Клиническая онкогематология. 2016;9(3):302–13

ОНКО клиническая ГЕМАТОЛОГИЯ

Clinical oncohematology. 2016;9(3):302–13

ONCO clinical HEMATOLOGY

ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

LYMPHOID MALIGNANCIES

Острые лейкозы: различия иммунофенотипа бластных клеток и их неопухолевых аналогов в костном мозге

А.М. Попов[1], Т.Ю. Вержбицкая[2,3], Л.Г. Фечина[2], А.В. Шестопалов[1,4], С.А. Плясунова[1]

[1] ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, ул. Саморы Машела, д. 1, Москва, Российская Федерация, 117997

[2] ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», ул. Серафимы Дерябиной, д. 32, Екатеринбург, Российская Федерация, 620149

[3] ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», ул. Карла Маркса, д. 22а, Екатеринбург, Российская Федерация, 620026

[4] ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, ул. Саморы Машела, д. 1, Москва, Российская Федерация, 117997

РЕФЕРАТ

Определение иммунофенотипа опухолевых бластных клеток в костном мозге методом проточной цитометрии на протяжении многих лет является одним из основных методов диагностики острых лейкозов (ОЛ). Клетки нормального лимфопоэза и миелопоэза, сходные по антигенному профилю с опухолевыми бластами, могут серьезно осложнять процесс диагностики ОЛ. Генетические нарушения, приводящие к образованию опухолевого клона, способствуют формированию иммунофенотипа, отличающегося от нормальных клеток. Аберрантная экспрессия маркеров, определяемая исключительно на бластных клетках ОЛ, формирует так называемый лейкоз-ассоциированный иммунофенотип. Определение лейкоз-ассоциированного иммунофенотипа методом многоцветной проточной цитометрии позволяет четко отличать нормальные и лейкозные клетки-предшественницы. Однако для этого необходим анализ большого количества маркеров одновременно на одних и тех же клетках, т. е. применение многоцветной проточной цитометрии с хорошо продуманными и отработанными панелями моноклональных антител. Кроме того, правильная оценка положения клеточных популяций на графиках требует максимально адекватной настройки цитометра, корректной подготовки проб и наличия у оператора достаточного опыта. Чаще всего соблюдение этих условий возможно в крупных лабораториях, проводящих референс-иммунофенотипирование в рамках многоцентровых исследований.

Ключевые слова: острые лейкозы, проточная цитометрия, экспрессия антигенов, иммунофенотип.

Acute Leukemias: Immunophenotypic Differences between Blast Cells and Their Nonneoplastic Analogues in Bone Marrow

AM Popov[1], TYu Verzhbitskaya[2,3], LG Fechina[2], AV Shestopalov[1,4], SA Plyasunova[1]

[1] Dmitrii Rogachev Federal Scientific Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, 1 Samory Mashela str., Moscow, Russian Federation, 117997

[2] Regional Children's Hospital No. 1, 32 Serafimy Deryabinoi str., Yekaterinburg, Russian Federation, 620149

[3] Institute of Medical Cell Technologies, 22a Karla Marksa str., Yekaterinburg, Russian Federation, 620026

[4] N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, 1 Samory Mashela str., Moscow, Russian Federation, 117997

ABSTRACT

Flow cytometry immunophenotyping of bone marrow tumor blasts is one of the principal methods used for acute leukemia (AL) diagnosing. Normal lymphopoietic and myelopoietic progenitors have very similar antigenic profile with leukemic cells, thus, making the AL diagnosing more difficult. Genetic disorders resulting in formation of a tumor clone contribute to development of an immunophenotype that differs from normal cells. Aberrant expression of markers detected in AL blast cells alone forms a so-called leukemia-associated immunophenotype. The leukemia-associated immunophenotype detection by multicolor flow cytometry permits distinguishing between normal and neoplastic cells. This requires simultaneous assessment of many markers on the same cells, which is possible only if multicolor flow cytometry with well-designed and well-established antibodies panels is used. Moreover, correct interpretation of the cell population location on dot plot requires adequate cytometer setup, standardized sample preparation and enough experienced personnel. That is why correct immunophenotyping is often possible only in large laboratories performing reference immunophenotyping within the frames of multicenter trials.

Keywords: acute leukemias, flow cytometry, antigenic expression, immunophenotype.

© 2016 практическая медицина

Получено: 19 февраля 2016 г.
Принято в печать: 16 марта 2016 г.

Для переписки: Александр Михайлович Попов, канд. мед. наук, ул. Саморы Машела, д. 1, Москва, Российская Федерация, 117997; тел.: +7(495)287-65-70; e-mail: uralcytometry@gmail.com

Для цитирования: Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Фечина Л.Г. и др. Острые лейкозы: различия иммунофенотипа бластных клеток и их неопухолевых аналогов в костном мозге. Клиническая онкогематология. 2016;9(3):302–13.

DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-302-313

Received: February 19, 2016
Accepted: March 16, 2016

For correspondence: Aleksandr Mikhailovich Popov, PhD, 1 Samory Mashela str., Moscow, Russian Federation, 117997; Tel.: +7(495)287-65-70; e-mail: uralcytometry@gmail.com

For citation: Popov AM, Verzhbitskaya TYu, Fechina LG, et al. Acute Leukemias: Immunophenotypic Differences between Blast Cells and Their Nonneoplastic Analogues in Bone Marrow. Clinical oncohematology. 2016;9(3):302–13 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-302-313

ВВЕДЕНИЕ

Определение иммунофенотипа опухолевых бластных клеток в костном мозге (КМ) методом проточной цитометрии на протяжении многих лет является одним из основных методов диагностики острых лейкозов (ОЛ) [1–3]. Результаты иммунофенотипирования крайне важны для определения линейной принадлежности опухолевых клеток, достоверной диагностики иммунного варианта острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), стратификации пациентов на группы риска, мониторинга результатов терапии и подтверждения рецидивов ОЛ [1–4].

В ряде случаев в КМ могут присутствовать в значительном количестве нормальные гемопоэтические предшественники, неотличимые от лейкозных бластных клеток при цитоморфологическом исследовании, имеющие сходный с ними антигенный профиль [5–7]. В такой ситуации важной задачей иммунофенотипирования становится разграничение нормальных и опухолевых клеток-предшественниц. При анализе клеточного состава нормального КМ даже по базовым цитометрическим параметрам, таким как экспрессия общего лейкоцитарного антигена CD45 и величина бокового светорассеяния (SSC — side scatter), видно наличие большого количества элементов, принадлежащих различным линиям гемопоэза разной степени зрелости — от наиболее ранних лимфоидных и миелоидных предшественников до зрелых клеток (рис. 1). Фактически кроме ранних элементов Т-лимфопоэза, в основном происходящего в тимусе, в КМ в разном количестве определяются все типы гемопоэтических клеток.

Генетические нарушения, приводящие к образованию опухолевого клона, способствуют формированию иммунофенотипа, отличающегося от антигенного профиля нормальных клеток. Аберрантная экспрессия маркеров, определяемая исключительно на бластных клетках при ОЛ, формирует так называемый лейкоз-ассоциированный иммунофенотип (ЛАИФ) [7–9]. Описано несколько типов нарушений экспрессии антигенов [7–14]:

- повышенная экспрессия, например, CD58 при ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ) или CD33 при острых миелоидных лейкозах (ОМЛ);
- сниженная экспрессия, например, CD45-негативные клетки при ВП-ОЛЛ или промежуточная экспрессия CD3 на мембране бластных элементов при Т-линейных ОЛЛ;
- коэкспрессия антигенов другой линии — экспрессия миелоидных маркеров (например, CD13 или CD33) при ОЛЛ и лимфоидных маркеров (например, CD7 или CD19) при ОМЛ;
- гомогенная экспрессия — отсутствие типичного для нормального созревания гетерогенного распределения клеток по экспрессии антигенов;
- асинхронная экспрессия — одновременная экспрессия маркеров разных стадий дифференцировки, не встречающихся на одних и тех же нормальных клетках (например, CD34 и CD20 при ВП-ОЛЛ), либо, наоборот, отсутствие экспрессии какого-либо антигена при наличии других, характеризующих определенную степень дифференцировки клеток (например, отсутствие экспрессии CD2 при наличии CD3 на мембране бластов при Т-линейных ОЛЛ);

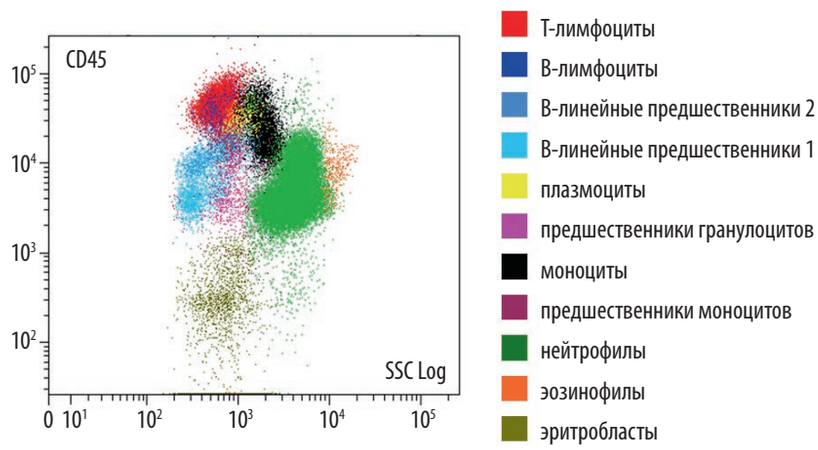


Рис. 1. Распределение клеток костного мозга в зависимости от экспрессии CD45 и SSC

Fig. 1. Distribution of bone marrow cells depending on the CD45 expression and SSC

- эктопическая экспрессия — появление в КМ клеток с фенотипом, встречающимся в норме в других органах и тканях (например, наличие в КМ клеток с фенотипом Т-линейных предшественников).

Случаи полного отсутствия ЛАИФ и соответствия фенотипа бластов при ОЛ нормальным клеткам-предшественницам крайне редки. При использовании многоцветной проточной цитометрии и адекватно составленных комбинаций моноклональных антител практически всегда удается идентифицировать ЛАИФ. Наличие даже одного аномально экспрессируемого маркера говорит об опухолевой природе исследуемой популяции клеток, в то время как убедительным доказательством обратного служит отсутствие любой аберрации экспрессии всех определяемых антигенов [7].

Чаще всего аберрации иммунофенотипа представлены асинхронной экспрессией маркеров различных стадий дифференцировки. Этот тип нарушения антигенного профиля является наиболее заметным для оператора цитометра, что приводит к уменьшению субъективного компонента анализа данных иммунофенотипирования.

НОРМАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ В-ЛИМФОЦИТОВ

В-лимфопоэз до стадии зрелых наивных В-лимфоцитов происходит в КМ, поэтому CD19-позитивные клетки КМ — очень гетерогенная популяция, включающая в себя разные стадии развития клеток-предшественниц. Чаще всего для анализа В-линейного развития используют комбинации маркера нормальных ВП (CD10 и др.) как более ранних антигенов (CD34, TdT), так и антигенов зрелых клеток (CD20, CD45), а также активационных (CD38) и лейкоз-ассоциированных (CD58) маркеров [5–19]. Типичное распределение CD19-позитивных клеток КМ на графиках представлено на рис. 2. Наиболее ранние ВП имеют яркую экспрессию CD10 и CD38, присутствуют CD34 и TdT, отсутствует экспрессия CD45 (но обязательно CD45-позитивны) и CD20. По мере созревания клетки теряют маркеры предшественников, снижается экспрессия CD10 и CD38, повышается — CD45 и появляется CD20. В итоге зрелые В-лимфоциты имеют фенотип CD19+CD10–CD34–TdT–CD20+CD38–CD45+ [5–20].

Доля каждой субпопуляции среди всех ВП может варьировать в зависимости от различных внешних условий, таких как индивидуальные особенности, подбор антител, условия подготовки проб, предшествующая терапия и т. п. Самое высокое процентное содержание ВП в КМ определяется у детей младше 2 лет [6]. Кроме того, большое количество опухолевых клеток в КМ также приводит к снижению числа нормальных В-лимфобластов [6].

Варианты расположения опухолевых бластных клеток на точечных графиках при ВП-ОЛЛ представлены на рис. 3 [7–15, 19–21]. Следует отметить, что зачастую на графиках отсутствует четкая граница между нормальными и опухолевыми бластными элементами. Проведенные исследования показали, что далеко не во всех случаях ОЛЛ на всех клетках наблюдается аберрантная экспрессия маркеров, используемых для выявления лейкозных ВП (рис. 4) [12]. В связи с этим только при применении многоцветных комбинаций антител с большим количеством одновременно определяемых маркеров (> 6) удается с большей вероятностью определить опухолевую природу клеток и подобрать сочетание антигенов, по экспрессии которых можно четко разделить нормальные и лейкозные ВП. Кроме того, было показано, что в нормальном КМ присутствуют также минорные популяции ВП с фенотипом, характерным для опухолевых клеток, например CD10–CD20–CD34+ или CD19+CD33/CD13+ [15]. Относительное число таких клеток невелико, однако при определении минимальной остаточной болезни они могут служить причиной ошибочной интерпретации данных [15]. Причиной обнаружения таких нетипичных для нормальных ВП сочетаний экспрессии антигенов может быть как определение наиболее ранних крайне немногочисленных популяций ВП, так и неспецифическое связывание антител [22], результаты которого становятся наиболее заметными при анализе большого количества клеток. Наиболее приемлемым способом повышения специфичности определения ЛАИФ является увеличение количества одновременно определяемых антигенов, т. е. применение многоцветной цитометрии.

Достаточно частой аберрацией иммунофенотипа при ВП-ОЛЛ является коэкспрессия миелоидных маркеров (от 1 до 5) [7, 12, 13, 19, 20]. Более чем в половине случаев опухолевые клетки экспрессируют как минимум 1 миелоидный антиген [20]. Чаще всего наблюдается гетерогенное распределение популяции лимфобластов по экспрессии маркеров гранулоцитов. Кроме того, выявление некоторых антигенов нередко бывает связано с наличием определенных молекулярно-генетических аномалий. Например, CD13 и CD33 часто встречаются при ОЛЛ с t(12;21) (p12;q22) [23], а CD15 и CD65 — при ОЛЛ, ассоциированном с перестройками гена *MLL* [23, 24].

При ВП-ОЛЛ также в редких случаях экспрессируются Т-линейные (CD7, CD5, CD2) и NK-клеточные

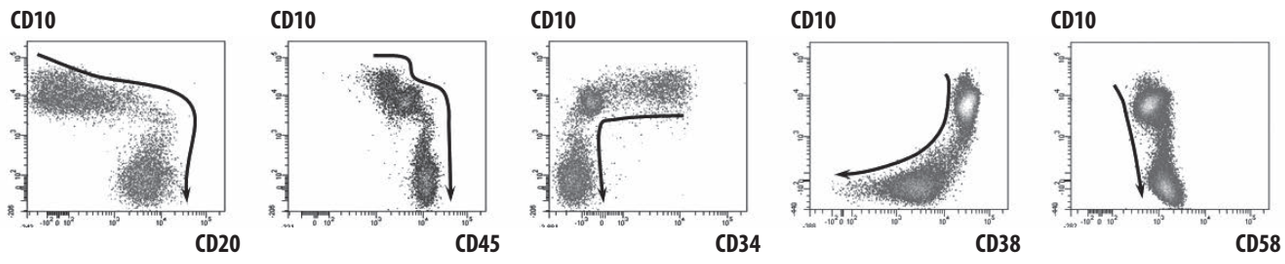


Рис. 2. Типичное для В-линейной регенерации распределение клеток на точечных графиках. Отображены CD19(+)-клетки. Направление изменения экспрессии маркеров при созревании В-лимфоцитов показано стрелкой

Fig. 2. Distribution of cells in point charts typical for B-linear regeneration. CD19(+) cells are shown. The direction of marker expression in maturation of B-lymphocytes is marked with an arrow

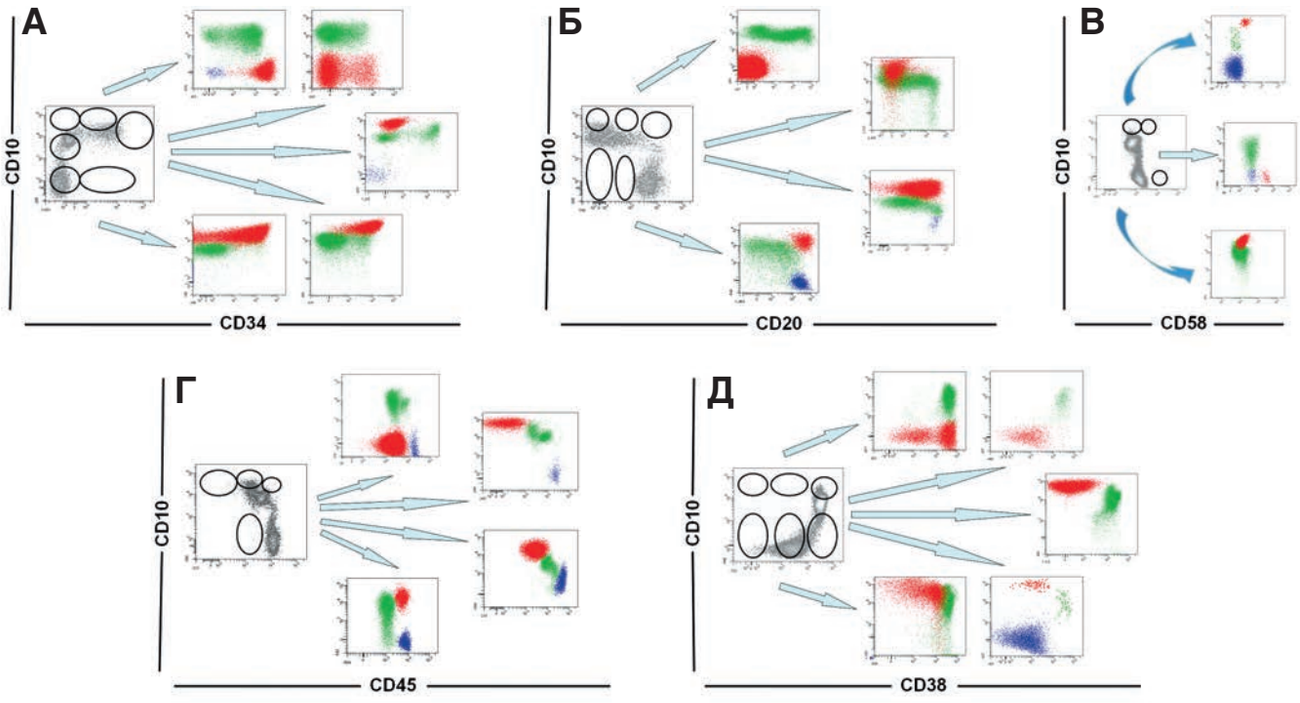


Рис. 3. Варианты расположения опухолевых бластных клеток при остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников относительно нормальных В-клеток костного мозга на точечных графиках CD34/CD10 (*А*), CD20/CD10 (*Б*), CD58/CD10 (*В*), CD45/CD10 (*Г*), CD38/CD10 (*Д*). Отображены CD19(+)-клетки. Опухолевые клетки отмечены красным цветом, зрелые В-лимфоциты — синим, нормальные В-предшественники — зеленым

Fig. 3. Variants of tumor blast cell location in acute lymphoblastic leukemia from B-linear precursors of relatively normal B-cells of the bone marrow in point charts CD34/CD10 (*A*), CD20/CD10 (*Б*), CD58/CD10 (*B*), CD45/CD10 (*Г*), CD38/CD10 (*Д*). CD19(+) cells are shown. Tumor cells are marked with red, mature B-lymphocytes with blue, normal B-precursors with green

(CD56) маркеры [20]. В то же время CD5 нельзя считать строго специфичным Т-клеточным антигеном, поскольку он может определяться и на ранних нормальных ВП [25].

ЛАИФ могут изменяться под воздействием противоопухолевых препаратов [26–32], прежде всего кортикостероидов [30]. Снижается экспрессия CD10, CD34 и CD58, в то время как экспрессия CD45, CD20 и CD19 повышается [26, 29–33]. Изменяется не только интенсивность экспрессии антигенов, но и распределение клеток в популяции, а также процентное содержание положительных клеток [31]. Иммунофенотип бластных клеток частично восстанавливается по окончании индукционной терапии [33], однако чаще всего все же отличается от исходно диагностированного [34, 35]. Кроме того, противоопухолевые препараты изменяют и антигенный профиль нормальных клеток КМ. Уже к середине индукционной терапии погибают нормальные ВП [36–38], а экспрессия маркеров В-лимфоцитами изменяется [31]. В противоположность опухолевым бластным клеткам на зрелых клетках снижается экспрессия CD45 и CD20 [31]. Таким образом, нормальные и лейкозные клетки на графиках сближаются, что в ряде случаев затрудняет их раз-

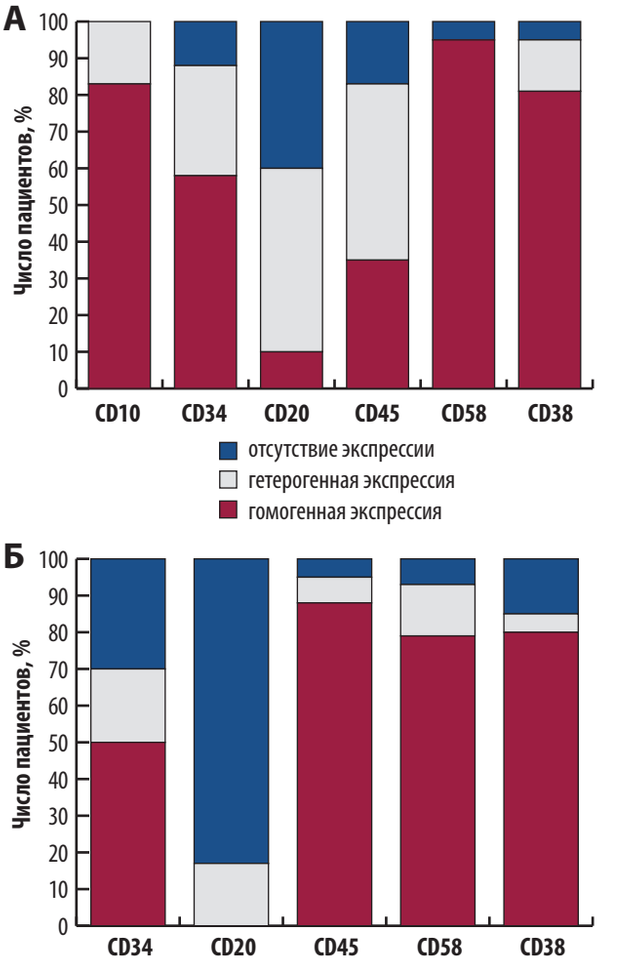


Рис. 4. Варианты экспрессии CD10, CD34, CD20, CD45, CD58 и CD38 опухолевыми клетками при CD10-позитивном (*А*) и CD10-негативном (*Б*) иммунных подтипах острого лимфобластного лейкоза из В-линейных предшественников [12, 14]

Fig. 4. Variants of CD10, CD34, CD20, CD45, CD58 and CD38 expression with tumor cells in CD10-positive (*A*) and CD10-negative (*Б*) immune subtypes of acute lymphoblastic leukemia from B-linear precursors [12, 14]

граничение. Изменение фенотипа опухолевых бластных клеток и ВП во время терапии также требует применения многоцветной цитометрии для точной идентификации ВП-ОЛЛ.

У большинства пациентов (особенно при CD10-негативном варианте ВП-ОЛЛ) выделение опухолевых клеток только по экспрессии CD45 может оказаться проблематичным, поскольку бласты отличаются от нормальных клеток по экспрессии пан-лейкоцитарного антигена только количественно. Несмотря на выявленные количественные отличия в экспрессии антигенов опухолевыми и нормальными клетками, зачастую маркеры экспрессируются далеко не всеми бластами. Так, в 15–20 % случаев наблюдалась гетерогенная экспрессия CD10-маркера, по которому чаще всего основывается оценка нормальных ВП [12]. Гетерогенная экспрессия CD34, еще одного антигена, часто используемого для выявления лейкозных клеток, отмечается в 30–35 % случаев. Кроме того, у части пациентов бласты CD34-негативны. В итоге менее чем у половины больных (около 45 %) все бласты коэкспрессируют CD10 и CD34. Приблизительно у 5 % пациентов обнаруживаются опухолевые клетки, не экспрессирующие ни CD10, ни CD34 [12]. Сходные результаты определения экспрессии CD34 были получены в группе пациентов с CD10-негативным ВП-ОЛЛ [14]. Разные варианты экспрессии CD20 и CD38, а также выявление случаев с наличием CD58-негативных бластов свидетельствуют в пользу того, что и эти маркеры не всегда применимы для достоверного выявления опухолевых клеток. Гетерогенность экспрессии антигенов опухолевыми клетками, обнаруженная для всех исследованных маркеров при обоих вариантах ВП-ОЛЛ [12, 14], обусловливает то, что у некоторых больных приходится мониторировать одновременно несколько субпопуляций бластов. Таким образом, несмотря на четкие различия между опухолевыми и нормальными клетками по экспрессии различных антигенов, в настоящее время не существует единственного маркера, который был бы применим для определения бластов во всех случаях ВП-ОЛЛ. Все перечисленное определяет необходимость использования многоцветной цитометрии для точного выявления опухолевых клеток на фоне нормальных клеток-предшественниц.

Т-ЛИМФОЦИТЫ КОСТНОГО МОЗГА

Развитие Т-клеток в основном происходит в тимусе, а в КМ попадают только зрелые Т-лимфоциты. В связи с этим распределение Т-клеток КМ по экспрессии антигенов похоже на распределение в периферической крови (рис. 5) [7, 39]. Большинство клеток имеет фенотип CD7+iCD3+CD5+CD2+CD3+TCRαβ+, также экспрессирует CD4 или CD8, но не имеет маркеров ни гемопоэтических предшественников (CD34, CD99, TdT), ни кортикальных тимоцитов (CD1a). При этом в крайне низких количествах могут определяться Т-клетки TCRγδ+ и лимфоциты с нетипичным фенотипом [7, 39].

Появление в КМ клеток с фенотипом Т-линейных предшественников автоматически может расцениваться как развитие опухоли [7, 39]. В связи с этим в ряде работ предлагалось использовать простую комбинацию внутриклеточных антигенов CD3 (экспрессируется всеми Т-клетками) и TdT для подтверждения опухолевой природы клеток [7]. Однако в ряде случаев Т-линейных ОЛЛ TdT в ядрах бластов не определяется, поэтому для выявления лейкозных клеток вполне приемлемо использование других маркеров клеток-предшественниц. Наибольшее распространение наряду с TdT получил антиген CD99 [40–42]. Прежде всего, экспрессию данного маркера определяют с целью обнаружить остаточные опухолевые клетки во время терапии [42]. Следует отметить, что зачастую фенотип Т-линейных ОЛЛ мало чем отличается от фенотипа нормальных Т-клеток тимуса, поэтому наиболее часто встречающимся ЛАИФ при Т-ОЛЛ является эктопическая экспрессия маркеров, т. е. появление тимических клеток в КМ [7]. Хотя и реже, но встречаются и другие аберрации фенотипа [39]. Среди них наиболее часто отмечаются снижение экспрессии Т-клеточных маркеров CD3, CD2, CD5 и различные варианты асинхронной экспрессии [39]. Гораздо реже, чем при ВП-ОЛЛ, могут выявляться

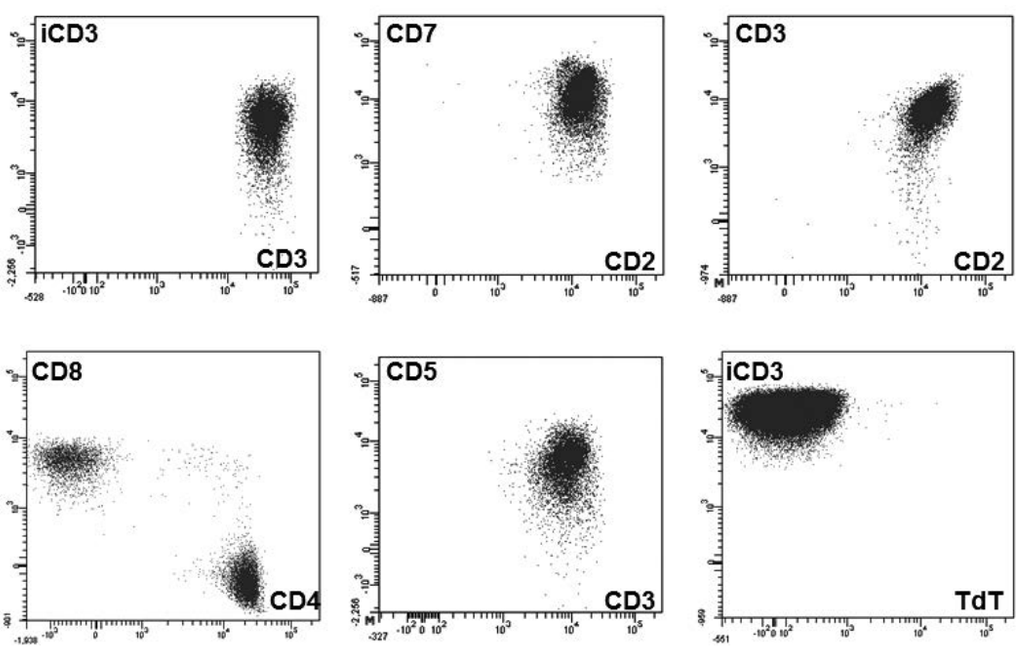


Рис. 5. Типичное распределение Т-клеток костного мозга по экспрессии антигенов. Отображены iCD3(+)-клетки

Fig. 5. Typical distribution of bone marrow T-cells according to antigen expression. iCD3(+) cells are shown

миелоидные антигены [39]. Варианты расположения опухолевых бластных клеток на точечных графиках при Т-ОЛЛ представлены на рис. 6.

Поскольку нормальные Т-клетки в КМ представлены практически только зрелыми Т-лимфоцитами, их количество и распределение мало изменяются в период лечения [42, 43]. В то же время иммунофенотип Т-линейных ОЛЛ также может меняться под действием противоопухолевых препаратов. Наиболее часто отмечается снижение экспрессии TdT и миелоидных маркеров, однако и количество CD99 на поверхности опухолевых клеток также может становиться меньше [42, 43].

НОРМАЛЬНЫЙ МИЕЛОПОЭЗ

Развитие всех клеток миелоидной направленности также происходит в КМ. Однако для дифференциальной диагностики с ОЛ наибольшее значение имеют предшественники нейтрофилов, моноцитов и эритроцитов, в то время как развивающиеся базофилы, эозинофилы, мегакариоциты являются минорной составляющей клеточного состава КМ. Кроме того, крайне редко можно обнаружить в КМ общие миелоидные клетки-предшественницы, не коммитированные к дифференцировке к одной из линий. В связи с этим дальнейшее описание будет касаться только значимых клеточных популяций.

Распределение предшественников гранулоцитов и моноцитов на точечных графиках экспрессии антигенов представлено на рис. 7. Как и в случае с В-лимфопоэзом, клетки гранулоцитопоэза крайне гетерогенны по экспрессии антигенов. Все они имеют относительно низкую экспрессию CD45, хотя всегда CD45-позитивны. Ранние миелоидные предшественники экспрессируют общемиелоидные антигены CD13 и CD33, причем по мере

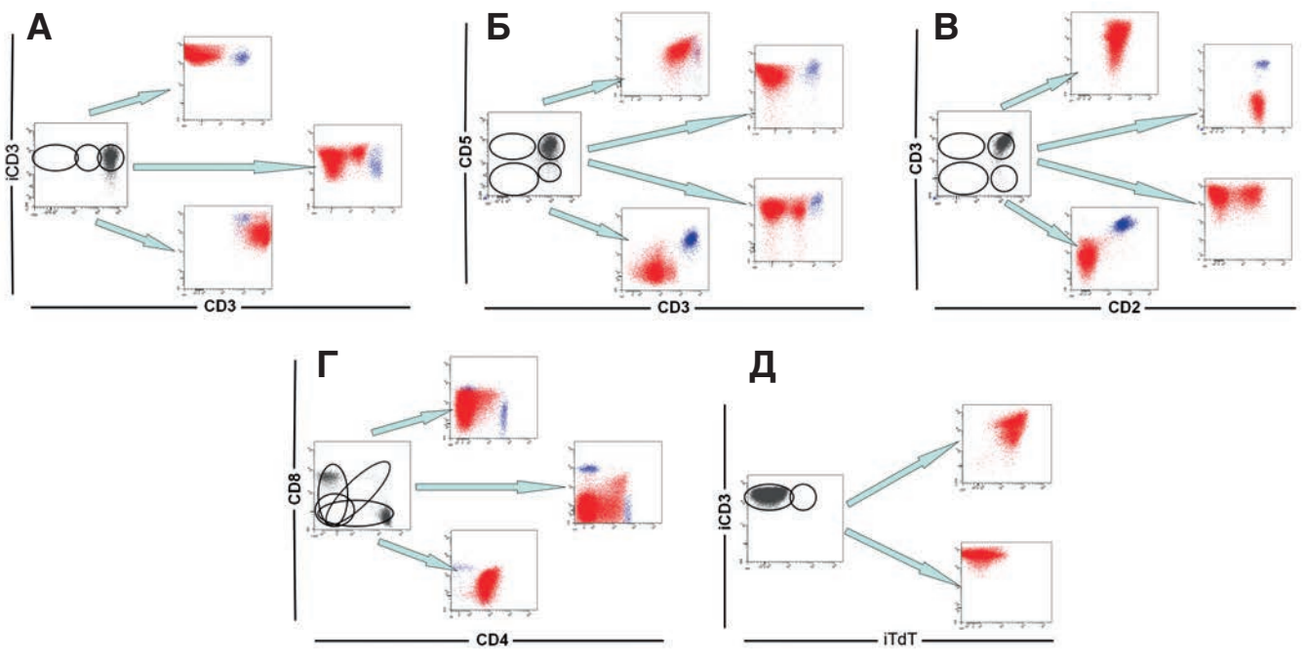


Рис. 6. Варианты расположения опухолевых бластных клеток при Т-линейных острых лимфобластных лейкозах относительно нормальных Т-клеток костного мозга на точечных графиках CD3/iCD3 (*А*), CD3/CD5 (*Б*), CD2/CD3 (*В*), CD4/CD8 (*Г*), iTdT/iCD3 (*Д*). Отображены iCD3(+)-клетки. Опухолевые клетки отмечены красным цветом, зрелые Т-лимфоциты — синим

Fig. 6. Variants of tumor blast cell location in T-linear acute lymphoblastic leukemias in relation to normal bone marrow T-cells in point charts CD3/iCD3 (*A*), CD3/CD5 (*Б*), CD2/CD3 (*B*), CD4/CD8 (*Г*), iTdT/iCD3 (*Д*). iCD3(+)-cells are shown. Tumor cells are marked with red, mature T-cells with blue

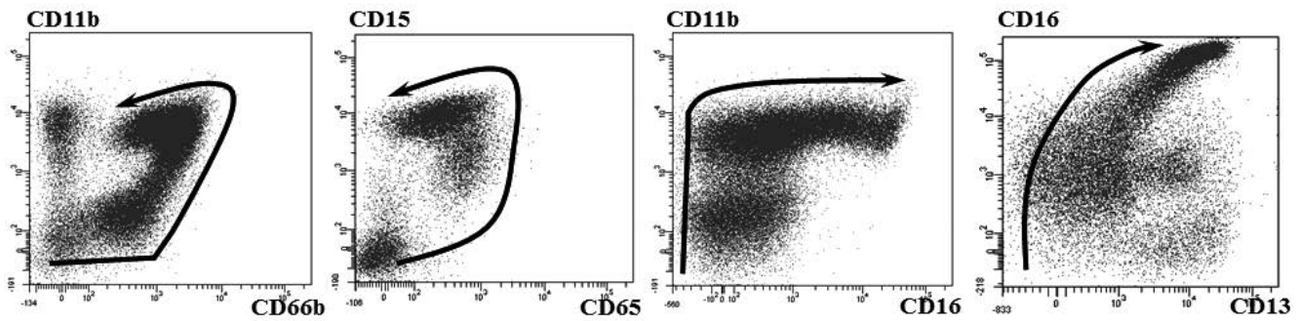


Рис. 7. Распределение предшественников гранулоцитов и моноцитов на точечных графиках экспрессии антигенов. Отображены CD33(+)-клетки. Направление изменения экспрессии маркеров при созревании нейтрофилов показано стрелкой

Fig. 7. Distribution of granulocyte and monocyte precursors in point charts of antigen expression. CD33(+) cells are shown. The direction of marker expression in maturation of neutrophils is marked with an arrow

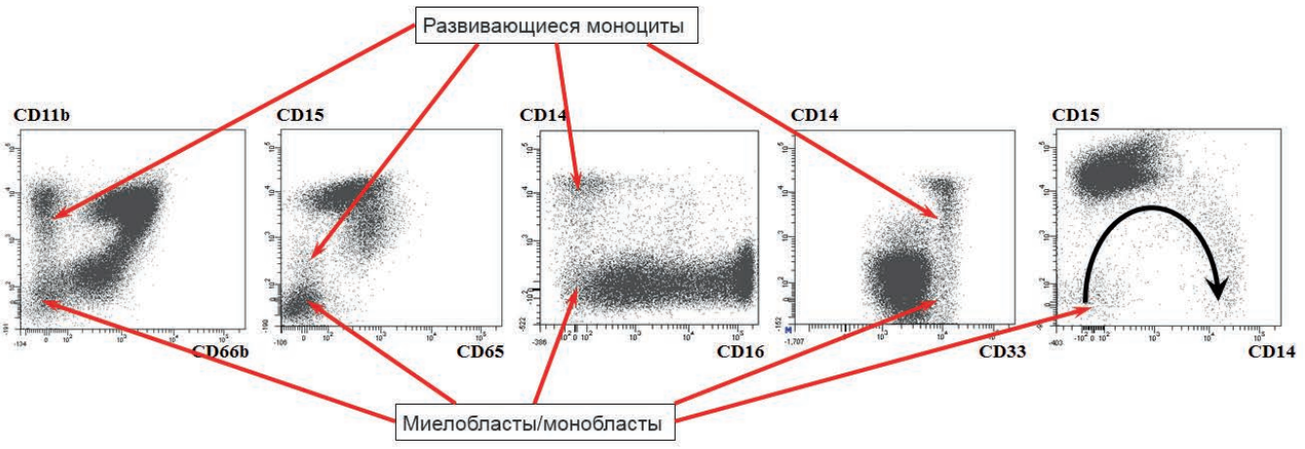


Рис. 8. Расположение развивающихся моноцитов относительно распределения предшественников нейтрофилов на точечных графиках экспрессии антигенов. Отображены CD33(+)-клетки. Направление изменения экспрессии маркеров при созревании моноцитов показано черной стрелкой

Fig. 8. Location of developing monocytes in relation to the distribution of neutrophil precursors in point charts of antigen expression. CD33(+) cells are shown. The direction of marker expression in maturation of monocytes is marked with a black arrow

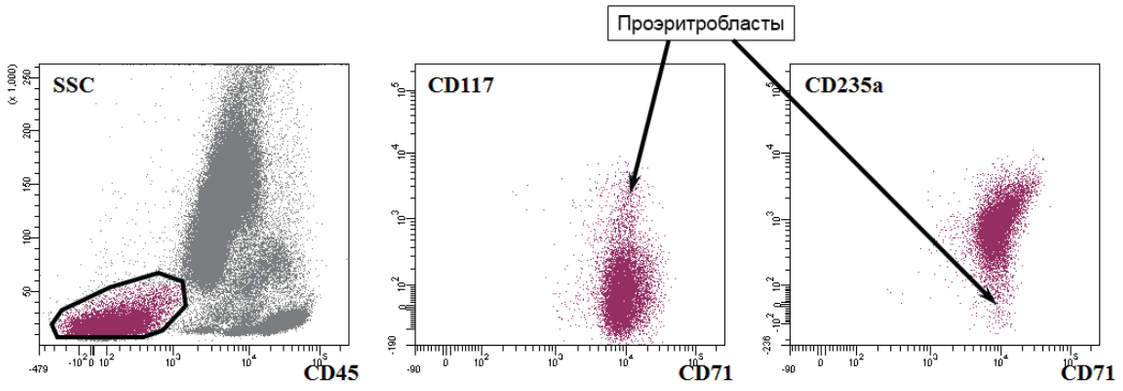


Рис. 9. Развитие эритроидных клеток в регенерирующем костном мозге. Отдельно показаны наиболее ранние предшественники эритроцитов. На графике CD45/SSC хорошо видно существенное количество миелоидных и В-линейных предшественников

Fig. 9. Development of erythroid cells in the regenerating bone marrow. Most early RBC precursors are shown separately. You may visualize a significant number of myeloid B-linear precursors in the CD45/SSC chart

созревания их экспрессия сначала повышается, а затем снижается [17, 44, 45]. Кроме того, определяются маркеры клеток-предшественниц CD34, CD117 и HLA-DR, но не обнаруживаются более зрелые гранулоцитарные маркеры [17, 44–47]. Затем происходит повышение экспрессии CD16, CD11b, CD66b, CD65, CD15, однако на некоторых промежуточных стадиях эти антигены выявляются в большем количестве, нежели на зрелых нейтрофилах [44–48]. Кроме того, с развитием гранулярности увеличивается и значение SSC. Следует отметить, что на гранулоцитах периферической крови определяется яркая экспрессия CD10 и CD16, что может использоваться для оценки степени разведения образца КМ кровью [48, 49]. При выделении в регион CD33-позитивных клеток попадают также клетки моноцитарной направленности дифференцировки. На ранних этапах развития предшественники гранулоцитов и моноцитов по экспрессии антигенов разделить невозможно [17], однако затем на графиках можно видеть отделяющуюся популяцию созревающих моноцитов (рис. 8). Отдельно для характеристики моноцитарного развития подходит комбинация CD14/CD15, т. к. на таком графике хорошо видны все основные стадии дифференцировки, а гранулоциты не мешают анализу (рис. 8). Моноциты отличаются экспрессией CD33 и CD13, наличием CD14, CD64, CD11b, а также SSC, несколько превышающим SSC лимфоцитов. Клетки эритроидного развития не экспрессируют CD45, но имеют на мембране сначала CD117, а затем CD71 и CD235a (рис. 9) [17].

При различных заболеваниях в КМ может увеличиваться также количество базофилов, эозинофилов, тучных клеток, но обычно существенной проблемы для дифференциальной диагностики с ОМЛ или миелодиспластическими синдромами (МДС) они не представляют [17].

Опухолевые клетки при ОМЛ или МДС бывает крайне сложно дифференцировать с нормальными миелоидными предшественниками [17]. Проблема заключается в том, что бласты при ОМЛ могут находиться в любой области любого графика, отражающего миелоидное созревание, в т. ч. и смешиваться с популяциями нормальных клеток-предшественниц (рис. 10). Только одновременное определение большого количества антигенов, т. е. применение многоцветной проточной цитометрии, может позволить четко идентифицировать ЛАИФ. При этом наиболее значи-

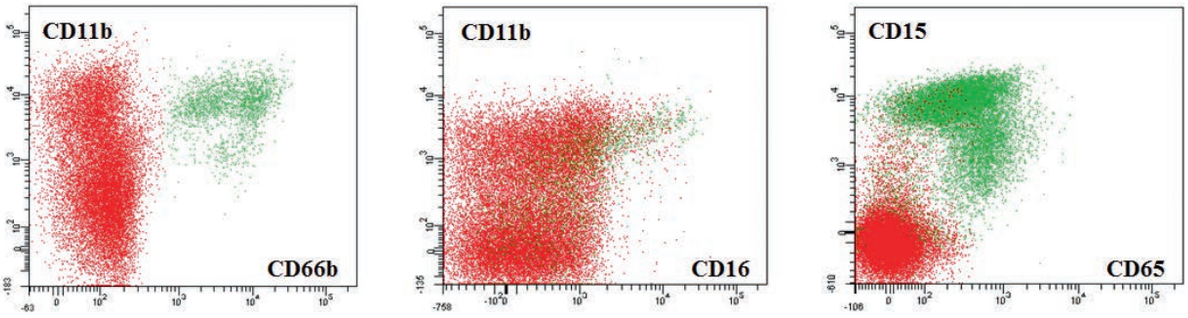


Рис. 10. Примеры положения опухолевых бластов при острых миелоидных лейкозах (ОМЛ) на графиках экспрессии антигенов, отражающих нормальное развитие миелоидных клеток. Отображены CD33(+)-клетки. Опухолевые клетки отмечены красным цветом, нормальные гранулоциты — зеленым. Хорошо видно отсутствие существенных различий между бластными клетками при ОМЛ и нормальными миелоидными предшественниками

Fig. 10. Examples of tumor blast locations in acute myeloid leukemias (AML) in antigen expression charts reflecting normal development of myeloid cells. CD33(+) cells are shown. Tumor cells are marked with red and normal granulocytes with green. The absence of significant difference between blasts in AML and normal myeloid precursors is evident

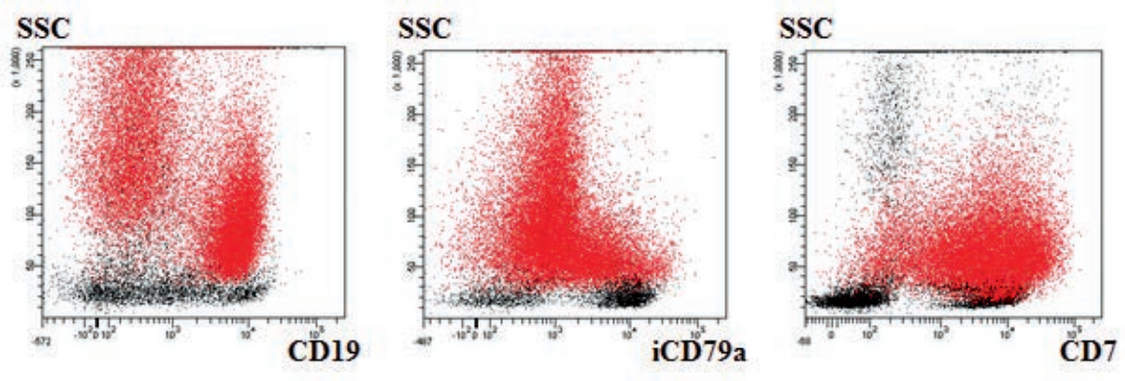


Рис. 11. Примеры экспрессии лимфоидных антигенов на бластных клетках при острых миелоидных лейкозах. Опухолевые клетки отмечены красным цветом, все остальные — черным

Fig. 11. Examples of lymphoid antigen expression on blast cells in acute myeloid leukemias. Tumor cells are marked with red, all other cells with black

мыми аберрациями иммунофенотипа при ОМЛ являются коэкспрессии лимфоидных антигенов (чаще всего CD7, CD19, CD56, CD22, TdT, CD79a) (рис. 11). Достаточно часто можно выявить опухолевые клетки по асинхронной или чрезмерной экспрессии маркеров. Крайне важно помнить, что ЛАИФ при ОМЛ или МДС имеют не только опухолевые предшественники, но и более зрелые миелоидные клетки. При этом в разных миелоидных популяциях дисплазия иммунофенотипа может быть представлена разными аберрациями и быть выражена в разной степени [17]. ЛАИФ может определяться на клетках-предшественницах не только при ОМЛ и МДС, но и при некоторых вариантах миелопролиферативных заболеваний (рис. 12). Дифференциальная диагностика бывает крайне сложной, но это и не входит в задачи оценки опухолеассоциированной экспрессии маркеров. Иммунофенотипирование позволяет зачастую лишь отличить опухолевые бласты от нормальных предшественников. Однако и для этого чаще всего подходит только многоцветная цитометрия.

ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРИРУЮЩЕГО КОСТНОГО МОЗГА

Существуют значимые различия клеточного состава КМ у здоровых людей и пациентов, получавших противоопухолевое лечение [5, 11, 17, 46, 47]. Активное восстановление костномозгового кроветворения приводит к совершенно специфической картине регенерирующего КМ (рис. 13). Происходит увеличение относительного числа более ранних субпопуляций как ВП, так и миелоидных предшественников [5, 11]. Кроме того, выявляемое количество ВП в КМ, а также соотношение различных субпопуляций могут существенно различаться в зависимости от того, через какой период времени от окончания ближайшего этапа химиотерапии происходит забор КМ (рис. 14).

На фенотип нормальных ВП влияет также таргетная терапия, прежде всего анти-CD20-моноклональные антитела. Картина КМ в таких ситуациях описана в небольшом количестве работ [50–52]. В целом происходит гибель созревающих ВП и зрелых В-клеток, однако ранние стадии В-линейного созревания сохраняются [50–52].

В зависимости от этапа противоопухолевой терапии может отличаться не только фенотип нормальных ВП, но и их количество. Эти клетки не обнаруживаются в образцах, взятых во время индукционной терапии, вне зависимости от применяемого протокола и от того, выявляются ли в этих образцах остаточные опухолевые бласты [36–38]. Однако уже на момент окончания индукционной терапии в КМ могут обнаруживаться нормальные ВП [36, 38], причем относительное число ВП-положительных образцов напрямую зависит от интенсивности терапии в рамках конкретного протокола и, как следствие, скорости восстановления кроветворения в КМ [36, 38]. В дальнейшем

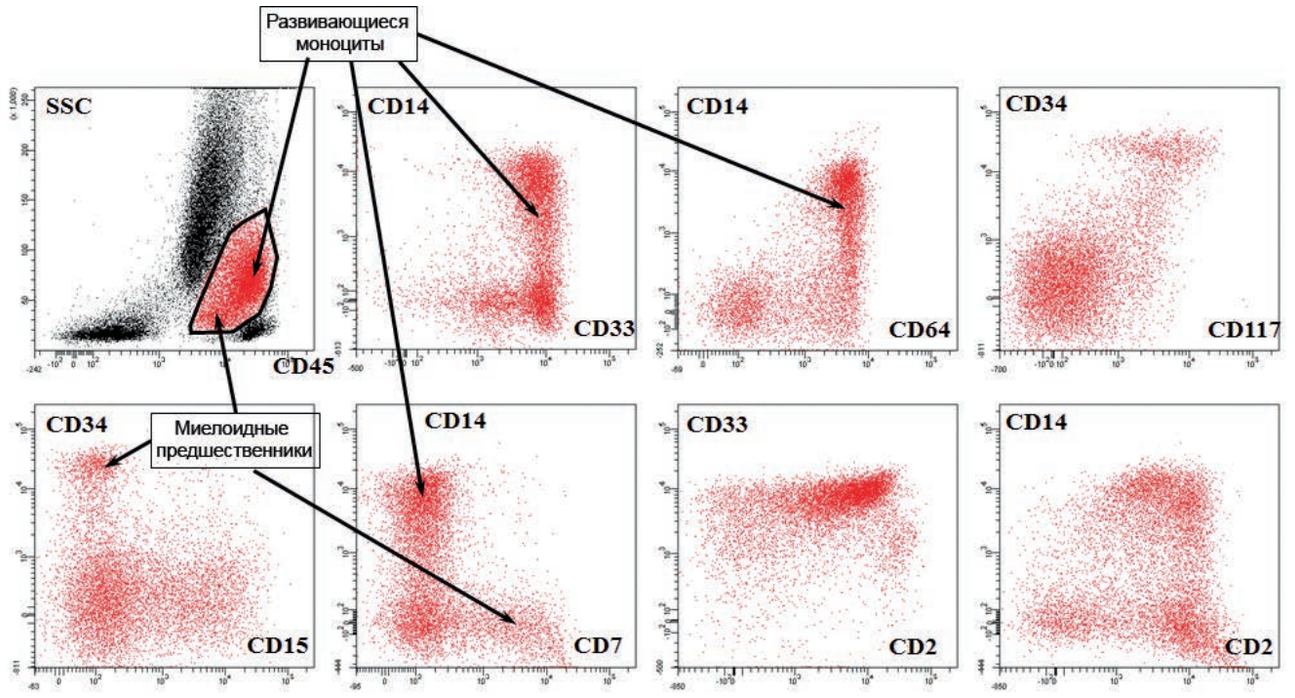


Рис. 12. Экспрессия CD7 и CD2 на миелоидных предшественниках и развивающихся моноцитах при хроническом миеломоноцитарном лейкозе

Fig. 12. CD7 and CD2 expression on myeloid precursors and developing monocytes in chronic myelomonocytic leukemia

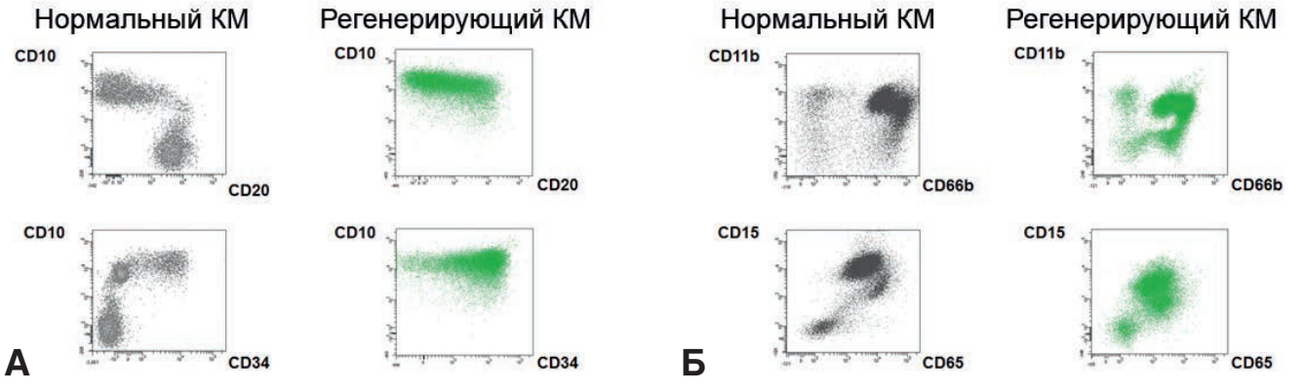


Рис. 13. Различия в распределении клеток В-линейного (*А*) и миелоидного (*Б*) развития в нормальном и регенерирующем костном мозге (КМ). Видно существенное повышение относительного числа клеток-предшественниц

Fig. 13. Difference in distribution of B-linear (*A*) and myeloid (*Б*) development in normal and regenerating bone marrow (KM). A significant increase in the relative precursor cell count is evident

нормальные клетки-предшественницы обнаруживаются у подавляющего большинства пациентов (рис. 15).

Изменения распределения клеток миелопоэза возможны не только при регенерации КМ после химиотерапии, но и под воздействием колониестимулирующих факторов. Так, применение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора приводит к весьма существенному сдвигу в сторону более ранних клеток-предшественниц (рис. 16). Необходимо также отметить, что ранние миелоидные клетки иногда могут неспецифически связывать CD19, что может осложнять выявление нормальных и опухолевых ВП [53].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разграничение опухолевых клеток от нормальных по иммунофенотипу необходимо в следующих ситуациях:

- диагностика ОЛ при малом количестве бластных клеток на фоне предшествующего лечения или выраженной регенерации КМ (рис. 17);
- диагностика рецидивов ОЛ;
- определение минимальной остаточной болезни во время терапии;
- выявление опухолевых клеток в биологических жидкостях (рис. 18) [54].

Клетки нормального лимфопоэза и миелопоэза, сходные по антигенному профилю с опухолевыми бластами, могут серьезно осложнять процесс диагностики ОЛ. ЛАИФ позволяет четко отличать нормальные и лейкозные клетки-предшественницы. Однако для этого необходим анализ большого количества маркеров одновременно на одних и тех же клетках, т. е. применение многоцветной проточной цитометрии с хорошо продуманными и отработанными панелями моноклональных антител. Кроме того, правильная оценка

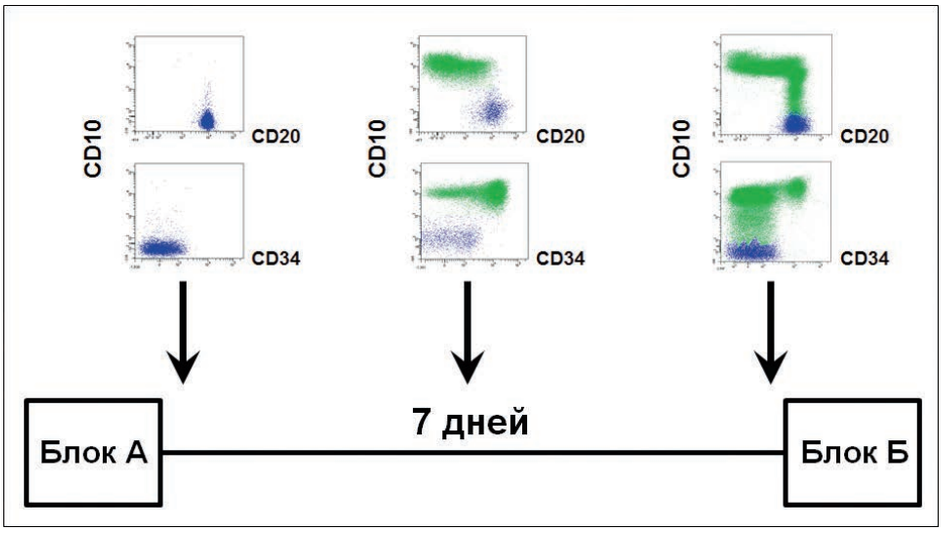
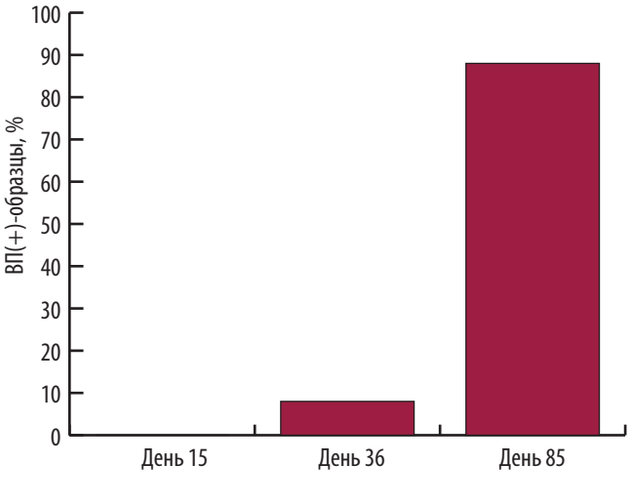


Рис. 14. Различная картина В-линейного развития в разные дни недельного перерыва между блоками интенсивной противоопухолевой терапии (блоки А и Б). Непосредственно после окончания блока нормальных В-предшественников в костном мозге нет, затем по мере восстановления сначала появляются наиболее ранние элементы и лишь к концу перерыва определяется существенное число созревающих В-предшественников

Fig. 14. Different presentations of B-linear development on different days of a one-week interval between cycles of the intense antitumor therapy (A and B). There are no normal B-precursors in the bone marrow directly after the course; then, during the course of recovery, early elements appear, and a significant number of maturing B-precursors is observed by the end of the interval

Рис. 15. Частота определения нормальных В-предшественников (ВП) в костном мозге детей с острым лимфобластным лейкозом на разных этапах терапии по протоколу «ОЛЛ МБ 2008» [38]. После окончания индукционной терапии в костном мозге нормальные клетки-предшественницы обнаруживаются у большинства пациентов

Fig. 15. The incidence of detection of normal B-precursors (ВП) in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia at different stages of treatment according to the «ОЛЛ МБ 2008» (ALL MB 2008) protocol [38]. Normal precursor cells are found in most patients with the recovery of hematopoiesis in the bone marrow



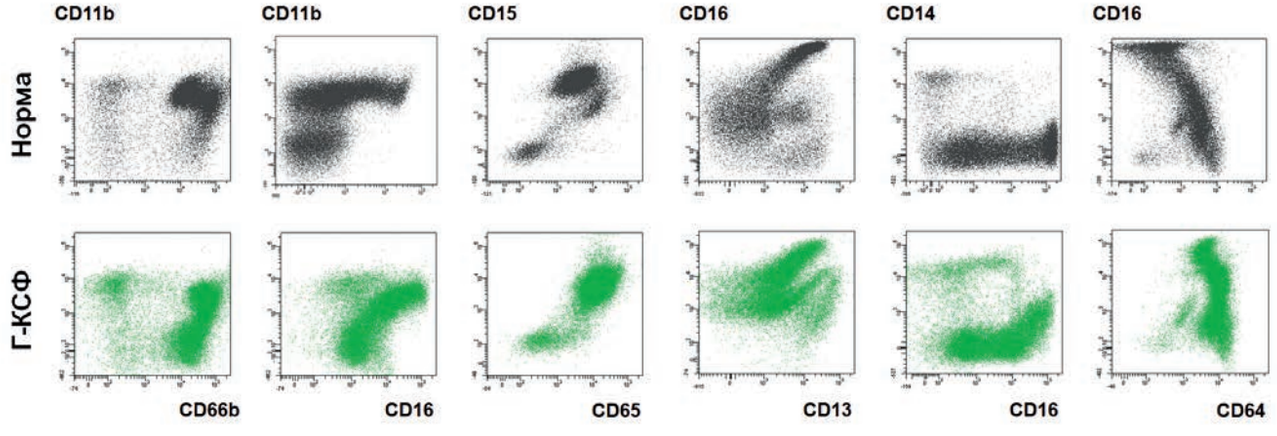


Рис. 16. Отличия картины миелоидного развития в костном мозге при использовании гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ). Отображены CD33(+)-клетки. Использование Г-КСФ приводит к существенному сдвигу в сторону более ранних клеток-предшественниц миелопоэза

Fig. 16. Difference in the myeloid development in the bone marrow with the use of granulocyte-colony stimulating factor (Г-КСФ). CD33(+) cells are shown. The use of G-CSF results in a significant shift to earlier myelopoiesis of precursor cells

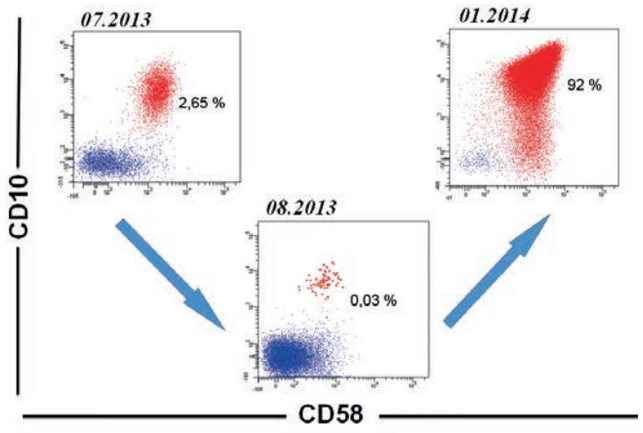


Рис. 17. Развитие острого лимфобластного лейкоза из В-линейных предшественников у ребенка 4 лет. За 6 мес. до развернутого дебюта заболевания были определены клетки с лейкоз-ассоциированным иммунофенотипом, число которых снижалось еще до начала терапии (спонтанная регрессия). Отображены CD19(+)-клетки. Опухолевые клетки отмечены красным цветом, зрелые В-лимфоциты — синим

Fig. 17. Development of acute lymphoblastic leukemia from B-linear precursors in a 4-year-old child. 6 months before the full-scaled presentation, cells with leukemia-associated phenotype were found; their number decreased before initiation of the therapy (spontaneous regression). CD19(+) cells are shown. Tumor cells are marked with red and mature B-lymphocytes with blue

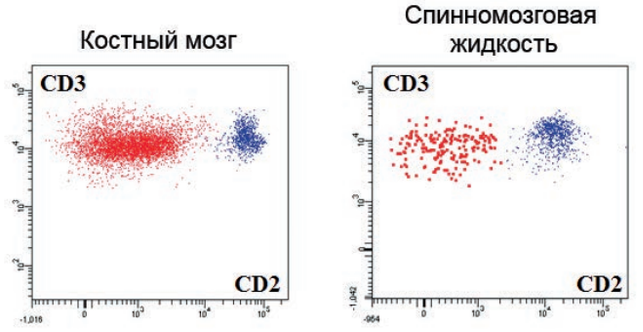


Рис. 18. Одинаковая асинхронная экспрессия антигенов (наличие CD3 в отсутствие CD2) опухолевыми клетками в костном мозге и спинномозговой жидкости у пациента с Т-линейным острым лимфобластным лейкозом [54]. Отображены CD7(+)-клетки. Опухолевые клетки отмечены красным цветом, зрелые Т-лимфоциты — синим

Fig. 18. Identical asynchronous antigen expression (the presence of CD3 with the absence of CD2) with tumor cells in the bone marrow and cerebrospinal fluid in a patient with T-linear acute lymphoblastic leukemia [54]. CD7(+) cells are shown. Tumor cells are marked with red and mature T-lymphocytes with blue

положения популяций на графиках требует максимально адекватной настройки цитометра, корректной подготовки проб и наличия у оператора достаточного опыта. Чаще всего соблюдение этих условий возможно в крупных лабораториях, проводящих референс-иммунофенотипирование в рамках многоцентровых исследований.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: все авторы.
Сбор и обработка данных: все авторы.
Предоставление материалов исследования: все авторы.
Анализ и интерпретация данных: все авторы.
Подготовка рукописи: А.М. Попов.
Окончательное одобрение рукописи: А.М. Попов, А.В. Шестопалов.
Административная поддержка: Л.Г. Фечина, А.В. Шестопалов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Morike A, Zimmermann M, Reiter A, et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. Leukemia. 2010;24(2):265–84. doi: 10.1038/leu.2009.257.

2. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. J Clin Oncol. 2011;29(5):551–65. doi: 10.1200/jco.2010.30.7405.

3. Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling MV. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? Blood. 2012;120(6):1165–74. doi: 10.1182/blood-2012-05-378943.

4. Bene M, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia. 1995;9(10):1783–6.

5. van Lochem EG, Wiegers YM, van den Beemd R, et al. Regeneration pattern of precursor-B-cells in bone marrow of acute lymphoblastic leukemia patients depends on the type of preceding chemotherapy. Leukemia. 2000;14(4):688–95. doi: 10.1038/sj.leu.2401749.

6. McKenna RW, Washington LT, Aquino DA, et al. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. Blood. 2001;98(8):2498–507. doi: 10.1182/blood.v98.8.2498.

7. Campana D, Coustan-Smith E. Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. Best Pract Res Clin Hematol. 2002;15(1):1–19. doi: 10.1053/beha.2002.0182.

8. Dworzak MN, Fritsch G, Fleischer C, et al. Comparative phenotype mapping of normal vs. malignant pediatric B-lymphopoiesis unveils leukemia-associated aberrations. Exp Hematol. 1998;26(4):305–13.

9. Lucio P, Parreira A, van den Beemd MVM, et al. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. Leukemia. 1999;13(3):419–27. doi: 10.1038/sj.leu.2401279.

10. Lucio P, Gaipa G, van Lochem EG, et al. BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. Leukemia. 2001;15(8):1185–92. doi: 10.1038/sj.leu.2402150.

11. Dworzak MN, Fritsch G, Fleisher C, et al. Multiparameter phenotype mapping of normal and post-chemotherapy B lymphopoiesis in pediatric bone marrow. Leukemia. 1997;11(8):1266–73. doi: 10.1038/sj.leu.2400732.

12. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Аберрации иммунофенотипа, применимые для мониторинга минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии при CD10-позитивном остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников. Иммунология. 2010;31(6):299–304.

[Popov AM, Verzhbitskaya TYu, Tsaur GA, et al. Immunophenotype aberrations used for monitoring of the minimal residual disease using flow cytometry in CD10-positive acute lymphoblastic leukemia from B-linear precursors. Immunologiya. 2010;31(6):299–304. (In Russ)]

13. Мовчан Л.В. Лейкоз-ассоциированный иммунофенотип опухолевых клеток у детей с острым лимфобластным лейкозом из предшественников В-лимфоцитов. Онкогематология. 2012;1:22–8.

[Movchan LV. Leukemia-associated immunophenotype of tumor cells in childhood B-precursors acute lymphoblastic leukemia. Onkogematologiya. 2012;1:22–8. (In Russ)]

14. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Алгоритм применения проточной цитометрии для мониторинга минимальной остаточной болезни при CD10-негативном остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников. Вопросы диагностики в педиатрии. 2012;4(5):31–5.

[Popov AM, Verzhbitskaya TYu, Tsaur GA, et al. Methodology of flow cytometry application for minimal residual disease monitoring in childhood CD10-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Voprosy diagnostiki v pediatrii. 2012;4(5):31–5. (In Russ)]

15. Ciudad J, Orfao A, Vidriales B, et al. Immunophenotypic analysis of CD19+ precursors in normal human adult bone marrow: implications for minimal residual disease detection. Haematologica. 1998;83(12):1069–75.

16. Veltroni M, De Zen L, Sanzari MC, et al. Expression of CD58 in normal, regenerating and leukemic bone marrow B cells: implications for the detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia. Haematologica. 2003;88(11):1245–52.

17. van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, et al. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. Cytometry B Clin Cytom. 2004;60B(1):1–13. doi: 10.1002/cyto.b.20008.

18. Lee RV, Braylan RC, Rimsza LM. CD58 expression decreases as nonmalignant B cells mature in bone marrow and is frequently overexpressed in adult and pediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. Am J Clin Pathol. 2005;123(1):119–24. doi: 10.1309/x5vv6fkjq6mublpx.

19. Robillard N, Cave H, Mechinaud F, et al. Four-color flow cytometry bypasses limitations of IG/TCR polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in certain subsets of children with acute lymphoblastic leukemia. Haematologica. 2005;90(11):1516–23.

20. Seegmiller AC, Kroft SH, Karandikar NJ, McKenna RW. Characterization of immunophenotypic aberrancies in 200 cases of B acute lymphoblastic leukemia. Am J Clin Pathol. 2009;132(6):940–9. doi: 10.1309/AJCP8G5RMTWUEMUU.

21. Sedek L, Bulsa J, Sonsala A, et al. The immunophenotypes of blast cells in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: how different are they from their normal counterparts. Cytometry B Clin Cytom. 2014;86(5):329–39. doi: 10.1002/cyto.b.21176.

22. Hulspas R, O'Gorman MRG, Wood BL, et al. Consideration for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom. 2009;76B(6):355–64. doi: 10.1002/cyto.b.20485.

23. Hrusak O, Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. Leukemia. 2002;16(7):1233–58. doi: 10.1038/sj.leu.2402504.

24. Попов А.М., Цаур Г.А., Вержбицкая Т.Ю. и др. Иммунофенотипическая характеристика острого лимфобластного лейкоза у детей первого года жизни. Онкогематология. 2012;7(2):14–24. doi: 10.17650/1818-8346-2012-7-2-14-24.

[Popov AM, Tsaur GA, Verzhbitskaya TY, et al. Immunophenotypic investigation of infant acute lymphoblastic leukemia. Oncohematology. 2012;7(2):14–24. doi: 10.17650/1818-8346-2012-7-2-14-24. (In Russ)]

25. Fuda FS, Karandikar NJ, Chen W. Significant CD5 expression on normal stage 3 hematogones and mature B-lymphocytes in bone marrow. Am J Clin Pathol. 2009;132(5):733–7. doi: 10.1309/AJCPU5E3NXEKLFIY.

26. Gaipa G, Basso G, Maglia O, et al. Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection. Leukemia. 2005;19(1):49–56. doi: 10.1038/sj.leu.2403559.

27. Gaipa G, Basso G, Ratei R, et al. Reply to van der Sluijs-Gelling, et al. Leukemia. 2005;19(12):2351–2. doi: 10.1038/sj.leu.2403912.

28. van der Sluijs-Gelling AJ, van der Velden VHJ, Roeffen ETJM, et al. Immunophenotypic modulation in childhood precursor-B-ALL can be mimicked in vitro and is related to the induction of cell death. Leukemia. 2005;19(10):1845–7. doi: 10.1038/sj.leu.2403911.

29. Dworzak MN, Schumich A, Printz D, et al. CD20 up-regulation in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction treatment: setting the stage for anti-CD20 directed immunotherapy. Blood. 2008;112(10):3982–8. doi: 10.1182/blood-2008-06-164129.

30. Gaipa G, Basso G, Aliprandi S, et al. Prednisone induces immunophenotypic modulation of CD10 and CD34 in nonapoptotic B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. Cytometry B Clin Cytom. 2008;74B(3):150–5. doi: 10.1002/cyto.b.20408.

31. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Изменения иммунофенотипа опухолевых бластов при CD10-позитивном остром лимфобластном лейкозе у детей к 15-му дню индукционной терапии по протоколу ALL-MB-2008. Иммунология. 2010;31(2):60–4.

[Popov AM, Verzhbitskaya TYu, Tsaur GA, et al. Changes of tumor blast immunophenotype in CD10-positive acute lymphoblastic leukemia in children by the 15th day of induction therapy according to the ALL-MB-2008 protocol. Immunologiya. 2010;31(2):60–4. (In Russ)]

32. Мовчан Л.В., Шман Т.В., Белевцев М.В. и др. Изменение иммунофенотипа лейкемических клеток на этапах индукционной терапии острого лимфобластного лейкоза из предшественников В-лимфоцитов у детей. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2011;10(1):21–6.

[Movchan LV, Shman TV, Belevtsev MV, et al. Immunophenotypic modulation of the leukemic cells during induction therapy in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii. 2011;10(1):21–6. (In Russ)]

33. Dworzak MN, Gaipa G, Schumich A, et al. Modulation of antigen expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction therapy is partly transient: evidence for a drug-induced regulatory phenomenon. Results of the AIEOP-BFM-ALL-FLOW-MRD-Study Group. Cytometry B Clin Cytom. 2010;78B(3):147–53. doi: 10.1002/cyto.b.20516.

34. Borowitz MJ, Pullen DJ, Winick N, et al. Comparison of diagnostic and relapse flow cytometry phenotypes in childhood acute lymphoblastic leukemia: implications for residual disease detection: a report from the Children's Oncology Group. Cytometry B Clin Cytom. 2005;68B(1):18–24. doi: 10.1002/cyto.b.20071.

35. Liu YR, Chang Y, Fu JY, et al. Comparison of the immunophenotype of patients with B lineage acute lymphoblastic leukemia at diagnosis and relapse. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi. 2006;27(5):335–8.

36. 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.

37. 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.

38. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Ограниченная возможность применения упрощенного подхода для определения минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии у детей с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников. Клиническая лабораторная диагностика. 2011;3:25–9.

[Popov AM, Verzhbitskaya TYu, Tsaur GA, et al. Limited potential for use of simplified approach for determining minimal residual disease by means of flow cytometry in children with acute lymphoblastic leukemia from B-linear precursors. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 2011;3:25–9. (In Russ)]

39. Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Lucio P, et al. BIOMED-1 concerted action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). Leukemia. 2000;14(5):816–25. doi: 10.1038/sj.leu.2401741.

40. Dworzak MN, Fritsch G, Buchinger P, et al. Flow cytometric assessment of human MIC2 expression in bone marrow, thymus, and peripheral blood. Blood. 1994;83(2):415–25.

41. Dworzak MN, Fritsch G, Fleischer C, et al. CD99 (MIC2) expression in paediatric B-lineage leukaemia/lymphoma reflects maturation-associated patterns of normal B-lymphopoiesis. Br J Haematol. 1999;105(3):690–5. doi: 10.1046/j.1365-2141.1999.01426.x.

42. Dworzak MN, Froschl G, Printz D, et al. CD99 expression in T-lineage ALL: implications for flow cytometric detection of minimal residual disease. Leukemia. 2004;18(4):703–8. doi: 10.1038/sj.leu.2403303.

43. Roshal M, Fromm JR, Winter S, et al. Immaturity associated antigens are lost during induction for T cell lymphoblastic leukemia: implications for minimal residual disease detection. Cytometry B Clin Cytom. 2010;78B(3):139–46. doi: 10.1002/cyto.b.20511.

44. Lund-Johansen F, Terstappen LW. Differential surface expression of cell adhesion molecules during granulocyte maturation. J Leuk Biol. 1993;54(1):47–55.

45. Terstappen LW, Huang S, Picker LJ. Flow cytometric assessment of human T-cell differentiation in thymus and bone marrow. Blood. 1992;79(3):666–77.

46. Aalbers AM, van den Heuvel-Eibrink MM, Baumann I, et al. Bone marrow immunophenotyping by flow cytometry in refractory cytopenia of childhood. Haematologica. 2015;100(3):315–23. doi: 10.3324/haematol.2014.107706.

47. Feng B, Verstovsek S, Jorgensen JL, Lin P. Aberrant myeloid maturation identified by flow cytometry in primary myelofibrosis. Am J Clin Pathol. 2010;133(2):314–20. doi: 10.1309/AJCPNC99DHXIOOTD.

48. Loken MR, Chu S-Ch, Fritschle W, et al. Normalization of bone marrow aspirates for hemodilution in flow cytometric analyses. Cytometry B Clin Cytom. 2009;76B(1):27–36. doi: 10.1002/cyto.b.20429.

49. Kussick SJ, Wood BL. Using 4-color flow cytometry to identify abnormal myeloid populations. Arch Pathol Lab Med. 2003;127(9):1140–7.

50. Leandro MJ, Cooper N, Cambridge G, et al. Bone marrow B-lineage cells in patients with rheumatoid arthritis following rituximab therapy. Rheumatology (Oxford). 2007;46(1):29–36. doi: 10.1093/rheumatology/kel148.

51. Rehnberg M, Amu S, Tarkowski A, et al. Short- and long-term effects of anti-CD20 treatment on B cell ontogeny in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 2009;11(4):R123. doi: 10.1186/ar2789.

52. Nakou M, Katsikas G, Sidiropoulos P, et al. Rituximab therapy reduces activated B cells in both the peripheral blood and bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: depletion of memory B cells correlates with clinical response. Arthritis Res Ther. 2009;11(4):R131. doi: 10.1186/ar2798.

53. Borowitz MJ. Minimal residual disease detection in childhood ALL. Haematopoiesis Immunology. 2010;7(1):24–35.

54. Вержбицкая Т.Ю., Попов А.М., Томилов А.Ф. и др. Определение опухолевых клеток в спинномозговой жидкости у детей с острыми лейкозами методом проточной цитометрии. Вопросы диагностики в педиатрии. 2012;5:31–5.

[Verzhbitskaya TYu, Popov AM, Tomilov AF, et al. Detection of tumor cells in cerebrospinal fluid in children with acute leukemias using flow cytometry. Voprosy diagnostiki v pediatrii. 2012;5:31–5. (In Russ)]