

Минимальная остаточная болезнь при плазмноклеточной (множественной) миеломе: проточно-цитометрические подходы

Л.Ю. Гривцова¹, В.В. Лунин², А.А. Семенова³, В.Б. Ларионова³, Г.С. Тумян³

¹Медицинский радиологический научный центр им А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 249031 Обнинск, ул. Королева, 4;

²Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 3;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Людмила Юрьевна Гривцова grivtsova@mail.ru

Минимальная остаточная болезнь (МОБ) при опухолях кроветворной и лимфоидной систем в настоящий момент – важная составляющая обследования больного в ходе проведения терапии. Исследование МОБ выполняется для оценки эффекта и риск-стратификации в процессе химиотерапии (острые лейкозы) или по ее окончании (периферические В-клеточные лимфомы). Основными лабораторными методами оценки МОБ являются молекулярные (полимеразная цепная реакция) и иммунологические (многопараметровая проточная цитометрия (ПЦ)). Иммунологическая оценка МОБ – стандарт клинических протоколов при лечении острых лимфобластных лейкозов у детей на этапе индукционной терапии. В случае острых лейкозов у взрослых оценка МОБ проводится, как правило, по окончании курса консолидации. Клинически значимой и практически стандартизированной является иммунологическая оценка МОБ при В-клеточном хроническом лимфолейкозе.

В отношении множественной миеломы (в трактовке классификации Всемирной организации здравоохранения (2016) – плазмноклеточная миелома (ПКМ)) также ведется работа по стандартизации протоколов и унификации подходов к детекции клеток МОБ. Благодаря введению новых препаратов и схем лечения, а также опции трансплантации клинические результаты лечения больных ПКМ существенно улучшаются и показатель МОБ рассматривается в качестве фактора прогноза развития болезни. На настоящий момент использование показателя МОБ в качестве биомаркера ответа на лечение при ПКМ одобрено Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США.

По мере накопления наших знаний относительно МОБ и установления клинической значимости ПЦ при ПКМ Международной группой по изучению множественной миеломы (IMWG) еще в 2011 г. к традиционным критериям полной ремиссии ПКМ было добавлено следующее определение: «иммунофенотипическая полная ремиссия» – отсутствие иммунофенотипически aberrантных клональных плазматических клеток в костном мозге при анализе минимум 1 млн миелокариоцитов с использованием многопараметровой ПЦ (4 и более параметров).

В данной статье рассмотрена эволюция иммунологических подходов с использованием многопараметровой ПЦ к выявлению клеток МОБ у больных ПКМ в соответствии с различными существующими протоколами, особенности преаналитического этапа и общие правила ПЦ-детекции клеток МОБ при ПКМ.

Ключевые слова: плазмноклеточная опухоль, миелома, проточная цитометрия, маркер aberrантности, минимальная остаточная болезнь

Для цитирования: Гривцова Л.Ю., Лунин В.В., Семенова А.А. и др. Минимальная остаточная болезнь при плазмноклеточной (множественной) миеломе: проточно-цитометрические подходы. Онкогематология 2020;15(1):40–50.

DOI: 10.17650/1818-8346-2020-15-1-40-50



Minimal residual disease in plasma cell (multiple) myeloma: flow cytometric approaches

L. Yu. Grivtsova¹, V. V. Lunin², A. A. Semenova³, V. B. Larionova³, G. S. Tumyan³

¹A. F. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; 4 Koroleva St., Obninsk 249031, Russia;

²P. A. Hertzen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; 3 2nd Botkinskiy Proezd, Moscow 125284, Russia;

³N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

The minimum residual disease (MRD) for hematopoietic and lymphoid systems tumors is an important component of patient examination during therapy. The MRD detection is performed to evaluate the effect of therapy and risk stratification during chemotherapy (acute leukemia) or at the end of it (peripheral B-cell lymphomas). The main laboratory methods for MRD assessing are molecular (polymerase chain reaction) and immunological (multi-parameter flow cytometry (FC)) methods. Immunological evaluation of MRD is the standard of clinical protocols for the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia during induction therapy. In the case of acute leukemia in adults, MRD assessment is usually performed at the end of the consolidation course. Clinically significant and practically standardized is the immunological assessment of MRD in B-cell chronic lymphocytic leukemia.

In multiple myeloma (in World Health Organization (2016) classification – plasma cell myeloma (PCM)), work is also underway to standardize protocols and unify approaches to MRD detection. With the introduction of new drugs and treatment regimens, as well as transplantation

clinical outcome of patients significantly improved and MRD value is considered as a prognostic factor. To date, the use of the MRD value as a biomarker of treatment response in PCM has been approved by the US Food and Drug Administration.

With the accumulation of our knowledge regarding the MRD and to establish the clinical significance of the FC in PCM, International Multiple Myeloma Study Group (IMWG) in 2011 was added the following definition to the traditional criteria of PCM complete remission: “Immunophenotypic complete remission” – the immunophenotypically absence of aberrant clonal plasma cells in the bone marrow when analyzing at least 1 million myelocaryocytes using a multiparameter FC (4 or more parameters).

This article discusses the evolution of immunological approaches using a multi-parameter FC to detect MRD in patients with PCM in accordance with various existing protocols, features of the preanalytical stage and general rules for FC detection of MRD in PCM.

Key words: plasma cell tumor, myeloma, flow cytometry, aberration marker, minimum residual disease

For citation: Grivtsova L.Yu., Lunin V.V., Semenova A.A. et al. Minimal residual disease in plasma cell (multiple) myeloma: flow cytometric approaches. *Onkologematologiya = Oncohematology* 2020;15(1):40–50. (In Russ.).

Введение

Изучение особенностей иммунофенотипа опухолевых клеток при острых лейкозах и лимфомах и выявление устойчивых aberrантных признаков опухоли, отличающих патологический клон от нормальных клеточных аналогов, позволили выработать оптимальные подходы выявления клеток минимальной остаточной болезни (МОБ) методами проточной цитометрии (ПЦ). Наиболее отработанными и стандартизованными являются ПЦ-протоколы выявления клеток МОБ при острых лимфобластных лейкозах из В-линейных предшественников у детей. Определенный прогресс достигнут и в отношении детекции МОБ при Т-линейных острых лимфобластных лейкозах [1–7].

В отношении зрело-клеточных опухолей стандартизованными являются цитометрические протоколы выявления клеток остаточного опухолевого клона при В-клеточном хроническом лимфолейкозе [8–10].

Попытки выявления остаточной болезни при плазмноклеточной миеломе (ПКМ) с использованием методов ПЦ предпринимаются достаточно давно. Впервые потенциальная клиническая значимость ПЦ-выявления

клеток МОБ при миеломе была продемонстрирована в 2002 г. [11, 12].

На первом этапе для выявления плазматических клеток и опухолевых плазматических клеток использовались 3–4-параметровые ПЦ-протоколы. В качестве общего маркера клеток плазматического ряда применяли антиген CD38, а aberrантные клетки выявляли на основании оценки CD45, CD19 и CD56 (рис. 1).

Данная комбинация маркеров была выбрана, поскольку удовлетворяла основным требованиям иммунологического выявления клеток МОБ: идентификация целевой популяции, в данном случае плазматических клеток (CD38); разграничение нормальных и aberrантных/опухолевых плазматических клеток в пределах всех плазматических клеток; возможность оценки других клеточных популяций образца (CD56, CD19, CD45) [12–15].

Затем для повышения специфичности выявления плазматических клеток среди миелокариоцитов было предложено использовать комбинацию 2 маркеров CD38 и CD138 (рис. 2). Список маркеров aberrантности расширился, и в качестве возможных изучались

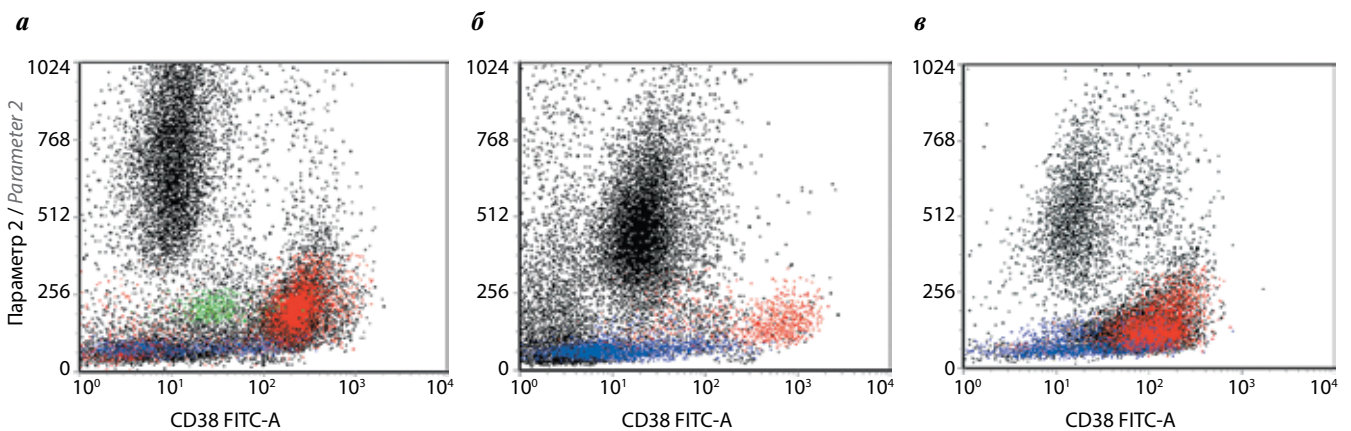


Рис. 1. Экспрессия антигена CD38 на клетках костного мозга и периферической крови. Представлены 2 образца костного мозга (а, б) и образец периферической крови (в) больных плазмноклеточной миеломой. Образец а – выраженная пропорция клеток плазматической природы (50 % миелокариоцитов); образец б – незначительная пропорция плазматических клеток среди всех клеток костного мозга; образец в – отчетливая пропорция плазмобластов в периферической крови (70 %). Во всех случаях экспрессия CD38 (популяция клеток красного цвета) более отчетливая в сравнении с другими клетками образца (синие – лимфоциты, зеленые – моноциты, черные – гранулоцитарный росток)

Fig. 1. CD38 expression on bone marrow and peripheral blood cells. Two bone marrow samples (a, б) and a peripheral blood sample (в) of patients with plasma cell myeloma are presented. Sample a – a pronounced proportion of cells with plasma nature (50 % among myelocaryocytes); sample б – a small proportion of plasma cells among all bone marrow cells; sample в – a clear proportion of plasmoblasts in peripheral blood (70 %). In all cases, CD38 expression (a red cells population) is more distinct in comparison with other cells of the sample (blue – lymphocytes, green – monocytes, black – granulocytes)

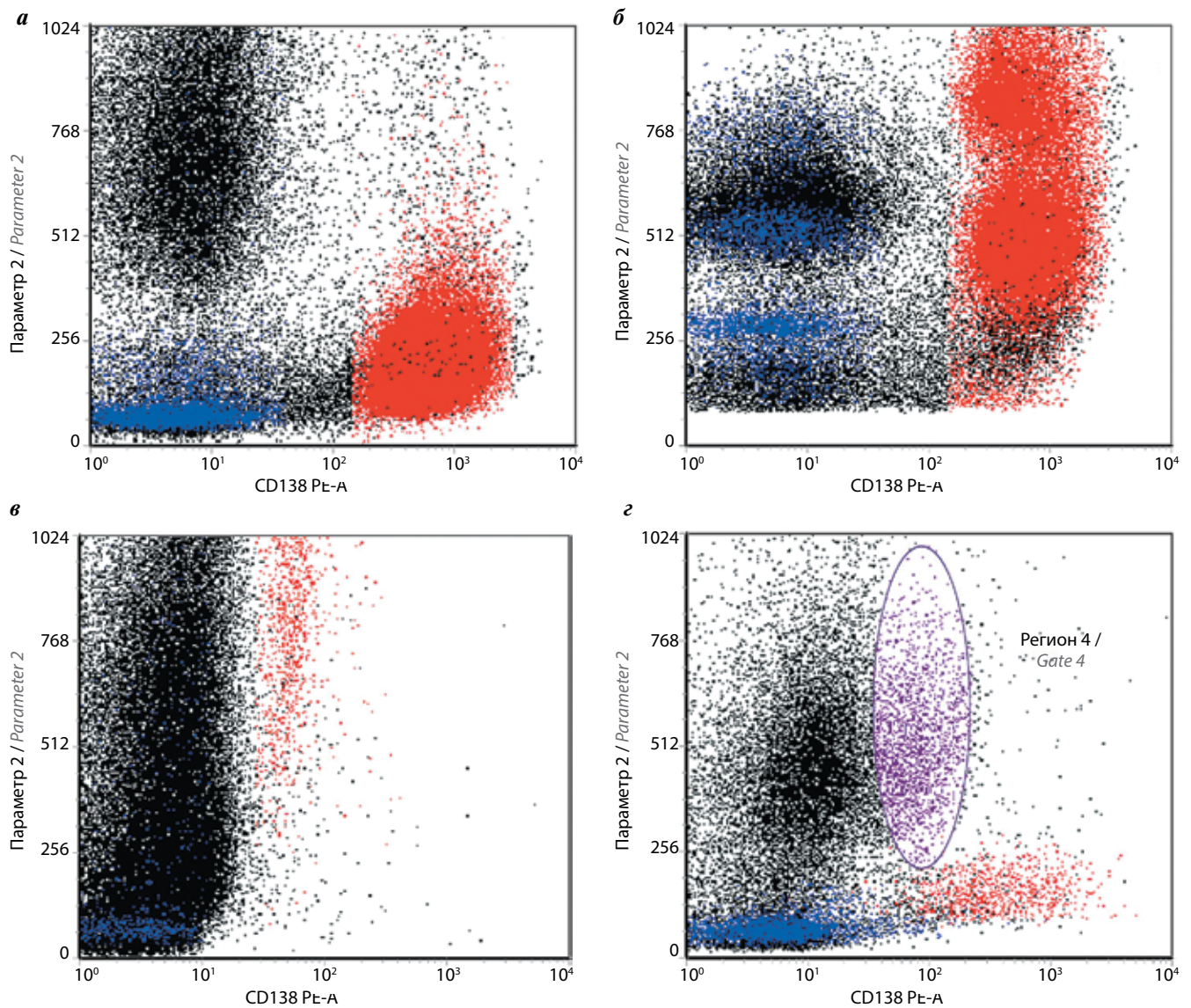


Рис. 2. Экспрессия синдекана 1 (CD138) на клетках костного мозга. Представлены образцы костного мозга 3 больных: а, б – 1-й; в – 2-й; г – 3-й больной. В 1-м случае среди миелокарицитов определена выраженная пропорция плазматических клеток с отчетливой экспрессией CD138 (а), гетерогенных по размеру (б); на обеих цитограммах CD138⁺-клетки обозначены красным. Второй случай (в) демонстрирует фоновую экспрессию CD138 на клетках гранулоцитарного ростка (клетки с фоновым свечением выделены красным), плазматические клетки у данного больного в костном мозге практически отсутствуют. В 3-м случае (г) пропорция плазматических клеток невысока (2 % миелокарицитов, выделены красным цветом), также отмечается неспецифическая фоновая реакция CD138 с клетками гранулоцитарного ростка (маркированы фиолетовым цветом). На всех цитограммах в качестве внутреннего контроля синим цветом маркированы лимфоциты

Fig. 2. Syndecan 1 (CD138) expression on bone marrow cells. Bone marrow samples of 3 patients are presented: а, б – 1st; в – 2nd; г – 3rd patient. In the 1st case, a pronounced proportion of plasma cells with a distinct CD138 expression (а) heterogeneous in size (б) was determined among myelocaryocytes; on both cytograms, CD138⁺ cells are shown in red. The second case (в) demonstrates the background CD138 expression on granulocytes (cells with a background fluorescence are highlighted in red); plasma cells are practically absent in the bone marrow of this patient. In the 3rd case (г), the proportion of plasma cells is low (2 % of myelocaryocytes; highlighted in red), and a non-specific background reaction of CD138 with granulocytes (marked in purple) is also noted. On all cytograms, lymphocytes are marked in blue as internal control

антигены CD117, CD28, CD27, CD81, CD200 и CD307 [16–18]. Однако ни один маркер сам по себе не обеспечивает достаточной специфичности в отношении четкого различия между клональными плазматическими клетками и нормальными плазмочитами. Для эффективного разграничения нормы и опухоли был рекомендован многопараметровый анализ единичных миеломных плазматических клеток в пределах большого количества нормальных/реактивных плазмочитов и нормальных клеток костного мозга (КМ).

В последующих исследованиях установлено, что комбинированная оценка CD138 и CD38 вместе с CD45, CD19, CD56, CD27, CD81 и CD117 на данный момент развития наших знаний относительно иммунофенотипа оптимально подходит для мониторинга МОБ практически для каждого пациента с ПКМ. Дополнительно может быть проведена оценка клональности плазматических клеток на основании экспрессии в цитоплазме легких цепей иммуноглобулинов (Igκ, Igλ).

Постепенно ПЦ стала предпочтительным методом для определения качественного полного ответа, риск-стратификации и мониторинга лечения больных ПКМ.

Метод зарекомендовал себя как надежный, воспроизводимый и информативный подход, позволяющий выявлять клетки МОБ практически у каждого больного ПКМ. Преимуществами метода являются высокая специфичность и чувствительность, позволяющие выявить 1 опухолевую клетку среди 10 000–100 000 клеток КМ, что приравнивает ПЦ по чувствительности к методам полимеразной цепной реакции [3]. Важно, что данные могут быть получены практически в день исследования при сравнительно невысокой стоимости [16, 19].

До настоящего момента обсуждаются вопросы в отношении клонирования используемых антител, сочетаний антител и флуорохромных конъюгатов, последовательности инкубации и количества оцениваемых одномоментно параметров. В силу технических особенностей метода (наборы реагентов, методики, приборы) существует значительная вариабельность подходов к оценке количества опухолевых плазматических клеток как среди зарубежных лабораторий, так и в ПЦ-лабораториях на территории России, что требует анализа и унификации подходов.

Общие принципы проточной цитометрии выявления клеток минимальной остаточной болезни при миеломе

Некоторые особенности преаналитического этапа. Качество ПЦ-выявления МОБ при миеломе зависит от множества различных факторов, а именно от количества и качества образца, процессинга образца, комбинации реагентов, условий сбора образца на ПЦ, включая количество анализируемых клеток, правильный алгоритм аналитического этапа и адекватное заключение по результатам исследования. Кратко анализируя каждый из пунктов, необходимо сказать следующее.

Оптимальным материалом для исследования на предмет выявления клеток МОБ при ПКМ считается пунктат КМ. Неадекватным считается образец большого объема, частично свернувшийся и длительно хранившийся и без надлежащей маркировки (данные больного, дата и время взятия образца). Поэтому работа с образцом должна быть начата как можно раньше. Стандартом признается не более чем 24-часовой интервал от момента взятия образца до его постановки. Следует обратить внимание, что длительно (>48 ч) или неправильно хранившийся и транспортировавшийся образец (перепады температуры) может быть исследован, однако в заключении должна быть сделана пометка о качестве образца. Оптимальным консервантом для образца при оценке МОБ ПКМ является К2ЭДТА, пробирки, содержащие гепарин, не могут быть использованы в силу особенностей антигена CD138 (см. далее). Согласно данным Международной группы по изучению множественной миеломы (IMWG) оптимальной для хранения образца и выполнения

преаналитического этапа считается комнатная температура (около 22 °С) [15, 17, 19–22]. При регистрации материала важно отметить объем образца, поступившего на исследование. Так, объем >1 мл скорее всего приведет к разбавлению периферической кровью и потребует корректировки панели моноклональных антител с учетом возможности поправки на гемодилюцию [23, 24].

Важным этапом пробоподготовки, повышающим чувствительность ПЦ, является предварительный лизис эритроцитов. Это способствует анализу большего количества клеток в пробе и оптимизации расхода моноклональных антител. Лизис осуществляется щадящим раствором без фиксатора, содержащим 155 мМоль хлорида аммония, 10 мМоль бикарбоната калия и 0,2 мМоль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Раствор может быть приготовлен *ex tempore*, но также коммерчески доступен.

Лизирование эритроцитов после инкубации с моноклональными антителами может быть выполнено, однако приводит к снижению количества анализируемых миелокариоцитов.

Не рекомендуется использовать выделение клеток на градиенте плотности FicollНураque. Этот метод обогащения приводит к значительной потере плазматических клеток и, возможно, к утрате экспрессии CD138.

Проведение прямой реакции (без предварительного лизиса) с образцом объемом более 200 мкл (например, 400 мкл) возможно на усмотрение лаборатории, но при этом потребуются большее количество реагентов, что экономически нецелесообразно.

ПЦ-подходы к выявлению плазматических клеток. Принципиальным этапом в отношении выявления МОБ является выбор антигена, позволяющего идентифицировать целевую популяцию. Как уже указано ранее, маркером плазматических клеток признан антиген CD38, очень ценный для оценки количества как нормальных, так и миеломных плазматических клеток. Экспрессия антигена не является специфичной для плазмочитов и охватывает широкий спектр клеток от ранних предшественников до активированных Т-, В-клеток, миеломоноцитарных клеток и клеток красного ряда. Наибольшей плотностью экспрессии антигена (в терминологии ПЦ – высокие уровни экспрессии, CD38^{high} или CD38⁺⁺) характеризуются клетки плазматической природы и злокачественные плазматические клетки при миеломе, отчетливая экспрессия антигена в норме описана для популяций НК-клеток и ряда субпопуляций активированных Т-, В-клеток [25–30].

Необходимо отметить, что экспрессия белка характерна для целого ряда опухолей кроветворной и лимфоидной тканей. CD38 выявляется и на тканях негемопозитической природы, в частности на эпителии предстательной железы, клетках Лангерганса, дендритах и перикарии нейронов, а также на некоторых клетках

мышечной ткани [31–33]. С учетом особенностей онтогенеза В-клеток плазмциты характеризует наиболее яркая экспрессия CD38 в сравнении с другими клетками крови и КМ (см. рис. 1), поэтому CD38 является наиболее надежным маркером клеток плазматической линии дифференцировки и долгое время был единственным маркером, используемым для идентификации плазматических клеток методами ПЦ [28, 29, 34–37].

Интересным в этом отношении с точки зрения выявления популяции плазматических клеток оказался белок синдекан 1, кластрированный как CD138 [11, 38] (см. рис. 2). До недавнего времени считалось, что экспрессия CD138 характерна только для плазматических клеток. Однако совершенствование технологий ПЦ и разработка более чувствительных флуорохромов позволили выявить слабую экспрессию синдекана 1 на других клеточных популяциях и неспецифическую достаточно высокую автофлуоресценцию в клетках миелоидной рестрикции. Следует учитывать, что при оценке экспрессии CD138 проба должна быть обработана максимально быстро, без временной отсрочки. Как уже сказано ранее, клетки не следует выделять на градиенте плотности и в качестве консерванта нельзя использовать гепарин, поскольку экспрессия маркера снижается по мере стояния образца, а присутствие гепарина влияет на доступность эпитопа, связывающего антитела [39–41].

Для более надежной верификации клеток плазматической природы IMWG предложено включить кроме CD38 и CD138 также антиген CD45, что позволяет оптимизировать алгоритм выявления плазматических клеток.

Таким образом, в соответствии со стандартными рекомендациями IMWG для максимально аккуратного выделения (в терминологии ПЦ – гейтирования) всех плазматических клеток образца необходимо использование сочетания антигенов CD38 vs CD138.

Необходимо обратить внимание на такой важный факт, как отсутствие экспрессии синдекана 1 у некоторых больных на части миеломных клеток (рис. 3). Несмотря на то что частота таких случаев невысока, факт является клинически значимым. Установлено, что больные ПКМ, у которых выявляется отчетливая пропорция клеток CD138, имеют худший прогноз, высокую вероятность развития рецидива и повышенный риск метастазирования [42–44].

В рамках стандартов лечения ПКМ возможно проведение таргетной терапии моноклональными антителами к антигенам CD38 (даратумумаб и SAR650984) и CD319 (элотузумаб/SLAMF7 и PDL241). На фоне проведения подобной терапии стандартное выявление плазматических клеток с использованием анти-CD38-антител становится затруднительным. В этом контексте важен поиск альтернативных маркеров плазматических клеток. В качестве потенциально возможных рассматривались маркеры CD229, CD54, CD319, CD269. В отдельных исследованиях установлено, что наиболее оптимальным из предложенных

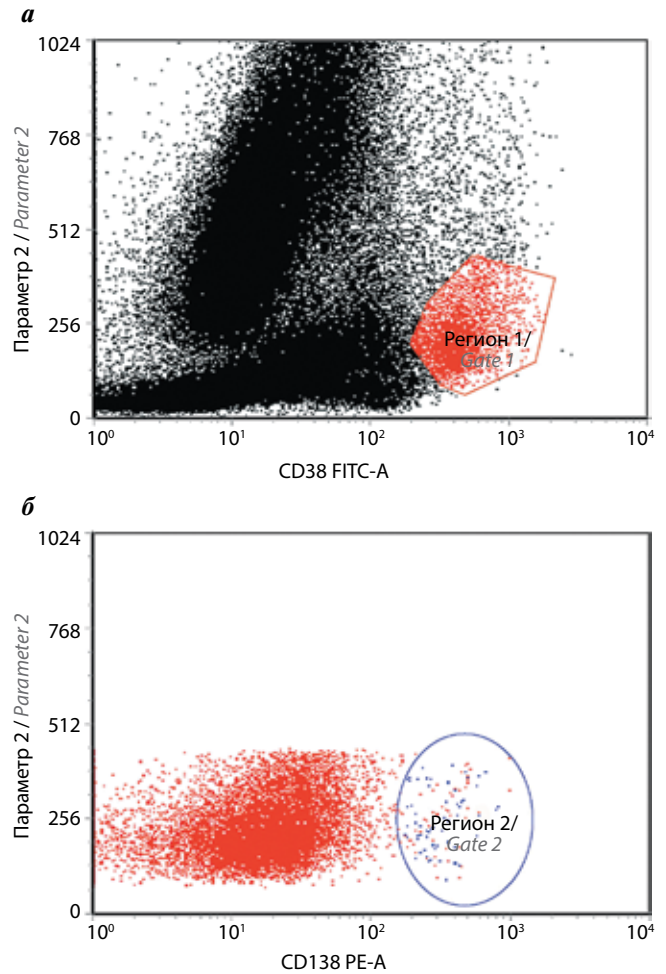


Рис. 3. Атипичная экспрессия CD138 на плазматических клетках костного мозга при плазмклеточной миеломе. В данном случае у больного выявлено 3,5 % плазматических клеток в костном мозге (а), при этом большинство из них имели слабовыраженную экспрессию CD138, и только небольшая пропорция (менее 1,0 % плазматических клеток CD38⁺) была CD138⁺⁺ (б) (выделена синим)

Fig. 3. Atypical CD138 expression on bone marrow plasma cells in plasma cell myeloma. In this case, the patient revealed 3.5 % of plasma cells in the bone marrow (a), while most of them had mild CD138 expression, and only a small proportion (less than 1.0 % of CD38⁺ plasma cells) was CD138⁺⁺ (b) (highlighted in blue)

в отдельных ситуациях для выявления плазматических клеток считается использование CD229. Следует учитывать, что экспрессия всех указанных выше антигенов не является строго специфичной для клеток плазматического ряда и их использование для идентификации клеток МОБ при ПКМ возможно только в комбинации с наиболее стандартными маркерами плазматических клеток, например CD138.

Кроме этого, может быть рассмотрена возможность идентификации клеток МОБ с использованием анти-CD38-диагностических антител другого клона, нежели использованные терапевтические антитела.

Таким образом, стандартом для большинства больных ПКМ в настоящее время считается выявление плазматических клеток на основании CD38, CD138,

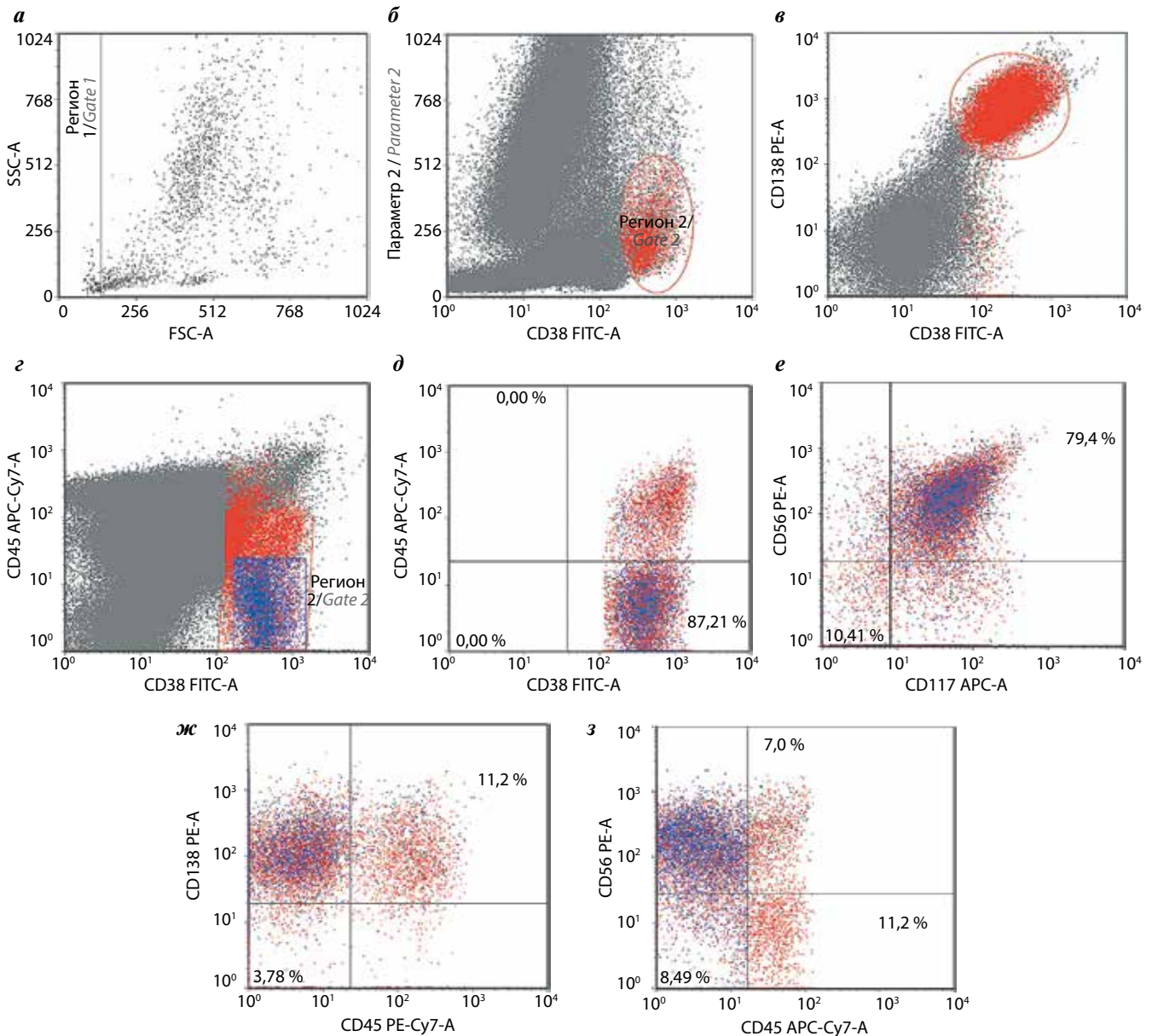


Рис. 4. Алгоритм проточно-цитометрического выделения клеток минимальной остаточной болезни при плазмочелочной миеломе (согласно рекомендациям Международной группы по изучению множественной миеломы). На 1-м этапе исключается дебрис (разрушенные клетки и дуплеты) (а), далее в пределах миелокариоцитов выявляются клетки CD38⁺⁺, т. е. клетки плазматической природы (б), которые в данном образце составили 3,34 % в пределах миелокариоцитов. Затем область анализа корректируется с учетом экспрессии CD138 (в), количество CD38⁺CD138⁺-клеток в данном образце составляет 2,86 % в пределах миелокариоцитов. На следующем этапе выявляются плазматические клетки с отсутствием экспрессии антигена CD45, которые составляют 87,0 % всех клеток CD38⁺CD138⁺ или 2,48 % в пределах миелокариоцитов (г) (выделены синим цветом), все они CD19⁻CD56⁺CD117⁺ (д, е) (клетки целевой популяции выделены синим). На цитограмах ж, з оценено количество нормальных (не aberrantных) плазматических клеток на основании выявления в пределах CD38⁺CD138⁺-плазматических клеток популяции CD19⁺ и CD45⁺CD56⁻, которые в данном случае составили 11,2 % в пределах плазматических клеток или 0,31 % всех миелокариоцитов

Fig. 4. Flow cytometric algorithm for minimal residual disease cell isolation in plasma cell myeloma (according to the recommendations of the International Multiple Myeloma Study Group). At the 1st stage, debris (destroyed cells and doublets) is excluded (a), and then CD38⁺⁺ cells, i.e. cells of a plasma nature, are detected within the myelokaryocytes (б), which in this sample amounted to 3.34 %. Then the analysis area is adjusted taking into account the CD138 expression (в), the number of CD38⁺CD138⁺ cells in this sample is 2.86 % within myelokaryocytes. At the next stage, plasma cells with negative CD45 expression are detected, which constitute 87.0 % of all CD38⁺CD138⁺ cells or 2.48 % within myelokaryocytes (г) (highlighted in blue), all of them are CD19⁻CD56⁺CD117⁺ (д, е) (cells of the target population are highlighted in blue). On cytograms ж, з the number of normal (non-aberrant) plasma cells was estimated based on the detection of CD19⁺ and CD45⁺CD56⁻ population within CD38⁺CD138⁺ plasma cells, which in this case amounted to 11.2 % within plasma cells or 0.31 % of all myelokaryocytes

CD45 и характеристик светорассеяния. Принципиальной последовательностью при этом считается выявление популяции с коэкспрессией CD38 и CD138 и только потом сужение области анализа в пределах CD38 vs CD45 (рис. 4).

Проточно-цитометрические панели выявления клеток минимальной остаточной болезни, маркеры aberrantности

Для корректной оценки количества клеток МОБ ПКМ необходимо правильное разграничение нор-

мальных и опухолевых плазмочитов на основании aberrантного иммунофенотипа.

Более чем 10 лет назад Европейская рабочая группа по изучению миеломы рекомендовала в качестве наиболее надежных маркеров выявления опухолевых плазматических клеток оценку экспрессии антигена В-клеток CD19 и молекулы клеточной адгезии, являющейся маркером субпопуляции NK-клеток CD56. Также целый ряд антигенов был рекомендован на тот момент для разграничения нормальных и опухолевых плазмочитов (табл. 1).

В ходе многочисленных исследований установлено, что большинство нормальных плазматических клеток КМ иммунофенотипически гетерогенны по экспрессии CD19 и CD45, негативны в отношении CD117 и CD20, тогда как экспрессия антигенов CD27 и CD81 достаточно отчетливая. Обязательным к включению в панель детекции МОБ ПКМ является маркер CD56, но необходимо учитывать, что, как и в случае с CD28, часть нормальных плазмочитов могут экспрессировать данные антигены [45–47].

Использование 4–5-параметрового анализа на основании оценки в пределах целевой популяции CD38⁺⁺CD138⁺CD45^{-/+}-клеток с одновременной оцен-

кой антигенов CD19 и CD56 признано достаточным для выявления МОБ у 90 % больных ПКМ, при этом чувствительность метода составляет 10⁻⁴ [14].

Добавление к панели антигенов, перечисленных в табл. 1, и одновременное использование 6 параметров позволяют достаточно уверенно различать опухолевые и нормальные плазматические клетки в 95 % случаев ПКМ.

Наиболее интересными из них представляются антигены CD27 и CD81, демонстрирующие устойчивую яркую экспрессию на нормальных плазматических клетках, а также CD28, экспрессия которого нетипична для нормальных плазматических клеток.

Антиген CD27 достаточно широко представлен на лимфоцитах, в пуле В-клеток его экспрессия характеризует клетки герминальных центров, В-клетки памяти и плазматические клетки [48, 49].

Костимуляторный рецептор Т-клеток, молекула CD28, играет значительную роль в регуляции иммунитета. Гиперэкспрессия костимуляторной молекулы CD28 на клетках миеломы является чрезвычайно неблагоприятным фактором прогноза, способствуя длительному выживанию CD28⁺⁺-плазматических клеток в стромальных нишах КМ. Эти данные позволяют

Таблица 1. Антигенный профиль нормальных и опухолевых плазмочитов (адаптировано из [14])

Table 1. Antigenic profile of normal and tumor plasmocytes (adapted from [14])

АГ AG	Нормальный профиль экспрессии (процент АГ ⁺ нормальных плазматических клеток) Normal expression profile (percentage of АГ ⁺ normal plasma cells)	Аберрантный профиль Aberrant profile	Процент случаев плазмочеточной миеломы с данной абберацией The proportion of plasma cell myeloma cases with this aberration	Необходимость для диагностики и мониторинга The need for diagnosis and monitoring
CD19	АГ ⁺ (>70) АГ ⁺ (>70)	Отрицательный Negative	95	Необходимо Necessary
CD56	АГ ⁻ (<15) АГ ⁻ (<15)	АГ ⁺⁺ АГ ⁺⁺	75	Необходимо Necessary
CD117	АГ ⁻ (0) АГ ⁻ (0)	Положительный Positive	30	Рекомендовано Recommended
CD20	АГ ⁻ (0) АГ ⁻ (0)	Положительный Positive	—	Рекомендовано Recommended
CD28	АГ ⁻ /слабоположительная (<15) АГ ⁻ /weakly positive (<15)	АГ ⁺⁺ АГ ⁺⁺	15–45	Рекомендовано Recommended
CD27	АГ ⁺⁺ (100) АГ ⁺⁺ (100)	Слабоположительный или отрицательный Weakly positive or negative	40–50	Рекомендовано Recommended
CD81	АГ ⁺ (100) АГ ⁺ (100)	Слабоположительный или отрицательный Weakly positive or negative	Нет данных No data	Может быть использовано Can be used
CD200	Слабая экспрессия Weak expression	АГ ⁺⁺ АГ ⁺⁺	Нет данных No data	Может быть использовано Can be used

Примечание. АГ – антиген.

Note. AG – antigen.

рассматривать CD28 не только как aberrантный маркер плазматических клеток, но и как прогностический маркер, выявляющий наиболее длительно живущую, резистентную к терапии популяцию плазматических клеток [13, 50–54].

В контексте стандартизации подходов в ПЦ-диагностике, в том числе в выявлении плазматических клеток, наиболее значимым шагом является внедрение в клиническую практику панелей и методов анализа, предложенных консорциумом EuroFlow [55].

На 1-м этапе в рамках данного подхода для диагностики опухолей плазмоцитарной дифференцировки была предложена панель из 2 проб (табл. 2).

Данный подход учитывал практически все необходимые маркеры для аккуратного и точного выявления и описания плазматических клеток при первичной диагностике. Однако для 100 % выявления клеток МОБ ПКМ на этапе регенерации КМ после высокодозной химиотерапии с трансплантацией стволовых клеток этого оказалось недостаточно.

Тогда для повышения эффективности разграничения нормальных, регенерирующих и клональных плазматических клеток панель была специально адаптирована под данные цели (табл. 3). При этом из протокола исключены антигены CD28, β 2-микроглобулин ввиду их меньшей роли в разграничении регенерирующих и клональных плазматических клеток (большая значимость в отношении прогноза при первичной диагностике). Результаты проспективного валидированного исследования 2 центров показали надежность и клиническую значимость предложенного метода [56].

Данный подход в настоящее время может считаться единственным стандартизованным методом выявления опухолевых плазматических клеток.

Исследования в отношении aberrантного иммунофенотипа плазматических клеток продолжаются. Предполагалось, что полезным в отношении выявления клеток МОБ ПКМ может оказаться антиген CD200, наиболее часто используемый в ПЦ для подтверждения диагноза В-клеточного хронического лимфолейкоза. Более чем в 70 % случаев ПКМ выявляются aberrантные CD200^{+/+}-плазматические клетки, значимые в отношении прогноза заболевания. Кроме этого, идет дискуссия о том, насколько необходима оценка клональности плазматических клеток при детекции МОБ на основании выявления в цитоплазме легких цепей иммуноглобулинов. С учетом этого производителем моноклональных антител предложен к использованию частично стандартизованный при выявлении плазматических опухолей и оценке МОБ при ПКМ 8-параметровый протокол CD38/CD45/CD81/CD27/CD19/CD200/CD138/CD56. Однако дальнейшие исследования не продемонстрировали повышения эффективности в выявлении клеток МОБ при ПКМ при добавлении к панели антигена CD200 [57].

Введение в практику ПЦ более высокого разрешения позволило к данному моменту апробировать консорциуму EuroFlow протоколы, использующие более 8 параметров, например 10-цветный протокол, предлагающий к оценке следующую комбинацию антигенов: CD138/CD27/CD117/CD38/CD56/CD45/CD19/CyIgk/CyIgl/CD81. Использование 10-цветной ПЦ несомненно повысило чувствительность методики и обеспечило возможность одномоментного анализа большинства важных для выявления МОБ маркеров ПКМ.

Важно, что использование таких многопараметровых подходов позволяет оценить количество клеток

Таблица 2. Восьмипараметровая панель консорциума EuroFlow для диагностики плазматических опухолей

Table 2. EuroFlow consortium eight-parameter panel for the diagnosis of plasma cell tumors

Проба/флуорохром Sample/fluorochrome	PВ	PO	FITC	PE	PerCP-cy5.5	PeCy7	APC	APC-H7
1	CD45	CD138	CD38	CD28	CD27	CD19	CD117	CD81
2	CD45	CD138	CD38	CD56	β 2-m	CD19	cyIgk	cyIgl

Таблица 3. Восьмипараметровая панель консорциума EuroFlow для оценки минимальной остаточной болезни при плазматической миеломе

Table 3. EuroFlow consortium eight-parameter panel for minimal residual disease detection in plasma cell myeloma

Проба/флуорохром Sample/fluorochrome	BV-421	BV-510	FITC	PE	PerCP-cy5.5	PeCy7	APC	APC-C750
1	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81
2	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	cyIgk	cyIgl

МОБ при отсутствии данных по первичному образцу (в отличие от методов полимеразной цепной реакции и секвенирования нового поколения (NGS)) и может быть выполнено на любом этапе лечения больного.

Заключение

При составлении ПЦ-панелей для диагностики клеток МОБ при ПКМ необходимо руководствоваться основными принципами выявления остаточных опухолевых плазматических клеток. Наиболее информативным для выявления МОБ считается КМ. На 1-м этапе анализа необходимо использование как минимум 5 начальных параметров выявления анализируемой клеточной популяции: CD38, CD138, CD45, прямое и боковое светорассеяние в одной и той же аликвоте. Такой принцип позволяет наиболее точно идентифицировать плазматические клетки. Второй этап – анализ экспрессии потенциально aberrантных фенотипических маркеров с детальной оценкой не просто факта их выявления и процента антигенположительных aberrантных плазматических клеток, а детализации интенсивности экспрессии по сравнению с иммунофенотипом неопухолевых плазматических клеток

(полученным с использованием того же инструмента и параметров). В качестве минимального предела обнаружения рекомендован уровень 0,001 %, соответственно количество анализируемых клеток должно составлять $3-5 \times 10^6$ миелокарицитов. Клинически значимым порогом позитивности является 0,01 % плазматических клеток с aberrантным иммунофенотипом (клетки МОБ) в пределах миелокарицитов. Минимально допустима оценка 2 маркеров aberrантности CD19 и CD56. Наиболее оптимальна дополнительная оценка антигенов CD117, CD27 и CD81.

Таким образом, идеальная проба для разграничения нормальных плазматических клеток и опухолевых плазматических клеток и, соответственно, для оценки количества клеток МОБ представляет собой комбинацию из 8 антигенов, что диктует необходимость использования в клинической практике не менее 8-параметровой ПЦ. При описании результатов исследования количественно следует указывать процентное содержание всех плазматических клеток КМ, процентное содержание как нормальных, так и опухолевых плазматических клеток от общего количества всех плазматических клеток КМ и от общего числа миелокарицитов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Dworzak M.J., Froshl G., Printz D.T. et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99(6):1952–8. DOI: 10.1182/blood.v99.6.1952.
- Borowitz M.J., Devidas M., Hunger S.P. et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 2008;111(12):5477–85. DOI: 10.1182/blood-2008-01-132837.
- Basso G., Veltroni M., Valsecchi M.G. et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol* 2009;27(31):5168–74. DOI: 10.1200/JCO.2008.20.8934.
- Coustan-Smith E., Ribeiro R.C., Stow P. et al. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* 2006;108(1):97–102. DOI: 10.1182/blood-2006-01-0066.
- Гривцова Л.Ю., Попа А.В., Серебрякова И.Н. и др. К дальнейшей стандартизации определения остаточных бластных клеток в костном мозге детей с В-линейными острыми лимфобластными лейкозами на 15-й день индукционной терапии. *Иммунология гемопоеза* 2011;8(1):35–54. [Grivtsova L.Y., Popa A.V., Serebryakova I.N. et al. to further standardize the determination of residual blast cells in the bone marrow of children with B-linear acute lymphoblastic leukemia on the 15th day of induction therapy. *Immunologiya gemopoeza = Hematopoiesis Immunology* 2011;8(1):35–54. (In Russ.)].
- Безнос О.А., Гривцова Л.Ю., Попа А.В. и др. Определение минимальной остаточной болезни при В-линейных острых лимфобластных лейкозах с использованием подходов EuroFlow. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика* 2017;10(2):158–68. [Beznos O.A., Grivtsova L.Yu., Popa A.V. et al. Determination of minimal residual disease in B-linear acute lymphoblastic leukemia using EuroFlow approaches. *Klinicheskaya onkogematoloiya. Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaya praktika = Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice* 2017;10(2):158–68. (In Russ.)].
- Чернышева О.А., Гривцова Л.Ю., Серебрякова И.Н. и др. Диагностика острых лимфобластных лейкозов из Т-линейных предшественников и подходы к мониторингу минимальной остаточной болезни. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика* 2019;12(1):79–85. [Chernysheva O.A., Grivtsova L.Yu., Serebryakova I.N. et al. Diagnosis of acute lymphoblastic leukemia from T-linear progenitors and approaches to monitoring minimal residual disease. *Klinicheskaya onkogematoloiya. Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaya praktika = Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice* 2019;12(1):79–85. (In Russ.)].
- Тупицына Д.Н., Купрышина Н.А., Гривцова Л.Ю. Критерии минимальной остаточной болезни В-клеточного хронического лимфолейкоза в диагностике индолентных лимфом. *Вестник гематологии* 2011;7(1):52. [Tupitsyna D.N., Kupryshina N.A., Grivtsova L.Yu. Criteria for minimal residual disease of B-cell chronic lymphocytic leukemia in the diagnosis of indolent lymphomas. *Vestnik gematologii = Bulletin of Hematology* 2011;7(1):52. (In Russ.)].
- Rawstron A.C., Villmor N., Ritgen M. et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007;21(5):956–64. DOI: 10.1038/sj.leu.2404584.
- Купрышина Н.А., Тупицын Н.Н. Проточная цитометрия в онкогематологии. Часть II. Основы и нововведения в диагностике хронического лимфолейкоза.

- за. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика 2012;5(4):349–54. [Kuryshina N.A., Tupitsyn N.N. Flow cytometry in oncohematology. Part II. Fundamentals and innovations in the diagnosis of chronic lymphocytic leukemia. *Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaya praktika* = Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice 2012;5(4):349–54. (In Russ.)].
11. Rawstron A.C., Davies F.E., Das Gupta R. et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: The relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood* 2002;100(9):3095–100. DOI: 10.1182/blood-2001-12-0297.
 12. San Miguel J.F., Almeida J., Mateo G. et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood* 2002;99(5):1853–6. DOI: 10.1182/blood.v99.5.1853.
 13. Mateo G., Montalban M.A., Vidriales M.B. et al. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J Clin Oncol* 2008;26(16):2737–44. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.4120.
 14. Rawstron A.C., 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.
 15. Paiva B., Almeida J., Perez-Andres M. et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78(4):239–52. DOI: 10.1002/cyto.b.20512.
 16. Paiva B., van Dongen J.J., Orfao A. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. *Blood* 2015;125:3059–68. DOI: 10.1182/blood-2014-11-568907.
 17. 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* 2015;90(1):61–72. DOI: 10.1002/cyto.b.21265.
 18. 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 I.V., Mendeleev L.P., Davydova Yu.O. et al. Investigation of minimal residual disease using multicolor flow cytometry in patients with multiple myeloma after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Onkogematologiya* = Oncohematology 2017;12(2):62–9. (In Russ.)].
 19. Pedreira C.E., Costa E.S., Lecrevisse Q. et al. Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. *Trends Biotechnol* 2013;31(7):415–25. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.04.008.
 20. Rawstron A.C., Child J.A., de Tute R.M. 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(34):2540–7. DOI: 10.1200/JCO.2012.46.2119.
 21. Mathis S., Chapis N., Borgeot J. et al. Comparison of cross-platform flow cytometry minimal residual disease evaluation in multiple myeloma using a common antibody combination and analysis strategy. *Cytometry B Clin Cytom* 2015;88(2):101–9. DOI: 10.1002/cyto.b.21200.
 22. Flanders A., Stetler-Stevenson M., Landgren O. Minimal residual disease testing in multiple myeloma by flow cytometry: major heterogeneity. *Blood* 2013;122(6):1088–9. DOI: 10.1182/blood-2013-05-506170.
 23. Loken M.R., Chu S.C., Fritsche W. et al. Normalization of bone marrow aspirates for hemodilution in flow cytometric analyses. *Cytometry B Clin Cytom* 2009;76(1):27–36. DOI: 10.1002/cyto.b.20429.
 24. Гривцова Л.Ю., Тупицын Н.Н. Иммунологическая оценка гемодилуции костного мозга при лабораторных исследованиях (на основании теста М. Локен). *Медицинский алфавит* 2015;4(18):67–70. [Gritsova L.Yu., Tupitsyn N.N. Immunological evaluation of bone marrow hemodilution in laboratory studies (based on the test M. Loken). *Meditsinskiy alfavit* = Medical Alphabet 2015;4(18):67–70. (In Russ.)].
 25. Anderson K.C., Bates M.P., Slaughenhaupt B.L. et al. Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood* 1984;63(6):1424–33.
 26. San Miguel J.F., Caballero M.D., Gonzalez M. et al. Immunological phenotype of neoplasms involving the B cell in the last step of differentiation. *Br J Haematol* 1986;62:75–83.
 27. Deaglio S., Mehta K., Malavasi F. Human CD38: a(r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leuk Res* 2001;25(1):1–12. DOI: 10.1016/s0145-2126(00)00093-x.
 28. Campana D., Suzuki T., Todisco E. et al. CD38 in hematopoiesis. *Chem Immunol* 2000;75:169–88. DOI: 10.1159/000058768.
 29. Braylan R.C. Impact of flow cytometry on the diagnosis and characterization of lymphomas, chronic lymphoproliferative disorders and plasma cell neoplasias. *Cytometry A* 2004;58:57–61. DOI: 10.1002/cyto.a.10101.
 30. Krejcik J., Casneuf T., Nijhof I.S. et al. Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood* 2016;128(3):384–94. DOI: 10.1182/blood-2015-12-687749.
 31. Crowell P.D., Goldstein A.S. Functional evidence that progenitor cells near sites of inflammation are precursors for aggressive prostate cancer. *Mol Cell Oncol* 2017;4(2):e1279723. DOI: 10.1080/23723556.2017.1279723.
 32. Kotlikoff M.I., Kannan M.S., Solway J. et al. Methodologic advancements in the study of airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114(suppl 2):S18–31. DOI: 10.1016/j.jaci.2004.04.040.
 33. Horenstein A.L., Sizzano F., Lusso R. et al. CD38 and CD157 ectoenzymes mark cell subsets in the human corneal limbus. *Mol Med* 2009;15(3–4):76–84. DOI: 10.2119/molmed.2008.00108.
 34. Quijano S., Lopez A., Rasillo A. et al. Association between the proliferative rate of neoplastic B cells, their maturation stage, and underlying cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphoproliferative disorders: Analysis of a series of 432 patients. *Blood* 2008;111(10):5130–41. DOI: 10.1002/cyto.b.20547.
 35. Perez-Andres M., Paiva B., Nieto W.G. et al. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78(1):47–60. DOI: 10.1002/cyto.b.20547.
 36. Terstappen L.W., Johnsen S., Segers-Nolten I.M., Loken M.R. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood* 1990;76(9):1739–47.
 37. Orfao A., Garcia-Sanz R., Lopez-Berges M.C. et al. A new method for the analysis of plasma cell DNA content in multiple myeloma samples using a CD38/propidium iodide double staining technique. *Cytometry* 1994;17(4):332–9. DOI: 10.1002/cyto.990170409.
 38. Wijdenes J., Vooijs W.C., Clement C. et al. A plasmacyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol* 1996;94(2):318–23. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1811.x.

39. Jourdan M., Ferlin M., Legouffe E. et al. The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *Br J Haematol* 1998;100(4):637–46. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1998.00623.x.
40. San Antonio J.D., Karnovsky M.J., Gay S. et al. Interactions of syndecan-1 and heparin with human collagens. *Glycobiology* 1994;4(3):327–32. DOI: 10.1093/glycob/4.3.327.
41. Yang Y., Borset M., Langford J.K. et al. Heparan sulfate regulates targeting of syndecan-1 to a functional domain on the cell surface. *J Biol Chem* 2003;278(15):12888–93. DOI: 10.1074/jbc.M209440200.
42. Reid S., Yang S., Brown R. et al. Characterization and relevance of CD138 negative plasma cells in plasma cell myeloma. *Int J Lab Hematol* 2010;32(6 Pt 1):190–6. DOI: 10.1111/j.1751-553X.2010.01222.x.
43. Wu D., Guo X., Su J. et al. CD138-negative myeloma cells regulate mechanical properties of bone marrow stromal cells through SDF-1/CXCR4/AKT signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* 2015;1853(2):338–47. DOI: 10.1016/j.bbamer.2014.11.019.
44. Костюкова М.Н. Значение рецептора ИЛ-6 на опухолевых клетках множественной миеломы. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2014. 145 с. [Kostyukova M.N. The value of the IL-6 receptor on tumor cells of multiple myeloma. Thesis ...of candidate of biological sciences. Moscow, 2014. 145 p. (In Russ.)].
45. Cannizzo E., Bellio E., Sohani A.R. et al. Multiparameter immunophenotyping by flow cytometry in multiple myeloma; the diagnostic utility of defining ranges of normal antigenic expression in comparison to histology. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78(4):231–8. DOI: 10.1002/cyto.b.20517.
46. Liu D., Lin P., Hu Y. et al. Immunophenotypic heterogeneity of normal plasma cells: comparison with minimal residual plasma cell myeloma. *J Clin Pathol* 2012;65(9):823–9. DOI: 10.1136/jclinpath-2012-200881.
47. Tembhare P.R., Yuan C.M., 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.
48. Jung J., Choe J., Li L. et al. Regulation of CD27 expression in the course of germinal center B cell differentiation: the pivotal role of IL-10. *Eur J Immunol* 2000;30(8):2437–43. DOI: 10.1002/1521-4141(2000)30:8<2437::AID-IMMU2437>3.0.CO;2-M.
49. Sims G.P., Ettinger R., Shirota Y. et al. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 2005;105(11):4390–8. DOI: 10.1182/blood-2004-11-4284.
50. Boomer J.S., Green J.M. An enigmatic tail of CD28 signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2(8). DOI: 10.1101/cshperspect.a002436.
51. Nair J.R., Carlson L.M., Koorella C. et al. CD28 expressed on malignant plasma cells induces a pro-survival and immunosuppressive microenvironment. *J Immunol* 2011;187(3):1243–53. DOI: 10.4049/jimmunol.1100016.
52. Pellat-Deceunynck C., Bataille R., Robillard N. et al. Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells. *Blood* 1994;84(8):2597–603.
53. Zhang X.G., Olive D., Devos J. et al. Malignant plasma cell lines express a functional CD28 molecule. *Leukemia* 1998;12(4):610–8. DOI: 10.1038/sj.leu.240097.1.
54. Rozanski C.H., Utley A., Carlson L.M. et al. CD28 promotes plasma cell survival, sustained antibody responses, and BLIMP-1 upregulation through its distal PYAP proline motif. *J Immunol* 2015;194(10):4717–28. DOI: 10.4049/jimmunol.1402260.
55. Van Dongen J.J., Lhermitte L., Böttcher S. et al. EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow antibody panels for standardized N-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012;26(9):1908–75. DOI: 10.1038/leu.2012.120.
56. 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.
57. Alapat D., Coviello-Malle J., Owens R. et al. Diagnostic usefulness and prognostic impact of CD200 expression in lymphoid malignancies and plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol* 2012;137(1):93–100. DOI: 10.1309/AJCP59UORCYZEVQO.

Вклад авторов

Л.Ю. Гривцова: разработка дизайна статьи, написание текста рукописи, редактирование статьи;
 В.В. Лунин: анализ данных литературы, составление списка литературы;
 А.А. Семенова: техническое редактирование;
 В.Б. Ларионова: редактирование статьи;
 Г.С. Тумян: анализ клинических данных.

Authors' contributions

L.Yu. Grivtsova: article design development, article writing, article editing;
 V.V. Lunin: literature data analysis, compiling a list of references;
 A.A. Semenova: technical editing;
 V.B. Larionova: article editing;
 G.S. Tumyan: clinical data analysis.

ORCID авторов/ORCID of authors

Л.Ю. Гривцова/L.Yu. Grivtsova: <https://orcid.org/0000-0001-9103-9688>
 А.А. Семенова/A.A. Semenova: <https://orcid.org/0000-0001-5910-5892>
 В.Б. Ларионова/V.B. Larionova: <https://orcid.org/0000-0002-4614-606X>
 Г.С. Тумян/G.S. Tumyan: <https://orcid.org/0000-0002-5771-4413>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.
Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 15.12.2019. **Принята к публикации:** 25.01.2020.
Article submitted: 15.12.2019. **Accepted for publication:** 25.01.2020.