

DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-3-16-25



# Проточная цитометрия при диагностике плазмоклеточных опухолей и оценке минимальной остаточной болезни

Л.Ю. Гривцова<sup>1</sup>, Т.Ю. Мушкарина<sup>1</sup>, В.В. Лунин<sup>2</sup>, П.А. Зейналова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 249031 Обнинск, ул. Маршала Жукова, 10;

<sup>2</sup>Московский 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;

<sup>3</sup>Клинический госпиталь «Лапино» группы компаний «Мать и дитя»; Россия, 143081 Московская обл., д. Лапино, 1-е Успенское шоссе, 111

**Контакты:** Людмила Юрьевна Гривцова [grivtsova@mail.ru](mailto:grivtsova@mail.ru)

В статье рассмотрены особенности и возможности проточно-цитометрической диагностики плазмоклеточных опухолей от моноклональной гаммапатии неясного значения IgM-типа до плазмоклеточной миеломы с учетом классификации опухолей лимфоидной и кроветворной тканей Всемирной организации здравоохранения (пересмотр 2017 г.) и клинических рекомендаций Национальной сети по борьбе с раком (NCCN, 2021). Описаны стандартизованные проточно-цитометрические протоколы (концепция Euro-Flow) и алгоритмы как диагностики плазмоклеточных опухолей, так и выявления минимальной остаточной болезни при множественной миеломе.

**Ключевые слова:** плазмоклеточная опухоль, проточная цитометрия, клональные плазмциты, аберрантность, минимальная остаточная болезнь, множественная миелома, классификация опухолей кроветворной лимфоидной системы

**Для цитирования:** Гривцова Л.Ю., Мушкарина Т.Ю., Лунин В.В., Зейналова П.А. Проточная цитометрия при диагностике плазмоклеточных опухолей и оценке минимальной остаточной болезни. Онкогематология 2021;16(3):16–25. DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-3-16-25.

## Flow cytometry in the diagnosis of plasma cell tumors and assessment of minimal residual disease

L. Yu. Grivtsova<sup>1</sup>, T. Yu. Mushkarina<sup>1</sup>, V. V. Lunin<sup>2</sup>, P. A. Zeynalova<sup>3</sup>

<sup>1</sup>A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center — branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; 10 Marshala Zhukova St., Obninsk 249031, Russia;

<sup>2</sup>P.A. Herten Moscow Oncology Research Institute — branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; 3 2<sup>nd</sup> Botkinskiy Proezd, Moscow 125284, Russia;

<sup>3</sup>Clinical Hospital “Lapino” of the “Mother and Child” Group of companies; 111 1<sup>st</sup> Uspenskoe Shosse, Lapino, Moscow region 143081, Russia

**Contacts:** Lyudmila Yu'evna Grivtsova [grivtsova@mail.ru](mailto:grivtsova@mail.ru)

The article considers the features and possibilities of flow cytometric diagnostics of plasma cell neoplasms, taking into account the classification of lymphoid and hematopoietic tissue tumors of the World Health Organization, revision of 2017 and the NCCN clinical recommendations, 2021. Standardized flow cytometric protocols (the Euro-Flow conception) and algorithms for both the diagnosis of plasma cell tumors and the detection of minimal residual disease in plasma cell myeloma are described.

**Key words:** plasma cell tumor, flow cytometry, clonal plasmocytes, aberrance, minimal residual disease, multiple myeloma, classification of hematopoietic lymphoid system tumors

**For citation:** Grivtsova L.Yu., Mushkarina T.Yu., Lunin V.V., Zeynalova P.A. Flow cytometry in the diagnosis of plasma cell tumors and assessment of minimal residual disease. Onkogematologiya = Oncohematology 2021;16(3):16–25. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-3-16-25.

## Введение

Плазмоклеточные опухоли — достаточно гетерогенная группа заболеваний, опухолевым субстратом при которых являются клональные, как правило иммуноглобулинсекретирующие, В-клетки терминальной стадии дифференцировки (плазматические клетки) с переключением класса тяжелых цепей иммуноглобулинов. Данные патологические В-клетки, патологические плазмциты, секретируют один тип моноклонального иммуноглобулина, так называемый М-протеин, присутствие которого определяется как моноклональная гаммапатия.

Плазмоклеточные опухоли занимают особое место в классификации опухолей лимфоидной и кроветворной систем в разделе зрелоклеточных В-клеточных опухолей с учетом их патогенеза. Настоящий раздел включает 5 типов плазмоклеточных неоплазий, в пределах которых различают отдельные варианты, а именно плазмоклеточную миелому (ПКМ) (и ее варианты); плазмцитому; заболевания, ассоциированные с отложением иммуноглобулинов в тканях (первичный амилоидоз и болезни накопления легких и тяжелых цепей); достаточно редкие клональные плазмоклеточные пролиферации, ассоциированные с паранеопластическим синдромом (POEMS-синдром и TEMPI-синдром); а также моноклональные гаммапатии неясного значения (MGUS) не-IgM-типа, которые в 25 % случаев трансформируются в ПКМ.

Другие иммуноглобулин-секретирующие зрелоклеточные В-клеточные заболевания, характеризующиеся наличием клональных В-лимфоцитов и плазматических клеток, включая лимфоплазмочитарную лимфому, болезни тяжелых цепей и моноклональные гаммапатии неопределенного значения IgM-типа, к разделу плазмоклеточных неоплазий настоящая классификация не относит [1].

Следует добавить, что согласно последней версии классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2017 г. термин «множественная миелома» заменен на термин «плазмоклеточная миелома».

## Проточная цитометрия в диагностике плазмоклеточных опухолей

Методы проточной цитометрии, широко используемые в настоящее время в рутинной диагностике острых лейкозов и лейкомизированных лимфом, являются достаточно полезным диагностическим инструментом и в отношении плазмоклеточных опухолей. Это не случайно, поскольку именно проточная цитометрия — один из наиболее удобных инструментов изучения такого важного модулирующего болезнь органа, как костный мозг. Именно проточная цитометрия дает возможность изучения гетерогенных клеточных популяций костного мозга, причем не только в качественном эквиваленте (иммунофенотипические особенности, субпопуляционный состав), но и, что особенно важно, в количественном.

Согласно классификации ВОЗ 2017 г. даже в случае различных вариантов моноклональной гаммапатии неясного генеза целесообразно подтверждение клональности плазматических клеток с применением методов проточной цитометрии [1]. Это важно в отношении прогноза, так как выявление среди плазматических клеток значительной пропорции клональных плазмцитов приводит к высокому риску прогрессирования заболевания и развитию множественной миеломы (табл. 1).

Согласно международным клиническим рекомендациям Национальной сети по борьбе с раком (NCCN, 3-я версии, 2021) на диагностическом этапе многопараметровая проточная цитометрия является одним из важных методов в определении диагноза, при этом необходима и рекомендована иммунологическая характеристика именно аспирационного пунктата костного мозга параллельно с морфологической оценкой (миелограмма) и иммуногистохимическим исследованием трепанобиоптата костного мозга. Динамическая (каждые 3–6 мес) детальная иммунологическая характеристика состава костного мозга и субстрата заболевания методом многопараметровой проточной цитометрии рекомендована в случае тлеющей ПКМ высокого риска и плохого прогноза, независимо от клинической тактики [2].

Для успешной реализации проточно-цитометрического подхода имеется несколько принципиальных моментов, а именно преаналитический этап, детально описанный нами ранее [3]. Важно параллельное выполнение морфологического исследования (миелограмма) и иммунофенотипирования методом проточной цитометрии из одной пробирки, т.е. должен исследоваться материал одной и той же аспирационной пункции костного мозга.

В контексте проточной цитометрии важным моментом считается подбор оптимальных наборов моноклональных антител и реагентов. Основой иммунофенотипической диагностики плазмоклеточных опухолей является прежде всего выявление клеток плазматической природы. В качестве стандартного маркера плазмцитов достаточно давно используется антиген CD38. Данный маркер очень широко представлен на различных клетках организма, в том числе негемопоэтических. Среди клеток кроветворной природы экспрессия этого антигена является наиболее выраженной на клетках плазматической линии (рис. 1). Цитограммы на рис. 1, а, б представляют образцы костного мозга с различным содержанием плазмцитов, цитограмма на рис. 1, в — пример присутствия выраженной пропорции плазмобластов в образце периферической крови больного с плазмоклеточным лейкозом.

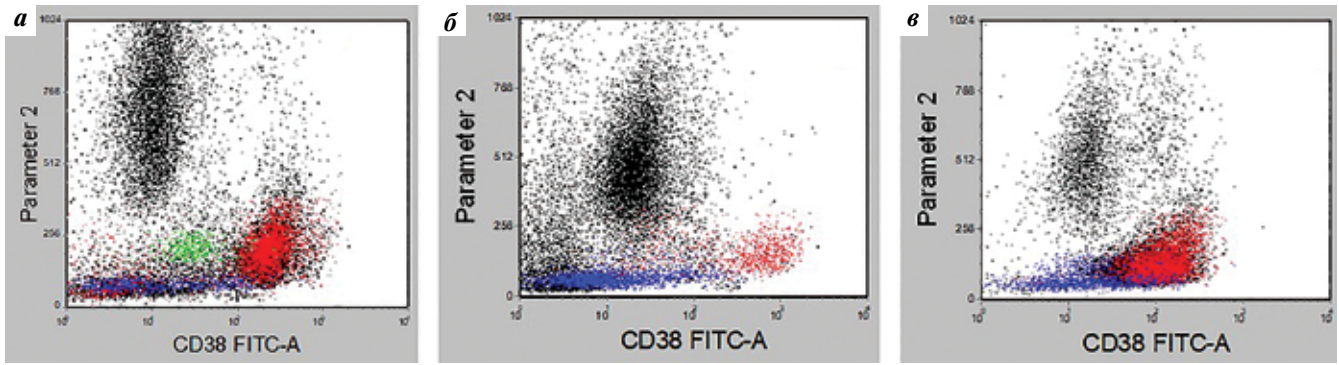
В дополнение для более аккуратного выявления плазмцитов предложен такой маркер, как синдекан 1, или антиген CD138. Необходимо обратить внимание на такой важный факт, как отсутствие экспрессии синдекана 1 у некоторых больных на части миеломных

**Таблица 1.** Показания к проведению многопараметровой проточной цитометрии при диагностике плазмноклеточных опухолей (в соответствии с классификацией Всемирной организации здравоохранения 2017 г.)

**Table 1.** Indications for multiparameter flow cytometry in the diagnosis of plasma cell tumors (according to the classification of the World Health Organization 2017)

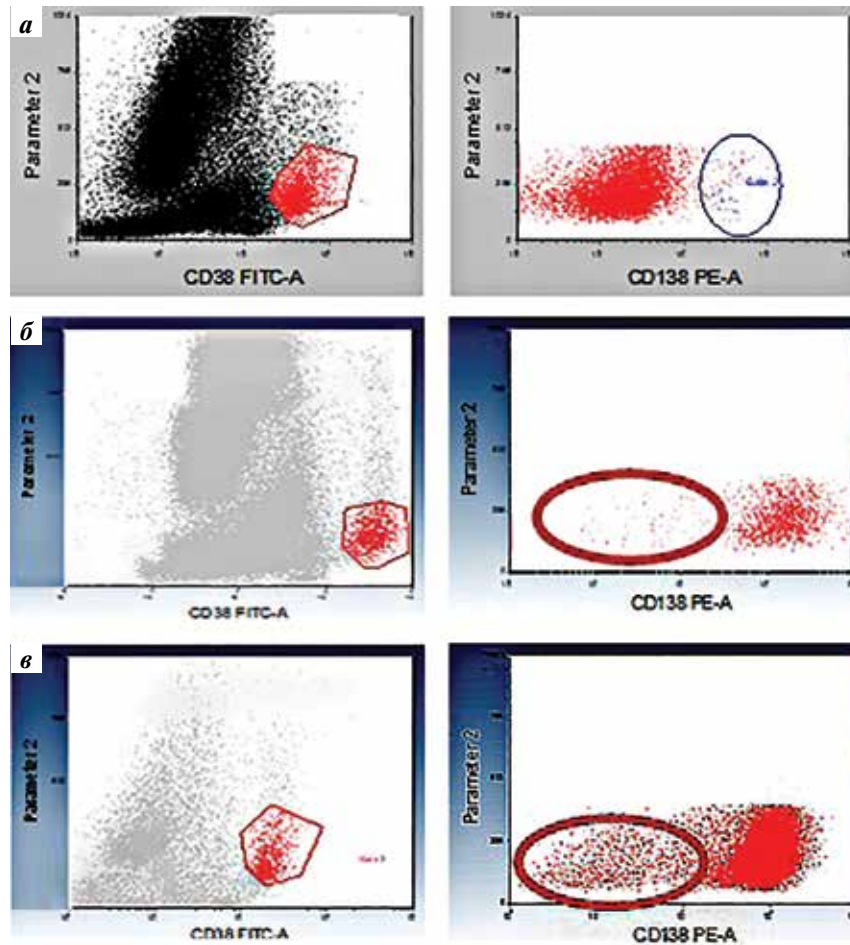
Нозологическая форма Nosological form	Диагностический критерий Diagnostic criterion	Проточная цитометрия Flow cytometry
He-IgM MGUS Non-IgM MGUS	Концентрация моноклонального сывороточного белка не-IgM <30 г/л. Инфильтрация ПК костного мозга <10 %. Отсутствие признаков органного поражения и амилоидоза Non-IgM monoclonal serum protein concentration <30 g/L. Bone marrow PC infiltration <10 %. Absence of organ damage and amyloidosis	Многопараметровая проточная цитометрия. Часто выявляются 2 популяции ПК: поликлональные с нормальным иммунофенотипом (CD38 <sup>++</sup> CD19 <sup>+</sup> /CD56 <sup>-</sup> ) и aberrантные моноклональные ПК (CD38 <sup>+</sup> /lowCD19 <sup>-</sup> CD56 <sup>-</sup> /+). <b>Пациенты с преобладанием aberrантных ПК (&gt;90 %) имеют высокий риск развития множественной миеломы</b>
MGUS легкие цепи MGUS light chains	Измененное соотношение свободных легких цепей (<0,26 или >1,654). М-протеин в моче >500 мг/24 ч, клональные ПК <10 %. Отсутствие признаков органного поражения и амилоидоза Altered ratio of free light chains (<0.26 or >1.654). M-protein in urine >500 mg/24 h, clonal PC <10 %. Absence of organ damage and amyloidosis	Multiparameter flow cytometry. Two populations of PC are often identified: polyclonal with normal immunophenotype (CD38 <sup>++</sup> CD19 <sup>+</sup> /CD56 <sup>-</sup> ) and aberrant monoclonal PC (CD38 <sup>+</sup> /lowCD19 <sup>-</sup> CD56 <sup>-</sup> /+). <b>Patients with a predominance of aberrant PC (&gt;90 %) have a high risk of developing multiple myeloma</b>
Плазмноклеточная миелома Plasma cell myeloma	Клональные ПК в костном мозге ≥10 %. Признаки поражения органов (гиперкальциемия, почечная недостаточность, поражение костей, анемия) Clonal PC in bone marrow ≥10 %. Symptoms of organ damage (hypercalcemia, renal failure, bone lesion, anemia)	Моноклональные ПК (цитоплазматические Ig и отсутствие мембранных Ig) CD38 <sup>+</sup> CD138 <sup>++</sup> с aberrантным иммунофенотипом Monoclonal PC (cytoplasmic Ig and absent of membrane Ig) CD38 <sup>+</sup> CD138 <sup>++</sup> with aberrant immunophenotype
Бессимптомная (тлеющая) миелома Asymptomatic (smoldering) myeloma	Сывороточный или уринарный М-протеин (>30 г/л и 500 мг/24 ч соответственно), клональные ПК 10–80 % в костном мозге при отсутствии органных симптомов, ассоциированных с миеломой, и амилоидоза Serum or urinary M-protein (>30 g/L and 500 mg/24 h, respectively), clonal PC 10–80 % in the bone marrow in the absence of organ symptoms associated with myeloma and amyloidosis	
Плазмобластный лейкоз Plasmablastic leukemia	Клональные ПК в периферической крови >20 % (2,0 × 10 <sup>9</sup> /л), плазмцитоподобная инфильтрация костного мозга Clonal PC in peripheral blood >20 % (2.0 × 10 <sup>9</sup> /L), plasmacytoid bone marrow infiltration	Проточная цитометрия образцов периферической крови и костного мозга Flow cytometry of peripheral blood and bone marrow samples
Плазмоцитома Plasmacytoma	Нет вовлечения костного мозга No bone marrow involvement	Не показана Not indicated
Болезнь накопления Ig Ig storage disease		
Плазмноклеточные опухоли, ассоциированные с паранеопластическим синдромом Plasma cell tumors associated with paraneoplastic syndrome	Количество aberrантных ПК Number of aberrant PC	Рекомендована Recommended

**Примечание.** Ig — иммуноглобулин; MGUS — моноклональная гаммапатия неясного значения; ПК — плазматические клетки.  
**Note.** Ig — immunoglobulin; MGUS — monoclonal gammopathy of undetermined significance; PC — plasma cells.



**Рис. 1.** CD38 как основной маркер плазматических клеток. Проточно-цитометрический анализ образцов 3 пациентов. Все цитогаммы представлены в виде параметров SSC (ось ординат) и экспрессии CD38 (ось абсцисс). CD38<sup>+</sup>-плазматические клетки выделены красным цветом, лимфоциты — синим цветом: а, б — образцы костного мозга 2 пациентов с различным содержанием плазматических клеток: в первом случае количество плазматических клеток составило 56 % от ядросодержащих клеток костного мозга, во втором — 2,3 %; в — образец периферической крови пациента с плазмобластным лейкозом (количество плазматических клеток — 61 % от лейкоцитов крови)

**Fig. 1.** CD38 — as the main marker of plasma cells. Flow cytometric analysis of samples from three different patients. All cytograms are presented in the parameters SSC (ordinate axis) and CD38 expression (abscissa axis), CD38<sup>+</sup> plasma cells are highlighted in red, lymphocytes — in blue; а, б — bone marrow samples of 2 patients with different plasma cell content, in the first case the number of plasma cells was 56 % of the nucleated bone marrow cells, and in the second — 2.3 %; в — a sample of peripheral blood of a patient with plasmoblastic leukemia (plasma cells — 61 % of blood leukocytes)



**Рис. 2.** Особенности экспрессии CD138 на патологических плазмоцитах. Проточно-цитометрический анализ образцов костного мозга 3 пациентов с плазмноклеточной миеломой: а — цитогаммы пациента 1, у которого большинство плазматических клеток CD38<sup>+</sup> не экспрессирует синдекан 1, синим цветом выделена незначительная часть плазмоцитов CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>; б — цитогаммы пациента 2, у которого отрицательные клетки по синдекану 1 практически отсутствуют (правая цитогамма); в — цитогаммы пациента 3, у которого выявляется отчетливая, но незначительная популяция CD38<sup>+</sup>CD138-клеток (обозначена красной линией)

**Fig. 2.** Features of CD138 expression on pathological plasmocytes. Flow cytometric analysis of bone marrow samples from 3 plasma cell myeloma patients: а — the first patient in whom the majority of CD38 plasma cells do not express syndecan-1, an insignificant proportion of CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> plasmocytes is highlighted in blue; б — the second patient has almost no negative cells in syndecan-1 (right cytogram); в — the third patient has a distinct but insignificant population of CD38<sup>+</sup>CD138 cells (indicated by a red line)



клеток (рис. 2). Приведен иммунофенотипический анализ костного мозга 3 различных больных, у каждого из них среди плазматических CD38<sup>++</sup>-клеток выявляется различное количество CD138-негативных плазматических клеток, наибольшая их пропорция отмечена у пациента 1 (рис. 2, а, справа). Несмотря на то что частота таких случаев невысока, факт является клинически значимым. Установлено, что больные ПКМ, у которых выявляется отчетливая пропорция CD138-клеток, имеют худший прогноз и высокую вероятность рецидива [4].

Следующий этап в иммунологической диагностике плазмноклеточных опухолей — подтверждение злокачественной природы плазматических клеток на основании их иммунофенотипа. Одним из валидированных в данном отношении подходов является 6-параметровый протокол, разработанный ведущей командой по изучению множественной миеломы под руководством А.С. Rawstron для такой важной цели, как выявление остаточных патологических плазмцитов (клеток минимальной остаточной болезни (МОБ)) в процессе лечения (табл. 2) [5].

При этом основными маркерами, отличающими патологические плазмциты от нормальных, считаются антигены CD56, CD19 и CD81, остальные маркеры (антигены CD28, CD117) являются значимыми в плане прогноза заболевания.

Методы постепенно отрабатывались и более чем 10 лет назад Европейское общество по изучению миеломы рекомендовало 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 плазмцитов.

В ходе многочисленных исследований установлено, что большинство нормальных плазматических клеток костного мозга 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

**Таблица 2.** Первая валидированная панель диагностики плазмноклеточной миеломы и выявления клеток минимальной остаточной болезни при множественной миеломе (адаптировано из [5, 6])

**Table 2.** The first validated panel for plasma cell myeloma diagnosis and detection of minimal residual disease cells in multiple myeloma (adapted from [5, 6])

Проба Tube	FITC	PE	PerCPcy5.5	PC7	APC	APCC750
1	CD27	CD56	CD19	CD38	CD138	CD45
2	CD81	CD117	CD19	CD38	CD138	CD45

**Таблица 3.** Наиболее значимые маркеры патологических (опухолевых) плазмцитов (адаптировано из [6])

**Table 3.** The most significant markers of pathological (tumor) plasma cells (adapted from [6])

АГ AG	Нормальный профиль экспрессии Normal expression profile	Аберрантный профиль Aberrant profile	Случаи плазмноклеточной миеломы с данной аберрацией, % Plasma cell myeloma cases with this aberration, %	Необходимость для диагностики и мониторинга Relevance for diagnosis and monitoring
CD19	АГ+ (более 70 %) AG+ (more than 70 %)	Негативность Negativity	95	Необходимо Necessary
CD56	АГ– (менее 15 %) AG (less than 15 %)	АГ++ AG++	75	Необходимо Necessary
CD117	АГ– (0 %) AG– (0 %)	Позитивность Positivity	30	Рекомендовано Recommended
CD20	АГ– (0 %) AG– (0 %)	Позитивность Positivity		Рекомендовано Recommended
CD28	АГ–/слабо+ (менее 15 %) AG–/weak + (less than 15 %)	АГ++ AG++	15–45	Рекомендовано Recommended
CD27	АГ++ (100 %) AG++ (100 %)	Слабо+ или отрицательно Weak+ or negative	40–50	Рекомендовано Recommended

**Примечание.** АГ — антиген.  
**Note.** AG — antigen.

Таблица 4. Диагностическая панель плазмноклеточных опухолей консорциума Euro-Flow (2012)

Table 4. Plasma cell tumors diagnostic panel of the Euro-Flow consortium (2012)

Проба Tube	PB	PO	FITC	PE	PerCPcy5.5	PeCy7	APC	APC-H7
1	CD45	CD138	CD38	CD28	CD27	CD19	CD117	CD81
2	CD45	CD138	CD38	CD56	$\beta$ 2-m	CD19	CyIg $\kappa$	CyIg $\lambda$

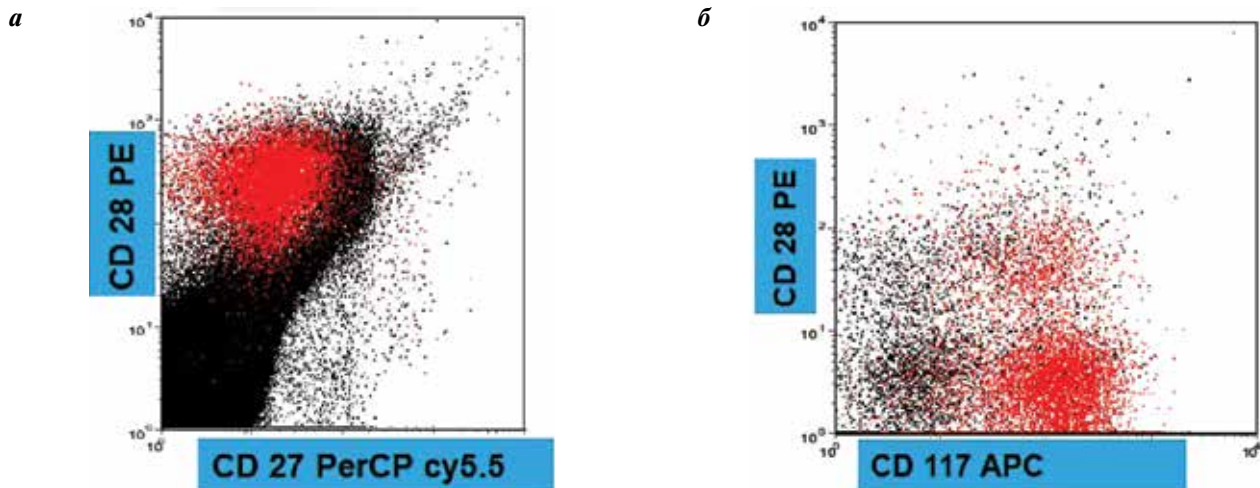


Рис. 3. Иммунологические маркеры прогноза при плазмноклеточной миеломе. Иммунофенотипическая характеристика плазматических клеток 2 больных. На цитограммах плазматические клетки выделены красным цветом. В первом случае (а) плазматические клетки имеют иммунофенотип  $CD28^+CD27^-$ , что является признаком плохого прогноза. Во втором случае (б) плазматические клетки имеют иммунофенотип  $CD117^+CD28^-$ , что свидетельствует о благоприятном прогнозе

Fig. 3. Immunological prognostic markers in plasma cell myeloma. Immunophenotypic characteristics of plasma cells in 2 patients. On cytograms, plasma cells are highlighted in red. In the first case (a), plasma cells have the  $CD28^+CD27^-$  immunophenotype, which is a sign of a poor prognosis. In the second patient (b), plasma cells have the  $CD117^+CD28^-$  immunophenotype, which indicates a favorable prognosis

маркер CD56. Однако необходимо учитывать, что, как и в случае с CD28, часть нормальных плазмцитов может экспрессировать данные антигены. Рекомендации, приведенные в табл. 3, сохраняют свою актуальность и в настоящее время.

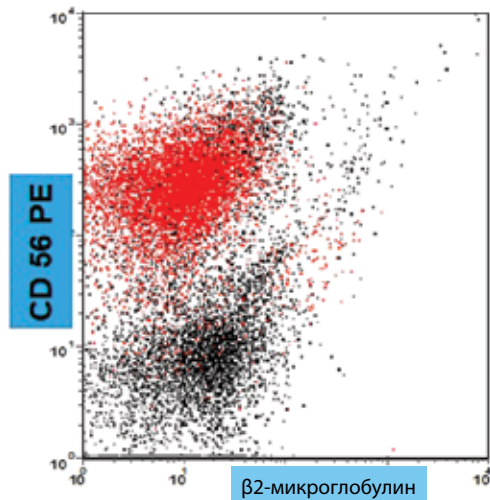
Своего рода переломным для иммунологической диагностики опухолей кроветворной системы стал 2012 г., когда европейским консорциумом специалистов по проточной цитометрии Euro-Flow был предложен новый алгоритм иммунофенотипической диагностики, включающий в том числе и диагностику плазмноклеточных опухолей [7]. Этот алгоритм, касающийся всех опухолей лимфоидной и кроветворной систем, стал первым реальным шагом к стандартизации проточно-цитометрических подходов. Данный подход в отношении диагностики плазмноклеточных опухолей предполагал использование 2 проб, содержащих моноклональные антитела к 8 антигенам каждая. При этом были учтены практически все необходимые маркеры для аккуратного и точного выявления и описания плазматических клеток при первичной диагностике и маркеры, позволяющие разграничивать нормальные плазматические клетки от патологических. Основные маркеры плазматических клеток CD38 и CD138 присутствуют в обеих пробах (табл. 4).

При этом необходимо отметить, что были подобраны оптимальные комбинации не только антител, но и флуорохромных меток, что является существенным при проведении цитометрического анализа.

Предложенный консорциумом Euro-Flow подход позволяет легко разделять патологические клоны и остаточные нормальные плазматические клетки.

Для каких же целей мы должны использовать такую подробную широкую иммунологическую диагностику, если, казалось бы, достаточно просто определить количество патологических клеток? Необходимо подтверждение их клональности, кроме того, за диагнозом следует оценка прогноза. Среди маркеров прогноза даже экспрессия плазматических антигенов уже может быть значимой, как указано выше в отношении синдекана 1. Также значимыми в отношении прогноза являются антиген CD27, выявление которого на опухолевых плазматических клетках — знак хорошего прогноза, а также оценка вариантов коэкспрессии антигенов CD28 и с-kit рецептора, антигена CD117 (рис. 3). В данном случае проточная цитометрия и иммунофенотип — инструменты для возможной дополнительной риск-стратификации пациентов.

Еще одним маркером прогноза оказался мембранный (экспрессируемый на мембране плазматических



**Рис. 4.** Прогностическая роль мембранного  $\beta 2$ -микроглобулина. Проточно-цитометрический анализ экспрессии  $\beta 2$ -микроглобулина на мембране плазматических клеток костного мозга, которые в данном случае демонстрируют иммунофенотип  $CD56^{++}$   $\beta 2$ -микроглобулина, что свидетельствует в пользу плохого прогноза

**Fig. 4.** Prognostic role of membrane  $\beta 2$ -microglobulin. Flow cytometric analysis of  $\beta 2$ -microglobulin expression on bone marrow plasma cells membrane, which in this case demonstrate the  $CD56^{++}$   $\beta 2$ -microglobulin-immunophenotype, which indicates a poor prognosis

клеток)  $\beta 2$ -микроглобулин. Прогностическая роль данного показателя оказалась противоположной значимости выявления этого маркера в сыворотке крови, высокие уровни которого достоверно определяют группу хорошего прогноза [8]. В то же время группу плохого прогноза с точки зрения экспрессии  $\beta 2$ -микроглобулина на мембране плазматических клеток характеризует присутствие меньшего количества антигенположительных клеток (рис. 4).

### Проточная цитометрия и оценка минимальной остаточной болезни при плазмоклеточной миеломе

Кроме прогноза, есть еще один очень важный момент, определяющий необходимость подробной иммунофенотипической характеристики клеток при плазмоклеточных опухолях и в первую очередь при множественной миеломе. Исследование костного мозга при множественной миеломе долгое время было краеугольным камнем оценки заболевания при отсутствии измеряемого моноклонального белка в сыворотке или моче, независимо от того, шла речь о полном ответе или строгом полном ответе. В 2011 г. рабочей группой по миеломе введено такое понятие, как иммунофенотипическая ремиссия — оценка величины остаточного клона опухоли в костном мозге методом проточной цитометрии [9]. Подобный анализ, как уже сказано ранее, может дать количественную и качественную оценку любых остаточных опухолевых клеток в костном мозге, включая опухолевые плазмциты и нормальные регенерирующие плазматические клетки. Этот момент также нашел отражение в международных клинических рекомендациях, согласно которым имму-

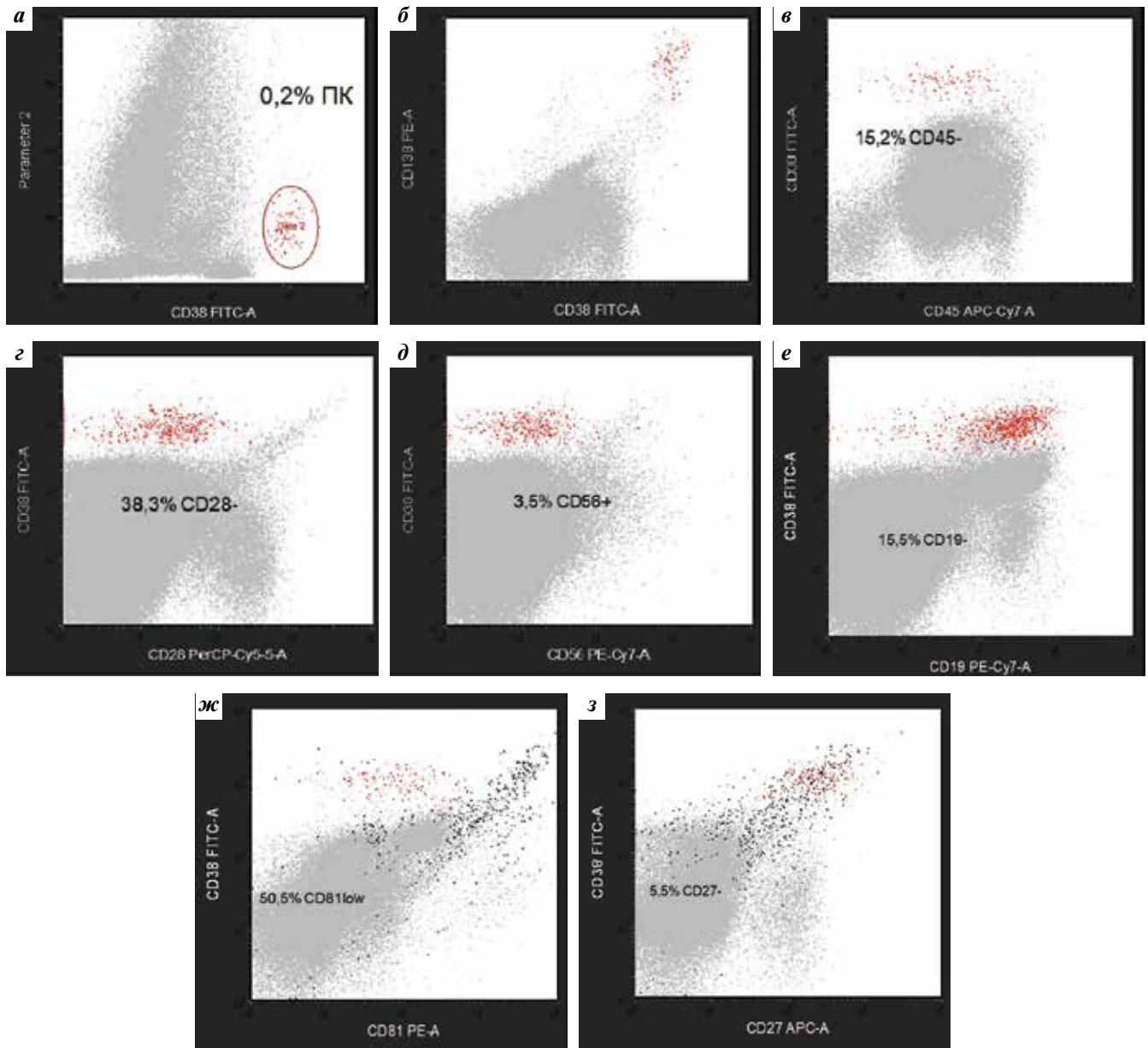
нологическое исследование методом проточной цитометрии (оценка МОБ) должно быть выполнено у больных множественной миеломой на этапе окончания лечения, после проведения высокодозной химиотерапии с аутологичной трансплантацией стволовых кроветворных клеток или после аллогенной трансплантации на этапе начала регенерации костного мозга (100 дней с момента аутологичной/аллогенной трансплантации костного мозга), а также на этапе поддерживающей терапии.

В настоящее время достаточной с точки зрения чувствительности выявления клеток МОБ является 6-параметровая проточная цитометрия, что позволяет достоверно выявлять клетки МОБ у 95 % больных ПКМ. При этом использование 4–5-параметровой проточной цитометрии также допустимо и дает возможность четкого выявления клеток МОБ у 90 % больных. Так, на рис. 5 приведен пример выявления МОБ у больного по завершении лечения с применением 6-параметровой проточной цитометрии. Плазматические клетки в этом случае составили 0,2 % в пределах миелокариоцитов, небольшая часть из них (15,2 %) демонстрировала совокупный aberrantный иммунофенотип  $CD38^{+}CD138^{+}CD19^{-}CD45^{-}CD81^{low}$ , что, несмотря на отсутствие среди них плазматических клеток  $CD56^{+}$ , позволило (на основании отсутствия экспрессии  $CD19$  и  $CD45$  и слабой экспрессии  $CD81$ ) расценить случай как МОБ-положительный — 0,03 % aberrantных плазматических клеток в пределах миелокариоцитов.

С учетом высокой значимости метода в отношении оценки количества клеток МОБ и нормальных плазматических клеток в момент начала восстановления костного мозга после проведения аутологичной/аллогенной трансплантации костного мозга [10] 6-параметровой проточной цитометрии оказалось недостаточно, и консорциумом Euro-Flow была предложена усовершенствованная 8-параметровая панель для диагностики МОБ при ПКМ, отличная от используемых при первичной диагностике заболевания (табл. 5). При этом из протокола исключены антигены  $CD28$ ,  $\beta 2$ -микроглобулин ввиду их меньшей роли в разграничении регенерирующих и клональных плазматических клеток (большая значимость в отношении прогноза при первичной диагностике) [10–12]. В проспективном валидированном исследовании 2 центров были показаны надежность и клиническая значимость предложенного метода.

С помощью данного подхода разграничение нормальных, регенерирующих плазмцитов и опухолевого клона в целом сложностей не представляет, при этом каждая популяция может быть оценена количественно.

Введение в практику проточных цитометров более высокого разрешения позволило к данному моменту апробировать консорциуму Euro-Flow протоколы, использующие более 8 параметров, например 10-параметровый протокол, предлагающий к оценке следующую комбинацию антигенов:  $CD138/CD27/CD117/CD38/$



**Рис. 5.** Пример 6-параметровой проточной цитометрии при оценке количества клеток минимальной остаточной болезни при плазмноклеточной миеломе. На всех цитограммах плазматические клетки выделены красным. Цитограммы а, б – выделение плазматических клеток на основании CD38 и CD138, в данном случае плазматические клетки составили 0,2 % среди ядродержащих клеток костного мозга. На цитограммах в–з по оси ординат – экспрессия антигена CD38, по оси абсцисс – маркеры aberrантности: в – отсутствие на 15,2 % плазматических клеток антигена CD45; г – слабая экспрессия на большинстве плазматических клеток антигена CD28; д – большинство плазматических клеток CD56<sup>+</sup>; е – 15,5 % плазматических клеток не экспрессируют CD19; ж – большинство плазматических клеток слабо экспрессируют CD81; з – большинство плазматических клеток CD27<sup>+</sup>

**Fig. 5.** Example of 6-parameter flow cytometry for estimating the number of minimal residual disease cells in plasma cell myeloma. On all cytograms, plasma cells are highlighted in red. Cytograms а, б – isolation of plasma cells based on CD38 and CD138, in this case, plasma cells accounted for 0.2 % of the nucleated bone marrow cells. On cytograms в–з, the expression of CD38 antigen is along the ordinate axis, aberrance markers are located along the abscissa axis: в – absence of CD45 antigen on 15.2 % of plasma cells; г – weak expression of CD28 antigen on most plasma cells; д – the most of plasma cells is CD56 positive; е – the 15.5 % of plasma cells do not express CD19; ж – the most of plasma cells weakly express CD81; з – the majority of plasma cells is CD 27 positive

CD56/CD45/CD19/CyIgk/CyIg/CD81. Использование 10-цветной проточной цитометрии, несомненно, повысило чувствительность методики и обеспечило возможность одномоментного анализа большинства важных для выявления маркеров МОБ ПКМ.

Важно, что использование таких многопараметровых подходов (10 параметров и более) позволяет оценить количество клеток МОБ при отсутствии данных по первичному образцу (в отличие от полимеразной цепной реакции и секвенирования нового поколения)



Таблица 5. Усовершенствованная панель консорциума Euro-Flow для оценки количества клеток минимальной остаточной болезни

Table 5. Revised Euro-Flow Consortium Panel for Minimum Residual Disease Cell Count

Проба Tube	FITC	PE	PerCPcy5.5	PC7	APC	APCC750	V450	BV510
1	CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81	CD138	CD27
2	CD38	CD56	CD45	CD19	CyIgκ	CyIgλ	CD138	CD27

и может быть выполнено на любом этапе лечения больного.

Однако и этого на данном этапе существующих терапевтических стратегий оказывается недостаточно. В клиническую практику активно входят такие терапевтические агенты, как моноклональные антитела. В случае плазмоклеточных опухолей их мишенью является антиген CD38. Понятно, что в этом случае выявление клеток МОБ не может опираться на данный антиген и требуются альтернативные комбинации маркеров. В настоящее время изучаются такие антигены, как CD319, CD54, CD229, среди которых последний оказался наиболее информативным. При этом 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.

### Заключение

Таким образом, метод проточной цитометрии при плазмоклеточных опухолях — необходимая интегральная часть лабораторных исследований, определяющая диагноз, риск-стратификацию и обеспечивающая мониторинг ответа на терапию. Кроме того, это очень важный инструмент научных исследований в контексте ПКМ, позволяющий изучать патогенез заболевания, включая такую важную часть, как микроокружение опухоли, и выявлять новые терапевтические мишени.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. WHO Classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues (revised 4<sup>th</sup> edn). Lyon: JARC, 2017.
2. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Version 3.2021.
3. Гривцова Л.Ю., Лунин В.В., Семенова А.А. и др. Минимальная остаточная болезнь при плазмоклеточной (множественной) миеломе: проточно-цитометрические подходы. Онкогематология 2020;15(1):40–50. [Grivtsova L.Yu., Lunin V.V., Semenova A.A. et al. Minimal residual disease in plasma cell (multiple) myeloma: flow cytometric approaches. Oncohematology 2020;15(1):40–50. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2020-15-1-40-50.
4. 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.
5. Rawstron A.C., Davies F.E., DasGupta R. et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: The relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. Blood 2002;100(9):3095–100. DOI: 10.1182/blood-2001-12-0297.
6. 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.
7. Van Dongen J.J., Lhermitte L., Böttcher S. et al. Euro-Flow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). Euro-Flow 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.
8. 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.
9. 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.
10. Mateo G., Montalbán 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.
11. 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.
12. 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.

**Вклад авторов**

Л.Ю. Гривцова: анализ публикаций по теме статьи, разработка концепции статьи, написание теста рукописи, окончательная редакторская правка;

Т.Ю. Мушкарина: обработка данных проточной цитометрии;

В.В. Лунин: анализ данных мировой литературы;

П.А. Зейналова: редакторская правка.

**Authors' contributions**

L.Yu. Grivtsova: analysis of publications on the article topic, article concept, article writing, final article editing;

T.Yu. Mushkarina: processing of flow cytometry data;

V.V. Lunin: analysis of world literature data;

P.A. Zeynalova: article editing.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

Л.Ю. Гривцова / L.Yu. Grivtsova: <https://orcid.org/0000-0001-9103-9688>

Т.Ю. Мушкарина / T.Yu. Mushkarina: <https://orcid.org/0000-0002-1266-1792>

В.В. Лунин / V.V. Lunin: <https://orcid.org/0000-0001-8689-1227>

П.А. Зейналова / P.A. Zeynalova: <https://orcid.org/0000-0003-1564-424X>

**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.