

# Zastosowanie sekwencjonowania następnej generacji do oceny heterogenności klonalnej oraz minimalnej choroby resztkowej u chorych na szpiczaka plazmocytozowego

## Use of next generation sequencing for clonal heterogeneity and minimal residual disease assessment in plasma cell myeloma patients

Iwona Solarska<sup>1</sup>, Bartosz Puła<sup>2</sup>, Agnieszka Krzywdzińska<sup>3</sup>, Krzysztof Jamroziak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Diagnostyki Hematologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

<sup>2</sup>Klinika Hematologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

<sup>3</sup>Pracownia Immunofenotypowania, Zakład Diagnostyki Hematologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

### Streszczenie

Szpiczak plazmocytozowy (PCM) jest chorobą nowotworową charakteryzującą się klonalną proliferacją plazmocytozów w szpiku kostnym lub narządach pozaszpikowych. Rodzaj zaburzeń molekularnych, szczególnie wtórnych, kształtuje tempo progresji tego nowotworu i różnorodność obrazu klinicznego u poszczególnych chorych. Choroba stanowi idealny model do badania zjawiska heterogenności wewnątrzklonalnej ze względu na wysoki stopień zróżnicowania genetycznego klonu nowotworowego. Proces ewolucji wewnątrzklonalnej odgrywa podstawową rolę w transformacji nowotworowej i progresji gammapatii o nieokreślonym znaczeniu oraz bezobjawowego szpiczaka tłącego się do postaci objawowej. Istnienie różnorodnych subklonów komórek przekłada się również na różną skuteczność poszczególnych strategii terapeutycznych oraz implikuje potrzebę określenia czynników stratyfikacji ryzyka, które umożliwiłyby personalizację i optymalizację terapii. Idealnym narzędziem umożliwiającym ocenę ewolucji klonalnej PCM jest technika sekwencjonowania następnej generacji. Pozwala ona zidentyfikować mutacje sprawcze warunkujące agresywność rozrostu danego klonu komórek, a dodatkowo umożliwia ocenę minimalnej choroby resztkowej (MRD) z bardzo wysoką czułością, trudną do osiągnięcia rutynowymi metodami diagnostycznymi. Uzyskiwane obecnie wyniki oznaczania MRD mają znaczenie głównie prognostyczne, jednak w bliskiej przyszłości z dużym prawdopodobieństwem będą one podstawą indywidualizacji terapii. Zrozumienie tego, jak zmiany genetyczne przyczyniają się do ewolucji klonalnej, a tym samym rozwoju oporności PCM, pozwoli w przyszłości na przełamanie choroby odpornej oraz zapobieżenie jej powstawaniu.

**Słowa kluczowe:** sekwencjonowanie następnej generacji, heterogenność klonalna, szpiczak plazmocytozowy, choroba resztkowa

*Hematologia 2019; 10, 2: 75–86*

**Adres do korespondencji:** Iwona Solarska, Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Diagnostyki Hematologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, Warszawa, tel. +48 22 34 96 171, e-mail: isolarska@hotmail.com

## Abstract

*Plasma cell myeloma (PCM) is a cancer characterized by proliferation of clonal plasmocytes in the bone marrow or extraosseous organs. Type of molecular events, especially of secondary nature, affects the kinetics of disease progression and its clinical heterogeneity in particular patients. Plasma cell myeloma poses an ideal study model of intraclonal heterogeneity due to the high genetical variety of the tumor clone. The process of intraclonal evolution plays a key role in the cancerous transformation of monoclonal gammopathy of undetermined significance and progression of smouldering multiple myeloma to symptomatic PCM. The existence of various cell subclones affects the efficacy of therapeutic strategies and urges the need of identification of novel risk stratification factors which may allow the personalization and optimization of the therapy. Next generation sequencing is an ideal tool enabling the assessment of clonal PCM evolution. This technique is capable of identifying funding mutations defining the aggressiveness of the cell clone. Additionally, it enables the assessment of minimal residual disease (MRD), which is not achievable with routine diagnostic methods. The results of MRD assessment have so far mainly prognostic significance, however in the near future it is most probable that it will be the basis of therapy personalization. The understanding of how genetic changes contribute to clonal evolution and thereby to resistance of plasma cell myeloma cells, will enable to overcome and prevent the development of refractory disease.*

**Key words:** next generation sequencing, clonal heterogeneity, plasma cell myeloma, residual disease

*Hematologia 2019; 10, 2: 75–86*

## Wprowadzenie

Szpiczak plazmocytowy (PCM, *plasma cell myeloma*) jest chorobą nowotworową charakteryzującą się klonalną proliferacją plazmocytów w szpiku kostnym lub tkankach pozaszpikowych [1]. Choroba dotyka głównie osoby starsze (mediana zachorowania 69 lat) i charakteryzuje się niekorzystnym rokowaniem. Jednak wprowadzenie kilku nowych grup leków w ostatnich dwóch dekadach, w tym leków immunomodulujących (talidomid, lenalidomid, pomalidomid), inhibitorów proteasomu (bortezomib, karfilzomib) czy przeciwciał monoklonalnych (m.in. daratumumab), znacznie przedłużyło oczekiwany czas przeżycia pacjentów [2–4]. Równolegle do postępów w leczeniu szpiczaka rozwijano nowe metody diagnostyczne, takie jak mikromacierze ekspresyjne pozwalające na badanie profilu ekspresji genów (GEP, *gene expression profiling*) czy sekwencjonowanie następnej generacji (NGS, *next generation sequencing*), które wpłynęły na rozwój wiedzy dotyczącej patogenezы, czynników rokowniczych i predykcyjnych choroby [2, 5]. W niniejszej pracy omówiono rolę badań metodą NGS w kontekście analizы heterogenności wewnątrzklonalnej oraz monitorowania minimalnej choroby resztkowej (MRD, *minimal residual disease*) u chorych na PCM.

## Zmiany genetyczne występujące w PCM

Szpiczak plazmocytowy jest nowotworem o niejednorodnym obrazie klinicznym, zróżnicowanym przebiegu choroby oraz niezdefiniowanej ostatecznie etiologii. Uważa się, że wstępnym etapem onkogenezy PCM są błędy w fizjologicznym procesie powstawania somatycznych hipermutacji zachodzącym w komórkach prekursorowych limfocytów B, co w przypadku zaburzeń mechanizmów naprawy DNA prowadzi między innymi do translokacji onkogenów w pobliże sekwencji wzmacniających ekspresję w obrębie genów łańcucha ciężkiego immunoglobulin (*IGH, immunoglobulin heavy chain*) [6, 7]. Skutkuje to niestabilnością genetyczną, pojawianiem się mutacji w onkogenach oraz powstaniem niewielkiego klonu plazmocyтового. Prowadzi to do rozwoju gammapatii monoklonalnej o nieokreślonym znaczeniu (MGUS, *monoclonal gammopathy of undetermined significance*), która prawdopodobnie poprzedza wystąpienie PCM u większości chorych, jednak ze względu na brak objawów klinicznych najczęściej pozostaje nierozpoznana [1, 6, 8]. Najczęstsze zmiany genetyczne na tym etapie to właśnie zaburzenia w obrębie genów *IGH*, w tym delecje całego genu lub jego fragmentów oraz zaburzenia rearanżacji genów kodujących segmenty V, D i J. [7, 9, 10].

W kolejnym etapie dochodzi do dalszej ewolucji klonu nowotworowego i jego proliferacji, co

w konsekwencji powoduje wystąpienie objawów klinicznych PCM. Pojawiają się dodatkowe zmiany genetyczne, takie jak delecje fragmentów chromosomu 13 czy 17, zaburzenia w obrębie chromosomu 1 lub mutacje genów *KRAS* i *NRAS* [6]. Procesy te są konsekwencją narastającej niestabilności genetycznej, która odpowiada za dalsze wtórne mutacje onkogenów i genów supresorowych oraz aberracje chromosomowe. Prawdopodobnie rodzaj zaburzeń molekularnych, szczególnie wtórnych, kształtuje tempo progresji i heterogenność obrazu klinicznego u poszczególnych chorych [2, 5, 6, 11, 12]. Progresja PCM do bardziej agresywnej postaci pozaszpiczkowej lub białaczki plazmocytoowej wiąże się z wystąpieniem kolejnych wtórnych aberracji, zwłaszcza takich genów jak *c-MYC* czy *TP53* [6, 13, 14]. Dalsze poznanie roli zmian genetycznych w procesie ewolucji klonalnej PCM może w przyszłości umożliwić zapobieganie oporności na kolejne grupy leków lub przyczynić się do opracowania nowych strategii terapeutycznych przełamujących tę oporność.

Obecnie najistotniejszymi czynnikami rokowniczymi u chorych na PCM są zmiany cytogenetyczne, wykrywane przede wszystkim techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, *fluorescence in situ hybridization*) [15]. Wyodrębnia się dwa podtypy choroby: postać hiperdiploidalną i niehiperdiploidalną, a podział ten odzwierciedla dwie różne patogenetycznie drogi ekspansji klonalnej plazmocytoów. Hiperdiploidia jest stwierdzana u około 50% chorych i związana z trisomią chromosomów nieparzystych, szczególnie 5., 9. i/lub 17. pary. Klinicznie chorzy z kariotypem hiperdiploidalnym charakteryzują się wyższym odsetkiem odpowiedzi na zastosowane leczenie oraz dłuższym czasem przeżycia całkowitego (OS, *overall survival*) [12]. W postaci niehiperdiploidalnej często stwierdza się całkowite lub częściowe monosomie chromosomów 6., 13., 16. i 22 pary oraz występowanie translokacji z zaangażowaniem genów *IGH* [16, 17]. W tej postaci PCM również częściej obserwuje się genetyczne aberracje związane z wysokim ryzykiem progresji, takie jak delecja chromosomu 13. i 14. lub zaburzenia chromosomów 1. i 17. [12, 18]. Klinicznie postać niehiperdiploidalna wiąże się z bardziej agresywnym przebiegiem, krótszym OS oraz krótszym czasem do wystąpienia nawrotu choroby [12, 13, 19].

Do głównych nieprawidłowości chromosomalnych stwierdzanych u chorych na PCM należą translokacje angażujące geny immunoglobulin, głównie geny *IGH*. W translokacji uczestniczy zwykle jeden z pięciu onkogenów: *CCND1*, *MAFC*,

*FGFR3*, *CCND3* bądź *MAFB*. Najczęściej występuje translokacja t(11;14)(q13;q32) powodująca nadekspresję genu dla cykliny D1 (*CCND1*), co promuje aktywność proliferacyjną komórek [11, 12, 20]. Podczas progresji w klonie nowotworowym pojawiają się wtórne aberracje, w tym te związane ze złym rokowaniem, takie jak del(17p), del(13q), del(1p) i amp(1q). Do najistotniejszych aberracji genetycznych, związanych z wysokim ryzykiem progresji, należą nieprawidłowości o typie delecji w obrębie ramienia krótkiego chromosomu 17. obejmujące *locus* genu *TP53* (17p13) oraz utraty ramienia długiego chromosomu 13. — *locus* genu *DLEU1* (13q14) występujące u około połowy chorych na szpiczaka [12, 17]. W tym kontekście wymienia się również zaburzenia morfologii chromosomu 1., tj. del(1p) i amp(1q). Amplifikacje długiego ramienia chromosomu 1. są stwierdzane u około 40% nowo zdiagnozowanych chorych, a w nawrocie u prawie 70% pacjentów [21]. Region 1q21 obejmuje gen *CKS1B*, którego nadekspresja powoduje wzrost i proliferację komórek nowotworowych [21]. Delecja 1p występuje u 7–40% chorych, w tym w około 15% przypadków dochodzi do utraty regionu 1p32, co obniża ekspresję genu *CDKN2C*. Uważa się, że zmniejszenie ekspresji *CDKN2C* jest jednym z czynników inicjujących progresję MGUS do objawowego PCM [22]. U około 15% chorych są opisywane rearanżacje regionu 8q24 kodującego gen *C-MYC*. W badaniu GEP wykazano, że czynnik transkrypcyjny *c-MYC* odgrywa główną rolę w transformacji prawidłowych komórek plazmatycznych do komórek szpiczakowych [13]. Chorzy z GEP odpowiadający kategorii prognostycznej bardzo wysokiego ryzyka charakteryzują się OS poniżej 2 lat [12, 15].

### Ewolucja klonalna

Jedną z cech choroby nowotworowej jest heterogenność wewnątrzklonalna, czyli zjawisko występowania różnic genetycznych (zwykle niewielkich) pomiędzy grupami komórek w obrębie tego samego klonu nowotworowego, nazywanymi subklonami. W konsekwencji tych różnic poszczególne subklony charakteryzują się odmienną zdolnością do przeżycia oraz proliferacji w odpowiedzi na bodźce środowiskowe, na przykład terapię przeciwnowotworową. Heterogenność wewnątrzklonalna jest podłożem konkurencji między subklonami o zasoby mikrośrodowiska i prowadzi do ewolucji klonalnej. Efektem takiej ewolucji może być na przykład progresja do fazy objawowej lub nawrót po remisji osiągniętej za pomocą chemioterapii.

Szczyk plazmocytowy wydaje się bardzo dobrym modelem do badania zjawiska ewolucji klonalnej ze względu na wysoki stopień zróżnicowania genetycznego klonu nowotworowego. Powstanie PCM u chorego to złożony, wieloetapowy proces związany z nabywaniem wielu kolejnych zmian genetycznych, które prowadzą do zmiany właściwości biologicznych plazmacytów. Obecność tylko pierwotnych zmian genetycznych nie jest wystarczająca do rozwoju pełnoobjawowego PCM. Do rozpoczęcia procesu transformacji nowotworowej niezbędne jest nabycie dodatkowych zmian, takich jak niesynonimiczne zmiany pojedynczych nukleotydów (SNV, *single nucleotide variation*), zmiany liczby kopii (CNV, *copy number variation*) oraz zmiany epigenetyczne.

W przypadku PCM wykazano istnienie kilku subklonów różniących się między sobą obecnością aberracji chromosomowych, mutacji w genach oraz profilem ekspresji genów [2]. Proces ewolucji wewnątrzklonalnej, warunkowany interakcjami z mikrośrodowiskiem nowotworu, w tym oddziaływaniami z elementami podścieliska szpiku kostnego oraz różnymi typami komórek układu immunologicznego, odgrywa podstawową rolę w transformacji nowotworowej i progresji MGUS oraz bezobjawowego szczyka plazmocytozowego tłącego się (SMM, *smouldering multiple myeloma*) do postaci objawowej. Wiadomo, że już na bardzo wczesnym etapie rozwoju nowotworu w komórkach plazmatycznych występuje duże zróżnicowanie na poziomie subklonalnym, przy czym poszczególne subklony komórek różnią się agresywnością, podlegają konkurencji i selekcji w odpowiedzi na bodźce środowiskowe, w tym przede wszystkim na zastosowane leczenie [23, 24]. Badania nad ewolucją molekularnej heterogenności PCM są niezwykle istotne, by lepiej zrozumieć mechanizmy transformacji nowotworowej, oporności na leczenie oraz wyboru właściwej strategii terapeutycznej. Istnienie różnorodnych subklonów komórek PCM przekłada się bowiem na różną skuteczność poszczególnych strategii terapeutycznych i tym samym implikuje potrzebę określenia czynników, które umożliwiłyby personalizację terapii.

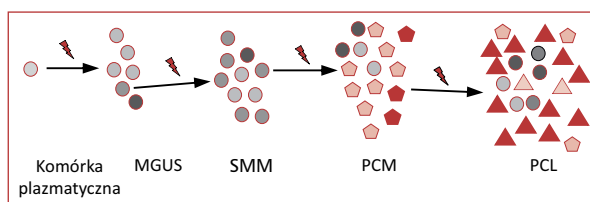
Odnotowany w ostatniej dekadzie ogromny postęp w leczeniu PCM wpłynął na odsetek oraz głębokość uzyskiwanych odpowiedzi. Jednak, mimo poprawy skuteczności chemioterapii, w większości chorych wciąż dochodzi do nawrotu choroby. Choć rearanżacje genów *IGH* oraz hiperdiploidia są kluczowe do inicjacji onkogenezy, to na podstawie badań innych nowotworów należy sądzić, że przebieg choroby u konkretnego chorego jest uwarun-

kowany historią klonalną, przy czym niepowodzenie terapii pozostaje ściśle związane z powstaniem opornych subklonów komórkowych [8].

Na podstawie dotychczasowych badań postuluje się istnienie trzech modeli ewolucji klonalnej:

- 1) modelu linearnego, zgodnie z którym nowotwór rozwija się w wyniku sekwencyjnie pojawiających się nowych zmian genetycznych w całym klonie;
- 2) modelu ekspansyjnego, zgodnie z którym wszystkie niezbędne do nowotworzenia zmiany genetyczne są obecne w klonie już w początkowym stadium choroby (MGUS), a ich następowa ekspansja prowadzi do progresji i rozwoju pełnoobjawowego szczyka;
- 3) modelu wewnątrzklonalnej heterogenności, zgodnie z którym w wyniku naturalnego współzawodnictwa między różnymi subklonami komórek oraz w odpowiedzi na presję selektywną środowiska dochodzi do dominacji najbardziej opornego subklonu i jego dalszej ekspansji.

Największe zainteresowanie budzi ostatni model ewolucji klonalnej, w którym różne populacje komórek plazmatycznych charakteryzują się występowaniem odmiennej kombinacji zmian genetycznych, a pojawienie się na kolejnym etapie choroby dodatkowych zmian, tak zwanych mutacji wiodących (*driver*), determinuje selekcję pozytywną i dominację danego klonu komórek (ryc. 1). Zmiany pierwotne, tak zwane mutacje *passengers*, są neutralne w odniesieniu do zapoczątkowania ewolucji danego klonu komórek. Powstałe po transformacji nowotworowej subklony, o odmiennym



**Rycina 1.** Model rozwoju oraz progresji szczyka plazmocytozowego (PCM) z uwzględnieniem heterogenności wewnątrzklonalnej; MGUS — gammopatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu; SMM — szczyk plazmocytozowy tłący się; PCL — białaczka plazmatykomórkowa

**Figure 1.** Initiation and progression model of plasma cell myeloma (PCM) considering the intraclonal heterogeneity; MGUS — monoclonal gammopathy of undetermined significance; SMM — smouldering multiple myeloma; PCL — plasma cell leukemia

profilu mutacji, mogą współistnieć przez długi czas i dopiero presja środowiska powoduje dominację jednego z nich [25].

### Znaczenie NGS w badaniach heterogenności klonalnej w PCM

Sekwencjonowanie następnej generacji jest obecnie jedną z nowocześniejszych technik biologii molekularnej. Może być ona wykorzystywana do sekwencjonowania genomów (WGS, *whole genome sequencing*), eksomów (WES, *whole exome sequencing*) i transkryptomów, sekwencjonowania celowanego (obejmującego wybrane fragmenty genomów i amplikonów), identyfikacji różnic w pod względem liczby kopii, oceny obecności rearanzacji chromosomalnych, badania interakcji białko–DNA/RNA, sprawdzania stopnia metylacji czy metagenomiki. Stała się uniwersalnym i niezastąpionym narzędziem biologii molekularnej, dając niemal nieograniczony wgląd w informację genetyczną. Równocześnie zapewnia dużą przepustowość, wysoką precyzję i jakość odczytów badanych sekwencji. Dzięki możliwości dopasowania do indywidualnych potrzeb projektu, NGS znajduje zastosowanie w wielu dziedzinach naukowych — począwszy od diagnostyki medycznej, przez biologię ewolucyjną, skończywszy na ocenie MRD.

Podstawą metody jest równoległe, masowe sekwencjonowanie od kilku do kilkuset milionów różnych matryc, tak zwanych bibliotek. Główna zasada przypomina sekwencjonowanie technologią Sangera i opiera się na sygnałach emitowanych przez poszczególne zasady podczas resyntezy DNA matrycowego. Odpowiednie przygotowanie biblioteki DNA, w tym szczególnie etap wzbogacania, pozwalają na rozszerzenie tego procesu poprzez jednoczesne prowadzenie milionów reakcji i uzyskanie tym sposobem gigabajtów danych genomowych z jednego sekwencjonowania. Dzięki tym właściwościom staje się optymalnym rozwiązaniem w diagnostyce genetycznej, zastępując dotychczasowe metody, szczególnie gdy w grę wchodzi choroba o trudnym do ustalenia i heterogennym podłożu genetycznym. Technika NGS stanowi idealne narzędzie do badania ewolucji klonalnej.

W przypadku PCM w progresję do fazy objawowej jest zaangażowanych prawdopodobnie wiele różnorodnych aberracji genetycznych, prowadzących do aktywacji różnych szlaków sygnałowych, z których wiele pozostaje niepoznanych. Ponadto otwartą kwestią pozostaje, które aberracje są kluczowe w procesie ewolucji klonalnej PCM. Ostatecznego wyjaśnienia mechanizmu ewolucji/heterogenności klonalnej charakterystycznej dla

PCM upatruje się w możliwościach, jakie niesie za sobą technika NGS. Zastosowanie NGS pozwala na identyfikację mutacji sprawczych, warunkujących agresywność rozrostu danego klonu komórek oraz jego ekspansywność. Specyficzne mutacje, klonalne lub subklonalne, oceniane w materiale pacjenta na podstawie odsetka odczytów oraz głębokości detekcji, umożliwiają skonstruowanie drzew filogenetycznych nowotworu i analizę ewolucji wewnątrzklonalnej [8, 23, 24, 26, 27]. W dotychczas prowadzonych badaniach NGS zidentyfikowano nowe geny wiodące, zaangażowane w proces ewolucji klonalnej plazmocytoów, oraz dowiedziono heterogennej struktury i współistnienia subklonów komórek o różnej architekturze genetycznej, odpowiadających za progresję szpiczaka [8, 23, 24, 26–28].

### Ocena MRD w PCM

Mimo poprawy skuteczności chemioterapii u ogromnej większości chorych dochodzi do nawrotu choroby, co wiąże się z występowaniem nowotworowych komórek plazmatycznych niewykrywalnych rutynowymi metodami diagnostycznymi, tak zwanej MRD [19, 29]. Analiza poziomu MRD stanowi najbardziej wiarygodne narzędzie oceny odpowiedzi pacjenta na zastosowaną terapię. Poziom MRD pozostaje jednak często poniżej progu czułości metod standardowo wykorzystywanych do oceny efektywności leczenia, dlatego celem monitorowania MRD jest nie tylko detekcja przetrwałych komórek nowotworowych (analiza jakościowa), ale przede wszystkim precyzyjne ustalenie ich poziomu (analiza ilościowa). Jednym z ważniejszych warunków dotyczących doboru odpowiedniej metody do oznaczania MRD jest wykorzystanie nowotworowo-specyficznych markerów.

Czułość standardowych metod oceny odpowiedzi na leczenie w PCM jest ograniczona i nie przekracza  $10^{-2}$  w przypadku definiowania całkowitej remisji (CR) z wykorzystaniem immunofiksacji i badania morfologicznego szpiku oraz  $10^{-3}$  w przypadku restrykcyjnej CR (sCR, *stringent CR*) z zastosowaniem oceny klonalności plazmocytoów szpiku i stosunku wolnych łańcuchów lekkich w surowicy [30]. Wykazano natomiast, że obecność MRD określanej na poziomie czułości przynajmniej  $10^{-4}$  metodami molekularnymi stanowi niezależny niekorzystny czynnik prognostyczny dla czasu wolnego od progresji (PFS, *progression-free survival*) i OS [31].

Z tych powodów od lat są prowadzone badania nad opracowaniem i walidacją różnych technik oznaczania MRD u chorych na PCM. Zasadniczo

można wyróżnić dwa uzupełniające się kierunki rozwoju tych metod 1) techniki pozwalające na bardziej precyzyjną ocenę odsetka przetrwałych patologicznych plazmacytów w szpiku kostnym; 2) badania obecności i aktywności rezydualnych nacieków pozaszpikowych. Udoskonalone techniki oceny MRD w szpiku kostnym, w tym wieloparametrowa cytometria przepływowa (MFC, *multicolor flow cytometry*) oraz metody molekularne wykorzystujące NGS, umożliwiają oznaczenie MRD z czułością  $10^{-5}$ – $10^{-6}$ , co oznacza identyfikację jednej nowotworowej komórki plazmatycznej wśród nawet miliona prawidłowych komórek szpiku [32–34]. Dotychczas stosowane metody molekularne, takie jak na przykład allelo-specyficzna reakcja łańcuchowej polimerazy (ASO-PCR, *allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction*), pozwalały na ocenę MRD na poziomie czułości  $10^{-4}$ – $10^{-5}$ . Najnowsze wytyczne oceny odpowiedzi w PCM według *International Myeloma Working Group* (IMWG) zostały uaktualnione o kategorie głębokich odpowiedzi obejmujące również MRD [30]. Ta istotna zmiana w podejściu terapeutycznym do PCM, wskazująca na celowość dążenia do eradykacji MRD, powoduje konieczność wprowadzenia bardziej czułych metod monitorowania MRD w referencyjnych ośrodkach hematologicznych. Uzyskiwane obecnie wyniki oznaczania MRD mają znaczenie głównie prognostyczne, jednak w bliskiej przyszłości będą one z dużym prawdopodobieństwem podstawą indywidualizacji terapii.

### Podstawy molekularnej oceny MRD w PCM

Punktem wyjścia do utworzenia markera molekularnego, którego obecność umożliwia monitorowanie choroby resztkowej, są hipermutacje i rekombinacje somatyczne sekwencji genów kodujących regiony zmienne łańcucha ciężkiego immunoglobulin (*IGHV*, *immunoglobulin variable region heavy chain*) [7, 10, 33]. Technika PCR umożliwia selektywną amplifikację określonego regionu DNA. Namnożony określony fragment DNA, kodujący rearanżacje genów *IG* charakterystycznych dla nowotworu pacjenta, służy do dalszej analizy badanego materiału. Przez wiele lat udoskonalano technikę PCR, wdrażając różne jej odmiany (jakościowe i półilościowe) do oceny MRD w nowotworach limfoidalnych [35–38]. Technologicznie te były swoiste i specyficzne, jednak ich zastosowanie i czułość detekcji choroby resztkowej pozostawały ograniczone [38, 39]. Przełomowe okazało się odkrycie i opisanie w 1993 roku metody ilościowej PCR, a w toku kolejnych modyfikacji i rozwoju nauki — opracowanie techniki ilościowej

oceny MRD w PCM za pomocą technologii TaqMan i w oparciu o ASO-PCR, czyli tak zwaną ASO-qPCR (allelo-specyficzna ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy; *allele-specific quantitative oligonucleotide polymerase chain reaction*) [40–45]. Wykazano, że metodą tą można wykryć komórki plazmatyczne w przypadkach, w których inne badania wskazywały na CR [41].

Najpowszechniejsza obecnie molekularna metoda oznaczania MRD jest oparta na wykrywaniu sekwencji złącz zrearanżowanych genów *Ig/TCR*, kodujących immunoglobuliny i receptory limfocytów T w reakcji PCR w czasie rzeczywistym (RQ-PCR, *real-time quantitative PCR*) [42, 43]. Metoda charakteryzuje się czułością  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  i możliwością zastosowania u większości chorych. Przegrupowania genów *V–D–J* (tzw. zmienność rekombinacyjna) oraz insercje i delecje pojedynczych, przypadkowych nukleotydów na złączach *V–D–J* (tzw. zmienność na łączach) powodują powstanie unikatowych dla danego klonu nowotworowego (specyficznego dla danego pacjenta) sekwencji markerowych. Podstawą analizy MRD tą metodą jest identyfikacja rearanżacji markerowych w materiale uzyskanym przy rozpoznaniu nowotworu, poprzez amplifikację zrearanżowanych genów metodą PCR z użyciem standardowych kombinacji starterów [42, 43]. Ocenie klonalności wykrytych w materiale wyjściowym pacjenta rearanżacji służy analiza heterodupleksów. Umożliwia ona odróżnienie klonalnych produktów amplifikacji, czyli potencjalnych markerów do analizy MRD, od poliklonalnych produktów reakcji PCR będących efektem amplifikacji sekwencji w poliklonalnych limfocytach. Kolejnym etapem jest identyfikacja rearanżacji genów *V, D, J* i sekwencji złącz *V–D–J* poprzez sekwencjonowanie klonalnych produktów PCR i analizę porównawczą sekwencji z bazami danych niezrearanżowanych genów immunoglobulin. Umożliwia to zaprojektowanie starterów oligonukleotydowych specyficznych dla każdego chorego (ASO, *allele-specific oligonucleotides*), komplementarnych do miejsc złącz, które w trakcie leczenia wykorzystuje się do oznaczeń poziomu MRD metodą RQ-PCR. Oznaczenie ilościowe wykonuje się w technologii TaqMan. W przypadku oznaczania MRD w reakcji RQ-PCR stosuje się startery ASO oraz sondy i startery germinalne, tj. specyficzne wobec zarodkowych sekwencji genów *V, D* i *J*. Poziom MRD w badanych próbkach określa się przy użyciu krzywej standardowej, sporządzonej poprzez serię rozcieńczeń DNA uzyskanego od danego pacjenta przed rozpoczęciem leczenia [40, 42–45]. Ta czasochłonna, ale szczególnie przy-

datna w przypadku nowotworów z niedojrzałych limfocytów B, technika jest również z sukcesem wykorzystywana w przypadku chorych na PCM, znajdując zastosowanie u chorych po przeszczepieniu autologicznych krwiotwórczych komórek macierzystych (auto-HSCT, *autologous hematopoietic stem cell transplantation*) oraz u pacjentów pozostających w częściowej remisji (PR, *partial remission*) [39, 46].

Najlepszym markerem molekularnym dla PCM jest fragment genu zawierający informację odnośnie do budowy regionu złącz łańcucha ciężkiego Ig. Charakteryzuje się on największą różnorodnością w zakresie sekwencji eksonów V-D i D-J. Jest to tak zwany odcinek nadzmienny CDR3 (*complementarity determining region 3*) genu dla Ig i jest typowy dla konkretnego nowotworu wywodzącego się z układu chłonnego [9, 10, 35, 38]. Limfocyty B dojrzewają również w drodze powstawania hipermutacji somatycznych, co szczególnie dotyczy PCM, który jest nowotworem z najbardziej dojrzałych komórek B. W wyniku tych mutacji może dojść do zmiany sekwencji DNA, skutkującej utratą markera molekularnego zidentyfikowanego pierwotnie. W związku z tym zastosowanie metody ASO-qPCR jest dla tych chorych bardziej ograniczone niż w przypadku chorych na pozostałe nowotwory B-komórkowe.

### Metoda ASO-qPCR

Metoda ASO-qPCR umożliwia detekcję specyficznych dla komórki PCM klonalnych rearanżacji *IGH* na bardzo niskim poziomie, tj. z czułością  $10^{-5}$ . Zastosowanie starterów komplementarnych do regionu złącz zrearanżowanych genów *IGH*, specyficznych dla konkretnego chorego, wymaga dysponowania materiałem z okresu rozpoznania PCM, w którym determinuje się określony dla pacjenta marker klonalności, badany w kolejnych próbkach szpiku i służący do oceny MRD.

W 2004 roku ukazały się wyniki pracy Bakkus i wsp. [47], którzy oceniali użyteczność oceny MRD metodą ASO-qPCR jako czynnika prognostycznego w 3.–6. miesiącu po auto-HSCT w grupie 67 chorych. W toku analizy autorzy zdefiniowali próg odcięcia poziomu MRD (0,015%) stanowiący istotnie statystycznie niezależny czynnik prognostyczny w odniesieniu do PFS, pozwalający na identyfikację chorych predysponowanych do szybkiego nawrotu nowotworu. W badaniu tym po raz pierwszy udowodniono znaczenie prognostyczne oznaczania poziomu MRD u chorych na PCM po auto-HSCT [47].

Z kolei Lipinski i wsp. [48] w analizie retrospektywnej oceniali poziom MRD u chorych po

auto-HSCT w próbkach krwi obwodowej (ocena stężenia białka monoklonalnego) i szpiku (molekularna ocena rearanżacji techniką ASO-qPCR) w dwóch punktach czasowych — w remisji po auto-HSCT oraz w momencie progresji choroby. Potwierdzono wysoką czułość tej techniki do oceny MRD, umożliwiającą wykrycie progresji szpiczaka wcześniej niż innymi metodami. Znaczenie prognostyczne oceny MRD w PCM techniką ASO-qPCR potwierdzono również w wielu innych badaniach [32, 49].

Temat znaczenia poziomu MRD jako czynnika prognostycznego u chorych na PCM leczonych przeszczepieniem allogenicznych krwiotwórczych komórek macierzystych (allo-HSCT, *allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*) podjęli Lioznov i wsp. [50]. W swojej pracy porównali wyniki oceny MRD metodami MFC i ASO-qPCR oraz ocenę chimeryzmu metodą RQ-PCR. Wyniki tych badań również potwierdziły wysoką korelację między techniką MFC i ASO-qPCR ( $p < 0,0001$ ), a także bardzo dobrą korelację w zakresie negatywizacji MRD, a całkowitym chimeryzmem ocenianym metodą RQ-PCR [50].

W 2014 roku Puig i wsp. [46] opublikowali wyniki swojej pracy, w której porównywali zastosowanie metod MFC i ASO-qPCR do oceny MRD w grupie 170 chorych na PCM pochodzących z kilku badań klinicznych, którzy w wyniku leczenia osiągnęli co najmniej PR. W swoich badaniach wykazali wysoką korelację między obiema technikami. Nieprawidłowy fenotyp techniką MFC wykryto u 46% chorych, natomiast klonalną rearanżację metodą ASO-qPCR — u 54% chorych [46]. Zwraca uwagę fakt, że tylko u 42% chorych wykazano możliwość rzetelnej oceny MRD techniką ASO-qPCR. U ponad połowy chorych oznaczenia tą techniką nie wykonano lub wynik był niemiarodajny z powodu niestwierdzenia klonalnej rearanżacji genów *IGH*, ograniczeń sekwencjonowania lub suboptymalnych warunków reakcji ASO-qPCR [46]. Ostatecznie analizę porównawczą wykonano w grupie 103 chorych i wykazano wysoką korelację w zakresie oceny poziomu MRD między obiema technikami ( $p < 0,001$ ). Stwierdzono również, że ocena MRD na poziomie  $10^{-4}$  pozwala najlepiej klasyfikować chorych do różnych kategorii ryzyka, niezależnie od intensywności leczenia. Chorych z MRD poniżej  $10^{-4}$  cechuje dłuższe PFS niż pozostałych (mediana PFS nieosiągnięta v. 31 mies.;  $p = 0,002$ ) [46]. W grupie pacjentów, którzy osiągnęli CR, wyniki badania molekularnego pozwoliły wyodrębnić dwie odmienne prognostycznie grupy chorych w zakresie PFS (mediana PFS 49 v. 26 mies.;  $p = 0,001$ ).

W badaniu tym udowodniono, że dla chorych, u których istnieje możliwość zastosowania oznaczenia MRD techniką molekularną, stanowi ona znakomite narzędzie prognostyczne [46]. Podobne wyniki w zakresie porównywalności metod MFC i ASO-qPCR w ocenie znaczenia prognostycznego badania MRD na poziomie  $10^{-4}$  w odniesieniu do PFS wykazali również niezależnie Sarasquete i wsp. oraz Martínez-Sánchez i wsp. [51, 52].

### Analiza sekwencji z wykorzystaniem NGS (VDJseq NGS)

W celu podwyższenia czułości oceny MRD rozpoczęto poszukiwania innych, bardziej precyzyjnych technik molekularnych oceny choroby resztkowej. Alternatywą dla ASO-qPCR okazała się tak zwana metoda *Lympho*SIGHT (Sequentia INC, USA), która charakteryzuje się nie tylko wyższą czułością detekcji MRD, ale również może być zastosowana u większego odsetka chorych w porównaniu z innymi technikami ( $> 90\%$  v.  $< 70\%$  ASO-PCR) [39].

Metoda *Lympho*SIGHT opiera się na technice NGS oraz reakcjach *multiplex* PCR z zastosowaniem uniwersalnych starterów, umożliwiających amplifikację i sekwencjonowanie wszystkich zrearranzowanych segmentów genów kodujących łańcuchy immunoglobulinowe (Ig) w klonie nowotworowym [53–55]. Genomowe DNA jest amplifikowane przy użyciu *locus*-specyficznych starterów zaprojektowanych dla konkretnych rearanżacji *IGH-VDJH*, *IGH-DJH* oraz *IGK*. Aby zapobiec nieproporcjonalnej amplifikacji jednej z rearanżacji, testowano zestawy wielu starterów i dostosowano je tak, by zagwarantować porównywalną amplifikację każdej rearanżacji *IG*. Zamplifikowany fragment jest następnie sekwencjonowany, a w kolejnym etapie oszacowane zostają częstości określonych klonotypów i zdeterminowany ostateczny marker molekularny danego pacjenta. Ograniczeniem metody, w kontekście późniejszej oceny MRD u konkretnego pacjenta, jest odsetek komórek nowotworowych w materiale pobranym przed leczeniem. Tylko pacjenci z klonem komórek szpiczakowych stanowiących powyżej 5% analizowanych komórek w materiale wyjściowym kwalifikują się do późniejszej oceny MRD. Wystandaryzowany algorytm, uwzględniający wyjściowy odsetek komórek danego klonu, umożliwia ocenę MRD na poziomie czułości nieprzekraczającym  $10^{-6}$ , czyli co najmniej 10 razy wyższym (1 log) niż w przypadku innych technik [39].

Ponieważ ocena MRD techniką NGS w sposób zaproponowany przez Sequentia i wsp. jest dość

skomplikowana, Martinez-Lopez i wsp. zaproponowali zmodyfikowaną i uproszczoną metodę NGS opartą na starterach zaprojektowanych do badania BIOMED-2 [42, 56]. Metodyka umożliwia identyfikację klonotypu szpiczakowego u 97% chorych, co stanowi bardzo zbliżony wynik do uzyskiwanego techniką MFC, a lepszy niż w przypadku metody Sequentia [39]. Wyniki zaproponowanej analizy MRD są powtarzalne przy czułości oznaczeń wynoszącej  $10^{-5}$ . Wykazano również związek negatywizacji MRD określanej nową metodą z dłuższym PFS [39, 57]. Martinez-Lopez i wsp. [39] dowiedli, że odpowiedź molekularna oceniana metodą NGS, korespondująca z nieobecnością na poziomie poniżej  $10^{-5}$  MRD, pozostaje w korelacji z istotnie statystycznie dłuższym czasem do progresji (TTP, *time to progression*), z medianą czasu 80 w porównaniu z 31 miesiącami ( $p < 0,0001$ ) oraz dłuższym OS ( $p = 0,02$ ), odpowiednio, u chorych z nieobecnością (niewykrywalną) oraz obecnością (wykrywalną) MRD. W tym samym badaniu zaproponowano stratyfikację chorych z przetrwałą MRD do trzech grup ryzyka (wysokiego, pośredniego, niskiego) wynikających z poziomu, na jakim choroba resztkowa była wykrywana (odpowiednio  $10^{-3}$ ,  $10^{-3}$ – $10^{-5}$ ,  $10^{-5}$ ). Wykazano, że mediana TTP uległa istotnemu wydłużeniu wraz z osiągnięciem głębszych odpowiedzi i wynosiła odpowiednio 27, 48 i 80 miesięcy [39].

Ladetto i wsp. [57] porównywali zastosowanie obu technik molekularnych — ASO-qPCR oraz NGS, aby ocenić, w jakich przypadkach technologia NGS przełamuje ograniczenia ASO-qPCR i czy rzeczywiście przekłada się to na zwiększenie czułości i specyficzności oceny MRD. Udowodniono wysoką zgodność w zakresie identyfikowanych klonotypów komórek nowotworowych (97% homologii). Czułość detekcji MRD w obu metodach wyniosła  $10^{-5}$ , a korelacja w zakresie wykrywania MRD wykazała zgodność w 79,6% przypadków [57]. Autorzy zwrócili uwagę, że niewątpliwą zaletą technologii NGS jest brak konieczności projektowania starterów i sond indywidualnych dla chorego [57].

W wielu opisanych badaniach wykazano, że badanie MRD metodą NGS może osiągnąć czułość  $10^{-6}$ . Natomiast należy pamiętać, że obie techniki molekularne oparte na ocenie rearanżacji genów *IGH* bezwzględnie wymagają oceny wyjściowego materiału pacjenta, pobranego przed rozpoczęciem leczenia, w celu identyfikacji konkretnego markera do późniejszej oceny MRD [32, 39, 53–57].

Martinez-Lopez i wsp. [39] podjęli się porównania technologii NGS i MFC. Porównywali próbki szpiku pobrane przed leczeniem oraz od chorych z bardzo dobrą odpowiedzią częściową (VGPR,



*very good partial response*) i odpowiedzią całkowitą. Identyfikowali klonotyp w materiale wyjściowym, a następnie przeprowadzali reewaluację w materiale pobranym w czasie leczenia (MRD) na obecność tego samego klonotypu. Pacjentów niekwalifikowanych do transplantacji oceniano po zakończeniu indukcji terapii, a chorych poddanych auto-HSCT — w 3. miesiącu po procedurze. Wykazano, że klon dominujący został zidentyfikowany ogólnie w całej grupie w 91% przypadków (w przypadku określonych rearanżacji odpowiednio: *IGH-VDJH* w 69%, *IGH-DJH* w 55%, *IGK* w 48%). Sugeruje to, że niektóre klony mogą nie zostać wykryte z powodu hipermutacji somatycznych. W przypadku materiałów pobranych w trakcie leczenia (110/121 chorych) i ocenianych metodą NGS osiągnięto czułość oznaczenia  $10^{-6}$  i wykazano obecność choroby resztkowej u 73% chorych. Wśród chorych, którzy osiągnęli VGPR, wykazano dłuższe PFS i OS w grupie MRD(-) w porównaniu z grupą MRD(+). W grupie z CR większość chorych wykazywała negatywizację MRD, co dodatkowo wydłużyło PFS u tych chorych (w porównaniu z MRD+). Informacje dotyczące oceny MRD innymi metodami były dostępne odpowiednio u 99 chorych metodą MFC oraz 41 ocenianych metodą ASO-qPCR. Zgodność w zakresie oceny MRD między NGS i MFC oraz NGS i ASO-qPCR wyniosła odpowiednio 83% i 85%. W grupie niezgodności 12 chorych z wynikiem negatywnym w MFC uzyskało wynik dodatni w NGS, 5 z wynikiem dodatnim w MFC uzyskało wynik o ujemnych w NGS [39].

Kazandjian i wsp. [58] również oceniali poziom MRD technikami MFC i NGS w grupie 43 chorych na PCM leczonych karfilzomibem, lenalidomidem i deksametazonem. Zaobserwowano, że 12-miesięczny PFS wyniósł odpowiednio 100% u chorych MRD(-) i 79% w grupie MRD(+) ( $p < 0,001$ ) w ocenie cytometrycznej oraz 100% w porównaniu z 95% ( $p = 0,02$ ) odpowiednio u chorych MRD(-) i MRD(+) ocenianej techniką NGS [58].

W badaniu klinicznym IFM2009 (700 objętych randomizacją chorych) 289 pacjentów oceniano metodą NGS, a 475 metodą MFC przed terapią podtrzymującą oraz 178 techniką NGS i 310 techniką MFC po zakończeniu leczenia podtrzymującego. Ocena MRD metodą NGS z czułością  $10^{-6}$  była możliwa do przeprowadzenia u 92% chorych. Wśród chorych, którzy osiągnęli CR, 3-letnie PFS wyniosło 87% w odniesieniu do MRD(-) i odpowiednio 42% w odniesieniu do MRD(+) w grupie przed leczeniem podtrzymującym (*pre-maintenance*) oraz odpowiednio 83% i 30% w grupie *post-maintenance* [59].

## Podsumowanie

Postęp w dziedzinie biologii molekularnej znacznie poprawił stan wiedzy na temat biologii PCM. Liczne badania pozwoliły zidentyfikować nowe onkogeny oraz zdefiniować wspierającą rolę mikrośrodowiska szpiku kostnego w aktywacji poszczególnych komórkowych szlaków przekazywania sygnału, prowadzących do wzrostu patologicznych plazmocytoów, ich proliferacji, przeżycia, migracji oraz lekooporności. Wykorzystanie tej wiedzy w praktyce klinicznej umożliwia poprawę końcowych wyników leczenia chorych na PCM. W przyszłych badaniach klinicznych powinno zostać określone, w jaki sposób wprowadzane schematy lecznicze zmodyfikują dotychczasowe parametry rokownicze, co będzie podstawą rozwoju zindywidualizowanych terapii.

Rodzaj zaburzeń molekularnych, szczególnie wtórnych, kształtuje tempo progresji i heterogenność obrazu klinicznego u poszczególnych chorych. Zrozumienie tego, jak zmiany genetyczne przyczyniają się do ewolucji klonalnej, a tym samym rozwoju oporności szpiczaka, pozwoli w przyszłości na przełamanie tej oporności lub jej zapobieżenie.

Metodyka NGS wydaje się idealnym narzędziem do oceny zmian genetycznych w komórkach szpiczaka, określenia zmian genetycznych prowadzących do powstania oporności oraz odpowiadających na poprowadzenie subklonu w kierunku ewolucji.

Techniki biologii molekularnej (PCR, ASO-qPCR, NGS) pozwoliły na lepszy wgląd w biologię i genetykę PCM oraz poznanie przebiegu choroby. Wprowadzenie nowoczesnych metod leczenia chorych na PCM wiąże się z koniecznością zastosowania lepszych, cechujących się wyższą czułością detekcji, technik oceny MRD umożliwiających stratyfikację do grup ryzyka, wczesne rozpoznanie i leczenie nawrotu choroby oraz zindywidualizowanie terapii [29].

Metodę ASO-qPCR przez wiele lat uważano za najczulszą metodę molekularną do oceny MRD, jednak bardzo pracochłonną. Ponadto badanie to nie daje jednoznacznej możliwości rozróżnienia między komórkami PCM a limfocytami B zawierającymi klonalną rearanżację genów *IGVH*. Z tego względu jej przydatność jest ograniczona. W interpretacji badania należy liczyć się z ryzykiem uzyskania fałszywie negatywnych wyników zależnych od niereprezentatywnej próbki materiału, nierównomiernego rozproszenia komórek nowotworowych w szpiku oraz możliwą zmianą pierwotnego markera w przebiegu ewolucji klonalnej choroby [32, 46, 50, 51].

**Tabela 1.** Porównanie technik oceny minimalnej choroby resztkowej u chorych na szpiczaka plazmocytozy (PCM) (zmodyfikowano na podstawie [30])**Table 1.** Comparison of minimal residual disease assessments methods in patients with plasma cell myeloma (PCM) (modified from [30])

Oceniany parametr	ASO-qPCR	MFC	NGS [VDJseq]
Zastosowanie	60–70%*	Prawie 100%	> 90%
Konieczność dysponowania próbką wyjściową	Tak	Nie	Tak
Analiza w czasie	Materiał świeży lub zamrożony	Dostarczenie do pracowni w ciągu 24–48 h Koniecznie świeży materiał	Materiał świeży lub zamrożony
Ocena jakości materiału	W momencie oceny	Od razu — ocena komórkowości badanego szpiku	W momencie oceny
Czułość oznaczenia	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup> –10 <sup>-6</sup>
Dodatkowe informacje na temat badanego materiału	Nie	Tak	–
Szybkość oznaczenia (czas do uzyskania wyniku)	Procedura czasowo-pracochłonna (kilka dni) Konieczność projektowania starterów i sond indywidualnie dla pacjenta	Zautomatyzowana procedura możliwa do przeprowadzenia w ciągu kilku godzin	Procedura czasowo-pracochłonna (kilka dni) Konieczność współpracy z bioinformatykiem
Standaryzacja	Nie dla PCM, tak dla ALL	Tak ( <i>EuroFlow</i> )	W toku
Możliwość zastosowania w ośrodkach	Szeroka	Szeroka	Ograniczona posiadaniem platformy NGS

\*Hipermutacje somatyczne; ASO-qPCR (*allele-specific quantitative oligonucleotide polymerase chain reaction*) — allelo-specyficzna ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy; MFC (*multicolor flow cytometry*) — wielokolorowa cytometria przepływowa; NGS (*next generation sequencing*) — sekwencjonowanie następnej generacji; ALL (*acute lymphoblastic leukemia*) — ostra białaczka limfoblastyczna

Metoda *LymphoSIGHT* zapewnia obecnie największą możliwą do osiągnięcia czułość oceny MRD, dlatego znajduje zastosowanie szczególnie u chorych z niewykrywalną innymi metodami chorobą resztkową i umożliwia identyfikację chorych obciążonych potencjalnie wyższym ryzykiem nawrotu (z MRD wykrywalną na poziomie 10<sup>-6</sup>) [39, 56, 57, 59].

Do oceny MRD u chorych na PCM mogą być wykorzystywane różnorodne techniki przedstawione w tabeli 1. Optymalna technologia powinna być możliwa do zastosowania u wszystkich lub większości chorych, charakteryzować się wysoką czułością i specyficnością oznaczenia, powtarzalnością, łatwym dostępem, możliwością uzyskania wyniku w krótkim czasie, koniecznością pobrania odpowiednio niewielkiej ilości materiału oraz udokumentowanym znaczeniem klinicznym i prognostycznym.

### Podziękowania

Projekt finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu ERA-NET

TRANSCAN-2 nr ERA-NET TRANSCAN-2 — 1/2017.

### Konflikt interesów

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

### Piśmiennictwo

- Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2011; 364(11): 1046–1060, doi: [10.1056/NEJMra1011442](https://doi.org/10.1056/NEJMra1011442), indexed in Pubmed: [21410373](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21410373/).
- Manier S, Salem KZ, Park J, et al. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017; 14(2): 100–113, doi: [10.1038/nrclinonc.2016.122](https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.122), indexed in Pubmed: [27531699](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27531699/).
- Salomon-Perzyński A, Jamrozik K. The role of daratumumab in the treatment of relapsed/refractory plasma cell myeloma. *Hematologia*. 2017; 8(4): 255–264.
- Dmoszyńska A, Usnarska-Zubkiewicz L, Walewski J, et al. Zalecenia Polskiej Grupy Szpiczakowej dotyczące rozpoznawania i leczenia szpiczaka plazmocytozy oraz innych dyskrazji plazmocytozy na rok 2017. *Acta Haematol Pol*. 2017; 48(2): 55–103, doi: [10.1016/j.achaem.2017.05.003](https://doi.org/10.1016/j.achaem.2017.05.003).
- Robiou du Pont S, Cleynen A, Fontan C, et al. Genomics of multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2017; 35(9): 963–967, doi: [10.1200/JCO.2016.70.6705](https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.6705), indexed in Pubmed: [28297630](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28297630/).

6. Tiedemann RE, Gonzalez-Paz N, Kyle RA, et al. Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia*. 2008; 22(5): 1044–1052, doi: [10.1038/leu.2008.4](https://doi.org/10.1038/leu.2008.4), indexed in Pubmed: [18216867](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18216867/).
7. González D, van der Burg M, García-Sanz R, et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*. 2007; 110(9): 3112–3121, doi: [10.1182/blood-2007-02-069625](https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-069625), indexed in Pubmed: [17634408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17634408/).
8. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2014; 5: 2997, doi: [10.1038/ncomms3997](https://doi.org/10.1038/ncomms3997), indexed in Pubmed: [24429703](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24429703/).
9. Szczepanski T, van 't Veer MB, Wolvers-Tettero IL, et al. Molecular features responsible for the absence of immunoglobulin heavy chain protein synthesis in an IgH(-) subgroup of multiple myeloma. *Blood*. 2000; 96(3): 1087–1093.
10. Swedin A, Lenhoff S, Olofsson T, et al. Clinical utility of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement identification for tumour cell detection in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1998; 103(4): 1145–1151, indexed in Pubmed: [9886333](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9886333/).
11. Hervé AL, Florence M, Philippe M, et al. Molecular heterogeneity of multiple myeloma: pathogenesis, prognosis, and therapeutic implications. *J Clin Oncol*. 2011; 29(14): 1893–1897, doi: [10.1200/JCO.2010.32.8435](https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.8435), indexed in Pubmed: [21482986](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21482986/).
12. Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood*. 2003; 101(11): 4569–4575, doi: [10.1182/blood-2002-10-3017](https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3017), indexed in Pubmed: [12576322](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12576322/).
13. Avet-Loiseau H, Gerson F, Magrangeas F, et al. Intergroupe Francophone du Myélome. Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood*. 2001; 98(10): 3082–3086, doi: [10.1182/blood.v98.10.3082](https://doi.org/10.1182/blood.v98.10.3082), indexed in Pubmed: [11698294](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11698294/).
14. Chang H, Qi C, Yi QL, et al. p53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2005; 105(1): 358–360, doi: [10.1182/blood-2004-04-1363](https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1363), indexed in Pubmed: [15339849](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15339849/).
15. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009; 23(12): 2210–2221, doi: [10.1038/leu.2009.174](https://doi.org/10.1038/leu.2009.174), indexed in Pubmed: [19798094](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19798094/).
16. Fonseca R, Debes-Marun CS, Picken EB, et al. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood*. 2003; 102(7): 2562–2567, doi: [10.1182/blood-2003-02-0493](https://doi.org/10.1182/blood-2003-02-0493), indexed in Pubmed: [12805059](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12805059/).
17. Debes-Marun CS, Dewald GW, Bryant S, et al. Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia*. 2003; 17(2): 427–436, doi: [10.1038/sj.leu.2402797](https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402797), indexed in Pubmed: [12592343](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12592343/).
18. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*. 2011; 471(7339): 467–472, doi: [10.1038/nature09837](https://doi.org/10.1038/nature09837), indexed in Pubmed: [21430775](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21430775/).
19. Van Wier S, Braggio E, Baker A, et al. Hypodiploid multiple myeloma is characterized by more aggressive molecular markers than non-hyperdiploid multiple myeloma. *Haematologica*. 2013; 98(10): 1586–1592, doi: [10.3324/haematol.2012.081083](https://doi.org/10.3324/haematol.2012.081083), indexed in Pubmed: [23716545](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23716545/).
20. Prideaux SM, Conway O'Brien E, Chevassut TJ. The genetic architecture of multiple myeloma. *Adv Hematol*. 2014; 2014: 864058, doi: [10.1155/2014/864058](https://doi.org/10.1155/2014/864058), indexed in Pubmed: [24803933](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24803933/).
21. Hanamura I, Stewart JP, Huang Y, et al. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood*. 2006; 108(5): 1724–1732, doi: [10.1182/blood-2006-03-009910](https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-009910), indexed in Pubmed: [16705089](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16705089/).
22. Leone PE, Walker BA, Jenner MW, et al. Deletions of CDKN2C in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(19): 6033–6041, doi: [10.1158/1078-0432.CCR-08-0347](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0347), indexed in Pubmed: [18829482](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18829482/).
23. Dutta AK, Hewett DR, Fink JL, et al. Cutting edge genomics reveal new insights into tumour development, disease progression and therapeutic impacts in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2017; 178(2): 196–208, doi: [10.1111/bjh.14649](https://doi.org/10.1111/bjh.14649), indexed in Pubmed: [28466550](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28466550/).
24. Johnson DC, Lenive O, Mitchell J, et al. Neutral tumor evolution in myeloma is associated with poor prognosis. *Blood*. 2017; 130(14): 1639–1643, doi: [10.1182/blood-2016-11-750612](https://doi.org/10.1182/blood-2016-11-750612), indexed in Pubmed: [28827410](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28827410/).
25. Williams MJ, Werner B, Barnes CP, et al. Identification of neutral tumor evolution across cancer types. *Nat Genet*. 2016; 48(3): 238–244, doi: [10.1038/ng.3489](https://doi.org/10.1038/ng.3489), indexed in Pubmed: [26780609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26780609/).
26. Bolli N, Biancon G, Moarii M, et al. Analysis of the genomic landscape of multiple myeloma highlights novel prognostic markers and disease subgroups. *Leukemia*. 2018; 32(12): 2604–2616, doi: [10.1038/s41375-018-0037-9](https://doi.org/10.1038/s41375-018-0037-9), indexed in Pubmed: [29789651](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29789651/).
27. Laganà A, Perumal D, Melnekoff D, et al. Integrative network analysis identifies novel drivers of pathogenesis and progression in newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia*. 2018; 32(1): 120–130, doi: [10.1038/leu.2017.197](https://doi.org/10.1038/leu.2017.197), indexed in Pubmed: [28642592](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28642592/).
28. Rasche L, Chavan SS, Stephens OW, et al. Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing. *Nat Commun*. 2017; 8(1): 268, doi: [10.1038/s41467-017-00296-y](https://doi.org/10.1038/s41467-017-00296-y), indexed in Pubmed: [28814763](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28814763/).
29. Krzywdzińska A, Solarska I, Puła B, et al. Praktyka kliniczna oceny minimalnej choroby resztkowej u chorych na szpiczaka plazmocytoowego w Polsce: badanie ankietowe Polskiego Konsorcjum Szpiczakowego. *Hematologia*. 2017; 8(4): 239–245, doi: [10.5603/Hem.2017.0035](https://doi.org/10.5603/Hem.2017.0035).
30. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2016; 17(8): e328–e346, doi: [10.1016/S1470-2045\(16\)30206-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30206-6), indexed in Pubmed: [27511158](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27511158/).
31. Martínez-Lopez J, Fernández-Redondo E, García-Sanz R, et al. GEM (Grupo Español Multidisciplinar de Melanoma)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) cooperative study group. Clinical applicability and prognostic significance of molecular response assessed by fluorescent-PCR of immunoglobulin genes in multiple myeloma. Results from a GEM/PETHEMA study. *Br J Haematol*. 2013; 163(5): 581–589, doi: [10.1111/bjh.12576](https://doi.org/10.1111/bjh.12576), indexed in Pubmed: [24117042](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24117042/).
32. Jamroziak K, Krzywdzińska A, Solarska I, et al. Znaczenie minimalnej choroby resztkowej w szpiczaku plazmocytoowym — Stanowisko Polskiego Konsorcjum Szpiczakowego. *Hematologia*. 2018; 8(4): 246–254, doi: [10.5603/hem.2017.0036](https://doi.org/10.5603/hem.2017.0036).

33. Sanchez-Vega B, Ayala R, Cedena T. Minimal residual disease testing for multiple myeloma. *Hematologia*. 2017; 8(3): 219–227, doi: [10.5603/Hem.2017.0025](https://doi.org/10.5603/Hem.2017.0025).
34. Rihova L, Hajek R. Flow cytometric minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Hematologia*. 2017; 8(3): 211–218.
35. Galimberti S, Brizzi F, Mameli M, et al. An advantageous method to evaluate IgH rearrangement and its role in minimal residual disease detection. *Leuk Res*. 1999; 23(10): 921–929, indexed in Pubmed: [10573138](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10573138/).
36. Brisco MJ, Condon J, Hughes E, et al. Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukaemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet*. 1994; 343(8891): 196–200, doi: [10.1016/s0140-6736\(94\)90988-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(94)90988-1), indexed in Pubmed: [7904666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7904666/).
37. Billadeau D, Blackstadt M, Greipp P, et al. Analysis of B-lymphoid malignancies using allele-specific polymerase chain reaction: a technique for sequential quantitation of residual disease. *Blood*. 1991; 78(11): 3021–3029, indexed in Pubmed: [1954387](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1954387/).
38. Owen RG, Johnson RJ, Rawstron AC, et al. Assessment of IgH PCR strategies in multiple myeloma. *J Clin Pathol*. 1996; 49(8): 672–675, doi: [10.1136/jcp.49.8.672](https://doi.org/10.1136/jcp.49.8.672), indexed in Pubmed: [8881921](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8881921/).
39. Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood*. 2014; 123(20): 3073–3079, doi: [10.1182/blood-2014-01-550020](https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-550020), indexed in Pubmed: [24646471](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24646471/).
40. Ladetto M, Donovan JW, Harig S, et al. Real-Time polymerase chain reaction of immunoglobulin rearrangements for quantitative evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2000; 6(3): 241–253, indexed in Pubmed: [10871149](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10871149/).
41. Rasmussen T, Poulsen TS, Honoré L, et al. Quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using an allele-specific real-time PCR assay. *Exp Hematol*. 2000; 28(9): 1039–1045, indexed in Pubmed: [11008016](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11008016/).
42. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003; 17(12): 2257–2317, doi: [10.1038/sj.leu.2403202](https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403202), indexed in Pubmed: [14671650](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14671650/).
43. van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*. 2003; 17(6): 1013–1034, doi: [10.1038/sj.leu.2402922](https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402922), indexed in Pubmed: [12764363](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12764363/).
44. Pongers-Willems MJ, Seriu T, Stolz F, et al. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999; 13(1): 110–118, indexed in Pubmed: [10049045](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10049045/).
45. Pongers-Willems MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, et al. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia*. 1998; 12(12): 2006–2014, indexed in Pubmed: [9844931](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9844931/).
46. Puig N, Sarasquete ME, Balanzategui A, et al. Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. *Leukemia*. 2014; 28(2): 391–397, doi: [10.1038/leu.2013.217](https://doi.org/10.1038/leu.2013.217), indexed in Pubmed: [23860448](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23860448/).
47. Bakkus MHC, Bouko Y, Samson D, et al. Post-transplantation tumour load in bone marrow, as assessed by quantitative ASO-PCR, is a prognostic parameter in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2004; 126(5): 665–674, doi: [10.1111/j.1365-2141.2004.05120.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05120.x), indexed in Pubmed: [15327517](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15327517/).
48. Lipinski E, Cremer FW, Ho AD, et al. Molecular monitoring of the tumor load predicts progressive disease in patients with multiple myeloma after high-dose therapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001; 28(10): 957–962, doi: [10.1038/sj.bmt.1703276](https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1703276), indexed in Pubmed: [11753551](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11753551/).
49. Galimberti S, Benedetti E, Morabito F, et al. Prognostic role of minimal residual disease in multiple myeloma patients after non-myceloablative allogeneic transplantation. *Leuk Res*. 2005; 29(8): 961–966, doi: [10.1016/j.leukres.2005.01.017](https://doi.org/10.1016/j.leukres.2005.01.017), indexed in Pubmed: [15978948](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15978948/).
50. 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(10): 913–916, doi: [10.1038/bmt.2008.14](https://doi.org/10.1038/bmt.2008.14), indexed in Pubmed: [18264143](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18264143/).
51. Sarasquete ME, García-Sanz R, González D, et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica*. 2005; 90(10): 1365–1372, indexed in Pubmed: [16219573](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16219573/).
52. Martínez-Sánchez P, Montejano L, Sarasquete ME, et al. Evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma patients by fluorescent-polymerase chain reaction: the prognostic impact of achieving molecular response. *Br J Haematol*. 2008; 142(5): 766–774, doi: [10.1111/j.1365-2141.2008.07263.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07263.x), indexed in Pubmed: [18637804](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18637804/).
53. Faham M, Zheng J, Moorhead M, et al. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012; 120(26): 5173–5180, doi: [10.1182/blood-2012-07-444042](https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-444042), indexed in Pubmed: [23074282](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23074282/).
54. Gawad C, Pepin F, Carlton VEH, et al. Massive evolution of the immunoglobulin heavy chain locus in children with B precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012; 120(22): 4407–4417, doi: [10.1182/blood-2012-05-429811](https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-429811), indexed in Pubmed: [22932801](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22932801/).
55. Logan AC, Zhang B, Narasimhan B, et al. Minimal residual disease quantification using consensus primers and high-throughput IGH sequencing predicts post-transplant relapse in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2013; 27(8): 1659–1665, doi: [10.1038/leu.2013.52](https://doi.org/10.1038/leu.2013.52), indexed in Pubmed: [23419792](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23419792/).
56. Martinez-Lopez J, Sanchez-Vega B, Barrio S, et al. Analytical and clinical validation of a novel in-house deep-sequencing method for minimal residual disease monitoring in a phase II trial for multiple myeloma. *Leukemia*. 2017; 31(6): 1446–1449, doi: [10.1038/leu.2017.58](https://doi.org/10.1038/leu.2017.58), indexed in Pubmed: [28210002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28210002/).
57. Ladetto M, Brüggemann M, Monitillo L, et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia*. 2014; 28(6): 1299–1307, doi: [10.1038/leu.2013.375](https://doi.org/10.1038/leu.2013.375), indexed in Pubmed: [24342950](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24342950/).
58. Kazandjian D, Korde N, Mailankody S, et al. Treatment with carfilzomib-lenalidomide-dexamethasone with lenalidomide extension in patients with smoldering or newly diagnosed multiple myeloma. *JAMA Oncol*. 2015; 1(6): 746–754, doi: [10.1001/jamaoncol.2015.2010](https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.2010), indexed in Pubmed: [26181891](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26181891/).
59. Avet-Loiseau H, Corre J, Lauwers-Cances V, et al. Evaluation of minimal residual disease (MRD) by next generation sequencing (NGS) is highly predictive of progression free survival in the IFM/DFCI 2009 trial. *Blood*. 2015; 126(23): 191.