers, first of all those involved in flow cytometry diagnosis of hematology malignancies.

This year we have changed the conference format somehow and invited more clinical oncohematologists and oncologists in order clinicians could have the opportunity to find more about latest achievements in tumor immunodiagnosis and to implement them into clinical practice. Together with traditional oncohematology issues the program includes a circulating tumor cell section with presentations of leading researchers in this field such as Professor Klaus Pantel (Germany) and Catherine Alix-Panabieres (France).

The format of oncohematology section has changed too, and we are looking forward to Professor Jean-Francois Rossi’s presentation on the role of IL-6 in tumor progression and use of anti-IL-6 in the treatment for multiple myeloma. Bruno Paiva (Spain), a member of the most authoritative clinical study group headed by Professor J. San Miguel, will speak on clinical significance of residual tumor cell measurement in patients with multiple myeloma.

All the above-mentioned authors kindly gave us their reports that we are pleased to publish in the first issue of Haematopoiesis Immunology in 2012. You may find the program of the conference to be held on the 8th of June, 2012, at the end of this issue.

Honored Scientist of Russia

Editor-in-Chief Haemopoiesis Immunology journal

N.N. Tupitsyn

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – антиген,

Ауто-, алло-ТКМ – аутологичная или аллогенная трансплантация клеток костного мозга или мобилизованных стволовых клеток периферической крови,

БСВ – бессобытийная выживаемость

β-ХЛЛ – В-клеточный хронический лимфолейкоз,

ИГ – иммуноглобулин,

ИФА – иммуноферментный анализ,

ИФТ – иммунофенотипирование,

ЛДГ – лактатдегидрогеназа,

МДС – миелодиспластические синдромы

МК – моноклональный компонент,

МКА – моноклональные антитела,

ММ – множественная миелома,

МНК – моноклеарные клетки,

МОБ – минимальная остаточная болезнь,

МРБ – минимальная резидуальная болезнь,

НХЛ – неходжкинская лимфома

РА – рефрактерная анемия

РБ – резидуальная болезнь,

РМЖ – рак молочной железы

КМ – костный мозг

РИФ – реакция иммунофлуоресценции,

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз,

ПК – плазматические клетки,

ПР – полная ремиссия

ПЦ – проточная цитометрия,

ПЦР – полимеразная цепная реакция,

СОЭ – скорость оседания эритроцитов,

СРБ – С-реактивный белок.

ТПЛ – тумор-пенетрирующие лимфоциты

ЧР – частичная ремиссия

ABBREVIATIONS

Ag, antigen.

ALL, acute lymphoblastic leukemia.

Auto-/allo-BMT, autologous or allogeneic transplantation of bone marrow cells or mobilized peripheral stem cells.

B-CLL, B-cell lymphocytic leukemia.

BSA, bovine serum albumin.

BC, breast cancer

CD (cluster of differentiation) – кластер лейкоцитарных дифференцировочных антигенов.

CRP, C-reactive protein.

EIA, enzyme immunoassay.

ESR, erythrocyte sedimentation rate.

FC, flow cytometry.

FISH, fluorescent hybridization *in situ* (флюоресцентная гибридизация *in situ*).

IG, immunoglobulin.

IFR, immunofluorescence reaction.

IPT, immunophenotyping.

LDH, lactate dehydrogenase.

MDS, myelodysplastic syndromes

MC, monoclonal component.

Mab, monoclonal antibodies.

major histocompatibility complex (MHC)

MNC, mononuclear cells.

MRD, minimal residual disease.

NHL, Non-Hodgkin's lymphomas

PNAS (Proceedings of National Academy of Sciences of the USA)

RD, residual disease.

PBS, phosphate buffered saline.

PC, plasma cells.

PCR, polymerase chain reaction.

Jean-François Rossi

INTERLEUKIN-6 AS A THERAPEUTIC TARGET FOR DYSIMMUNE DISEASE AND CANCER

INSERM U1040, Institute for Research in Biotherapy.

*80 avenue Gaston Fliche- 34295 Montpellier Cédex France Université Montpellier
I and Department of Haematology UNIVERSITY HOSPITAL – CHU de Montpel-
lier and CHU de Nîmes*

Key words: Interleukin-6, treatment, cancer, dysimmune diseases

Running Title: Anti-interleukin 6 in cancers and dysimmune diseases

ABSTRACT

Human interleukin-6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine, with a four-helix bundle structure, having 212 amino acids with a signal peptide of 27 amino acids, whose gene is located on chromosome 7 (7p15). Several cells are producing IL-6, including both normal and cancer cells. C-Reactive Protein and serum Amyloid-A protein secretion are under IL-6 control, making these molecules as major surrogate markers to follow patients receiving anti-IL-6 therapy. IL-6 binds to IL-6 soluble receptor or to the membrane form of the gp80 (IL-6R or α -subunit receptor, also named CD126), followed by gp130 (β subunit of the IL-6R, also named CD130) dimerization, that leads to activation of receptor-associated kinases (JAK1, JAK2, and Tyk2). The gp130 receptor chain represents the complex which transmits the signal for the IL-6 family and IL-27, a common member to the IL-12 family. IL-6 is a major cytokine implicated in different biological mechanisms, particularly inflammation, haematopoiesis, lipid and glucid metabolism, bone resorption, neural cell differentiation and other biological activities.

Blocking IL-6 pathway represents a major therapeutic advance in several diseases, particularly in dysimmune diseases with anti-IL6R monoclonal antibodies such as tocilizumab particularly in rheumatoid arthritis or Castleman's disease, and siltuximab that has been used in clinical trials for patients having multiple myeloma, metastatic renal cell carcinoma and prostate cancer. Other molecules such as humanized monoclonal antibodies against IL-6 and IL6R are now developed.

INTRODUCTION

Interleukin-6 (IL-6) is an inflammatory cytokine that is implicated in different biological processes, including dysimmune diseases and cancers. IL-6 is mainly produced by monocytes, keratinocytes, and other cells in response to different stimuli. The receptor of this cytokine includes two chains, α chain that is specific to the molecule, and β chain. The activated receptor is an heterodimer associating

IL-6R-IL-6 and 2 gp 130 molecules that transduced the signal. Anti-IL-6 therapies have been developed including monoclonal antibodies (MoAb) against IL-6 (siltuximab) and the soluble IL-6 receptor (tozilizumab) in dysimmune diseases and in cancers. In this review, our aim is to update data on these MoAbs and to underline the advantages for these two drugs and the potential development for such therapeutic strategies.

INTERLEUKIN-6 IS A PLEIOTROPIC CYTOKINE (fig. 1)

Human interleukin-6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine, with a four-helix bundle structure, having 212 amino acids with a signal peptide of 27 amino acids. Its molecular weight ranges between 21 and 28 kDa, depending on the amount of post-translational modifications, such as glycosylation and phosphorylation [1]. The human gene of IL-6 is located on chromosome 7 (7p15) [2]. Epigenetic control has been observed and particularly studied in different cancers. So, IL-6 has been demonstrated to act on suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins, particularly SOCS-3 in multiple myeloma (MM) [3], or from microRNA-370 in human malignant cholangiocytes [4]. IL-6 supports several functions, including immune and pro-inflammatory activity and acts on several cells, including lymphocytes, fibroblasts, hepatocytes and haematopoietic stem cells [5;6]. IL-6 is produced by different types of cell, mainly fibroblasts, keratinocytes, monocytes, and macrophages, particularly in early phase of infectious inflammation after stimulation of Toll-like receptors [7;8]. In addition, other cells have been proved to produce IL-6, including several cancer cells [5–7]. In physiological conditions, IL-6 modulates the transcription of several hepatic genes, particularly C-Reactive Protein (CRP) and other acute-phase proteins like serum amyloid A (SAA), antichymotrypsin, fibrinogen, haptoglobin, and hepcidin that is implicated in inflammatory anemia through the blockade of ferroportin 1, an iron transporter [9–12].

On the opposite, IL-6 reduces the level of albumin, transferrin, fibronectin and cytochrome P450, and more recently it was demonstrated that CYP3A4 mRNA expression was most reduced by IL-6 followed by CYP2C9 and CYP2C19 [13;14]. Serum CRP and SAA levels have been correlated with circulating IL-6, thus they represent major surrogate biomarkers to follow patients having anti-IL6 therapy [15–17].

INTERLEUKIN-6 BELONGS

TO THE GLYCOPROTEIN (gp) 130 RECEPTOR FAMILY

AND INTERACTS WITH THE INTERLEUKIN-12 FAMILY (fig. 2)

Cytokines are acting through cell membrane receptors that activate some intracellular pathways. Type-I cytokines include the IL-6 and IL-12 families. Both of them are structurally related of four-helix bundle proteins. Members of the IL-6 family are secreted as single-subunit monomers.

On the opposite, IL-12 family members form heterodimeric complexes. The IL-12 family α subunits (p19, p28, p35) are structurally homologous to IL-6 family cytokines, which include IL-6, IL-11, leukemia inhibitory factor (LIF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), neuropoetin (NP), cardiotrophin-1 (CT-1), cardiotrophin-like cytokine (CLC), and oncostatin M (OSM). These α -subunits can pair with 2 possible β subunits (p40 and Ebi3), structurally similar to the membrane-bound receptors for IL-6 cytokines (IL-6Ra, IL-11Ra, and CNTFRa). IL-12 family β -subunits lack a transmembrane do-main and are secreted as soluble a/b heterodimers. So, the IL-12 family associates four cytokines with unique a/b subunit pairings: IL-12 (p35/p40), IL-23 (p19/p40), IL-27 (p28/Ebi3), and IL-35 (p35/Ebi3).

The gp130 receptor chain (also named CD130) represents the β subunit of the IL-6R complex which transmits the signal for the IL-6 family and IL-27 a common member to the IL-12 family [21]. Gp130 is expressed in almost all organs, and it plays a fundamental role in embryonic development, as well as development of hematopoiesis, cell survival and growth.

This receptor system explains the unique characteristics of the IL-6 family, pleiotropy derived from the expression profiles of their receptor α -subunits and redundancy shared their common β -subunit, gp-130, ubiquitously expressed. For example, LIF receptor (LIF-R) is expressed, but not IL-6R, on cardiomyocytes. IL-6R and IL-11R are present in different organs explaining the control megacaryopoiesis, liver regeneration. CNTF, LIF, and CLC act as neurotrophic factors important for the survival and development of motor neurons.

SIGNALING OF INTERLEUKIN-6 RECEPTOR

IL-6 first binds to IL-6 soluble receptor or at the cell membrane, the α -subunit receptor (IL-6R, also named CD126) which, after dimerization with gp130, leads to activation of receptor-associated kinases (JAK1, JAK2, and Tyk2). These actions lead to phosphorylation of proximal tyrosine residues within the intracellular portion of gp130, and the subsequent control of STAT1 and STAT3 activity, and the Src homology region 2 domain-containing phosphatase 2 cascade. In addition to STATs, there are 2 other signaling pathways downstream of gp130, ERKs and PI3 kinase/Akt (for review 18–25). There is an alternative IL-6 pathway that is trans-signaling [26]. In this situation, IL-6 binds to a naturally occurring soluble IL-6R (sIL-6R) and this IL-6/sIL-6R complex activates gp130. Therefore, cells lacking the membrane bound IL-6R can respond to IL-6. If many cytokines receptors exist in a soluble form, the majority of them such as sTNFR, act as antagonists, competing with the membrane bound receptors for their ligands. On the opposite, sIL-6R acts as an agonist that amplify IL-6 effects, by 1/enlarging the spectrum of IL-6 target cells due to the fact that cells that do not express IL-6-R can be stimulated by the complex IL-6/sIL-6R, and 2/ amplifying the activity of IL-6 on cells which present IL-6R, such as hepatocytes.

The generation of the human sIL-6R is supported by two mechanisms. The first mechanism is called shedding and corresponds to limited proteolysis from the membrane bound receptor. This reaction is carried out by transmembrane metallo-proteinases, like the ADAM-proteases [27], particularly ADAM-17 which could be induced by different stimuli including the acute phase protein C-reactive protein [28], bacterial toxins, apoptosis, cholesterol depletion, P2X7-receptor-, and G protein-coupled receptor-activation (for review 29). The second mechanism by which soluble receptors can be generated is translation from alternatively spliced mRNA that lack the coding region of the transmembrane domain [30].

In normal healthy individuals, the sIL-6R protein is found in peripheral blood at concentrations of about 50-80 ng/ml [31]. The sIL-6R serum levels is increased about 2-fold in some inflammatory diseases, which corresponds to IL-6 levels elevated up to several hundred fold [32; 33]. In addition, sIL-6R levels were increased by 51% in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) (mean value: 135 ng/ml), by 44% in patients with early MM (mean value: 128 ng/ml) and by 116% in patients with overt MM (mean value: 193 ng/ml) and was not modified under therapy for patients having MM [34].

Recently, it has been shown that the Asp358Ala variant in the IL6R gene was associated with a clear anti-inflammatory effect as attested by reduced concentrations of C-reactive protein (per-allele reduction 7,5% and 8,4%, respectively) and fibrinogen (per allele reduction 1,0% and 0,9%, respectively). So, the Asp358Ala IL6R affects proteolytic cleavage of the membrane-bound receptor, leading to reduced concentrations of the membrane-bound form with concomitant higher circulating concentrations of the soluble form of the receptor, and resulting to a reduction of the IL6 signalling on hepatocytes, monocytes, or macrophages. Furthermore, this anti-inflammatory effect observed in population having this genetic change was accompanied by a reduced risk of coronary heart disease (per-allele reduction 3,4% and 5,0%, respectively) [35; 36].

BIOLOGICAL ACTIVITY OF INTERLEUKIN-6

Immune system

In lymphocyte functions, IL-6 acts on both T and B lymphocyte lineages. So, IL-6 is implicated in B-cell differentiation, particularly into immunoglobulin-producing cells. It has been implicated in the proliferation of normal plasmablastic cells [37]. On T-cell lineage, IL-6 possesses different functions, in combination to Transforming Growth Factor (TGF)- β , Th17 differentiation from naïve CD4 cells, a subpopulation that is implicated in auto-immune process [38]. In addition, IL-6 inhibits the production of regulatory T-lymphocytes induced by TGF- β [39]. However, IL 27, a member of the IL12/IL6 cytokine family possesses activities on CD4 T cell subsets, including T regulatory type 1 (Tr-1) cells, T follicular helper cells, and T regulatory cells. Furthermore, the IL-27p28 subunit acts as a cytokine receptor antagonist [20].

Haematopoiesis and bone resorption

In haematopoiesis, IL-6 is implicated in different processes, from early haematopoiesis to different cell lineage maturation, particularly for megacaryocyte lineage, in conjunction with IL-11 [40].

In bone resorption, IL-6 interacts with different pathways, including cyclooxygenase (Cox)-2, Wnt, TGF- β , and NF κ B. IL-6 stimulates the expression of Cox-2 in osteoblasts and osteoclasts, and the production of prostaglandin E2 (PGE2). PGE2 acts as a mediator of osteoclast activation by increasing the expression of RANKL in osteoblasts and the expression of RANK in osteoclasts [41]. In addition, IL-6 induces the expression of PGE2 receptors, EP2, and EP4 in osteoblasts, resulting in production of PGE2 via Cox-2 and enhancing PGE2 response by increasing the number of PGE2 receptors at the cell surface [42]. IL-6 also interacts with the Wnt signaling pathway. Wnt controls osteogenesis and the synthesis of collagen. Wnt is controlled by several inhibitors, in particular Dickkopf-1 (DKK-1), a soluble protein that, when bound to Wnt, prevents its interaction with Frizzled and the lipoprotein co-receptor protein LRP5/6, and thus inhibits Wnt signaling [43;44]. In addition, LIF, a member of the IL6/gp130 family has been shown to possess a central role in bone metabolism, particularly acting in signaling cascades for different cells such as stromal cells, chondrocytes, osteoblasts, osteocytes, adipocytes, and synovial fibroblasts [45].

Angiogenesis, cardiovascular and muscle effects

The gp130 cytokine family is known to act on cardiomyocytes, promoting cell survival and angiogenesis through the JAK/STAT pathway. Activation of gp130 in cardiac stem cells induces their endothelial transdifferentiation, leading to neovascularization. IL-6 has no direct effect and sIL-6R confers the ability for an activity of IL-6 on cardiac progenitor differentiation [46].

IL-6 is secreted during muscular exercise and its amplitude depends on the exercise type and IL-6 is implicated in the glucose liberation by hepatocytes [47]. Combined to lipolysis, this IL-6 effect contributes to mobilise energy for muscle.

Endocrinology and Metabolism

IL-6 has been demonstrated as implicated in different metabolism pathways, including nitration, glucose controls and adipocytes. An estimated one-third of the total basal IL-6 concentration in healthy individuals is estimated to originate from adipose tissue, where macrophages are infiltrating, particularly in overweight status [48;49]. Chronic low-grade inflammation, often linked to oxidative stress, is a common feature of obesity, insulin resistance and type 2 diabetes. So, elevated plasma IL-6 is associated with obesity-related insulin resistance, but not necessarily with Type-2 diabetic state [50]. The role of IL-6 in insulin resistance is sustained by SOCS-3 expression, and subsequent impairment of insulin signaling, is controlled by mTOR

regulation of the phosphorylation of the transcription factor STAT3. Furthermore, IL-6 directly interfere lipid metabolism and activates path-ways that increase energy turnover, particularly lipolysis by lowering adipose tissue liprotein lipase activity [51]. This explains the fact that in patients having anti-IL6 therapy, lipid and cholesterol serum levels are increased. In addition, other gp130 cytokines have been demonstrated to interfere with lipid metabolism and adipose tissues, including some of them having an anti-obesity clinical efficacy [52]. However, IL-6 polymorphism may be associated to obesity risk and fatty-acid intake may influence obesity and IL-6 production (for review 53). Based on follow-up of the Whitehall II study including 2496 men and 1026 women, the mean increases in CRP and IL-6 were 0,08 mg/liter and 0,04 pg/ml per 1-kg increase in body weight during follow-up, confirming the linkage between obesity and in-inflammatory process [54]. In addition, the gp130 cytokine family has been de-scribed as important cytokines implicated in nidation and pregnancy, particularly LIF [55–57].

Neural stem cell differentiation and psychiatric linkage

Cytokines that belongs to gp130 family and Bone Morphogenetic Proteins (BMP) act in synergy on neuroepithelial cells to induce astrocyte differentiation. Cooperation of these two types of moléculs is explained by the the production of a complex between their respective downstream transcription factors (STAT-3 and Smad1), bridged by a transcriptional coactivator (p300) [58]. Among the gp130 family, CNTF has been described as one of the major factor implicated in neural differentiation. CNTF is expressed in glial cells within the central and peripheral nervous systems. It stimulates gene expression, cell survival or differentiation in a variety of neuronal cell types such as sensory, sympathetic, ciliary and motor neurons. In addition, LIF has been shown to exert an opposing effect on IL-6-induced signal transducer and activator of STAT3 phosphorylation required for Th17 cell differentiation by triggering a signaling cascade that activated extracellular signal-regulated MAP kinase (ERK) and upregulated suppressor of SOCS3 expression [59]. IL-6 and CRP have been observed as biomarkers associated with depression [60–62]. In addition, a recent meta-analysis concludes that normalization of over-active inflammatory processes is observed after antidepressant treatment [63].

IL-6 and biological cross-talking

Cytokines are regulatory proteins, produced by different cell types. They act in response to many stimuli. The interaction between the endocrine and immune system is based on the observation of several common mechanisms: 1/ cells of both systems have receptors to cytokines, neuropeptides and neurotransmitters, 2/ immunoneuroendocrine products are found in both systems, 3/ endocrine mediators modulate the immune system, and 4/ immune structures mediators may affect the endocrine system.

Steroid hormones affect the immune response by acting on gene expression in cells having receptors for hormones. In addition, immune cells via receptors, bind to steroids, growth hormone, estradiol and testosterone. The hypothalamicpituitarythyroid axis can be inhibited by different inflammatory cytokines including IL-6 and the hypothalamicpituitaryadrenal axis may influence immune function with glucocorticoids suppressing the maturation, differentiation and proliferation of immune cells. The hypothalamicppituitary axis can also modulate the immune function. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is also involved in the process of developing and modulating the immune system.

In addition, IL-6 is implicated in aging [64]. IL-6 and the gp130 family has been described as associated with senescence, including osteoporosis, cardiovascular risk and other risks. Low levels of inflammatory markers are associated with better survival in older adults, independent of age and other clinical and functional variables.

The different anti-IL-6 drugs : is there any arguments for choice ?

The lessons from anti-IL-6 murine monoclonal antibodies (MoAbs)

In early 1990, clinical trials with B-E4 and B-E8 murine MoAbs were conducted in the context of MM. The first patients treated included plasma cell leukaemias, thus confirming that IL-6 was an in vivo proliferation factor, with a reduction of circulating myeloma cells, and particularly proliferative myeloma cells [65;66]. In addition, we observed no major toxicity, except a transient and mild (25%) decrease of platelet count which is expected with such a drug active on platelet differentiation and maturation. Objective response with a decrease of the monoclonal component was observed, including for refractory patients [67].

Another clinical study was performed in metastatic renal cell carcinoma and a total of 54 patients having these 2 diseases were treated in our center [7; 15; 16]. In addition, daily production of IL-6 could be calculated by knowing the different pharmacological parameters, including the dissociation constants, from 10^{-9} M between sIL-6R and IL-6, 10^{-9} M between IL-6 and IL-6R, and 10^{-11} M between the murine MoAb and the cytokine [68]. Furthermore, it has been observed an accumulation of IL-6 in the form of stable monomeric immune complexes throughout treatment with the murine MoAb [69]. We also could calculate that, during Escherichia coli sepsis, the IL-6 production may reach 8 mg, representing a huge quantity of the cytokine [70]. In addition, CRP serum levels was demonstrated to be the surrogate marker to be abolished, thus representing the range of the biological efficacy. So, daily production less than 18µg was associated with CRP abrogation and correlated to clinical response [16]. We also described the kinetic of inflammatory protein reduction, from a total and rapid control of CRP and SAA, to a delayed and partial increase of albumin serum level, observed at least after 18 to 21 days of anti-IL-6 blockade. Platelet count decreased by 25 to 50% under anti-IL-6,

and it has been observed a rise of the hemoglobin level to 1 to 1.5 g/dL due to inflammation control. No major change was seen in different circulating T-, NK, B-lymphocytes and complement molecules.

The anti-IL-6 drugs

There are several anti-IL-6 MoAbs that have been developed, including CNTO328 or siltuximab in clinical development (randomized Phase II) in MM and Castleman's disease in addition to Phase I study in metastatic renal cell carcinoma and prostate cancer [17;71]. Human anti-IL6 MoAb (sirukumab) has been developed, with PK/PD and safety analyzed in healthy subjects in a first-in-human study. This drug has a terminal median half-life ranging from 18.5 to 29.6 days with no serious adverse events [72]. Additional targets have been actively investigated within IL-6 signaling pathway, and the IL-6 membrane receptor subunit gp80 is an attractive candidate. So, Sant7 is a potent antagonist of the IL-6 receptor, engineered through targeted amino acid substitutions in key residues of the human IL-6 molecule. It shows higher affinity than IL-6 for the gp80 receptor subunit, but completely lacks binding capacity to the gp130 receptor signaling subunit, thus efficiently blocking IL-6 biological activity [73;74]. Anti-sIL-6 R MoAb has been developed, particularly tozilizumab, in dysimmune diseases [75]. Recently, it has been developed targetted "masked" antibodies, activated by disease associated proteases, developed by CytomX Therapeutics Inc. [76].

Basis for phamacological effects of antagonists

The affinity constants are well known as previously described, around 10^{-9} M between sIL-6R and IL-6, similarly between IL-6 and IL-6R [69]. In a clinical study using the murine anti-IL-6 MoAb BE-8 for patients with MM, total inhibition of CRP production was only achieved in patients producing <18 μ g/day of IL-6 [17], which equates to a mean concentration of ~ 6 ng/mL per day, assuming a blood volume of $\sim 3\,000$ mL. During the previous study of siltuximab in patients with MM, IL-6 levels reached 50 pg/mL, with median IL-6 production rates of 60 mg/day [17]. The 5- μ g/mL siltuximab trough concentration initially proposed as a target for the starting dose of this study was based on maintaining at least a 300-fold molar excess of antibody to total serum concentration and IL-6 production. This excess quantity was considered necessary to block IL-6 activity to below the level required to support tumor growth [69] based on the dissociation constant of the anti-IL-6 antibody/IL-6 complex. In the Phase I study on metastatic RCC, administration of siltuximab at 6 mg/kg every 2 weeks seemed to effectively suppress serum CRP in all patients, all of whom had a baseline CRP of ≤ 30 mg/L [77]. In addition, a two-compartment PK model adequately described the serum siltuximab concentration-time data. CRP serum level was chosen as the main surrogate marker, defining the biological efficient dose when it was inferior to 4mg/L.

The mean indirect response PK/PD model generated a PD Kin value of 20 $\mu\text{g/L/d}$ and a Kout parameter value of 0.64 1/d. The Kout parameter estimate corresponded to a half-life of ~ 1 day. Simulations were conducted using the mean PK and PD parameter estimates to evaluate various doses and clinically relevant schedules of siltuximab with a dosage of 6 mg/kg every 2 weeks or 9 mg/kg every 3 weeks [77].

By combining two anti-IL-6 MoAbs, the cytokine was stabilized. Simultaneous treatment with three anti-IL-6 antibodies, binding to three distinct epitopes, induced the rapid uptake of the trimeric immune complexes by the liver and the elimination of IL-6 from the central compartment [68]. The use of anti-IL-6 and anti-IL-6R allows to completely block IL-6 activation mechanisms and particularly trans-activation mechanisms. Other more recent approaches have been developed by using probodies against gp80 or gp130.

Clinical results

Dysimmune diseases

Tozilizumab, the anti-sIL-6R MoAb developed initially by Kishimoto's group has demonstrated its efficacy either as monotherapy or in combination with disease-modifying antirheumatic drugs for adult patients with moderate to severe RA [78–83]. A Cochrane database systematic review concluded that anti-IL-6R MoAb-treated patients were four times more likely to achieve American College of Rheumatology (ACR) 50% improvement (38.8% versus 9.6%) and 11 times more likely to achieve Disease Activity Score remission (30.5% versus 2.7%) [84]. Thus, anti-IL-6R MoAb is now been approved for the treatment of RA in more than 90 countries worldwide. The outstanding results obtained with biologics such as anti-IL-6Rab in the treatment of RA led to a change in the treatment objective from protection against joint destruction to prolongation of life expectancy with normal activities of daily living. Safety has been reported from 6 studies performed in Japan. The incidence of adverse events (AEs), including abnormal laboratory test results, was calculated as 465.1 per 100 patient-years, with infections as the most common with 6.22 per 100 patient-years. In addition, as expected, increases in lipid and liver function parameters, were observed, but most were mild. In addition, tozilizumab is a promising drug for systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, polymyositis, Takayasu and giant cell arteritis, Crohn's disease, relapsing polychondritis, multiple sclerosis, Still's disease, Behçet's disease [18].

Castleman's disease

Castleman's disease is a lymphoproliferative disease characterized by benign hyperplastic lymph nodes, follicular hyperplasia, and capillary proliferation accompanied by vascular hyperplasia and expression of IL-6 mainly due to viral IL-6 produced by Kaposi sarcoma (KS)-associated herpes virus (KSHV or human her-

pes virus 8) which directly binds and stimulates gp130 in the absence of gp80. All HIV-positive and half of the HIV-negative patients with multicentric Castleman's disease were infected with KSHV [85]. B-E8 was first used by Beck et al. from Little Rock, for a patient having Castleman's disease [86]. Tozilizumab was registered in Japan as an orphan drug in 2005, for this disease. Recently, siltuximab was also shown as an active drug in such a disease, in a Phase I study followed by a randomized Phase II study in multicentric non HIV-Castleman's diseases in order to get a registration of the drug as well as tozilizumab.

Multiple Myeloma

IL-6 was first described as an autocrine factor for myeloma cells by Kishimoto's group. Klein et al. demonstrated that IL-6 is more a paracrine survival factor for MM cells, mainly produced by the micro-environment [87–90]. IL-6 and IGF1 represent the main proliferation/survival factors for myeloma cells. Other factors have been described, including BAFF/APRIL, mainly produced by osteoclasts, Hb-EGF, HGF, VEGF and others. Syndecan-1 (CD138) has been described as a major molecule produced by the tumoral cells, with a shedding leading to a soluble form that is regulated by heparanase, mainly produced by osteoclasts [91]. BE-4 and BE-8, murine MoAbs were first used in Montpellier for patients having MM [66;67], and we demonstrated that IL-6 was a survival/proliferation factor *in vivo*. In addition, CRP was demonstrated as the surrogate marker defining the optimal biological dose when CRP was controled, a situation that corresponds to a daily production less than 18µg. Furthermore, BE-8 combined to melphan 140mg/m² plus autologous transplantation was suggested to be an active association for lowering tumor mass as effective than melphalan 200mg/m² in an historic comparison (personal data). The MoAb was administered at least for 21 days till haematological recovery, covering the period of aplasia associated with the IL-6 production. Furthermore, Moreau et al. showed that the combination of melphalan 220mg/m² and BE-8 was effective in relapse/refractory patients having MM [92]. A randomized study, from the Intergroupe Francophone du Myélome (IFM) (IFM99–04) demonstrated that the association between BE-8 and melphalan high dose plus autologous peripheral blood stem cell transplantation was not associated with a survival or progression-free survival [93].

Nevertheless, this study exhibits several biases that render the results unacceptable : 1/only aggressive patients were included in the study ; 2/BE-8 was given only for 3 days after melphalan high dose, despite the fact that we observed a peak of *in vivo* IL-6 production between day 7-11 post-transplantation, leading to a huge accumulation of free IL-6, the survival factor for tumoral cells; 3/no information on the biological effect of BE-8 was collected, particularly CRP serum levels. So, this protocol was a major example of a non usefull program with the worse conditions for targeting IL-6 *in vivo*.

All of these reasons support the fact that anti-IL-6 could have a positive impact on MM and siltuximab was tested in different clinical trials, first starting in a Phase I study showing that tolerance was acceptable with clinical responses [94]. This Phase I study was followed by a Phase I/II study and randomized studies in advanced diseases and in front-line therapy with bortezomib (95 and ongoing studies). Siltuximab was proven to have a synergistic effect in vitro when associated to different drugs such as melphalan, bortezomib, dexamethasone and other targeted drugs [96–98]. From all of these ongoing studies, the combination of anti-IL-6 and bortezomib represents an active combination, supporting the fact that this drug may have a major place in the treatment for MM, at different times, during induction therapy, reinforcement post-transplantation or maintenance therapy, better named as control of residual disease. In addition, CRP has been shown to enhance myeloma cell proliferation under stressed conditions and protected tumoral cells from chemotherapy drug-induced apoptosis in vitro and in vivo. In addition, CRP was proven to bind activating Fcγ receptors, activates PI3K/Akt, ERK, and NF-κB pathways, and inhibits caspase cascade activation induced by chemotherapy drugs. Furthermore, CRP increases IL-6 production and synergized with IL-6 to protect myeloma cells from chemotherapy drug-induced apoptosis [99]. Recently, it has been demonstrated a clonal competition with alternating dominance in MM, a situation that needs to totally review the therapy for patients having MM [100; 101]. This means that criteria for therapeutic choice are now available opening a new therapeutic era for all the drugs, including specific targets such as anti-IL-6.

Other haematological malignancies

IL-6/CRP was shown to be a prognostic factor in several B-cell malignancies, particularly malignant lymphoma [102;103]. IL-6 has been found as a biologic marker in different other lymphoid malignancies, including Hodgkin's disease, cutaneous CD30-positive lymphomas and KSHV-associated malignancies [104–107]. Polymorphism of different cytokines, and particularly IL-6 (IL-6-174GG genotypes) had a significantly lower probability of freedom from treatment failure in Hodgkin's disease [108]. In addition, the majority of B cell tumours expressed one or both of the IL-6 receptors, except neoplasia of immature B cells, mantle cell lymphoma being found to express the highest density of receptors [109]. BE-8 has been used in 11 patients having HIV-associated lymphoma, showing a clinical benefit observed, particularly on B symptoms [110], and in one patient with acute monoblastic leukaemia [111]. Thus, gp130 signalling might play an important role in the pathogenesis of certain B cell neoplasia, and new clinical programs could be developed in such diseases.

Metastatic renal cell carcinoma

IL-6 was shown to be an autocrine proliferation factor in several cell lines obtained from patients having metastatic renal cell carcinoma (mRCC) [112;113].

The mutation of p53 contributes to the overexpression of IL-6 in such a disease [114]. We and others have demonstrated that CRP/IL-6 are prognostic factors in mRCC [15;115;116]. Furthermore, we demonstrated a significant association between the presence of the IL-6R in tumours and tumour stage, nuclear grade, proliferation index, and serum IL-6 [117].

Treatment of RCC cells with cisplatin (CDDP) in combination with anti-IL-6 MoAb or anti-IL-6R MoAb can overcome their CDDP-resistance by down-regulation of glutathione S-transferase π expression [118]. Furthermore, in a Phase I study, the use of IL-6 and GM-CSF for patients having RCC was associated with inverse clinical effects [119]. We treated 18 patients suffering mRCC with BE-8, demonstrating a clinical benefit, including abrogation of fever, hypercalcemia, inflammatory syndrome, reduction of anemia and morphin intake, increase of weight, with objective response observed (2/18 patients with partial response, one minor response and one stable disease) [7;15;120].

Siltuximab was used in a Phase I/II study, showing that this drug stabilised disease in >50% of progressive mRCC patients, with one partial response and a favourable safety profile, a situation that could authorize further evaluation of dose-escalation strategies and/or combination therapy [17]. Nevertheless, to our knowledge, no further studies was performed.

Prostate cancer

IL-6 produced in adipose tissue plays a role in lipid metabolism, and also interacts with sex steroids. IL-6 acts as a paracrine and autocrine growth factor for both benign and cancer prostate cells.

The levels of IL-6 and IL-6R are increased during prostate carcinogenesis and tumor progression. In addition, it has been reported a correlation between increased serum and plasma IL-6 and soluble IL-6R levels with aggressiveness of the disease. During the treatment of prostate cancer, a castration-resistance appears generally leading to the death of the patient. So, it is important to understand the mechanisms of such a situation. The signaling pathway mediated by IL-6 represents an alternative pathway in the cancer-resistance phenotype acquisition and cancer progression [121;122].

During androgen deprivation therapy a regulation loop may emerge between sex steroids and IL-6, with a strong positive correlation with total-testosterone, androstenedione, and estradiol levels [123]. Other gp130 cytokines, such as OSM have been implicated in tumor progression, by promoting Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and urokinase plasminogen activator (u-PA) [124].

A meta-analysis was recently performed for evaluating IL-6 genetic polymorphism -174G/C with susceptibility to prostate cancer, with an increased risk observed in two cohort studies from one article, needing additional well-designed studies to validate these findings [125].

All of these data shows the importance of the IL-6/IL-6R pathway in regulation of prostate cancer cells. So, a Phase I study including 20 patients scheduled to undergo radical prostatectomy, was designed with patients received either no drug or siltuximab (6 mg/kg, 5 patients/group with administration once, two times, and three times prior to surgery). It was observed a decrease in phosphorylation of Stat3 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases, with down-regulation of genes immediately downstream of the IL-6 signaling pathway and key enzymes of the androgen signaling pathway [126].

A Phase II study was designed by SWOG in chemotherapy-pretreated patients with castration-resistant prostate cancer, showing stable disease in 7 patients (23%) but with an increase of IL-6 after therapy which may translate an accumulation of the cytokine resulting in a lack of a clinical benefit [127].

Combination of mitoxantrone/prednisone plus siltuximab was not associated with a clinical improvement in a randomized Phase II study, as compared to chemotherapy alone [71]. Other molecules have been shown to support an activity on tumorigenesis in prostate cancer, such as some polyphenols, by mediating a decrease IL-6 signaling [128]. Due to a rise in IL-6 both in vitro and in vivo in the presence of tyrosine kinase resistant cell line, IL-6 may represent a biomarker for tyrosine kinase resistance [129].

Possible other indications

IL-6 inhibition may represent a good therapeutic indication in other cancers, including ovarian cancer. Recently, it was demonstrated a correlation between thrombocytosis and IL-6 and thrombopoietin secretion in 619 patients [130]. In addition, neutralizing IL-6 significantly enhanced the therapeutic efficacy of paclitaxel in mouse models of epithelial ovarian cancer, reducing tumor growth and angiogenesis [130;131]. Squamous cell carcinoma, melanoma, hepatocellular carcinoma and neuroblastoma have been also studied supporting the interest for developing anti-IL-6 therapy in such solid tumors [7;132–135].

In addition, tocilizumab has been tried in different other dysimmune diseases such as autoimmune hemolytic anemia associated with Castleman's disease and in steroid refractory graft-versus-host disease [136;137].

In conclusion, blocking IL-6 represents a new therapeutic way for different diseases from cancers, including haematological malignancies such as B-lymphoid neoplasms, and some solid tumors such as ovarian cancer and others, to dysimmune diseases.

There are several molecules that trigger this cytokine system, including anti-IL-6 MoAbs (siltuximab, and other humanized anti-IL-6 MoAbs), anti-IL-6R (tocilizumab, and other humanized anti-IL-6R) or JAK/STAT pathway inhibitors. By using such molecules, clinical benefits has to be analyzed when efficient biological dose is reached. A novel era for such therapeutic tools is now open.

REFERENCES

1. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986; 324:73–76
2. Sutherland GR, Baker E, Callen DF, Hyland VJ, Wong G, Clark S, Jones SS, Eglinton LK, Shannon MF, Lopez AF, et al. Interleukin 4 is at 5q31 and interleukin 6 is at 7p15. *Hum Genet.* 1988; 79:335–7.
3. Wilop S, van Gemmeren TB, Lentjes MH, van Engeland M, Herman JG, Brümmendorf TH, Jost E, Galm O. Methylation-associated dysregulation of the suppressor of cytokine signaling-3 gene in multiple myeloma. *Epigenetics.* 2011; 6:1047–52.
4. Wehbe-Janek H, Henson R, Smith H, Patel TMeng F. Epigenetic regulation of microRNA-370 by interleukin-6 in malignant human cholangiocytes. *Oncogene.* 2008; 27: 378–86.
5. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood* 1989 ; 74:1–10.
6. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine – 40 years in immunology. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23:1–21
7. Trikha M, Corringham R, Klein B, Rossi JF. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 4653–65.
8. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2004, 4: 499–511
9. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J* 1990 ; 265:621–36.
10. Siewert E, Bort R, Kluge R, Heinrich PC, Castell J, Jover R.. Hepatic cytochrome P450 down- regulation during aseptic inflammation in the mouse is interleukin 6 dependent. *Hepatology* 2000 ; 32: 49–55 6.
11. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J. Clin. Invest.* 2004, 113:1271–76.
12. Obici L, Perfetti V, Palladini G, Moratti R, Merlini G. Clinical aspects of systemic amyloid diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 2005, 1753:11–22.
13. Schultz DR, Arnold PI. Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, and fibrinogen. *Semin Arthritis Rheum.* 1990 ; 20: 129–47.
14. Kim S, Ostör AJ, Nisar MK. Interleukin-6 and cytochrome-P450, reason for concern? *Rheumatol Int.* 2012 Mar 27.
15. Blay JY, Favrot M, Rossi JF, Widjenes J. Role of interleukin-6 in paraneoplastic thrombocytosis. *Blood* 1993, 82 : 2261–62.

16. Rossi JF, Fegueux N, Lu ZY, Legouffe E, Exbrayat C, Bozonnat MC, Navarro R, Lopez E, Quittet P, Daures JP, Rouillé V, Kanouni T, Widjenes J, Klein B. Optimizing the use of anti-interleukin-6 monoclonal antibody with dexamethasone and 140 mg/m² of melphalan in multiple myeloma: results of a pilot study including biological aspects. *Bone Marrow Transplant.* 2005; 36: 771–9.
17. Rossi JF, Négrier S, James ND, Kocak I, Hawkins R, Davis H, Prabhakar U, Qin X, Mulders P, Berns B. A phase I/II study of siltuximab (CNTO 328), an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, in metastatic renal cell cancer. *Br J Cancer.* 2010; 103: 1154–62.
18. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Therapeutic targeting of the interleukin-6 receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2012, 52 :199–219.
19. Fujio Y, Maeda M, Mohri T, Obana M, Iwakura T, Hayama A, Yamashita T, Nakayama H, Azuma J. Glycoprotein 130 cytokine signal as a therapeutic target against cardiovascular diseases. *J Pharmacol Sci* 2011, 117 :213–222.
20. Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest* 2011, 121 : 3375–83.
21. Jones LL, Vignali DAA. Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. *Immunol Res* 2011, 51 :5–14.
22. Tait Wojno ED, Hunter CA. New directions in the basic and translational biology of interleukin-27. *Trends in Immunol* 2012, 33 : 91–97.
23. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003; 374(Pt 1):1–20.
24. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 2012; 122: 143–59.
25. Dayer JM, Choy E. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. *Rheumatology (Oxford).* 2010 ; 49: 15–24.
26. Rose-John S, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J* 1994; 300: 281–90.
27. Althoff K, Reddy P, Peschon J, Voltz N, Rose-John S, Mullberg J. Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *Eur J Biochem* 2000; 267: 2624–31.
28. Jones SA, Novick D, Horiuchi S, Yamamoto N, Szalai AJ, Fuller GM. C-reactive protein: a physiological activator of interleukin 6 receptor shedding. *J Exp Med* 1999; 189: 599–604.
29. Drucker C, Gewiese J, Malchow S, Scheller J, Rose-John S. Impact of interleukin-6 classic and trans-signaling on liver damage and regeneration. *J autoimmunity* 2010, 34 : 29–37.

30. Lust JA, Donovan KA, Kline MP, Greipp PR, Kyle RA, Maihle NJ. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cyto-kine* 1992; 4: 96–100.
31. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, et al. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment. *Immunity* 2001; 14: 705–14.
32. Honda M, Yamamoto S, Cheng M, Yasukawa K, Suzuki H, Saito T, et al. Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. *J Immunol* 1992; 148: 2175–80.
33. Richards PJ, Nowell MA, Horiuchi S, McLoughlin RM, Fielding CA, Grau S, et al. Functional characterization of a soluble gp130 isoform and its therapeutic capacity in an experimental model of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1662–72.
34. Gaillard JP, Bataille R, Brailly H, Zuber C, Yasukawa K, Attal M, Maruo N, Taga T, Kishimoto T, Klein B. Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy. *Eur J Immunol*. 1993 ; 23: 820–4.
35. IL6R Genetics Consortium Emerging Risk Factors Collaboration. Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies. *Lancet*. 2012; 379: 1205–1213.
36. Interleukin-6 Receptor Mendelian Randomisation Analysis (IL6R MR) Consortium, Hingorani AD, Casas JP. The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: a mendelian randomisation analysis. *Lancet*. 2012; 379: 1214–24.
37. Tarte K, De Vos J, Thykjaer T, Zhan F, Fiol G, Costes V, Rème T, Legouffe E, Rossi JF, Shaughnessy J Jr, Ørntoft TF, Klein B. Generation of polyclonal plasmablasts from peripheral blood B cells: a normal counterpart of malignant plasmablasts. *Blood*. 2002; 100: 1113–22.
38. Kishimoto T. IL-6: from its... *Int Immunol*. 2010; 22: 347–52.
39. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH et al. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 2008, 453 : 65–71.
40. Schwertschlag US, Trepicchio WL, Dykstra KH, Keith JC, Turner KJ, Dorner AJ. Hematopoietic, immunomodulatory and epithelial effects of interleukin-11. *Leukemia*. 1999; 13: 1307–15.
41. Monroe DG, McGee-Lawrence ME, Oursler MJ, Westendorf JJ. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene* 2012, 492, 118.
42. Ara T, DeClerk YA. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur J Cancer* 2010, 46 :1223–31.
43. Gustafson B, Smith U. The WNT Inhibitor Dickkopf 1 and Bone Morphogenetic Protein 4 Rescue Adipogenesis in Hypertrophic Obesity in Human. *Diabetes*. 2012 Mar 23.

44. Hoepfner LH, Secreto FJ, Westendorf JJ. Wnt signaling as a therapeutic target for bone diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2009 Apr;13(4):485-96.
45. Sims NA, Johnson RW. Leukemia inhibitory factor: A paracrine mediator of bone metabolism. *Growth Factors*. 2012; 30: 768-7.
46. Fischer P, Hilfiker-Kleiner D. Survival pathways in hypertrophy and heart failure: the gp130-STAT3 axis. *Basic Res Cardiol*. 2007; 102: 279-97.
47. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev*. 2008; 88: 1379-406.
48. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82: 4196-200.
49. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003; 112: 1796-808.
50. Lagathu C, Bastard JP, Auclair M, Maachi M, Capeau J, Caron M. Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 311: 372-9.
51. Trujillo ME, Sullivan S, Harten I, Schneider SH, Greenberg AS, Fried SK. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89: 5577-82.
52. White UA, Stephens J. The gp130 receptor cytokine family : regulators of adipocyte development and function. *Curr Pharmacol Des* 2011, 17: 340-46.
53. Stryjecki C, Mutch DM. Fatty-acid-gene interactions, adipokines and obesity. *Eur J Clin Nutr* 2011, 65 : 285-97.
54. Fransson EI, Batty GD, Tabák AG, Brunner EJ, Kumari M, Shipley MJ, Singh-Manoux A, Kivimäki M. Association between change in body composition and change in inflammatory markers: an 11-year follow-up in the Whitehall II Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95: 5370-4.
55. Lemons AR, Naz RK. Birth control vaccine targeting leukemia inhibitory factor. *Mol Reprod Dev*. 2012; 79: 97-106.
56. Déchaud H, Maudelonde T, Daurès JP, Rossi JF, Hédon B. Evaluation of endometrial inflammation by quantification of macrophages, T lymphocytes, and interleukin-1 and -6 in human endometrium. *J Assist Reprod Genet*. 1998; 15: 612-8.
57. Dubinsky V, Poehlmann TG, Suman P, Gentile T, Markert UR, Gutierrez G. Role of regulatory and angiogenic cytokines in invasion of trophoblastic cells. *Am J Reproduct Immunol* 2010 ; 63 : 193-199.
58. Taga T, Fukuda S. Role of IL-6 in the neural stem cell differentiation. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005, 28 : 249-56.

59. Cao W, Yang Y, Wang Z, Liu A, Fang L, Wu F, Hong J, Shi Y, Leung S, Dong C, Zhang JZ. Leukemia inhibitory factor inhibits T helper 17 cell differentiation and confers treatment effects of neural progenitor cell therapy in autoimmune disease. *Immunity*. 2011; 35: 273–84.
60. Su JA, Chou SY, Tsai CS, Hung TH. Cytokine changes in the pathophysiology of poststroke depression. *Gen Hosp Psychiatry*. 2012; 34: 35–9.
61. Grassi-Oliveira R, Bauer ME, Pezzi JC, Teixeira AL, Brietzke E. Interleukin-6 and verbal memory in recurrent major depressive disorder. *Neuro Endocrinol Lett*. 2011;32(4):540–4.
62. Illman J, Corringham R, Robinson D Jr, Davis HM, Rossi JF, Cella D, Trikha M. Are inflammatory cytokines the common link between cancer-associated cachexia and depression? *J Support Oncol*. 2005 Jan-Feb;3(1):37–50.
63. Hiles SA, Baker AL, de Malmanche T, Attia J. Interleukin-6, C-reactive protein and interleukin-10 after antidepressant treatment in people with depression: a meta-analysis. *Psychol Med*. 2012 Feb 16:1–12.
64. Tsirpanlis G. Cellular Senescence and Inflammation: A Noteworthy Link. *Blood Purif* 2009; 28: 12–14
65. Klein B, Zhang XG, Lu ZY, Bataille R. Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood*. 1995; 85: 863–72.
66. Klein B, Wijdenes J, Zhang XG, Jourdan M, Boiron JM, Brochier J, Liautard J, Merlin M, Clement C, Morel-Fournier B, et al. Murine anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for a patient with plasma cell leukemia. *Blood*. 1991; 78: 1198–204.
67. Bataille R, Barlogie B, Lu ZY, Rossi JF, Lavabre-Bertrand T, Beck T, Wijdenes J, Brochier J, Klein B. Biologic effects of anti-interleukin-6 murine monoclonal antibody in advanced multiple myeloma. *Blood*. 1995; 86: 685–91.
68. Montero-Julian FA, Klein B, Gautherot E, Brailly H. Pharmacokinetic study of anti-interleukin-6 (IL-6) therapy with monoclonal antibodies: enhancement of IL-6 clearance by cocktails of anti-IL-6 antibodies. *Blood*. 1995; 85: 917–24.
69. Lu ZY, Brochier J, Wijdenes J, Brailly H, Bataille R, Klein B. High amounts of circulating interleukin (IL)-6 in the form of monomeric immune complexes during anti-IL-6 therapy. Towards a new methodology for measuring overall cytokine production in human in vivo. *Eur J Immunol*. 1992; 22: 2819–24.
70. Lu ZY, Brailly H, Rossi JF, Wijdenes J, Bataille R, Klein B. Overall interleukin-6 production exceeds 7 mg/day in multiple myeloma complicated by sepsis. *Cytokine*. 1993; 5: 578–82.

71. Fizazi K, J.S. De Bono, Flechon A, Heidenreich A, Voog E., Davis NB, Ming Qi, Bandekar R, Vermeulen JT, Cornfeld M, Hudes GR. Randomised phase II study of siltuximab (CNTO 328), an anti-IL-6 monoclonal antibody, in combination with mitoxantrone/prednisone versus mitoxantrone/prednisone alone in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur J Cancer* 2012; 48 : 85–93.
72. Xu Z, Bouman-Thio E, Comisar C, Frederick B, Van Hartingsvelt B, Marini JC, Davis HM, Zhou H. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of a human anti-IL-6 monoclonal antibody (sirukumab) in healthy subjects in a first-in-human study. *Br J Clin Pharmacol* 2011 ; 72 : 270–81.
73. Demartis A, Bernassola F, Savino R, Melino G, Ciliberto G. Interleukin 6 receptor superantagonists are potent inducers of human multiple myeloma cell death. *Cancer Res* 1996; 56: 4213–8.
74. Campo S, Serlupi-Crescenzi O, Arseni B, Rossi S, Saggio I, Salone B, Cherubini G, Carminati P, De Santis R. Comparative activity of Sant7 and anti-IL-6, IL-6R monoclonal antibodies in a murine model of B-cell lymphoma. *Cytokine*. 2005; 31: 368–74.
75. Atlizumab: anti-IL-6 receptor antibody-Chugai, anti-interleukin-6 receptor antibody-Chugai, MRA-Chugai. *BioDrugs*. 2003; 17: 369–72.
76. Thomas JM, Daugherty PS. Proligands with protease-regulated binding activity identified from cell-displayed prodomain libraries. *Protein Sci*. 2009; 18: 2053–9.
77. Puchalski T, Prabhakar U, Qun Jiao, Berns B, Davis HM. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of an anti-interleukin-6 chimeric monoclonal antibody (Siltuximab) in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 1652–1661.
78. Nishimoto N, Hashimoto J, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, et al. Study of active controlled monotherapy used for rheumatoid arthritis, an IL-6 inhibitor (SAMURAI): evidence of clinical and radiographic benefit from an X-ray reader-blinded randomized controlled trial of tocilizumab. *Ann. Rheum. Dis*. 2007 ; 66: 1162–67.
79. Emery P, Keystone E, Tony HP, Cantagrel A, van Vollenhoven R, et al. IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor biologicals: results from a 24-week multicentre randomized placebo controlled trial. *Ann. Rheum. Dis*. 2008 ; 67: 1516–23.
80. Smolen JS, Beaulieu A, Rubbert-Roth A, Ramos-Remus C, Rovensky J, et al. Efficacy of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Lancet* 2008 ; 371: 987–97.

81. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi, T, et al. Study of active controlled tocilizumab monotherapy for rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate (SATORI): significant reduction in disease activity and serum vascular endothelial growth factor by IL-6 receptor inhibition therapy. *Mod. Rheumatol.* 2009 ; 19: 12–19.
82. Jones G, Sebba A, Gu J, Lowenstein MB, Calvo A, et al. Comparison of to-cilizumab monother- apy versus methotrexate monotherapy in patients with mod-erate to severe rheumatoid arthritis: the AMBITION study. *Ann. Rheum. Dis.* 2010 ; 69: 88–96.
83. Kremer JM, Blanco R, Brzosko M, Burgos-Vargas R, Halland AM, et al. Tocilizumab inhibits structural joint damage in rheumatoid arthritis patients with inadequate responses to methotrexate: results from the double-blind treatment phase of a randomized placebo-controlled trial of tocilizumab safety and prevention of structural joint damage at one year. *Arthritis Rheum.* 2011 ; 63: 609–21.
84. Singh JA, Beg S, Lopez-Olivo MA. 2010. Tocilizumab for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst. Rev.* July 7(7):XΔ008331
85. Soulier J, Grollet L, Oksenhendler E, Cacoub P, Cazals-Hatem D, et al. Kaposi's sarcoma- associated herpesvirus-like DNA sequences in multi-centric Cas-tleman's disease. *Blood* 1995 ; 86:1276–80.
86. Beck JT, Hsu SM, Wijdenes J, Bataille R, Klein B, Vesole D, Hayden K, Ja-gannath S, Barlogie B. Brief report: alleviation of systemic manifestations of Cas-tleman's disease by monoclonal anti-interleukin-6 antibody. *N Engl J Med.* 1994; 330: 602–5.
87. Klein B, Tarte K, Jourdan M, Mathouk K, Moreaux J, Jourdan E, Legouffe E, De Vos J, Rossi JF. Survival and proliferation factors of normal and malignant plasma cells. *Int J Hematol.* 2003; 78: 106–13.
88. Sprynski AC, Hose D, Caillot L, Réme T, Shaughnessy JD Jr, Barlogie B, Seckinger A, Moreaux J, Hundemer M, Jourdan M, Meissner T, Jauch A, Mahtouk K, Kassambara A, Bertsch U, Rossi JF, Goldschmidt H, Klein B. The role of IGF-1 as a major growth factor for myeloma cell lines and the prognostic relevance of the expression of its receptor. *Blood.* 2009; 113: 4614–26.
89. Moreaux J, Sprynski AC, Dillon SR, Mahtouk K, Jourdan M, Ythier A, Moine P, Robert N, Jourdan E, Rossi JF, Klein B. APRIL and TACI interact with syndecan-1 on the surface of multiple myeloma cells to form an essential survival loop. *Eur J Haematol.* 2009; 83: 119–29.
90. Mahtouk K, Moreaux J, Hose D, Rème T, Meissner T, Jourdan M, Rossi JF, Pals ST, Goldschmidt H, Klein B. Growth factors in multiple myeloma: a compre-hensive analysis of their expression in tumor cells and bone marrow environment using Affymetrix microarrays. *BMC Cancer.* 2010 May 13;10: 198.

91. Bret C, Hose D, Reme T, Sprynski AC, Mahtouk K, Schved JF, Quittet P, Rossi JF, Goldschmidt H, Klein B. Expression of genes encoding for proteins in-volved in heparan sulphate and chondroitin sulphate chain synthesis and modifica-tion in normal and malignant plasma cells. *Br J Haematol.* 2009; 145: 350–68.
92. Moreau P, Harousseau JL, Wijdenes J, Morineau N, Milpied N, Bataille R. A combination of anti-interleukin 6 murine monoclonal antibody with dexamethasone and high-dose melphalan induces high complete response rates in ad-vanced multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2000; 109: 661–4.
93. Moreau P, Hullin C, Garban F, Yakoub-Agha I, Benboubker L, Attal M, Marit G, Fuzibet JG, Doyen C, Voillat L, Berthou C, Ketterer N, Casassus P, Monconduit M, Michallet M, Najman A, Sotto JJ, Bataille R, Harousseau JL; Intergroupe Francophone du Myélome group. Tandem autologous stem cell transplanta-tion in high-risk de novo multiple myeloma: final results of the prospective and randomized IFM 99-04 protocol. *Blood.* 2006 ; 107: 397–403.
94. van Zaanen HC, Lokhorst HM, Aarden LA, Rensink HJ, Warnaar SO, van der Lelie J, van Oers MH. Chimaeric anti-interleukin 6 monoclonal antibodies in the treatment of advanced multiple myeloma: a phase I dose-escalating study. *Br J Haematol.* 1998; 102: 783–90.
95. Rossi JF, Manges R, Sutherland H, Jagannath S, Voorhees P, Sonneveld P, Delforge M, Pegourie B, Alegre A, de la Rubia J, La Police D, Bandekar R, Rijnbeek B, Xie H, Orlowski R. CNTO 328 (Anti-IL-6 mAb) and bortezomib in subjects with relapsed or refractory multiple myeloma. Results from Part 1 of a Phase 2 study. *Blood.* 2008; 112: [abstract 867].
96. Hunsucker SA, Magarotto V, Kuhn DJ, Kornblau SM, Wang M, Weber DM, Thomas SK, Shah JJ, Voorhees PM, Xie H, Cornfeld M, Nemeth JA, Orlowski RZ. Blockade of interleukin-6 signalling with siltuximab enhances melphalan cytotox-icity in preclinical models of multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2011; 152: 579–92.
97. Voorhees PM, Chen Q, Small GW, Kuhn DJ, Hunsucker SA, Nemeth JA, Orlowski RZ. Targeted inhibition of interleukin-6 with CNTO 328 sensitizes pre-clinical models of multiple myeloma to dexamethasone-mediated cell death. *Br J Haematol.* 2009; 145: 481–90.
98. Voorhees PM, Chen Q, Kuhn DJ, Small GW, Hunsucker SA, Strader JS, Corringham RE, Zaki MH, Nemeth JA, Orlowski RZ. Inhibition of interleukin-6 signaling with CNTO 328 enhances the activity of bortezomib in preclinical mod-els of multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 6469–78.
99. Yang J, Wezeman M, Zhang X, Lin P, Wang M, Qian J, Wan B, Kwak LW, Yu L, Yi Q. Human C-reactive protein binds activating Fcγ receptors and protects myeloma tumor cells from apoptosis. *Cancer Cell.* 2007; 12: 252–65.

100. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, Van Wier S, Blackburn PR, Baker AS, Dispenzieri A, Kumar S, Rajkumar SV, Carpten JD, Barrett M, Fonseca R, Stewart AK, Bergsagel PL. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*. 2012 Apr 12. [Epub ahead of print]
101. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12: 335–48.
102. Legouffe E, Rodriguez C, Picot MC, Richard B, Klein B, Rossi JF, Com-mes T. C-reactive protein serum level is a valuable and simple prognostic marker in non Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 1998; 31: 351–7.
103. Kurzrock R., Redman J., Cabanillas F., Jones D., Rothberg J., Talpaz M. Serum Interleukin-6 levels are elevated in lymphoma patients and correlate with survival in advanced Hodgkin's disease and with B symptoms. *Cancer Research* 1993 ; 53, 2118–2122.
104. Kadin ME, Pavlov IY, Delgado JC, Vonderheid EC. High soluble CD30, CD25, and IL-6 may identify patients with worse survival in CD30+ cutaneous lymphomas and early mycosis fungoides. *J Invest Dermatol*. 2012; 132: 703–10.
105. Sakakibara S, Tosato G. Viral interleukin-6: role in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: associated malignancies. *J Interferon Cytokine Res*. 2011; 31: 791–801.
106. Gaiolla RD, Domingues MA, Niéro-Melo L, de Oliveira DE. Serum levels of interleukins 6, 10, and 13 before and after treatment of classic Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2011; 13: 483–9.
107. Bartsch R, Woehrer S, Raderer M, Hejna M. Serum interleukin-6 levels in patients with gastric MALT lymphoma compared to gastric and pancreatic cancer. *Anticancer Res*. 2006; 26: 3187–90.
108. Hohaus S, Giachelia M, Di Febo A, Martini M, Massini G, Vannata B, D'Alo' F, Guidi F, Greco M, Pierconti F, Larocca LM, Voso MT, Leone G. Polymorphism in cytokine genes as prognostic markers in Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 2007; 18: 1376–81.
109. Tupitsyn N, Kadagidze Z, Gaillard JP, Sholokhova E, Andreeva L, Liautard J, Duperray C, Klein B, Brochier J. Functional interaction of the gp80 and gp130 IL-6 receptors in human B cell malignancies. *Clin Lab Haematol*. 1998 ; 20: 345–52.
110. Emilie D, Wijdenes J, Gisselbrecht C, Jarrousse B, Billaud E, Blay JY, Gabarre J, Gaillard JP, Brochier J, Raphael M. Administration of an anti-interleukin-6 monoclonal antibody to patients with acquired immunodeficiency syndrome and lymphoma: effect on lymphoma growth and on B clinical symp-toms. *Blood*. 1994; 84: 2472–9.

111. Bataille R, Zhang XG, Wijdenes J, Schved JF, Klein B. Effects of an anti-interleukin-6 (IL-6) murine monoclonal antibody in a patient with acute monoblastic leukemia. *Med Oncol Tumor Pharmacother*. 1993; 10: 185–8.
112. Miki S, Iwano M, Miki Y, Yamamoto M, Tang B, Yokokawa K, Sonoda T, Hirano T, and Kishimoto T. Interleukin-6 (IL-6) functions as an in vitro autocrine growth factor in renal cell carcinomas. *FEBS Lett*, 1989 ; 250: 607–610.
113. Alberti L, Thomachot MC, Bachelot T, Menetrier-Caux C, Puisieux I, Blay JY. IL-6 as an intracrine growth factor for renal carcinoma cell lines. *Int J Cancer*. 2004; 111: 653–61.
114. Angelo LS, Talpaz M, Kurzrock R. Autocrine interleukin-6 production in renal cell carcinoma: evidence for the involvement of p53. *Cancer Res*. 2002; 62: 932–40.
115. Ito K, Asano T, Yoshii H, Satoh A, Sumitomo M, Hayakawa M. Impact of thrombocytosis and C-reactive protein elevation on the prognosis for patients with renal cell carcinoma., *Int J Urol*. 2006; 13: 1365–70.
116. Guida M, Casamassima A, Monticelli G, Quaranta M, Colucci G. Basal cytokines profile in metastatic renal cell carcinoma patients treated with subcutaneous IL-2-based therapy compared with that of healthy donors. *J Transl Med*. 2007 Oct 22; 5:51.
117. Costes V, Liautard J, Picot MC, Robert M, Lequeux N, Brochier J, Baldet P, Rossi JF. Expression of the interleukin 6 receptor in primary renal cell carcinoma. *J Clin Pathol*. 1997; 50: 835–40.
118. Mizutani Y, Bonavida B, Koishihara Y, Akamatsu K, Ohsugi Y, Yoshida O. Sensitization of human renal cell carcinoma cells to cis-diamminedichloroplatinum(II) by anti-interleukin 6 monoclonal antibody or anti-interleukin 6 receptor monoclonal antibody. *Cancer Res*. 1995; 55: 590–6.
119. Tate J, Olencki T, Finke J, Kottke-Marchant K, Rybicki LA, Bukowski RM. Phase I trial of simultaneously administered GM-CSF and IL-6 in patients with renal-cell carcinoma: clinical and laboratory effects. *Ann Oncol*. 2001; 12: 655–9.
120. Brochier J, Legouffe E, Liautard J, Gaillard JP, Mao LQ, Bataille R, Rossi JF, Klein B. Immunomodulating IL-6 activity by murine monoclonal antibodies. *Int J Immunopharmacol*. 1995; 17: 41–8.
121. Lee SO, Chun JY, Nadiminty N, Lou W, Gao AC. Interleukin-6 undergoes transition from growth inhibitor associated with neuroendocrine differentiation to stimulator accompanied by androgen receptor activation during LNCaP prostate cancer cell progression. *Prostate*. 2007; 67: 764–73.

122. Azevedo A, Cunha V, Teixeira AL, Medeiros R. IL-6/IL-6R as a potential key signaling pathway in prostate cancer development. *World J Clin Oncol.* 2011; 2: 384–96.
123. Komatsu S, Hara N, Ishizaki F, Nishiyama T, Takizawa I, Isahaya E, Kawasaki T, Takahashi K. Altered association of interleukin-6 with sex steroids in lipid metabolism disorder in men with prostate cancer receiving androgen deprivation therapy. *Prostate* 2011 Dec 27. doi: 10.1002/pros.22471. [Epub ahead of print]
124. Weiss TW, Simak R, Kaun C, Rega G, Pflüger H, Maurer G, Huber K, Wojta J. Oncostatin M and IL-6 induce u-PA and VEGF in prostate cancer cells and correlate in vivo. *Anticancer Res.* 2011; 31: 3273–8.
125. Zhang H, Xu Y, Li L, Liu R, Ma B. The Interleukin-6 -174G/C Polymorphism and Prostate Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Urol Int.* 2012 Apr 17. [Epub ahead of print]
126. Karkera J, Steiner H, Li W, Skradski V, Moser PL, Riethdorf S, Reddy M, Puchalski T, Safer K, Prabhakar U, Pantel K, Qi M, Culig Z. The anti-interleukin-6 antibody siltuximab down-regulates genes implicated in tumorigenesis in prostate cancer patients from a phase I study. *Prostate* 2011; 71: 1455–65.
127. Dorff TB, Goldman B, Pinski JK, Mack PC, Lara PN Jr, Van Veldhuizen PJ Jr, Quinn DI, Vogelzang NJ, Thompson IM Jr, Hussain MH. Clinical and correlative results of SWOG S0354: a phase II trial of CNT0328 (siltuximab), a monoclonal antibody against interleukin-6, in chemotherapy-pretreated patients with castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2010; 16: 3028–34.
128. Kwon GT, Jung JI, Song HR, Woo EY, Jun JG, Kim JK, Her S, Park JH. Piceatannol inhibits migration and invasion of prostate cancer cells: possible mediation by decreased interleukin-6 signaling. *J Nutr Biochem.* 2012; 23: 228–38.
129. Kutikov A, Makhov P, Golovine K, Canter DJ, Sirohi M, Street R, Simhan J, Uzzo RG, Kolenko VM. Interleukin-6: a potential biomarker of resistance to multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitors in castration-resistant prostate cancer. *Urology.* 2011; 78: 968.e7–11.
130. Stone RL, Nick AM, McNeish IA, Balkwill F, Han HD, Bottsford-Miller J, Rupaimoole R, Armaiz-Pena GN, Pecot CV, Coward J, Deavers MT, Vasquez HG, Urbauer D, Landen CN, Hu W, Gershenson H, Matsuo K, Shahzad MM, King ER, Tekedereli I, Ozpolat B, Ahn EH, Bond VK, Wang R, Drew AF, Gushiken F, Collins K, DeGeest K, Lutgendorf SK, Chiu W, Lopez-Berestein G, Afshar-Kharghan V, Sood AK. Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2012; 366: 610–8.

131. Coward J, Kulbe H, Chakravarty P, Leader D, Vassileva V, Leinster DA, Thompson R, Schioppa T, Nemeth J, Vermeulen J, Singh N, Avril N, Cummings J, Rexhepaj E, Jirstrom K, Gallagher WM, Brennan DJ, McNeish IA, Balkwill FR. Interleukin-6 as a therapeutic target in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2011; 17: 6083–96.
132. Shinriki S, Jono H, Ota K, Ueda M, Kudo M, Ota T, Oike Y, Endo M, Ibusuki M, Hiraki A, Nakayama H, Yoshitake Y, Shinohara M, Ando Y. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody suppresses tumor angiogenesis and in vivo growth of human oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 5426–34.
133. Labbozzetta M, Notarbartolo M, Poma P, Giannitrapani L, Cervello M, Montalto G, D'Alessandro N. Significance of autologous interleukin-6 production in the HA22T/VGH cell model of hepatocellular carcinoma. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1089: 268–75.
134. Pistoia V, Bianchi G, Borgonovo G, Raffaghello L. Cytokines in neuroblastoma: from pathogenesis to treatment. *Immunotherapy.* 2011; 3: 895–907.
135. Okamoto M, Hattori K, Oyasu R. Interleukin-6 functions as an autocrine growth factor in human bladder carcinoma cell lines in vitro. *Int J Cancer.* 1997; 72: 149–54.
136. Yuzuriha A, Saitoh T, Koiso H, Mitsui T, Uchiumi H, Yokohama A, Handa H, Kojima M, Tsukamoto N, Karaswa M, Murakami H, Nojima Y. Successful treatment of autoimmune hemolytic anemia associated with multicentric Castleman disease by anti-interleukin-6 receptor antibody (tocilizumab) therapy. *Acta Haema-tol.* 2011; 126: 147–50.
137. Drobyski WR, Pasquini M, Kovatovic K, Palmer J, Douglas Rizzo J, Saad A, Saber W, Hari P. Tocilizumab for the treatment of steroid refractory graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011; 17: 1862–8.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



*Б. Паива, М.Б. Видриалес, Х. Алмейда, А. Лопес,
М.-К. Лопес-Вергес, А. Орфано, Х. Бладе,
Х.Х. Лагуерта, Х.Ф. Сан-Мигуель*

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТА ЛЕЧЕНИЯ
ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ:
КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МОНИТОРИНГА МОЗ
GEM/PETHEMA**

*Терапевтическое отделение, Службы цитометрии и гематологии
Онкологический научный центр Университета Саламанки
и Университетской больницы Саламанки,
Больница им. 12 октября, Мадрид; Клиническая больница, Барселона, Испания*

Абстракт

Применение иммунофенотипических и молекулярных исследований для оценки эффекта терапии стало стандартной практикой при многих типах гемобластозов. Однако, до последнего времени эффект лечения больных множественной миеломой (ММ) оценивали только по обычным клиническим, морфологическим и серологическим параметрам. Продолжаются исследования с целью повышения эффективности терапии при ММ, которую определяют по числу остаточных опухолевых клеток после лечения.

Высокочувствительным (10^{-5} и 10^{-7}) способом определения эффекта лечения у больных миеломой является определение минимального остаточного заболевания (МОЗ) молекулярными методами. Однако методики на основе ПЦР занимают много времени, относительно дороги и их применимость ограничена (примерно 75% больных). В то же время показано, что иммунофенотипирование методом 4-цветной многопараметрической проточной цитометрии (МПЦ) характеризуется большей степенью применимости (90–95% больных), относительно высокой чувствительностью (10^{-4}) и занимает меньше времени. Важно отметить, что роль достижения иммунофенотипической и молекулярной ремиссии в результате терапии как основного прогностического фактора постоянно подтверждалась результатами исследований в группах больных, которым показана трансплантация, и в случаях невозможности проведения этого вида лечения, как до, так и после наступления эры новаторских препаратов.

Ожидается, что после внедрения в практику 8-цветной МПЦ в сочетании с новым компьютерным обеспечением и новыми аналитическими подходами чувствительность иммунофенотипирования может достичь уровня АС-ПЦР, что приведет к повышению эффективности мониторинга эффективности новых терапевтических препаратов и протоколов. В совокупности результаты проведенных исследований показывают клиническую значимость определения МОЗ при ММ. Недавно Рабочая группа по миеломе пересмотрела критерии оценки эффекта: определены как иммунофенотипическая, так и молекулярная ремиссия при ММ.

Bruno Paiva, María-Belén Vidriales, Julia Almeida, Gema Mateo, Antonio López, María-Consuelo López-Berges, Alberto Orfao, Joan Blade, Juan-Jose Lahuerta, Jesús F. San Miguel

RESPONSE ASSESSMENT

IN MULTIPLE MYELOMA:

CLINICAL SIGNIFICANCE OF MRD MONITORING

GEM (Grupo Español de MM)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) cooperative study groups.

Department of Medicine, Services of Cytometry and Hematology and Cancer Research Center (CIC, IBMCC USAL-CSIC),

University of Salamanca and University Hospital of Salamanca, Salamanca. Hospital 12 de Octubre, Madrid, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Spain.

Abstract

The use of immunophenotypic and molecular techniques to evaluate response to therapy has become standard practice in many hematological malignancies. By contrast, up until now response to treatment in multiple myeloma (MM) has only been evaluated by conventional clinical, morphological and serological parameters. In MM continuous efforts are being made to improve the efficacy of therapy, which translates into a decreased number of residual tumour cells after therapy. Minimal residual disease (MRD) detection in myeloma patients by molecular techniques is highly sensitive (10^{-5} and 10^{-7}). However, PCR-based approaches are time-consuming, relatively expensive and they have a limited applicability ($\approx 75\%$ of all patients). In contrast, 4-color multiparameter flow cytometry (MFC) immunophenotyping has proven to be broadly applicable (90% – 95% of all cases), less time-consuming, and relatively sensitive (10^{-4}). Most importantly, the achievement of immunophenotypic and molecular response after therapy has been consistently demonstrated as a major prognostic factor for both transplant eligible and non-eligible patients, before and in the era of novel drugs. With the incorporation of 8-color MFC together with new software and analytical approaches, it is expected that the sensitivity of immunophenotyping may reach a level similar to that of ASO-PCR, increasing its utility in monitoring the effects of new therapeutic agents and protocols. Altogether, the available results support the clinical relevance of MRD investigation in MM. Accordingly, the International Myeloma Working Group has recently updated the response criteria to define both immunophenotypic and molecular response in MM.

Наступление ремиссии при множественной миеломе

За последние 20 лет парадигма лечения ММ претерпела значительные изменения [1]. В течение долгого времени целью лечения являлось достижение частичной ремиссии или стабилизации заболевания [2; 3]. Однако, благодаря внедрению в клиническую практику высокодозной терапии с последующей аутотрансплантацией стволовых клеток (ВДТ/АТСК) появилась возможность достижения полной ремиссии примерно у 35% больных миеломой [4–8]. Кроме того, в случаях, когда интенсивные режимы противопоказаны, применение таких новых препаратов как талидомид, бортезомиб и леналидомид в первой линии лечения позволило повысить частоту ПР с менее 8% на фоне мелфалана/преднизона [9; 10] до 30% на фоне бортезомиба и талидомида [11; 12]. Следует, однако, отметить: ни стандартные, ни новые препараты не способны обеспечить полное уничтожение всех клеток миеломы, в результате рецидив развивается вследствие МОЗ у большинства (если не у всех) больных.

Точно определенное и быстрое наступление ремиссии является благоприятным фактором прогноза при большинстве гемобластозов, и достижение качественной ПР коррелирует [13; 14] с увеличением продолжительности жизни (хронический миелоидный лейкоз и острый промиелоцитарный лейкоз). Для разработки эффективных стратегий поддержки ремиссии необходимы чувствительные методы оценки эффекта терапии с целью определения оптимальной продолжительности лечения и поддержки больного в состоянии ремиссии в течение как можно более продолжительного времени. В гематологии считается практически общепринятым, что достижение и поддержание высококачественной ремиссии является первостепенным требованием положительного результата лечения. У больных миеломой ПР определяется как отсутствие М-белка по данным иммунофиссации (ИФкс) и присутствие менее 5% плазмочитов (ПЦ) в костном мозге [15]. Большинство исследований показали, что достижение ПР после лечения ассоциируется [16–18] с увеличением продолжительности жизни без прогрессирования заболевания (ПЖБП), однако в ряде работ указывается, что высокие показатели ПР не всегда коррелируют с увеличением продолжительности жизни [19–24]. Это несоответствие можно объяснить, по крайней мере отчасти [25], низкой чувствительностью метода анализа (10^{-3}) и высокой степенью вариабельности как между больными, так в каждом конкретном случае [26]. Также высказано предположение, что прогностическое значение достижения ПР может зависеть от типа лечения, возраста и исходного состояния больного [27]. В связи с этим, можно считать, что данный критерий не обладает достаточной точностью для выявления больных, которым может принести клиническую пользу дополнительная терапия в ранние сроки после лечения [18; 19]. Совсем недавно Международная рабочая группа по изучению миеломы (IMWG) предложила использовать новую категорию эффекта – «строгая ПР» (сПР), для которой требуется нормализация отношения свободных легких цепей в сыворотке (sFLC) и отсутствие клональных ПЦ по данным иммуногистохимического и флуоресцентного исследований.

The onset of response in multiple myeloma

The paradigm of multiple myeloma (MM) treatment has impressively changed in the last two decades.[1] For many years the goal was to achieve partial response (PR) or disease stabilization [2; 3]. However, the introduction of high dose therapy followed by autologous stem cell transplantation (HDT/ASCT) made possible the achievement of complete response (CR), in approximately 35% of myeloma patients [4–8]. Also for patients ineligible to intensive regimens, the incorporation of the novel agents thalidomide, bortezomib and lenalidomide into front-line therapy has significantly improved the CR rates, that evolved from less than 8% with melphalan/prednisone [9; 10] to approximately 30% with bortezomib or thalidomide [11; 12]. However, both standard and novel therapies fail to eradicate all myeloma cells, and most (if not all) patients will eventually relapse as a consequence of persistent minimal residual disease (MRD).

An accurate and fast onset of response is a good predictor for prognosis in most hematological malignancies, where the achievement of high-quality CR correlates with prolonged survival (ie, chronic myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia) [13; 14]. Moreover, to develop effective maintenance strategies sensitive methods to measure response are mandatory to help deciding duration of therapy and maintain long-term remissions. Thus, a widely accepted concept in hematology is that achieving and maintaining high-quality remissions is seen as a primary requirement for the cure of patients. In the myeloma setting, CR is defined by the absence of M-protein by immunofixation (IFx) and less than 5% plasma cells (PC) in bone marrow (BM) [15]. Although the majority of studies show that patients achieving CR after treatment have a prolonged progression-free survival (PFS) [16–18], others have shown that higher CR rates do not always translate into extended survival [19–24]. This inconsistency could be explained, at least to a certain extent, to the low sensitivity of the assay (10^{-2}) [25] and the high inter- and inpatient variability [26]. Moreover, it has been suggested that the prognostic impact of achieving a CR may depend on the type of treatment, patients' age, and baseline picture.[27] Therefore, this criteria probably lacks the accuracy to identify patients who might benefit from additional therapy in the early stages after therapy [28; 29] Most recently, the International Myeloma Working Group (IMWG) proposed the addition of a new response category, the stringent CR (sCR) that requires normalization of the serum free light chain (sFLC) ratio and absence of clonal PC by immunohistochemistry or fluorescence.

Хотя этот критерий более чувствителен [30], чем критерий для определения ПР (10^{-3} и 10^{-2}), имеющейся информации о прогностическом значении с ПР пока недостаточно [31], и значение корреляции олигоклональных полос с эффектом лечения для оценки применимости этого вида анализа еще предстоит определить [32; 33]. Важно отметить, что измерение уровня М-белка и определение sFLC отражает только количество продукта секретирующего клона, но не обеспечивает прямое количественное определение остаточной опухолевой массы. В связи с этим, длительное время полужизни некоторых иммуноглобулинов, в частности – парапротеинов IgG [36], может обуславливать появление ложноположительного результата [34; 35]. В недавно опубликованной работе Chee et al. [37] подтверждена важность морфологического исследования КМ даже у больных с отрицательным статусом ИФкс после терапии. Однако, в отличие от острых лейкозов, стандартное морфологическое исследование КМ при ММ в общем случае не позволяет различать нормальные и злокачественные ПЦ, что снижает чувствительность цитологического анализа в период наблюдения [38].

Для повышения чувствительности анализа при определении МОЗ молекулярными методами необходимо провести секвенирование области CDR3 для получения праймеров, специфичных для данного больного, с целью последующего индивидуального мониторинга. Определение остаточных злокачественных ПЦ методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции (АС-ПЦР) отличается высокой специфичностью, чувствительностью (10^{-4} – 10^{-5}) [39], и как показали исследования в небольших группах больных, обладает прогностической ценностью [40–42], особенно в контексте аллотрансплантации стволовых клеток [43]. Однако этот метод занимает много времени и характеризуется высокими трудозатратами, высокой стоимостью и ограниченной применимостью (около 75%), что затрудняет его внедрение в клиническую практику [44–47]. Кроме того, сравнительное исследование определения МОЗ молекулярными и иммунофенотипическими методами показало, что, несмотря на высокую чувствительность первых, их применение не коррелирует с повышением точности прогноза [48–50]. Это, скорее всего, объясняется тем, что оба метода позволяют достичь клинически релевантного порогового уровня определения МОЗ – 10^{-4} . Интересно отметить, что применение методов визуализации при мониторинге ММ позволяет выявлять часто присутствующие персистирующие очаги даже у больных с ПР [51], и ценность такого рода исследований при наблюдении за больными была недавно подтверждена Итальянской группой изучения миеломы. Показано, что оценка эффекта методами 18ФДГ-ПЭТ/КТ является независимым фактором прогноза как для общей продолжительности жизни, так и для ПЖБП. Иммунофенотипирование методом многопараметрической проточной цитометрии (МПЦ) позволяет исследовать экспрессию и интенсивность флуоресценции большого числа маркеров на большом числе клеток.

Although this criteria is more sensitive than the one defined for CR (10^{-3} vs. 10^{-2}) [30], there is still limited information regarding the prognostic significance of the sCR [31], and the role that response-based oligoclonal bands may play on the applicability of this assay is yet to be fully determined [32; 33]. Most importantly, both the measurement of the M-protein and sFLC only reflect the product of the secreting clone and are not a direct measurement of the remaining tumor burden. Thus, the long half-life of some immunoglobulins may imply some false positive results [34; 35], in particular IgG paraproteins [36]. Accordingly, Chee et al. [37] most recently confirmed the importance of morphological BM evaluation, even in IFx negative patients after therapy. However and in contrast to acute leukemias, conventional morphological (CM) BM evaluation in MM is generally not capable to distinguish normal from malignant PC, thus reducing the sensitivity of cytological follow-up analysis [38].

In order to be highly sensitive, MRD investigations based on molecular techniques require sequencing of the CDR3 region to design patient-specific primers for individual monitoring. Thus, allele specific oligonucleotid-polymerase chain reaction (ASO-PCR) measurement of residual malignant PC is highly specific, sensitive (10^{-4} – 10^{-6}) [39], and studies conducted in small series of patients have demonstrated its prognostic value [40–42], particularly in the context of allogenic stem cell support [43]. However, this technique is time- and labor-consuming, expensive and has limited applicability (~75%), hampering its use in routine clinical practice [44–47]. Moreover, comparative studies of MRD detection between molecular vs. immunophenotypic approaches have shown that despite the higher sensitivity of the first, it does not correlate with better prognostication [48–50]. This finding is most probably explained by the fact that both techniques are able to achieve the current clinical relevant threshold level for MRD detection, which stands in the 10^{-4} . Interestingly, the recent incorporation of imaging tools in monitoring of MM has shown frequently present persistent focal lesions even in CR patients [51], and its utility on follow-up analysis has now been confirmed by the Italian myeloma group, who showed that response assessment using 18-FDG PET/CT is an independent prognostic factor for both PFS and OS. Multiparameter flow cytometry (MFC) immunophenotyping makes possible the individual analysis in a high number of cells the expression of multiple markers and their fluorescence intensity. This allows the discrimination of abnormal PC from normal or reactive PC, despite their low representation in the BM [52–56].

Метод также позволяет различать аномальные, нормальные и реактивные ПЦ несмотря на низкий уровень этих клеток в КМ [52–56]. Это уникальное качество присуще только данному методу, поскольку ни стандартные морфологические, ни молекулярные подходы по отдельности или вместе, не обладают способностью различать клональные и нормальные ПЦ. Это очень важно, т.к. в дополнение к мониторингу миеломатозных ПЦ иммунофенотипирование также позволит следить за восстановлением нормальных ПЦ, что в свою очередь также является важной прогностической информацией. В соответствии с вышесказанным, иммунофенотипирование методом МПЦ является обязательным при диагностической характеристике опухолевых клеток, а также мониторинге эффекта лечения при широком спектре гемобластозов [57–62]. В контексте ММ и других аномалий ПЦ показана клиническая значимость МПЦ для дифференциального диагноза моноклональной гаммапатии неопределенной значимости (МГНЗ) и ММ [63], выявления групп повышенного риска МГНЗ, дремлющей ММ (дММ) и ММ [64; 65], определения антигенного профиля для прогноза заболевания [68] и поиска новых терапевтических мишеней [53].

В данном обзоре основное внимание уделяется применению МПЦ для определения МОЗ при ММ: сначала рассматриваются некоторые технические аспекты, затем – их применение в клинической практике.

Иммунофенотипический анализ плазмоцитов

Достижения в разработке аппаратуры и программного обеспечения для проточной цитометрии за последние годы привлекли внимание к использованию результатов иммунофенотипических исследований в лечении гемобластозов [67–70]. МПЦ позволяет:

1. Одновременно анализировать несколько параметров на основе одной клетки.
2. Изучать большое число клеток в пределах относительно короткого промежутка времени, что позволяет хранить информацию для последующих анализов.
3. Проводить количественный анализ экспрессии антигенов.
4. Объединять выявление поверхностных и внутриклеточных антигенов [71; 72].

В контексте дискразии ПЦ эти свойства позволяют однозначно идентифицировать, определять количество и далее характеризовать ПЦ даже при небольшом количестве клеток, благодаря использованию различных маркеров и двухэтапной процедуре получения.

Установлено, что антигены CD38 и CD138 лучше всего подходят для специфической идентификации ПЦ в гематологических образцах и их определения на фоне других популяций лейкоцитов [73].

This is an unique particularity, only available with this technique since either CM and/or molecular approaches fail to distinguish clonal from normal PC. In fact, this is a very important finding because in addition to monitoring myelomatous PC, immunophenotyping can also evaluate how normal PC recover, which may offer additional prognostic information. Accordingly, MFC immunophenotyping is considered mandatory for the diagnostic characterization of neoplastic cells, as well as treatment monitoring in a vast number of hematological malignancies [57–62]. In the context of MM and other PC disorders, MFC has demonstrated to be clinically relevant for the differential diagnosis between monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and MM [63], identification of high-risk MGUS, smoldering MM (SMM) and MM patients [64; 65], definition of prognostic antigenic profiles [66] and, identification of new therapeutic targets [53].

In the present review we will focus on the use of MFC for MRD investigations in MM patients, addressing first some technical aspects and then its utility in the clinical setting.

Immunophenotypic analysis of plasma cells

Advances in flow cytometry instruments and software over recent years have made attractive the use of immunophenotypic studies in the management of hematological malignancies [67–70]. Thus, MFC makes possible to:

1. simultaneously analyze several parameters on a single-cell basis;
2. study high numbers of cells within a relatively short period of time, allowing the storage of information for latter analysis;
3. quantitatively evaluate antigen expression;
4. combine the detection of surface and intracellular antigens [71; 72].

In the context of PC dyscrasias, these characteristics allow the unequivocal identification, quantification, and further characterization of PC even in low numbers, through the use of multiple markers and a double-step acquisition procedure. It is well established that CD38 and CD138 are the two best markers for the specific identification of PC in hematological samples and its discrimination from other leukocyte populations [73].

Несмотря на то, что CD38 экспрессируется на большом числе гематопоэтических клеток [74], этот антиген считают «специфическим» маркером, благодаря высокой интенсивности окрашивания на ПЦ, которая выделяет эти клетки из других популяций [75–77]. В свою очередь окрашивание CD138 также считают специфичным [78], хотя часто встречаются ПЦ с низким уровнем экспрессии CD138 [53; 79]. В связи с этим для эффективной идентификации ПЦ предлагается использовать оба маркера [80–82]. На первом этапе получения, когда выделяют 2×10^4 – 1×10^5 событий, соответствующих полному клеточному составу КМ, точная идентификация ПЦ позволяет определить число этих клеток после исключения тромбоцитов и дебрис. На высокочувствительном втором этапе сохраняют информацию о ПЦ в широком диапазоне живых клеток, из которой отбирают события CD38hi и/или CD138 при минимальном количестве 3000 ПЦ на пробирку [58; 83–85]. Эта процедура в сочетании с многократным окрашиванием представляет основу для точного иммунофенотипирования ПЦ, что в свою очередь позволяет различать злокачественные и нормальные/реактивные ПЦ. Также установлено, что фенотипические характеристики опухолевых ПЦ отличаются от характеристик нормальных клеток по экспрессии антигенов:

1. пониженной экспрессии CD19, CD27, CD38, CD45 и CD81;
2. гиперэкспрессии CD28, CD33 и CD45;
3. асинхронной экспрессии CD20, CD117;
4. поверхностных иммуноглобулинов [53; 86–106].

Таким образом, необходимо иметь иммунофенотипические панели, содержащие 4 и более маркеров в многоцветных комбинациях [107], а также панели антител в соответствии с перечисленными маркерами; это позволит выявлять наличие фенотипических аномалий более чем у 90% больных ММ [108]. Как ожидается, внедрение в клиническую практику 8-цветных панелей позволит выявлять клональные ПЦ у всех больных благодаря одновременной оценке рестрикции легких цепей и аберраций антигенов. Однако сегодня одной пробирки в сочетании с CD19, CD38, CD45 и CD56, направленной в лабораторию с 4-цветной МПЦ, достаточно для определения злокачественных ПЦ примерно у 90% больных ММ при постановке диагноза и анализе в период наблюдения [109–113], даже в случаях, когда фенотип злокачественных ПЦ не известен.

Чувствительность иммунофенотипирования для оценки МОЗ при множественной миеломе

Чувствительность иммунофенотипирования напрямую зависит от минимального числа событий, необходимых для определения интересующей исследователя популяции, а оно, в свою очередь, определяется типом фенотипических аберраций, комбинации МАТ, которые используются для детекции, и исследуемого образца [114].

Though CD38 is widely expressed on hematopoietic cells [74], the bright intensity observed for PC, clearly superior to other populations [75–77], is considered a “specific” marker. In turn, CD138 staining is specific [78], although PC expressing low levels of CD138 can be frequently found [53; 79]. Therefore, it has been proposed the use of both markers for an efficient identification of PC [80–82]. In the first step of acquisition, where 2×10^4 to 1×10^5 events corresponding to the whole BM cellularity are stored, a precise identification of PC allows their accurate enumeration, after concrete exclusion of platelets and debris. In a highly sensitive second step, information about PCs contained in a broad ‘live-gate’ drawn to select CD38hi and/or CD138 events is stored, containing a minimum of 3 000 PC/tube. [53; 83–85] This procedure, together with multiple staining provides the basis for the accurate immunophenotypic PC characterization which, subsequently, makes possible the discrimination between malignant and normal/reactive PC. Accordingly, it is currently well known that the phenotypic characteristics of neoplastic PC differ from their normal counterpart in terms of antigenic:

1. infra-expression of CD19, CD27, CD38, CD45 and CD81;
2. over-expression of CD28, CD33 and CD45 and;
3. asynchronous expression of CD20, CD117;
4. surface immunoglobulin [53; 86–106].

Thus, immunophenotypic panels containing 4 or more markers in multicolor combinations are required [107] and antibody panels based on the markers listed above, allow the identification of the presence of phenotypic abnormalities in more than 90% of MM patients [108].

Of note, it is expected that the incorporation into routine clinical practice of 8-color panels will make the detection of clonal PC applicable for all patients, on basis of the simultaneous assessment of light chain restriction and antigen aberrancies. In the mean-while, and directed to 4-color MFC laboratories, a single tube combined with CD19, CD38, CD45 and CD56 is capable of identifying malignant PC in approximately 90% of MM patients at diagnosis and follow-up analysis [109–113], even in cases without previous knowledge of the malignant PC phenotype.

Sensitivity of immunophenotyping for MRD investigation in multiple myeloma

The sensitivity of immunophenotyping depends directly in the minimum number of events necessary to define the population of interest, and this depends on the type of phenotypic aberration, the combination of MoAbs used for detection and the sample under study [114].

Известно, что для правильного определения популяции требуется всего 20 событий [115; 116]. Однако в последних опубликованных рекомендациях Европейской сети по миеломе [117], содержится указание на необходимость наличия не менее 100 неопластических ПЦ для точного анализа. Таким образом, для достижения необходимого порога чувствительности 10^{-4} необходимо учесть минимум 10000 общих событий, для чего важно использовать двухэтапную процедуру получения ПЦ, описанную выше. Соответственно, в экспериментах с разведением нами показано, что иммунофенотипическая дифференциация нормальных и злокачественных ПЦ на основе МПЦ имела чувствительность $\geq 10^{-4}$, причем в 4 из 14 (29%) случаев она достигала 10^{-5} [118]. Важно отметить, что степень чувствительности не зависела от типа аберрации злокачественных ПЦ [119]. Следует еще раз подчеркнуть, что с внедрением 8-цветной МПЦ и нового программного обеспечения, которые позволят применять новаторские аналитические подходы [120–122], чувствительность иммунофенотипирования может достигать уровня АС-ПЦР и даже превосходить его.

Потенциальные ограничения иммунофенотипирования в определении МОЗ

По опыту применения МПЦ для определения МОЗ при других видах гемобластозов, постоянно указываются два основных недостатка:

1. отсутствие опухолеспецифических маркеров;
2. появление в процессе развития заболевания фенотипических изменений, которые могут приводить к ложноотрицательным результатам [123; 124].

Однако в контексте ММ злокачественные ПЦ достаточно легко идентифицировать на основе множественных и синхронно определяемых фенотипических аберраций, которые позволяют четко отграничить злокачественные клетки от нормальных [125]. Таким образом, наиболее важное значение приобретает правильное составление разнообразных комбинаций МАТ, также обязательным требованием является одновременная оценка экспрессии антигенов CD19, CD45 и CD56. Этим можно объяснить, почему в двух исследованиях [126–128] фенотипические изменения регистрировались в течение всего периода лечения, тогда как в нашей группе [129–131] и других группах [132–135] регистрировали стабильную экспрессию антигенов на злокачественных ПЦ.

Тем не менее, это не исключает появления фенотипических изменений после терапии. На самом деле, такие изменения действительно имеют место, но скорее всего, они связаны с другими типами маркеров, а не с теми, которые были перечислены выше. Соответственно, фенотипические аберрации выявленные при постановке диагноза, могут использоваться как (антигенные) зонды, специфичные для конкретного больного, при определении МОЗ в период последующего наблюдения [136; 137].

It has been stated that as much as 20 events are necessary to correctly define a population [115; 116]. However, accordingly to the recently re-reported European Myeloma Network recommendations [117], no fewer than 100 neoplastic PC should be acquired for an accurate analysis. Therefore, a minimum of 10 000 of total events should be acquired to reach the sensitivity threshold of 10^{-4} , thus supporting a PC acquisition based in a double-step procedure, as previously described. Accordingly, we have already showed in dilution experiments that MFC immunophenotypic discrimination of normal vs. malignant PC has a sensitivity level of $\geq 10^{-4}$, reaching up to 10^{-5} in 4 out of 14 cases (29%) [118]. Most importantly, the level of sensitivity was independent of the type of aberrancy displayed by malignant PC [119]. Once more, it should be emphasized that with the incorporation of 8-color MFC and new software tools allowing novel analytical approaches [120–122] it is expected that the sensitivity of immunophenotyping may reach a level similar to, if not greater than the achieved by ASO-PCR.

***Potential limitations
of immunophenotypic MRD investigations***

Throughout the use of MFC in MRD investigations in other hematological malignancies, two major pitfalls have been constantly pointed:

1. the absence of tumor-specific markers;
2. the existence of phenotypic changes during the course of the disease, which could induce false negative results [123; 124].

However, in the context of MM the identification of malignant PC can be easily performed on basis of multiple and simultaneously determined phenotypic aberrancies, that clearly discriminate them from their normal counterpart [125]. Thus, the correct design of multiple combinations of MoAbs is of most importance, and the simultaneous assessment of CD19, CD45 and CD56 is mandatory. This can explain why phenotypic changes throughout the course of treatment were described in two studies [126–128] whereas our group [129–131] and others [132–135] reported stable antigen expression on malignant PC. Nevertheless this does not preclude the existence of phenotypic changes after therapy. In fact, these most probably occur but should probably be related to other genre of markers and not to the ones stated above. Accordingly, phenotypic aberrancies detected at diagnosis can be used as patient (antigenic) specific probes for follow-up MRD investigations [136;137].

Другим недостатком является тот факт, что иммунофенотипические исследования для определения МОЗ исключительно сфокусированы на популяцию ПККМ (плазматических клеток костного мозга), т.к. ряд исследователей сообщают о выявлении клонально родственных В-клеток у больных ММ после терапии [138]. Однако роль этих клонотипических В-лимфоцитов в патогенезе данного заболевания не установлена [139-140]. На самом деле идентификация этих клеток методом АС-ПЦР может объяснить не только более высокую частоту МОЗ-положительных случаев ММ, выявляемую этим методом, но также и почему этот результат не ассоциируется с наиболее неблагоприятным исходом [141]. Таким образом, действительно важным ограничением МПЦ при определении МОЗ является характерная очаговая структура миеломной инфильтрации КМ [142-144] и/или возможность экстрамедуллярного рецидива, при котором методы визуализации могут играть очень большую роль в процессе мониторинга МОЗ [145].

МНОГОЦВЕТНАЯ ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЗ ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ – ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ КЛИНИКИ

Сравнение эффективности различных стратегий лечения

Как указывалось ранее, за последние 10 лет в «пейзаже» лечения миеломы появилось несколько новых препаратов [146; 147]. Кроме того, в настоящее время проходит испытание по программе I/II и даже III фаз ряд новых препаратов, которые пополняют арсенал средств лечения ММ [148; 149]. Таким образом, мы переживаем пору проведения многочисленных клинических исследований, которые призваны оптимизировать наилучшие из возможных фармакологические комбинации. Все это требует появления новых инструментов для сравнения эффективности различных лечебных групп. В настоящее время появилось ощущение, что частота ПР в результате применения того или иного режима лечения как параметр сравнения эффекта в разных группах не является оптимальным [150], в частности, рандомизированные исследования новых препаратов показали, что частота ПР может зависеть от исходных специфических характеристик больных ММ [151]. Одной из возможных альтернатив является применение МПЦ, как показано в исследовании San Miguel et al. [152] по сравнительной оценке эффективности АТСК и стандартной химиотерапии (СХ) на основе данных анализа популяций ПККМ. Результаты показали, что процент больных без МОЗ был статистически значимо выше после трансплантации (36%), чем после СХ (15%). Также восстановление процента нормальных ПЦ (Н-ПЦ) в составе ПЦКМ (% Н-ПЦ/ПЦКМ) было более эффективным в группе трансплантации (86% и 35%; $P=0,01$), и эта новая переменная (% Н-ПЦ/ПЦКМ) оказывала значимое влияние на ПЖБП (медиана 60 и 34 мес. для больных с Н-ПЦ/ПЦКМ ≥ 30 по сравнению с < 30 , соответственно).

Other possible disadvantage could be the fact that MRD immunophenotypic investigations are focused exclusively on the BMPC compartment, since some investigators have detected clonally related B-cells in MM patients after therapy [138]. However, the role that this clonotypic B-lymphocytes play on the pathogenesis of this disease is still unknown [139; 140]. In fact, their identification by ASO-PCR may explain not only the higher frequencies of MRD-positive MM patients that this technique detect, but also why this finding does not translate into worst outcome [141]. Thus, the real main limitation of MFC MRD studies could be either the characteristic patchy pattern of the myeloma BM infiltration [142–144] and/or the possibility of extramedullary relapses, in which imaging-based techniques can play a very important role in MRD monitorization [145].

MULTICOLOR FLOW CYTOMETRY MRD DETECTION IN MULTIPLE MYELOMA – IMPLICATIONS OF MANAGEMENT

Comparison of the efficacy of different treatment strategies

As mentioned before, the last decade saw the incorporation of several new drugs into the landscape of myeloma [146; 147]. Eventually, new and promising drugs that are now in phase I/II and even phase III studies will increment furthermore the actual MM treatment armamentarium [148; 149]. Thus, we are now in the era of multiple clinical trials that will optimize the best possible pharmacological combinations. This will turn mandatory the use of capable tools in order to compare the efficacy of different treatment arms. There is now the feeling that the frequency of CR rates achieved as a method for compare different arm response is suboptimal [150], in particular on randomized trials including novel agents, as CR rates seem to depend on the baseline signature of MM patients [151]. One possible alternative could be the use of MFC as demonstrated in 2002 when San Miguel et al. [152] compared the efficacy of ASCT vs. conventional chemotherapy (CC), by analyzing the BMPC compartment. The results showed that the percentage of MRD-negative patients was significantly higher after transplantation (36%) than after CC (15%). In addition, recovery of the percentage of normal PC (N-PC) within the BMPC (% of N-PC/BMPC) was also greater in the transplantation group (86% vs. 35%; $P = 0,01$) and this new variable (% of N-PC/BMPC) had a significant impact on PFS (median of 60 vs. 34 months for patients with $\geq 30\%$ vs. $< 30\%$ N-PC/BMPC, respectively).

Таким образом, это исследование впервые показало, что иммунофенотипическая характеристика популяции ПЦ у больных ММ после лечения может дать ценную прогностическую информацию.

Следует подчеркнуть, что необходимо в самое ближайшее время проверить, может ли данный подход обеспечить такие же или даже более высокие результаты при использовании в рандомизированных исследованиях в эру разработки новых препаратов.

Влияние определения МОЗ методом МПЦ на исход болезни у пациентов с множественной миеломой

Позднее Rawston et al. [153] показали, что в общей популяции 45 больных ММ, получавших ВДТ/АТСК, ПЖБП была значимо короче у лиц с положительным статусом МОЗ через 3 месяца после АТСК (19/45; 42%), чем у пациентов с недетектируемым заболеванием (медиана 20 и 35 мес. соответственно). Несмотря на то, что соответствующие показатели 5-летней выживаемости составили 64 и 76%, авторы не выявили статистически значимых различий в ОВ. Проведенный в последнее время ретроспективный анализ исследований МОЗ-МПЦ у 42 больных миеломой показал, что выявление существенной популяции клональных ПЦ ($> 1,8\%$ в общем клеточном составе КМ) перед АТСК значимо коррелировало с меньшей ПЖБП [154]. Так, в группе больных с $> 1,8\%$ миеломных ПЦ прогрессирование заболевания наблюдалось у 13 из 21 (62%) по сравнению с 6 из 21 (29%) в группе с $\leq 1,8\%$ таких клеток. Снова показана тенденция к снижению ОВ для случаев $> 1,8\%$ клональных ПЦ перед АТСК ($p = 0,08$). В недавнем исследовании мы показано, что персистенция остаточных клональных ПЦ через 100 суток после ВДТ/АТСК выявляется более чем у половины больных ММ (170/295, 58%) [155]. Важно подчеркнуть, что просто наличие или отсутствие МОЗ (без необходимости устанавливать пороговое значение) после трансплантации может служить фактором разделения больных на группы с четко различным исходом и существенно влиять на ПЖБП (медиана 37 и 71 мес., соответственно; $p < 0,0001$) и ОПЖ (медиана 89 мес. и не достигнута, соответственно; $P = 0,002$). Таким образом, на основании данных, полученных в самых масштабных исследованиях ($n = 295$) МОЗ у больных ММ, нами подтверждены результаты, полученные в менее многочисленных популяциях [156158], а именно то, что МПЦ является точным инструментом как для оценки МОЗ, так и для прогноза течения ММ. Что касается оптимальной единственной временной точки для анализа, полученные данные четко указывают клиническую релевантность проведения анализа МОЗ методом МПЦ у больных, получающих ВДТ/АТСК, через 3 месяца после АТСК. Liu et al [159] показали некоторую прогностическую значимость МПЦ перед пересадкой стволовых клеток, однако ценность такого анализа ниже, чем при его проведении после АТСК [160; 161].

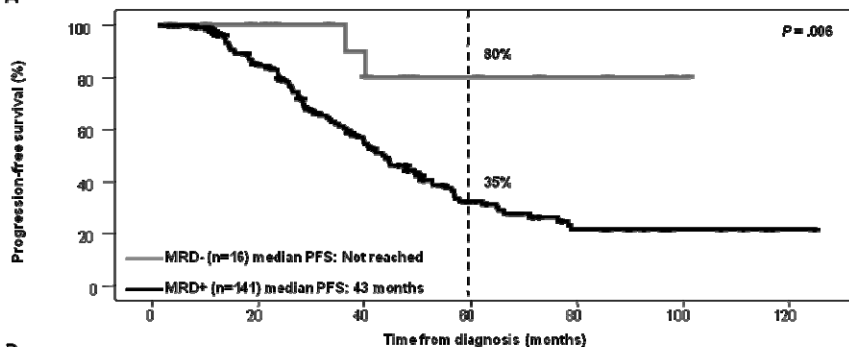
Thus, this was the first study suggesting that the immunophenotypic evaluation of the PC compartment in MM patients after treatment could offer valuable prognostic information. Of note, it will be important in the immediate future to investigate if this approach can reproduce similar or even better results when applied in randomized trials in the era of the novel agents.

***Impact of MRD detection by MFC
on multiple myeloma patients' outcome***

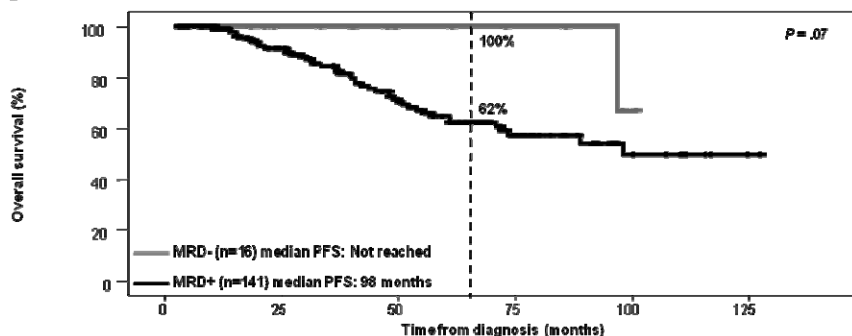
Later on the same year, Rawstron and colleagues [153] showed that among 45 MM patients submitted to HDT/ASCT, those who were MRD-positive (19/45, 42%) 3 months after ASCT had a significantly shorter PFS than cases with undetectable disease (median of 20 vs. 35 months, respectively). Although the respective 5-year survival rates were of 64% vs. 76%, the authors did not found statistical significant difference regarding OS. Recently, a retrospective analysis of MFC-MRD investigations in 42 myeloma patients showed that the detection of a significant population of clonal PC ($>1.8\%$ within the whole BM cellularity) prior to ASCT significantly correlated with poorer PFS [154]. Thus, in the group of patients with $>1.8\%$ myelomatous PC, 13/21 (62%) had progressed whereas only 6/21 (29%) did on the $\leq 1.8\%$ group. Once more a trend to a decrease in OS was found for " $>1.8\%$ clonal PC pre-ASCT" cases ($P = 0,08$). Most recently, we demonstrated that the persistence of residual clonal PC at day+100 after HDT/ASCT could be detected in more than half of MM patients (170/295, 58%) [155]. Most importantly, the simple presence or absence of MRD (without the need of establishing thresholds) after transplantation could separate two groups with clearly different outcome, with a strikingly impact on both PFS (median of 37 vs. 71 months, respectively; $P < 0,0001$) and OS (median 89 months vs. not reached, respectively; $P = 0,002$). Thus, we confirmed on the largest series ($n=295$) of MRD investigations performed on MM patients preliminary data obtained on smaller series [156–158] establishing MFC as a valid tool for both the assessment of MRD and prognostication of MM. Concerning an optimal single check-point to perform this analysis, these data clearly indicate that in HDT/ASCT based-regimens MFC-MRD investigations 3 months after ASCT are clinically relevant. Although Liu et al showed MFC studies performed previously to stem cell rescue afford prognostication [159], its impact is lower when compared to post-ASCT investigations [160; 161].

Также в наших исследованиях у 157 больных, для которых имелась иммунофенотипическая информация после индукционной терапии, но перед АТСК, показано, что больные без МОЗ ($n = 16$, 10%) имели большую ПЖБП (медиана не достигнута и 43 мес., $P = 0,006$; рис. 1А) и ОПЖ (медиана не достигнута и 98 мес., $P = 0,07$; рис. 1В) по сравнению с МОЗ+ случаями (неопубликованные данные). Однако из-за того, что перед трансплантацией МОЗ не выявляется лишь у небольшого числа больных, информация носит ограниченный характер. Кроме того, эти данные указывают на очень важный аспект трансплантации стволовых клеток, т.е. возможность повышения частоты и/или качества ремиссии после индукционной терапии. Также анализ данных о 44 больных с ПР после индукции, но положительным статусом МОЗ, показал, что в группе МОЗ-отрицательных больных ($n = 25$, 57%) после АТСК ПЖБП была достоверно больше, чем у пациентов с персистирующим заболеванием (медиана не достигнута и 36 мес., $P = 0,04$, соответственно; рис. 2). Эти данные показывают, что АТСК как фактор повышения качества ремиссии влияет на исход у больных ММ. Что касается аллотрансплантации, то при оценке потенциального влияния трансплантата на миелому для определения МОЗ возможно потребуется больше времени после трансплантации, чтобы данные этого определения были релевантными [162].

А



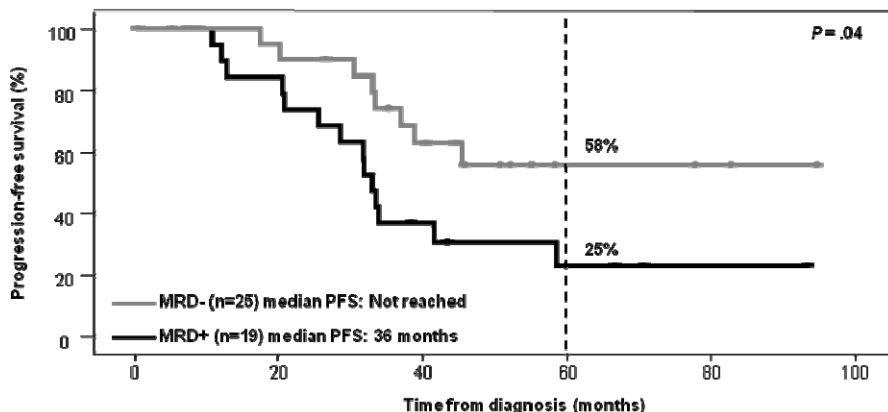
В



Accordingly, we have seen in our series of 157 patients with immunophenotypic information after induction therapy but before ASCT that MRD-negative patients ($n=16$, 10%) had an increased PFS (median not reached vs. 43 months, $P = 0,006$; Figure 1A) and OS (median not reached vs. 98 months, $P = 0,07$; fig. B) when compared to MRD-positive cases, respectively (unpublished data). However, due to the small number of patients with phenotypically undetectable disease prior to transplantation this type of information is somehow limited. Moreover, this data stresses an important aspect concerning stem cell transplantation, which is its ability to increase the frequency and/or the quality of the post-induction response. Accordingly, a personal sub analysis of 44 patients who were in CR after induction therapy but still MRD-positive showed that; patients who were MRD-negative ($N = 25$, 57%) after ASCT had a significantly increased PFS over patients with persistent disease (median not reached vs. 36 months, $P = 0,04$; respectively – fig. 2). This data indicates that the influence of ASCT in improving the quality of response impacts on MM patients' outcome. Regarding allogenic-based therapies, it will probably be necessary more time after transplantation for MRD investigations to be relevant, in order to fully evaluate the potential graft vs. myeloma effect [162].

Рис. 1. Выживаемость без прогрессирования заболевания (ВБП) и общая выживаемость (ОВ) в зависимости от наличия или отсутствия злокачественных ПЦ по данным анализа после индукционной терапии (до АТСК). На рис. А и В показаны значения ВБП и ОВ для больных, включенных в настоящий анализ ($n = 157$).

Fig. 1. Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) according to the presence or absence of malignant PCs assessed post-induction therapy (before ASCT). Panels A and B show PFS and OS for patients included in the present analysis ($N = 157$).



Сравнение категорий ремиссии – иммунофенотипическая ПР

В 1998 г. EBMT предложила новый критерий оценки эффекта при ММ после ВДТ/АТСК [163]; также в публикации указано, что по мере появления новых методов необходимо проводить повторную оценку и соответствующую модификацию предложенных критериев. Также можно использовать новые методы, если предпочтение будет сделано в пользу иммунофиксации как методики, обладающей более высокой чувствительностью по сравнению с электрофорезом и в перспективе более широкой применимостью по всему миру. В связи с этим IMWG предложила определение отношения sFLC как новый метод (и соответственно новую категорию) оценки эффекта, однако этот метод недостаточно чувствителен для определения МОЗ [164]. Достижение молекулярной ремиссии коррелируют с более благоприятным исходом [165-167]. Однако, для повышения чувствительности требуется секвенирование и идентификация CDR3 для получения специфических праймеров, и с точки зрения обычной клинической практики этот подход является более дорогостоящим, занимает много времени и отличается большими трудозатратами, поэтому вряд ли можно ожидать, что многие лаборатории станут применять его в скором времени [168]. В то же время результаты иммунофенотипирования можно получить приблизительно через 1 час, и 4-цветная проточная цитометрия считается вполне применимым методом исследования. Sarasquete et al [169] показали, что в отношении прогностической значимости оценки МОЗ молекулярные методы по сравнению с иммунофенотипированием являются частично пересекающимися, и это мнение разделяется и другими исследователями [170]. Что касается сравнения МПЦ и ИФкс, в исследовании группы из Лидса показано, что у 33 больных с отрицательным статусом ИФкс после АТСК злокачественные ПЦ выявлялись методом МПЦ в 27% (9 из 33) случаев, и в этих случаях медиана ПЖБП была статистически значимо меньше, чем в ИФкс-отрицательной/МОЗ-отрицательной группе (ПЖБП: 20 и 35 мес., соответственно; $P = 0,04$) [171].

Рис. 2. Выживаемость без прогрессирования заболевания (ВБП) в зависимости от наличия или отсутствия злокачественных ПЦ в костном мозге на 100-й день после АТСК в подгруппе больных, достигших ПР после индукционной терапии. Влияние АТСК на достижение иммунофенотипической ремиссии.

Fig. 2. Progression-free survival (PFS) according to the presence or absence of neoplastic PCs in the bone marrow at day 100 post-ASCT in a subgroup of patients achieving CR after induction therapy. The influence of ASCT in the achievement of an immunophenotypic remission.

Comparison of response categories – the immunophenotypic CR

In 1998 when the European Group for Blood and Marrow Transplant (EBMT) proposed a new criteria for evaluating the disease response in MM patients treated by HDT/ASCT [163], they also stated that re-assessment and subsequent modification of the proposed criteria would be necessary as new techniques would become available. Back then, if the immunofixation was chosen for its higher sensitivity over electrophoresis and worldwide potential applicability, at present new techniques could be implemented. Accordingly, the IMWG recently incorporated the sFLC ratio evaluation as a new method (and subsequently a new category) to assess response, but this is still rather insensitive to detect MRD [164]. The achievement of a molecular remission correlates with improved outcome [165–167]. However, to be highly sensitive CDR3 sequencing and identification is required to design specific primers and from a clinical routine point of view, this strategy is still expensive, time/labor consuming and results would not be immediately available in most laboratories [168]. In contrast, immunophenotypic results can be obtained in approximately one hour and 4-color flow cytometry is still considered affordable. Moreover, Sarasquete et al. [169] showed that the prognostic value of MRD detection of molecular vs. immunophenotypic techniques is overlapping, a finding recently suggested by others [170]. Concerning the comparison between MFC and IFx, the Leeds group showed that in 33 patients who were IFx-negative after ASCT, malignant PC were detected by MFC in 27% (9 of 33) and these cases had a median PFS significantly poorer compared to the IFx-negative/MRD-negative group (PFS: 20 vs 35 months, respectively; $P = 0,04$) [171].

По результатам многофакторного анализа статус ИФкс после трансплантации не является независимым прогностическим фактором в отличие от статуса МОЗ, определенного методом МПЦ ($P = 0,014$) [172]. В публикациях других групп также сообщается о выявлении персистирующих фенотипически клональных ПЦ у больных с ПР после лечения [173;174], нами показано, что в группе больных с ПР после АТСК ($N = 147$) персистирующее МОЗ определялось методом МПЦ более чем у трети ($53/147$, 36%) больных с аналогичным распределением по прогностическим подгруппам при сравнении с общим числом больных [175]. В данной субпопуляции больных ($n = 147$) 5-летняя выживаемость без прогрессирования заболевания составила 62% у МОЗ-отрицательных по сравнению с 30% у МОЗ-положительных больных ($n = 53$; $P \leq 0,0001$), соответствующие показатели ОВ составили 87 и 59% ($P = 0,009$). Анализ после разделения больных по подгруппам в зависимости от статуса МПЦ и ИФкс показал, что ПЖБП была значимо больше в подгруппах МПЦ/ИФкс и МПЦ/ИФкс по сравнению с подгруппами МПЦ/ИФкс и МПЦ/ИФкс [176]. Важно подчеркнуть, что больные с МПЦ/ИФкс ($n = 31$) имели очень хороший исход, аналогично больным с МПЦ/ИФкс, который был статистически значимо более благоприятным по сравнению с таковым в подгруппе МПЦ/ИФкс. Это дает основания считать, что различия результатов иммунофиксации и иммунофенотипирования могли быть обусловлены длительным временем полужизни некоторых иммуноглобулинов. Мы изучили результаты последующего анализа на парапротеин в группе МПЦ/ИФкс, оказалось, что более чем у половины больных М-белок не выявлялся (ИФкс) через 6 и более месяцев после АТСК (личные данные). Позднее мы исследовали влияние иммунофенотипической ПР в сравнении с обычной ПР и ПР с нормальным соотношением свободных легких цепей в сыворотке (sFLC), т.е. «строгой ПР») у пожилых больных ММ, получавших лечение новыми препаратами (Paiva et al., J. Clin. Oncol., 2011), в группе из 102 больных, достигших по крайней мере частичной ремиссии со снижением М-компонента на 70% и более после шести запланированных циклов индукционной терапии. ПР зарегистрирована у 43%, строгая ПР – у 30% и ИР – у 30%. В группе строгой ПР не выявлено значительного повышения выживаемости по сравнению с группой ПР, тогда как в группе ИР отмечено статистически значимое увеличение ПЖБП и ВДП по сравнению с группой строгой ПР и ПР, причем эти результаты были подтверждены данными многомерного анализа ($HR = 4,1$; $P = 0,01$ для ПЖБП). Различия между тремя методами были общим явлением. Интересно отметить, что все семь больных с ИР, но положительным статусом по данным иммунофиксации М-компонент не выявлялся при последующем анализе, тогда как в группе МПЦ+ больных с отрицательным статусом по иммунофиксации ($n = 20$) наблюдалась тенденция к раннему исчезновению М-компонента (медиана 3 мес.). Аналогично у пяти из одиннадцати пациентов со строгой ПР, но положительным результатом МПЦ, клинически выраженное прогрессирование заболевания регистрировалось через период времени с медианой 13 месяцев после индукции.

In addition, the multivariate analysis did not retained the IFX status after transplantation as an independent prognostic factor, in contrast to the MRD status by MFC ($P = 0,014$) [172]. The detection of persistent phenotypically clonal PC in CR patients after treatment have also been reported by others [173; 174], and we have recently demonstrated that in a group of patients achieving CR after ASCT ($N = 147$) MFC was able to detect persistent MRD in more than 1/3 (53/147, 36%), with a similar prognostic differentiation when compared to the overall series of patients [175]. In this subset of patients ($N = 147$) the 5-year PFS rate was 62% in MRD-negative versus 30% in MRD-positive cases ($N = 53$; $P \leq 0,0001$), and the respective 5-year OS rates were 87% versus 59% ($P = 0,009$). Furthermore, when discriminating patients according to both MFC and IFx status, PFS was significantly longer in MFC-/IFx- and MFX/IFx vs MFC/IFx and MFC/IFx+ [176]. It is important to emphasize that MFC/IFx patients ($n = 31$) had a very good out-come, similar to MFC/IFxpatients and significantly better than MFC/IFxpatients. This suggests that the discrepant results between immunofixation and immunophenotyping could be due to the long half-life of some immunoglobulins. In fact, we have investigated subsequent paraprotein analysis of the MFX/IFx group and more than half of patients had negative M-protein (IFx) six months or more after ASCT (personal data). Most recently, we investigated the impact of immunophenotypic CR versus conventional CR and CR plus normal serum free light chain (sFLC) ratio ("stringent CR") in elderly multiple myeloma (MM) patients treated with novel agents (Paiva et al., J. Clin. Oncol., 2011) in a series of 102 patients achieving at least a partial response with $\geq 70\%$ reduction in M-component after the six planned induction cycles. 43% of patients achieved CR, 30% "stringent CR" and 30% IR. Patients in "stringent CR" showed no significant survival advantage compared with those in CR, while patients in IR showed significantly increased PFS and TTP than those in "stringent CR" or CR; this was confirmed by multivariate analysis ($HR = 4.1$; $P = 0,01$ for PFS). Discrepancies between the three techniques were relatively common. Notably, in all seven patients achieving IR but remaining immunofixation positive the M-component disappeared in follow-up analysis. In contrast, MFC positive patients who were immunofixation negative ($n = 20$) showed a tendency towards early reappearance of the M-component (median: 3 months). Similarly, in five of eleven "stringent CR" but MFC positive patients, symptomatic disease progression was recorded at a median of 13 months after induction.

Этот анализ показал, что достижение иммунофенотипической ПР коррелирует с более высокой выживаемостью без прогрессирования и более продолжительным временем до прогрессирования заболевания по сравнению с обычной ПР и строгой ПР. Также нами было показано, что эти три метода дают дополняющую друг друга информацию, поэтому необходимо разработать более точные критерии оценки эффекта при ММ. В совокупности все эти результаты указывают, что достижение иммунофенотипической ремиссии обладает большей клинической значимостью, чем достижение полной ремиссии, поскольку позволяет выделить группы больных с различным исходом [177]. Как подчеркивалось выше, одним из недостатков определения ПР является зависимость этого эффекта от исходных клинических и биологических характеристик больных, тогда как статус МОЗ по данным МПЦ позволяет статистически значимо выделять пациентов с более (МОЗ-) и менее (МОЗ+) благоприятным прогнозом независимо от скорости пролиферации злокачественных ПЦ (S-фаза), уровней микроглобулинов $\beta 2$ и статуса заболевания (ISS) [178]. Понимая, какую важную роль играет цитогенетика при данном заболевании, мы также определяли прогностическое значение статуса МОЗ в разных FISH-цитогенетических подгруппах риска (рис. 3). В подгруппе стандартного риска (отсутствие $t(4;14)$, $t(14;16)$ и $del(17p)$; $n = 81$) ПЖБП была больше у МОЗ- больных по сравнению с МОЗ+ (медиана ПЖБП: не достигнута и 37 мес., $P = 0,001$; рис. 3А) [179]. Интересно, что несмотря на небольшое число больных ($n = 16$) в группе высокого риска [$t(4;14)$, $t(14;16)$, $del(17p)$], ПЖБП была также больше при МОЗ- статусе по сравнению с МОЗ+ (медиана ПЖБП: 30 и 19 мес., $P = 0,07$; рис. 3В), следовательно, достижение ремиссии по МПЦ является важной целью лечения даже в группах высокого риска [180]. Эти факты в совокупности указывают на необходимость уточнения критерия оценки эффекта при ММ, который должен включать с настоящего времени и далее новый – иммунофенотипический – статус. Мы изучили вопрос о том, какой прогностический фактор способен проспективно идентифицировать больных с неустойчивой ПР, т.к. это обстоятельство четко ассоциируется с негативным исходом (медиана общей продолжительности жизни 39 мес.). Оказалось, что наличие цитогенетических показателей высокого риска по FISH ($HR = 17,3$; $P = 0,002$) и персистенция МОЗ по данным МПЦ на 100-ый день после ВДТ/АТСК ($HR = 8,0$; $P = 0,005$) являются единственными независимыми факторами предсказания неустойчивой ПР. Следовательно, эти два показателя позволяют идентифицировать больных в ПР с высоким риском раннего прогрессирования после ВДТ/АТСК, в лечении которых можно попробовать использовать новые препараты (Paiva et al., Blood, 2012).

Последующий мониторинг

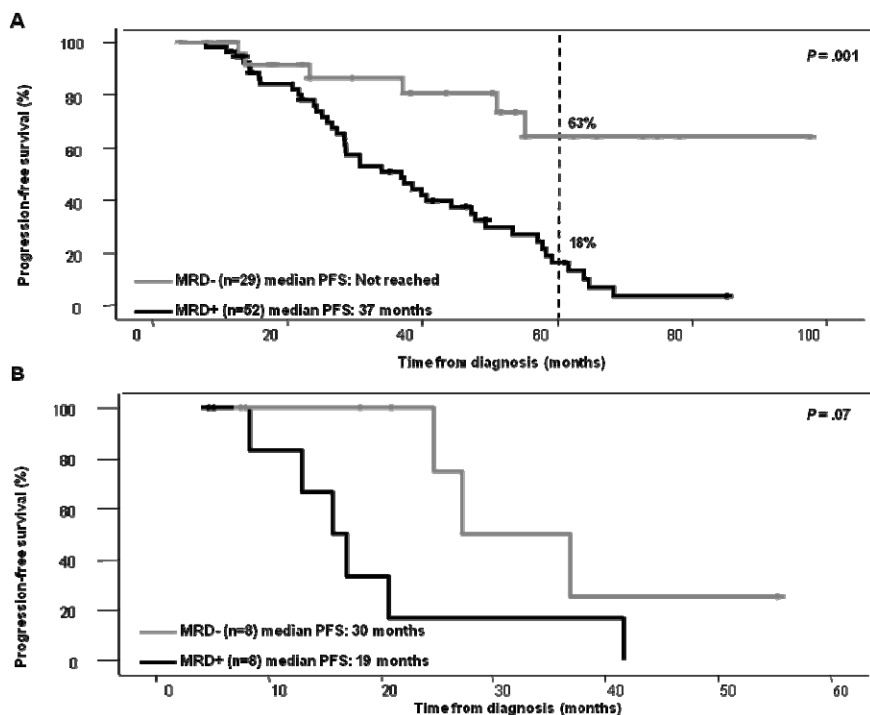
минимального остаточного заболевания при миеломе

В научном сообществе исследователей миеломы крепнет убеждение в том, что основной целью лечения на ближайшее будущее является перевод этого неизлечимого заболевания в хроническое состояние (особенно у лиц из группы низкого риска).

This analysis showed that achieving an immunophenotypic CR translates into superior PFS and TTP compared with conventional CR or “stringent CR”. Moreover, we have found that these techniques provide complementary information and thus, an effort should be made to refine response criteria in MM. Altogether, these results clearly indicate that achieving an immunophenotypic remission is clinically more meaningful than achieving a complete remission, as it can better discriminate MM patients with a significantly different outcome [177]. As stressed above, one of the pitfalls pointed to the value of CR is that it seems to be dependent of the base-line clinical and biological picture of patients. In contrast, the MRD status by MFC significantly differentiates patients with a more favorable (MRD-negative) or adverse (MRD-positive) prognosis irrespectively of the malignant PC rate of proliferation (S-phase), β 2-microglobulin levels and disease status (ISS) [178]. Moreover, and knowing the major role that cytogenetics play in this disease, we have also evaluated the prognostic value of the MRD status in different FISH-cytogenetic risk subgroups (fig. 3). Among standard-risk patients (absence of t(4;14), t(14;16), and del(17p); n = 81), those who were MRD-negative had longer PFS compared with MRD-positive patients (median PFS: not reached vs 37 months, P = 0,001; fig. 3A) [179]. Although the number of high-risk patients [t(4;14), t(14;16), or del(17p)] was small (N = 16), interestingly those who achieved MRD-negative status also had longer PFS compared with MRD-positive patients (median PFS: 30 vs 19 months, P = 0,07; fig. 3B), indicating that the achievement of MFC remission is an important goal even among patients with high-risk cytogenetics [180]. Altogether, these findings support the need of a refinement of the MM criterion of response, that should include from now on this new – immunophenotypic remission – status. In fact, we have recently investigated which prognostic markers can prospectively identify patients with unsustained CR since these are clearly associated with a dismal outcome (median overall survival: 39 months). We have found that the presence of baseline high-risk cytogenetics by FISH (HR = 17.3; P = 0,002), and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry at day+100 after HDT/ASCT (HR = 8.0; P = 0,005) were the only independent factors predicting unsustained CR. In consequence, these two parameters may help to identify patients in CR at risk of early progression after HDT/ASCT in whom novel treatments should be investigated (Paiva et al., Blood, 2012).

Minimal residual disease sequential monitoring in myeloma

It is the general feeling in the myeloma scientific community that turning this incurable disease into a chronic one (especially in low-risk patients) is a line in the near horizon.



Хорошо известно, что это возможно только в случае достижения высококачественной устойчивой ремиссии. Соответственно, в последнем исследовании группы из Арканзаса показано, что для достижения длительной ремиссии важнее поддерживать ПР, а не достичь ее как можно раньше [181]. Поэтому необходимо определить режимы персонализированной поддерживающей терапии на основании индивидуальных уровней остаточного заболевания, а для этого необходимы методы, которые были бы одновременно высокочувствительными и легко осуществимыми. В этой связи некоторые исследования последовательного определения МОЗ молекулярными методами показали, что этот вид анализа обладает значительной прогностической ценностью [182;183]. Однако, эти исследования проводились в небольших группах больных, что отражает незначительную степень их применимости и делает МПЦ привлекательным инструментом оценки эффекта лечения в течение длительного периода времени. Мы показали, что иммунофенотипирование является эффективным методом определения МОЗ при миеломе на разных этапах лечения и что полученные этим методом результаты связаны с выживаемостью [184].

Рис. 3. Выживаемость без прогрессирования заболевания (ВБП) в зависимости от наличия или отсутствия злокачественных ПЦ в костном мозге на 100-й день после АТСК. На рис. А и В показана ВБП в группе стандартного (N = 81) и высокого (N = 16) риска соответственно по данным FISH-цитогенетического исследования. Цитогенетические показатели группы высокого риска – любые t(4;14), t(14;16) и del(17p); группа стандартного риска – все прочие случаи.

Fig. 3. Progression-free survival (PFS) according to the presence or absence of clonal PCs in the bone marrow at day 100 post-ASCT. Panel A and B show PFS for standard-risk (N = 81) and high-risk (N = 16) patients according to FISH-cytogenetics, respectively. High-risk cytogenetics included any t(4;14), t(14;16), and del(17p); standard-risk cytogenetics included all other cases.

It is also well known that this will only be possible if high quality and sustained remissions are achieved. Accordingly, a recent study from the Arkansas group elegantly showed that for prolonged survival in myeloma, most important than fastly achieve a CR is to sustain it [181]. Thus, patient-specific maintenance therapies should be determined based on individual levels of residual disease, and this will require techniques that can be simultaneously high-sensitive and easily applicable. In this regard some molecular-based sequential MRD studies have demonstrated that this type of analysis affords valuable prognostication [182;183]. However, these studies were performed in small series reflecting the low applicability of this technique, highlighting MFC as an attractive tool in long-term evaluation of patients response. Accordingly, we have recently demonstrated that immunophenotyping is an effective approach to detect MRD in myeloma patients at different stages of treatment, and how it reflects on survival [184].

Результаты мониторинга в 2 временных точках (перед АТСК и через 100 дней после АТСК) показали, что больные, у которых определялся эффект лечения на ранних сроках, и которые могут достичь иммунофенотипической ремиссии в ранние сроки после индукции, имеют более благоприятный прогноз по сравнению с лицами, достигшими этого статуса только после АТСК, и очевидно более благоприятный прогноз по сравнению с лицами, лечеными без эффекта [185]. Такие больные, устойчивые к ХТ, должны включаться в группу повышенного риска и становиться кандидатами на экспериментальную терапию. Интересно отметить, что эти результаты не только указывают на целесообразность применения МПЦ при последующем мониторинге ММ, но также подчеркивают, что качество ремиссии в результате индукционной терапии по данным иммунофенотипирования влияет на конечный исход заболевания.

Мониторинг материала стволовых клеток

СК ПК являются предпочтительным материалом для АТСК, т.к. их применение ассоциируется с более быстрым восстановлением гемопоэза [186] и их легко получить [187; 188]. Нами [189] и другими исследователями [190; 191] было показано, что ПК менее контаминирована ПЦ, чем КМ. Эти работы проведены из-за опасения, что материал СКПК может быть контаминирован злокачественными ПЦ, присутствующими в кровотоке. Не вызывает удивления также тот факт, что эти исследования [192-198] показали присутствие неопластических ПЦ в значительном количестве материала СКПК (16-52%). Причем, как молекулярное, так и иммунофенотипическое выявление остаточных ПЦ в аферезных образцах, по-видимому, коррелируют с исходом [197-199]. Таким образом, несмотря на то, что, по общему мнению, материал СКПК обычно контаминирован, в лечении больных множественной ММ большую помощь может оказать количественное определение циркулирующих опухолевых клеток.

Заключение

В последние годы парадигма лечения ММ претерпела значительные изменения. Применение новых препаратов и потенциальное использование еще более новых делает реальной индивидуализацию лечения на основе точного определения эффекта. В обзоре большое внимание уделено релевантности определения МОЗ при миеломе; показано также, что МПЦ можно считать методом выбора для такого определения. Иммунофенотипические методы определения МОЗ позволяют проводить сравнение эффективности различных лечебных подходов, подбирать индивидуальные режимы поддерживающей терапии и оценивать их эффективность в режиме непрерывного мониторинга. Показано, что достижение иммунофенотипической ремиссии обладает прогностической ценностью для ПЖБП и общей ПЖ, а также является наиболее релевантным прогностическим фактором у больных, которые являются кандидатами на АТСК. В этой связи IMWG недавно пересмотрела категорию сПР, для которой теперь требуется отсутствие МОЗ по данным ≥ 4 -цветной МПЦ, и мы с нетерпением ожидаем результатов многочисленных и хорошо спланированных клинических исследований.

Based on two specific monitoring-points (prior to- or at day 100 after- ASCT) our results showed that early responders, able to promptly achieve an immunophenotypic remission after induction had an improved outcome when compared to patients that were only able to achieve that status after ASCT, and obviously a better outcome when compared to cases that did not respond at all.[185]. Such chemoresistant patients should be considered a high-risk subgroup and candidates for experimental therapies. Interestingly, these results not only support the use of MFC in the sequential monitoring in MM but also stress the fact that the quality of response to induction therapy – when immunophenotypically assessed – influences the final outcome in this disease.

Monitoring of stem cell harvests

Peripheral blood (PB) stem cells (SC) are the preferred source for ASCT since their use is associated with more rapid hematopoietic reconstitution [186] and are easy to collect [187; 188]. Moreover, we [189] and others [190; 191] reported that PB is less contaminated with PC than BM harvests. Obviously, these studies have taken place due to the major concern that reinfused PBSC harvest could be contaminated with malignant circulating PC. Unsurprisingly, these studies also showed that a consistent number of PBSC harvests (16–52%) are contaminated with neoplastic PC [192–196]. Moreover, both molecular and immunophenotypic detection of residual PC in aphaeresis samples seems to correlate with outcome [197–199]. Thus, although the general feeling is that PBSC harvests will usually be contaminated, the quantification of the circulating tumor burden may be of help in the management of multiple myeloma patients.

Concluding remarks

The paradigm of the myeloma treatment has impressively changed in recent years. The introduction of novel agents and the potential future incorporation of other drugs will turn tailored therapies based on patients' on-set depth of response a reality. This review has highlighted the clinical relevance of MRD investigations in myeloma and showed how MFC should be considered the method of choice to perform them. Immunophenotypic MRD-studies can help to compare the efficacy of different treatment strategies, design patient-specific maintenance approaches and evaluate them in a sequential monitoring fashion. Moreover, the achievement of an immunophenotypic remission has prognostic value for both PFS and OS, and is one of the most relevant prognostic factors in patients eligible to autotransplantation. Accordingly, the IMWG most recently updated their sCR response category that now also requires absence of MRD detected by ≥ 4 color MFC, and it will be exciting to see its use in this era of innumerable and well designed clinical trials.

Reference List

1. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A et al. Improved survival in multiple myeloma and the im-pact of novel therapies. *Blood* 2008;111:2516-2520.
2. Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. Myeloma Trialists' Collaborative Group. *J.Clin.Oncol.* 1998;16:3832-3842.
3. Corso A, Nozza A, Lazzarino M et al. Plateau phase in multiple myeloma: an end-point of conven-tional-dose chemotherapy. *Haematologica* 1999;84:336-341.
4. Attal M, Harousseau JL. Role of autologous stem-cell transplantation in multiple myeloma. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2007;20:747-759.
5. Barlogie B, Tricot G, Anaissie E et al. Thalidomide and hematopoietic-cell transplantation for mul-tiple myeloma. *N.Engl.J.Med.* 2006;354:1021-1030.
6. Child JA, Morgan GJ, Davies FE et al. High-dose chemotherapy with he-matopoietic stem-cell res-cue for multiple myeloma. *N.Engl.J.Med.* 2003;348:1875-1883.
7. Lenhoff S, Hjorth M, Turesson I et al. Intensive therapy for multiple mye-loma in patients younger than 60 years. Long-term results focusing on the effect of the degree of response on survival and relapse pattern after trans-plantation. *Haematologica* 2006;91:1228-1233.
8. Moreau P, Facon T, Attal M et al. Comparison of 200 mg/m(2) melphalan and 8 Gy total body ir-radiation plus 140 mg/m(2) melphalan as condition-ing regimens for peripheral blood stem cell transplan-tation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: final analysis of the Intergroupe Fran-cophone du Myelome 9502 randomized trial. *Blood* 2002;99:731-735.
9. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM et al. A prospective, randomized trial of autologous bone mar-row transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N.Engl.J.Med.* 1996;335:91-97.
10. Palumbo A, Bringhen S, Petrucci MT et al. Intermediate-dose melphalan improves survival of myeloma patients aged 50 to 70: results of a random-ized controlled trial. *Blood* 2004;104:3052-3057.
11. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N.Engl.J.Med.* 2008;359:906-917.
12. Offidani M, Corvatta L, Piersantelli MN et al. Thalidomide, dexamethasone, and pegylated lipo-somal doxorubicin (ThaDD) for patients older than 65 years with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2006;108:2159-2164.

13. Iacobucci I, Saglio G, Rosti G et al. Achieving a major molecular response at the time of a complete cytogenetic response (CCgR) predicts a better duration of CCgR in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients. *Clin.Cancer Res.* 2006;12:3037-3042.
14. Lo CF, Diverio D, Pandolfi PP et al. Molecular evaluation of residual disease as a predictor of relapse in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet* 1992;340:1437-1438.
15. Blade J, Samson D, Reece D et al. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant. *Br.J.Haematol.* 1998;102:1115-1123.
16. Lahuerta JJ, Martinez-Lopez J, Serna JD et al. Remission status defined by immunofixation vs. electrophoresis after autologous transplantation has a major impact on the outcome of multiple myeloma patients. *Br.J.Haematol.* 2000;109:438-446.
17. Lahuerta JJ, Mateos MV, Martinez-Lopez J et al. Influence of pre- and post-transplantation responses on outcome of patients with multiple myeloma: sequential improvement of response and achievement of complete response are associated with longer survival. *J.Clin.Oncol.* 2008;26:5775-5782.
18. Alexanian R, Weber D, Giralt S et al. Impact of complete remission with intensive therapy in patients with responsive multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27:1037-1043.
19. Lahuerta JJ, Martinez-Lopez J, Serna JD et al. Remission status defined by immunofixation vs. electrophoresis after autologous transplantation has a major impact on the outcome of multiple myeloma patients. *Br.J.Haematol.* 2000;109:438-446.
20. Lahuerta JJ, Mateos MV, Martinez-Lopez J et al. Influence of pre- and post-transplantation responses on outcome of patients with multiple myeloma: sequential improvement of response and achievement of complete response are associated with longer survival. *J.Clin.Oncol.* 2008;26:5775-5782.
21. Barlogie B, Tricot G, Rasmussen E et al. Total therapy 2 without thalidomide in comparison with total therapy 1: role of intensified induction and posttransplantation consolidation therapies. *Blood* 2006;107:2633-2638.
22. Barlogie B, Tricot GJ, van RF et al. Long-term outcome results of the first tandem autotransplant trial for multiple myeloma. *Br.J.Haematol.* 2006;135:158-164.
23. Barlogie B, Tricot G, Anaissie E et al. Thalidomide and hematopoietic-cell transplantation for multiple myeloma. *N.Engl.J.Med.* 2006;354:1021-1030.

24. Alexanian R, Weber D, Giralt S et al. Impact of complete remission with intensive therapy in pa-tients with responsive multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27:1037-1043.
25. Keren DF, Alexanian R, Goeken JA et al. Guidelines for clinical and laboratory evaluation pa-tients with monoclonal gammopathies. *Arch.Pathol.Lab Med.* 1999;123:106-107.
26. Tricot GJ. What is the significance of molecular remission in multiple myeloma? *Clin.Adv.Hematol.Oncol.* 2007;5:91-95.
27. Harousseau JL, Attal M, vet-Loiseau H. The role of complete response in multiple myeloma. *Blood* 2009;114:3139-3146.
28. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplanta-tion. *Blood* 2002;100:3095-3100.
29. Paiva B, Vidriales MB, Cervero J et al. Multiparameter flow cytometric remis-sion is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplanta-tion. *Blood* 2008;112:4017-4023.
30. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G et al. International Myeloma Working Group guidelines for se-rum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009;23:215-224.
31. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G et al. International Myeloma Working Group guidelines for se-rum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009;23:215-224.
32. Singhal S, Vickrey E, Krishnamurthy J et al. The relationship between the serum free light chain assay and serum immunofixation electrophoresis, and the definition of concordant and discordant free light chain ratios. *Blood* 2009;114:38-39.
33. Fernandez de LC, Cibeira MT, Elena M et al. Abnormal serum free light chain ratio in patients with multiple myeloma in complete remission has strong association with the presence of oligoclonal bands: implications for stringent complete remission definition. *Blood* 2009
34. Blade J, Samson D, Reece D et al. Criteria for evaluating disease response and progression in pa-tients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommit-tee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant. *Br.J.Haematol.* 1998;102:1115-1123.
35. Davies FE, Forsyth PD, Rawstron AC et al. The impact of attaining a minimal disease state after high-dose melphalan and autologous transplan-tation for multiple myeloma. *Br.J.Haematol.* 2001;112:814-819.
36. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M et al. Report of the European Myeloma Network on multi-parametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008;93:431-438.

37. Chee CE, Kumar S, Larson DR et al. The importance of bone marrow examination in determining complete response to therapy in patients with multiple myeloma. *Blood* 2009;114:2617-2618.
38. Almeida J, Orfao A, Ocqueteau M et al. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br.J.Haematol.* 1999;107:121-131.
39. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica* 2005;90:1365-1372.
40. Cavo M, Terragna C, Martinelli G et al. 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.
41. Martinelli G, Terragna C, Zamagni E et al. Polymerase chain reaction-based detection of minimal residual disease in multiple myeloma patients receiving allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2000;85:930-934.
42. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica* 2005;90:1365-1372.
43. Harousseau JL, Attal M, vet-Loiseau H. The role of complete response in multiple myeloma. *Blood* 2009;114:3139-3146.
44. Davies FE, Rawstron AC, Owen RG, Morgan GJ. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma. *Best.Pract.Res.Clin. Haematol.* 2002;15:197-222.
45. Lioznov M, Badbaran A, Fehse B et al. Monitoring of minimal residual disease in multiple myeloma after allo-SCT: flow cytometry vs PCR-based techniques. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:913-916.
46. Mason KD, Juneja S. Go with the flow for monitoring response in myeloma with minimal residual disease. *Leuk.Lymphoma* 2008;49:177-178.
47. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica* 2005;90:1365-1372.
48. Lioznov M, Badbaran A, Fehse B et al. Monitoring of minimal residual disease in multiple myeloma after allo-SCT: flow cytometry vs PCR-based techniques. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:913-916.
49. Owen RG, Rawstron AC. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: flow cytometry is the method of choice. *Br.J.Haematol.* 2005;128:732-733.

50. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D et al. Minimal residual disease monitoring in multi-ple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica* 2005;90:1365-1372.
51. Walker R, Barlogie B, Haessler J et al. Magnetic resonance imaging in multiple myeloma: diag-nostic and clinical implications. *J.Clin.Oncol.* 2007;25:1121-1128.
52. Mateo G, Montalban MA, Vidriales MB et al. Prognostic value of immunophenotyping in multi-ple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J.Clin.Oncol.* 2008;26:2737-2744.
53. Mateo MG, San M, I, Orfao de MA. Immunophenotyping of plasma cells in multiple myeloma. *Methods Mol.Med.* 2005;113:5-24.
54. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am.J.Pathol.* 1998;152:1655-1665.
55. Perez-Andres M, Santiago M, Almeida J et al. Immunophenotypic approach to the identification and characterization of clonal plasma cells from patients with monoclonal gammopathies. *J.Biol. Regul. Homeost. Agents* 2004;18:392-398.
56. Perez-Andres M, Almeida J, Martin-Ayuso M et al. Clonal plasma cells from monoclonal gam-mopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different ex-pression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microen-vironment. *Leukemia* 2005;19:449-455.
57. Braylan RC. Impact of flow cytometry on the diagnosis and characterization of lymphomas, chronic lymphoproliferative disorders and plasma cell neoplasias. *Cytometry A* 2004;58:57-61.
58. Kaleem Z, Crawford E, Pathan MH et al. Flow... critical analysis of data. *Arch.Pathol.Lab Med.* 2003;127:42-48.
59. Rawstron AC, Kennedy B, Evans PA et al. Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. *Blood* 2001;98:29-35.
60. San Miguel JF, Martinez A, Macedo A et al. Immunophenotyping investigation of minimal re-sidual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997;90:2465-2470.
61. San Miguel JF, Vidriales MB, Lopez-Berges C et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may con-tribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 2001;98:1746-1751.

62. Vidriales MB, Perez JJ, Lopez-Berges MC et al. Minimal residual disease in adolescent (older than 14 years) and adult acute lymphoblastic leukemias: early immunophenotypic evaluation has high clinical value. *Blood* 2003;101:4695-4700.
63. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am.J.Pathol.* 1998;152:1655-1665.
64. Paiva B, Vidriales MB, Mateo G et al. The persistence of immunophenotypically normal residual bone marrow plasma cells at diagnosis identifies a good prognostic subgroup of symptomatic multiple myeloma patients. *Blood* 2009
65. Perez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multi-parameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood* 2007;110:2586-2592.
66. Mateo G, Montalbán MA, Vidriales MB et al. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J.Clin.Oncol.* 2008;26:2737-2744.
67. Pedreira CE, Costa ES, Barrena S et al. Generation of flow cytometry data files with a potentially infinite number of dimensions. *Cytometry A* 2008;73:834-846.
68. Pedreira CE, Costa ES, Almeida J et al. A probabilistic approach for the evaluation of minimal residual disease by multiparameter flow cytometry in leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Cytometry A* 2008;73A:1141-1150.
69. Pedreira CE, Costa ES, Arroyo ME, Almeida J, Orfao A. A multidimensional classification approach for the automated analysis of flow cytometry data. *IEEE Trans. Biomed. Eng* 2008;55:1155-1162.
70. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat.Rev.Immunol.* 2004;4:648-655.
71. San-Miguel JF, Vidriales MB, Orfao A. Immunological evaluation of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukaemia (AML). *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2002;15:105-118.
72. Vidriales MB, San-Miguel JF, Orfao A, Coustan-Smith E, Campana D. Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* 2003;16:599-612.
73. Rawstron AC. Immunophenotyping of plasma cells. *Curr.Protoc.Cytom.* 2006;Chapter 6:Unit6.

74. Funaro A, Malavasi F. Human CD38, a surface receptor, an enzyme, an adhesion molecule and not a simple marker. *J.Biol.Regul.Homeost.Agents* 1999;13:54-61.
75. Almeida J, Orfao A, Ocqueteau M et al. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br.J.Haematol.* 1999;107:121-131.
76. Harada H, Kawano MM, Huang N et al. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 1993;81:2658-2663.
77. Terstappen LW, Johnsen S, Segers-Nolten IM, Loken MR. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood* 1990;76:1739-1747.
78. Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C et al. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br.J.Haematol.* 1996;94:318-323.
79. Lin P, Owens R, Tricot G, Wilson CS. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am.J.Clin.Pathol.* 2004;121:482-488.
80. Almeida J, Orfao A, Ocqueteau M et al. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br.J.Haematol.* 1999;107:121-131.
81. Lin P, Owens R, Tricot G, Wilson CS. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am.J.Clin.Pathol.* 2004;121:482-488.
82. Rawstron AC, Barrans SL, Blythe D et al. In multiple myeloma, only a single stage of neoplastic plasma cell differentiation can be identified by VLA-5 and CD45 expression. *Br.J.Haematol.* 2001;113:794-802.
83. Almeida J, Orfao A, Ocqueteau M et al. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br.J.Haematol.* 1999;107:121-131.
84. Perez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multi-parameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood* 2007;110:2586-2592.
85. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood* 2002;99:1853-1856.
86. Dahl IM, Rasmussen T, Kauric G, Husebekk A. Differential expression of CD56 and CD44 in the evolution of extramedullary myeloma. *Br.J. Haematol.* 2002;116:273-277.
87. Davies FE, Forsyth PD, Rawstron AC et al. The impact of attaining a minimal disease state after high-dose melphalan and autologous transplantation for multiple myeloma. *Br.J.Haematol.* 2001;112:814-819.

88. Harada H, Kawano MM, Huang N et al. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 1993;81:2658-2663.
89. Mateo G, Castellanos M, Rasillo A et al. Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. *Clin.Cancer Res.* 2005;11:3661-3667.
90. Mateo G, Montalban MA, Vidriales MB et al. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA / GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J.Clin.Oncol.* 2008;26:2737-2744.
91. Nowakowski GS, Witzig TE, Dingli D et al. Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2005;106:2276-2279.
92. Ocqueteau M, San Miguel JF, Gonzalez M, Almeida J, Orfao A. Do myelomatous plasma cells really express surface immunoglobulins? *Haematologica* 1996;81:460-463.
93. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am.J.Pathol.* 1998;152:1655-1665.
94. Orfao A, Garcia-Sanz R, Lopez-Berges MC et al. A new method for the analysis of plasma cell DNA content in multiple myeloma samples using a CD38/propidium iodide double staining technique. *Cytometry* 1994;17:332-339.
95. Paiva B, Vidriales MB, 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;112:4017-4023.
96. Paiva B, Vidriales MB, Mateo G et al. The persistence of immunophenotypically normal residual bone marrow plasma cells at diagnosis identifies a good prognostic subgroup of symptomatic multiple myeloma patients. *Blood* 2009
97. Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Robillard N et al. Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells. *Blood* 1994;84:2597-2603.
98. Pellat-Deceunynck C, Barille S, Puthier D et al. Adhesion molecules on human myeloma cells: significant changes in expression related to malignancy, tumor spreading, and immortalization. *Cancer Res.* 1995;55:3647-3653.
99. Perez-Andres M, Santiago M, Almeida J et al. Immunophenotypic approach to the identification and characterization of clonal plasma cells from patients with monoclonal gammopathies. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 2004;18:392-398.

100. Perez-Andres M, Almeida J, Martin-Ayuso M et al. Clonal plasma cells from monoclonal gam-mopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different ex-pression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microen-vironment. *Leukemia* 2005;19:449-455.
101. Perez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multi-parameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood* 2007;110:2586-2592.
102. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplanta-tion. *Blood* 2002;100:3095-3100.
103. Robillard N, Pellat-Deceunynck C, Bataille R. Phenotypic characterization of the human mye-loma cell growth fraction. *Blood* 2005;105:4845-4848.
104. San Miguel JF, Gonzalez M, Gascon A et al. Immunophenotypic heterogeneity of multiple mye-loma: influence on the biology and clinical course of the disease. Castellano-Leones (Spain) Cooperative Group for the Study of Monoclonal Gammopathies. *Br.J.Haematol.* 1991;77:185-190.
105. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood* 2002;99:1853-1856.
106. San Miguel JF, Gutierrez NC, Mateo G, Orfao A. Conventional diagnostics in multiple mye-loma. *Eur.J.Cancer* 2006;42:1510-1519.
107. Orfao A, Schmitz G, Brando B et al. Clinically useful information provided by the flow cytomet-ric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. *Clin.Chem.* 1999;45:1708-1717.
108. Mateo G, Montalban MA, Vidriales MB et al. Prognostic value of immunophenotyping in multi-ple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J.Clin.Oncol.* 2008;26:2737-2744.
109. Mateo G, Montalban MA, Vidriales MB et al. Prognostic value of immunophenotyping in multi-ple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J.Clin.Oncol.* 2008;26:2737-2744.
110. Paiva B, Vidriales MB, Cervero J et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplanta-tion. *Blood* 2008;112:4017-4023.

111. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood* 2002;99:1853-1856.
112. Kobayashi S, Hyo R, Amitani Y et al. Four-color flow cytometric analysis of myeloma plasma cells. *Am.J.Clin.Pathol.* 2006;126:908-915.
113. Liu H, Yuan C, Heinerich J et al. Flow cytometric minimal residual disease monitoring in pa-tients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: a retrospective study. *Leuk.Lymphoma* 2008;49:306-314.
114. Vidrales MB, Orfao A, San-Miguel JF. Immunologic monitoring in adults with acute lym-phoblastic leukemia. *Curr.Oncol.Rep.* 2003;5:413-418.
115. Escribano L, az-Agustin B, Lopez A et al. Immunophenotypic analysis of mast cells in mastocy-tosis: When and how to do it. Proposals of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA). *Cytometry B Clin.Cytom.* 2004;58:1-8.
116. Subira D, Castanon S, Aceituno E et al. Flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid samples and its usefulness in routine clinical practice. *Am.J.Clin.Pathol.* 2002;117:952-958.
117. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M et al. Report of the European Myeloma Network on multi-parametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008;93:431-438.
118. Almeida J, Orfao A, Ocqueteau M et al. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br.J.Haematol.* 1999;107:121-131.
119. Almeida J, Orfao A, Ocqueteau M et al. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br.J.Haematol.* 1999;107:121-131.
120. Pedreira CE, Costa ES, Barrera S et al. Generation of flow cytometry data files with a poten-tially infinite number of dimensions. *Cytometry A* 2008;73:834-846.
121. Pedreira CE, Costa ES, Almeida J et al. A probabilistic approach for the evaluation of minimal residual disease by multiparameter flow cytometry in leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disor-ders. *Cytometry A* 2008;73A:1141-1150.
122. Pedreira CE, Costa ES, Arroyo ME, Almeida J, Orfao A. A multidimensional classification ap-proach for the automated analysis of flow cytometry data. *IEEE Trans.Biomed.Eng* 2008;55:1155-1162.
123. Campana D, Coustan-Smith E. Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* 2002;15:1-19.

124. San Miguel JF, Ciudad J, Vidriales MB et al. Immunophenotypical detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 1999;32:175-185.
125. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am.J.Pathol.* 1998;152:1655-1665.
126. Cao W, Goolsby CL, Nelson BP et al. Instability of immunophenotype in plasma cell myeloma. *Am.J.Clin.Pathol.* 2008;129:926-933.
127. Gupta R, Bhaskar A, Kumar L, Sharma A, Jain P. Flow cytometric immunophenotyping and minimal residual disease analysis in multiple myeloma. *Am.J.Clin.Pathol.* 2009;132:728-732.
128. Ocio EM, Mateos MV, Maiso P, Pandiella A, San-Miguel JF. New drugs in multiple myeloma: mechanisms of action and phase I/II clinical findings. *Lancet Oncol.* 2008;9:1157-1165.
129. Paiva B, Vidriales MB, 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;112:4017-4023.
130. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood* 2002;99:1853-1856.
131. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica* 2005;90:1365-1372.
132. Kobayashi S, Hyo R, Amitani Y et al. Four-color flow cytometric analysis of myeloma plasma cells. *Am.J.Clin.Pathol.* 2006;126:908-915.
133. Lioznov M, Badbaran A, Fehse B et al. Monitoring of minimal residual disease in multiple myeloma after allo-SCT: flow cytometry vs PCR-based techniques. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:913-916.
134. Liu H, Yuan C, Heinerich J et al. Flow cytometric minimal residual disease monitoring in patients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: a retrospective study. *Leuk.Lymphoma* 2008;49:306-314.
135. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood* 2002;100:3095-3100.
136. Paiva B, Vidriales MB, 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;112:4017-4023.

137. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood* 2002;99:1853-1856.
138. Rottenburger C, Kiel K, Bosing T et al. 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.
139. Ghosh N, Matsui W. Cancer stem cells in multiple myeloma. *Cancer Lett.* 2009;277:1-7.
140. Johnsen HE, Kjeldsen MK, Urup T et al. Cancer stem cells and the cellular hierarchy in haematological malignancies. *Eur.J.Cancer* 2009;45 Suppl 1:194-201.
141. Corradini P, Voena C, Tarella C et al. Molecular and clinical remissions in multiple myeloma: role of autologous and allogeneic transplantation of hematopoietic cells. *J.Clin.Oncol.* 1999;17:208-215.
142. Nadav L, Katz BZ, Baron S et al. Diverse niches within multiple myeloma bone marrow aspirates affect plasma cell enumeration. *Br.J.Haematol.* 2006;133:530-532.
143. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M et al. Report of the European Myeloma Network on multi-parametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008;93:431-438.
144. San Miguel JF, Gutierrez NC, Mateo G, Orfao A. Conventional diagnostics in multiple myeloma. *Eur.J.Cancer* 2006;42:1510-1519.
145. Barlogie B, Epstein J, Shaughnessy JD, Jr. Going with the flow, and beyond, in myeloma. *Blood* 2008;112:3917-3918.
146. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 2008;111:2516-2520.
147. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 2004;351:1860-1873.
148. Ocio EM, Mateos MV, Maiso P, Pandiella A, San-Miguel JF. New drugs in multiple myeloma: mechanisms of action and phase I/II clinical findings. *Lancet Oncol.* 2008;9:1157-1165.
149. San Miguel JF. Relapse/Refractory Myeloma Patient: Potential Treatment Guidelines. *J.Clin.Oncol.* 2009
150. Attal M, Harousseau JL, Facon T et al. Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 2003;349:2495-2502.
151. Harousseau JL, Attal M, van Loiseau H. The role of complete response in multiple myeloma. *Blood* 2009;114:3139-3146.

152. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood* 2002;99:1853-1856.
153. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood* 2002;100:3095-3100.
154. Liu H, Yuan C, Heinerich J et al. Flow cytometric minimal residual disease monitoring in patients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: a retrospective study. *Leuk.Lymphoma* 2008;49:306-314.
155. Paiva B, Vidriales MB, 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;112:4017-4023.
156. Liu H, Yuan C, Heinerich J et al. Flow cytometric minimal residual disease monitoring in patients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: a retrospective study. *Leuk.Lymphoma* 2008;49:306-314.
157. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood* 2002;100:3095-3100.
158. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood* 2002;99:1853-1856.
159. Liu H, Yuan C, Heinerich J et al. Flow cytometric minimal residual disease monitoring in patients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: a retrospective study. *Leuk.Lymphoma* 2008;49:306-314.
160. Paiva B, Vidriales MB, 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;112:4017-4023.
161. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood* 2002;100:3095-3100.
162. Davies FE, Rawstron AC, Owen RG, Morgan GJ. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma. *Best.Pract. Res. Clin. Haematol.* 2002;15:197-222.

163. Blade J, Samson D, Reece D et al. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant. *Br.J.Haematol.* 1998;102:1115-1123.
164. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009;23:215-224.
165. Cavo M, Terragna C, Martinelli G et al. 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.
166. Martinelli G, Terragna C, Zamagni E et al. Polymerase chain reaction-based detection of minimal residual disease in multiple myeloma patients receiving allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2000;85:930-934.
167. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica* 2005;90:1365-1372.
168. Owen RG, Rawstron AC. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: flow cytometry is the method of choice. *Br.J.Haematol.* 2005;128:732-733.
169. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica* 2005;90:1365-1372.
170. Lioznov M, Badbaran A, Fehse B et al. Monitoring of minimal residual disease in multiple myeloma after allo-SCT: flow cytometry vs PCR-based techniques. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:913-916.
171. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood* 2002;100:3095-3100.
172. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood* 2002;100:3095-3100.
173. Gupta R, Bhaskar A, Kumar L, Sharma A, Jain P. Flow cytometric immunophenotyping and minimal residual disease analysis in multiple myeloma. *Am.J.Clin.Pathol.* 2009;132:728-732.
174. Kobayashi S, Hyo R, Amitani Y et al. Four-color flow cytometric analysis of myeloma plasma cells. *Am.J.Clin.Pathol.* 2006;126:908-915.

175. Paiva B, Vidriales MB, 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;112:4017-4023.
176. Paiva B, Vidriales MB, 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;112:4017-4023.
177. Paiva B, Vidriales MB, 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;112:4017-4023.
178. Paiva B, Vidriales MB, 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;112:4017-4023.
179. Paiva B, Vidriales MB, 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;112:4017-4023.
180. Paiva B, Vidriales MB, 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;112:4017-4023.
181. Hoering A, Crowley J, Shaughnessy JD, Jr. et al. Complete remission in multiple myeloma ex-aminated as time-dependent variable in terms of both onset and duration in Total Therapy protocols. *Blood* 2009;114:1299-1305.
182. Cavo M, Terragna C, Martinelli G et al. 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.
183. Fenk R, Ak M, Kobbe G et al. Levels of minimal residual disease detected by quantitative molecular monitoring herald relapse in patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2004;89:557-566.
184. Paiva B, Vidriales MB, 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;112:4017-4023.
185. Paiva B, Vidriales MB, 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;112:4017-4023.
186. Boccadoro M, Pileri A. Diagnosis, prognosis, and standard treatment of multiple myeloma. *Hematol.Oncol.Clin.North Am.* 1997;11:111-131.
187. Barlogie B, Jagannath S, Vesole D, Tricot G. Autologous and allogeneic transplants for multiple myeloma. *Semin.Hematol.* 1995;32:31-44.
188. San Miguel JF, Blade CJ, Garcia-Sanz R. Treatment of multiple myeloma. *Haematologica* 1999;84:36-58.

189. Mateo G, Corral M, Almeida J et al. Immunophenotypic analysis of peripheral blood stem cell harvests from patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2003;88:1013-1021.
190. Henry JM, Sykes PJ, Brisco MJ et al. Comparison of myeloma cell contamination of bone marrow and peripheral blood stem cell harvests. *Br.J.Haematol.* 1996;92:614-619.
191. Vescio RA, Han EJ, Schiller GJ et al. Quantitative comparison of multiple myeloma tumor contamination in bone marrow harvest and leukapheresis autografts. *Bone Marrow Transplant.* 1996;18:103-110.
192. Mateo G, Corral M, Almeida J et al. Immunophenotypic analysis of peripheral blood stem cell harvests from patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2003;88:1013-1021.
193. Vogel W, Kopp HG, Kanz L, Einsele H. Myeloma cell contamination of peripheral blood stem-cell grafts can predict the outcome in multiple myeloma patients after high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 2005;131:214-218.
194. Lopez-Perez R, Garcia-Sanz R, Gonzalez D et al. The detection of contaminating clonal cells in apheresis products is related to response and outcome in multiple myeloma undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Leukemia* 2000;14:1493-1499.
195. Pope B, Brown R, Gibson J, Joshua D. Plasma cells in peripheral blood stem cell harvests from patients with multiple myeloma are predominantly polyclonal. *Bone Marrow Transplant.* 1997;20:205-210.
196. Kopp HG, Yildirim S, Weisel KC, Kanz L, Vogel W. Contamination of autologous peripheral blood progenitor cell grafts predicts overall survival after high-dose chemotherapy in multiple myeloma. *J.Cancer Res. Clin. Oncol.* 2009;135:637-642.
197. Vogel W, Kopp HG, Kanz L, Einsele H. Myeloma cell contamination of peripheral blood stem-cell grafts can predict the outcome in multiple myeloma patients after high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2005;131:214-218.
198. Lopez-Perez R, Garcia-Sanz R, Gonzalez D et al. The detection of contaminating clonal cells in apheresis products is related to response and outcome in multiple myeloma undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Leukemia* 2000;14:1493-1499.
199. Kopp HG, Yildirim S, Weisel KC, Kanz L, Vogel W. Contamination of autologous peripheral blood progenitor cell grafts predicts overall survival after high-dose chemotherapy in multiple myeloma. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 2009;135:637-642.

Катерин Аликс-Панабиер^{1;2;3}, Клаус Пантел⁴

ВЫЯВЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕМИНИРУЮЩИХ РАКОВЫХ КЛЕТОК ПРИ СОЛИДНЫХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ

¹Университетский медицинский центр, Университет Монпелье, Больница Ст. Элуа, Институт исследований в биотерапии, Лаборатория редких циркулирующих клеток человека, Монпелье, Франция

²Университетский медицинский центр, Лаборатория клеточной и гормональной биологии, Больница Арно де Вильнев, Монпелье, Франция

³Университетский институт клинических исследований UM1-EA2415, Эпидемиология, биостатистика и здоровье населения

⁴Институт биологии опухолей, Университетский медицинский центр Гамбург-Эппендорф, Гамбург, Германия

Абстракт

Количественное определение и характеристика циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в периферической крови и диссеминированных опухолевых клеток (ДОК) в костном мозге позволяет получить важную прогностическую информацию и проводить мониторинг эффективности терапии. Современные методы анализа не позволяют различать апоптотические и жизнеспособные ЦОК/ДОК, однако теперь появилась возможность применить новый метод иммуноферментного анализа EPISPOT, который способен определять белки, секретируемые/активно выделяемые из одиночных эпителиальных раковых клеток. Клетки культивируют в течение небольшого времени на мембране с покрытием из антител, которые захватывают эти секретируемые/выделенные белки, и эти белки затем детектируются вторичными антителами, меченными флюорохромом. При раке молочной железы определяли выделение цитокератина-19 (CK19) и муцина-1 (MUC1); показано, что во многих случаях жизнеспособные ДОК определяются даже при визуально локализованных опухолях (стадия M₀ 54%). Предварительные данные свидетельствуют, что наличие ДОК, выделяющих CK19, ассоциируется с неблагоприятным прогнозом. Также изучены ЦОК или CK19-секретирующие клетки (CK19-СК) в периферической крови у больных раком молочной железы стадии M₁; показано, что наличие CK19-СК является фактором неблагоприятного прогноза. При раке простаты в качестве маркера использовали секрецию ПСА; исследование показало, что значительная часть ЦОК секретирует фактор роста фибробластов-2 (FGF2) – известный фактор роста стволовых клеток. Также EPISPOT дает возможность выявлять и характеризовать жизнеспособные ЦОК/ДОК у онкологических больных, может использоваться при многопараметрическом анализе для определения белкового «отпечатка пальцев» ЦОК/ДОК. Детектирование и характеристика этих клеток позволит сделать еще один шаг на пути к индивидуализации антиметастатической терапии.

Catherine Alix-Panabières^{1,2,3}, PhD, Klaus Pantel⁴

**DETECTION AND CHARACTERIZATION
OF DISSEMINATING CANCER CELLS IN PATIENTS
WITH SOLID EPITHELIAL MALIGNANCIES**

¹University Medical Centre, University Montpellier, Saint-Eloi Hospital, Institute of Research in Biotherapy, Laboratory of Rare Human Circulating Cells, Montpellier, France

²University Medical Centre, Laboratory of Cell and Hormonal Biology, Arnaud de Villeneuve Hospital, Montpellier, France

³University Institute of Clinical Research UMI – EA2415 – Epidemiology, Biostatistics, Public Health

⁴Institute of Tumor Biology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany;

Abstract

The enumeration and characterization of circulating tumor cells (CTC) in the peripheral blood and disseminated tumor cells (DTC) in bone marrow may provide important prognostic information and might help to monitor the efficacy of therapy. Since current assays cannot distinguish between apoptotic and viable CTC/DTC, it is now possible to apply a novel ELISPOT assay (designated ‘EPISPOT’) that detects proteins secreted/released/shed from single epithelial cancer cells. Cells are cultured for a short time on a membrane coated with antibodies that capture the secreted/released/shed proteins which are subsequently detected by secondary antibodies labeled with fluorochromes. In breast cancer, we measured the release of cytokeratin-19 (CK19) and mucin-1 (MUC1) and demonstrated that many patients harbored viable DTC, even in patients with apparently localized tumors (stage M₀: 54%). Preliminary clinical data showed that patients with DTC-releasing CK19 have an unfavorable outcome. We also studied CTC or CK19-secreting cells in the peripheral blood of M₁ breast cancer patients and showed that patients with CK19-SC had a worse clinical outcome. In prostate cancer, we used prostate-specific antigen (PSA) secretion as marker and found that a significant fraction of CTC secreted fibroblast growth factor-2 (FGF2), a known stem cell growth factor. In conclusion, the EPISPOT assay offers a new opportunity to detect and characterize viable CTC/DTC in cancer patients and it can be extended to a multi-parameter analysis revealing a CTC/DTC protein fingerprint. Detection and characterization of these cells will contribute to more “tailored” and personalized anti-metastatic therapies.

Введение

До настоящего времени основными методами выявления ЦОК/ДОК были иммуноцитологические (иммуноцитохимический, проточная цитометрия и EPISPOT) и молекулярно-биологические (RT-PCR) методы [1-2]. Общим недостатком обоих подходов является невозможность различения жизнеспособных и апоптотических клеток. В последнее время появился новый метод анализа ЦОК/ДОК, позволяющий проводить это важное различие [3-7]. Этот метод называется EPISPOT (EPithelial ImmunoSPOT). Эта технология представляет собой часть расширенного спектра диагностических методов, которые позволяют характеризовать единичные клетки с особыми свойствами благодаря их реакции с МКА тип и биологические характеристики клеток-мишеней, эти антитела используют в комбинации. Чаще всего для выявления и сортировки редких популяций клеток используют проточную цитометрию. Однако этот метод обычно не обладает достаточной чувствительностью для детектирования ЦОК, концентрация которых в крови составляет 10^{-6} – 10^{-8} , если не используются новые специализированные системы. Помимо этого ЦОК можно выявлять по секреции белков-маркеров. Секретируемые цитокины можно идентифицировать вокруг интересующих клеток кратковременного культивирования *in vitro* – это позволяет сделать метод иммуноферментного спот-анализа (ELISPOT). EPISPOT представляет собой модификацию технологии ELISPOT; этот метод позволяет идентифицировать единичные жизнеспособные эпителиальные опухолевые клетки по их секреции или выделению специфических маркеров (эпителиальный маркер CK19; тканеспецифичный маркер ПСА; фактор роста стволовых клеток FGF-2; опухолевые маркеры MUC1 или CA15-3 и HER2). При использовании метода EPISPOT требуется этап обогащения за счет истощения нормальных окружающих CD45 гематопозитических клеток, что позволяет избежать систематической ошибки в отборе опухолевых клеток.

В работе представлены принципы обогащения ЦОК и применения двойных методов флуороCK19/MUC1- и CK19/HER2-EPISPOT для выявления и характеристики ЦОК при раке молочной железы, а также двойного метода флуороPSA/FGF2-EPISPOT при раке простаты.

Обогащение ЦОК

В связи с тем, что ЦОК присутствуют в крови в очень малых концентрациях – одна опухолевая клетка на несколько миллионов гематопозитических клеток, обычно на первом этапе требуется процедура обогащения. Как метод детектирования, EPISPOT может в принципе комбинироваться с любой процедурой обогащения ЦОК. Однако клетки должны оставаться живыми, и фиксация клеток не допускается. Техника обогащения включает большую панель технологий, в основе которых лежат различные свойства ЦОК, отличающие их от окружающих нормальных гематопозитических клеток:

Introduction

Up to now, immunocytological (immunocytochemistry, flow cytometry and the EPISPOT Assay) and molecular biology (reverse-transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) methods are the main approaches used to detect CTC/DTC [1-2]. A drawback of both approaches is that they are usually unable to distinguish between viable and apoptotic cells. Recently, a new technique that allows this important discrimination was introduced for CTC/DTC analyses [3-7]. This technique was designated EPISPOT (i.e., EPithelial ImmunoSPOT). This technology is part of the extended range of diagnostic methods by which single cells with particular features are characterized by the virtue of their reactivity with monoclonal antibodies. Frequently, these antibodies are used in combination to recognize the type and biologic characteristics of the target cell. The most frequently used approach to detect and sort rare cell populations is flow cytometry. However, this approach is usually not sensitive enough to detect CTC occurring at frequencies of 10^{-6} to 10^{-8} in blood unless new specialized systems are employed. Alternatively, CTC can be detected by the secretion of marker proteins. The secreted cytokines can be identified after a short term culture in vitro around the cells of interest as enzyme-linked immunospot (ELISpot test). The EPISPOT assay is an adaptation of the ELISPOT technology when single viable epithelial tumor cells are identified by their secretion, release or shedding of specific markers (i.e., epithelial marker: CK19; tissue-specific marker: PSA; stem cell growth factor: FGF-2; tumor markers: MUC1 or CA15-3 and HER2). The enrichment step used with the EPISPOT assay is a depletion of the normal surrounding CD45 hematopoietic cells which avoids bias of tumor cell selection.

Here we describe the principles of CTC enrichment and the application of dual fluoroCK19/MUC1- CK19/HER2-EPISPOT assays for the detection and characterization of CTC in breast cancer, and dual fluoroPSA/FGF2-EPISPOT assay in prostate cancer.

CTC enrichment

As CTC occur at very low concentrations of one tumor cell in the background of millions of hematopoietic cells, a first step of enrichment is usually required. Being a detection method, the EPISPOT assay can be combined, in principle, to any kind of CTC enrichment step. However, cells must remain viable and cell fixation must be avoided. It includes a large panel of technologies based on the different properties of CTC that distinguish them from the surrounding normal hematopoietic cells:

- физические (размер, плотность, электрический заряд, деформируемость);
- биологические (экспрессия белков на поверхности клетки, жизнеспособность и инвазивная способность [8]).

Большинство современных технологий основано на экспрессии молекулы адгезии эпителиальных клеток (ЕpCAM); однако учитывая, что эпителиально-мезенхимальный переход может происходить в частности в процессе диссеминации клеток, новые технологии позволяют детектировать также и ЕpCAM– ЦОК.

До настоящего времени метод EPISPOT комбинировали главным образом с истощением CD45⁺ клеток с использованием системы RosetteSep (StemCell Technology, Ванкувер, Канада), позволяющей избежать прямого контакта с клетками-мишенями и изучать ЕpCAM– ЦОК (рис. 1а; см. вклейку).

В самом деле, истощение нормальных гематопозитических клеток, которые являются CD45⁺ клетками, позволит избежать систематической ошибки на основании экспрессии ЕpCAM, на первом этапе выявления ЦОК. За счет этого повышается скорость восстановления ЦОК даже при том, что чистота больше не является высокой. Однако ЕpCAM– ЦОК все еще являются составной частью последующих этапов детектирования при использовании технологии EPISPOT. Показано, что ЦОК могут проходить ЭМП и утрачивать эпителиальные свойства. Кроме того, такие ЦОК могут приобретать свойства стволовых клеток, в том числе способность метастазировать в отдаленные органы. В связи с этим, важно не ограничиваться на этапе обогащения только одним белком с потенциально сниженной экспрессией и определять всю субпопуляцию ЦОК.

Определение ЦОК

В технологии EPISPOT нитроцеллюлозные мембраны планшетов EPISPOT покрыты антителами к специфическому белковому маркеру (рис. 1б). В каждую лунку планшета засевают клетки и культивируют в течение 24–48 ч. На этом инкубационном этапе секретируемые специфические белки непосредственно оседают на мембране с покрытием из антител. Затем клетки смывают, определяют специфический белковый маркер при помощи вторичных антител, конъюгированных с флюорохромом.

Полученные иммуноферментные пятна пересчитывали при помощи съемки на видеокамеру и компьютерного анализа (KS ELISPOT, Carl Zeiss Vision): одно пятно соответствует «отпечатку пальцев» одной жизнеспособной клетки, секретирующей белок.

Этот метод анализа является количественным (подсчитывают число пятен) и качественным – изученные белки хорошо определены в контексте солидных опухолей, что позволяет охарактеризовать фенотип ЦОК/ДОК.

Разработан двойной флюоресцентный метод EPISPOT, который позволяет определять ЦОК по секретиции двух различных белков.

- physical (size, density, electric charges, deformability);
- biological properties (surface protein expression, viability and invasion capacity) [8].

Most of the current technologies are still based on epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) expression; however, due to the assumption that an Epithelial-to-Mesenchymal Transition may occur in particular during tumor cell dissemination, new emerging technologies try to capture also EpCAM-negative CTC.

Up to now, the EPISPOT assay was mostly combined with a depletion of CD45-positive cells using the RosetteSep system (StemCell Technology, Vancouver, Canada), avoiding direct contact with the target cells and allowing the study of EpCAM-negative CTC (fig. 1a; see inset).

Indeed, using a depletion of the normal hematopoietic cells that are all CD45 cells will avoid a bias based on the expression of EpCAM at the first step of the CTC-detection. This allows a high recovery rate of the CTC, even though the purity is not high anymore. However, EpCAM-negative CTC will be still part of the subsequent detection step of the EPISPOT assay. Indeed, it had been shown that CTC might undergo an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and down-regulate its epithelial features. In addition, these CTC have a gain of stem-cell properties with the ability to develop metastases in distant sites. Thus, it is important not to base the enrichment step on only one potentially down-regulated protein and to detect all sub-set of CTC.

CTC detection

CTC can be detected by different ways: molecular biology (real time RT-PCR) and immunocytological methods (immunocytochemistry, flow cytometry and the EPISPOT assay). This chapter will focus only on the EPISPOT technology.

Concerning the EPISPOT procedure, the nitrocellulose membranes of the ELISPOT plates are coated with an antibody against a specific protein marker (Figure 1b). Then, cells are seeded in each well and cultured for 24 to 48 hours. During this incubation step, the specific secreted proteins are directly captured on the antibody-coated membrane.

Next, cells are washed off and the specific protein marker is detected by a second antibody conjugated with a fluorochrome. Immunospots are counted by video camera imaging and computer assisted analysis (KS ELISPOT, Carl Zeiss Vision): one immunospot corresponds to the fingerprint of one viable marker protein-secreting cell.

This assay is quantitative – the immunospots are counted – and qualitative – the proteins studied are well defined in the context of solid tumors, allowing the phenotypic characterization of the CTC/DTC.

Dual fluorescent EPISPOT assay were quickly developed to target CTC through the secretion of two different proteins.

Определение жизнеспособных и неапоптотических ЦОК/ДОК

Как показано ранее, для того, чтобы сформировать иммуноферментные пятна жизнеспособные клетки должны накопить значительное количество выделенных белков-маркеров в процессе культивирования клеток *in vitro* при проведении анализа EPISPOT, поэтому умирающие клетки при анализе не выявляются [3; 9]. Важно отметить: для того, чтобы создать наилучшие условия, клеточная культуральная среда обогащается различными факторами роста, как описано ранее для определения клеточных линий ДОК [10].

Нами проведены дополнительные опыты с применением лекарственных средств, они показали, что только функционирующие ЦОК/ДОК способны формировать иммуноферментные пятна. Так, добавление Брефелдина А или циклогексимида в течение короткого периода культивирования клеток при анализе EPISPOT приводило к подавлению образования иммуноферментных пятен, подтверждая, что определяются только жизнеспособные ЦОК/ДОК (данные не показаны). Еще одним важным наблюдением было то, что размер иммуноферментных пятен оказался значительно крупнее размера одной клетки (рис. 2). Таким образом, невозможно выделить остаточную нежизнеспособную опухолевую клетку на мембране из иммуноферментного пятна *de novo*, образованного за счет непрерывного выделения белка жизнеспособными опухолевыми клетками, культивированными в течение 48 ч. В дополнение следует отметить, что модификация стандартной культуральной среды путем добавления специфических факторов роста может изменить поведение опухолевых клеток. Это проявляется в различном размере и числе иммуноферментных пятен, как показано на рис. 3.

Клинические и трансляционные корреляции

Рак молочной железы. При раке молочной железы в качестве белков-маркеров используют муцин-1 (MUC1) и цитокератин-19 (CK19)[11]. MUC1 является мембрано-связанным муцином с гиперэкспрессией на клетках РМЖ и аберрантным гликозилированием в этих клетках. MUC1 может расщепляться, выделяться из клеток и определяться в сыворотке онкологических больных (опухолевый маркер CA15-3); [12-14]. CK19 – один из трех основных кератинов наряду с CK8 и CK18, присутствует в простом и многослойном эпителии, а также в злокачественных опухолях; показана его гиперэкспрессия на клетках таких первичных эпителиальных опухолей как РМЖ, РТК, рак легкого и ГЦР [15-16], но не на нормальных мезенхимальных гематопоетических клетках. MUC1-секретирующие клетки (СК) определяются в крови при всех запущенных метастатических РМЖ, однако у здоровых доноров из контрольной группы эти клетки не определялись [3]. Кроме того, MUC1 слабо экспрессировался нормальными активированными В-лимфоцитами. Но, экспрессия этого маркера на нормальных и опухолевых клетках существенно различалась. Можно было четко определить граничный размер MUC1-иммуноферментных пятен, сформированных опухолевыми клетками [3].

Detection of viable and not apoptotic CTC/DTC

As previously shown, viable cells need to accumulate a sufficient amount of the released marker proteins during the *in vitro* cell culture of the EPISPOT assay to form immunospots and dying cells are therefore not detected using this assay [3; 9]. To be in the best conditions, it is important to notice that the cell culture medium is enriched with different growth factors, as it has been already described for the establishment of DTC cell lines [10]. Moreover, we performed additional drug experiments to show that only functional CTC/DTC are able to give rise to immunospots. Indeed, the addition of Brefeldin A or cycloheximide during the short-time cell culture step of the EPISPOT assay showed a clear inhibition of the immunospot formation, confirming that only viable CTC/DTC are detected (data not shown). Another important observation is the size of the immunospots, significantly bigger than that of a single cell (fig. 2). Thus, there is no doubt to distinguish a residual non-viable tumor cell on the membrane from a *de novo* immunospot established by continuous protein secretion of viable tumor cells cultured over 48 hours. In addition, the modification of the standard culture medium with the addition of specific growth factors could modify the behavior of tumor cells, observed by differences in the size and the number of spots as shown by the fig. 3.

Clinical and translational leads

Breast cancer. In breast cancer, mucin-1 (MUC1) and cytokeratin-19 (CK19) were used as marker proteins [11]. MUC1 is a membrane-bound mucin overexpressed and aberrantly glycosylated in breast carcinoma cells. MUC1 is cleaved, shed, and can be detected in the serum of cancer patients (tumor marker CA15-3) [12-14]. CK19, one of the three main keratins besides CK8 and CK18, is found in simple or stratified epithelium and in carcinomas, and it has been demonstrated to be abundantly expressed in primary epithelial tumors such as breast, colon, lung and hepatocellular cancer cells [15-16], but not in normal mesenchymal hematopoietic cells.

MUC1-releasing cells (RC) were detected in blood of all advanced metastatic breast cancer patients analyzed, whereas such cells were not observed in healthy controls [3]. In fact, MUC1 was also weakly released by normal activated B lymphocytes, however, there was a significant difference between the release of MUC1 by tumor and normal cells and we could define a clear cut-off for the size of the MUC1-immunospots obtained from tumor cells [3].

Таким образом, подсчет MUC1- и CK19-СК позволил определить жизнеспособные ДОК в костном мозге у 90 и 54% больных РМЖ с определяемыми отдаленными метастазами и без таковых соответственно [11]. Эти значения согласуются с результатами, полученными при использовании чувствительной RT-PCR [17]. Интересно отметить, что число ДОК у лиц со стадией заболевания M1 было статистически значимо выше, чем при стадии M₀ (общее число ДОК 3604 и 689; медиана 103 и 1; среднее число 180 и 19; диапазон 08-13 и 02-62 для M₁ по сравнению с M₀), однако большинство ДОК, определенных у больных с M₀, имели фенотип CK19⁺ MUC1 и могли иметь свойства стволовых клеток [11;18]. Очень важно отметить, что больные РМЖ с CK19-СК имели неблагоприятный клинический исход, обусловленный развитием (больные с M₀) или прогрессированием (больные с M₁) метастазов, тогда как клинических корреляций с MUC1-СК не обнаружено [19]. Однако для подтверждения этих предварительных данных необходимо провести крупное исследование.

В качестве белка-маркера также используют HER2. HER2 принадлежит семейству рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR). Амплификация гена или гиперэкспрессия этого белка играют важную роль в патогенезе и прогрессировании определенных агрессивных типов РМЖ, поэтому этот белок является важным биомаркером и мишенью таргетной терапии при РМЖ. Разработан тест HER2-EPISPOT, в котором используются клетки РМЖ линии BT474 (рис. 4). Нами подсчитано число ЦОК, выделяющих HER2, в крови 194 больных РМЖ стадии M1, для чего применялся двойной иммунофлюоресцентный тест EPISPOT-CK19/HER2. Показано, что:

1. CK19-СК, определенные как ЦОК, присутствовали у 115/194 (59,3%) больных, однако всего 4 из 115 (3,5%) имели ЦОК, выделяющие HER2;
2. клинический исход был неблагоприятным для больных РМЖ стадии M1 с CK19-СК в крови по сравнению с больными, у которых ЦОК не определялись ($p = 0,0164$). В заключение отметим, что жизнеспособные ЦОК при метастатическом РМЖ могут секретировать HER2, однако эта субпопуляция ЦОК встречается очень редко.

При этом CK19-СК могут составлять очень важную и биологически активную субпопуляцию ЦОК. Идентификация терапевтически значимых мишеней, таких как HER2, может способствовать более правильному отбору больных для назначения таргетной терапии. При РМЖ HER2 является наиболее перспективной мишенью для биологической терапии с использованием гуманизированных МКА к HER2. В настоящее время все больные проходят стратификацию для получения трастузумаба только по данным анализа первичной опухоли. Однако, как показали последние публикации, HER2-положительные ДОК/ЦОК могут определяться также и у больных с HER2-отрицательными первичными опухолями [20-23], и значит – возможностями терапии, направленной против HER2, могут воспользоваться и другие больные.

Thus, the enumeration of both MUC1- and CK19-RC allowed the detection of viable DTC in bone marrow of 90% and 54% of breast cancer patients with and without overt distant metastasis, respectively [11]. These incidences are in the range of those obtained with sensitive RT-PCR-based techniques [17]. Interestingly, M₁-patients had significantly higher DTC counts than M₀-patients (Total nDTC: 3604 vs 689; Median: 103 vs 1; Mean: 180 vs 19; Range: 0-813 vs 0-262, for M₁ vs M₀), but most of the DTC detected in M₀ patients showed the CK19⁺MUC1- phenotype and may have stem-like properties [11; 18]. Most importantly, breast cancer patients with CK19-RC had an unfavorable clinical outcome due to the occurrence (M₀-patients) or progression (M₁-patients) of metastasis, whereas no clinical relevance was found with MUC1-RC [19]. However, these preliminary data need to be confirmed in a larger study.

In addition, HER2 has been used as a protein marker. HER2 is a member of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family. Amplification or over-expression of this gene has been shown to play an important role in the pathogenesis and progression of certain aggressive types of breast cancer and it has evolved to become an important biomarker and target of therapy for the disease. A HER2-EPISPOT assay has been developed using the BT474 breast cancer cell line (fig. 4). We enumerated CTC releasing HER2 in the blood of 194 M₁-breast cancer patients by performing a dual fluoroEPISPOT-CK19/HER2 assay. We showed that:

1. 115/194 (59.3%) patients had CK19-RC defined as CTC with only 4/115 (3.5%) patients who had HER2-releasing CTC;
2. M₁-breast cancer patients with CK19-RC in their blood had an unfavorable clinical outcome compared to patients with no CTC ($p = 0.0164$). In conclusion, viable CTC in metastatic breast cancer can release HER2, however, this subpopulation of CTC is very rare. Moreover, CK19-RC might be an important and biological active subset of CTC.

The identification of therapeutically relevant targets such as HER2 may contribute to a better selection of cancer patients for targeted therapies. In breast cancer, HER2 has become the most prominent target for biological therapy with a humanized anti-HER2 monoclonal antibody. Currently, all patients are stratified to trastuzumab therapy by primary tumor analysis only. However, recent reports have shown that HER2-positive DTC/CTC can be detected also in patients with HER2-negative primary tumors [20-23], suggesting that additional patients could benefit from HER2-directed therapies.

Наличие HER2+ ДОК и ЦОК коррелировало с неблагоприятным прогнозом при РМЖ и раке пищевода [20; 24-25], установлено также, что амплификация HER2 может появляться в процессе прогрессирования онкологического заболевания [26]. Таким образом, оценка статуса HER2 ДОК и ЦОК позволяет получить ценную информацию для лечения онкологических больных. Продолжающиеся в настоящее время клинические исследования позволят установить возможность прогноза эффективности трастузумаба или других препаратов, направленных против HER2, на основании статуса HER2 ЦОК.

Рак простаты. При раке простаты в качестве маркера используют ПСА [27]. Нами исследованы образцы крови, полученные у больных раком простаты с макроскопически определяемыми метастазами (M_1). ПСА-секретирующие клетки (ПСА-СК) определялись у большинства больных раком простаты M_1 (83,3%), но не выявлялись у здоровых доноров и у больных с доброкачественной гиперплазией простаты [11]. EPISPOT позволял определять жизнеспособные ЦОК в периферической крови у 65% больных раком простаты даже при отсутствии видимых метастазов (стадия M_0), однако число ПСА-СК при раке простаты M_0 (медиана 9, диапазон от 2 до 197) было статистически значимо ниже ($p = 0,01$) чем при раке простаты M_1 (медиана 29, диапазон от 1 до 684); таким образом подтверждается корреляция с различными стадиями рака и общей массой опухолей. Для оптимизации характеристики ЦОК при раке простаты мы использовали фактор роста фибробластов-2 (FGF2) – известный фактор роста стволовых клеток, который также имеет значение для роста *in vitro* микрометастатических клеток РМЖ [10]. Мы разработали двойной метода флюоресцентного анализа PSA/FGF2-EPISPOT для характеристики ПСА-СК по статусу секреции FGF2, исходя из предположения, что значительная часть ДОК может секретировать фактор, потенциально участвующий в их росте [11].

Заболевания толстой кишки. И наконец, как показали важные последние результаты, в крови у некоторых больных с доброкачественными воспалительными заболеваниями толстой кишки присутствуют жизнеспособные циркулирующие клетки эпителия, которые можно выявлять современными апробированными методами анализа ЦОК [28]. Выявление этих цитокератин-положительных/CD45-отрицательных клеток не ассоциировалось с развитием злокачественного заболевания в период наблюдения в данном исследовании. Объяснением нашего открытия может быть тот факт, что эпителиальные клетки из незлокачественного эпителия толстой кишки попадают в кровоток при определенных условиях, например, воспалении, и это согласуется с тем, что воспалительные цитокины могут стимулировать миграцию эпителиальных клеток. Этот потенциальный фон незлокачественных эпителиальных клеток в крови, особенно у лиц с воспалительной патологией, может быть важным мешающим фактором у онкологических пациентов с очень низким числом ЦОК, что может привести к ложно-положительному результату ЦОК-диагностики, если не будут применяться строгие морфологические критерии или молекулярная характеристика этих клеток.

The detection of HER2-positive DTC and CTC was correlated to an unfavourable clinical outcome in breast and oesophageal cancer [20; 24-25] and HER2 gene amplification can be acquired during tumor progression of the cancer [26]. Thus, the assessment of the HER2 status on DTC and CTC might add important information for the clinical management of cancer patients. Ongoing clinical studies will reveal whether the HER2 status of CTC may predict response to trastuzumab or other HER2-directed therapies.

Prostate cancer. In prostate cancer, prostate specific antigen (PSA) was used as a marker protein [27]. We studied blood samples from prostate cancer patients with gross metastases (M1). PSA-secreting cells (SC) were detected in the majority of M₁-prostate cancer patients (83,3%), whereas such SC were not observed in healthy controls or in patients with benign prostatic hyperplasia [11]. The EPISPOT assay revealed also viable CTC in the peripheral blood of 65% of prostate cancer patients, even in the absence of overt metastases (stage M₀), but the number of PSA-SC in M₀-prostate cancer patients (median, 9; range, 2-197) was significantly lower ($P = 0.01$) than in M1-prostate cancer patients (median, 29; range, 1-684), a finding that is in accordance with the different disease stages and total tumor burdens.

To better characterize CTC in prostate cancer, we focused on fibroblast growth factor 2 (FGF2), a known stem cell growth factor also relevant for the in vitro growth of a breast micrometastatic cells [10]. We developed a dual fluorescent PSA/FGF2-EPISPOT assay to characterize PSA-SC for the secretion of FGF2 and applied it to blood samples from 19 patients with localized prostate cancer. PSA-SC were detected in 15 patients, and a subset of these SC also secreted FGF2, suggesting that a significant fraction of DTC may secrete a factor potentially relevant to their outgrowth [11].

Colon diseases. Finally, important recent results indicate that certain patients with benign inflammatory colon diseases can harbor viable circulating epithelial cells detected by current established and validated CTC assays [28]. The detection of these cytokeratin-positive/CD45-negative cells was not associated with the occurrence of malignant disease during the follow up period of our study. Our finding can be explained on the basis that epithelial cells from nonmalignant colonic epithelium may enter the bloodstream under certain conditions, such as inflammation and is consistent with the fact that inflammatory cytokines can stimulate the migration of epithelial cells. This potential background of nonmalignant epithelial cells in the blood especially in inflammatory bowel disease patients may be an important confounding factor in cancer patients with very low CTC counts, which may lead to false-positive findings in CTC diagnostics unless strict morphological criteria or molecular characterization of these cells can be also applied.

Это – важное следствие полученных нами результатов, которое необходимо проверить другими методиками анализа ЦОК и на большем числе клинических образцов. Крайне необходима молекулярная характеристика ЦОК, а также количественный анализ этих клеток.

Проблемы и направления будущих исследований

Дифференциация жизнеспособных и апоптотических ЦОК для выявления и определения профиля наиболее важных ЦОК, инициирующих метастазирование, имеет большое значение [7]. Разработан новый метод иммуноферментного анализа EPISPOT, позволяющий выявлять жизнеспособные ЦОК/ДОК у онкологических больных. Секретируемые или выделяемые этими клетками белки осаждаются на мембране до того, как они могут раствориться в надосадочной жидкости. Таким образом, EPISPOT обладает чувствительностью в 4 раза выше по сравнению с количественными методами определения этих белков в бесклеточном культуральном супернатанте [3-4]. Тем не менее, для анализа требуется культура клеток, и белок, который используют для идентификации ЦОК/ДОК, должен активно секретироваться или выделяться из этих клеток. Также важно уметь анализировать захваченные ЦОК на молекулярном уровне и сравнивать их характеристики с характеристиками первичной опухоли и метастазов.

В настоящее время большое внимание уделяется разработке микроаппаратов для работы с образцами, которые по крайней мере в 10 раз меньше объема образцов, используемых в современных методах анализа; это позволяет минимизировать время анализа и расход дорогих реактивов. Однако концентрация ЦОК очень мала, и поэтому анализ больших по объему образцов крови (20 мл и более) является предпочтительным, особенно при ранних стадиях рака с небольшим количеством ЦОК. В связи с этим технологии, в которых требуется анализ крупных образцов, также заслуживают внимания.

Наши клинические данные показали, что ЦОК/ДОК у больных РМЖ и раком простаты являются жизнеспособными и отличаются разнообразием по характеру секреции значимых белков. В связи с тем, что многие секретируемые белки влияют на метастатическое прогрессирование (например, факторы роста и протеазы), и в распоряжении исследователей имеется большое число флюорохромов, вполне возможно расширить эти методы анализа до многопараметрических, что позволит углубить наше понимание биологии метастатического каскада. Благодаря новому методу EPISPOT мы можем определять уникальные «отпечатки пальцев» отдельных жизнеспособных опухолевых клеток и проводить последующий молекулярный анализ этих клеток.

Последовательный анализ периферической крови, особенно в целях мониторинга минимального остаточного заболевания у онкологических больных в реальном режиме времени представляется более удобным, чем повторные аспирации костного мозга.

This is an important implication of this finding that has to be further verified by other CTC methodologies as well, and in a larger amount of clinical samples. Molecular characterization of CTC is urgently required, enumeration is not enough.

Challenges and future directions

Distinguishing viable from apoptotic CTC to detect and profile the most relevant metastasis-initiating CTC is of utmost importance [7]. The EPISPOT assay is a new technique to detect viable CTC/DTC in cancer patients. Secreted, shed or released proteins are immunocaptured immediately on the membrane before being diluted in the supernatant. Thus, the EPISPOT assay has a sensitivity of up to four orders of magnitude higher compared with the quantification of these proteins in the cell-free culture supernatants [3-4]. However, a cell culture facility is required and the protein used to identify a CTC/DTC must be actively secreted, shed or released outside these cells. Moreover, it is crucial to be able to analyse the captured CTC at the molecular level and to compare their characteristics to those of the primary tumor and overt metastases.

Nowadays, there is a strong interest developing micro-devices that can handle at least 10 times smaller sample volume than so far applied tests, thereby minimizing assay time and the use of expensive staining reagents. However, CTC are extremely rare events and the analysis of large blood volume (≥ 20 mL) might be preferable in particular in early stage cancer patients with a small burden of CTC. Thus, technologies that can handle larger blood volumes still deserve special attention.

Our clinical data show that CTC/DTC in patients with cancer of the prostate or breast are viable and heterogeneous with regard to the secretion of relevant proteins. As many secreted proteins influence metastatic progression (e.g., growth factors and proteases) and as a large range of fluorochromes is available, it should permit the extension of this technique to a multi-parameter analysis and opens therefore also a new avenue in the understanding of the biology of metastatic cascade. The new EPISPOT technology may therefore reveal a unique fingerprint of single viable tumor cells and the subsequent molecular analysis of these tumor cells is in development.

Если прогностическое значение ЦОК достаточно надежно установлено при метастатическом РМЖ, колоректальном раке и раке простаты, то исследование влияния ЦОК при первичных злокачественных опухолях еще продолжается. Идентификация больных, входящих в группы повышенного риска рецидива после химиотерапии, является очень важной областью применения этой методики в клинике. Недавно получены обнадеживающие результаты мониторинга ЦОК в период первичной системной и адъювантной химиотерапии при РМЖ [8].

Итак, ЦОК могут стать важным биомаркером для мониторинга в реальном режиме времени эффективности системной адъювантной химиотерапии у отдельных больных. Фенотипическая и молекулярная характеристика этих клеток станет важным шагом на пути к индивидуализации антиметастатической терапии.

References

1. Alix-Panabieres, C., Muller, V. & Pantel, K. Current status in human breast cancer micrometastasis. *Curr Opin Oncol* 19, 558-563 (2007).
2. Alix-Panabieres, C., Riethdorf, S. & Pantel, K. Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clin Cancer Res* 14, 5013-5021 (2008).
3. Alix-Panabieres, C., et al. Characterization and enumeration of cells secreting tumor markers in the peripheral blood of breast cancer patients. *J Immunol Methods* 299, 177-188 (2005).
4. Alix-Panabieres, C., et al. Detection of circulating prostate-specific antigen-secreting cells in prostate cancer patients. *Clin Chem* 51, 1538-1541 (2005).
5. Pantel, K. & Alix-Panabieres, C. The clinical significance of circulating tumor cells. *Nat Clin Pract Oncol* 4, 62-63 (2007).
6. Pantel, K., Alix-Panabieres, C. & Riethdorf, S. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol* 6, 339-351 (2009).
7. Pantel, K. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med* 16, 398-406 (2010).
8. Alix-Panabieres, C., Schwarzenbach, H. & Pantel, K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med* 63, 199-215 (2012).
9. Czerkinski, C., Nilsson, L.A., Nygren, H., Ouchterlony, O. & Tarkowski, A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 65, 109-121 (1983).
10. Solakoglu, O., et al. Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2246-2251 (2002).
11. Alix-Panabieres, C., et al. Detection and characterization of putative metastatic precursor cells in cancer patients. *Clin Chem* 53, 537-539 (2007).
12. Ho, S.B., et al. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 53, 641-651 (1993).
13. Mommers, E.C., et al. Aberrant expression of MUC1 mucin in ductal hyperplasia and ductal carcinoma *In situ* of the breast. *Int J Cancer* 84, 466-469 (1999).
14. Parry, S., et al. Identification of MUC1 proteolytic cleavage sites *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 283, 715-720 (2001).

Sequential peripheral blood drawings in particular for real-time monitoring of minimal residual disease in cancer patients undergoing systemic therapies should be more acceptable than repeated BM aspirations. While the prognostic significance of CTC could be reliably demonstrated for metastatic breast, colorectal or prostate cancer patients, studies on the impact of CTC in primary cancer patients are still ongoing. The identification of patients at increased risk for recurrence after chemotherapy is an application of high clinical relevance. Recently, encouraging results on monitoring of CTC during primary systemic or adjuvant chemotherapy in breast cancer patients were obtained [8].

In summary, CTC have the potential to become important biomarkers for real-time monitoring of the efficacy of systemic adjuvant therapy in individual patients. Furthermore, phenotypical and molecular characterization of these cells will contribute to more “tailored” and personalized anti-metastatic therapies.

15. Chu, P.G. & Weiss, L.M. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 40, 403-439 (2002).
16. Zhou, X., Liao, J., Hu, L., Feng, L. & Omary, M.B. Characterization of the major physiologic phosphorylation site of human keratin 19 and its role in filament organization. *J Biol Chem* 274, 12861-12866 (1999).
17. Zach, O. & Lutz, D. Tumor cell detection in peripheral blood and bone marrow. *Curr Opin Oncol* 18, 48-56 (2006).
18. Gudjonsson, T., et al. Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties. *Genes Dev* 16, 693-706 (2002).
19. Alix-Panabieres, C., et al. Full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells: a potential role in metastatic progression of breast cancer. *Breast Cancer Res* 11, R39 (2009).
20. Braun, S., et al. ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res* 61, 1890-1895 (2001).
21. Riethdorf, S., et al. Detection and HER2 Expression of Circulating Tumor Cells: Prospective Monitoring in Breast Cancer Patients Treated in the Neoadjuvant GeparQuattro Trial. *Clin Cancer Res* 16, 2634-2645 (2010).
22. Fehm, T., et al. HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial. *Breast Cancer Res Treat* 124, 403-412 (2010).
23. Ignatiadis, M., et al. HER2-positive circulating tumor cells in breast cancer. *PLoS One* 6, e15624 (2011).
24. Wulfig, P., et al. HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 12, 1715-1720 (2006).
25. Stoecklein, N.H., et al. Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. *Cancer Cell* 13, 441-453 (2008).
26. Meng, S., et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9393-9398 (2004).
27. Doyen, J., et al. Circulating tumor cells in prostate cancer: A potential surrogate marker of survival. *Crit Rev Oncol Hematol* (2011).
28. Pantel, K., et al. Circulating Epithelial Cells in Patients with Benign Colon Diseases. *Clin Chem* (2011).

Зуева Е.Е., Русанова Е.Б., Ramon Simon

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОГО СИНДРОМА МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ. СКРИНИНГ

*Лаборатория клинической иммунологии и молекулярной диагностики,
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург
Beckman Coulter Eurocenter S.A. Nyon, Switzerland*

Резюме

Диагностика миелодиспластического синдрома является сложной задачей на стыке клинических и диагностических специальностей. Оценка клеточного состава периферической крови с применением проточной цитометрии становится востребована именно в последние годы, с появлением направленной терапии МДС. Патологические характеристики миелоидных клеток при МДС, выявляемые при проточной цитометрии, неразрывно связаны именно с дисплазией и нарушением созревания. Представлена разработанная технология оценки клеточного состава периферической крови с определением индекса гранулярности нейтрофилов как доступная программа скрининга МДС в различных возрастных группах.

Ключевые слова: миелодиспластический синдром, скрининг, проточная цитометрия, индекс гранулярности нейтрофилов.

Иммунологическая диагностика, как и все исследования в области клинической лабораторной диагностики, выполняется по нескольким видам направлений (табл. 1).

Таблица 1

Направления клинической иммунодиагностики

Направления диагностики	Примеры	Биологический материал
1. Выполнение назначений врача	Количественная оценка ГСК. Аллергодиагностика	Выбор очевиден
2. Диагностика по направлению врача	Острый лейкоз? Остаточная болезнь?	
3. Скрининг	Миелодиспластический синдром	

Одной из проблем клинической иммунодиагностики онокогематологических заболеваний является отсутствие правил точной оценки степени разведения костного мозга периферической кровью и, как следствие, трудность определения относительного содержания бластов при миелодиспластическом синдроме (МДС). Именно этим объясняется интерес к проточной цитометрии для оценки клеточного состава различных видов биологического материала. С другой стороны, для гетерогенной группы заболеваний, объединенных в группу МДС, золотым стандартом диагностики является морфология. Проточная цитометрия стала привлекать внимание для диагностики МДС совсем недавно (табл. 2).

Таблица 2

МДС - группа клональных заболеваний костного мозга

Диагностические критерии	Направления диагностики	Дополнительные критерии
Неэффективный гемопоэз	Выявление нарушений созрева- ния и дифференцировки	Многоцветная проточная цитометрия
Цитопения	Дифференцировка МДС от цитопений неклонального происхождения	
Однолинейная или мультилинейная дисплазия	Выявление морфологических особенностей МДС как кло- нального заболевания	

Диагностика МДС базируется, прежде всего, на лабораторных данных, которые включают:

- полный клинический анализ крови;
- цитологическое и гистологическое исследования костного мозга;
- цитогенетический анализ периферической крови или костного мозга для выявления хромосомных изменений.

В обязательный перечень диагностических мероприятий входят:

- морфологическое исследование аспирата костного мозга и гистологическое исследование трепанобиоптата;
- цитогенетический анализ для подтверждения присутствия патологического клона.

Тем не менее, учитывая, что большая часть больных МДС являются людьми старшей возрастной группы, получение костного мозга может быть затруднено. Поэтому оценка клеточного состава периферической крови с применением проточной цитометрии становится востребована именно в последние годы, с появлением направленной терапии МДС. Литературный поиск информации в системе PubMed по ключевым словам «Flow cytometry» и «myelodysplastic syndrome» на 1 июня 2011 года дает всего 50 ссылок, а к середине весны 2012 – 55 (поиск по сочетанию «Flow cytometry» дает более 120 000 ссылок).

К положительным сторонам проточной цитометрии для диагностики МДС следует отнести:

1. точное количественное определение миелобластов по их антигенному профилю;
2. выявление патологических миелобластов даже в тех случаях, когда количество бластов менее 5%;
3. выявление иммунофенотипических признаков дисплазии созревающих миелоидных предшественников и моноцитов;
4. количественная или балльная оценка патологических характеристик для прогноза в клинических исследованиях (Valent P, et al. Leuk Res 2007;31:727–36).

Иммунофенотипический профиль клеток миелоидного ряда во многом определяется линейным происхождением, уровнем созревания и дифференцировки (рис. 1).

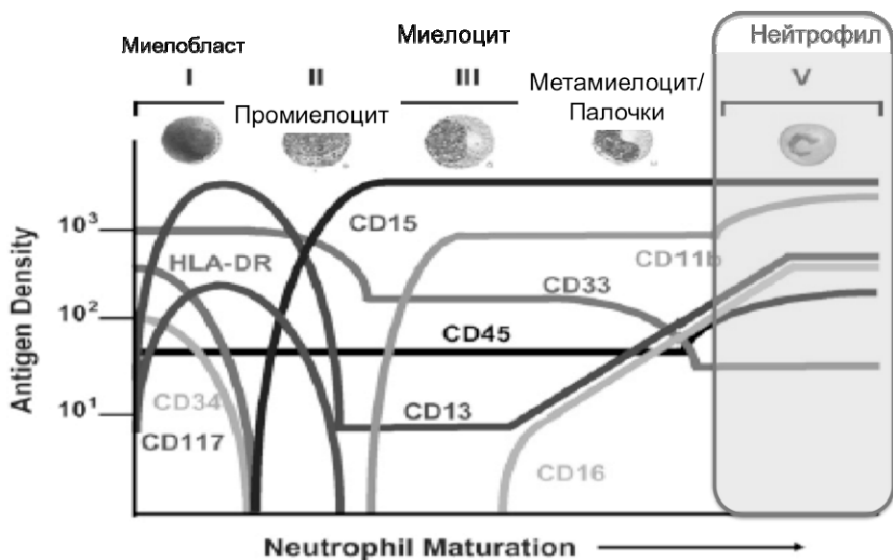


Рис. 1. Экспрессия различных миелоантигенов при созревании нейтрофилов. Цитируется по Leukemia Research 32 (2008) 5-17 с изменениями.

Миелодиспластический синдром (МДС) – это группа заболеваний костного мозга, носящих клональный характер и возникающих в результате мутации стволовой клетки крови. Процесс дифференцировки потомков такой трансформированной стволовой клетки носит неэффективный характер, т.е. приводит к дисплазии и нарушению созревания клеток (табл. 3).

Таблица 3

Фенотипические нарушения	Проявления	Данные цитометрии
Дисплазия	Изменение экспрессии антигена на созревающих или зрелых клетках по сравнению с нормальным или регенерирующим костным мозгом	1. Снижение уровня бокового светорассеяния 2. Измененная плотность экспрессии CD10, CD13, CD16, CD33, CD45 и CD6
Нарушения созревания	1. Аберрантная экспрессия зрелых антигенов на миелоблестах или на незрелых клетках других типов 2. Сохранение экспрессии ранних антигенов на зрелых клетках. 3. Может быть перекрестная экспрессия антигенов	1. Неодновременное появление CD11b и CD16 2. (i) Сохранение экспрессии CD34 и HLADR на промиелоцитах и более зрелых гранулоцитах и (ii) гомогенная экспрессия CD33, CD38 и CD117 3. Аберрантная гомогенная экспрессия CD14 и CD56

Диагностические критерии МДС по данным проточной цитометрии с одной стороны многочисленны, а с другой стороны – неопределенны (табл. 4).

Известно, что при большинстве онкогематологических заболеваний blasts обладают сниженным по сравнению с лимфоцитами уровнем экспрессии панлейкоцитарного маркера CD45. Тем не менее, оценка только таких клеток (CD45dim) не позволяет получать достоверную информацию по иммунофенотипу миелоидных предшественников. Аналогичным уровнем экспрессии CD45 обладают также:

- базофилы (CD13⁺, CD33⁺, CD11b⁺, CD10⁻, CD117⁻ и HLADR⁺);
- часть натуральных киллеров и Т-киллеров (CD2⁺, CD7⁺ и CD56⁺);
- предшественники В-клеток – гематогонии (CD19⁺, CD10⁺ и субпопуляция CD34⁺);
- часть незрелых моноцитов и плазматических клеток.

Основные иммунофенотипические характеристики миелоидных клеток суммированы в табл. 5. Таким образом, перед лабораторной диагностикой стоит серьезная задача поиска возможности проведения скрининга для выявления пациентов с высоким риском МДС. Предпочтительным биологическим материалом для скрининга, естественно, является периферическая кровь, а не костный мозг, так как ее получение гораздо менее травматично для пациента. Другим требованием скрининговых программ является применение простой воспроизводимой технологии, доступной в большинстве лечебно-профилактических учреждений, помогающих больным онкогематологического профиля.

В естественной истории опухоли доминирует предклиническая фаза. Длительность естественной истории опухоли определяется скоростью ее роста (рис. 2) (Wells DA et al. Blood 2003;102:394-403; Bène MC, Clinical and Applied Immunology Reviews 5 (2005) 133-148).

Таблица 4

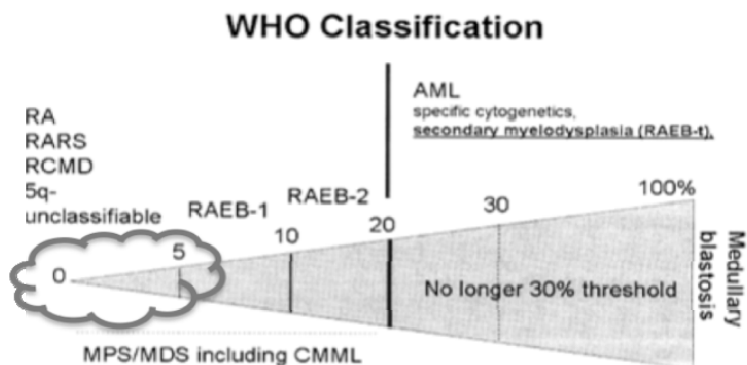
Диагностические критерии МДС по данным проточной цитометрии

Результат	Бласты	Миеломоноцитарные клетки
Отрицательный	Нет патологии	0-2 отклонения экспрессии зрелых миеломоноцитарных антигенов
Промежуточный	CD117, CD45 патологический уровень или четкая популяция	0-2 отклонения экспрессии зрелых миеломоноцитарных антигенов
	Нет патологии	Гипогранулярность и 0-2 отклонения экспрессии зрелых миеломоноцитарных антигенов
	Нет патологии	3-4 отклонения экспрессии зрелых миеломоноцитарных антигенов
Положительный	$\geq 3\%$ миелобластов или любая аберрантная экспрессия лимфоидных антигенов	Нет необходимости оценивать
	CD117, CD45 патологический уровень или четкая популяция	> 3 отклонений экспрессии зрелых миеломоноцитарных антигенов или гипогранулярность с (или без) патологии других миеломоноцитарных антигенов
	Нет патологии	≥ 5 отклонений экспрессии зрелых миеломоноцитарных антигенов
	Нет патологии	Гипогранулярность и ≥ 3 отклонений экспрессии зрелых миеломоноцитарных антигенов

Таблица 5

Основные иммунофенотипические характеристики миелоидных клеток

Миелоидные клетки	
Незрелые	Зрелые
промиелоциты, миелоциты и ранние метамиелоциты	от поздних метамиелоцитов до сегментированных нейтрофилов
CD10 ⁻ , CD64 ⁺ , CD33bright ⁺ , CD15low ⁺ , heterogenous CD13 ⁺ , CD16 ⁺ , CD11b	CD10 ⁺ , CD64 ⁺ , CD33dim ⁺ , CD15bright ⁺ , CD13bright ⁺ , CD16bright ⁺ , CD11b bright



Модель Schwartz'a

Число удвоений клетки	30	40	45
Число клеток	10^9	10^{12}	
Размер	1 см^3	10 см^3	
Масса	1 г	1 кг	32 кг

Рис. 2. Сопоставление классификационной схемы миелопролиферативных заболеваний (WHO, 2008) и статистической модели Шварца соотношения числа делений трансформированной клетки, объема опухоли и ее массы.

Патологические характеристики миелоидных клеток при МДС, выявляемые при проточной цитометрии, неразрывно связаны именно с дисплазией и нарушением созревания:

1. Гипогранулярность клеток миелоидного ряда приводит к тому, что нижняя граница бокового светорассеяния (SSC) популяции созревающих миелоидных клеток снижается, по крайней мере, до уровня 100, либо средний канал флуоресценции всей популяции снижается более, чем до 150 (часто принимает грушевидную форму);
2. Увеличение или уменьшение интенсивности экспрессии миелоидных антигенов (CD33, CD13, CD11b, CD16, CD15, CD64, CD10, CD14 и HLADR), по меньшей мере, на треть декады по логарифмической шкале по сравнению с нормальным контролем, т.е. нейтрофилами здорового взрослого человека;
3. Отсутствие признаков созревания или асинхронная экспрессия двух миелоидных антигенов могут быть выявлены при оценке рисунка созревания на гистограммах CD64/CD10, CD33/CD15 и CD11b/CD16/CD13);

4. Аберрантная экспрессия немиелоидных или незрелых миелоидных антигенов (в частности, CD34 и CD117).

Скрининговое выявление признаков дисплазии и нарушения созревания миелоидных клеток при исследовании клеток периферической крови основано на идентификации измененных нейтрофилов и оценке их уровня гранулярности на гистограмме CD45/SS (рис. 3; см. вклейку). Нами проведено исследование периферической крови больных с верифицированным диагнозом МДС ($n = 35$, медиана возраста 68 лет, соотношение М:Ж 12:23) и пациентов с доказанным отсутствием гематологических заболеваний ($n = 30$, медиана возраста 46 лет, соотношение М:Ж 9:21) в рамках теста одной пробирки. Проведена оценка основных популяций периферической крови на гематологическом анализаторе, микроскопия мазков и окрашивание клеток моноклональными антителами (BC) CD14-FITC, CD16-PE, CD33-PC5, CD45-PC7 для исследования многоцветной проточной цитометрией. Цель использованной стратегии гейтирования состояла в четком определении популяции нейтрофилов и исключении из анализа других лейкоцитов (рис. 4). Уровень гранулярности нейтрофилов у больных МДС и здоровых отличается ($p < 0,0002$). Тем не менее, для практического внедрения методики и создания определенной независимости от типа используемого оборудования, может быть рекомендовано использование индекса гранулярности нейтрофилов, расчетной величины, получаемой как соотношение гранулярности нейтрофилов и лимфоцитов (рис. 5).

$$ИГН = \frac{SS\ Neu}{SS\ Lymph} ; \quad \frac{SS\ Neu}{SS\ Lymph} = \frac{545}{59,4} = 9,2$$

ИГН выявляет различия здоровых и больных МДС: индекс гранулярности значительно ниже у больных МДС ($p < 0,0001$). При разделении групп по cut-off ИГН $< 7,1$ чувствительность теста составляет 71,4%, специфичность 93,3%. При построении ROC-кривой, показывающей зависимость количества верно классифицированных положительных примеров от количества неверно классифицированных отрицательных примеров (Rusanova E.B., Simon R.S., Zueva E.E. Haematologica 2009; 94(s2)) получено подтверждение возможности использования ИГН в качестве скрининга при подозрении на МДС (AUC = 0,841). Форма представления результата – числовая, количественная, объективная (рис. 6).

Таким образом, на сегодняшний день существует возможность объективного скрининга МДС при использовании в качестве биологического материала периферической крови, в качестве метода исследования – многоцветной проточной цитометрии. Затраты лаборатории при таком подходе минимальны и составляют тест одной пробирки с использованием четырех диагностических антител.

Индекс гранулярности нейтрофилов:

Средний уровень гранулярности нейтрофилов с учетом экспрессии CD14, CD16, CD33, CD45 и уровня гранулярности SS:	669.0	>	усл.ед.	(480.0-650.0)
Средний уровень гранулярности лимфоцитов с учетом экспрессии CD45 и уровня гранулярности SS	95.5	>	усл.ед.	(60.0-85.0)
Индекс гранулярности нейтрофилов, ИГН:	7.0	<		(>8.3)

Индекс гранулярности нейтрофилов:

Средний уровень гранулярности нейтрофилов с учетом экспрессии CD14, CD16, CD33, CD45 и уровня гранулярности SS:	553.0		усл.ед.	(480.0-650.0)
Средний уровень гранулярности лимфоцитов с учетом экспрессии CD45 и уровня гранулярности SS	71.7		усл.ед.	(60.0-85.0)
Индекс гранулярности нейтрофилов, ИГН:	7.7	<		(>8.3)

Рис. 6. Примеры представления результатов определения индекса гранулярности нейтрофилов.

Список литературы

1. Куртова А.В, Русанова Е.Б, Слободнюк К.Ю, Горчакова М.В, Зуева Е.Е. Диагностика острых лейкозов методом проточной цитометрии в соответствии с классификацией ВОЗ 2008г. опухолей гемопоэтических и лимфоидных тканей (часть I – острые миелобластные лейкозы). Клиническая онкогематология, 2009, т.2, №3. стр. 233-5.
2. Chopra A, Pati H, Mahapatra M, Mishra P, Seth T, Kumar S, Singh S, Pandey S, Kumar R. *Ann Hema-tol.* 2012 Apr 21. Flow cytometry in myelodysplastic syndrome: analysis of diagnostic utility using maturation pattern-based and quantitative approaches.
3. Harrington A.M, Olteanu H, Kroft S.H. *Am J Clin Pathol.* 2012 May;137(5):800-4. A Dissection of the CD45/Side Scatter "Blast Gate".
4. Garcia-Manero G. *Am J Hematol.* 2011 Jun;86(6):490-8. Myelodysplastic syndromes: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management.
5. Hall J, Foucar K. *Int J Lab Hematol.* 2010 Dec;32(6 Pt 2):559-71. Diagnosing myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: laboratory testing strategies to exclude other disorders.
6. Kern W, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T. *Cancer.* 2010 Oct 1;116(19):4549-63. Clinical utility of multiparameter flow cytometry in the diagnosis of 1013 patients with suspected myelodysplastic syndrome: correlation to cytomorphology, cytogenetics, and clinical data.

INTERLEUKIN-6 AS A THERAPEUTIC TARGET FOR DYSIMMUNE DISEASE AND CANCER

Fig. 1

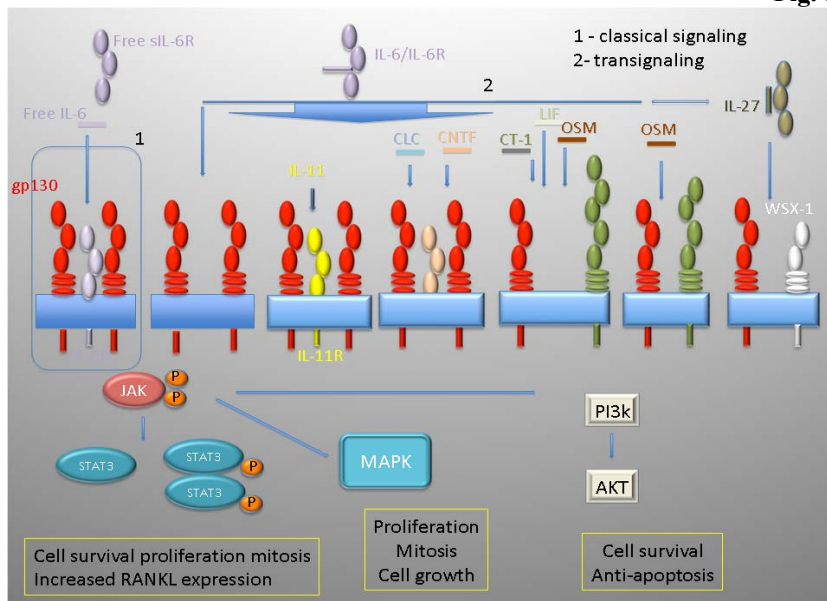
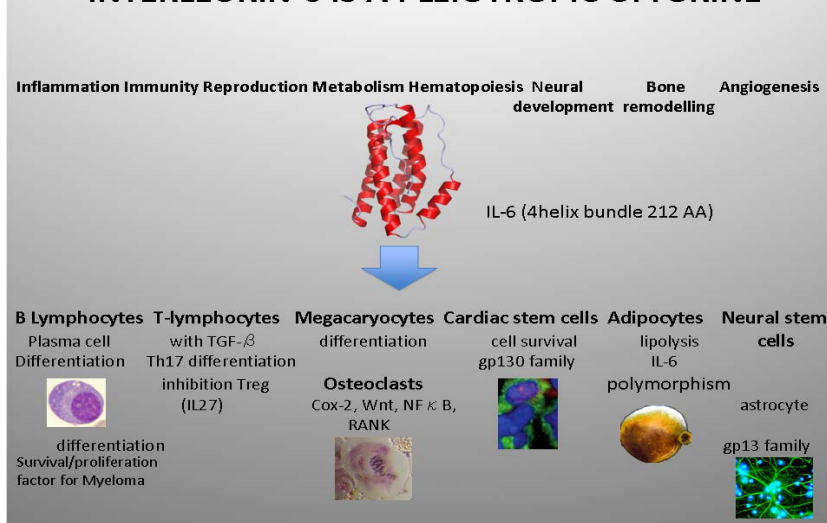


Fig. 2

INTERLEUKIN-6 IS A PLEIOTROPIC CYTOKINE



Рисунки к статье Катерин Аликс-Панабиер с соавт.

ВЫЯВЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕМИНИРУЮЩИХ РАКОВЫХ КЛЕТОК ПРИ СОБЛИДНЫХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ

Catherine Alix-Panabières, Klaus Pantel

DETECTION AND CHARACTERIZATION OF DISSEMINATING CANCER CELLS IN PATIENTS WITH SOLID EPITHELIAL MALIGNANCIES

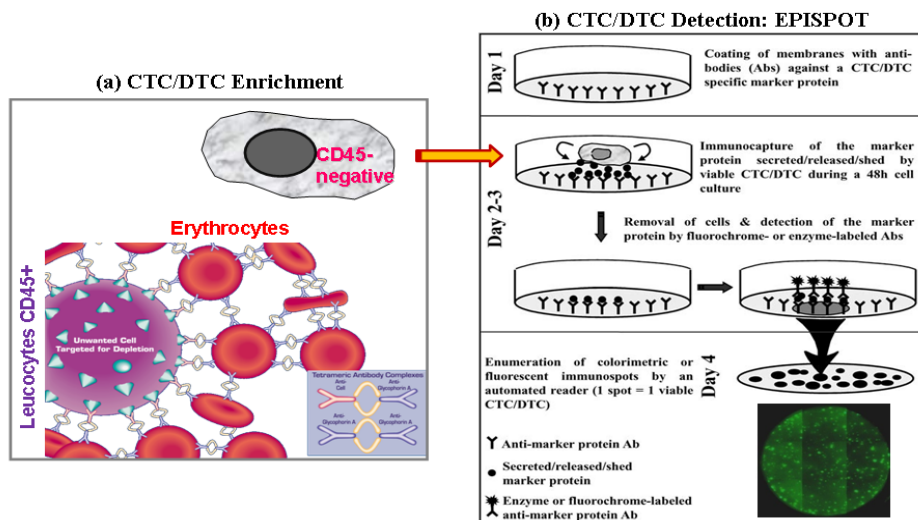


Рис. 1. Метод обогащения ЦОК/ДОК и процедура анализа EPISPOT (приводится по Alix-Panabieres C. Minimal Residual Disease and Circulating Tumor Cells in Breast Cancer, 2012).

- Опухолевые клетки EpCAM/ обогащены путем истощения CD45 гематopoитических клеток.
- Обогащенные ЦОК/ДОК культивируются in vitro в течение короткого времени в соответствующей обогащенной культуральной среде. И наконец, под микроскопом подсчитываются белковые «отпечатки пальцев» ЦОК/ДОК: полученное число соответствует числу жизнеспособных секретирующих клеток.

Fig. 1. CTC/DTC Enrichment method and EPISPOT assay procedure (taken from Alix-Panabières C. Minimal Residual Disease and Circulating Tumor Cells in Breast Cancer, 2012).

- EpCAM/ tumor cells are enriched via a depletion of the CD45 hematopoietic cells.
- Enriched CTC/DTC are then cultured in vitro during a short time in an appropriate enriched culture medium. Protein fingerprints of CTC/DTC are finally counted under a microscope and correspond to viable secreting CTC.

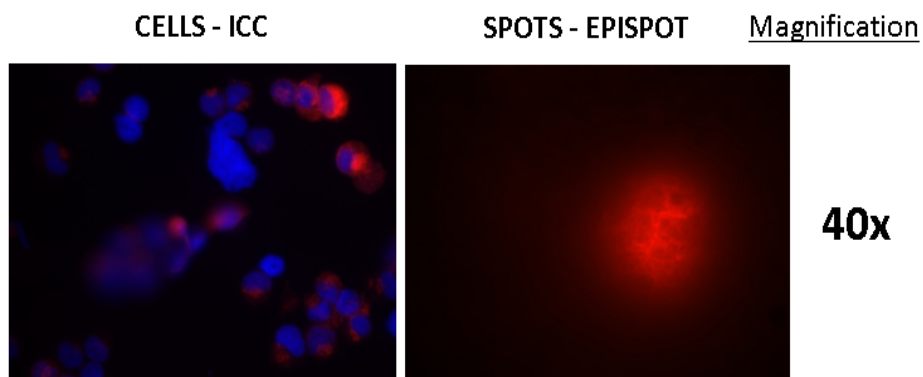


Рис. 2. Иммуноцитохимический анализ и EPISPOT. Размер иммуноферментных пятен и соответствующие опухолевые клетки с увеличением $\times 40$ после иммуноцитохимического анализа (ICC) и EPISPOT.

Fig. 2. Immunocytochemistry and EPISPOT assay. Size of the immunospots and the corresponding tumor cells are observed at magnification $\times 40$ after immunocytochemistry (ICC) and EPISPOT assay.

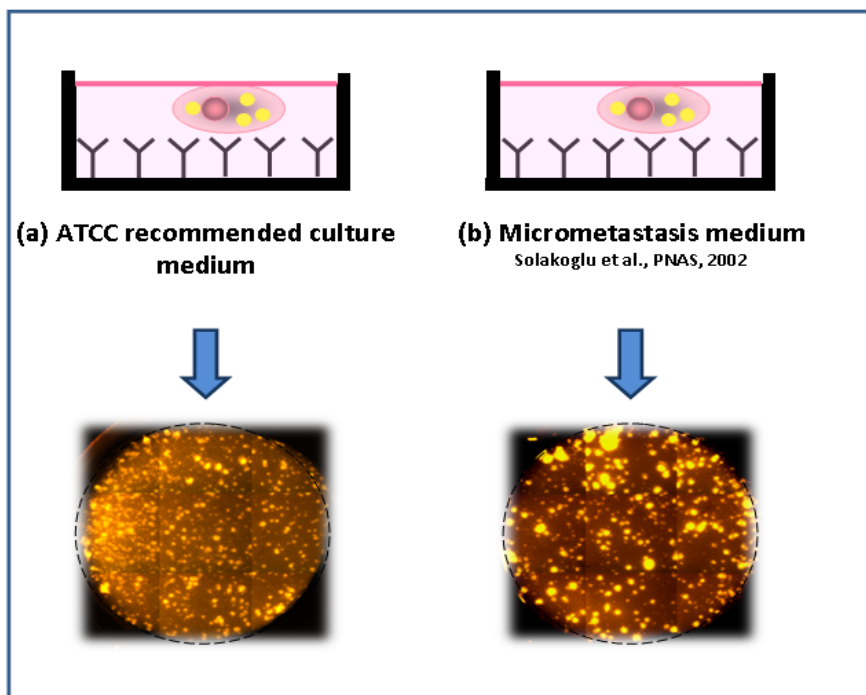
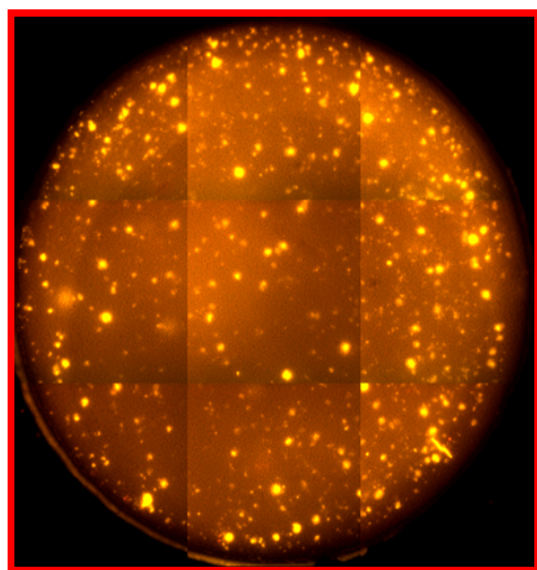


Рис. 3. EPISPOT и влияние факторов роста на поведение опухолевых клеток. В качестве контроля при анализе EPISPOT использовали культуральную среду, рекомендованную ATTC;

- a. Видны сотни иммуноферментных пятен. Анализ EPISPOT проводили с обогащенной культуральной средой, содержащей специфические факторы роста;
- b. Иммуноферментные пятна большего размера, что указывает на объединение клеток в кластеры или повышение секреции белка на уровне единичных клеток.

Fig. 3. EPISPOT assay and growth factor impact on the behavior of tumor cells. As control, the EPISPOT assay was performed with the ATTC recommended culture medium;

- a. Hundreds of immunospots are observed. EPISPOT assays were performed with an enriched culture medium with specific growth factors
- b. Immunospots are bigger showing the association of tumor cells by clusters or an increase of protein secretion at the single cell level.



5000 SKBR3 cells



Рис. 4. HER2-EPISPOT. При разработке этого анализа в качестве контроля использовали HER2⁺ клетки рака молочной железы линии SKBR3. Активное выделение внеклеточного домена HER2 обеспечивает образование HER2-специфических иммуноферментных пятен.

Fig. 4. HER2-EPISPOT assay. HER2⁺ SKBR3 breast cancer cell line was used as a control to develop this EPISPOT assay. The active shedding of the extracellular domain of HER2 allows the formation of HER2 specific immunospots.

Рисунки к статье Зуевой Е.Е. с соавт.

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОГО СИНДРОМА МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ. СКРИНИНГ

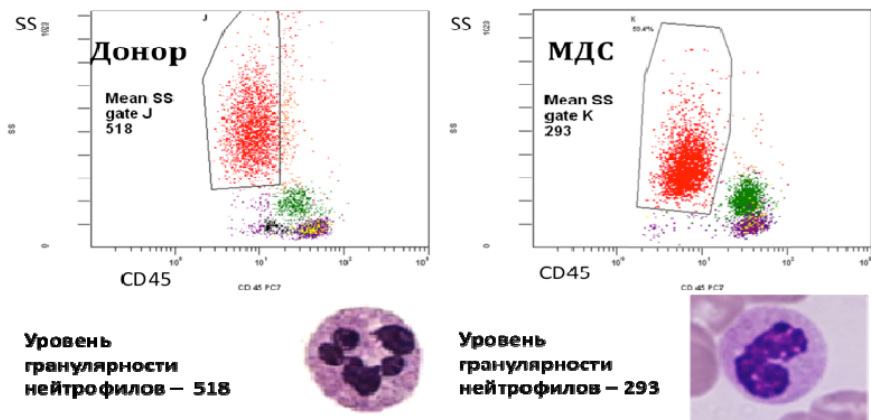


Рис. 3. Сопоставление морфологии нейтрофилов и их уровня гранулярности в норме и при верифицированном МДС.

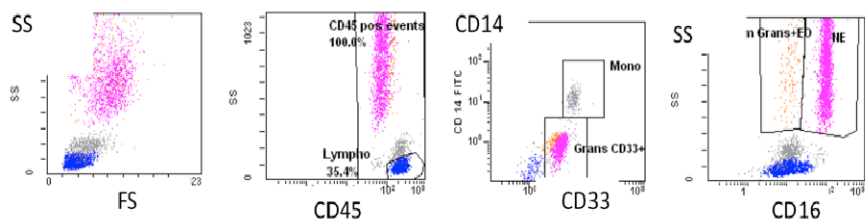


Рис. 4. Стратегия гейтирования идентификации нейтрофилов и исключения других клеток из анализа. Гистограмма FS/SS использована для предварительной оценки морфологических характеристик клеток по параметрам светорассеяния (гистограмма 1)

1. Гистограмма CD45/SS использована для выявления лейкоцитов и исключения дебриса из анализа (гистограмма 2)
2. Гистограмма CD33/CD14 использована для исключения моноцитов, т.е. двойных позитивных клеток (гистограмма 3)
3. Гистограмма CD16/SS использована для исключения эозинофилов (гистограмма 4)
4. Последовательное гейтирование позволяет четко идентифицировать популяцию нейтрофилов и определить ее уровень гранулярности.

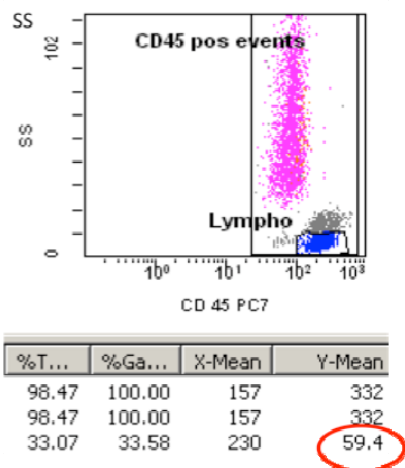
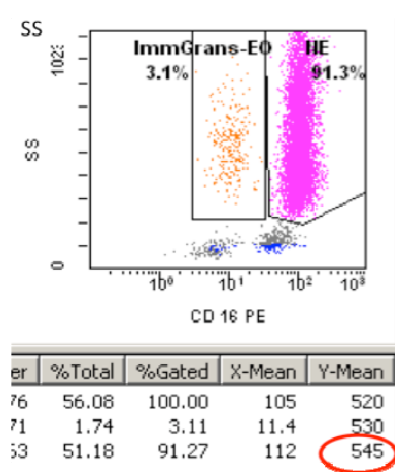


Рис. 5. Пример расчета индекса гранулярности нейтрофилов. Уровень гранулярности нейтрофилов составляет 545 усл. ед, уровень гранулярности лимфоцитов составляет 59,4 усл. ед. ИГН составляет 9,2.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН

