

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра

\_\_\_\_\_ Р.А. Часнойть  
23 марта 2007 г.  
Регистрационный № 152-1105

**ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ ПЛАЗМОЦИТОВ  
К ЦИТОСТАТИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ IN VITRO  
И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ОТВЕТА НА ХИМИОТЕРАПИЮ  
ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический  
центр гематологии и трансфузиологии»

АВТОРЫ: канд. мед. наук С.М. Космачева, канд. мед. наук Д.Г. Цвирко, В.Ф.  
Мыслицкий

Минск 2007

Цель разработки инструкции – прогнозирование эффективности химиотерапии множественной миеломы (ММ) на этапе выбора и назначения схемы (протокола) лечения.

Инструкция может быть использована в практике Республиканских гематологических центров, гематологических отделений областных клинических больниц.

Противоопухолевое действие цитостатических химиопрепаратов на опухолевые плазмоциты может быть определено *in vitro* с помощью МТТ-теста, пролиферативного или DiSC-теста. С этой целью исследуемые опухолевые клетки инкубируются в присутствии различных концентраций исследуемых цитостатических препаратов. Рассчитывается концентрация препарата, подавляющая жизнеспособность опухолевых плазмоцитов (МТТ- и DiSC-методы) или их пролиферативную активность (пролиферативный тест) на 50%. Проводится балльная оценка химиочувствительности плазмоцитов к каждому отдельному препарату и к совокупности препаратов, используемых в терапии.

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

- камера пылезащитная не ниже II класса защиты с ламинарным потоком стерильного воздуха;
- центрифуга (1200-1500-1800 об./мин);
- CO<sub>2</sub> – инкубатор или термостат при условии создания в эксикаторе атмосферы с 5% CO<sub>2</sub>;
- микроскоп световой бинокулярный;
- набор автоматических дозаторов;
- 96-луночные кругло- и плоскодонные планшеты для культур клеток;
- пробирки центрифужные;
- наконечники для дозаторов.

#### ***Дополнительное оборудование***

*для постановки МТТ-теста:*

- много- или одноканальный планшеточный спектрофотометр (540 нм).

*для постановки DiSC-метода:*

- цитоцентрифуга или обычная центрифуга типа ОПН-3, оборудованная циторотором с насадками (1000-1500 об./мин);
- фильтры для цитопрепаратов или бумага фильтровальная для иммуноблота;
- стекла предметные 25/75 мм с полосой для записи.

*для постановки пролиферативного теста:*

- β-счетчик;
- устройство для сбора меченых клеток и переноса их на бумажные или стеклофильтры (харвестер);
- шкаф вытяжной.

**Реактивы:**

- фиколл-верографин,  $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>;
- среда RPMI-1640;
- пенициллин-стрептомицин (в конечной концентрации 100 Ед/мл);
- раствор L-глутамина в конечной концентрации 2,5 мМ;
- термоинактивированные (56°C, 30 мин) АВ(IV)-сыворотка или эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС);
- изотонический фосфатно-солевой буфер (рН 7,4);
- тестируемые цитостатические препараты;
- изотонический раствор хлорида натрия.

**Дополнительные реактивы**

при использовании МТТ-теста:

- ДМСО или изопропанол;
- МТТ (Sigma).

при использовании DiS- теста:

- краска Романовского;
- краска нигрозин;
- метанол;
- спирт этиловый 96°;
- эфир медицинский.

при использовании пролиферативного теста:

- жидкость сцинтилляционная типа ЖС-1;
- <sup>3</sup>Н-тимидин.

Таблица 1

## Приготовление культуральной среды и реагентов

<b>Культуральная среда</b> (полная питательная среда, ППС)	RPMI-1640 2 мМ L-глутамина 100 Ед/мл пенициллина 100 мг/мл стрептомицина 10% АВ(IV)-сыворотки или ЭТС
<b>МТТ</b>	Растворить 10 мг МТТ в 2 мл 0,9% NaCl Поместить в термостат на 15-20 мин. Стерилизовать раствор через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм Хранить при -20°C, расфасовав по аликвотам
<b>10-кратный раствор NaCl (1,5 М)</b>	Растворить 8,775 г NaCl (х.ч.) в 100 мл бидистиллированной воды. Стерилизовать раствор через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм
<b>Раствор А для лизиса эритроцитов</b>	1,55 М NH <sub>4</sub> Cl и мМ Na <sub>2</sub> ЭДТА в стерильной воде Растворить 8,29 г NH <sub>4</sub> Cl и 0,037 г Na <sub>2</sub> ЭДТА в 100 мл стерильной дистиллированной воды Хранить при +4°C
<b>Раствор В для лизиса эритроцитов</b>	0,1 М KHCO <sub>3</sub> в стерильной дистиллированной воде Растворить 1,0 г 0,1 М KHCO <sub>3</sub> в 100 мл стерильной

	дистиллированной воды Хранить при +4°C
<b>Закисленный изопропанол</b>	2-пропанол с 0,04 Н НСl. Добавить 1 мл 2 Н НСl к 50 мл 2-пропанола. Готовить закисленный изопропанол не позднее, чем за 2 недели до использования Хранить при комнатной температуре
<b>Смесь Никифорова</b>	Смешать в соотношении 1:1 спирт этиловый и эфир медицинский. Закрывать герметично, хранить в прохладном месте, не допускать нагревания и попадания прямых солнечных лучей
<b>Краска нигрозин</b>	Растворить 1 г краски нигрозин в 100 мл ФСБ Добавить 1 мл 2% азида натрия и профильтровать. Хранить при комнатной температуре
<b>Трипановый синий</b>	Растворить 0,02 г краски трипанового синего в 10 мл ФСБ. Добавить 0,1 мл 2% азида натрия и профильтровать. Хранить при комнатной температуре
<b>Азид натрия</b>	Растворить 0,2 г азида натрия в 10 мл дистиллированной воды, профильтровать Хранить при комнатной температуре
<b>Фосфатно-солевой буфер</b>	Приготовить навески: NaCl – 8 г, KCl – 0,2 г, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 1,44 г, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0,24 г. Растворить в 800 мл дистиллированной воды. Довести рН 7,4 НСl Добавить дистиллированной воды до объема 1000 мл Профильтровать. Хранить при -20°C. Перед использованием разморозить
<b>Краска Романовского</b>	Развести концентрат краски Романовского в ФСБ в соотношении 1:15. Использовать в течение 24 ч

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Множественная миелома, требующая проведения специфической химиотерапии (необходимость выбора схемы терапии).

#### **Критерии отбора образцов клеток больных ММ для постановки тестов по определению химиочувствительности**

Постановка теста является целесообразной при условии:

- с момента забора костного мозга (КМ) до начала выделения клеток прошло не более 3 ч;

- отсутствуют внешние признаки гемолиза эритроцитов;

- отсутствуют признаки образования сгустков.

Дополнительно при проведении МТТ-теста:

- образец выделенных моноклеарных клеток должен содержать не менее 60% опухолевых миеломных клеток.

Учет теста считается целесообразным, если:

- жизнеспособность клеток в контрольных лунках на 3-й день культивирования не менее 70%;
- оптическая плотность (ОП) контрольных лунок не менее 0,05 единиц (шкала 0,0-1,0).

### **Забор и выделение опухолевых плазмоцитов**

#### **1. Забор образцов**

Образцы КМ свежие или взятые в течение 3 ч могут быть использованы при содержании в них опухолевых клеток на момент забора не менее 60% при использовании МТТ-теста и менее 60% – при использовании пролиферативного и DiSC-метода. КМ берется в пробирки с расчетным конечным содержанием гепарина 20 Ед/мл КМ. Пробирки с образцами транспортируются в лабораторию при комнатной температуре.

#### **2. Установление содержания плазматических клеток в образце КМ**

Установить процент плазматических клеток по морфологии клеток в препаратах, окрашенных по методу Романовского-Гимза:

1. Приготовить мазки клеток на предметных стеклах.
2. Фиксировать 100% метанолом 3 мин при комнатной температуре.
3. Окрасить 20-25 мин свежеприготовленной краской Романовского-Гимза.
4. Смыть стекла под водопроводной водой.
5. Высушить стекла.
6. Определить количество лейкоцитов и процентное содержание плазматических клеток в костном мозге под световым микроскопом.

#### **3. Выделение опухолевых плазмоцитов из образцов костного мозга**

Процедура выделения опухолевых плазмоцитов и постановка тестов проводятся в ламинарных боксах с соблюдением стерильности:

1. Перед выделением плазмоцитов развести образцы КМ теплым (37°C) изотоническим раствором хлорида натрия в соотношении 1:1.
2. Наслоить клеточную суспензию на лимфопреп ( $D=1,078 \text{ г/см}^3$ ), соотношение суспензия клеток/лимфопреп не более 2:1.
3. Центрифугировать при 1500 об./мин 30 мин при комнатной температуре.
4. Удалить верхний слой без нарушения интерфазы.
5. Собрать интерфазу в отдельную пробирку.
6. Развести суспензию клеток интерфазы изотоническим раствором хлорида натрия с 3% АВ(IV)-сыворотки или ЭТС.
7. Центрифугировать при 1500 об./мин 25 мин при комнатной температуре.
8. Ресуспендировать клетки в изотоническом растворе хлорида натрия с 3% АВ(IV)-сыворотки или 3% ЭТС.
9. Центрифугировать при 1500 об./мин 10 мин при комнатной температуре.
10. Ресуспендировать клетки в ППС в конечной концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл.

#### **4. Оценка жизнеспособности клеток и количество лейкоцитов и эритроцитов в образцах костного мозга**

Жизнеспособность опухолевых клеток, количество лейкоцитов и эритроцитов оценивается по исключению трипанового синего:

1. Смешать аликвоту клеток с равным объемом 0,2% раствора трипанового синего.

2. Подсчитать количество неокрашенных клеток (живые клетки), синих клеток (мертвые клетки) и желтоватых клеток (эритроциты).

3. Посчитать процент жизнеспособности, клеточную концентрацию и соотношение лейкоциты/эритроциты.

4. Приготовить цитопрепарат из суспензии выделенных клеток, окрасить по Романовскому и подсчитать процентное содержание опухолевых плазмоцитов.

#### **5. Удаление эритроцитов**

Эритроциты могут влиять на переход МТТ в формазан на 3 сутки инкубации при учете жизнеспособности с помощью МТТ-теста. Поэтому эритроциты должны быть удалены до культивирования опухолевых плазмоцитов клеток. Лизис эритроцитов проводят, если соотношение лейкоцитов к эритроцитам после выделения на градиенте плотности фиколл/верографин меньше 2:1:

- добавить к 8 мл стерильной воды 1 мл раствора А и 1 мл раствора В для лизиса эритроцитов;

- фильтровать раствор через 0,22 мкм фильтр;

- добавить 5% ЭТС и охладить лизирующий раствор на льду;

- добавить 2-5 мл раствора к клеткам;

- инкубировать на льду 5 мин;

- добавить среду RPMI-1640 через 5 мин;

- отобрать 30 мкл суспензии клеток для подсчета количества;

- центрифугировать оставшиеся клетки (1200 об./мин) 10 мин при комнатной температуре;

- смешать 20 мкл ранее отобранной суспензии клеток с трипановым синим (1:1) и подсчитать соотношение лейкоцитов и эритроцитов под световым микроскопом. Если соотношение более 2:1, лизис следует повторить.

#### **Подготовка 96-луночных планшет с цитостатиками**

Набор тестируемых химиопрепаратов определяется в зависимости от наличия и возможности использования их в составе той либо иной схемы для лечения конкретного больного:

1. Приготовить исходный раствор цитостатических препаратов, растворяя, если требуется, в растворителе согласно инструкции к препарату. Разлить на аликвоты. Хранить при -20°C один год.

2. Перед постановкой теста из исходного раствора приготовить рабочее разведение цитостатических препаратов в среде RPMI-1640 без добавления АВ(IV)-сыворотки или ЭТС (табл. 2).

3. Внести в лунки культуральных планшет по 100 мкл ППС.
4. Добавить по 25 мкл рабочего разведения (10-кратный концентрат) препарата в 2 лунки 96-луночного круглодонного планшета, перемешать.
5. Перенести 25 мкл раствора в следующие 2 лунки и т. д. Сделать по 6 разведений каждого препарата.
6. В качестве контроля использовать:
  - исследуемые клетки в ППС без добавления цитостатиков;
  - исследуемые клетки, инкубированные только с тритоном X-100 (0,01% раствор);
  - ППС с разведенными цитостатиками без добавления исследуемых клеток.

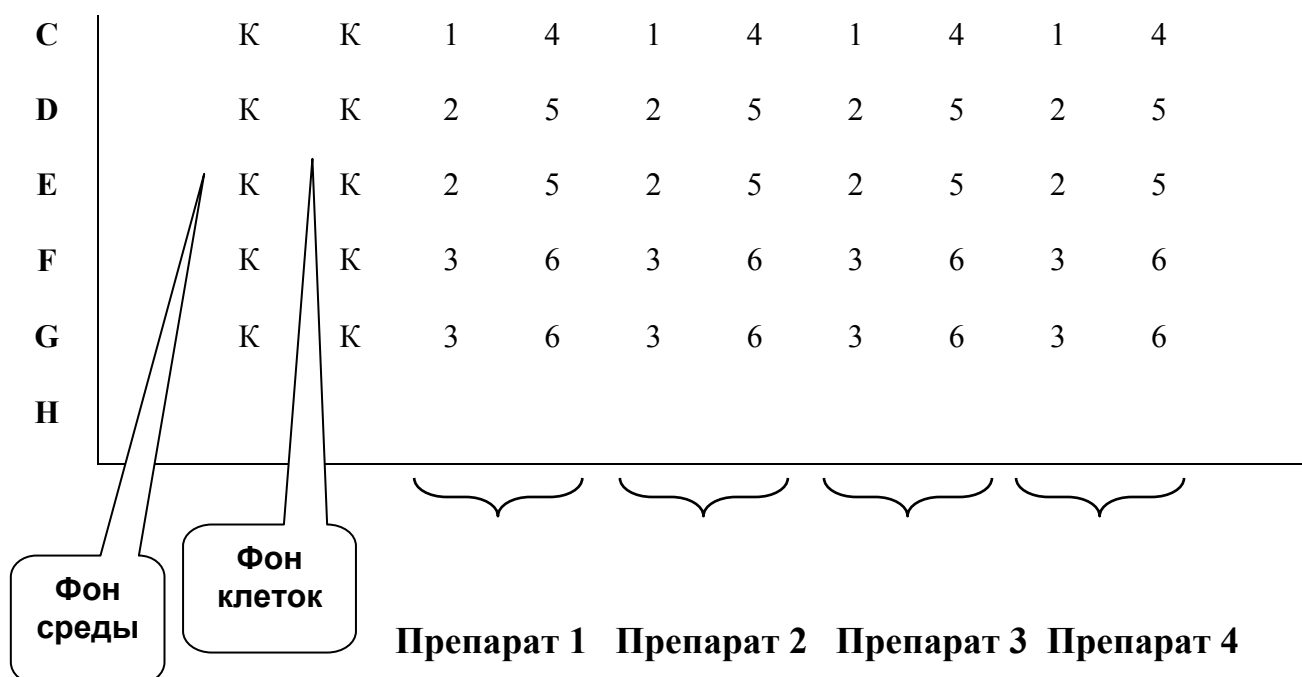
Схема добавления цитостатических препаратов в 96-луночные планшеты для МТТ- и DiSC-теста представлена на рис. 1. Титрование цитостатических препаратов при использовании пролиферативного теста проводится в горизонтальных рядах.

Таблица 2

Перечень тестируемых цитостатических препаратов

№	Препарат	Максимальная концентрация в культуре, мкг/мл	Концентрация исходного раствора (50 <sup>x</sup> ), мкг/мл	Концентрация рабочего раствора (10 <sup>x</sup> ), мкг/мл	Приготовление рабочего раствора (10 <sup>x</sup> ) из исходного (п. 4)
1	Доксорубин	<b>0,8</b>	2000	8	Разв. в 250 раз 4 мкл+996 мкл
2	Винкристин	<b>5</b>	1000	50	Разв. в 20 раз 50 мкл+950 мкл среды
3	Преднизолон	<b>300</b>	30000	3000	Разв. в 10 раз 100 мкл+900 мкл среды
4	Циклофосфан	<b>100</b>	20000	1000	Разв. в 20 раз 50 мкл+950 мкл среды
5	Мелфалан	<b>50</b>	5000	500	Разв. в 10 раз 100 мкл+900 мкл среды
6	Кармустин	<b>500</b>	10000	5000	Разв. в 2 раза. 500 мкл+500 мкл среды

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>А</b>												
<b>В</b>		К	К	1	4	1	4	1	4	1	4	



**Рис. 1.** Схема добавления исследуемых препаратов и клеток в 96-луночную планшету

Цифрами 1, 2, 3 и т. д. указаны лунки, содержащие различные концентрации тестируемого химиопрепарата (в дуплетах). Краевые лунки не используются для тестов и заполняются стерильной питательной средой для уменьшения испарения из тест-лунок.

#### **Культивирование исследуемых клеток с цитостатиками**

После разведения цитостатиков в микропланшетах вносят суспензию исследуемых клеток в концентрации 1 млн/мл в объеме 100 мкл/лунку. Инкубируют в течение 72 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> во влажной атмосфере. Для постановки одного теста необходимо 10 млн клеток (10 мл суспензии клеток с концентрацией 1 млн/мл).

#### **Учет пролиферативного теста**

1. В конце 2-го дня культивирования внести во все лунки метил-<sup>3</sup>H-тимидин из расчета 37 Кбк на лунку.
2. Инкубировать планшет 18 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.
3. Исследуемые клетки перенести на бумажные фильтры с помощью харвестера.
4. Фильтры высушить.
5. Фильтры перенести во флаконы с 400 мкл сцинтилляционной жидкости ЖС-1.
6. Провести учет радиоактивности на β-счетчике.
7. Рассчитать среднее значение 2-х лунок пролиферативной активности клеток для каждой концентрации лекарственного препарата.
8. Рассчитать выживаемость ОМК в присутствии исследуемого лекарственного препарата по формуле:

$$\left( \frac{\text{КОЛ-ВО ИМПУЛЬСОВ}_{\text{(опыт. лунка)}}}{\text{КОЛ-ВО ИМПУЛЬСОВ}_{\text{(контр. лунка)}}} \right) \times 100\%.$$



9. На основании последней графы таблицы построить график, откладывая на оси абсцисс дозы, на оси ординат выживаемость (%).

10. Найти  $LC_{50}$  по графику.

#### **Учет МТТ-теста**

На 3-й день культивирования:

1. Если на 3-й день количество жизнеспособных клеток более 70% – добавить по 10 мкл МТТ (5 мг/мл) в каждую лунку.

2. Перемешать содержимое лунок планшет на шейкере в течение 5 мин.

3. Инкубировать планшет 4 ч при 37°C в атмосфере 5%  $CO_2$ .

4. Осторожно удалить супернатант, не затрагивая кристаллы формазана.

5. Растворить кристаллы формазана в 100 мкл закисленного (0,04 Н HCl) изопропанола или 150 мкл ДМСО. Ресуспендировать клетки многоканальной пипеткой, пока все кристаллы не растворятся.

6. Инкубировать планшет 5 мин при комнатной температуре.

7. Измерить ОП при длине волны 540 нм (при длине волны сравнения 720 нм).

8. Провести визуальный контроль непосредственно после считывания результатов на наличие факторов, которые могут влиять на оптическую плотность каждой лунки (пузырьки воздуха, белковые преципитаты, царапины на внешней поверхности лунок и т. д.).

9. Провести расчет выживаемости исследуемых клеток и  $LC_{50}$ , если оптическая плотность превышает 0,05 ед. (по шкале 0,0-1,0).

10. Рассчитать выживаемость клеток для каждой концентрации лекарственного препарата по формуле:

$$\frac{(\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды})}{\text{ОП контр. лунок} - \text{ОП среды}} \times 100\%,$$

где ОП – оптическая плотность.

11. Построить дозозависимую кривую и рассчитать  $LC_{50}$ .

#### **Учет DiSC-метода**

На 3-й день культивирования:

1. Подготовить бумажные фильтры.

2. Подготовить стекла для цитопрепаратов (обезжирить в смеси Никифорова и насухо вытереть).

3. Из каждой лунки осторожно забрать 150 мкл супернатанта, не затрагивая осадок клеток.

4. В лунки добавить по 50 мкл нигрозина (1% водный раствор).

5. Инкубировать 5 мин при комнатной температуре.

6. Приготовить препараты на цитоцентрифуге.

7. Стекла высушить, фиксировать метанолом и окрасить по Романовскому.

8. Считать под световым микроскопом 3 типа клеток: живые плазматические клетки, живые нормальные клетки и мертвые клетки (темные пятна).

9. Рассчитать процент живых опухолевых клеток (LT-live tumour) по формуле:

$$LT = \frac{\text{Кол-во опухолевых живых клеток}}{(\text{Опухолевые живые клетки} + \text{живые нормальные} + \text{мертвые})} \times 100.$$

10. Для каждой концентрации исследуемого препарата рассчитать выживаемость опухолевых клеток (TCV-tumour cell viability) как процент по отношению к контролю:  $TCV = \frac{LT \text{ лекарства}}{LT \text{ контроль}} \times 100.$

11. Построить дозозависимую кривую и рассчитать  $LC_{50}$ .

#### **Обработка полученных данных**

Для вычисления  $LC_{50}$  используют также специальную компьютерную программу, составленную в Excel (Veerman AGP, 1999; Kaspers GJL, 1999).

#### **Оценка результатов тестирования и прогнозирование результатов химиотерапии**

В целях обеспечения максимально точного прогнозирования результатов химиотерапии следует использовать комплексный метод прогнозирования:

1. Определить степень чувствительности исследуемых клеток к каждому химиопрепарату по шкале чувствительности, которая учитывает среднетерапевтические дозы, используемые для лечения конкретного больного.

Для расчетов использовать следующие значения  $LC_{50}$ :

1) нечувствительные ( $LC_{50}$  выше среднетерапевтической дозы более чем в 10 раз);

2) слабочувствительные ( $LC_{50}$  выше среднетерапевтической дозы не более чем в 10 раз);

3) чувствительные ( $LC_{50}$  равен среднетерапевтической дозе и ниже ее не более чем в 10 раз);

4) высокочувствительные ( $LC_{50}$  ниже среднетерапевтической дозы более чем в 10 раз).

2. Прогнозировать эффективность применения той либо иной схемы химиотерапии, для чего следует:

- определить балл химиочувствительности клеток к каждому исследуемому химиопрепарату согласно предлагаемой ранговой оценке (табл. 3);

- суммарный балл всей схемы терапии (в расчет принимать только препараты, входящие в исследуемую схему ПХТ);

- средний балл схемы как отношение суммарного балла к числу препаратов, применяемых в данной схеме;

- выбрать из существующих схем (протоколов) терапии ММ схему с минимальным значением среднего балла.

Пример прогнозирования исхода химиотерапии по результатам определения чувствительности опухолевых плазмоцитов больных ММ к цитостатическим препаратам *in vitro* (выбор одной из схем VMCP или M2) приведен в табл. 4.

Таблица 3

Ранговая оценка концентрации препаратов, вызывающих 50% гибель исследуемых клеток

№	Препарат	Баллы							
		8	7	6	5	4	3	2	1
1	Доксорубицин	>4	4-0,8	0,8-0,16	0,16-0,032	0,032-0,0064	0,0064 - 0,0013	0,0013 - 0,0002	<0,0002
2	Винкристин	>5	5-1	1-0,2	0,2-0,04	0,04-0,008	0,008-0,0016	0,0016 - 0,0003	<0,0003
3	Преднизолон	>300	300-60	60-12	12-2,4	2,4-0,48	0,48-0,096	0,096-0,0192	<0,0192
4	Циклофосфан	>500	500-100	100-20	20-4	4-0,8	0,8-0,16	0,16-0,032	<0,032
5	Мелфалан	>50	50-10	10-2	2-0,4	0,4-0,08	0,08-0,016	0,016-0,0032	<0,0032
6	Кармустин	>500	500-100	100-20	20-4	4-0,8	0,8-0,16	0,16-0,032	<0,032

Примечание. Концентрация препаратов, вызывающих 50% гибель клеток (LC50) приведена в мкг/мл.

Таблица 4

Пример прогнозирования результатов химиотерапии на основе бальной оценки химиочувствительности

	Баллы							Сумма баллов	Средний балл	Предполагаемая схема ПХТ <i>in vivo</i>	Прогнозируемый исход ПХТ
	2	3	4	5	6	7	8				
1		carb	pred	vincr melph			cyclop	25	5	M2	Чувствительность
2			pred	vincr melph			cyclop	22	5,5	VMC P	Резистентность

Примечание 1. Для схемы M2: 3 балла (кармустин) + 4 балла (преднизолон) + 5 баллов (винкристин) + 5 баллов (мелфалан) + 8 баллов (циклофосфан) = 25 (суммарный балл), средний балл =5.

Примечание 2. Для схемы VMCP: 4 балла (преднизолон) + 5 баллов (винкристин) + 5 баллов (мелфалан) + 8 баллов (циклофосфан) = 22 (суммарный балл), средний балл =5,5. При условии, что за критерий чувствительности к ПХТ принимается значение среднего балла 5 и ниже, схема VMCP оценивается как менее эффективная, чем схема M2.

**Схема прогнозирования эффективности химиотерапии  
множественной миеломы на основе комплексной оценки  
химиочувствительности опухолевых плазмоцитов *in vitro***

1. Выбор метода тестирования химиочувствительности (MTT, DiSC, или пролиферативный тест) в зависимости от возможности применения в данной клинике (наличия соответствующего оборудования и материалов).

2. Выбор применяемых в данном учреждении цитостатиков, входящих в соответствующие схемы терапии больных ММ и определение перечня препаратов, необходимых для исследования индивидуальной химиочувствительности опухолевых клеток в соответствии с предполагаемой схемой химиотерапии конкретного больного.

3. Проведение тестирования химиочувствительности установочной серии (20 и более) образцов опухолевых плазмоцитов больных ММ. Сопоставление результатов тестирования клеток *in vitro* с результатами клинического ответа на терапию (в данном учреждении).

4. Определение референтных значений химиочувствительности исследуемых клеток (в баллах) для всех схем химиотерапии в зависимости от того или иного типа ответа на терапию.

5. Индивидуальное тестирование химиочувствительности опухолевых плазмоцитов пациентов с ММ к каждому химиопрепарату, входящему в схемы химиотерапии в данном лечебном учреждении.

6. Прогнозирование эффективности применения той или иной схемы терапии для конкретного больного на основе определения суммарного и среднего балла химиочувствительности всей совокупности химиопрепаратов, входящих в ту либо иную схему лечения.

7. Выбор наиболее эффективной схемы химиотерапии и оптимальных доз химиопрепаратов по результатам тестирования химиочувствительности *in vitro*.