

FLOWCYTOMETRICKÁ ANALÝZA PLAZMATICKÝCH BUNĚK U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF PLASMA CELLS IN MULTIPLE MYELOMA

KOVÁŘOVÁ L.^{1,2}, HÁJEK R.^{1,2,3}

¹ UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

² LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

³ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

Souhrn

Imunofenotypizace myelomových buněk přináší dostatek informací k charakterizaci a odlišení těchto heterogenních neoplastických plazmocytů od jejich normálních protějšků a své uplatnění tedy nalézá v diferenciální diagnostice. Stanovení antigenního profilu PC může též napomoci identifikaci prognostických markerů, které by vedly jednak k jednoznačnému stanovení diagnózy a určení pravděpodobnosti progresu u asymptomatických monoklonálních gamapatií, ale také k případnému hodnocení minimální reziduální choroby či účinnosti léčby u mnohočetného myelomu. Je snahou Evropské myelomové sítě (European Myeloma Network), EMN, sjednotit a standardizovat flowcytometrické vyšetření plazmocytů v rámci monoklonálních gamapatií.

Klíčová slova: monoklonální gamapie, mnohočetný myelom, plazmatické buňky, flowcytometrie.

Summary

Immunophenotyping of myeloma cells is used to characterize the malignant plasma cells and to distinguish them from their normal counterparts. Flow cytometry is mostly used for the diagnosis of plasma cell proliferations but a detailed analysis of plasma cell immunophenotype can identify disease markers that are associated with the progression of monoclonal gammopathy of unknown significance to multiple myeloma (MM), the prognosis of MM, the response to treatment, and the presence of minimal residual disease. The aim of the European Myeloma Network (EMN) is to unify and standardize immunophenotyping methods for the analysis of plasma cells in monoclonal gammopathies.

Keywords: monoclonal gammopathy, multiple myeloma, plasma cells, flow cytometry.

Úvod

Průtoková cytometrie se v diagnostice mnohočetného myelomu (MM) uplatňuje od 90. let 20. století, přestože se nejprve u plazmatických buněk (PC) věnovala spíše DNA analýze (15, 3). Postupně, s vývojem monoklonálních protilátek, se objevovaly údaje o fenotypu PC, které se dále zpřesňovaly (2, 33, 12, 36). Studovány byly také rozdíly ve fenotypu normálních a maligních PC (38, 9). Jako zásadní se jeví objev protilátky B-B4 proti znaku CD138 (Syndecan-1), který významně doplňuje identifikaci PC (39). Časem bylo vymezeno spektrum povrchových a intracelulárních markerů, které jsou i nadále využívány v analýzách fenotypu PC a jeho vztahu k diferenciální diagnostice onemocnění, nicméně v současnosti je stále více pozornosti věnováno také možnostem stanovení prognózy pacientů a detekci minimální reziduální choroby (MRN) (24, 4, 30).

Lidské plazmocyty tvoří heterogenní populaci buněk a mohou být rozděleny do několika podtypů. V lymfoidních tkáních se nacházejí proliferující plazmablasty s krátkou dobou života, v periferní krvi (PK) přechodné plazmatické buňky a v kostní dřeni (KD) se nalézají většinou neproliferující plazmocyty s dlouhou dobou života (20). Pro identifikaci všech typů PC je zásadní znak CD38, který je

na PC silně exprimován, přestože není jejich specifickým markerem (10). Je známo, že zralé neoplastické PC mohou CD38 exprimovat s nižší intenzitou než fyziologické PC (16). Naopak CD138 je exprimován pouze na PC, normálních i patologických, a to již ve stádiu prekurzorů (11). Ztráta exprese CD138 a jeho uvolnění do plazmy vede k apoptóze PC, což vypovídá o regulační funkci tohoto proteoglykanu (6). Další informaci přináší exprese znaku CD45, který mizí v průběhu diferenciace a na zralých PC již nebývá exprimován, avšak u cirkulujících či reaktivních nemaligních PC může být exprese zachována (27). Bylo zjištěno, že také v KD pacientů s MM existuje subpopulace CD45⁺ PC tvořící proliferující složku PC (32). Z hlediska posuzování „normality“ PC je důležitá exprese B lymfocytárního markeru CD19, tento může být využit pro identifikaci potenciálně fyziologických reziduálních PC, které vykazují polyklonální charakter, zatímco exprese znaku CD56 je významně častější u patologických monoklonálních PC (4, 22). Pro fyziologické PC je také charakteristická exprese znaku CD27, jehož exprese na PC se pojí s lepší prognózou pacientů (8). Naopak mezi aberrantně exprimované markery neoplastických PC jsou u pacientů s MM řazeny B-lymfocytární marker CD20, kostimulační molekula T lymfocytů CD28 a CD117 (c-KIT),

přičemž pro tyto znaky byl prokázán vztah mezi antigenním profilem PC, DNA ploidií a specifickými genetickými změnami (18).

Princip metody a její různé podtypy

Každá buňka je charakterizována systémem povrchových a intracelulárních antigenů, které mohou být využity k její identifikaci. Tzv. CD klasifikace (clusters of differentiation, CD) byla ustanovena v r. 1982 v Paříži, přičemž nejprve obsahovala pouze leukocytární antigeny, posléze byly zahrnuty i znaky dalších buněčných populací a v současné době už obsahuje 350 znaků (40).

Průtoková cytometrie využívá k identifikaci subtypů buněk jejich funkčních i strukturálních vlastností. Buňky v suspenzi jsou unášeny nosnou kapalinou a jedna po druhé se potkávají s paprskem laseru o určité vlnové délce, přičemž dochází jednak k rozptylu světla na buňkách, ale také k excitaci fluorochromů konjugovaných s protilátkami navázanými na buňkách. Pohlacená energie je následně emitována formou fluorescence, která je v přístroji dále zpracovávána. Všechny parametry získané převodem světelného signálu na elektronický na patřičných detektorech přístroje jsou zaznamenávány a uchovány. Výhodou oproti fluorescenčnímu mikroskopu je jednak vyšší množství současně použitých fluorochromů definujících jednotlivé antigeny, ale také podstatně vyšší množství analyzovaných částic. Klasická imunofenotypizace tedy využívá, kromě znalosti velikosti a granularity analyzovaných buněk, elektronickou „vizualizaci“ vazby protilátka-antigen, přičemž nejčastěji je využíváno komerčních monoklonálních protilátek. Při DNA analýze je „vizualizován“ obsah DNA v buňkách, a to prostřednictvím stechiometrické interkalace propidium jodidu (PI) mezi báze DNA analyzovaných buněk, které mohou být současně označeny navázanou protilátkou.

V současnosti je v imunofenotypických analýzách stále více využíváno nejen mnohobarevné (multicolor, multiparametric) průtokové cytometrie, ale také tzv. polychromatické průtokové cytometrie, která pracuje s kombinacemi 5-18 fluorescencí (17). Takovéto průtokové cytometry využívají k excitaci fluorochromů 1-4 laserů, ašak zatím se jedná spíše o experimentální přístup.

Vstupní materiál, požadavek na kvantitu a kvalitu, čistotu

K imunofenotypické analýze PC může být využita jednak KD, ale svůj diagnostický význam má také analýza PK, kde se mohou nacházet cirkulující PC. Obecně nejsou dány žádné požadavky na kvantitu, kvalitu a čistotu materiálu, přestože je zřejmé, že v případě KD by analýza měla být provedena nejlépe z 1. aspirátu. Vzorky PK i KD, odebrané do EDTA, by měly být zpracovány pokud možno do 24h od odběru.

Odkaz na platnou normu či závazné doporučení

Za základě dvou uskutečněných workshopů pořádaných Evropskou myelomovou sítí (European Myeloma Network, EMN) byl vytvořen „manuál“ pro analýzu PC, který obsahuje několik doporučení (30).

Specifická nastavení u MM

Všeobecně se soudí, že průtoková cytometrie není zásadním vyšetřením u MM, a to zejména proto, že existují další parametry a kritéria, která jednoznačně stanoví diagnózu (7). Na řadě pracovišť se tedy fenotypizace PC omezuje pouze na analýzu znaků CD38, CD138 a CD45 a stanovení zastoupení PC v PK i KD, přičemž nejsou prováděna přídatná vyšetření pro upřesnění fenotypu či klonality PC a jejich vztahu k prognóze pacientů.

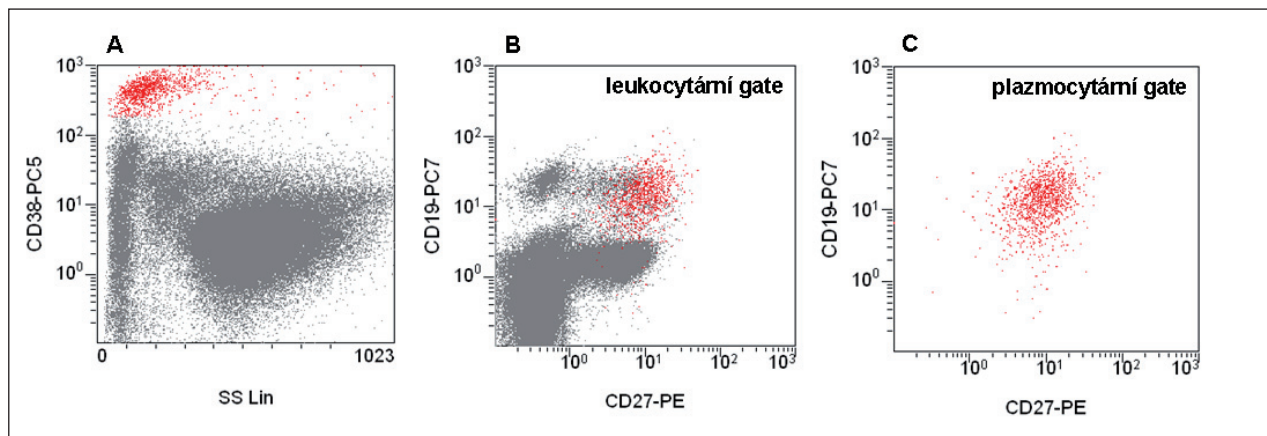
Při studiu cirkulujících PC v PK bylo zjištěno, že jejich množství je u nových pacientů s MM nezávislý prognostický faktor, kdy byla nalezena inverzní korelace mezi počtem cirkulujících PC a celkovým přežitím (23). Počty cirkulujících PC také reagují na léčbu (31), což umožňuje studovat souvislost mezi jejich množstvím a minimální reziduální chorobou (1; 13). Předpokládáme, že cirkulující PC pacientů s MM, převážně fenotypu CD38⁺⁺⁺CD138⁺⁺⁺CD45⁺CD19⁻CD56⁺, jsou známkou pokročilého stádia onemocnění a prognostický význam jejich počtu, případně i fenotypu, by měl být dále ověřen (14).

Jak morfologické, tak flowcytometrické stanovení infiltrace KD plazmocytů může vést k odlišení MGUS od MM, ale předpokládá se, že % PC stanovené pomocí flowcytometrie má větší prognostický význam nežli morfologicky stanovená infiltrace (19). Při využití kombinace markerů CD38, CD138 a CD45 je sice možno stanovit infiltraci PC v KD, avšak nemůže tak být získána informace o charakteru PC, což je důležité zejména z hlediska hodnocení reziduálních normálních PC u MGUS či případně u studia MRN léčených pacientů s MM. Jsou známy markery, které jsou s vysokou pravděpodobností exprimovány na normálních PC (CD19, CD27, CD81) a dále markery, jejichž exprese je naopak omezena především na maligní PC (CD56, CD117, CD20, CD28, CD200). Některé z těchto znaků zatím nejsou detailně prostudovány (např. CD81, CD200) a lze očekávat, že do budoucna se mohou objevit další markery hrající úlohu patofyziologii maligních PC (30, 4).

Pro potvrzení klonality PC je nutno analyzovat cytoplazmatickou expresi lehkých řetězců kappa a lambda, přičemž zde se uplatňuje 5-barevná analýza (CD38, CD138, CD45, κ , λ), obdobně jako u studia „normality“ PC (CD38, CD138, CD45, CD19, CD56).

V případě DNA analýzy, využívané ke stanovení % proliferujících PC a jejich ploidiie, se při využívání silné exprese CD38 na PC, jelikož intenzita exprese znaku CD138 není ve většině případů dostatečná pro odlišení plazmocytů od ostatních leukocytů (37). DNA aneuploidie je u MM považována za genetický marker malignity, aneuploidní PC i klonální B lymfocyty lze nalézt v PK, KD a též v separátu krevních kmenových buněk (peripheral blood stem cells, PBSC) (35). Bylo taktéž prokázáno, že ke změnám v obsahu DNA dochází v čase od stanovení diagnózy do progresu onemocnění velmi zřídka (5).

Rozšířená imunofenotypizace PC je nejčastěji prováděna na výzkumných pracovištích či v případě nejasné diagnózy, nicméně sjednocení postupů, kombinací použitých znaků a také nastavení přístrojů v rámci různých pracovních skupin je nezbytné a v současnosti se jím zabývá EMN (30). Standardizace vyšetření plazmocytů u monoklonál-



Obrázek č. 1: Fenotyp fyziologických paměťových PC. Na dotplorech jsou červeně zvýrazněny CD38⁺⁺ PC. (A) Fyziologické PC jsou silně pozitivní na znak CD38. (B) Expres znaků CD19 a CD27 v rámci leukocytů. (C) Expres znaků CD19 a CD27 na CD38⁺⁺ PC.

ních gamapatií a nalezení významu stavajících i nově identifikovaných znaků exprimovaných na PC patří tak mezi hlavní cíle EMN.

Specifické problémy u MM

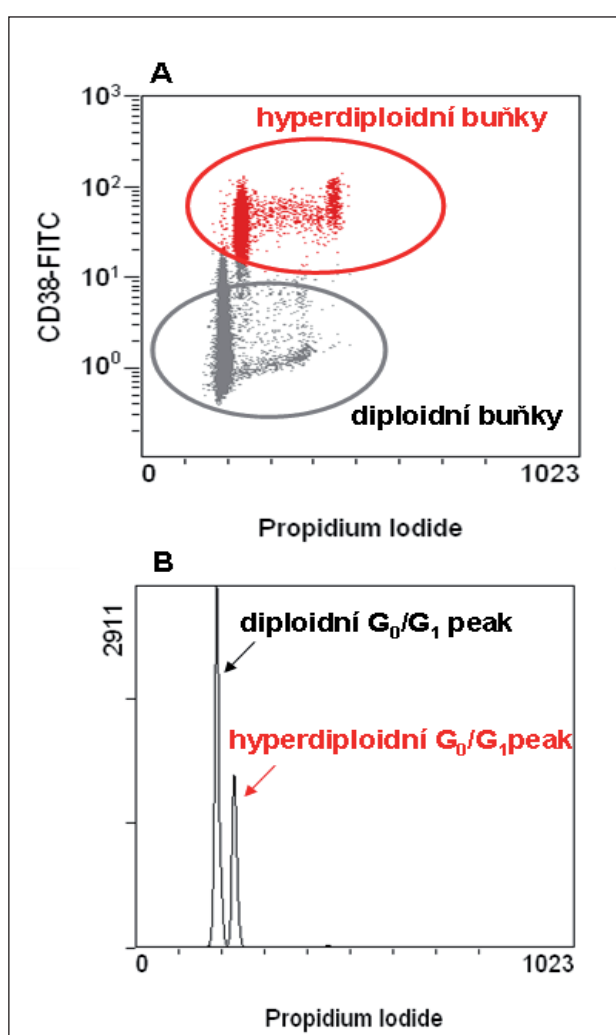
1. Morfologicky zjištěné množství PC v kostní dřeni neodpovídá zcela flowcytometrickému nálezu, avšak je známo, že první aspirát kostní dřene - určený pro morfologické hodnocení - je vždy bohatší na plasmocyty, jelikož se zvyšujícím se objemem odběru KD dochází k jejímu postupnému ředění periferní krví a ztrátě obsahu PC. Důvodem mohou být také chyby v počítání buněk a exprese některých adhezivních molekul (30). Snaha získat pokud možno první mililitry KD může kolidovat s požadavky na jiná vyšetření (genetika, angiogeneze, genomika aj.). Výhodou flowcytometrie je relativní nezávislost exprese markerů na infiltraci KD, což je zaručeno vymezením a hodnocením pouze populace PC. DNA analýza je však při nízké infiltraci KD nevypovídající.

2. Jelikož infiltrace KD může být v rámci pacientů s MGUS i MM nízká, je pro dosažení dostatečné citlivosti flowcytometrie potřebné analyzovat vyšší počty leukocytů tak, aby bylo pro danou zkumavku získáno alespoň 100 plasmocytů (30). Při infiltraci 0,05% PC to může znamenat sběr min. 0,2 miliónu buněk a získ objemného datového souboru. Proto lze využít i tzv. 2-krokového systému získávání buněk, kdy je nejprve analyzováno několik tisíc buněk plné KD a poté je pomocí elektronického gate vymezena požadovaná populace PC (např. CD38⁺CD138⁺ bb), na které je dále prováděna samotná analýza (34, 28).

3. Ve vybraných případech může být odběr KD neinformativní, a to jednak z důvodu problematického odběru (např. suchá punkce, vznik koagula v odebraném vzorku), s následným zkresleným % infiltrace PC. Zřejmě též může nastat situace, kdy při odběru nemusí být zaměřeno ložisko PC, a je tak získána informace o nízké infiltraci v KD s normálním fenotypem PC, která neodpovídá stavu pacienta (14).

Ukázka reprezentativního výsledku

Získaná data, matice zaznamenaných parametrů (velikost, granularita, fluorescence) ve formě tzv. listmode, můžeme



Obrázek č. 2: DNA analýza u pacienta s MM. Znázorněny jsou dvě populace buněk s rozdílným obsahem DNA. (A) Na dotplotu jsou červeně zvýrazněny CD38⁺⁺ PC, které tvoří oddělenou populaci s vyšším obsahem DNA (hyperdiploidní buňky) než má populace zbylých leukocytů (diploidní buňky). (B) Normálním diploidním buňkám na histogramu odpovídá peak G₀/G₁ fáze buněčného cyklu umístěný vlevo, zatímco populace hyperdiploidních PC s vyšším obsahem DNA, tvoří peak G₀/G₁ umístěný vpravo.

zobrazit ve formě 1-parametrového histogramu či případně 2-parametrového dotplotu. Nejprve však musíme vymezit populaci buněk, kterou máme v úmyslu analyzovat, a to tvorbou tzv. gate, kterým ohraničíme požadovanou populaci buněk (např. plazmocytární gate nám ze všech analyzovaných buněk vymezí pouze populaci plazmocytů). Výstupem z analýz je pak informace o relativním (%) či absolutním (počet bb/ul) počtu buněk, které vykazují pozitivitu/negativitu pro zvolený znak (viz Obrázek č.1 a č.2).

Význam metody u MM stávající

Flowcytometrické vyšetření PC, zejména stanovení normálního/aberrantního fenotypu a průkaz restrikce lehkého řetězce κ či λ , je doporučováno pro odlišení reaktivní a neoplastické plazmocytózy (30). Také v diagnostice monoklonálních gamapatií mohou existovat hraniční případy, např. doutnající mnohočetný myelom (smouldering multiple myeloma, SMM) či monoklonální gamapatie nejasného významu (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS), kdy průtoková cytometrie může identifikaci zastoupení a fenotypu PC napomoci diferenciální diagnostice či případně stanovit pravděpodobnost progresse onemocnění (28). Flowcytometrie se také uplatňuje v hodnocení minimální reziduální nemoci s obdobnou senzitivitou jako PCR a navíc s menší finanční i časovou náročností. Značnou výhodou při studiu minimální reziduální nemoci je také univerzálnost použitých markerů pro stanovení zastoupení normálních CD19⁺ a abnormálních CD56⁺ PC, přičemž, až na výjimky, není nutno znát původní fenotyp PC pacienta před léčbou (34, 29, 30). S rozvojem molekulárně-genetických technik se částečně ztratil význam DNA analýzy PC, přesto však je % proliferujících PC stále považováno za významný prognostický faktor a byl prokázán vztah mezi ploidií PC a specifickými chromozomálními změnami (18).

Význam metody u MM očekávaný

Flowcytometrické odlišení klonálních plazmocytů na základě stanovení povrchových znaků je významným přínosem pro rutinní laboratoře. Odpadlo by tak náročné stanovení cytoplazmatických lehkých řetězců, které navíc není vhodné pro vzorky s nízkou infiltrací. Mnohá pracoviště již publikovala získané výsledky týkající se studia vybraných parametrů souvisejících s progresí MGUS či SMM do pokročilejších stadií onemocnění (28). Také byl ověřován význam flowcytometrické analýzy při studiu minimální reziduální nemoci u léčených pacientů s MM (29, 34, 26). Potvrzení vztahu dalších povrchových znaků k normálním/maligním plazmocytům může dále ujasnit procesy zodpovídající za maligní transformaci plazmocytů.

Závěr

Flowcytometrie je účinný nástroj k analýze heterogenní populace plazmocytů a je zřejmé, že podrobnější analýza fenotypu je uplatnitelná na úrovni klinické i výzkumné. Je známa část markerů majících vztah k patofyziologii plazmocytů a jejich chování, nicméně stále jsou hledány další parametry s prediktivní i prognostickou hodnotou.

Lze předpokládat, že přidavným stanovením klonality plazmocytů prostřednictvím lehkých řetězců κ a λ bude jednoznačně ověřen přínos exprese znaků CD19 a CD56 pro určení normality/abnormality plazmocytů. Taktéž analýza vybraných znaků (CD20, CD27, CD28, CD81, CD117), s možnou aberrantní expresí na plazmocycitech, by měla vést k zisku informací o jejich charakteru a vztahu k typu onemocnění.

Poděkování

Podpořeno projekty: MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

Literatura

- Adam Z, Klabusay M, Vorlíček J, Hájek R. Detection of myeloma cells in the peripheral blood using flow cytometry. *Vnitř Lek*. 1997 Sep;43(9):592-598
- Anderson KC, Park EK, Bates MP et al. Antigens on human plasma cells identified by monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1983 Mar;130(3):1132-1133
- Barlogie B, Alexanian R, Gehan EA et al. Marrow cytometry and prognosis in myeloma. *J Clin Invest*. 1983 Sep;72(3):853-861
- Bataille R, Jégou 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 Sep;91(9):1234-1240
- Chng WJ, Winkler JM, Greipp PR et al. Ploidy status rarely changes in myeloma patients at disease progression. *Leuk Res*. 2006 Mar;30(3):266-271
- Dhodapkar MV, Abe E, Theus A et al. Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood*. 1998 Apr 15;91(8):2679-2688
- Greipp PR, San Miguel J, Durie BG et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005 May 20;23(15):3412-3420
- Guikema JE, Hovenga S, Vellenga E et al. CD27 is heterogeneously expressed in multiple myeloma: low CD27 expression in patients with high-risk disease. *Br J Haematol*. 2003 Apr;121(1):36-43
- Harada H, Kawano MM, Huang N et al. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood*. 1993 May 15;81(10):2658-2663
- Jackson N, Ling NR, Ball J et al. An analysis of myeloma plasma cell phenotype using antibodies defined at the IIIrd International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens. *Clin Exp Immunol*. 1988 Jun;72(3):351-356
- Jego G, Robillard N, Puthier D et al. Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood*. 1999 Jul 15;94(2):701-712
- King MA, Nelson DS. Tumor cell heterogeneity in multiple myeloma: antigenic, morphologic, and functional studies of cells from blood and bone marrow. *Blood*. 1989 May 15;73(7):1925-1935
- Klabusay M, Doubek M, Adam Z et al. Detection of myeloma cells in peripheral blood using multi-parameter flow cytometry: monitoring residual disease. *Cas Lek Cesk*. 2000 Jul 19;139(14):432-436
- Kovarova L, Buchler T, Buresova I et al. Phenotype of Plasma Cells in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Multiple Myeloma Subjects. *Hematologica* 2008, připraveno k tisku
- Latreille J, Barlogie B, Dosik G et al. Cellular DNA content as a marker of human multiple myeloma. *Blood*. 1980 Mar;55(3):403-408
- Lima M, Teixeira Mdos A, Fonseca S et al. Immunophenotypic aber-

- rations, DNA content, and cell cycle analysis of plasma cells in patients with myeloma and monoclonal gammopathies. *Blood Cells Mol Dis.* 2000 Dec;26(6):634-645
17. Mahnke YD, Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin Lab Med.* 2007 Sep;27(3):469-485
18. Mateo G, Castellanos M, Rasillo A et al. Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2005 May 15;11(10):3661-3667
19. Mateo G, Gutierrez NC, Lopez-Berges C et al. Current role of immunophenotyping in multiple myeloma. *Multiple Myeloma. Torino, 22-24 April: Meeting Proceedings;* 2004:31-33
20. Medina F, Segundo C, Campos-Caro A et al. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood.* 2002 Mar 15;99(6):2154-2161
21. Moreau P, Robillard N, Jégo G et al. Lack of CD27 in myeloma delineates different presentation and outcome. *Br J Haematol.* 2006 Jan;132(2):168-170
22. Morgan TK, Zhao S, Chang KL et al. Low CD27 expression in plasma cell dyscrasias correlates with high-risk disease: an immunohistochemical analysis. *Am J Clin Pathol.* 2006 Oct;126(4):545-551
23. Nowakowski GS, Witzig TE, Dingli D et al. Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood.* 2005 Oct 1;106(7):2276-2279
24. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol.* 1998 Jun;152(6):1655-1665
25. Ocqueteau M, Orfao A, García-Sanz R et al. Expression of the CD117 antigen (c-Kit) on normal and myelomatous plasma cells. *Br J Haematol.* 1996 Dec;95(3):489-493
26. Owen RG, Rawstron AC. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: flow cytometry is the method of choice. *Br J Haematol.* 2005 Mar;128(5):732-3; author reply 733-734
27. Pellat-Deceunynck C, Bataille R. Normal and malignant human plasma cells: proliferation, differentiation, and expansions in relation to CD45 expression. *Blood Cells Mol Dis.* 2004 Mar-Apr;32(2):293-301
28. Pérez-Persona E, Vidriales MB, 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 Oct 1;110(7):2586-2592
29. Rawstron AC, Davies FE, 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 Nov 1;100(9):3095-3100
30. 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 Mar;93(3):431-438
31. Rawstron AC, Owen RG, Davies FE et al. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol.* 1997 Apr;97(1):46-55
32. Robillard N, Pellat-Deceunynck C, Bataille R. Phenotypic characterization of the human myeloma cell growth fraction. *Blood.* 2005 Jun 15;105(12):4845-4848
33. Ruiz-Argüelles GJ, Katzmán JA, Greipp PR et al. Multiple myeloma: circulating lymphocytes that express plasma cell antigens. *Blood.* 1984 Aug;64(2):352-356
34. San Miguel JF, 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 Mar 1;99(5):1853-1856
35. Santonocito AM, Consoli U, Bagnato S et al. Flow cytometric detection of aneuploid CD38(++) plasmacells and CD19(+) B-lymphocytes in bone marrow, peripheral blood and PBSC harvest in multiple myeloma patients. *Leuk Res.* 2004 May;28(5):469-477
36. Terstappen LW, Johnsen S, Segers-Nolten IM, Loken MR. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood.* 1990 Nov 1;76(9):1739-1747
37. Toušková M., Maisnar V., Kratěnová J. et al. DNA analýza vyhodnocená průtokovou cytometrií v diagnostice monoklonálních gamapatií. *Alergie.* 2001;3(1)
38. Van Camp B, Durie BG, Spier C et al. Plasma Cells in Multiple Myeloma Express a Natural Killer Cell-Associated Antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood.* 1990 Jul 15;76(2):377-382
39. Wijdenes J, Vooijs WC, Clément C, Post J et al. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol.* 1996 Aug;94(2):318-323
40. Zola H, Swart B, Banham A et al. CD molecules 2006--human cell differentiation molecules. *J Immunol Methods.* 2007 Jan 30;319(1-2):1-5