Клиническая онкогематология. 2017;10(2):158–68

Clinical oncohematology. 2017;10(2):158–68

ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

LYMPHOID TUMORS

Определение минимальной остаточной болезни при В-линейных острых лимфобластных лейкозах с использованием подходов EuroFlow

О.А. Безнос, Л.Ю. Гривцова, А.В. Попа, М.А. Шервашидзе, И.Н. Серебрякова, О.Ю. Баранова, Е.А. Османов, Н.Н. Тупицын

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478

Evaluation of Minimal Residual Disease in B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Using EuroFlow Approaches

OA Beznos, LYu Grivtsova, AV Popa, MA Shervashidze, IN Serebryakova, OYu Baranova, EA Osmanov, NN Tupitsyn

NN Blokhin Russian Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478

РЕФЕРАТ

Актуальность и цели. Оценка минимальной остаточной болезни (МОБ) на различных этапах химиотерапии — один из ключевых факторов прогноза и стратификации больных на группы риска при острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ). Основой определения МОБ как на 15-й день, так и на более поздних сроках терапии является выявление бластных клеток с лейкоз-ассоциированным иммунофенотипом. Цель — оценить возможности 8-цветных стандартизованных панелей консорциума EuroFlow и выявить на этапе первичной диагностики индивидуальные критерии мониторинга МОБ.

Материалы и методы. В анализ включены данные по первичному иммунофенотипу и оценке МОБ в процессе химиотерапии у 10 взрослых больных и 35 детей с установленным диагнозом ОЛЛ из В-линейных предшественников.

Результаты. Особенности фенотипа ОЛЛ на этапе первичной диагностики дают возможность наиболее полно охарактеризовать 8-цветные панели EuroFlow. Это позволяет отобрать наиболее информативные комбинации антигенов для дальнейшего мониторинга МОБ. В качестве наиболее часто встречающихся аберрантных иммунофенотипов бластных клеток при ОЛЛ могут быть рекомендованы комбинации с экспрессией антигенов CD58/CD38, CD81/CD9, а также оценка коэкспрессии пан-миелоидных антигенов CD13, CD33. В отношении В-линейных предшественников у детей на 15-й день индукционной химиотерапии кроме оценки количества В-линейных предшественников $CD10^+$ и/или $CD34^+$ целесообразно выявлять популяцию клеток TdT^+ $cyCD22^+$.

Заключение. Таким образом, 8-цветные панели EuroFlow позволяют не только детально охарактеризовать первичный иммунофенотип острого лейкоза, но и могут широко использоваться для выявления МОБ на всех этапах химиотерапии.

Ключевые слова: В-линейные острые лимфобластные лейкозы, многоцветная проточная цитометрия, минимальная остаточная болезнь.

ABSTRACT

Background & Aims. Evaluation of the minimal residual disease (MRD) at different stages of chemotherapy is one of key prognostic factors and a factor of stratification of patients into risk groups in acute lymphoblastic leukemia (ALL). The MRD detection on Day 15 and at later stages is based on identifying blast cells with a leukemia-associated immune phenotype. The aim is to assess the potential of 8-color standardized EuroFlow panels and to detect individual criteria for MRD monitoring during primary diagnosis.

Materials & Methods. The analysis included data on the primary immune phenotype and MRD assessment during chemotherapy in 10 adults and 35 children with a confirmed diagnosis of B-cell precursors ALL.

Results. The ALL phenotype characteristics at the stage of primary diagnosis permit to make the most complete description of the of 8-color standardized EuroFlow panels. This gives an opportunity to select the most informative antigen combinations for further MRD monitoring. Combinations with CD58/CD38, CD81/CD9 antigen expression, as well as assessment of pan-myeloid CD13, CD33 antigen co-expression may be recommended as the most frequent aberrant immune phenotypes of blast cells in ALL. As for B-lineage progenitor cells in children on Day 15 of the induction therapy, a detection of TdT^+ $cyCD22^+$ cell population is necessary in addition to the quantification of $CD10^+$ and/or $CD34^+$ B-lineage progenitor cells.

Conclusion. Therefore, the 8-color standardized EuroFlow panels permit not only to characterize the primary ALL immune phenotype in details, but may also be widely used for MRD evaluation at all stages of chemotherapy.

Keywords: B-lineage acute lymphoblastic leukemia, multicolor flow cytometry, minimal residual disease.

© 2017 практическая медицина

Получено: 14 января 2017 г.
Принято в печать: 29 января 2017 г.

Received: January 14, 2017
Accepted: January 29, 2017

Для переписки: Ольга Алексеевна Безнос, младший научный сотрудник, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478; тел.: 8(916)480-03-35; e-mail: beznos.olga@gmail.com

For correspondence: Ol'ga Alekseevna Beznos, junior researcher, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478; Tel: 8(916)480-03-35; e-mail: beznos.olga@gmail.com

Для цитирования: 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. 2017;10(2):158–68.

DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-2-158-168

For citation: Beznos OA, Grivtsova LYu, Popa AV, et al. Evaluation of Minimal Residual Disease in B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Using EuroFlow Approaches. Clinical oncohematology. 2017;10(2):158–68 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-2-158-168

ВВЕДЕНИЕ

Оценка количества остаточных лейкозных бластных клеток в костном мозге (минимальная остаточная болезнь — МОБ) на различных этапах лечения онкогематологических больных является одним из основных факторов прогноза и риск-стратификации при острых лимфобластных лейкозах из В-линейных предшественников (В-ОЛЛ) [1].

Отработка различных методов и протоколов выявления МОБ в первую очередь была сосредоточена на выявлении остаточных бластных клеток на различных этапах химиотерапии у детей. В крупных многоцентровых исследованиях показано клиническое значение оценки МОБ иммунологическими методами с использованием проточной цитометрии [1–4]. Наряду с первичной диагностикой острого лейкоза и определением его варианта наибольшие успехи проточной цитометрии достигнуты именно в обнаружении клеток МОБ.

Наиболее значимой в плане прогноза оказалась оценка МОБ на 15-й день индукционной химиотерапии. Обнаружение лейкозных бластных клеток на данном этапе лечения отражает первичный ответ опухоли на кортикостероиды и химиопрепараты (винкристин, даунорубицин). У детей при В-ОЛЛ МОБ на 15-й день индукционной терапии остается и до настоящего времени одним из основных прогностических факторов. Кроме того, по результатам определения МОБ в этот период впервые стало возможным уменьшение интенсивности химиотерапии первой линии путем снижения дозы антрациклинов в группе стандартного риска, что позволяет оптимизировать лечение [4–6]. Оценка МОБ на 33-й день индукционной химиотерапии имеет значение для риск-стратификации больных [1–2].

Стратегия выявления МОБ на 15–19-й день индукционной химиотерапии представляется обоснованной, поскольку четко показано, что на этом этапе лечения В-линейные предшественники в костном мозге отсутствуют [4, 5]. Таким образом, например, для выявления остаточных бластных клеток при пре-пре-В-иммуноподварианте В-ОЛЛ достаточно определить количество $CD10^+$ В-линейных предшественников. Ранее мы показали достоверную сопоставимость результатов 3-, 4- и 5-цветной проточной цитометрии в случае выявления МОБ на 15-й день индукционной химиотерапии [7, 8].

Более сложная задача — выявление МОБ на этапе окончания индукционной химиотерапии и в более поздние сроки. Несмотря на важное значение МОБ в этих точках и подтвержденную адекватность оценки остаточных бластных клеток методами проточной цитометрии, единых протоколов цитометрического определения МОБ на данном этапе не существует. Проблема возникает из-за необходимости разграничения нормальных регенерирующих В-линейных предшественников и лейкозных лимфобластов. В такой ситуации особое значение приобретает обнаружение бластных клеток с особым лейкоз-ассоциированным иммунофенотипом (ЛАИФ). Ключевым в определении ЛАИФ является понятие аберрантности экспрессии антигенов. В настоящее время под аберрантным иммунофенотипом подразумевают (рис. 1):

1) экспрессию антигенов несвойственных линий дифференцировки;
2) асинхронность экспрессии линейноспецифичных антигенов;
3) различие в уровнях экспрессии антигенов.

Если для выявления В-линейных предшественников вполне достаточно даже 3-цветной проточной цитометрии, то адекватное разграничение регенерирующих нормальных В-лимфобластов и опухоли из В-линейных предшественников возможно только с использованием многоцветной проточной цитометрии. При этом современная проточная цитометрия дает возможность оценить до 11 параметров клетки и изучить несколько миллионов клеток, что делает ее сопоставимой по чувствительности с молекулярно-биологическими методами [9].

Рис. 1. Аберрантность

Fig. 1. Aberrance

С точки зрения единых стандартов определения МОБ при В-ОЛЛ может рассматриваться уточняющий протокол диагностики В-ОЛЛ, предложенный консорциумом EuroFlow [10]. Данный протокол включает в себя большинство изученных к настоящему времени комбинаций антигенов, позволяющих выявить наиболее информативные ЛАИФ В-лимфобластов (CD58, CD38, CD45, CD66c, CD9), а также разграничить различные стадии В-клеточного онтогенеза (CD19, CD20, CD10, CD34, CD45, CD22). Важно, что экспрессия большинства антигенов может рассматриваться в пределах одной клеточной популяции, а именно В-линейного предшественника $CD19^+CD45^{low}CD34^+$.

В статье представлены данные по первичной диагностике В-ОЛЛ с использованием полной 8-цветной панели EuroFlow с точки зрения возможности дальнейшего мониторинга МОБ в процессе лечения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В анализ включены данные по первичному иммунофенотипу больных В-ОЛЛ и мониторингу МОБ у 10 взрослых больных и 35 детей с диагнозом пре-пре-В-иммуноподварианта ОЛЛ.

Оценка МОБ у взрослых больных проводилась через 3 и 6 мес. после первичной диагностики, т. е. на этапах индукционной и противорецидивной (поддерживающей) терапии. Оценка МОБ у детей проводилась на 15-й и 33-й дни индукционной терапии, а также на 72–78-й день.

Клетки МОБ выявлялись с использованием 5–8-цветной проточной цитометрии с учетом необходимости оценки аберрантной экспрессии антигенов в популяции В-линейных предшественников. Для этого в панели МОБ включали пан-В-клеточный антиген CD19, для верификации предшественников использовали антигены CD45, CD34, CD10. В качестве аберрантных во всех случаях оценена экспрессия маркеров CD58 и CD38. С точки зрения возможных ЛАИФ с использованием 8-цветных панелей EuroFlow при первичной диагностике в популяции В-линейных предшественников оценен характер экспрессии антигенов CD66c, CD81, CD9, CD123, TdT, CD22. На рис. 2 представлен алгоритм гейтирования анализируемой популяции В-линейных предшественников. Бластные клетки определялись на основании слабой экспрессии CD45 или ее отсутствия (рис. 2, *А*). Затем в пределах бластных элементов выявляли клетки $CD19^+$ (рис. 2, *Б*). В дальнейшем, при первичном иммунофенотипировании анализировалась именно эта популяция клеток $CD45^-CD19^+$ (рис. 2, *В*), представляющих В-линейные предшественники. На всех последующих цитометрических диаграммах данная популяция выделена зеленым цветом.

Каждый образец костного мозга был охарактеризован иммунологически и морфоцитохимически, оба исследования выполнялись с использованием материала из одной пробирки.

Подсчет числа В-клеток и В-линейных предшественников проводился в пределах всех ядросодержащих клеток (миелокариоцитов). С этой целью в панель для выявления МОБ обязательно входил

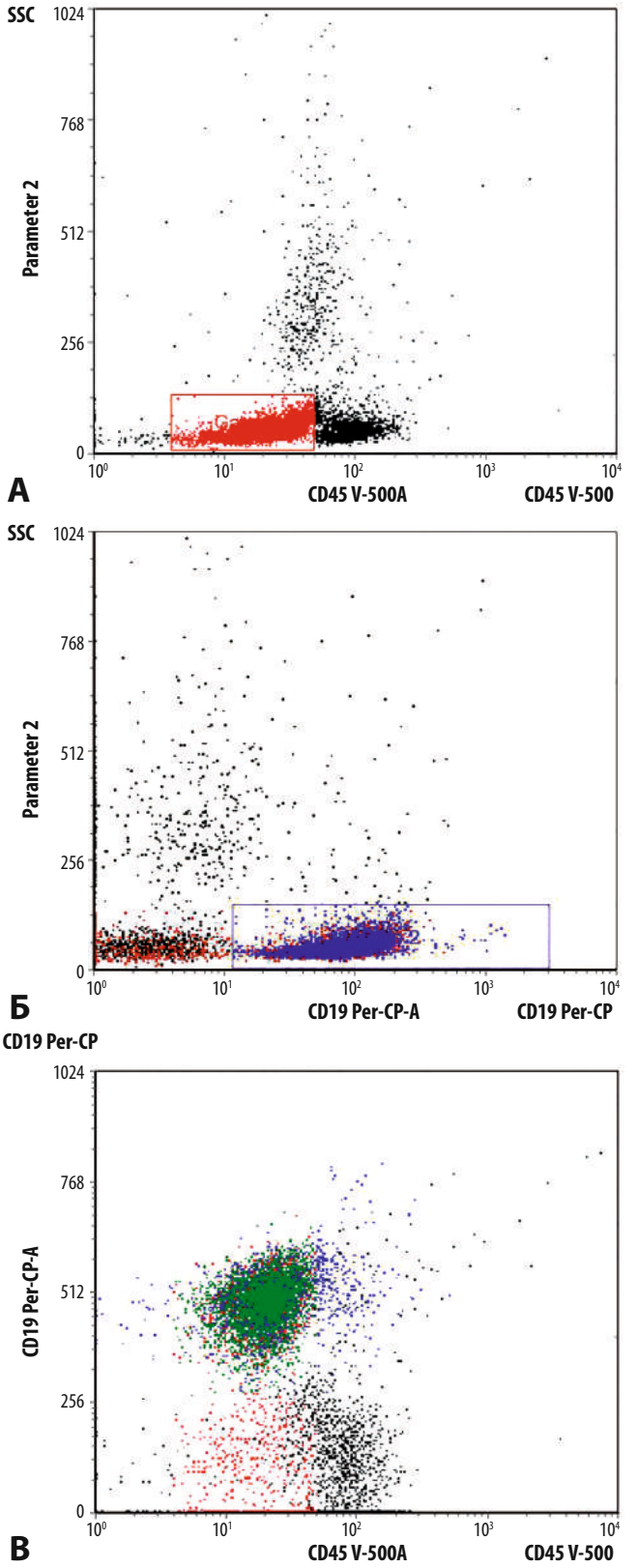


Рис. 2. Алгоритм гейтирования целевой клеточной популяции В-линейных предшественников. (*А*) Выявление бластных клеток (гейт 1, красный цвет) на основании слабой/отсутствующей экспрессии CD45 (ось *x*) *vs* боковое светорассеяние — SSC (ось *y*). (*Б*) В пределах бластных элементов определялись клетки $CD19^+$ (гейт 2, синий цвет). (*В*) В дальнейшем, при первичном иммунофенотипировании анализу подвергнута именно данная популяция клеток $CD45^-CD19^+$ (зеленый цвет)

Fig. 2. The algorithm of the target B-lineage progenitor cell population gating. (*A*) Detection of blast cells (gate 1, red) based on weak CD45 expression or lack of it (X axis) vs. side light scattering, SSC (*Y* axis). (*Б*) $CD19^+$ cells were detected within the blast elements (gate 2, blue). (*B*) After that, this $CD45^-CD19^+$ cell population was analyzed during the primary immunophenotyping (green)

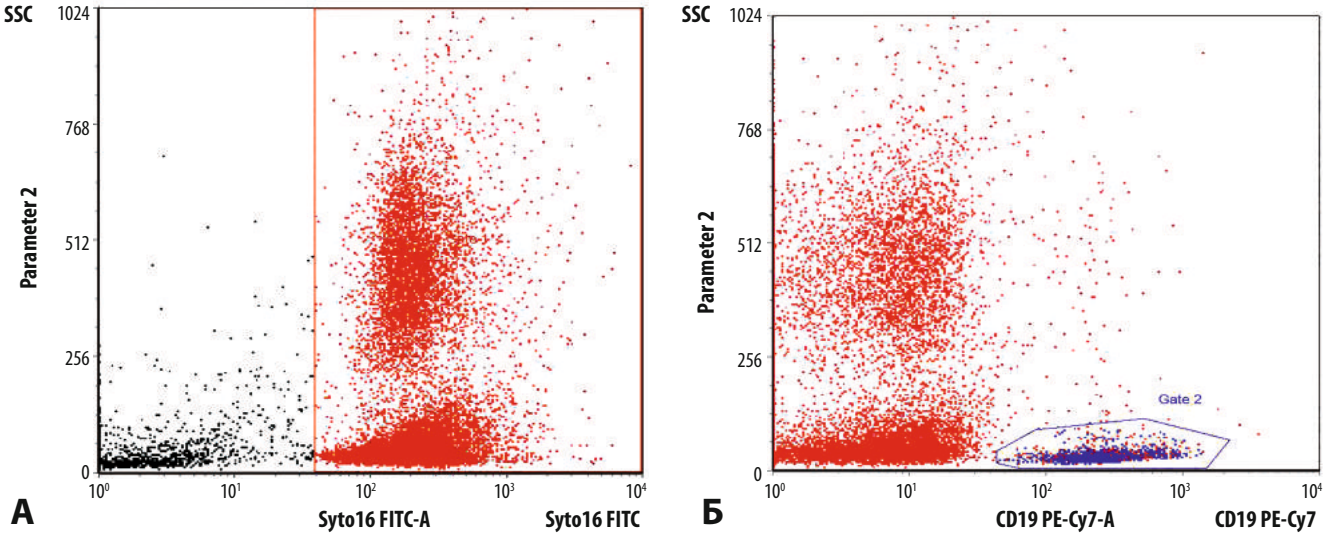


Рис. 3. Порядок подсчета В-клеток в пределах ядросодержащих элементов (миелокариоцитов) пунктата костного мозга на основании Syto16. (*А*) На первом этапе оценивается количество ядросодержащих клеток в образце на основании Syto16 (Syto16 — ось *x*, SSC — ось *y*). В данном образце ядросодержащие клетки (красный цвет) составили 94 %. (*Б*) Далее в пределах гейта Syto16$^+$ проводился подсчет В-клеток (гейт 2, синий цвет). В данном образце ядросодержащие В-клетки составили 12 %

Fig. 3. The procedure for calculation of B-cells within the nucleated cells (myelokaryocytes) of the bone marrow punctuate based on Syto16. (*A*) During the first stage, the number of nucleated cells in a sample is calculated based on Syto16 (Syto16 — X axis, SSC — Y axis). In this sample, there were 94 % of nucleated cells (red). (*Б*) Then, within the frames of the Syto16$^+$ gate, the number of B-cells (gate 2, blue) was calculated. There were 12 % of nucleated B-cells in this sample

Таблица 1. Диагностическая панель В-линейных острых лимфобластных лейкозов в соответствии с подходом EuroFlow

	Флюорохром							
	FITC	PE	PerCP-cy5.5	Pe-cy7	APC	APC-H7	V450	V500
№	Антиген							
1	CD58	CD66c	CD34	CD19	CD10	CD38	CD20	CD45
2	cyIgM	CD33	CD34	CD19	CD117+sIgM	sIg-λ	sIg-κ	CD45
3	TdT	CD13	CD34	CD19	CD22	CD24	CD9	CD45
4	CD15+CD65	NG2	CD34	CD19	CD123	CD81	CD21	CD45

нуклеотропный краситель Syto16. Алгоритм оценки количества В-клеток в пределах ядросодержащих клеток образца костного мозга с использованием Syto16 представлен на рис. 3. При необходимости (в случае разбавления костного мозга периферической кровью) проводилась нормализация состава костномозговых пунктатов с учетом гемодилюции на основании теста M. Loken [11, 12].

Использованные при диагностике панели представлены в табл. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы обсуждали диагностическую ценность и возможность стандартизации диагностики онкогематологических заболеваний в соответствии с концепцией EuroFlow [13]. Разработанные с учетом всех требований ВОЗ панели представляют ценность не только в плане диагностики, но и по совокупности оцениваемых маркеров. Это позволяет достаточно эффективно использовать данные подходы при выявлении и мониторинге МОБ.

С точки зрения выявления ЛАИФ В-линейных предшественников наиболее информативными в панели EuroFlow представляются пробы № 1 и 3 (см. табл. 1).

Наиболее часто используемым критерием аберрантности В-линейных предшественников при определении клеток МОБ считается гиперэкспрессия антигена CD58 в сочетании со слабой экспрессией либо отсутствием антигена CD38. Нормальные же В-линейные предшественники имеют иммунофенотип CD38$^+$CD58$^{+/low}$ [14, 15].

Выраженная экспрессия CD38, трансмембранного белка, обладающего рецепторной и ферментативной активностью, ассоциируется с важной функциональной ролью молекулы в онтогенезе как В-, так и Т-линейных предшественников. Вместе с тем имеются сведения о неоднородности и нестабильности экспрессии антигена в процессе дифференцировки кроветворных клеток. Наиболее стабильная экспрессия антигена наблюдается на костномозговых клетках-предшественницах [16–18].

В отдельных исследованиях продемонстрирована схожесть экспрессии CD38 на нормальных предшественниках и опухолевых В-лимфобластах [19].

Аберрантная экспрессия CD38 на лейкозных лимфобластах при первичной диагностике в нашем исследовании выявлена у 5 (50 %) из 10 взрослых и у 29 (82,8 %) из 35 детей с пре-пре-В-ОЛЛ.

В работе продемонстрирована более выраженная экспрессия CD58 в большинстве случаев лейкозных

В-лимфобластов в сравнении с нормальными В-линейными предшественниками [4, 20, 21].

Частота выявления лейкозных В-лимфобластов $CD58^{++}$ (иммуноподварианты про-В/пре-пре-В) у детей при первичной диагностике, по данным зарубежных исследователей, составила 93,5 %. Кроме того, показана стабильность экспрессии данной молекулы на бластных клетках при мониторинге МОБ [14].

В настоящем исследовании гиперэкспрессия CD58 выявлена у 24 (68,5 %) из 35 детей с пре-пре-В-ОЛЛ. У 31,5 % (11 из 35) детей экспрессия данного антигена была достаточно слабой. У взрослых гиперэкспрессия антигена CD58 на бластных клетках наблюдалась в 7 (70 %) из 10 случаев В-ОЛЛ.

Однако, как уже отмечалось выше, наиболее информативной в отношении выявления клеток МОБ считается оценка одновременной экспрессии молекул CD58 и CD38. Возможность оценки одновременной экспрессии обоих антигенов в пределах популяции В-линейных предшественников заложена в первой пробе уточняющей панели EuroFlow (см. табл. 1).

При анализе первичного иммунофенотипа на предмет одновременной аберрантной экспрессии CD58/CD38 мы установили, что 50 % (5 из 10) взрослых и 51,4 % (17 из 35) детей демонстрировали отсутствие аберрантности по данному сочетанию антигенов. Следует отметить, что при одновременной оценке экспрессии разных антигенов мы столкнулись со следующими ситуациями:

1) бластные клетки с двойной аберрантностью ($CD58^{++}CD38^{low}$) (рис. 4, *А*);
2) бластные клетки, аберрантные только по CD58, тогда как экспрессия CD38 была достаточно выраженной и сопоставимой с нормальными регенерирующими предшественниками, как это продемонстрировано на рис. 4, *Б* и *В* (бластные клетки гетерогенны по CD38, большая часть из них с выраженной экспрессией антигена);
3) выраженная доля бластных клеток $CD58^{+}CD38^{+}$ (рис. 4, *Г* и *Д*), т. е. отсутствие аберрантности бластных клеток и по CD58, и по CD38 — ситуация редкая (пример отсутствия аберрантности по CD58 представлен на рис. 4, *Д*).

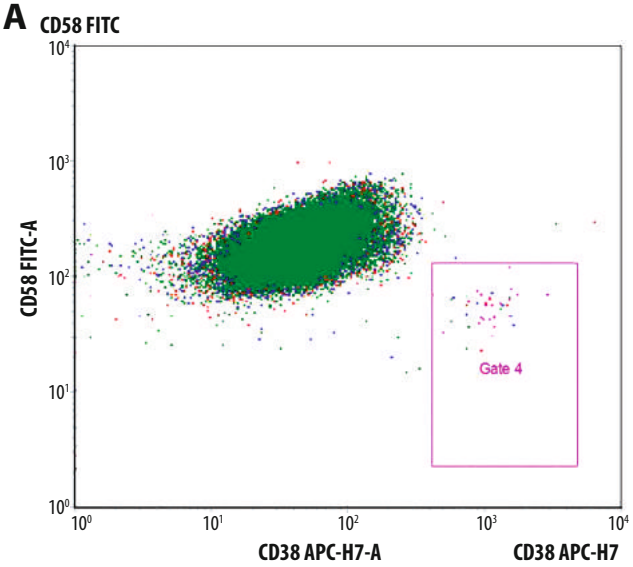
Для принятия решения об аберрантной, усиленной либо, наоборот, слабой экспрессии какого-либо маркера всегда необходимо видеть внутренний контроль. В случае с лейкозными В-лимфобластами таким

Рис. 4. Варианты одновременной экспрессии CD58/CD38 при первичной диагностике В-ОЛЛ у детей. Оценка в пределах 1-й пробы уточняющего протокола В-ОЛЛ 8-цветных панелей EuroFlow. На рис. *А–Д* представлены клетки $CD19^{+}CD45^{-}$ (зеленый цвет) в координатах CD58 (ось *y*) *vs* CD38 (ось *x*). (*А*) Пример типичной аберрантной экспрессии ($CD58^{++}/CD38^{low}$). Иммуноподвариант пре-пре-В-ОЛЛ. Бластные клетки ($CD45^{-}CD19^{+}$, зеленый цвет) демонстрируют гиперэкспрессию CD58 и слабоположительны по CD38. Уровни экспрессии CD38 на бластных клетках сопоставлены с экспрессией антигена на нормальных (неопухолевых) В-линейных предшественниках $CD38^{+}$ (гейт 4, сиреневый цвет). Рис. *Б* (про-В-ОЛЛ) и *В* (пре-пре-В-ОЛЛ) демонстрируют примеры отсутствия аберрантности по CD38. В обоих случаях основная популяция бластных клеток представлена клетками $CD58^{++}$, характеризующимися выраженной экспрессией CD38 ($CD58^{++}/CD38^{+}$), сопоставимой с нормальными резидуальными предшественниками [гейты 4 (*Б*) и 5 (*В*)]. На цитограмме *В-1* показано, что в случае анализа небольшого количества событий (2000–5000) нормальные В-линейные предшественники $CD38^{+}$ четко не визуализируются. Для их выявления необходима оценка не менее 500 000–1 000 000 клеток. (*Г*) Иммуноподвариант пре-пре-В-ОЛЛ. Выявление минорной популяции типичных аберрантных В-лимфобластов $CD58^{++}CD38^{-}$, составляющих 2 % ядросодержащих клеток образца (гейт 6, темно-синий цвет). Основная популяция бластных клеток представлена пре-пре-В-клетками $CD58^{+}CD38^{+}$ (гейт 4, красный цвет), присутствует и контрольная популяция нормальных В-линейных предшественников $CD38^{+}CD58^{-}$ (гейт 5, сиреневый цвет), необходимая для оценки уровней экспрессии CD38. (*Д*) Иммуноподвариант пре-пре-В-ОЛЛ. Пример отсутствия аберрантности по антигенам CD58/CD38 ($CD58^{+/low}/CD38^{+}$). Большинство бластных клеток демонстрирует фенотип $CD58^{+/low}/CD38^{+}$. Уровни экспрессии CD38 сопоставимы с остаточными нормальными В-лимфобластами (гейт 4, сиреневый цвет) — нормальными резидуальными В-линейными предшественниками. Цитограмма *Д-1* в координатах CD58 (ось *x*) *vs* SSC подтверждает отсутствие гиперэкспрессии CD58 на бластных клетках в сравнении с остальными клетками образца

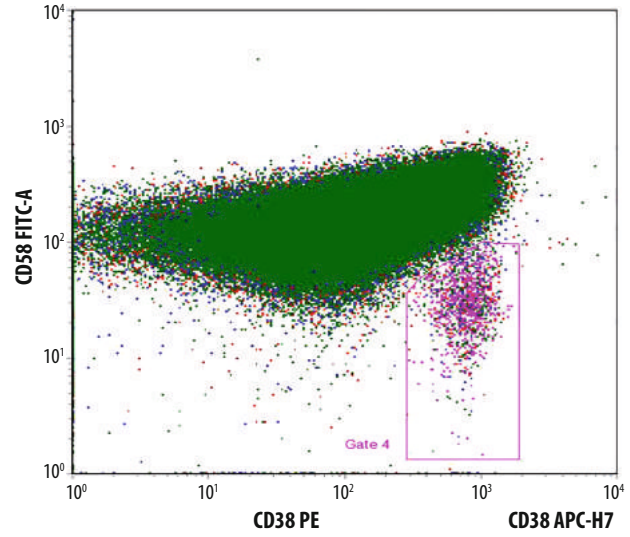
Fig. 4. Variants of simultaneous CD58/CD38 expression at primary diagnosis of B-ALL in children. The estimation is within the first test of the qualifying protocol of EuroFlow B-ALL 8-color panels. Figures *А–Д* demonstrate $CD19^{+}CD45^{-}$ cells (green) at coordinates CD58 (Y axis) vs. CD38 (X axis). (*А*) An example of typical aberrant expression ($CD58^{++}/CD38^{low}$). Pre-pre-B ALL immune subvariant. Blast cells ($CD45^{-}CD19^{+}$, green) demonstrate CD58 overexpression and are slightly positive for CD38. CD38 expression levels on blast cells were compared to the antigen expression in normal (non-tumor) B-lineage progenitor cells of $CD38^{+}$ (gate 4, lilac). Figures *Б* (pro-B ALL) and *В* (pre-pre-B ALL) demonstrate examples of the absence of aberrance for CD38. In both cases, the main population of blast cells is represented with $CD58^{++}$ cells; they are characterized by a pronounced CD38 ($CD58^{++}/CD38^{+}$) expression comparable to normal residual progenitor cells [gate 4 (*Б*) and gate 5 (*В*)]. Cytogram *B-1* demonstrates that in the analysis of a small number of events (2000–5000) normal B-lineage progenitor cells of $CD38^{+}$ are not visualized clearly. In order to detect them, not less than 500,000 to 1,000,000 cells should be assessed. (*Г*) Pre-pre-B ALL immune subvariant. Detection of a minor population of typical aberrant B-lymphoblasts $CD58^{++}CD38^{-}$ which represents 2 % of nucleated cells in the sample (gate 6, dark blue). The main population of blast cells is represented by pre-pre-B cells $CD58^{+}CD38^{+}$ (gate 4, red), there is also a control population of normal B-lineage progenitor cells of $CD38^{+}CD58^{-}$ (gate 5, lilac) which is necessary for evaluation of CD38 expression level. (*Д*) Pre-pre-B ALL immune subvariant. An example of the absence of the aberrance for CD58/CD38 antigens ($CD58^{+/low}/CD38^{+}$). Most blast cells demonstrate the $CD58^{+/low}/CD38^{+}$ phenotype. CD38 expression levels were comparable to residual normal B-lymphoblasts (gate 4, lilac), i.e. normal residual B-lineage progenitor cells. Cytogram *Д-1* at coordinates CD58 (X axis) vs. SSC confirms the absence of the CD58 overexpression on blast cells as compared to other cells of the sample. (*Г*) Pre-pre-B ALL immune subvariant. Detection of a minor population of typical aberrant B-lymphoblasts $CD58^{++}CD38^{-}$ which represents 2 % of nucleated cells in the sample (gate 6, dark blue). The main population of blast cells is represented by pre-pre-B cells $CD58^{+}CD38^{+}$ (gate 4, red), there is also a control population of normal B-lineage progenitor cells of $CD38^{+}CD58^{-}$ (gate 5, lilac) which is necessary for evaluation of CD38 expression level. (*Д*) Pre-pre-B ALL immune subvariant. An example of the absence of the aberrance for CD58/CD38 antigens ($CD58^{+/low}/CD38^{+}$). Most blast cells demonstrate the $CD58^{+/low}/CD38^{+}$ phenotype. CD38 expression levels were comparable to residual normal B-lymphoblasts (gate 4, lilac), i.e. normal residual B-lineage progenitor cells. Cytogram *Д-1* at coordinates CD58 (X axis) vs. SSC confirms the absence of the CD58 overexpression on blast cells as compared to other cells of the sample

№ tube	PacBlue \V450	PacOr \V500	FITC	PE	PE-cy5	PE-cy7	APC	APC-H7
1	CD20	**CD45**	CD58	CD66c	**CD34**	**CD19**	CD10	CD38

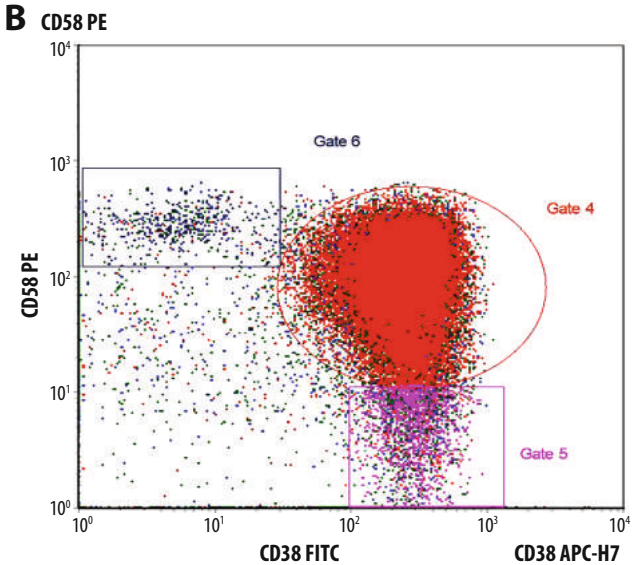
А



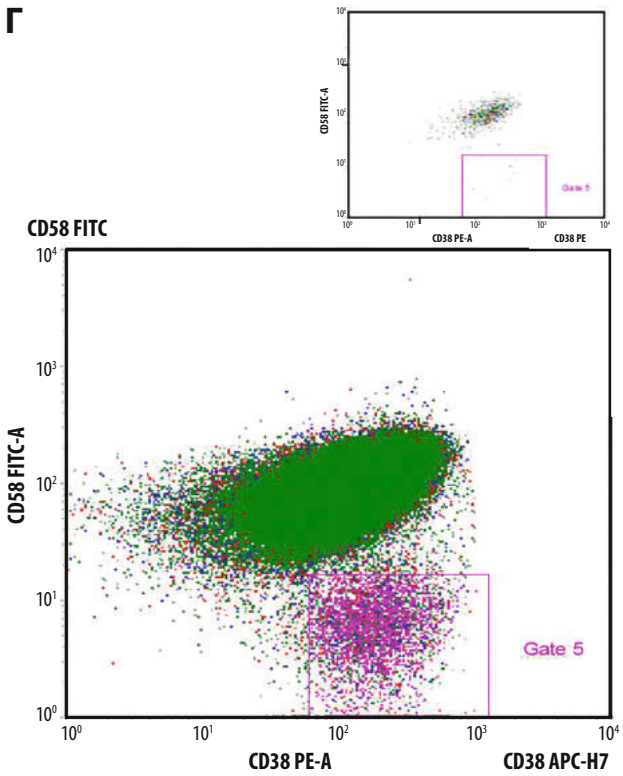
Б



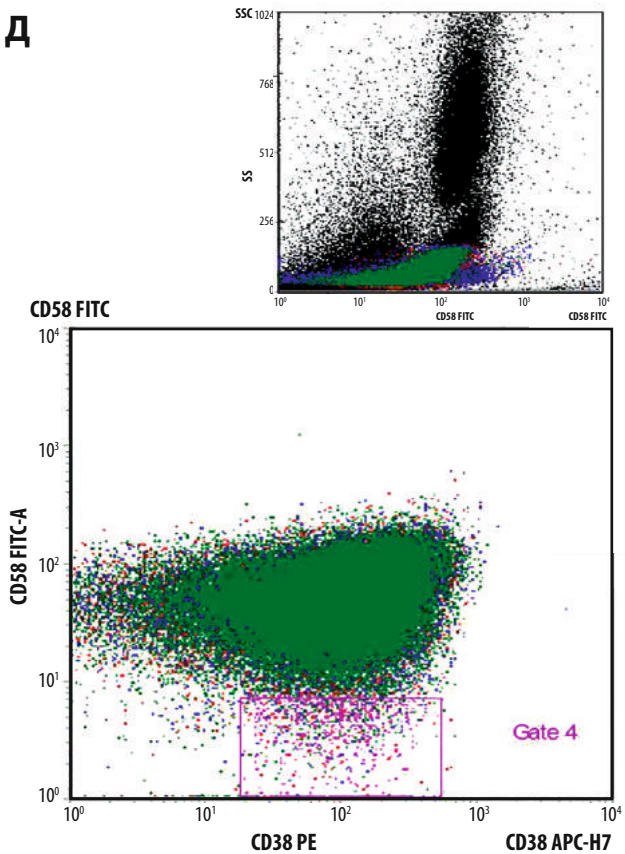
В



Г



Д



контролем являются нормальные резидуальные предшественники с фенотипом $CD38^{+}CD58^{low}$. Данная популяция продемонстрирована на цитограммах рис. 4, гейты 4 и 5, и выделена во всех случаях сиреневым цветом. Следует отметить, что для адекватной оценки остаточных нормальных (неопухолевых) В-лимфобластов даже при первичной диагностике необходимо проанализировать большое количество клеток, т. е. не менее 1 000 000 анализируемых событий.

В результате подобной детальной оценки большого количества событий даже при отсутствии аберрантности по CD58/CD38 среди лейкозных лимфобластов мы выявили незначительную популяцию клеток $CD58^{+/++}CD38^{-}$. В большинстве случаев данные клетки варьируют в пределах 0,0001–0,00002 % и при анализе меньшего количества событий не визуализируются. В отдельных наблюдениях эта популяция была достаточно выраженной (см. рис. 4, *Г*). В данном примере количество В-лимфобластов $CD58^{+}/^{++}CD38^{-}$ составило 2 % среди миелокариоцитов (гейт 6, клетки выделены темно-синим цветом).

Учитывая, что сочетание CD38/CD58 позволяет выявить опухолевые В-лимфобласты не во всех случаях, поскольку в большинстве ситуаций имеет место аберрантность по одному из антигенов, в процессе мониторинга МОБ с учетом использования 1-й пробы панели EuroFlow (см. табл. 1) целесообразно определять субпопуляции $CD58^{++}CD10^{+}CD45^{-/low}$ или $CD45^{low}CD34^{+}CD58^{++}$ и $CD38^{low}CD10^{+}CD45^{-/low}$ (рис. 5).

Серьезный интерес в отношении выявления клеток МОБ как на 15-й день, так и на более отдаленных этапах лечения представляет популяция В-линейных предшественников TdT^{+}. В онтогенезе ядерная TdT определяется на самых ранних этапах костномозговых В-линейных предшественников наряду с цитоплазматическими CD22 и CD79a. В ряде работ подтверждается экспрессия антигена на этапе плюрипотентного предшественника $CD19^{-}CD10^{+}CD34^{+}$,

№ tube	PacBlue \V450	PacOr \V500	FITC	PE	PE-cy5	PE-cy7	APC	APC-H7
1	CD20	**CD45**	CD58	CD66c	**CD34**	**CD19**	CD10	CD38

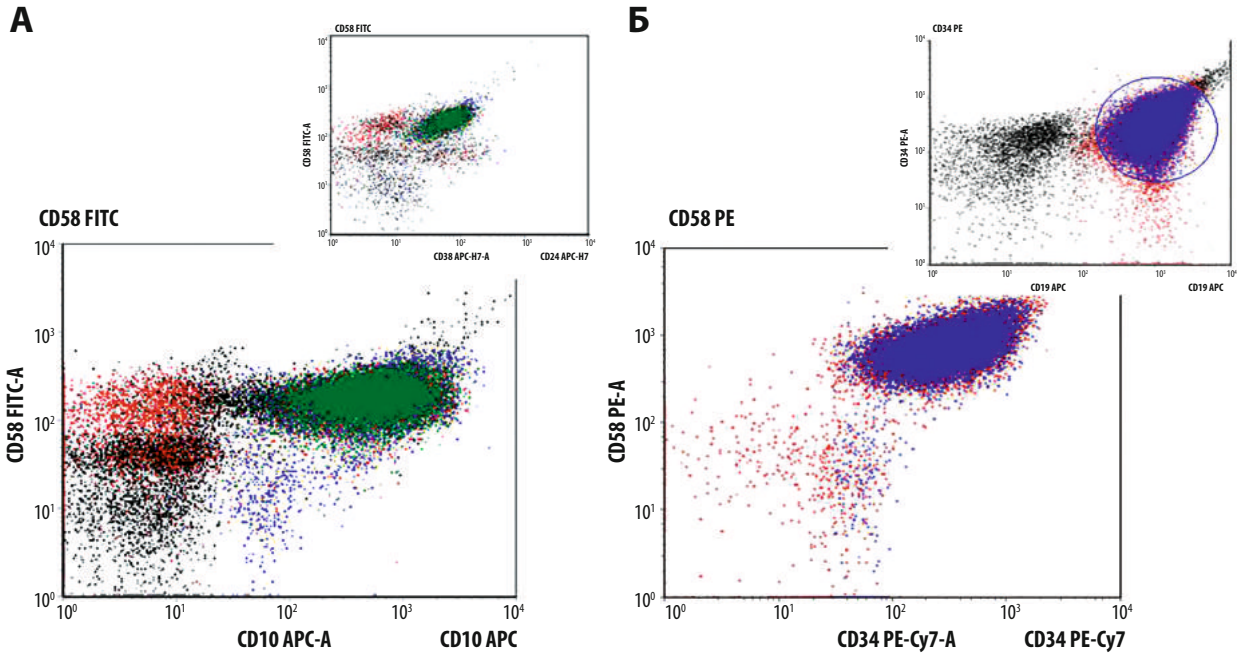


Рис. 5. Примеры возможных комбинаций антигенов для оценки МОБ при отсутствии аберрантности по одному из них (CD58 или CD38). Оценка в пределах 1-й пробы уточняющего протокола В-ОЛЛ 8-цветных панелей EuroFlow. (*А*) Комбинации CD58/CD10, пре-пре-В-ОЛЛ. На цитограмме *А-1* в координатах CD58 (ось *x*), CD38 (ось *y*) бластные клетки ($CD45^{-}/CD19^{+}$) демонстрируют гиперэкспрессию CD58, в то время как экспрессия CD38 на части из них достаточно выраженная (фактическое отсутствие аберрантности). Для оценки клеток МОБ целесообразно выявлять популяции в координатах CD58 (ось *y*), CD10 (ось *x*); весь пул опухолевых бластных клеток представлен клетками $CD58^{++}/CD10^{+}$, значительная часть которых характеризуется гиперэкспрессией CD10. (*Б*) Комбинация антигенов CD58/CD34, про-В-ОЛЛ (CD10-негативный). На цитограмме *Б-1* в гейте В-клеток ($CD19^{+}$, красный цвет) определяются бластные клетки $CD19^{+}/CD34^{+}$ (синий цвет). Как видно на рис. *Б* (CD58 — ось *y*, CD34 — ось *x*), большинство бластных клеток $CD58^{++}$. Для оценки МОБ в данном наблюдении рекомендована комбинация CD58/CD34.

Fig. 5. Examples of possible antigen combinations for MRD assessment in the absence of the aberrance for one of it (CD58 or CD38). The estimation is within the first test of the qualifying protocol of EuroFlow B-ALL 8-color panels. (*A*) Combinations CD58/CD10, pre-pre-B ALL. On cytogram *A-1* at coordinates CD58 (X axis), CD38 (Y axis) blast cells ($CD45^{-}/CD19^{+}$) demonstrate the CD58 overexpression, whereas the CD38 expression on some of them is pronounced (actual absence of aberrance). To assess MRD cells, it is reasonable to detect populations within coordinates CD58 (Y axis), CD10 (X axis); the whole pool of tumor blast cells is represented with $CD58^{++}/CD10^{+}$ cells most of which is characterized by the CD10 overexpression. (*Б*) CD58/CD34 antigen combination, pro-B ALL (CD10-negative). Cytogram *Б-1* in the gate of B-cells ($CD19^{+}$, red) demonstrates blast cells $CD19^{+}/CD34^{+}$ (blue). Figure *Б* (CD58 — Y axis, CD34 — X axis) demonstrates that most blast cells are $CD58^{++}$. To evaluate the MRD, the CD58/CD34 combination is recommended in this observation.

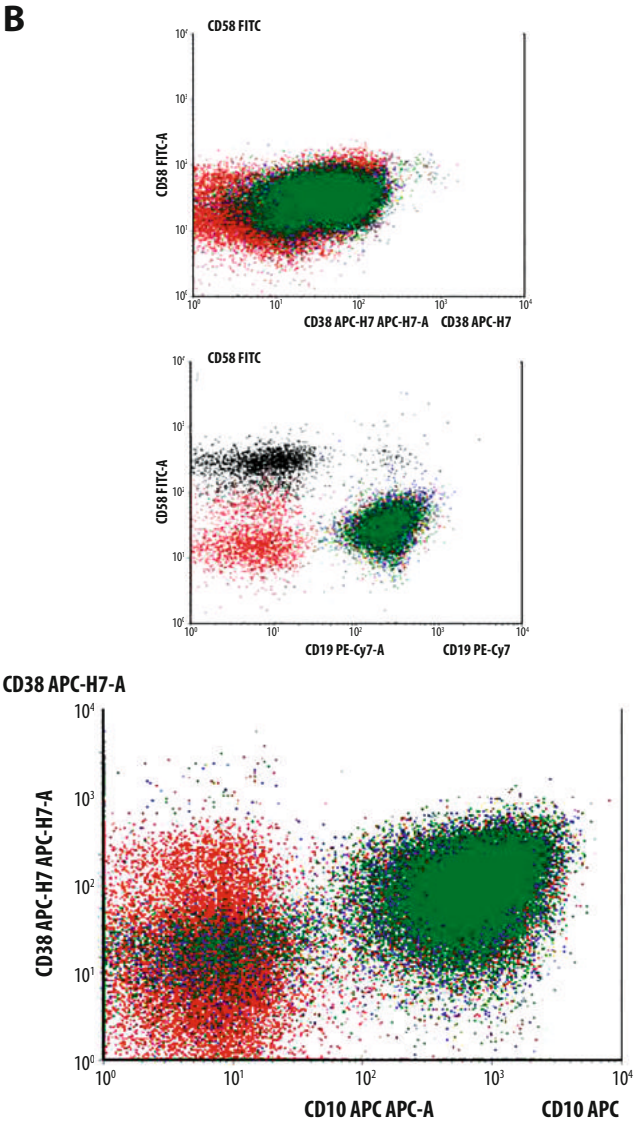


Рис. 5. (*B*) Комбинация антигенов CD38/CD10, пре-пре-В-ОЛЛ. На цитограмме *B-1* в координатах CD58 (ось *y*), CD38 (ось *x*) показано отсутствие экспрессии CD58 и CD38 на бластных клетках ($CD19^+CD45^-$). Экспрессия обоих антигенов на бластных клетках сопоставлена с нормальными В-линейными предшественниками (*B-1* — для CD38, гейт 4; *B-2* — для CD58). Выявлена аберрантность только по антигену CD38. Для дальнейшей оценки клеток МОБ необходимо определение популяции $CD38^{low}/CD10^+$, как это демонстрирует основная цитограмма *B*

Fig. 5. (*B*) CD38/CD10 antigen combination, pre-pre-B ALL. Cytogram *B-1* at coordinates CD58 (Y axis), CD38 (X axis) demonstrates the absence of CD58 and CD38 expressions on blast cells ($CD19^+CD45^-$). The expression of both antigens on blast cells is compared to the normal B-lineage progenitor cells (*B-1* for CD38, gate 4; *B-2* for CD58). There was aberrance only for CD38 antigen. Detection of the $CD38^{low}/CD10^+$ population is required for further MRD assessment, as it is shown in the main cytogram *B*

популяции клеток, формирующей в дальнейшем весь лимфобластный пул [22]. Оптимальной с точки зрения характеристики В-линейных предшественников в отношении TdT является 3-я проба панели EuroFlow (см. табл. 1). С точки зрения 15-го дня данная популяция незаменима для выявления предшественников, т. е. собственно клеток МОБ, особенно в случае CD10- и/или CD34-негативных В-ОЛЛ.

В отношении более поздних точек выявления клеток МОБ оценка количества клеток TdT^+ позволит идентифицировать аберрантные предшественники по наличию выраженной экспрессии мембранных CD22 и CD24 (асинхронная экспрессия антигенов различных этапов дифференцировки В-клеток в костном мозге) [23].

На рис. 6 представлены результаты анализа популяции бластных клеток пре-пре-В-ОЛЛ. Они характеризовались мономорфной экспрессией TdT (рис. 6, *A*). Данное наблюдение демонстрирует аберрантность с точки зрения мембранной экспрессии CD22 (рис. 6, *B*). Бластные клетки также характеризовались отчетливой экспрессией CD24 и CD9 (рис. 6, *Б* и *Г*).

Одновременная оценка ядерной TdT в совокупности с экспрессией CD9 также весьма полезна в отношении выявления атипии В-линейных предшественников. В норме наблюдается выраженная экспрессия обоих антигенов, а присутствие популяции TdT^+CD9^- или TdT^-CD9^+ В-линейных предшественников указывает на их злокачественность. В ряде случаев признаком аберрантности может служить гиперэкспрессия или мономорфная экспрессия CD9. Следует отметить, что подобный анализ, как и в целом выявление клеток МОБ после индукционной химиотерапии, можно проводить только в случае оценки уровней экспрессии данных антигенов в начале болезни [24, 25]. При первичной диагностике, что особенно важно, необходимо накапливать большое количество клеток для анализа (≥ 500 000). Только в этом случае будет можно сопоставить уровень экспрессии на опухолевых (бластных) клетках и на нормальных В-линейных предшественниках. Данное положение является принципиально новым в иммунодиагностике ОЛЛ.

При анализе возможностей 8-цветных протоколов EuroFlow в отношении выявления МОБ мы обратили внимание на антиген CD81. Согласно данным литературы, CD81 характеризуется достаточно стабильной, но слабой экспрессией на опухолевых В-лимфобластах ($CD81^+$). Степень экспрессии антигена сопоставима с таковой у лимфоцитов, но отличается от нормальных В-линейных предшественников. На мембране последних экспрессия данной молекулы всегда выраженная ($CD81^{++}$) [26]. Наши наблюдения подтвердили этот факт. На этапе первичной диагностики бластные клетки В-ОЛЛ в преобладающем большинстве случаев были $CD81^+$ (рис. 7, *A–B*), т. е. экспрессия CD81 по интенсивности соответствовала антигенпозитивным лимфоцитам (на рисунке обозначены синим цветом). В отдельных наблюдениях бластные клетки ОЛЛ были $CD81^{++}$ (рис. 7, *Г*). Согласно данным литературы, В-ОЛЛ, характеризующиеся слабой экспрессией CD81, связаны с экспрессией CD34 на бластных клетках [24]. Оценка уровней экспрессии CD81 на В-лимфобластах предусмотрена в 4-й пробе протокола EuroFlow.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на данном этапе анализа мы можем подтвердить, что 8-цветные панели EuroFlow предоставляют возможность не только для детальной оценки первичного иммунофенотипа острого лейкоза, но и могут быть широко использованы для выявления

№ tube	PacBlue \V450	PacOr \V500	FITC	PE	PE-cy5	PE-cy7	APC	APC-H7
3	CD9	**CD45**	nuTdT	CD13	**CD34**	**CD19**	CD22	CD24

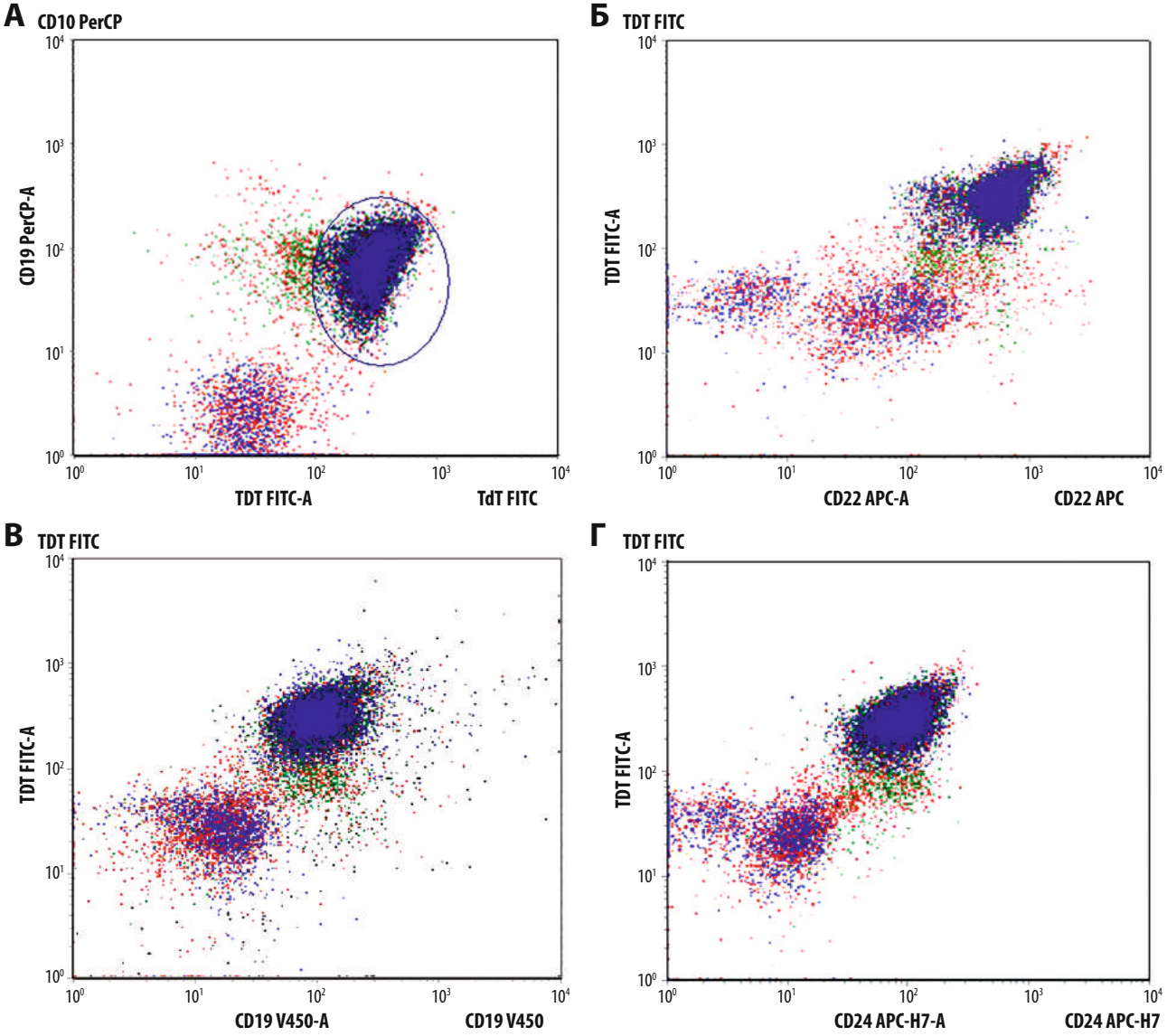


Рис. 6. Оценка экспрессии CD22, TdT и CD9 как возможных маркеров клеток МОБ. Оценка в пределах 3-й пробы уточняющего протокола В-ОЛЛ 8-цветных панелей EuroFlow. На рисунке представлен первичный иммунофенотип пре-пре-В-ОЛЛ, популяция бластных клеток выделена на основании экспрессии CD19 и CD45 (на всех цитограммах обозначена зеленым цветом). (*А*) Бластные клетки характеризуются мономорфной экспрессией TdT (темно-синий цвет); в качестве контрольной популяции представлены лимфоциты (синий цвет). (*Б*) Бластные клетки TdT$^+$ (ось *y*) экспрессируют мембранный антиген CD22 (ось *x*). (*В, Г*) На части из них отмечается отчетливая экспрессия CD9 и CD24 (ось *x*)

Fig. 6. Evaluation of CD22, TdT and CD9 expression as possible markers of MRD cells. The estimation is within the third test of the qualifying protocol of EuroFlow B-ALL 8-color panels. The figure demonstrates the primary immunophenotype of the pre-pre-B ALL; the blast cell population is detected based on the CD19 and CD45 expression (marked green in all cytograms). (*A*) Blast cells are characterized by monomorhic TdT expression (dark blue); lymphocytes represent the reference group (blue). (*Б*) Blast cells TdT$^+$ (Y axis) express the membrane antigen CD22 (X axis). (*B, Г*) Distinct CD9 and CD24 expression is observed on some of them (X axis)

МОБ на всех этапах химиотерапии. Эти данные могут служить базой для поиска новых иммунологических факторов прогноза. Важно, что стандартизованный протокол EuroFlow может быть рекомендован для мониторинга МОБ на всех этапах полихимиотерапии как у детей, так и у взрослых. Протокол включает большинство специфичных антигенов В-клеток одновременно с маркерами клеток-предшественниц, являющихся ключевыми (повторяющимися в каждой пробе). Кроме того, данный подход позволяет выявить экспрессию на бластных клетках маркеров несвойственных линий, в первую очередь миелоидных (CD66c, CD13, CD33, CD15, CD65), что указывает на аберрантный иммунофенотип и может быть использовано в определении МОБ для разграничения опухоли и регенерирующих (нормальных) В-лимфобластов. И наконец, в панель EuroFlow включены антигены, для которых признаком аберрантности является не позитивность/негативность, а уровень экспрессии — выраженная (CD58, CD9) либо более слабая (CD38, CD81).

№ tube	PacBlue \V450	PacOr \V500	FITC	PE	PE-cy5	PE-cy7	APC	APC-H7
4	CD21	**CD45**	CD15+ CD65	NG-2	**CD34**	**CD19**	CD123	CD81

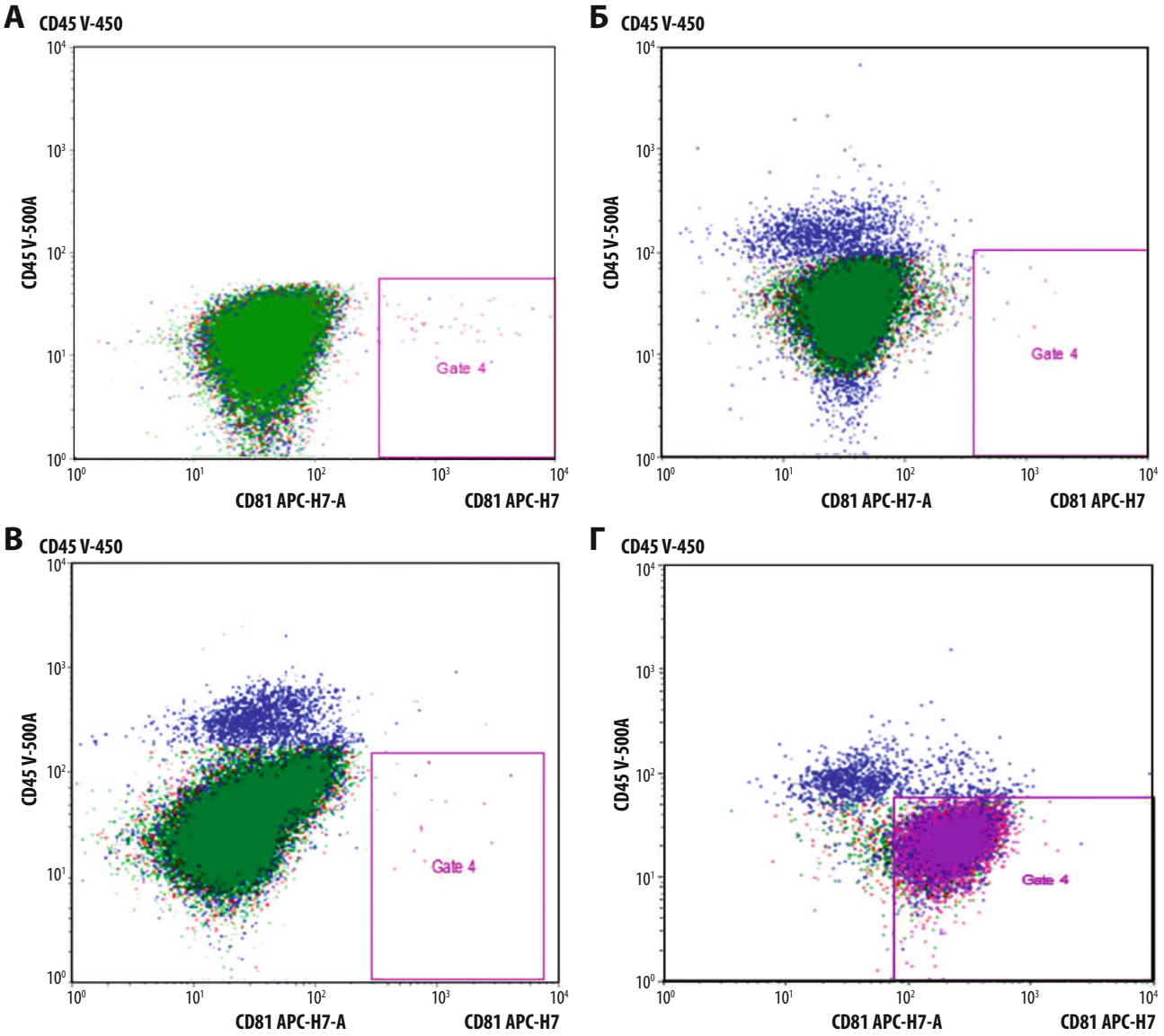


Рис. 7. Экспрессия антигена CD81 на бластных клетках В-ОЛЛ. Оценка в пределах 4-й пробы уточняющего протокола В-ОЛЛ 8-цветных панелей EuroFlow. Первичный иммунофенотип опухолевых В-лимфобластов (зеленый цвет) 4 больных. Во всех наблюдениях имеет место экспрессия CD81 (ось *x*) *vs* CD45 (ось *y*). У 3 больных (*А–В*) экспрессия CD81 слабая по сравнению с нормальными В-линейными предшественниками (гейт 4, сиреневый цвет), что можно расценить как аберрантность по данному антигену и рекомендовать его для дальнейшей оценки МОБ. У 4-го больного (*Г*) экспрессия CD81 по интенсивности совпадает с нормальными В-линейными предшественниками (гейт 4, бластные клетки и нормальные В-линейные предшественники обозначены сиреневым цветом). В подобной ситуации CD81 не может быть рекомендован для оценки МОБ

Fig. 7. CD81 antigen expression on blast cells of B-ALL. The estimation is within the fourth test of the qualifying protocol of EuroFlow B-ALL 8-color panels. Primary immunophenotype of tumor B-lymphoblasts (green) of 4 patients. Expression of CD81 (X axis) vs. CD45 (Y axis) is found in all observations. In 3 patients (*A–B*), the CD81 expression is weak, as compared to normal B-lineage progenitor cells (gate 4, lilac), which may be interpreted as aberrance for this antigen; and therefore it may be recommended for further MRD evaluation. In the 4th patient (*Г*), the intensity of the CD81 expression is similar to normal B-lineage progenitor cells (gate 4, blast cells and normal B-lineage progenitor cells are marked lilac). In such situations, CD81 cannot be recommended for MRD evaluation

Мониторинг МОБ предполагает проводить детальный иммунофенотипический анализ бластных клеток в сравнении с очень маленьким количеством нормальных, резидуальных в данной ситуации В-линейных предшественников. Выявить последние можно только при оценке 500 000–2 000 000 клеток образца.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов. Е.А. Османов, главный редактор, Н.Н. Тупицын, заместитель главного редактора, и А.В. Попа, член редакционной коллегии журнала «Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и

клиническая практика», не участвовали в рецензировании рукописи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: все авторы.
Сбор и обработка данных: О.А. Безнос, Л.Ю. Гривцова.
Предоставление материалов исследования: О.А. Безнос, Л.Ю. Гривцова, И.Н. Серебрякова, О.Ю. Баранова, М.А. Шервашидзе.
Анализ и интерпретация данных: О.А. Безнос, Л.Ю. Гривцова.
Подготовка рукописи: О.А. Безнос, Л.Ю. Гривцова.
Окончательное одобрение рукописи: Л.Ю. Гривцова, Н.Н. Тупицын, А.В. Попа.
Административная поддержка: Н.Н. Тупицын, Е.А. Османов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, et al. Clinical significance of minimal residual disease in children acute lymphoblastic leukemia and its relationship to the prognostic factors: a Children's Oncology Group study. Blood. 2008;111(12):5477–85. doi: 10.1182/blood-2008-01-132837.

2. Dworzak MN, Froschl G, Printz D, et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2002;99(6):1952–8. doi: 10.1182/blood.V99.6.1952.

3. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, 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.

4. Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2002;100(1);52–8. doi: 10.1182/blood-2002-01-0006.

5. Coustan-Smith E, Ribeiro RC, 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.

6. Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of antracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. Blood. 2000;95(11):3310–22.

7. Гривцова Л.Ю., Попа А.В., Купрышина Н.А. и др. Оценка минимальной резидуальной болезни при острых лимфобластных лейкозах из В-линейных предшественников у детей методом трехцветной проточной цитометрии. Иммунология гемопоэза. 2008;5(2):8–33.

[Grivtsova LYu, Popa AV, Kupryshina NA, et al. Detection of minimal residual disease in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with simplified protocols. Immunologiya gemopoeza. 2008;5(2):8–33. (In Russ)]

8. Гривцова Л.Ю., Попа А.В., Серебрякова И.Н., Тупицын Н.Н. К дальнейшей стандартизации определения остаточных бластных клеток в костном мозге детей с В-линейными острыми лимфобластными лейкозами на 15-й день индукционной терапии. Иммунология гемопоэза. 2011;8(1):35–54.

[Grivtsova LYu, Popa AV, Serebryakova IN, Tupitsyn NN. To further standardization in detection of residual blasts in bone marrow of children with B-cell acute lymphoblastic leukemia on Day 15 of induction therapy. Immunologiya gemopoeza. 2011;8(1):35–54. (In Russ)]

9. van Dongen JJM, van der Velden VHJ, Bruggemann M, et al. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. Blood. 2015;125(26):3996–4009. doi: 10.1182/blood-2015-03-580027.

10. van Dongen JJM, Lhermitte L, Bottcher S, et al. 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.

11. Локен М.Р., Уэлс Д.А. Определение клеток предшественников. Иммунология гемопоэза. 2010;7(1):8–22.

[Loken MR, Wells DA. Enumeration of progenitor cells. Immunologiya gemopoeza. 2010;7(1):8–22 (In Russ)]

12. Гривцова Л.Ю., Тупицын Н.Н. Иммунологическая оценка гемодилюции костного мозга при лабораторных исследованиях (на основании теста М. Локен). Медицинский алфавит. 2015;4(18):67–70.

[Grivtsova LYu, Tupitsyn NN. Immunological evaluation of bone marrow hemodilution in laboratory test (based on M. Loken's test). Meditsinskii alfavit. 2015;4(18):67–70. (In Russ)]

13. Тупицын Н.Н., Гривцова Л.Ю., Купрышина Н.А. Иммунодиагностика опухолей крови на основании многоцветных (8-цветных панелей) Европейского консорциума по проточной цитометрии (Euroflow). Иммунология гемопоэза. 2015;13(1):31–62.

[Tupitsyn NN, Grivtsova LYu, Kupryshina NA. Haematopoietic malignancies immune diagnostics based on Euroflow Consortium proposals: 8-color flow cytometry. Immunologiya gemopoeza. 2015;13(1):31–62. (In Russ)]

14. Veltroni M, de Zen L, Sanzari MC, et al.; I-BFM-ALL-FCM-MRD-Study Group. Expression of CD58 in normal, regenerating and leukemic bone marrow B cells: implications for the detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia. J Hematol. 2003;88(11):1245–52.

15. Romero-Ramırez H, Morales-Guadarrama MT, Pelayo R, et al. CD38 expression in early B-cell precursors contributes to extracellular signal-regulated kinase-mediated apoptosis. Immunology. 2014;144(2):271–81. doi: 10.1111/imm.12370.

16. Tajima F, Deguchi T, Laver JH, et al. Reciprocal expression of CD38 and CD34 by adult murine hematopoietic stem cells. Blood. 2001;97(9):2618–24. doi: 10.1182/blood.V97.9.2618.

17. Higuchi Y, Zeng H, Ogawa M. CD38 expression by hematopoietic stem cells of newborn and juvenile mice. Leukemia. 2003;17(1):171–4. doi: 10.1038/sj.leu.2402785.

18. Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. Immunol Rev. 2004;197(1):179–91. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.0109.x.

19. Lamkin T, Brooks J, Annett G, et al. Immunophenotypic differences between putative hematopoietic stem cells and childhood B cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. Leukemia. 1994;8(11):1871–8.

20. Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, et al. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2001;97(7):2115–20. doi: 10.1182/blood.V97.7.2115.

21. De Waele M, Renmans W, Jochmans K, et al. Different expression of adhesion molecules on CD34+ cells in AML and B-lineage ALL and their normal bone marrow counterparts. Eur J Haematol. 1999;63(3):192–201. doi: 10.1111/j.1600-0609.1999.tb01767.x.

22. Dworzak MN, Fritsch G, Froschl G, et al. Four-Color Flow Cytometric Investigation of Terminal Deoxynucleotidyl Transferase–Positive Lymphoid Precursors in Pediatric Bone Marrow: CD79a Expression Precedes CD19 in Early B-Cell Ontogeny. Blood. 1998;92(9):3203–9.

23. Coustan-Smith E, Song G, Clark C, et al. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2011;117(23):6267–76. doi: 10.1182/blood-2010-12-324004.

24. Barrena S, Almeida J, Yunta M, et al. Aberrant expression of tetraspanin molecules in B-cell chronic lymphoproliferative disorders and its correlation with normal B-cell maturation. Leukemia. 2005;19(8):1376–83. doi: 10.1038/sj.leu.2403822.

25. Тупицын Н.Н., Гривцова Л.Ю., Купрышина Н.А. Проточная цитометрия в онкогематологии. Часть I. Основы и нововведения в диагностике острых лейкозов. Клиническая онкогематология. 2012;5(1):42–7.

[Tupitsyn NN, Grivtsova LYu, Kupryshina NA. Flow cytometry in hematology malignancies. Part I. ABC and news in acute leukemia diagnostics. Klinicheskaya onkogematologiya. 2012;5(1):42–7. (In Russ)]

26. Shoham T, Rajapaksa R, Boucheix C, et al. The Tetraspanin CD81 Regulates the Expression of CD19 During B Cell Development in a Postendoplasmic Reticulum Compartment. J Immunol. 2003;171(8):4062–72. doi: 10.4049/jimmunol.171.8.4062.