

ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

LYMPHOID TUMORS

Множественная миелома: нюансы диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни методом многоцветной проточной цитометрии

Multiple Myeloma: Nuances of Minimal Residual Disease Diagnosis and Monitoring with the Use of Multicolor Flow Cytometry

И.В. Гальцева, К.А. Никифорова, Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов, М.В. Соловьев, Е.Н. Паровичникова, Л.П. Менделеева

IV Galtseva, KA Nikiforova, YuO Davydova, NM Kapranov, MV Solov'ev, EN Parovichnikova, LP Mendeleeva

ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Новый Зыковский пр-д, д. 4, Москва, Российская Федерация, 125167

National Research Center for Hematology, 4 Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167

РЕФЕРАТ

ABSTRACT

Оценка минимальной остаточной болезни (МОБ) методом многоцветной проточной цитометрии (МПЦ) — активно развивающееся направление лабораторных исследований. В последние годы оно приобрело особую ценность для врачей-гематологов. Хотя исследование плазматических клеток у больных множественной миеломой с помощью МПЦ достаточно хорошо стандартизовано, существуют различия в методиках пробоподготовки материала для исследования, в используемых сочетаниях моноклональных антител, а также анализе цитометрических данных. В настоящей статье обобщены основные международные и отечественные данные об исследовании плазматических клеток методом МПЦ; представлен собственный опыт анализа МОБ при множественной миеломе за последние несколько лет.

The assessment of minimal residual disease (MRD) by multicolor flow cytometry (MFC) is a rapidly growing area of laboratory studies. In recent years, it has become particularly valuable for hematologists. Although the MFC analysis of plasma cells in multiple myeloma patients is sufficiently standardized, there are differences in methods of sample preparation, monoclonal antibody combinations being used as well as in cytometric data evaluation. The present paper summarizes the key international and domestic data on the MFC analysis of plasma cells and documents the authors' own experience with MFC analysis in multiple myeloma over the last few years.

Ключевые слова: минимальная остаточная болезнь, множественная миелома, многоцветная проточная цитометрия, гейтирование, иммунофенотипирование.

Keywords: minimal residual disease, multiple myeloma, multicolor flow cytometry, gating, immunophenotyping.

Получено: 24 мая 2022 г.

Received: May 24, 2022

Принято в печать: 10 августа 2022 г.

Accepted: August 10, 2022

Для переписки: Ксения Александровна Никифорова, Новый Зыковский пр-д, д. 4, Москва, Российская Федерация, 125167; тел.: +7(495)612-62-21; e-mail: nikiforovaksenya@gmail.com

For correspondence: Kseniya Aleksandrovna Nikiforova, 4 Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167; Tel.: +7(495)612-62-21; e-mail: nikiforovaksenya@gmail.com

Для цитирования: Гальцева И.В., Никифорова К.А., Давыдова Ю.О. и др. Множественная миелома: нюансы диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни методом многоцветной проточной цитометрии. Клиническая онкогематология. 2022;15(4):365–76.

For citation: Galtseva IV, Nikiforova KA, Davydova YuO, et al. Multiple Myeloma: Nuances of Minimal Residual Disease Diagnosis and Monitoring with the Use of Multicolor Flow Cytometry. Clinical oncohematology. 2022;15(4):365–76. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2022-15-4-365-376

DOI: 10.21320/2500-2139-2022-15-4-365-376

ВВЕДЕНИЕ

Множественная миелома (ММ) — это злокачественная опухоль, морфологическим субстратом которой являются плазматические клетки (ПК), продуцирующие моноклональный иммуноглобулин. Частота ММ составляет приблизительно 1 % всех случаев злокачественных новообразований и 13 % гемопоэтических опухолей [1]. Согласно данным А.Д. Каприна и соавт., в 2019 г. зарегистрировано 4698 новых случаев ММ в РФ, а «грубый» показатель заболеваемости в 2019 г. составил 3,2 случая на 100 000 населения [2]. Возрастная медиана заболеваемости ММ составила 63 года [3].

Применение новых программ лечения, включающих современные лекарственные препараты, и внедрение высокодозной химиотерапии с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) позволили увеличить медиану общей выживаемости пациентов с ММ стандартного риска до 7 лет и более [4]. Однако такие достижения, к сожалению, не исключают развития рецидивов заболевания. В связи с этим возникла необходимость в более глубокой оценке полноты ремиссии, что и было рекомендовано Международной рабочей группой по ММ (IMWG) в 2016 г. [5].

Особое место в дифференциальной диагностике плазмноклеточных опухолей и определении минимальной остаточной болезни (МОБ) при ММ занимает многоцветная проточная цитометрия (МПЦ). МОБ-статус у пациентов с ММ — значимый прогностический фактор. Это подтверждено многочисленными исследованиями независимо от метода, которым МОБ была оценена: МПЦ [6, 7] или секвенирование нового поколения [10]. Так, в 2017 г. И.В. Гальцева и соавт. показали, что вероятность развития иммунохимического рецидива была меньше у пациентов с ММ, у которых МОБ не выявлялась с помощью МПЦ как до аутоТГСК ($p = 0,016$), так и на 100-й день после аутоТГСК ($p = 0,024$) [11]. Согласно исследованию М.В. Соловьева и соавт., у больных с МОБ-отрицательным статусом, определенным с использованием МПЦ на 100-й день после аутоТГСК, 2-летняя безрецидивная выживаемость была значимо выше, чем у пациентов с МОБ-положительным статусом (52,9 vs 37,2 %; $p = 0,05$) [12]. В метаанализе, выполненном Н.С. Munshi и соавт., продемонстрировано, что достижение МОБ-отрицательного статуса связано с лучшими показателями выживаемости при лечении как впервые диагностированной ММ, так и рецидивов/рефрактерной ММ [13].

Учитывая ценность цитометрического исследования ПК при ММ, есть необходимость в стандартизации этого метода. Существует ряд подходов и протоколов по определению aberrантных ПК с помощью метода МПЦ. Международное общество по клинической цитометрии и Европейское общество по клиническому анализу клеток (The International Clinical Cytometry Society and European Society for Clinical Cell Analysis, ICCS-ESCCA) организовали группу по разработке консенсусного руководства, касающегося ключевых факторов исследования ПК методом МПЦ. В 2016 г. опубликованы рекомендации по определению

Таблица 1. Критерии диагностики симптоматической ММ

	Критерий
1	<p>Присутствие ≥ 10 % клональных ПК в КМ или наличие подтвержденной биопсией костной/экстремедуллярной плазмцитомы и ≥ 1 из обозначенных ниже симптомов, обусловленных ММ:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● гиперкальциемия: уровень кальция в сыворотке $> 11,5$ мг/дл ($> 2,75$ ммоль/л) ● дисфункция почек: уровень креатинина в сыворотке > 2 мг/дл (> 173 ммоль/л), клиренс креатинина < 40 мл/мин ● анемия: нормохромная нормоцитарная, концентрация гемоглобина на 2 г/дл (20 г/л) меньше нижней границы нормы или < 10 г/дл (< 100 г/л) ● ≥ 1 остеолитического очага, в т. ч. подтвержденного данными рентгенографии костей, спиральной КТ или ПЭТ/КТ ● количество клональных ПК > 60 % в КМ ● аномальное соотношение СЛЦ иммуноглобулинов: ≥ 100 или $\leq 0,01$ ● > 1 очага поражения КМ, выявленного при МРТ костей
2	<p>Другие симптомы: гипервязкость, амилоидоз, частые бактериальные инфекции (> 2 эпизодов в течение 12 мес.)</p>

КМ — костный мозг; ММ — множественная миелома; ПК — плазматические клетки; ПЭТ/КТ — позитронно-эмиссионная томография, совмещенная с компьютерной томографией; СЛЦ — свободные легкие цепи.

aberrантных ПК, в которых описаны сочетания моноклональных антител, требования к качеству образца, процессу пробоподготовки и необходимое количество событий, которое нужно проанализировать, чтобы достичь высокого уровня чувствительности метода МПЦ [14].

В настоящей статье представлены международные рекомендации и собственный опыт ФБГУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ по определению aberrантных ПК при ММ методом МПЦ как в дебюте заболевания, так и при выявлении МОБ.

ДИАГНОСТИКА МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ

Согласно современным международным и национальным клиническим рекомендациям, диагностика ММ требует комплексного подхода, проведения ряда клинико-лабораторных и инструментальных исследований. Критерии симптоматической формы ММ приведены в табл. 1 [3–5, 15–17].

В основе диагностики ММ лежит выявление клональных ПК в костном мозге (КМ) ≥ 10 % или экстремедуллярной плазмцитомы, подтвержденной биопсией. Кроме того, важно обнаружение одного или более признаков, определяющих ММ (см. табл. 1): CRAB-синдром либо один биомаркер злокачественности или более (клональные ПК > 60 % в КМ, аномальное соотношение свободных легких цепей иммуноглобулинов ≥ 100 или $\leq 0,01$, > 1 очага поражения КМ, выявленного при МРТ костей). В перечисленных в табл. 1 критериях указано, что обнаруженные ПК должны быть клональными. Под клональностью в этом случае понимается κ - или λ -рестрикция легких цепей иммуноглобулинов, обнаруженная методами иммуногистохимического (ИГХ) исследования ПК в трепанобиоптате или проточной цитометрии клеток КМ. Если не удастся получить трепанобиоптат хорошего качества, когда результаты гистологического и ИГХ-исследований сложно трактовать, необходимо

Таблица 2. Частота обнаружения антигенов на нормальных и aberrантных ПК (цит. по [23])

Антиген	Экспрессия антигенов на нормальных ПК	Частота экспрессии антигена на нормальных ПК	Экспрессия антигена на миеломных клетках	Частота aberrантной экспрессии антигена на миеломных клетках
CD38	Положительная (высокая)	100 %	Слабее, чем на нормальных ПК	80 %
CD19	Положительная	> 70 %	Отсутствует	96 %
CD56	Отсутствует	< 15 %	Положительная	60–75 %
CD45	Гетерогенная	94 %	Отрицательная	80 %
CD20	Отсутствует	0 %	Слабоположительная	17–30 %
CD27	Строго положительная	100 %	Слабая или отсутствует	40–50 %
CD117	Отсутствует	0 %	Положительная	30–32 %
CD81	Положительная	100 %	Слабая или отсутствует	55 %
CD33	Отсутствует	0 %	Положительная	18 %
CD200	Слабоположительная	49 %	Высокая	≥ 70 %
CD54	Положительная	100 %	Слабая	60–80 %
CD28	Отсутствует или слабая	< 15 %	Положительная	15–45 %
CD307	Отсутствует	0 %	Высокая	Нет данных

ПК — плазматические клетки.

дополнительно провести исследование ПК методом МПЦ [18, 19]. Кроме того, результаты цитометрического анализа ПК имеют прогностическое значение. Так, в работах E. Perez-Persona и соавт. показано, что если доля опухолевых ПК от всех ПК > 95 %, то вероятность прогрессирования в симптоматическую ММ в течение 5 лет больше у пациентов как с моноклональной гаммапатией неясного значения (25 vs 5 %; $p < 0,001$), так и с тлеющей ММ (64 vs 8 %; $p < 0,001$) [20].

Таким образом, МПЦ является важным вспомогательным диагностическим методом при ММ и способствует подтверждению диагноза в сложных случаях, нуждающихся в дифференциальной диагностике.

ИММУНОФЕНОТИП НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Нормальные ПК являются терминальной стадией созревания В-клеток. По мере дифференцировки В-клеток в ПК происходит изменение экспрессии антигенов на поверхности клетки. Так, начинает появляться экспрессия CD138 (синдекана-1) — основного маркера ПК и увеличиваться экспрессия CD38. CD38 принимает участие в метаболизме никотинамиддинуклеотида, а также является регулятором внутриклеточного содержания кальция [21]. Этот антиген экспрессируется на многих клетках: В-клеточных и миелоидных предшественниках, активированных Т-клетках; однако наибольшая плотность экспрессии характерна именно для ПК. Кроме того, по мере созревания В-клеток в ПК происходит потеря В-клеточных маркеров CD20, CD22, а реактивные ПК могут утрачивать экспрессию В-клеточного маркера CD19 [22].

ММ — заболевание, характеризующееся неопластической пролиферацией одного клона ПК. Миеломные клетки — это опухолевый аналог ПК, поэтому для них также характерна экспрессия CD138 и высокая экспрессия CD38. Однако вследствие генетических

поломок, происходящих в миеломных клетках, на их поверхности начинают появляться белки, которые на нормальных ПК отсутствуют, и наоборот, отсутствуют антигены, которые должны быть на нормальных ПК. Такое сочетание аномальной экспрессии белков на миеломных клетках называют aberrантным иммунофенотипом. Другим отличием миеломных клеток от нормальных ПК является их клональность. Нормальные ПК поликлональны и характеризуются тем, что каждый клон синтезирует определенный тип иммуноглобулина с уникальной антигенспецифичной областью.

Как известно, иммуноглобулины состоят из тяжелых и легких цепей, причем выделяют два типа легких цепей: κ и λ . Поскольку в процессе созревания В-клетки выбор легкой цепи происходит случайным образом, то и соотношение ПК с легкой κ -цепью и с легкой λ -цепью составит примерно 1:1. По данным G.E. Marti и соавт., это соотношение κ/λ может в норме варьировать от 1:3 до 3:1 [22]. Миеломные клетки являются потомками одной единственной опухолевой клетки, поэтому в их популяции можно обнаружить только κ - или только λ -легкие цепи, что служит доказательством клональности миеломных клеток. В крайне редких случаях опухолевая популяция может быть представлена двумя дискретными клонами: одна с легкой κ -цепью и одна с легкой λ -цепью. В таких ситуациях соотношение κ/λ может быть нормальным. Однако анализ иммунофенотипа отдельных популяций ПК покажет, что они действительно являются двумя отдельными клонами миеломных клеток.

Таким образом, в основе диагностики ММ и выявления МОБ при ММ методом проточной цитометрии лежит обнаружение ПК с aberrантным иммунофенотипом и определение их клональности по легким цепям иммуноглобулинов.

Aberrантная экспрессия основных антигенов, которые анализируются в процессе диагностики и мониторинга МОБ при ММ, представлена в табл. 2. Очевидно, что список основных антигенов, которые следует подвергнуть анализу, чтобы подтвердить опу-

холевую природу ПК, достаточно большой. Это связано, во-первых, с тем, что aberrантный иммунофенотип миеломных клеток у разных пациентов отличается. Во-вторых, нормальные ПК гетерогенны, т. е. часть из них экспрессирует какой-то антиген, а часть — нет. Например, самой частой aberrацией, которую можно обнаружить, является отсутствие экспрессии антигена CD19 на миеломных клетках. Однако у 4 % пациентов миеломные клетки экспрессируют CD19. С другой стороны, до 30 % нормальных ПК могут не экспрессировать CD19 (см. табл. 2). Таким образом, необходим комплексный анализ иммунофенотипа ПК. Наличие изменений лишь в одном антигене недостаточно для заключения об опухолевой природе клетки.

Таким образом, иммунофенотип общей популяции нормальных ПК описывается как CD138⁺CD38^{high}CD19⁺CD56⁻CD45^{+/−}CD20⁻CD27⁺CD117⁻CD81⁺CD33⁻CD200^{dim}CD54⁺CD28⁻CD307⁻, поликлональные по внутриклеточным легким цепям иммуноглобулинов κ и λ. Тем не менее следует учитывать, что некоторые антигены экспрессируются на нормальных ПК по-разному. Так, преобладающая часть нормальных ПК не экспрессирует CD56, однако на небольшой части ПК (≤ 15 %) CD56 все же может обнаруживаться [24, 25]. Кроме того, могут присутствовать нормальные ПК (обычно < 30 % от общего их числа), у которых ряд маркеров утрачивается (CD45, CD19, CD27) или приобретает (CD20, CD28, CD200) [26], что отличает иммунофенотип таких ПК от классического нормального. Встречаются случаи, когда на нормальных ПК можно обнаружить даже два и три маркера, которые экспрессируются на миеломных клетках. Например, примерно 10 % нормальных ПК могут иметь иммунофенотип CD19⁻CD56⁺ [27]. Для того чтобы утверждать, что найденная популяция ПК aberrантная, необходимо сочетание aberrантной экспрессии 2 и более антигенов (за исключением CD19 и CD45), а в спорных случаях — подтверждение клональности ПК по соотношению κ/λ [23].

ТЕХНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И МОНИТОРИНГА МОБ У БОЛЬНЫХ ММ МЕТОДОМ МНОГОЦВЕТНОЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Согласно рекомендациям IMWG 2016 г. [5], в критерии ответа на терапию ММ введено понятие МОБ-отрицательной ремиссии.

МОБ означает присутствие остаточных опухолевых клеток в КМ в период полной ремиссии после проведенной противоопухолевой терапии, которые можно выявить только с помощью высокочувствительных методов. Определение МОБ у пациентов с ММ методом МПЦ основывается на знаниях иммунофенотипа нормальных и aberrантных ПК.

Отправной точкой для оценки МОБ может служить иммунофенотип миеломных клеток, определенный в дебюте заболевания. Однако следует учитывать, что в дебюте заболевания клон ПК может демонстрировать иммунофенотипическую гетерогенность. В ходе лечения некоторые субклоны исчезают, другие же начинают доминировать, что может выражаться в феномене смены иммунофенотипа за счет селекции

опухолевого клона. Следовательно, опираться только на первичный иммунофенотип опухолевой популяции ПК при выявлении МОБ недостаточно.

Условия, время транспортировки и хранения материала

Основным материалом для дифференциальной диагностики и мониторинга МОБ при ММ методом МПЦ является аспират КМ. Для исследования требуется первая порция аспириата КМ объемом 0,5–1,0 мл, т. к. в этом случае доля ПК будет выше из-за отсутствия разведения образца периферической кровью [28]. Именно первая порция аспириата КМ особенно важна для определения МОБ, поскольку значительное разведение кровью может привести к ложноотрицательному результату, если количество как всех ПК, так и aberrантных небольшое [29]. Проводить исследование МОБ рекомендуется в полной ремиссии заболевания и при восстановлении показателей периферической крови после противоопухолевого лечения. После выполнения аутоТГСК целесообразна оценка МОБ на 100-й день после трансплантации [12].

Более предпочтительно использовать в качестве антикоагулянта ЭДТА, поскольку гепарин приводит к снижению экспрессии CD138 на ПК. Не рекомендуется хранение аспириата КМ в холодильнике, т. к. происходит «слищивание» CD138 с поверхности ПК. Допускается хранение биообразцов при комнатной температуре до 24 ч [30].

Оценка качества образца

Для проведения исследования методом МПЦ обращают внимание на количество жизнеспособных клеток. С этой целью возможно предварительное окрашивание образца 7-аминоактиномицином D (7-AAD) в случае длительной транспортировки и/или длительного хранения материала. При наличии менее 85 % жизнеспособных клеток материал признается непригодным для цитометрического исследования [30]. Степень разведения КМ периферической кровью также служит важным критерием качества образца. В процессе анализа определяют количество нормальных ПК, миелобластов (CD117⁺), тучных клеток (CD117^{high}), В-клеточных предшественников (CD19⁺CD45^{dim}), эритрокариоцитов (CD45⁻). Отсутствие или присутствие лишь единичных клеток, формирующих перечисленные выше популяции, свидетельствует о значительном разведении образца КМ периферической кровью. Такие образцы признаются непригодными для анализа МОБ при ММ [31].

Пробоподготовка

Оптимальной методикой пробоподготовки, позволяющей добиться наибольшей чувствительности анализа, является предварительный лизис эритроцитов с последующими отмывкой и концентрированием ядросодержащих клеток КМ. Лизис эритроцитов осуществляется с помощью лизирующего раствора аммония хлорида без фиксирующих составляющих согласно инструкции производителя. Затем клетки необходимо осадить центрифугированием и отмыть в фосфатном буфере.

Оптимальным объемом для окрашивания является 50–100 мкл полученной суспензии клеток. Рекомендуется оценивать количество клеток в образце до добавления антител и окрашивать лишь необходимое число ядродержащих клеток. Это позволяет снизить расход антител и добиться внутрилабораторной стандартизации анализа. Кроме того, настоятельно рекомендуется использовать фильтры до и/или после лизиса эритроцитов для исключения микросгустков из анализируемых образцов.

Далее будет описан протокол пробоподготовки образцов для анализа МОБ при ММ, который применяется в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ. В его основе лежит протокол, предложенный А.С. Rawstron [32]. Сначала выполняют лизис эритроцитов. Для этого в полипропиленовую или поливинилхлоридную пробирку объемом 15 мл переносят 1 мл КМ и добавляют 9 мл лизирующего раствора в рабочей концентрации, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. Для постоянного равномерного взаимодействия клеток с лизирующим раствором можно оставить образец на шейкере. После лизиса образец центрифугируют со скоростью 400 g в течение 3,5 мин, надосадочную жидкость сливают, а осадок ресуспендируют в 2 мл раствора фосфатного буфера. Этот этап центрифугирования и отмывки повторяют еще раз. Далее полученный осадок ресуспендируют в 300 мкл фосфатного буфера и пропускают через фильтр с размером пор 70 мкм, после чего определяют клеточность полученной суспензии с помощью гематологического анализатора. Для анализа МОБ отбирают 3–5 млн клеток, если это возможно, а на этапе первичной диагностики ММ достаточно отобрать 500–700 тыс. клеток. Затем к суспензии клеток добавляют моноклональные антитела и проводят инкубацию в темноте при комнатной температуре в течение 15–20 мин. Этот процесс называют поверхностным окрашиванием клеток моноклональными антителами. После этого образец отмывают от несвязавшихся антител путем добавления фосфатного буфера и центрифугирования. Чтобы оценить количество жизнеспособных клеток, добавляют раствор 7-AAD и проводят инкубацию в течение 5 мин в темноте. Далее к образцу добавляют 300 мкл раствора фосфатного буфера и проводят анализ на проточном цитометре.

На этапе дифференциальной диагностики ММ и в спорных случаях при анализе МОБ необходимо оценить соотношение легких цепей иммуноглобулинов к/λ. Поскольку иммуноглобулины расположены внутри ПК, необходимо выполнить пермеабиллизацию для внутриклеточного окрашивания образца. Процесс пробоподготовки будет аналогичным описанному выше, но после этапа поверхностного окрашивания добавляют специальные реагенты, формирующие поры в цитоплазматической мембране клеток. Затем в пробирку вносят антитела против легких цепей κ и λ, которые проникают внутрь клеток через образованные поры и окрашивают белки, находящиеся в цитоплазме. Поскольку естественные киллеры, активированные Т-клетки и моноциты могут неспецифически связывать легкие цепи иммуноглобулинов, желателно перед внутриклеточным окрашиванием отмыть образец минимум 2 раза [33].

Общие рекомендации к подбору панели антител

Формирование панели моноклональных антител основывается на задачах, которые возникают в исследовании. Так, для определения МОБ при ММ можно выделить две задачи: 1) выделение общей популяции ПК образца; 2) дифференциация обнаруженных ПК на опухолевые и нормальные. Для решения первой задачи — идентификации ПК — в панели должны обязательно присутствовать антитела против CD138, CD38 и CD45, которые добавляют во все пробирки. В связи с тем, что все чаще при лечении пациентов с ММ применяют препараты на основе моноклональных антител против CD38 (даратумумаб), появляется необходимость во включении в панель дополнительных антител, позволяющих идентифицировать ПК, например антитело против CD319 (SLAMF7). Так же как и CD38, CD319 не является строго специфичным для ПК. Этот антиген экспрессируется на многих клетках КМ, но наибольшая плотность его экспрессии характерна для ПК.

Для анализа иммунофенотипа с целью отнести ПК к нормальным или опухолевым панель антител обязательно должна содержать антитела против CD19 и CD56. Другие маркеры, которые используются для оценки аберрантности иммунофенотипа ПК, — это CD27, CD28, CD117, CD20, CD81, CD200, CD33, CD54, CD307.

При подборе панели антител необходимо учитывать особенности экспрессии антигенов на нормальных клетках. Существует правило: для анализа слабо экспрессирующегося антигена или если антиген экспрессируется на небольшой по размеру популяции клеток, необходимо использовать конъюгат антитела с ярким флюорохромом, и наоборот. В связи с этим для оценки экспрессии CD138 необходимо использовать конъюгат антитела с наиболее ярким флюорохромом, например PE, PE-Cy7, APC, BV421, BV650 и др. Для антигенов CD38 и CD45 достаточно не слишком яркого флюорохрома, например FITC, PerCP, PerCP-Cy5.5, APC-Cy7. Выбор остальных антител (их количества и сочетания конъюгатов с флюорохромами) зависит от особенностей используемого цитофлюориметра.

После сбора многоцветной панели моноклональных антител необходимо провести с выбранными антителами ФМО-контроль («флуоресценция-минус-один»), при котором ставится серия экспериментов, заключающаяся в окрашивании клеток КМ антителами после исключения одного антитела из панели. Это делается для того, чтобы оценить, насколько сильно «засвечивает» исключенное антитело и формируется ли так называемый спред. «Спред» — это явление, возникающее при компенсации эмиссии флюорохрома (математической коррекции перекрытия спектров флуоресценции разных флюорохромов за счет поступления на другие, неспецифичные для них детекторы). Оно выражается в фиксировании слабого сигнала от эмиссии флюорохрома не на том детекторе, на котором фиксируется максимум пика спектра излучения. Вследствие этого имеет место визуальная деформация отрицательного пика и смещение границы отрицательной популяции на больших уровнях флуоресценции одного из двух компенсируемых флюорохромов. Формирование «спреда» приводит к сложностям разграничения популяции со

Таблица 3. Панель моноклональных антител при дифференциальной диагностике ММ и мониторинге МОБ, используемая в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ

	Флюорохром	FITC	PE	PE-Dazzle594	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-R700	APC-Fire750	BV421	BV605	BV650
Пробирка 1	Антиген	CD38	CD19	CD319	7-AAD	CD56	CD117	CD27	CD45	CD138	CD81	CD20
	Клон антитела	HIT2	SJ25C1	162.1	—	NCAM16.2	104D2	M-T271	H130	M115	JS-81	2H7
Пробирка 2	Антиген	λ	κ	—	CD38	CD56	CD19	CD27	CD45	CD138	—	—
	Клон антитела	Поликло- нальные кроличьи		—	HIT2	NCAM16.2	SJ25C1	M-T271	H130	M115	—	—

7-AAD — 7-аминоактиномицин D; APC — аллофикоцианин; APC-Fire750 — аллофикоцианин Fire750; APC-R700 — аллофикоцианин R700; BV — бриллиантовый фиолетовый; FITC — флюоресцеина изотиоцианат; PE — фикоэритрин; PE-Cy7 — фикоэритрин-цианин 7; PE-Dazzle594 — фикоэритрин Dazzle594; PerCP-Cy5.5 — перидинин-хлорофилл протеин-цианин 5.5; ММ — множественная миелома; МОБ — минимальная остаточная болезнь.

слабой экспрессией и отсутствием изучаемого антигена. Кроме того, рекомендуется провести титрование антител и вычислить оптимальную их концентрацию на фиксированное количество клеток. Это позволит избежать неспецифического связывания антител и оптимальной постоянной степени окрашивания.

Последние рекомендации (2016–2017 гг.) Европейского консорциума EuroFlow для определения МОБ при ММ предлагают использовать двухпробирочную 8-цветную панель, позволяющую проанализировать 10 различных антигенов. С помощью этой панели можно оценить экспрессию 8 поверхностных антигенов в первой пробирке и сочетание 6 поверхностных антигенов и внутриклеточных легких цепей иммуноглобулинов во второй пробирке [23, 34]. При отсутствии технических возможностей для постановки такого многоцветного анализа допускается применение метода с меньшим числом (5–6) моноклональных антител в одной пробирке, однако для полноценного выделения aberrантных клеток и описания их иммунофенотипа потребуется использование большего числа пробирок.

В ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ для дифференциальной диагностики ММ и мониторинга МОБ используется панель моноклональных антител, позволяющая определять экспрессию 10 поверхностных маркеров: CD138, CD38, CD319, CD19, CD45, CD20, CD27, CD117, CD56, CD81. В затруднительных случаях, когда анализ поверхностных маркеров не дает четкого понимания, являются ли ПК aberrантными, определяют соотношение κ/λ в исследуемой субпопуляции ПК. В таком случае пробирка будет включать антитела против мембранных антигенов CD19, CD38, CD56, CD27, CD45, CD138 и моноклональные антитела к легким цепям κ и λ, которыми образец окрашивается внутриклеточно. Панель моноклональных антител представлена в табл. 3.

Стратегия гейтирования

Оценка МОБ при ММ заключается в поиске популяции ПК, экспрессирующих aberrантное сочетание антигенов, не встречающееся на нормальных ПК.

Первой задачей гейтирования является выделение общей популяции ПК. Для этого выполняются следующие этапы (рис. 1, диаграммы 1–8).

1. Исключить из анализа агрегаты клеток (гейт «единичные события») на графике прямого светорассеяния по площади пика FSC-A

(forward scatter) против прямого светорассеяния по высоте или ширине (FSC-H/FSC-W).

2. Для контроля качества сбора данных рекомендуется также установить гейт на диаграмме бокового светорассеяния (side scatter, SSC) против параметра «время» (гейт «время»). Здесь показан равномерный сбор данных.
3. Исключить нежизнеспособные клетки по степени окрашивания ДНК-красителем 7-AAD (гейт «ядросодержащие события»).
4. Исключить погибшие клетки, осколки разрушенных клеток и нелизированные эритроциты на диаграмме линейных шкал SSC-A и FSC-A (гейт «клетки»).
5. На диаграмме «CD138 против CD38» выделить все события CD138⁺CD38⁺, захватывая также события с более низкой экспрессией CD138 и CD38; гейт «ПК (грубое выделение)».

Использование тактики выделения ПК на графике «CD38 против SSC-A» может привести к ложноотрицательному результату в случае, когда экспрессия CD38 на миеломных клетках низкая. Совместное применение CD38, CD138, CD45 и показателя SSC-A обеспечивает оптимальную точность и схожесть результата независимо от исполнителя анализа. Важно, чтобы первый гейт для выделения ПК устанавливался на графике «CD38 против CD138», а не «CD38 против CD45», чтобы ПК с низкой или отсутствующей экспрессией CD45 не были случайно исключены [27].

1. На диаграмме линейных шкал SSC-A и FSC-A выбрать клетки, соответствующие по размерам ПК, моноцитам и лимфоцитам; гейт «ПК (обратное гейтирование)».
2. На диаграмме «CD38 против CD319» выбрать клетки, высоко экспрессирующие CD319 (гейт «все ПК»);
3. На диаграмме «CD45 против CD38» выбрать клетки с высокой экспрессией CD38 и умеренной или низкой экспрессией CD45 (гейт «настоящие ПК»). CD45 не должен использоваться как маркер для исключения клеток, т. к. и нормальные, и опухолевые ПК характеризуются вариабельной экспрессией CD45 [34].

После четкого выделения всех ПК образца второй задачей анализа является разделение нормальных и опухолевых ПК по экспрессии рекомендуемых антигенов (рис. 1, диаграммы 8–11). Нормальные ПК вы-

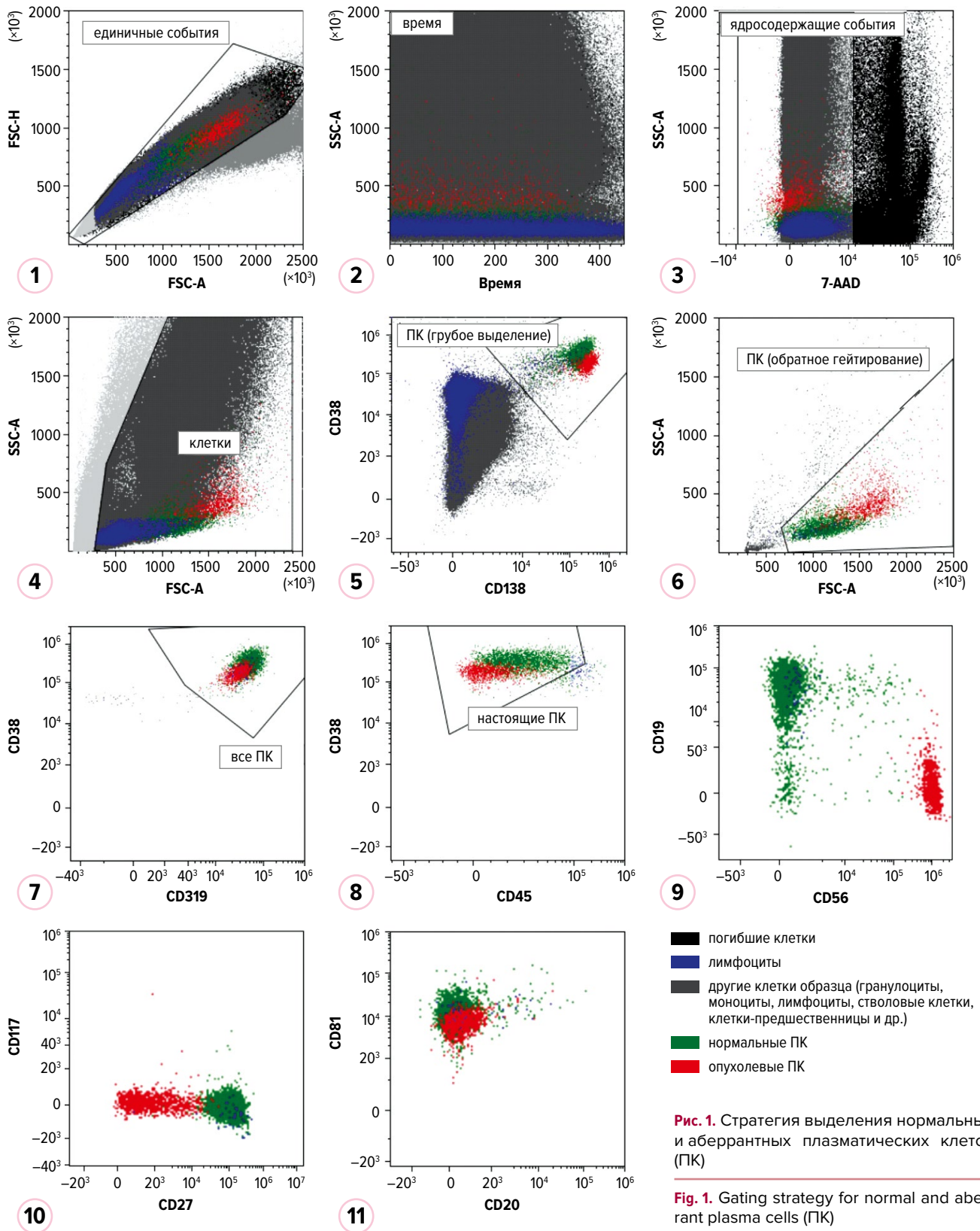


Рис. 1. Стратегия выделения нормальных и aberrantных плазматических клеток (ПК)

Fig. 1. Gating strategy for normal and aberrant plasma cells (ПК)

делены зеленым цветом, aberrantные — красным. На представленных диаграммах видно, что миеломные клетки в отличие от нормальных ПК характеризуются отсутствием экспрессии CD45, CD19, CD27 и наличием антигена CD56. Кроме того, в этом случае миеломные клетки экспрессируют CD38, но плотность их экспрессии ниже, чем на нормальных ПК (рис. 1, диаграмма 5). Кроме того, даже на графике «FSC-A против SSC-A» видно, что миеломные клетки лежат выше и

правее, чем нормальные ПК (рис. 1, диаграммы 1–6). Это говорит о том, что миеломные клетки больше по размеру и более гранулярные, чем нормальные ПК.

В популяции опухолевых ПК с большей частотой, чем на нормальных ПК, отмечается отсутствие экспрессии CD19 и CD45 и гомогенная положительная экспрессия CD56. Иными словами, интенсивность флуоресценции по указанным маркерам на всех клетках aberrantной популяции будет примерно

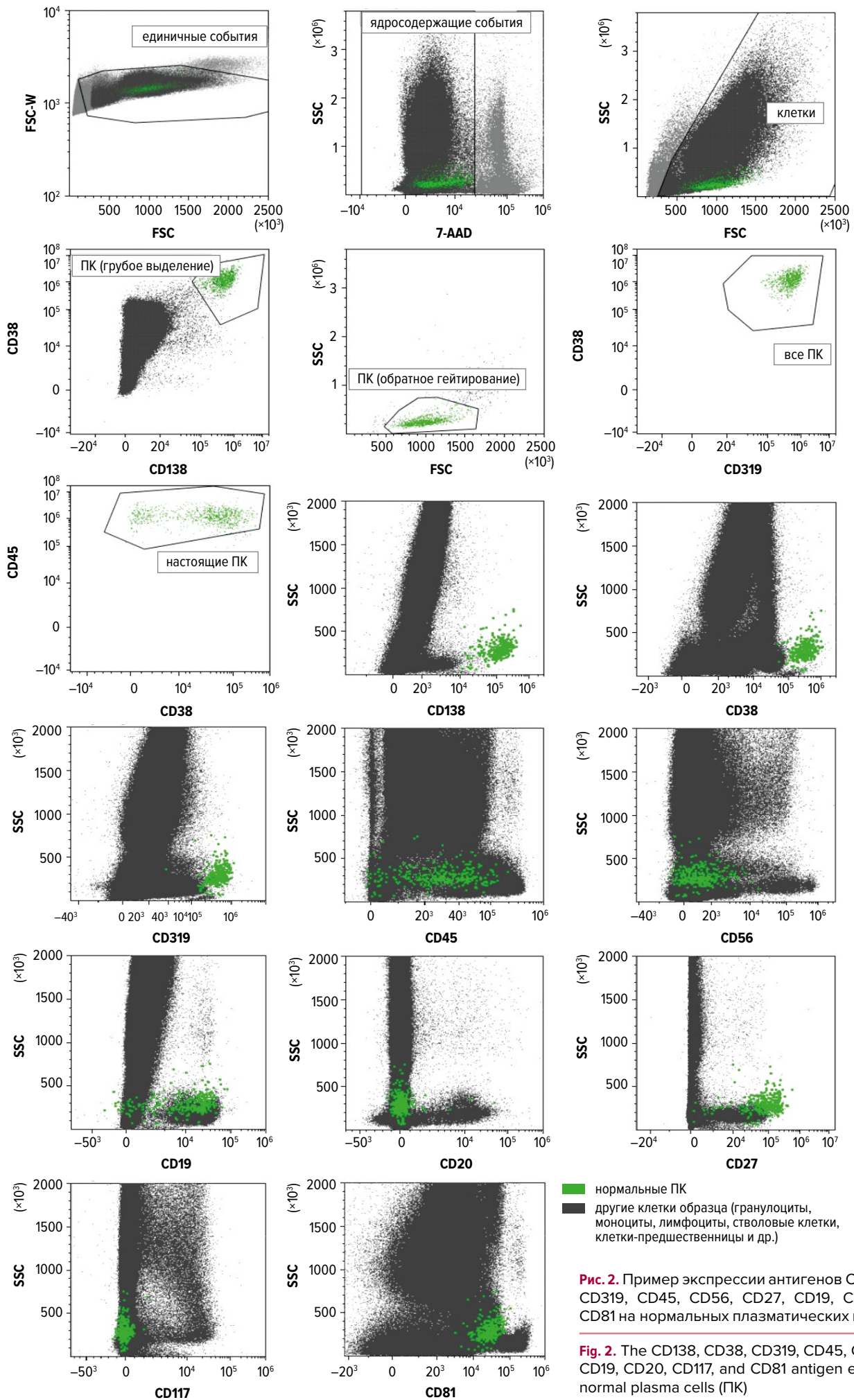


Рис. 2. Пример экспрессии антигенов CD138, CD38, CD319, CD45, CD56, CD27, CD19, CD20, CD117, CD81 на нормальных плазматических клетках (ПК)

Fig. 2. The CD138, CD38, CD319, CD45, CD56, CD27, CD19, CD20, CD117, and CD81 antigen expression in normal plasma cells (ПК)

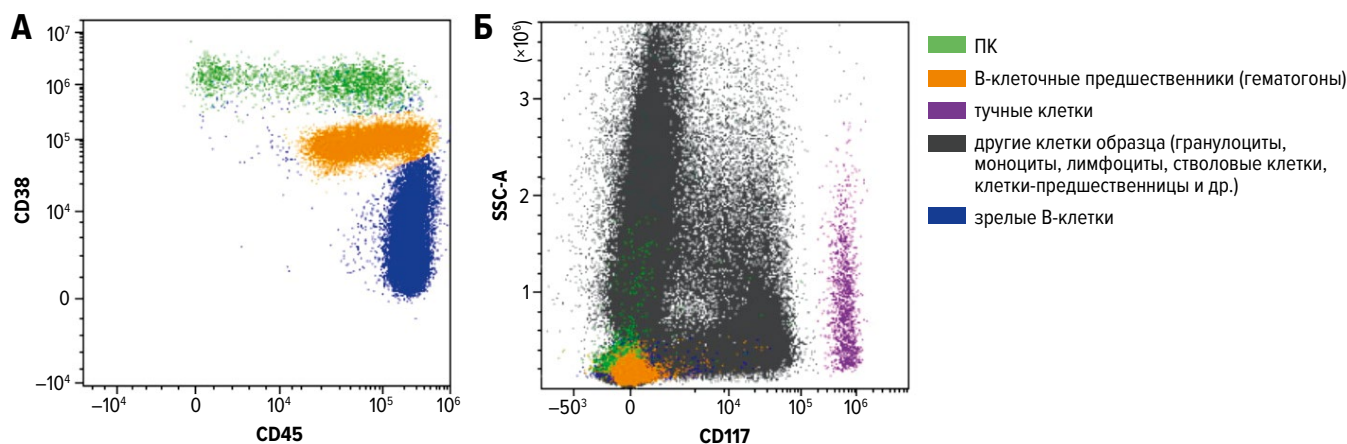


Рис. 3. Пример определения В-клеточных предшественников и тучных клеток для оценки качества образца:

А — выделение В-клеточных предшественников, показаны только CD19-позитивные события; Б — выделение тучных клеток, показаны все клетки образца

ПК — плазматические клетки.

Fig. 3. Detection of B-cell progenitors and mast cells for evaluating the sample quality:

А — B-cell progenitor gating, only CD19-positive events are shown; Б — mast cell gating, all the sample cells are shown

ПК — plasma cells.

одинаковой, а клетки будут располагаться на точечных графиках компактным кластером. Для опухолевых ПК характерна экспрессия CD56, CD117, сниженная экспрессия CD38 и высокие показатели по FSC и/или SSC.

На рис. 2 показан пример нормальных ПК, где экспрессия антигенов CD19, CD56, CD27, CD117, CD81, CD20, CD138, CD38, CD319, CD45 представлена на графиках против бокового светорассеяния.

Экспрессия антигенов на aberrantных ПК оценивается относительно экспрессии тех же антигенов на нормальных ПК. Руководство The Bethesda International Consensus Recommendations 2006 г. советует для описания экспрессии антигенов использовать такие термины, как «сниженная», «нормальная» и «повышенная» по сравнению с нормальной референсной популяцией клеток [35]. Кроме того, могут применяться обозначения сниженной (dim) или повышенной (high) экспрессии антигенов.

В ходе цитометрического анализа можно выделять дополнительные популяции клеток, которые помогают оценить качество образца. Сочетание антигенов CD27-CD117⁺ определяет количество тучных клеток, а при отсутствии этой популяции можно предположить плохое качество образца. Нормальные предшественники В-клеток (гематопоны) тоже характеризуют качество образца КМ и определяются по экспрессии антигенов CD45, CD19, CD81 и CD56 [34]. Гематопоны можно определять и на графике «CD45 против CD38»: клетки CD19⁺ с невысокой экспрессией CD45 и относительно высокой экспрессией CD38 являются В-клеточными предшественниками. При содержании в образце В-клеточных предшественников менее 0,33 % от всей популяции ядросодержащих клеток в суспензии КМ качество образца оценивают как неудовлетворительное (образец чрезмерно разведен периферической кровью) [31]. Присутствие перечисленных выше популяций помогает получить косвенную информацию о наличии или отсутствии гемодилузии образца (рис. 3).

Количественный подсчет МОБ, определение чувствительности, формирование заключения

В результате цитометрического анализа данных у пациентов с ММ делается заключение о наличии/отсутствии МОБ.

За популяцию опухолевых ПК с aberrantным иммунофенотипом принимается гомогенная группа клеток, т. е. эти клетки должны иметь сходную экспрессию большинства изучаемых антигенов, а также одинаковые показатели прямого и бокового светорассеяния. В таком случае группу обнаруженных миеломных клеток называют кластером. В ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ заключение о наличии МОБ делается только в том случае, если обнаруженный кластер опухолевых ПК состоит из 20 клеток и более. Размер популяции, принимаемой за минимальную, выбирается внутривлабораторно и зависит от возможностей проточных цитометров, а также опыта сотрудников, выполняющих анализ [26].

Когда кластер миеломных клеток обнаружен и включает более 20 клеток, подсчитывают процент этой популяции от всех определенных ПК и от всех клеток образца. В заключении указывается, что МОБ выявлена, и представляется иммунофенотип популяции миеломных клеток (рис. 4). При наличии признаков значительного разведения образца периферической кровью (отсутствие или низкое число В-клеточных предшественников, тучных клеток и эритроидных предшественников) рекомендуется повторная пункция КМ.

Для того чтобы сделать заключение об отсутствии МОБ, следует оценить следующие параметры:

- 1) адекватное качество образца, отсутствие стустков. При наличии признаков значительного разведения образца периферической кровью рекомендуется повторная пункция КМ;
- 2) < 20 ПК с aberrantным иммунофенотипом из 2×10^6 событий, формирующих кластер;

ФИО: _____

Год рождения: _____

Дата проведения анализа: _____

Материал: костный мозг

Были исследованы маркеры:

Поверхностные	CD138, CD38, CD319, CD19, CD27, CD45, CD56, CD117, CD200, CD81
Внутриклеточные	Легкие цепи иммуноглобулинов к и λ

Количество просчитанных событий: 1 987 550.

Количество обнаруженных плазматических клеток 5221, что составляет 0,26 % от всех событий.

Популяция аномальных клеток	% клеток с aberrantным фенотипом от плазматических клеток	% клеток с aberrantным фенотипом от всех клеток
CD138 ⁺ CD38 ^{dim} CD319 ⁺ CD19 ⁻ CD27 ⁻ CD45 ⁻ CD56 ^{high} CD117 ⁻ CD200 ⁻ CD81 ⁻ 163 клетки	3,1	0,008

Заключение: МОБ выявляется в количестве 0,008 %.

Рис. 4. Пример заключения при наличии минимальной остаточной болезни (МОБ)

Fig. 4. An example of medical judgement in case with minimal residual disease (МОБ)

- 3) при отсутствии кластера миеломных клеток обязательно указывается достигнутый порог определения, или чувствительности, исследования. Порог определения (чувствительность) — минимальное количество опухолевых клеток, которое можно обнаружить в выполненном исследовании; рассчитывается по следующей формуле:

$$\text{Чувствительность} = \frac{20 \text{ клеток (минимальная популяция)}}{\text{Количество собранных событий (клеток)}} \times 100 \%$$

МОБ-негативность не означает, что опухолевых клеток нет вообще и достигнуто полное их отсутствие у больного. МОБ-негативность означает, что в образце не найдено опухолевых клеток при указанной чувствительности метода и что опухолевые клетки могут персистировать, но в меньшем, чем чувствительность метода, количестве. Пример заключения в случае отсутствия МОБ представлен на рис. 5.

Согласно международным рекомендациям [14, 26], необходимым порогом чувствительности анализа МПЦ является 0,01–0,0001 % (10^{-4} – 10^{-6}). Для достижения требуемой чувствительности необходимо проанализировать не менее 2–5 млн событий (клеток). По результатам исследования ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ, опубликованным в 2017 г., у большинства пациентов доля опухолевых ПК варьировала от 0,001 до 0,008 % [36]. Таким образом, чувствительность 0,01 % и ниже может быть недостаточной, поэтому целесообразно достигать значений чувствительности на уровне 0,001 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дифференциальная диагностика сложных случаев плазмноклеточных опухолей требует комплексного подхода, и МПЦ является одним из важных дополнительных методов исследования. Однако для мониторинга МОБ при ММ метод МПЦ считается одним из основных лабораторных методов, позволяющих выявлять минимальное количество (10^{-4} – 10^{-6}) миеломных клеток в КМ пациента.

В связи с принятием в 2016 г. критериев глубокого ответа на терапию ММ, в числе которых МОБ-отрицательная ремиссия [5], метод МПЦ становится необходимым и востребованным исследованием в ходе программной терапии ММ. К достоинствам исследования МОБ методом МПЦ относятся:

- одновременная идентификация всех ПК и иммунофенотипическая характеристика миеломных клеток;
- анализ большого количества клеток в образце, что позволяет достичь высокой чувствительности;
- возможность получения быстрого количественного результата исследования [35, 36];
- комбинированное определение поверхностных и внутриклеточных маркеров;
- применимость метода в большинстве случаев ММ.

Кроме того, с помощью МПЦ можно оценить качество материала и выявить примесь периферической крови в аспирате КМ, что позволяет избежать получения ложноотрицательных результатов [31].

Для правильной оценки МОБ при ММ имеет значение множество факторов, а именно правильная

ФИО: _____
 Год рождения: _____
 Дата проведения анализа: _____
 Материал: костный мозг
 Были исследованы маркеры:

Поверхностные	CD138, CD38, CD319, CD19, CD27, CD45, CD56, CD117, CD200, CD81
Внутриклеточные	Легкие цепи иммуноглобулинов к и λ

Количество просчитанных событий: 2 000 000.

Количество обнаруженных плазматических клеток 3220, что составляет 0,16 % от всех событий.

Популяция аномальных клеток	% клеток с aberrantным фенотипом от плазматических клеток	% клеток с aberrantным фенотипом от всех клеток
Не выявляется*	—	—

* При уровне чувствительности 0,001 %.

Заключение: МОБ не выявлена.

Рис. 5. Пример заключения при отсутствии минимальной остаточной болезни (МОБ)

Fig. 5. An example of medical judgement in case without minimal residual disease (МОБ)

стратегия гейтирования, хорошее знание иммунофенотипа нормальных и aberrantных ПК, корректная пробоподготовка. Нельзя забывать, что в процессе противоопухолевой терапии может наблюдаться селекция клонов опухолевых ПК с разным иммунофенотипом, поэтому необходимо применять широкую панель рекомендуемых моноклональных антител. Грамотная работа на каждом из этапов служит гарантией достоверных результатов и, как следствие, более точной оценки ремиссии и прогноза заболевания.

Подводя итог, следует отметить, что обнаружение опухолевых ПК методом МПЦ более стандартизовано по сравнению с определением МОБ при острых лейкозах. Однако это достаточно сложный анализ, требующий точности, четкости и опыта.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: И.В. Гальцева, Л.П. Менделеева.
Сбор и обработка данных: К.А. Никифорова, Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов.

Предоставление материалов исследования: К.А. Никифорова, Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов.

Анализ и интерпретация данных: все авторы.

Подготовка рукописи: К.А. Никифорова, И.В. Гальцева.

Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014;15(12):e538–e548. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5.
- Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. и др. Злокачественные новообразования в России в 2019 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2020.
- [Kaprin AD, Starinskii VV, Shakhzadova AO, et al. Zlokachestvennyye novoo-brazovaniya v Rossii v 2019 godu (zabolevaemost' i smertnost'). (Malignant neoplasms in Russia in 2019 (incidence and mortality). Moscow: MNI OI im. P.A. Gertsena — filial FGBU "NMITs radiologii" Publ.; 2020. (In Russ)]
- Соловьев М.В., Менделеева Л.П., Алексеева А.Н. и др. Эффективность терапии множественной миеломы в России (результаты многоцентрового проспективного исследования). *Гематология и трансфузиология.* 2020;65(1):103–4.
- [Solov'ev MV, Mendeleeva LP, Alekseeva AN, et al. The efficacy of multiple myeloma therapy in Russia (results of a multi-center prospective study). *Gematologiya i transfuziologiya.* 2020;65(1):103–4. (In Russ)]
- Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2016;91(7):719–34. doi: 10.1002/ajh.24402.
- 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.
- Paiva B, Vidrales M-B, 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;114(20):4369–72. doi: 10.1182/blood-2009-05-221689.
- Rawstron AC, Child JA, de Tute RM, et al. Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *J Clin Oncol.* 2013;31(20):2540–7. doi: 10.1200/JCO.2012.46.2119.
- 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):3073–9. doi: 10.1182/blood-2014-01-550020.
- Korde N, Mailankody S, Roschewski M, et al. Minimal Residual Disease (MRD) Testing in Newly Diagnosed Multiple Myeloma (MM) Patients: A Prospective Head-to-Head Assessment of Cell-Based, Molecular, and Molecular-Imaging Modalities. *Blood.* 2014;124(21):2105. doi: 10.1182/blood.V124.21.2105.2105.

10. 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. doi: 10.1182/blood.V126.23.191.191.
11. Гальцева И.В., Менделеева Л.П., Давыдова Ю.О. и др. Исследование минимальной остаточной болезни методом многоцветной проточной цитофлуориметрии у больных множественной миеломой после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток. *Онкогематология*. 2017;12(2):62–9. doi: 10.17650/1818-8346-2017-12-2-62-69.
- [Galtseva IV, Mendeleeva LP, Davydova YuO, et al. Study of minimal residual disease by multicolor flow cytometry in multiple myeloma after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Oncohematology*. 2017;12(2):62–9. doi: 10.17650/1818-8346-2017-12-2-62-69. (In Russ)]
12. Соловьев М.В., Менделеева Л.П., Покровская О.С. и др. Множественная миелома: поддерживающая терапия после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в зависимости от минимальной остаточной болезни. *Терапевтический архив*. 2017;89(7):25–31. doi: 10.17116/terarkh201789725-31.
- [Solovuyev MV, Mendeleeva LP, Pokrovskaya OS, et al. Multiple myeloma: Maintenance therapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation, depending on minimal residual disease. *Tерапевтический архив*. 2017;89(7):25–31. doi: 10.17116/terarkh201789725-31. (In Russ)]
13. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Anderson KC, et al. A large meta-analysis establishes the role of MRD negativity in long-term survival outcomes in patients with multiple myeloma. *Blood Adv*. 2020;4(23):5988–99. doi: 10.1182/BLOODADVANCES.2020002827.
14. Stetler-Stevenson M, Paiva B, Stoolman L, et al. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016;90(1):26–30. doi: 10.1002/cyto.b.21249.
15. Менделеева Л.П., Вотякова О.М., Рехтина И.Г. и др. Множественная миелома: Клинические рекомендации [электронный документ]. Доступно по: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/144_1. Ссылка активна на 24.05.2022.
- [Mendeleeva LP, Votyakova OM, Rehtina IG, et al. Multiple Myeloma: Clinical Guidelines [Internet]. Available from: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/144_1. Accessed 24.05.2022. (In Russ)]
16. Менделеева Л.П., Покровская О.С. Множественная миелома. *Клиническая онкогематология*. 2009;2(1):96–8.
- [Mendeleeva LP, Pokrovskaya OS. Multiple myeloma. *Klinicheskaya onkologematologiya*. 2009;2(1):96–8. (In Russ)]
17. Менделеева Л.П., Вотякова О.М., Покровская О.С. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению множественной миеломы. *Гематология и трансфузиология*. 2016;61(1, прил. 2):1–24. doi: 10.18821/0234-5730-2016-61-1-S2-1-24.
- [Mendeleeva LP, Votyakova OM, Pokrovskaya OS, et al. National clinical guidelines on diagnosis and treatment of multiple myeloma. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2016;61(1, Suppl 2):1–24. doi: 10.18821/0234-5730-2016-61-1-S2-1-24. (In Russ)]
18. Bergstrom DJ, Kotb R, Louzada ML, et al. Consensus Guidelines on the Diagnosis of Multiple Myeloma and Related Disorders: Recommendations of the Myeloma Canada Research Network Consensus Guideline Consortium. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2020;20(7):e352–e367. doi: 10.1016/j.clml.2020.01.017.
19. Kumar SK, Callander NS, Adekola K, et al. Multiple Myeloma, Version 3.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Cancer Netw*. 2020;18(12):1685–717. doi: 10.6004/jnccn.2020.0057.
20. Perez-Persona E, Vidrales M-B, Mateo G, et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*. 2007;110(7):2586–92. doi: 10.1182/blood-2007-05-088443.
21. Hogan KA, Chini CCS, Chini EN. The Multi-faceted Ecto-enzyme CD38: Roles in Immunomodulation, Cancer, Aging, and Metabolic Diseases. *Front Immunol*. 2019;10:1187. doi: 10.3389/FIMMU.2019.01187.
22. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol*. 2005;130(3):325–32. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05550.x.
23. Flores-Montero J, de Tute R, Paiva B, et al. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016;90(1):61–72. doi: 10.1002/CYTO.B.21265.
24. Bataille R, Jego G, Robillard N, et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of “many and multiple myelomas” and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica*. 2006;91(9):1234–40.
25. Tembhare PR, Yuan CM, Venzon D, et al. Flow cytometric differentiation of abnormal and normal plasma cells in the bone marrow in patients with multiple myeloma and its precursor diseases. *Leuk Res*. 2014;38(3):371–6. doi: 10.1016/J.LEUKRES.2013.12.007.
26. Arroz M, Came N, Lin P, et al. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016;90(1):31–9. doi: 10.1002/cyto.b.21228.
27. Peceliunas V, Janiulioniene A, Matuzeviciene R, Griskevicius L. Six color flow cytometry detects plasma cells expressing aberrant immunophenotype in bone marrow of healthy donors. *Cytometry B Clin Cytom*. 2011;80B(5):318–23. doi: 10.1002/cyto.b.20601.
28. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 2008;93(3):431–8. doi: 10.3324/HAEMATOL.11080.
29. Manasanch EE, Salem DA, Yuan CM, et al. Flow cytometric sensitivity and characteristics of plasma cells in patients with multiple myeloma or its precursor disease: influence of biopsy site and anticoagulation method. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(5):1416. doi: 10.3109/10428194.2014.955020.
30. Stetler-Stevenson M, Ahmad E, Barnett D, et al. Clinical Flow Cytometric Analysis of Neoplastic Hematolymphoid Cells; Approved Guideline, CLSI Document H43-A2. 2nd edn. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
31. Гальцева И.В., Давыдова Ю.О., Капранов Н.М. и др. Способ оценки качества аспирата костного мозга в процессе проведения мониторинга минимальной резидуальной болезни при множественной миеломе. Патент РФ № 2639382/21.12.2017. *Бюлл. № 36*. Доступно по: <https://findpatent.ru/patent/263/2639382.html>. Ссылка активна на 09.04.2022.
- [Galtseva IV, Davydova YuO, Kapranov NM, et al. Sposob otsenki kachestva aspirata kostnogo mozga v protsesse provedeniya monitoringa minimalnoi rezidualnoi bolezni pri mnozhestvennoi mielome. Patent RUS No. 2639382/21.12.2017. *Byul. No. 36*. Available from: <https://findpatent.ru/patent/263/2639382.html>. Accessed 09.04.2022. (In Russ)]
32. Rawstron AC. Immunophenotyping of Plasma Cells. *Curr Protoc Cytom*. 2006;36(1). doi: 10.1002/0471142956.cy0623s36.
33. Britt Z, O'Donahue M, Mills D. Surface staining for kappa and lambda, how many washes are sufficient? You might be surprised. Available from: <http://www.cytometry.org/public/newsletters/elCCS-6-3/article2.php>. (accessed 24.05.2022).
34. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*. 2017;31(10):2094–103. doi: 10.1038/LEU.2017.29.
35. Paiva B, Gutierrez NC, Rosinol L, et al. High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood*. 2012;119(3):687–91. doi: 10.1182/blood-2011-07-370460.
36. 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):391–7. doi: 10.1038/leu.2013.217.