

Диагностика и мониторинг минимальной остаточной болезни при остром мегакариобластном лейкозе у детей

А.Д. Палладина^{✉1}, А.В. Попа², Т.Т. Валиев¹, В.Г. Никитаев³, О.А. Чернышева¹, Н.А. Купрышина¹, И.Н. Серебрякова¹, Т.В. Шведова¹, К.Л. Кондратчик^{2,4}, Н.Н. Тупицын¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия;

²ФГАУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия;

³ФГАУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия;

⁴ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

Аннотация

Острый мегакариобластный лейкоз (ОМегЛ) – это редкий вариант остро миелоидного лейкоза (ОМЛ), который характеризуется неблагоприятным прогнозом для всех пациентов, кроме детей с t(1;22) или с синдромом Дауна. Частота полных ремиссий при ОМегЛ сравнима с таковой при других вариантах ОМЛ, при этом медиана выживаемости значительно ниже. Это обуславливает необходимость в уточнении критериев оценки эффекта проводимого лечения с использованием проточно-цитометрического определения уровня минимальной остаточной болезни (МОБ). В настоящее время единые стандартизованные подходы к измерению МОБ при миелоидных лейкозах, в том числе при ОМегЛ, отсутствуют, что препятствует адекватной оценке эффекта терапии и в ряде случаев – определению показаний к аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В статье определены особенности диагностики и описаны подходы к измерению уровня МОБ при ОМегЛ.

Цель. Продемонстрировать алгоритмы диагностики и определения МОБ при ОМЛ М7 у детей.

Материалы и методы. В статье проанализированы клинические и иммунологические данные 10 мальчиков и 4 девочек с впервые выявленным диагнозом ОМегЛ в возрасте от 3 мес до 12 лет, 13 из которых получали лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» и 1 – в ГБУЗ «Морозовская ДГКБ» в период с 1995 по 2020 г. У 6 пациентов оценена МОБ. Оценка МОБ проводилась как морфоцитохимическим методом, так и методом многопараметровой проточной цитометрии с использованием маркеров мегакариоцитов (CD61, CD42, CD41) в сочетании с общемиелоидными маркерами (CD13, CD33), CD34, CD117 и маркерами аберрантности (наиболее часто – CD7).

Результаты. Показано, что адекватное измерение уровня МОБ требует подробного иммунофенотипирования при диагностике для установления аберрантности мегакариобластов. Наиболее часто на бластных клетках ОМегЛ помимо мегакариоцитарных маркеров (100% случаев) экспрессированы маркеры CD9 (100%), общемиелоидный антиген CD33 (69,2%), стволовых клеточный антиген CD34 (46,2%), CD13 (38,5%). Антиген CD117 присутствовал на бластных клетках в 33,3% случаев. Частой являлась экспрессия Т-клеточно-ассоциированного антигена CD7 (46,2%). Оценка МОБ проведена в процессе лечения (чаще – после индукционного курса) на основе маркеров мегакариоцитарной линии (CD61, CD41, CD42a, CD42b), слабой экспрессии CD45, а также особенностей иммунофенотипа при первичной диагностике. Уровни МОБ колебались от полностью отрицательных (0%; 0,006%) до явных (1,05%).

Заключение. Выявление остаточных опухолевых мегакариобластов при ОМЛ М7 с помощью проточной цитометрии является перспективным методом оценки эффекта терапии. Адекватное измерение уровня МОБ требует подробного иммунофенотипирования при диагностике для установления аберрантности мегакариобластов.

Ключевые слова: острый мегакариобластный лейкоз, М7, минимальная остаточная болезнь

Для цитирования: Палладина А.Д., Попа А.В., Валиев Т.Т., Никитаев В.Г., Чернышева О.А., Купрышина Н.А., Серебрякова И.Н., Шведова Т.В., Кондратчик К.Л., Тупицын Н.Н. Диагностика и мониторинг минимальной остаточной болезни при остром мегакариобластном лейкозе у детей. Современная онкология. 2021; 23 (1): 148–155. DOI: 10.26442/18151434.2021.1.200762

Информация об авторах / Information about the authors

[✉]Палладина Александра Дмитриевна – врач клинической лабораторной диагностики лаб. иммунологии гемопоэза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: palladinaa@gmail.com; ORCID: 0000-0002-9400-7347

Попа Александр Валентинович – проф. РАН, д-р мед. наук, проф. каф. пропедевтики детских болезней педиатрического фак-та ФГАУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова». E-mail: apopa@list.ru; ORCID: 0000-0001-5318-8033

Валиев Тимур Теймуразович – д-р мед. наук, зав. отд-нием химиотерапии гемобластозов НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: timurvaliev@mail.ru; ORCID: 0000-0002-1469-2365

Никитаев Валентин Григорьевич – д-р техн. наук, проф., зав. каф. компьютерных медицинских систем ФГАУ ВО НИЯУ МИФИ. E-mail: kaf46@mail.ru; ORCID: 0000-0002-4349-3023
Чернышева Ольга Алексеевна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. иммунологии гемопоэза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: beznos.olga@gmail.com; ORCID: 0000-0002-9630-5591

Купрышина Наталья Александровна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. иммунологии гемопоэза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: natalya-2511@yandex.ru; ORCID: 0000-0001-8509-0954

Серебрякова Ирина Николаевна – канд. мед. наук, врач клинко-диагностической лаб. ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». ORCID: 0000-0002-8389-4737

Шведова Тамара Викторовна – биолог клинко-диагностической лаб. ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

[✉]Alexandra D. Palladina – doctor, Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: palladinaa@gmail.com; ORCID: 0000-0002-9400-7347

Aleksandr V. Popa – D. Sci. (Med.), Prof. RAS, Pirogov Russian National Research Medical University. E-mail: apopa@list.ru; ORCID: 0000-0001-5318-8033

Timur T. Valiev – D. Sci. (Med.), Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: timurvaliev@mail.ru; ORCID: 0000-0002-1469-2365

Valentin G. Nikitaev – D. Sci. (Techn.), National Research Nuclear University MEPhI. E-mail: kaf46@mail.ru; ORCID: 0000-0002-4349-3023

Olga A. Chernysheva – Cand. Sci. (Med.), Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: beznos.olga@gmail.com; ORCID: 0000-0002-9630-5591

Natalia A. Kupryshina – Cand. Sci. (Med.), Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: natalya-2511@yandex.ru; ORCID: 0000-0001-8509-0954

Irina N. Serebryakova – Cand. Sci. (Med.), Blokhin National Medical Research Center of Oncology. ORCID: 0000-0002-8389-4737

Tamara V. Shvedova – biologist, Blokhin National Medical Research Center of Oncology

Detection and monitoring of minimal residual disease in acute megakaryoblastic leukemia in children

Alexandra D. Palladina^{✉1}, Aleksandr V. Popa², Timur T. Valiev¹, Valentin G. Nikitaev³, Olga A. Chernysheva¹, Natalia A. Kupryshina¹, Irina N. Serebryakova¹, Tamara V. Shvedova¹, Konstantin L. Kondratchik^{2,4}, Nikolai N. Tupitsyn¹

¹Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia;

³National Research Nuclear University MEPhI, Moscow, Russia;

⁴Morozov Children's Clinical Hospital, Moscow, Russia;

Abstract

Acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) is a rare subtype of acute myeloid leukemia (AML), which is associated with poor prognosis for all patients except children with t(1;22) or Down syndrome. The frequency of complete remission in case of AMKL is comparable to the frequency of complete remission in other variants of AML, and the median survival is much lower. This determines the necessity to update criteria for assessment of the effect of treatment using flow cytometry definition of the level of minimal residual disease (MRD). Nowadays, there are no unified and standardized approaches for the measurement of MRD in case of myeloid leukemia, including AMKL, which prohibits adequate assessment of the therapy effect and in some cases – determination of the indications for allogeneic hematopoietic stem cells transplantation. The article identifies diagnostic features and describes approaches for the measurement of the level of MRD in case of AMKL.

Aim. The aim is to demonstrate the algorithms for diagnosing and measuring MRD in case of AML-M7 in children.

Materials and methods. The article analyzes the clinical and immunological profile of 10 boys and 4 girls with the initial diagnosis of AMKL between the ages of 3 months – 12 years old, 13 of them have received treatment in the FSBI "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" and one – in the GBUZ "Morozovsky DGKB" between 1995 and 2020, The measurement of MRD was carried out in 6 patients. The measurement of MRD was carried out using both morphocytochemical method and multiparameter flow cytometry with megakaryocyte markers (CD61, CD42, CD41) in combination with other myeloid markers (CD13, CD33), CD34, CD117 and aberrant markers (mainly CD7).

Results. We showed that adequate measurement of the level of MRD had required detailed immunophenotyping during diagnosis to determine the aberration of megakaryoblasts. CD9 marker (100%), CD33 myeloid marker (69.2%), stem cell antigen CD34 (46.2%), CD13 (38.2%) in addition to megakaryocyte markers (100%) were most often expressed on blast cells in case of AMKL. The CD117 antigen was present on the blasts in 33.3% of cases. The expression of the T-cell-associated CD7 antigen (46.2%) was frequent. The measurement of MRD was carried out during the treatment (usually after an induction course) on the basis of the markers of megakaryocytic cell line (CD61, CD41, CD42a, CD42b), weak CD45 expression, as well as the immunophenotype characteristics during initial diagnosis. The level of MRD ranged from completely negative (0%; 0.006%) to evident (1.05%).

Conclusion. The detection of residual tumor megakaryoblasts in case of AML-M7 using flow cytometry is a promising method to evaluate the effect of therapy. The adequate measurement of the level of MRD requires detailed immunophenotyping during the diagnosis to determine the aberration of megakaryoblasts.

Keywords: acute megakaryoblastic leukemia, M7, minimal residual disease

For citation: Palladina AD, Popa AV, Valiev TT, Nikitaev VG, Chernysheva OA, Kupryshina NA, Serebryakova IN, Shvedova TV, Kondratchik KL, Tupitsyn NN. Detection and monitoring of minimal residual disease in acute megakaryoblastic leukemia in children. *Journal of Modern Oncology*. 2021; 23 (1): 148–155. DOI: 10.26442/18151434.2021.1.200762

Введение

Острый мегакариобластный лейкоз (ОМегЛ) является биологически неоднородным морфологическим вариантом острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и развивается из мегакариоцитарных предшественников. ОМегЛ впервые описан в 1931 г. J. von Boros [1, 2], однако в последующие годы сообщения о данном типе лейкоза редки в связи с отсутствием достоверных диагностических критериев. В 1978 г. J. Breton-Gorius и соавт. [3] впервые применили технологию ультраструктурной идентификации с использованием тромбоцитарной пероксидазы, которая позволила выявить малые мегакариоциты и увеличить точность диагностики ОМегЛ. Далее в 1985 г. диагноз ОМегЛ с уточненными диагностическими критериями внесен во Франко-Американско-Британскую классификацию [4].

ОМегЛ является сложным для установления диагнозом. Его морфологические признаки недостаточно специфичны, так как бластные клетки морфологически могут быть как неотличимы от лимфобластов, так и характеризоваться вы-

раженной базофилией и отростчатостью цитоплазмы [5]. Цитохимически в бластных клетках при этом заболевании отсутствует миелопероксидаза, а гликоген располагается в цитоплазме в форме гранул, что также является цитохимическими признаками лимфобластного лейкоза [5, 6]. Наиболее специфичным цитохимическим признаком ОМегЛ считается тромбоцитарная пероксидаза: для ее выявления необходима электронная микроскопия в сочетании с ультрацитохимическим исследованием, которые позволяют выявить положительную реакцию с тромбоцитарной пероксидазой в оболочке ядра и эндоплазматическом ретикулуме опухолевых мегакариобластов [7]. Достоверное установление диагноза ОМегЛ возможно только при полноценном иммунофенотипировании с использованием Т- и В-лимфоидных, мегакариоцитарных, эритроидных и пан-миелоидных маркеров. В педиатрической практике ОМегЛ наиболее часто встречается у детей до 1–3 лет, а также у детей с синдромом Дауна [2].

Кондратчик Константин Леонидович – канд. мед. наук, доц. каф. онкологии и гематологии ФГАУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова, зав. отд-нием онкологии и гематологии ГБУЗ «Морозовская ДГКБ». E-mail: morozov-14@yandex.ru; ORCID: 0000-0002-5195-4539
Тупицын Николай Николаевич – д-р мед. наук, проф., зав. лаб. иммунологии гемопоэза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». E-mail: nntca@yahoo.com; ORCID: 0000-0003-3966-128X

Konstantin L. Kondratchik – Cand. Sci. (Med.), Pirogov Russian National Research Medical University, Morozov Children's Clinical Hospital. E-mail: morozov-14@yandex.ru; ORCID: 0000-0002-5195-4539

Nikolai N. Tupitsyn – D. Sci. (Med.), Blokhin National Medical Research Center of Oncology. E-mail: nntca@yahoo.com; ORCID: 0000-0003-3966-128X

Таблица 1. Основная панель моноклональных антител, использованных в работе
Table 1. The main panel of monoclonal antibodies used in the study

№ пробы	Флуорохромы	V450	V500	F	PE	PE-cy5	PEcy7	APC	APCH7
1	HLA-DR	CD45	CD45	CD16*	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10
2	HLA-DR	CD45	CD45	CD35	CD64	CD34	CD117	CD300e	CD14
3	HLA-DR	CD45	CD45	CD36	CD105	CD34	CD117	CD33	CD71
4	HLA-DR	CD45	CD45	nuTdT	CD56	CD34	CD117	CD7	CD19
5	HLA-DR	CD45	CD45	CD15	NG2	CD34	CD117	CD22	CD38
6	HLA-DR	CD45	CD45	CD42a/CD61	CD203c	CD34	CD117	CD123	CD4
7	HLA-DR	CD45	CD45	CD41	CD25	CD34	CD117	CD42b	CD9

*Антитела, специфичные к указанным кластерам дифференцировки.
*Antibodies specific to the specified differentiation clusters.

Таблица 2. Иммунофенотипы пациентов, включенных в исследование
Table 2. Immunophenotypes of patients included in the study

Маркер	Пациент										Сводное количество (+/всего)				Процент позитивных	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
MPO				-		-	-		-		-				0/5	0
CD34	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+		6/13	46,2
CD117			-	+	-	-	-	-	-	+	+				3/9	33,3
CD13	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-		5/13	38,5
CD33	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+		+	-	9/13	69,2
CD64	-	-		-	-	-	-	-	-		-				0/8	0
CD4				-	-	-	-		-		-	-			0/7	0
CD7	+	-	-	+		+	+	+	-	-	+	-	-	-	6/13	46,2
HLA-DR	+	-	-	-	-	-	-	+		-	-	+	+	-	4/13	30,8
CD9			+	+	+	+	+			+					6/6	100
CD56	-		-	-	-	-	-			+					1/6	16,7
CD38	+			-	-	-	-	+			+	+			4/8	50
GPA	-	-						-	-		-		-		0/6	0
CD36				-	-	+				-					1/4	25
CD105				-	-	-									0/3	0
CD(61+42a)/CD61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	13/13	100
CD41			+	+		+	+								4/4	100
CD42b			+	+		-	+	+					+		5/6	83,3
CD71						+	-			-					1/3	33,3
CD22	-	-	-				-				-	-		-	0/7	0
TdT				-	-	-	-								0/4	0
CD11b				+	-	-	-			-		-	-		1/6	16,7
CD123			-	+	-	-	-			-					1/6	16,7

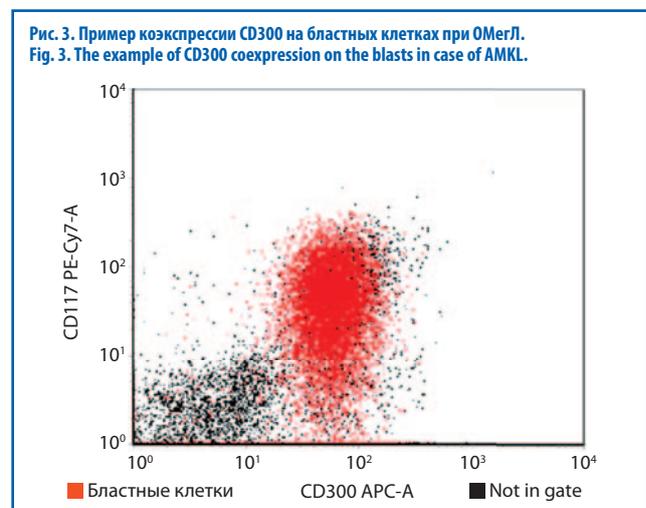
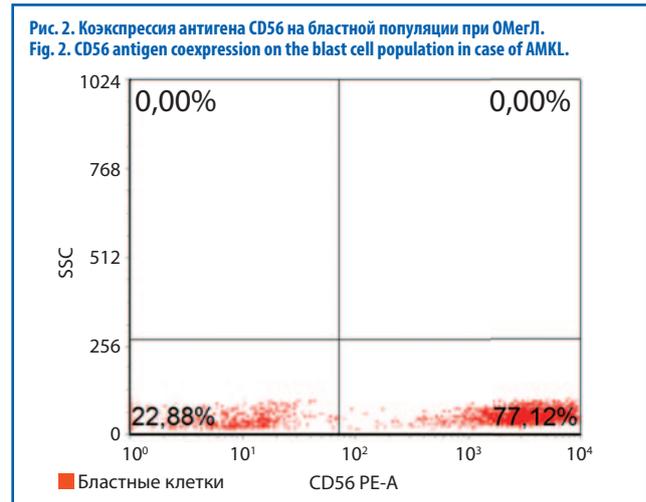
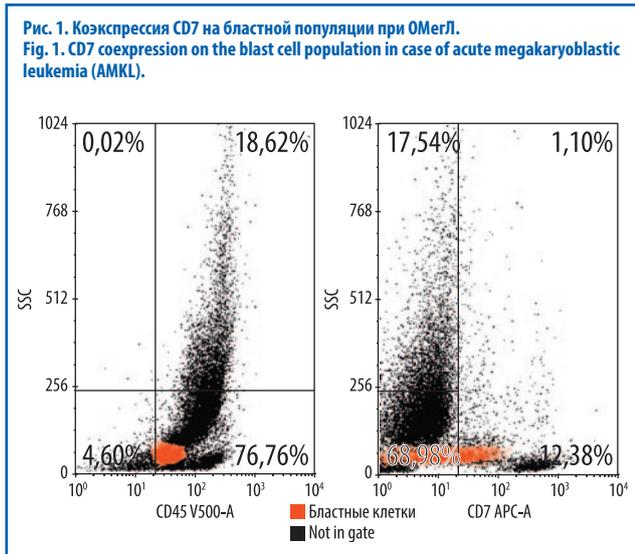
Проллиферирующие мегакариобласты синтезируют тромбоцитарный фактор роста PDGF-BB, а также некоторые другие факторы роста фибробластов, что приводит к выраженным реактивным фибротическим изменениям стромы костного мозга. Эти изменения препятствуют адекватной аспирации костного мозга при пункции, полученные пунктаты зачастую имеют недостаточный объем и клеточность, а пропорция в них бластных клеток может быть снижена. Фиброз костного мозга вкупе с особенностями кроветворения детей 1–2-го года жизни обуславливает сравнительно низкий процент опухолевых бластных клеток в костном мозге и трудности диагностики при ОМегЛ [8–10].

Цитогенетические особенности М7-варианта ОМЛ

До недавнего времени для этого варианта ОМЛ выделяли только одну специфическую цитогенетическую аномалию: наличие t(1;22)(p13;q13) в бластных клетках, в результате которой образуется химерный ген *RBM15-MKLI*, чаще всего эта транслокация обнаруживается у пациентов в возрасте до 2 лет. Наличие этой аномалии рядом исследователей признается как благоприятный прогностический признак [9, 11, 12].

Однако в последние годы с появлением метода полногеномного секвенирования обнаружены другие цитогенетические поломки, характерные для ОМегЛ: это inv(16)(p13.3q24.3), t(11;15)(p15;q35), реаранжировки гена *KMT2A* и др. Эти аномалии имеют различные частоты выявления и прогностическое значение [8]. Также в опухолевых клетках при ОМегЛ могут встречаться и другие цитогенетические поломки, неспецифичные для этого заболевания, например, моносомия хромосомы 5, 7, 9, гипердиплоидный, сложный кариотип. Наличие таких хромосомных аномалий является дополнительным фактором плохого прогноза.

Следовательно, с учетом морфологических, цитохимических, иммунологических и цитогенетических особенностей ОМегЛ нельзя рассматривать как мономорфную нозологическую единицу, что нашло отражение в классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей Всемирной организации здравоохранения (2016 г.). В соответствии с данной классификацией к ОМегЛ относятся: ОМЛ (мегакариобластный) с транслокацией t(1;22)(p13.3;q13.1); *RBM15-MKLI*, с инверсией inv(3)(q21.3;q26.2), с транслокацией t(3;3)(q21.3;q26.2), с транслокацией t(9;11)(p21.3;q23.3); *KMT2A-MLLT3* [5, 13].



По оценке исследовательских групп, частота достижения полной ремиссии (ПР) при ОМегЛ у детей составляет 70–80%, что сравнимо с другими вариантами ОМЛ; однако медиана общей выживаемости значительно ниже, чем при других вариантах ОМЛ [9, 14, 15]. Это диктует необходимость более эффективной, чем клинико-морфологическая, оценки глубины ремиссии при ОМегЛ, в том числе с применением проточно-цитометрической оценки минимальной остаточной болезни (МОБ). Для введения этого метода в практику необходимы установление алгоритма определения МОБ, критериев позитивности МОБ и оценка влияния полученных количеств остаточных опухолевых клеток на прогноз заболевания. Также такой низкий уровень общей выживаемости означает необходимость повышения эффективности существующей терапии консолидации ремиссии с возможным применением метода аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Измерение МОБ необходимо при оценке статуса заболевания перед аллогенной трансплантацией костного мозга (аллоТКМ), а также в установленные сроки после ее выполнения (30, 60, 100, 180, 360-й дни), однако единые стандартизованные подходы к измерению МОБ при ОМЛ, в том числе при ОМегЛ, отсутствуют, что препятствует адекватной оценке эффективности лечения.

В настоящей статье на основании характеристики 14 случаев ОМегЛ описаны критерии диагностики и оценки МОБ при ОМегЛ.

Материалы и методы

В нашей работе проанализированы данные 14 детей с впервые выявленным ОМегЛ: 10 мальчиков и 4 девочки в возрасте от 3 мес до 12 лет (6 пациентов младше 1 года), 13 из них получали лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» и 1 – в ГБУЗ «Морозовская ДГКБ» с период с 1995 по 2020 г.

Уровень лейкоцитов крови находился в пределах $2,5–53,0 \times 10^9/\text{л}$, бластные клетки в костном мозге 20,2 – 90%.

Цитогенетическое исследование проводилось 10 пациентам. У 2 пациентов выявлена транслокация t(1;22). У 3 пациентов определялись различные варианты химерного гена *MLL*: 46XY?, t(10;11)(p11;q23)[14]/46XY[6], t(10;11) *MLL/MLLT10* и t(9;11)(p22;q23) *MLL-AF9*. У 4 пациентов определялся сложный кариотип: 45XY,-7, t(3;3)(q21q26), 48XY,+21,+21, der(17), 53XX,t(1;7)(q21;p15),der(1),+2,+6,+7,+7,der(7)t(1;7),+8,+10,+19[8]/46,XX[10] и 50,XX,+6,+7,+8,+13, der(11), add(p15), del(17)(q24). У 1 пациента цитогенетические аномалии не выявлены: 46XY.

Следовательно, в соответствии с классификацией опухолей кроветворной и лимфоидной тканей Всемирной организации здравоохранения (2016 г.) у 2 больных диагностирован ОМЛ (мегакариобластный) с транслокацией t(1;22)(p13.3;q13.1); у 2 – ОМЛ с транслокацией t(10;11); у 1 – ОМЛ с транслокацией t(9;11); у 4 – ОМЛ с комплексным (сложным) кариотипом и у 1 больного – ОМЛ с нормальным кариотипом.

При проведении диагностики всем больным осуществляли подробное иммунофенотипирование бластных клеток. В основе подхода лежит концепция EuroFlow [16], которая включает оценку линейности лейкоза по ориентационной пробе ALOT с последующим анализом бластных клеток согласно их линейной принадлежности (табл. 1).

Большинство пациентов (8 из 14) получали лечение по протоколу НИИ ДОГ ОМЛ 2012; 3 – по AML-BFM 87 и 3 – по AML-BFM 2004. Протоколы НИИ ДОГ ОМЛ 2012 и AML-BFM 2004 состояли из 4–5 курсов химиотерапии (ХТ). У пациентов, включенных в группы промежуточного и высокого рисков, ХТ включала 5 курсов: А1Е (Ага-С, ИДА, этопозид), НАМ (Ага-С 3000 мг/м² №6, митоксантрон), А1 (Ага-С 500 мг/м² 1–5-й дни и ИДА), hAM (Ага-С 1000 мг/м² и митоксантрон) и НАЕ (Ага-С 3000 мг/м² №6 и этопозид). Поддерживающая терапия состояла из постоянного приема 6-меркаптопурина, четырехдневных курсов Ага-С 1 раз в 28 дней и длилась до 73-й недели от начала индуктивного курса. В отличие от протокола AML-BFM 2004 в протоколе НИИ ДОГ ОМЛ 2012 наряду с ХТ применялось эпигенетическое лечение (децитабин, вальпроевая и полностью транс-ретиноевая кислота – АТРА).

Протокол AML-BFM 87 состоял из: индукции ремиссии длительностью 8 дней, включавшей Ага-С 100 мг/м² в сутки внутривенно капельно 24 ч в 1–2-й дни, 100 мг/м² внутривенно капельно в течение 1 ч каждые 12 ч в 3–8-й дни, даунорубин 60 мг/м² в сутки внутривенно капельно 1 ч в 3–5-й дни и велезид (VP-16) 150 мг/м² в сутки внутривенно капельно 2 ч в 6–8-й дни; консолидации ремиссии – Ага-С 75 мг/м² в сутки внутривенно струйно в 3–6-й, 10–13-й, 17–20-й и 24–27-й дни, даунорубин 30 мг/м² в сутки внутривенно капельно в течение 2 ч в 1, 8, 15 и 22-й дни, 6-МП 60 мг/м² в сутки внутрь ежедневно в 1–27-й дни; и 2 курсов ранней интенсификации –

Таблица 3. Панель моноклональных антител, использованная при диагностике МОБ у пациентки 3
Table 3. The panel of monoclonal antibodies used in the diagnosis of minimal residual disease (MRD) in women 3

№ пробы	Флуорохромы	V450	FITC	PE	APC	APC-H7
1		SYTO-41	CD41	CD19	CD42b	CD9
2		CD45	CD41a+CD61	CD7		
3		CD45	CD7	CD10		CD9

Таблица 4. Маркеры, использованные при диагностике МОБ у пациента 4
Table 4. Markers used in the diagnosis of MRD in patient 4

№ пробы	Флуорохромы	V500	V450	FITC	PE	PerCP Cy-5	PE-Cy-7	APC
1		CD45	CD9	CD61+42a	CD33	CD34	CD13	CD117

Табл. 5. Маркеры, использованные при диагностике МОБ у пациентки 5
Table 5. Markers used in the diagnosis of MRD in women 5

№ пробы	Флуорохромы	V500	V450	FITC	PE	Cy-5	APC	APC-H7
1		CD45	SYTO 41	CD58	CD19	CD34	CD10	CD38
2		CD45		CD61+CD42a	CD19		CD33	

Таблица 6. Маркеры оценки МОБ у больного 7
Table 6. Markers used in the diagnosis of MRD in patient 7

№ пробы	Флуорохромы	V450	V500	FITC	PE	PE-Cy5	PE-Cy7	APC	APC-H7
1		HLA-DR	CD45	CD61+CD42a	CD25	CD34	CD117	CD42b	CD9
2			CD45	SYTO-16		CD34		CD42b	

Aga-C 1000 мг/м² внутривенно капельно каждые 12 ч в 1–3-й дни и VP-16 125 мг/м² в сутки внутривенно капельно в 2–5-й дни.

С целью консолидации полученной ремиссии 2 пациентам проведена аллоТКМ.

Результаты

Диагноз ОМегЛ во всех случаях установлен на основании детального морфологического, цитохимического и иммунофенотипического обследования.

Костный мозг чаще средне- или гипоклеточный. По данным морфоцитохимического исследования выявлялось более 20% бластных клеток (от 20,2 до 90%, среднее количество составило 48). В большинстве случаев бластные клетки имели неправильные очертания и отростчатую цитоплазму, умеренное и высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение, округлые ядра; цитоплазма характеризовалась базофилией и отсутствием зернистости. Однако в нескольких случаях бластные клетки не имели специфических морфологических признаков дифференцировки при морфологическом исследовании.

Для верификации диагноза ОМегЛ использовали антитела к мегакариоцитарным антигенам: CD61 (практически всегда в сочетании с CD42a), CD41a, CD42b. Следует отметить, что реакция с антителами к CD42b отрицательная лишь в 1 из 6 случаев, в этом случае положительная реакция отмечена с антителами к CD61+CD42a и CD41. В 1 случае антитела к CD61 не использовали, при этом отмечена положительная реакция с CD42b – 30%.

Как видно из данных, представленных в табл. 2, экспрессия мегакариоцитарных антигенов на бластных клетках наиболее часто сочеталась с экспрессией общемиелоидных антигенов (CD33 – 9/13, CD13 – 5/13), маркера стволовых клеток (CD34 – 6/13), CD9 – 6/6. Необходимо отметить, что в 6 из 13 изученных случаев на бластных клетках присутствовал Т-клеточно-ассоциированный антиген CD7. Маркер CD117 обнаружен в 1/3 случаев – 3/9.

Совокупность иммунофенотипов у больных ОМегЛ представлена в табл. 2.

Наиболее интересные иммунофенотипы с признаками аберрантности, позволяющими мониторировать МОБ у больных, представлены на рис. 1–3.

Следует отметить, что у отдельных больных наряду с мегакариобластами присутствовала достаточно выраженная пропорция В-линейных предшественников. Эти клетки ни в одном из случаев не имели признаков аберрантности и расценены как нормальные В-линейные предшественники.

Лечение больных осуществлялось по протоколам, представленным в разделе «Материалы и методы». Ремиссия достигнута у 10 (71,4%) из 14 больных.

Уровни МОБ оценивали у 6 больных в различные сроки, в 1 случае – дважды: на 15 и 34-й дни, 26, 42, 50-й дни, 8 мес.

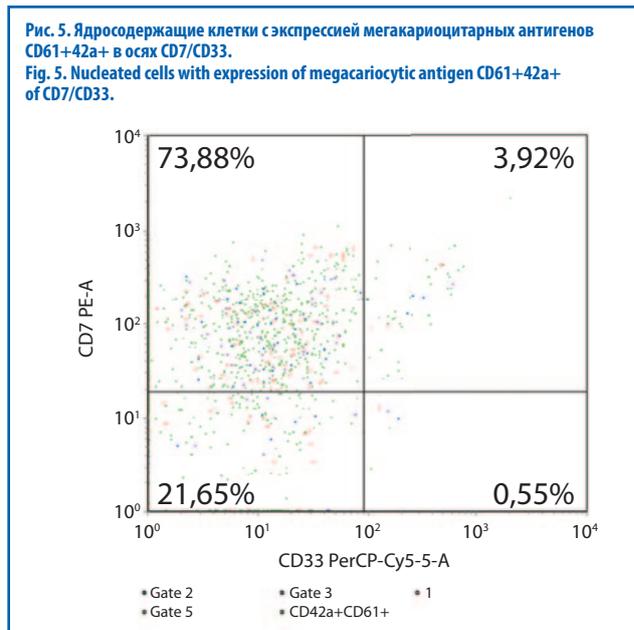
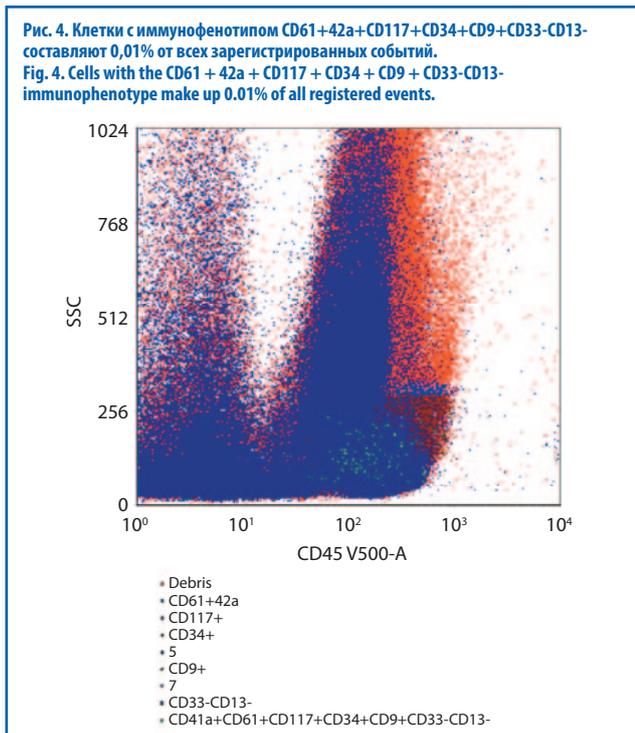
Приводим некоторые примеры определения МОБ у детей с ОМЛ М7 (ОМегЛ).

Больная С. (№3 в табл. 2). Оценка МОБ у данной пациентки впервые проведена после индукционного цикла АЕ с Дакогеном на 42-й день от установления диагноза. Морфологически бластные клетки в костном мозге составили 3,8%, пунктат клеточный, уменьшено количество лимфоцитов – 7,6%. Гранулоцитарный росток снижен – 20,2%, отмечена задержка созревания нейтрофилов на уровне миелоцитов. Эритроидный росток значительно раздражен (62,6%), умеренно выражены явления дизэритропоэза. Мегакариоциты в достаточном количестве.

Примененная панель антител при определении МОБ представлена в табл. 3.

Клетки с коэкспрессией мегакариоцитарных антигенов CD42b и CD41 составили 2,16% среди миелокариоцитов. Клетки с экспрессией CD41a/CD61 – 3,63%, с учетом слабой экспрессии CD45 содержание этих клеток среди миелокариоцитов составило 1,05%.

Уровень остаточных лейкозных клеток на 42-й день лечения ОМегЛ у данной пациентки ниже, чем число морфологически выявляемых бластов (3,8%), и составил 1,05%. Это соответствует МОБ-положительному статусу. Таким образом, у ребенка 7 мес с диагнозом ОМегЛ на 42-й день лечения оставались бластные клетки мегакариоцитарного ряда. Следует отметить, что при диагностике лейкоза нами не установлено иммунофенотипических особенностей злокачественных мегакариобла-



стов, поэтому оценка МОБ проводилась на основании определения бластных клеток с мегакариоцитарными антигенами. Единственной иммунофенотипической особенностью можно было бы считать экспрессию на бластных клетках антигена CD9, однако для использования данного антигена в оценке МОБ требуется дальнейшее накопление материала. У пациентки отсутствовала t(1;22), хотя кариотип характеризовался рядом особенностей: 50,XX,+6,+7,+8:der(11)add(p15),+13,del(17)(q24).

Пример определения МОБ у ребенка 1 года и 8 мес (№4 в табл. 2) на 30-й день от постановки диагноза ОМегЛ. Морфологически пунктат костного мозга средноклеточный, полиморфный. Бластные клетки составляют 2,4%, лимфоциты – 22,4%. В гранулоцитарном ростке отмечается незначительное ускорение созревания нейтрофилов. Выражена моноцитарная реакция (13,6%). Эритроидный росток редуцирован (2,8%). Количество мегакариоцитов снижено.

При определении МОБ использовались следующие маркеры (табл. 4).

При определении МОБ I этапом объединены клетки с коэкспрессией антигенов CD61+42a, CD117, CD34, CD9. Из полученной популяции исключены клетки с экспрессией CD13 и CD33. Итоговое содержание клеток, соответствующих иммунофенотипу таковых при диагностике, составило 0,01%; рис. 4.

Пример определения МОБ у ребенка 5 мес, №5 в табл. 2. Определение МОБ у данной больной проведено через 50 дней от момента диагностики по окончании индукционного курса АЕ с Дакогеном. Морфологически пунктат костного мозга гипоклеточный. Бластные клетки составляют 2,8%, лимфоциты – 24,4%. Гранулоцитарный росток сужен (32,4%). Увеличено количество моноцитов (8,8%). Эритроидный росток раздражен (31,6%), есть явления дизэритропоэза. Мегакариоциты в достаточном количестве.

Окрашены 2 пробы, набор маркеров представлен в табл. 5.

Ядродержащие клетки в анализируемом образце костного мозга составили 96% (SYTO-41+). Отчетливой популяции (CD42a+CD61)-клеток не определялось, соответственно, нет подобных клеток с экспрессией CD33 (маркер присутствовал на мегакариобластах при диагностике). По-видимому, это можно рассматривать как эффективность проведенного лечения и МОБ-негативный статус.

Пример определения МОБ у пациента 7 лет, №6 в табл. 2.

Использованная при диагностике панель моноклональных антител указывала на мегакариобластный вариант острого

лейкоза с коэкспрессией антигена CD7: CD33+CD13-CD7+CD(42a+61)+CD41+CD9+CD71+MPO-HLA-DR-CD117-CD42b-.

На 15-й день лечения произведено определение МОБ.

При морфологическом исследовании пунктат костного мозга крайне беден клеточными элементами. Подсчет произведен на 100 клеток. Бластные клетки не найдены; преобладают лимфоциты (94,0%). Умеренно выражена плазмоклеточная реакция (4,0%). Эритроидный росток отсутствует. Мегакариоциты не найдены (уровень лейкоцитов крови – 0,59×10⁹/л; тромбоциты – 8×10⁹/л; гемоглобин – 9,8 г/дл).

При определении МОБ I этапом выделены ядродержащие синглетные клетки, и в их пределах взяты в гейт клетки с экспрессией мегакариоцитарных антигенов (CD42a+CD61)+ – 0,21% от миелокариоцитов.

Полученный гейт размещен в осях CD7/CD33. На рис. 5 видно, что коэкспрессия CD7 присутствует на 73,8% мегакариоцитарных клеток, в то время как CD33 практически отсутствует. Объединенный гейт (CD42a/CD61)+ CD7+ характеризуется слабой экспрессией CD45 (клетки-предшественники). Эти клетки составили 0,15% от миелокариоцитов. Данный процент клеток мог быть расценен как МОБ у данного пациента.

Повторное определение МОБ проведено на 34-й день лечения. По данным морфологического исследования пунктат костного мозга гипоклеточный. Бластные клетки не найдены, лимфоциты составляют 18,0%. В гранулоцитарном ростке (63,0%) отмечается преобладание зрелых форм (53,2%). Умеренно выражена моноцитарная реакция (13,8%). Содержание клеток эритроидного ростка снижено до 5,2%. Мегакариоциты единичные в препарате. На момент исследования уровень лейкоцитов крови составил 2,57×10⁹/л, тромбоцитов – 72×10⁹/л.

При проточно-цитометрическом определении МОБ в пределах гейта ядродержащих клеток, исключаящего дуплеты, выделены клетки с экспрессией CD42a, их количество составило 0,67%. Четкого кластера CD7+ событий в пределах клеток с экспрессией CD42a не наблюдалось, а в целом коэкспрессия CD7 на этих клетках составила 7,74%. Таким образом, клетки с иммунофенотипом, соответствующим таковому при диагностике лейкоза, – CD42a+CD33+CD13-CD7+ составили 0,02%, что близко к МОБ-негативному статусу.

Еще один пример. Мальчик, 1 год 7 мес, №7 в табл. 2. При диагностике определяется экспрессия миелоидного антигена CD33 при отсутствии CD117 и CD13, а также яркая экспрессия мегакариоцитарных антигенов CD42a, CD61, CD42b, CD41.

Поскольку в этом случае мегакариоцитарные маркеры мноморфно экспрессированы на бластах, оценка МОБ проводилась как при ОМегЛ и включала 2 пробы (табл. 6).

При оценке МОБ последовательно выделены клетки, экспрессировавшие мегакариоцитарные антигены, в пределах

Таблица 7. Возрастные особенности состава клеток костного мозга
Table 7. Age-related characteristics of the bone marrow cells

Популяции клеток костного мозга	Процентное содержание клеточных популяций костного мозга в зависимости от возраста			
	дети до 1 года	дети от 1 до 7 лет	дети старше 7 лет	взрослые до 70 лет
CD34+ миелобласты составляют в среднем	1,4% (от 1 до 2%)	0,9% (0,6–1,6%)	0,6% (0,2–1,1%)	0,7% (0,3–1,3%)
Нейтрофилы	10,7% (6,2–15,0%)	16,7% (6,9–26,4%)	21,4% (12,8–29,4%)	22,8% (12,9–30,8%)
Эритробласты	8,4–10,3%			12,5–15,1%
В-линейные предшественники	15,5% (2,2–32,9%)	9,0% (1,3–22,8%)	2,0% (0,2–4,9%)	0,9% (0,0–2,6%)
Зрелые В-лимфоциты	1,4			2,8

клеток-предшественников CD45low с низкими уровнями бокового рассеяния (SSC). При оценке коэкспрессии на этих клетках CD117 и CD34 уровень МОБ составил 0,006%, что по всем международным критериям соответствует МОБ-негативному статусу.

Представленные примеры наглядно иллюстрируют возможности иммунодиагностики и определения уровней МОБ при ОМегЛ у детей.

Обсуждение

Нами приведены примеры диагностики и оценки МОБ при ОМегЛ у детей.

Интересно отметить, что у 3 пациенток младше 1 года в костном мозге присутствовало 2 популяции бластов: одна представлена нормальными В-линейными предшественниками, другая – опухолевыми мегакариобластами. В связи с этим необходимо остановиться подробно на особенностях кроветворения детей младшего возраста. Популяционный состав клеток костного мозга новорожденных и детей в возрасте менее 1 года значительно отличается от костного мозга детей более старшего возраста и взрослых [10]. В табл. 7 представлены возрастные особенности состава клеток костного мозга.

Таким образом, в костном мозге детей 1–2-го года жизни присутствуют популяции нормальных бластных клеток, относящихся к В-линейным и миелоидным предшественникам, и популяция В-линейных предшественников широко варьирует от 2,2 до 32,9%. Для точной морфоцитохимической и проточно-цитометрической диагностики острого лейкоза необходимо тщательное разделение бластной популяции на нормальные В-линейные, миелоидные и опухолевые бласты.

Иммунологически опухолевые клетки представлены мегакариобластами, на которых может присутствовать aberrантная коэкспрессия лимфоидных маркеров – чаще всего CD7, могут отсутствовать пан-миелоидные маркеры CD33 и CD13, а также отсутствовать некоторые из мегакариоцитарных маркеров, что также будет являться aberrантностью. Длительное время считалось, что мегакариоциты продуцируются общим бипотентным мегакариоцитарно-эритроидным предшественником (биМЭП). Иммунологически такая клетка в различных исследованиях охарактеризована как Lin–Sca1–cKit+CD34–FcγRII/III^{low}/– или Lin–Sca1–cKit+CD41–CD150+Endoglin–FcγRII/III–. Однако существовала гипотеза о том, что мегакариоцитопоэз протекает в обход биМЭП. В недавних исследованиях показано существование отдельной популяции гемопоэтических стволовых клеток, которые являются предшественниками клеток, продуцирующих тромбоциты. В крупных экспериментальных работах по трансплантации единственной клетки-предшественника также показано существование таких мегакариоцитарных предшественников, способных восстановить популяцию мегакариоцитов [17, 18]. Таким образом, в экспериментах получены данные о том, что клетка-предшественник мегакариоцитопоэза находится на более высоком уровне в иерархии гемопоэза, чем считалось прежде. Однако стадии мегакариоцитопоэза от такого предшественника до тромбоцитов все еще охарактеризованы недостаточно.

Для изучения мегакариоцитопоэза необходимо выделение мегакариоцитарных предшественников. Ранее для выделения из компартмента Lin–Sca1–cKit+ предшественников унипотентных мегакариоцитарных предшественников (уМКП) использовались такие маркеры, как CD9, CD41, CD150 в различных комбинациях. Однако ни один из этих маркеров не линейно-специфичен для мегакариоцитарной линии дифференцировки [18–20].

В исследовании Н. Nishikii и соавт. [18] показано, что CD42b (гликопротеин Ibα), который считается специфичным мембранным антигеном зрелых мегакариоцитов и тромбоцитов, экспрессируется уМКП внутри компартмента Lin–Sca1–cKit+. Также показано, что CD42b может использоваться для выделения уМКП: от 6 до 7% миелоидных предшественников с иммунофенотипом Lin–Sca1–cKit+CD34+FcγRII/RIII^{low}/– в норме экспрессируют CD42b. В то же время CD42b отсутствует на Lin–Sca1+cKit+ (LSK) клетках, на гранулоцитарно-моноцитарных предшественниках (Lin–Sca1–cKit+CD34+FcγRII/RIII+) и биМЭП. уМКП также имели мембранную экспрессию CD150, CD41high и CD9high, CD42c, CD42d и CD42a. При окраске по Романовскому–Гимзе уМКП имели морфологию одноядерных бластных клеток с базофильной цитоплазмой; морфологически сходство с мегакариоцитами отсутствовало. Через 5 дней культивации уМКП в жидких питательных средах в присутствии стволовых факторов роста и тромбопоэтина наблюдался рост однородной колонии крупных многоядерных клеток, морфологически сходных со зрелыми мегакариоцитами, позитивных по CD42b. При введении этих клеток мышам, получившим сублетальную дозу облучения, через 4 дня наблюдалось появление тромбоцитов в периферической крови. Также на этих клетках в отсутствие линейно-специфичных маркеров и Sca1 экспрессировались CD9 (ярко), CD150, CD41. Таким образом, сочетание CD42b и CD34 может использоваться для выделения уМКП.

Такой метод может применяться для установления уровня МОБ, так как количество клеток с иммунофенотипом Lin–cKit+(CD117+CD34+CD42b+ в костном мозге здорового донора не превышает 0,1% [21–23]. В то же время остается необходимым в подсчете клеток с таким иммунофенотипом в регенерирующем после цитостатического воздействия костном мозге, так как данные о таком подсчете в мировой литературе единичны. Кроме того, при выделении клеток с иммунофенотипом Lin–cKit+(CD117+CD34+CD42b+ при определении МОБ важно дополнительно определять клетки с aberrантным иммунофенотипом, соответствующим таковому при диагностике, например, клетки CD117+CD34+CD42b+CD7+, CD117+CD34+CD42b+CD41– и CD117–CD34–CD42b+CD9+.

Таким образом, выявление остаточных опухолевых клеток в ремиссии ОМегЛ принципиально отличается от выявления МОБ при других вариантах ОМЛ благодаря специфичному иммунофенотипу и низкому содержанию мегакариобластов в здоровом костном мозге. В целом можно отметить, что ОМегЛ является морфологически гетерогенным заболеванием, и оценка ряда новых подходов, в частности компьютерного моделирования с использованием экспертных систем искусственного интеллекта, основанных на морфологических и иммунологических признаках клеток, может способствовать дальнейшему уточнению критериев диагностики МОБ.

Заключение

При определении МОБ между курсами ХТ необходимо учитывать aberrантность опухолевых клеток при первичной диагностике, так как количество клеток с экспрессией мегакариоцитарных антигенов и мегакариоцитарных предшественников может быть увеличено по сравнению с нормой в связи с постцитостатической регенерацией костного мозга. Требуется использование нуклеотропных красителей для достоверного отделения ядросодержащих клеток с экспрессией мегакариоцитарных антигенов от тромбоцитов. Также необходима широкая панель антигенов как при диагностике – для выявления

ния опухолеассоциированного aberrантного иммунофенотипа, так и при определении МОБ – для выделения клеток с истинной экспрессией мегакариоцитарных антигенов от миелоидных предшественников с агрегацией на них тромбоцитов. Построение унифицированных алгоритмов определения МОБ при ОМегЛ требует дальнейшего набора материала ввиду редкости заболевания и является перспективным, учитывая низкий процент мегакариобластов в норме.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №18-29-09115.

Financing. The work was carried out with the financial support of the RFBR grant No. 18-29-09115.

Литература/References

- Von Boros J, Korenyi A. Über einen fall von akuter megakaryocytblasten-leukämie, zugleich einige bemerkungen zum. *Problem der akuten leukämie. Z Klin Med* 1931; 118: 679–718.
- Hahn AW, et al. Acute megakaryocytic leukemia: What have we learned. *Blood Rev* 2015. DOI: 10.1016/j.blre.2015.07.005
- Breton-Gorius J, Reyes F, Duhamel G, et al. Megakaryoblastic acute leukemia: identification by the ultrastructural demonstration of platelet peroxidase. *Blood* 1978; 51: 45–60.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7), a report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985; 103: 460–2.
- WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4th edition). Eds. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. IARC: Lyon, 2017; p. 163.
- Луговская С.А., Почтарь М.Е. *Гематологический атлас. 4-е изд. М. – Тверь: Триада, 2016 [Lugovskaya SA, Postman ME. Hematological atlas. 4th ed. Moscow-Tver: Triada, 2016 (in Russian)].*
- Окорокв А. *Диагностика болезней внутренних органов. Кн. 5-1. М.: Мед. лит-ра, 2019; с. 700 [Okorokov A. Diagnosis of diseases of internal organs. Book 5-1. Moscow: Med. liter, 2019; p. 700 (in Russian)].*
- Masetta R, Guidia V, Ronchini L, et al. The changing scenario of non-Down syndrome acute megakaryoblastic leukemia in children. *Crit Rev Oncol Hematol* 2019; 138: 132–8.
- De Marchi F, Araki M, Komatsu N. Molecular features, prognosis, and novel treatment options for pediatric acute megakaryoblastic leukemia. *Expert Rev Hematol* 2019. DOI: 10.1080/17474086.2019.1609351
- Pont J, Souvignet A, Campos L, et al. Accurate Quantification of Fourteen Normal Bone Marrow Cell Subsets in Infants to the Elderly by Flow Cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2018; 94 (5): 627–36.
- Carroll A, Civin C, Schneider N, et al. The t(1;22) (p13;q13) is nonrandom and restricted to infants with acute megakaryoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 1991; 78 (3): 748–52.
- Mercher T, Busson-Le Coniat M, Nguyen Khac F, et al. Recurrence of OTT-MAL fusion in t(1;22) of infant AML-M7. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 33: 22–8.
- Inaba H, Zhou Y, Ablal O, et al. Heterogeneous cytogenetic subgroups and outcomes in childhood acute megakaryoblastic leukemia: a retrospective international study. *Blood* 2015; 126 (13): 1575–84.
- O'Brien MM, Cao X, Pounds S, et al. Prognostic features in acute megakaryoblastic leukemia in children without Down syndrome: a report from the AML02 multicenter trial and the Children's Oncology Group study POG 9421. *Leukemia* 2015; 344 (6188): 1173–8.
- Giri S, Pathak R, Prouet P, et al. Acute megakaryocytic leukemia is associated with worse outcomes than other types of acute myeloid leukemia. *Blood* 2014; 124 (25): 3833–4
- van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher 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; PMID: 22552007
- Miyawaki K, Iwasaki H, Jiomaru T, et al. Identification of unipotent megakaryocyte progenitors in human hematopoiesis. *Blood* 2017; 129 (25): 3332–43. DOI: 10.1182/blood-2016-09-741611; PMID: 28336526
- Nishikii H, Kanazawa Y, Umemoto T, et al. Unipotent Megakaryopoietic Pathway Bridging Hematopoietic Stem Cells and Mature Megakaryocytes. *Stem Cells* 2015; 33 (7): 2196–207. DOI: 10.1002/stem.1985
- Ferkowicz MJ, Starr M, Xie X, et al. CD41 expression defines the onset of primitive and definitive hematopoiesis in the murine embryo. *Development* 2003; 130: 4393–403; PubMed: 12900455
- Deutsch VR, Tomer A. Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: From bench to bedside. *Br J Haematol* 2013; 161: 778–93; PubMed: 23594368
- Björklund E, Gruber A, Mazur J, et al. CD34+ cell subpopulations detected by 8-color flow cytometry in bone marrow and in peripheral blood stem cell collections: application for MRD detection in leukemia patients. *Int J Hematol* 2009; 90 (3): 292–302. DOI: 10.1007/s12185-009-0389-z; PMID: 19728029
- Wen Q, Goldenson B, Crispino JD. Normal and malignant megakaryopoiesis. *Expert Rev Mol Med* 2011; 13: e32. DOI: 10.1017/S1462399411002043; PMID: 22018018; PMCID: PMC4869998
- Macedo A, Orfao A, Ciudad J, et al. Phenotypic analysis of CD34 subpopulations in normal human bone marrow and its application for the detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1995; 9 (11): 1896–901. PMID: 7475281

Статья поступила в редакцию / The article received: 17.12.2020

Статья принята к печати / The article approved for publication: 03.03.2021



OMNIDOCTOR.RU