

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-1-165-177

# Диагностическое иммунофенотипирование острых лейкозов. Рекомендации российско-белорусской кооперативной группы по диагностике острых лейкозов у детей

А.М. Попов<sup>1</sup>, Т.Ю. Вержбицкая<sup>2</sup>, Л.В. Мовчан<sup>3</sup>, И.А. Дёмина<sup>1</sup>, Е.В. Михайлова<sup>1</sup>,  
А.А. Семченкова<sup>1</sup>, Ж.В. Пермикин<sup>2</sup>, Т.В. Шман<sup>3</sup>, А.И. Карачунский<sup>1</sup>, Г.А. Новичкова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева», Минздрава России, Москва

<sup>2</sup>ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница №1», Екатеринбург

<sup>3</sup>ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Республика Беларусь, Минск

На сегодняшний день данные иммунофенотипирования используются для диагностики острых лейкозов (ОЛ), стратификации пациентов в рамках крупных многоцентровых исследований и мониторинга минимальной остаточной болезни. Необходимым условием эффективной диагностики методом проточной цитометрии является разработка единого подхода к подбору комбинаций антител, методике пробоподготовки, настройкам проточного цитометра и анализу данных. Наличие в Российской Федерации и Республике Беларусь оригинальных протоколов терапии ОЛ диктует необходимость разработки единых алгоритмов цитометрической диагностики. Ранее нашей группой был опубликован стандарт диагностики острого лимфобластного лейкоза. В данной работе представлен обновленный стандарт проведения инициального цитометрического исследования, который мы рекомендуем к применению при всех вариантах ОЛ. Разработанный российско-белорусской кооперативной группой по диагностике ОЛ у детей гармонизованный подход включает рекомендации по пробоподготовке, настройке проточного цитометра, анализу и интерпретации цитометрических данных, формату заключения по результатам исследования.

**Ключевые слова:** острый лейкоз, проточная цитометрия, иммунофенотипирование

Попов А.М. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (1): 165–77.  
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-1-165-177

## Flow cytometry in acute leukemia diagnostics. Guidelines of Russian-Belarusian multicenter group for pediatric leukemia studies

A.M. Popov<sup>1</sup>, T.Yu. Verzhbitskaya<sup>2</sup>, L.V. Movchan<sup>3</sup>, I.A. Demina<sup>1</sup>, E.V. Mikhailova<sup>1</sup>, A.A. Semchenkova<sup>1</sup>,  
Zh.V. Permikin<sup>2</sup>, T.V. Shman<sup>3</sup>, A.I. Karachunskiy<sup>1</sup>, G.A. Novichkova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

<sup>2</sup>Regional Children's Clinical Hospital No.1, Ekaterinburg

<sup>3</sup>Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, the Republic of Belarus, Minsk

Flow cytometry is one of the key technologies for acute leukemia (AL) diagnostics. Nevertheless, lack of technological standards hampers implementation of immunophenotyping data in treatment protocols. Earlier our group published the acute lymphoblastic leukemia diagnostic standards. In this paper, we present the updated guidelines for initial immunophenotyping of ALs. This well-harmonized approach includes recommendations for monoclonal antibodies choice, sample preparation, cytometer setup, data analysis and interpretation as well as for the report writing. These guidelines allows application of diagnostic flow cytometric studies in all types of AL.

**Key words:** acute leukemia, flow cytometry, immunophenotyping

Popov A.M., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (1): 165–77.  
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-1-165-177

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 26.01.2023

Принята к печати 20.02.2023

### Контактная информация:

Попов Александр Михайлович,  
канд. мед. наук, заведующий лабораторией  
иммунофенотипирования гемобластозов  
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»  
Минздрава России  
Адрес: 117997, Москва,  
ул. Саморы Машела, 1  
E-mail: uralcytometry@gmail.com

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 26.01.2023

Accepted 20.02.2023

### Correspondence:

Alexander M. Popov,  
Cand. Med. Sci., Head of Leukemia  
Immunophenotyping Laboratory at the Dmitry  
Rogachev National Medical Research Center  
of Pediatric Hematology, Oncology  
and Immunology of Ministry of Healthcare  
of the Russian Federation  
Address: 1 Samory Mashela St.,  
Moscow 117997, Russia  
E-mail: uralcytometry@gmail.com

**О**пределение иммунофенотипа опухолевых клеток методом многоцветной проточной цитометрии является одним из основных диагностических инструментов при острых лейкозах

(ОЛ) у детей и взрослых [1, 2]. Различия в антигенном профиле лейкоэмических бластов позволяют не только уточнить линейную принадлежность ОЛ, но и выбрать наиболее подходящую терапевтиче-

скую схему для достижения оптимального результата лечения. Несмотря на то, что заключение по результату лабораторного исследования не является диагнозом, при ОЛ иммунофенотипирование (ИФТ) стало ключевым диагностическим методом. В связи с тем, что данные ИФТ используются для стратификации пациентов в рамках крупных многоцентровых исследований по терапии ОЛ, важной является максимально возможная гармонизация данного метода диагностики [3, 4]. Необходима разработка оптимального стандартного подхода, включающего подбор панели антител, методику пробоподготовки, настройку цитометра, анализ цитометрических данных и формулирование заключения. Хотя российскими группами периодически публикуются примеры применения различных классификаций ОЛ [5, 6], до появления российско-белорусской кооперативной группы по диагностике ОЛ у детей каких-либо общих подходов к проведению цитометрической диагностики ОЛ в нашей стране разработано не было. При проведенной нами ранее внешней оценке качества диагностики острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) методом проточной цитометрии [7, 8] было обнаружено, что в российских лабораториях, проводящих ИФТ, существуют совершенно разные подходы к пробоподготовке [7], настройкам приборов [7], анализу и интерпретации полученных результатов [7, 8].

Чаще всего стандартизованные протоколы ИФТ разрабатываются в рамках исследовательских групп по лечению ОЛ. Наличие в Российской Федерации и Республике Беларусь оригинальных протоколов терапии [9, 10] диктует необходимость разработки собственных стандартов цитометрической диагностики. Ранее нашей группой был опубликован стандарт диагностики ОЛЛ [11]. Однако за прошедшее время появились дополнительные данные и были опубликованы новые подходы к проведению диагностического ИФТ ОЛ. В данной работе представлен обновленный стандарт проведения инициального цитометрического исследования, который мы рекомендуем к применению при всех вариантах ОЛ.

### Исследуемый материал

Материалом для исследования при ИФТ ОЛ должен являться костный мозг (КМ). Периферическая кровь может быть использована в редких случаях: при крайне низкой клеточности КМ, большом количестве мертвых клеток и одновременном наличии массивного бластоза в крови. Взятие КМ в объеме не менее 2 мл осуществляется в пробирку с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Предпочтительным для исследования является материал, полученный в самом начале пункции, что позволяет максимально избежать разведения КМ периферической кровью, которое может

искажить результаты исследования. Все пробирки должны быть промаркированы фамилией и инициалами пациента, равно как и датой взятия материала, а в направлении на ИФТ указываются фамилия, имя и отчество пациента, возраст, дата, время взятия материала, направительный диагноз, контактные данные врача, назначившего исследование. Для обеспечения сохранности материал предпочтительно хранить и транспортировать при постоянной температуре 4°C и доставлять в лабораторию не позднее 48 ч после взятия. При наличии видимых сгустков, гемолиза или при факте длительного хранения запрашивается повторный образец. При нарушении маркировки пробирок (несоответствие фамилии направлению, отсутствие маркировки) материал утилизируется, также запрашивается повторный образец. Фильтрация КМ проводится при наличии включений жира и мелких сгустков.

### Алгоритм проведения анализа

Диагностическое ИФТ ОЛ решает следующие основные задачи:

- подтвердить наличие ОЛ;
- определить линейную принадлежность опухолевых клеток;
- классифицировать ОЛ (в рамках возможностей метода);
- создать предпосылки для дальнейшего мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ).

В качестве вторичных (необязательных) задач могут быть решены также следующие:

- предположить возможную принадлежность к клинически значимой и/или генетической подгруппе;
- определить экспрессию потенциальных мишеней для таргетной терапии и иммунотерапии.

Алгоритм исследования первичного образца КМ представлен на *рисунке 1*. При низкой экспрессии на опухолевых клетках общелейкоцитарного антигена CD45 (часть В-линейных ОЛЛ (В-ОЛЛ)), некоторые подтипы острого миелоидного лейкоза (ОМЛ)) важным является вопрос дифференциальной диагностики ОЛ с метастазами в КМ солидных опухолей. У детей чаще всего описаны такие метастазы нейробластомы, саркомы Юинга, рабдомиосаркомы. Ключевым отличием бластов при ОЛ является экспрессия линейно-специфических антигенов, в то время как при солидных опухолях кроме отсутствия общелейкоцитарного антигена CD45 наблюдается экспрессия только неспецифических маркеров, встречающихся на гемопоэтических клетках (CD56, CD81, CD9, CD99 и др.) [12–16]. При выявлении в КМ только гемопоэтических клеток в ряде случаев может быть также актуальным вопрос подтверждения опухолевой природы выявленных в образце клеток-предшественников (особенно при их малом количестве).

Уточнение природы «подозрительных» клеток проводится на основе оценки распределения клеток на графиках экспрессии определяемых антигенов и сравнения полученного распределения с таковым, описанным для нормальных клеток КМ [17]. В случае выявления в КМ лейкоэмических клеток производится определение их линейной принадлежности, а затем окончательная классификация (см. далее). Кроме того, рекомендуется провести окрашивание целиком той комбинацией моноклональных антител (МкАТ), которая в дальнейшем будет использована для мониторинга МОБ.

При диагностике рецидива ОЛ (рисунк 2) ключевой задачей является подтверждение опухолевой принадлежности выявленных клеток-предшественников, поскольку нередки случаи высокого содержания нормальных регенераторных клеток на различных этапах терапии и восстановления гемопоэза в КМ после окончания лечения, что может быть интерпретировано при цитологическом исследовании как развивающийся рецидив ОЛ. В то же время все остальные этапы диагностики проводятся заново, в том числе и определение линейной принадлежности опухолевых клеток, поскольку известны случаи так называемого переключения линий при рецидиве ОЛ [18–20].

#### Панель моноклональных антител

Подбор панели МкАТ проводится в соответствии с данным стандартом. Многоцветный подход к окрашиванию является обязательным. Конструкция панели может быть различной и зависит как от количества возможных одновременно определяемых параметров при помощи имеющегося в наличии проточного цитометра, так и от принятого в лаборатории алгоритма проведения исследования. Как применение многоступенчатого ИФТ (ориентационная(ые) комбинация(и) + дополнительное окрашивание в зависимости от линейной принадлежности ОЛ), так и окрашивание сразу всеми необходимыми антителами позволяют получить адекватный результат при грамотном проведении исследования.

Панель антител должна удовлетворять следующим условиям:

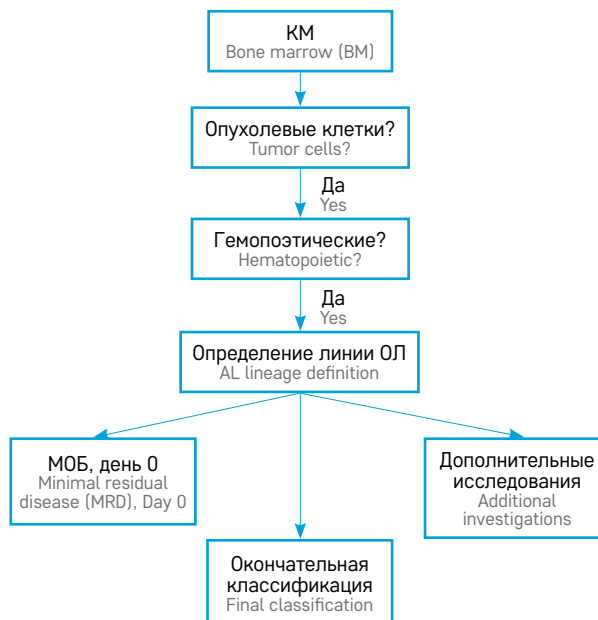
- наличие в каждой пробирке антитела, позволяющего идентифицировать бластные клетки (CD45);
- включение линейно-специфичных антигенов;
- включение маркеров клеток-предшественников;
- включение маркеров зрелых клеток каждой линии гемопоэза;
- включение антигенов, необходимых для классификации ОЛ;
- включение комбинаций маркеров, применяемых для мониторинга МОБ.

**Рисунок 1**

Алгоритм проведения ИФТ первичного ОЛ. Объяснение в тексте

**Figure 1**

An algorithm for immunophenotyping (IPhT) of primary acute leukemia (AL). An explanation is given in the text of the article



**Рисунок 2**

Алгоритм проведения ИФТ рецидива ОЛ. Объяснение в тексте

**Figure 2**

An algorithm for IPhT of AL relapse. An explanation is given in the text of the article



К основным маркерам могут быть добавлены дополнительно антигены, ассоциированные с прогностически важными генетическими aberrациями (например, CD123 при гипердиплоидии [21] или NG2 при перестройках с участием гена *KMT2A* [22]) или являющиеся потенциальными мишенями для таргетной или иммунобиологической терапии. Используемые антитела для диагностики ОЛЛ у детей представлены в таблице 1. Выбор клонов

антител и флуорохромов обычно проводится в соответствии с опытом лабораторий. Ключевые антитела, по которым происходит первичное выделение клеток (CD45, CD19, CD7, CD33), должны быть мечены флуорохромами, позволяющими хорошо разделить интересующие популяции.

### Пробоподготовка

ИФТ ОЛ производится из одной пробирки с материалом. Если в лабораторию поступило несколько пробирок с КМ, взятым из разных точек пункции, выбирается одна из них. В случае, если данному пациенту выполнялось цитологическое исследование, выбор точки для ИФТ осуществляется на основании результатов этого исследования. Выбирается точка с максимальным количеством бластных клеток. В случае, если цитологическое исследование в данной лаборатории не выполнялось, выбирается пробирка с наибольшей клеточностью по данным исследования на гематологическом анализаторе.

Используется цельный КМ, дополнительное выделение моноклеаров не рекомендуется. Количество клеток в окрашиваемом образце должно быть достаточным для цитометрического исследования, но в то же время не быть избыточным, так как в этом случае возможен недостаток количества антител

**Таблица 1**  
Используемые антитела для проведения ИФТ методом проточной цитометрии при ОЛ

**Table 1**  
Antibodies used for flow cytometry IPhT in patients with AL

<b>А. Обязательные маркеры</b> <b>A. Mandatory markers</b>	
В-линейные маркеры B-lineage markers	CD19, iCD79a, CD22, CD10, CD20, iIgM, IgM, Kappa, Lambda
Т-линейные маркеры T-lineage markers	iCD3, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD56, TCR $\alpha\beta/\gamma\delta$
Миелоидные маркеры Myeloid markers	iLysozyme, iMPO, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD33, CD64, CD65, CD235a, CD61, CD41
Маркеры предшественников Precursor markers	CD117, CD34
Линейно неограниченные маркеры Non-lineage restricted markers	CD45
<b>Б. Маркеры, используемые для мониторинга МОБ</b> <b>B. Markers for MRD monitoring</b>	
В-линейные маркеры B-lineage markers	CD58, CD38, CD24
Т-линейные маркеры T-lineage markers	CD99, CD48, CD16
<b>В. Дополнительные маркеры</b> <b>B. Additional markers</b>	
При В-ОЛЛ In B-lineage acute lymphoblastic leukemia (B-ALL)	NG2, CD123, TSLPR (CRLF2), CD27, CD44, CD371
При Т-ОЛЛ In T-lineage acute lymphoblastic leukemia (T-ALL)	HLA-DR, CD11b
При остром ОМЛ In acute myeloblastic leukemia (AML)	CD123, NG2, CD303, CD203c, CD45RA, CD371, CD66b, CD11b, HLA-DR

Примечание. i – внутриклеточный антиген.  
Note. i – intracellular antigen.

для окрашивания всех молекул антигена, что, в свою очередь, будет приводить к неадекватно слабой флуоресценции клеток. Однако следует помнить, что при большом объеме окрашиваемого КМ или периферической крови может быть затруднен лизис эритроцитов стандартным объемом лизирующего реагента. Так как при первичном ИФТ не рекомендуется анализировать более 50 000 клеток, чаще всего окрашивание большого объема материала не имеет смысла. Для того чтобы быть уверенным, что после всех манипуляций по пробоподготовке в анализируемом образце останется достаточное количество клеток, нужно брать такой объем материала, чтобы количество вносимых клеток не менее чем в 4 раза превышало целевое количество анализируемых клеток. Таким образом, окрашивание даже 200 000 клеток приведет к анализу необходимых 50 000. Однако для более быстрой записи данных проточным цитометром и более адекватного количественного соотношения антиген/антитело лучше окрашивать  $1-2 \times 10^6$  клеток. Превышать это количество не рекомендуется. Внесение материала для окрашивания рекомендуется производить после подсчета клеточности на гематологическом анализаторе и произведения расчетов необходимого объема материала.

Количество вносимых МкАТ напрямую зависит от количества клеток в окрашиваемом материале. Оптимальный объем раствора антитела на  $2 \times 10^6$  клеток определяется путем титрования. Антитела должны вноситься непосредственно из флакона производителя. Заблаговременное приготовление смесей (коктейлей) антител нецелесообразно, так как может привести к распаду относительно нестабильных tandemных флуорохромов.

Лизис эритроцитов и пермеабиллизация для внутриклеточного окрашивания проводятся в соответствии с инструкциями фирм-производителей соответствующих реагентов. Порядок пробоподготовки определяется как особенностями материала, так и правилами использования соответствующих реагентов. Возможно применение предварительного лизиса эритроцитов в образце до его окрашивания раствором МкАТ без дополнительного фиксатора клеток, однако чаще окрашивание предшествует лизису. При окрашивании антителами к мембранным или цитоплазматическим молекулам иммуноглобулина (Ig) необходима предварительная отмывка материала фосфатно-солевым буфером.

### Настройка проточного цитометра

Качество иммунофенотипического исследования во многом зависит от настроек используемого прибора. Основными параметрами, влияющими на результат исследования, являются стабильность работы лазеров и жидкостной системы, чувствитель-

ность фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) детекторов флуоресценции и цифровая компенсация данных флуоресценции.

Стабильность работы лазеров на большинстве приборов определяется по попаданию ее показателей в референсные диапазоны. У большинства производителей проточных цитометров существуют системы калибровочных частиц, позволяющие пользователю достаточно легко контролировать работу лазеров и ФЭУ. Персонал лабораторий обязан как минимум еженедельно контролировать стабильность работы лазеров для получения адекватных результатов анализа. Чувствительность ФЭУ жестко привязана к цифровой компенсации данных, поэтому их настройка производится одновременно. Для настройки компенсации необходимо применять калибровочные материалы, производимые поставщиком проточного цитометра, имеющегося в конкретной лаборатории. При использовании реагентов различных производителей необходимо проводить настройку чувствительности ФЭУ и компенсации для совершенно конкретных комбинаций используемых антител.

#### Анализ данных

При анализе данных используют гистограммы, контурные и точечные графики, что позволяет более точно оценить экспрессию каждого маркера в отдельности и выявить все возможные коэкспрессии. Для точного выделения опухолевых клеток более предпочтительно использование точечных графиков, в то время как для оценки экспрессии каждого отдельного антигена более информативны гистограммы и контурные графики, поскольку они дают более полную информацию о распределении внутри опухолевой популяции по экспрессии антигена (рисунок 3) [11].

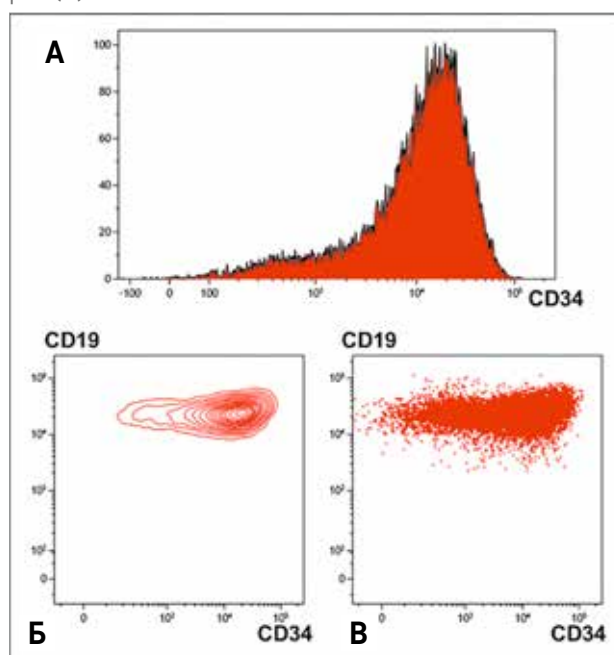
Последовательность действий при выделении опухолевых клеток представлена на рисунке 4. На точечном графике прямого и бокового светорассе-

яния (forward vs side scatter, FSC/SSC) из анализа исключается дебрис (рисунок 4А). Затем на графике, отображающем прямое светорассеяние в формате площади пика (FSC-A) и в формате высоты или ширины пика (FSC-H или FSC-W соответственно) выделяются синглеты и удаляются конгломераты клеток, способные давать завышенные значения флуоресценции (рисунок 4Б). Опухолевые клетки выделяют на графике CD45/SSC (рисунок 4В). Для исключения событий, попадающих в этот регион и не являющихся бластами (дебрис, лимфоциты, грану-

**Рисунок 3**

Оценка экспрессии антигенов опухолевыми клетками на разных типах графиков. Гистограмма (А) и контурный график (Б) дают больше информации о распределении клеток внутри опухолевой популяции по экспрессии CD34, чем точечный график (В)

**Figure 3**  
The evaluation of antigen expression by tumor cells on different types of plots. A histogram (А) and a contour plot (Б) provide more information about the distribution of cells within the tumor population by CD34 expression than a dot plot (В)

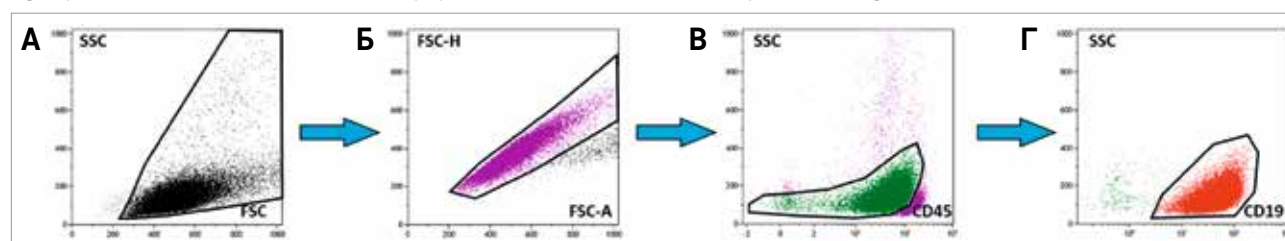


**Рисунок 4**

Последовательность выделения опухолевых клеток для дальнейшей оценки иммунофенотипа: удаление из анализа разрушенных и мертвых клеток (А), исключение конгломератов клеток (Б) и выделение бластных клеток (В) с последующим уточнением региона опухолевых клеток по линейно-специфическому маркеру (Г). Опухолевая популяция показана красным. Объяснение в тексте

**Figure 4**

Steps for the isolation of tumor cells for further immunophenotype evaluation: exclusion of damaged and dead cells (А), exclusion of cell aggregates (Б) and isolation of blast cells (В) followed by the delineation of the tumor cell region using a lineage specific marker (Г). The tumor cell population is shown in red. An explanation is given in the text of the article



лоциты или моноциты), проводится дополнительное гейтирование клеток, выделенных по экспрессии CD45, на графике линейно-ассоциированный маркер/SSC (рисунок 4Г), если такой маркер есть в применяемой комбинации антител. В качестве линейно-ассоциированного антигена используют CD19, CD7 и CD33 для В-ОЛЛ, Т-линейного ОЛЛ (Т-ОЛЛ) и ОМЛ соответственно [11]. Не рекомендуется проводить гейтирование и в обратном порядке, т. е. сначала выделять клетки по линейно-ассоциированному антигену, а потом уже среди этих клеток выделять бласты по низкой экспрессии CD45 и соответствующим значениям SSC. В этом случае в анализ могут не попасть дополнительные опухолевые популяции другой линейной направленности, выявляемые тем не менее по снижению экспрессии CD45. Если возникают сложности в выделении бластов при помощи только указанных антигенов, для этой цели допустимо использование любых антигенов, входящих в данную комбинацию, однако сниженная экспрессия CD45 всегда является основным критерием бластной популяции [11].

Применение изотипического контроля считается нецелесообразным, так как в каждом образце присутствуют клетки, представляющие собой как позитивный, так и негативный контроль для антигенов, экспрессируемых бластами. Например, для определения экспрессии CD19 позитивным контролем являются нормальные В-лимфоциты, практически всегда присутствующие в образце, а отрицательным – Т-лимфоциты или гранулоциты, которые также почти всегда хотя бы в небольшом количестве присутствуют в исследуемом материале. Необходимо учитывать, что с повышением значения SSC может увеличиваться аутофлуоресценция клеток и по каналам флуоресценции [23]. Поэтому в качестве негативного контроля, если есть такая возможность, предпочтительно использовать клетки, имеющие сходное значение SSC с исследуемой популяцией. Ширина пика негативной контрольной популяции не является постоянной величиной и зависит от конкретного антигена, используемого флуорохрома, настроек прибора и особенностей клеток данного пациента.

Популяция считается позитивной по данному антигену, если более 20% клеток при мембранном окрашивании или более 10% клеток при внутриклеточном окрашивании находятся на графике правее края контрольной популяции. В то же время, если центры исследуемой и контрольной популяций совпадают, а флуоресценция в исследуемой популяции распределена нормально (кривая Гаусса на гистограмме, расстояние между левыми краями исследуемой и контрольной популяций совпадает с расстоянием между правыми), то популяция считается негативной (рисунок 5А). Если центры

исследуемой и контрольной популяций совпадают, опухолевая популяция может считаться позитивной только при ненормальном распределении флуоресценции внутри популяции и размере «плеча» более 20% или 10% соответственно (рисунок 5Б). Правой границей «негативной зоны» при определении экспрессии CD45 является левый край популяции нормальных гранулоцитов (рисунок 6). Экспрессия CD45 определяется как позитивная, если выявляется существенное перекрытие (более 20%) пиков опухолевой популяции и нормальных гранулоцитов.

### Определение линейной принадлежности опухолевых клеток

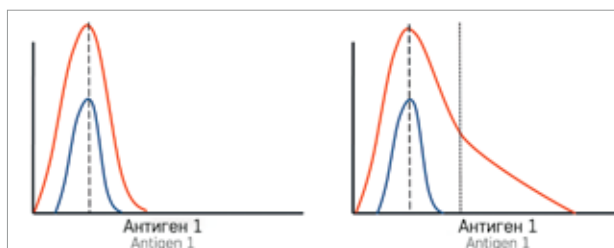
Принципиальным является определение того, к какой линии гемопоэза относятся опухолевые клетки, поскольку тип используемой терапии зависит, прежде всего, именно от линейной принадлежности опухоли. Различные исследовательские группы предлагают разные сочетания экспрессируемых бластами антигенов для определения доминирующей линии ОЛ [23–26]. Несмотря на некоторые различия, эти алгоритмы мало отличаются друг от друга. Наша

**Рисунок 5**

Оценка экспрессии антигенов опухолевыми клетками на разных типах графиков. Гистограмма (А) и контурный график (Б) дают больше информации о распределении клеток внутри опухолевой популяции по экспрессии CD34, чем точечный график (В)

**Figure 5**

The evaluation of antigen expression by tumor cells on different types of plots. A histogram (A) and a contour plot (B) provide more information about the distribution of cells within the tumor population by CD34 expression than a dot plot (B)

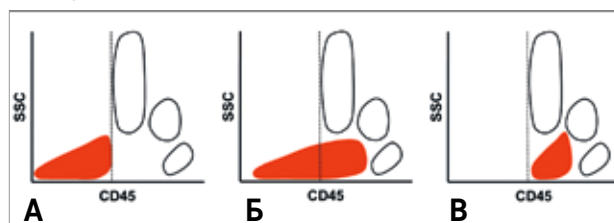


**Рисунок 6**

Оценка экспрессии CD45 опухолевыми клетками (показаны красным): примеры расположения популяции при CD45-негативном ОЛ (А), частичной экспрессии CD45 (Б) и CD45-позитивном ОЛ (В)

**Figure 6**

Evaluation of CD45 expression by tumor cells (red): examples of the location of the cell population in case of CD45-negative AL (A), partial expression of CD45 (B), and CD45-positive AL (B)



группа применяет следующий алгоритм определения линейной принадлежности ОЛ. В случае отсутствия специфичных признаков нескольких линий гемопоэза основное направление дифференцировки ОЛ определяется согласно критериям, указанным в *таблице 2*. ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ) характеризуется тотальной ( $\geq 80\%$  позитивных клеток) экспрессией нескольких В-линейных антигенов (CD19, CD10, CD22, iCD79a). Внутриклеточная экспрессия CD3, всегда сочетающаяся с мембранной экспрессией CD7, при отсутствии выявляемой миелопероксидазы определяет Т-линейную принадлежность опухоли. В то же время наличие на поверхности опухолевых клеток нескольких миелоидных маркеров при отсутствии специфических признаков ВП-ОЛЛ и Т-ОЛЛ позволяет определить ОМЛ. Тем не менее необходимо учитывать, что ранние антигены каждой из линий гемопоэза могут коэкспрессироваться на клетках ОЛ с другой линейной принадлежностью: например, CD7 или CD19 часто коэкспрессируются при ОМЛ, а CD13 и CD33 – при ВП-ОЛЛ. Разграничение между ОЛЛ с коэкспрессией миелоидных антигенов или ОМЛ с коэкспрессией лимфоидных маркеров, с одной стороны, и бифенотипическим лейкозом, сочетающимся на одной лейкоэмической популяции иммунофенотипические признаки разных линий гемопоэза, с другой стороны, является одной из важных задач диагностического ИФТ. ОЛ со смешанным фенотипом (ОЛСФ) диагностируют в тех случаях, когда бластные клетки экспрессируют одновременно специфические маркеры миелоидной и одной из лимфоидных линий (бифенотипический вариант) (*таблица 3*, с модификациями из [27]) либо определяются 2 опухолевые популяции с разной линейной принадлежностью (билинейный вариант) [28]. Учитывая генетическую и клональную схожесть отдельных частей опухолевой популяции при билинейной разновидности ОЛСФ [29–31], предпочтительно не разграничивать билинейный и бифенотипический варианты, а в обоих случаях диагностировать ОЛСФ, используя для этого лишь разные подходы: определение экспрессии специфических маркеров (*таблица 3*) или определение 2 отдельных популяций опухолевых клеток соответственно. В случае отсутствия экспрессии линейно-специфических антигенов и яркой тотальной экспрессии маркеров клеток-предшественников диагностируется острый недифференцированный лейкоз. При рецидиве В-линейного ОЛЛ после CD19-направленной иммунотерапии возможна потеря CD19 [32–35]. В тех случаях, когда другие В-линейные антигены экспрессируются слабо и/или гетерогенно [36], такой лейкоз уже может не соответствовать формальным критериям В-линейной дифферен-

цировки. Однако, принимая во внимание первичный иммунофенотип и очевидное его изменение под действием таргетного препарата, такие случаи все равно интерпретируются как В-ОЛЛ, кроме случаев очевидного «переключения линий» [19].

### Иммунофенотипическая классификация острых лейкозов

На данный момент основными классификациями ОЛ являются системы Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в редакциях 2016 и 2022 г. [28, 37], однако для ОЛЛ чаще всего используется адаптированный под каждую конкретную исследовательскую группу вариант классификации группы EGIL [24, 38].

**Таблица 2**  
Критерии линейной принадлежности ОЛ

**Table 2**  
Lineage assignment criteria for AL

Линия Lineage	Критерий Criteria	Антигены Antigens
ВП-ОЛЛ BCP-ALL	$\geq 2$ тотально позитивных ( $\geq 80\%$ ) или 1 тотально позитивный ( $\geq 80\%$ ) и 2 слабо позитивных (20–80%) $\geq 2$ completely positive ( $\geq 80\%$ ) or 1 completely positive ( $\geq 80\%$ ) and 2 weakly positive (20–80%)	CD19, iCD79a, CD22, CD10
Т-ОЛЛ T-ALL	Все 3 и нет признаков ВП-ОЛЛ All 3 and no features of BCP-ALL	CD7(+), iCD3(+), MPO(–)
ОМЛ AML	$\geq 2$ позитивных и нет признаков ВП-ОЛЛ или Т-ОЛЛ $\geq 2$ positive and no features of BCP-ALL or T-ALL	CD33, CD13, CD117, CD15, MPO, CD64

Note. BCP-ALL – B-cell precursor ALL.

**Таблица 3**  
Специфические признаки разных линий гемопоэза, используемые для диагностики ОЛСФ

**Table 3**  
Specific characteristics of different hematopoietic lineages used for the diagnosis of mixed-phenotype AL

Линия Lineage	Критерий Criteria
В-линия B-lineage	Яркая экспрессия CD19 и как минимум одного из следующих антигенов: CD10, CD22, iCD79a или слабая экспрессия CD19 и яркая экспрессия как минимум двух из следующих антигенов: CD10, CD22, iCD79a Strong expression of CD19 and at least one of the following antigens: CD10, CD22, iCD79a or weak expression of CD19 and strong expression of at least two of the following antigens: CD10, CD22, iCD79a
Т-линия T-lineage	Цитоплазматическая экспрессия CD3, определенная методом проточной цитометрии с использованием антител к $\epsilon$ -цепи рецептора Cytoplasmatic expression of CD3 detected by flow cytometry using antibodies to $\epsilon$ -chain of the receptor
Миелоидная линия Myeloid lineage	Миелопероксидаза, определенная любым методом, или не менее двух моноцитарных антигенов (CD11c, CD64, CD14, лизоцим) Expression of myeloperoxidase detected by any method, or at least two monocytic antigens (CD11c, CD64, CD14, lysozyme)

Тем не менее, по сути, при проведении диагностического ИФТ учитываются различные аспекты из обеих основных систем, прежде всего, на этапе определения линейности ОЛ.

Классификационные категории ОЛЛ хорошо известны и детально описаны [24, 38]. Как для В-ОЛЛ, так и для Т-ОЛЛ определение иммуноварианта базируется только на экспрессии перечисленных в классификации маркеров, в то время как определение других антигенов позволяет получить дополнительную информацию об опухолевых клетках, но не должно изменять определение классификационной группы [24]. Среди как В-ОЛЛ, так и Т-ОЛЛ выделяют несколько вариантов, отличающихся степенью «зрелости» опухолевых клеток (BI–BIV и TI–TIV соответственно).

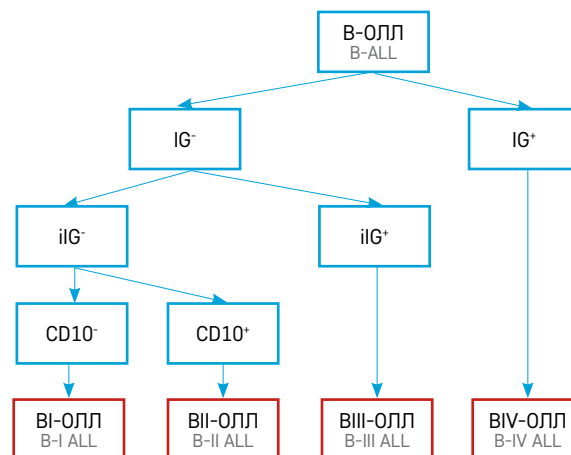
Для В-ОЛЛ степень «зрелости» определяется по экспрессии CD10, а также мембранной и внутриклеточной экспрессии тяжелых и/или легких цепей Ig [24]. Остальные маркеры, такие как CD20, CD34, TdT, CD58, имеют лишь вспомогательное значение и не являются основой для итогового заключения. Алгоритм диагностики В-ОЛЛ представлен на рисунке 7. Варианты BI–BIII относятся к ВП-ОЛЛ. В части случаев возможна экспрессия iIg при отрицательном CD10 [39], что не отменяет вариант BIII ОЛЛ. Редкие случаи ВП-ОЛЛ с поверхностной экспрессией Ig, не имеющие других признаков лимфомы/лейкоза Беркитта (морфология L3 по FAB, генетические аберрации с вовлечением гена MYC, высокая скорость пролиферации) все равно должны быть отнесены к BIV-варианту [23, 40], хотя включаются обычно в общепринятое лечение ОЛЛ [41]. Для уточнения природы такого ОЛ (рисунк 8) возможно применение дополнительных маркеров, таких как CD58, а также индикаторов высокой пролиферативной активности клеток, таких как внутриклеточная экспрессия Ki-67 и относительное количество клеток в S-фазе клеточного цикла, определенное при помощи ДНК-цитометрии [41, 42].

При Т-ОЛЛ степень «зрелости» определяется по наличию CD2, CD5, CD1a, а также Т-клеточных рецепторов [24]. Алгоритм диагностики Т-ОЛЛ представлен на рисунке 9. Экспрессия CD3 на поверхности клеток встречается уже на достаточно ранних стадиях развития [23], а не только при варианте TIV. Экспрессия CD1a независимо от других маркеров позволяет поставить диагноз TIII-ОЛЛ [23, 24].

При гетерогенной экспрессии классифицирующих антигенов, несмотря на очевидное наличие нескольких субпопуляций опухолевых клеток, не рекомендуется указывать несколько классификационных групп. Предпочтение отдается не большей субпопуляции, а той, которая имеет более «зрелый» иммунофенотип. Например, при экспрессии CD10 на

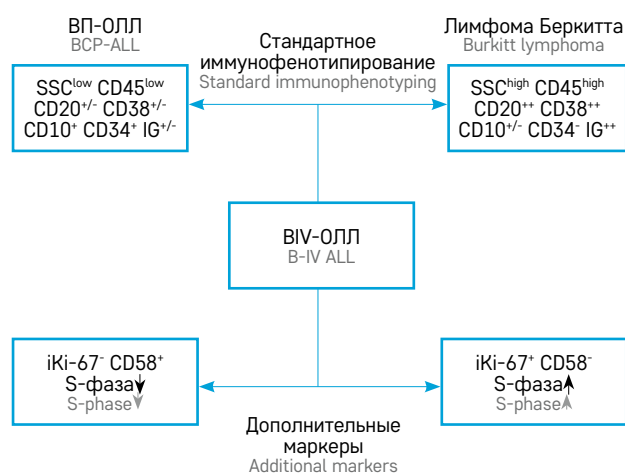
**Рисунок 7**  
Алгоритм дифференциальной диагностики В-ОЛЛ, согласно классификации EGIL

**Figure 7**  
An algorithm for differential diagnosis of B-ALL according to the EGIL classification



**Рисунок 8**  
Гетерогенность варианта BIV (IgM⁺) ОЛЛ по EGIL. Алгоритм дифференциальной диагностики В-ОЛЛ и лейкомизации лимфомы Беркитта. Объяснение в тексте

**Figure 8**  
Heterogeneity of B-IV (IgM⁺) ALL variant according to the EGIL. An algorithm for differential diagnosis of B-ALL and Burkitt lymphoma with bone marrow involvement. Explanation is given in the text of the article



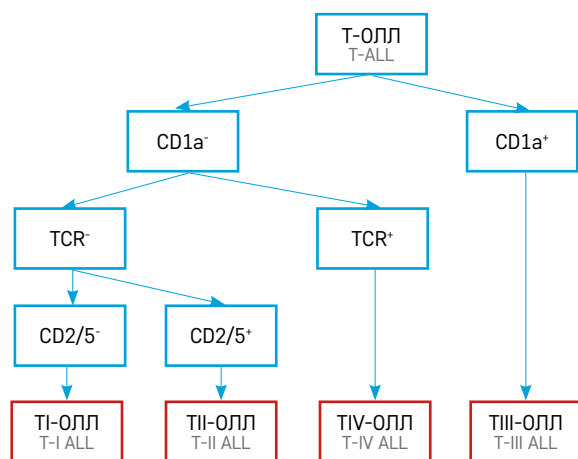
25% бластов и отсутствии мембранной и цитоплазматической экспрессии Ig должен быть установлен BII-вариант, несмотря на то, что подавляющее большинство клеток имеет фенотип BI ОЛЛ. Исключение делается только для экспрессии CD1a [23]. Вариант TIII (кортикальный Т-ОЛЛ) устанавливается при наличии данного маркера на поверхности более 20% бластов вне зависимости от других особенностей иммунофенотипа [23, 24]. Однако и в данном случае, исходя из биологических особенностей опухоли, может быть применено исключение и из другого упомянутого выше правила. При выраженной экспрессии Т-клеточных рецепторов предпочтительной является формулировка: TIII-ОЛЛ, ТКР⁺.

Рисунок 9

Алгоритм дифференциальной диагностики Т-ОЛЛ (CD7<sup>+</sup>iCD3<sup>+</sup>), согласно модифицированной классификации EGIL

Figure 9

An algorithm for differential diagnosis of T-ALL (CD7<sup>+</sup>iCD3<sup>+</sup>) according to the modified EGIL classification



Относительно недавно был выделен отдельный подтип Т-ОЛЛ – ОЛЛ из ранних Т-линейных предшественников (ЕТР-ОЛЛ) [43]. В этом случае бласты экспрессируют CD3 внутриклеточно (часто гетерогенно), для них характерна низкая (менее 75%) экспрессия CD5; отсутствует экспрессия CD1a и CD8, экспрессируется хотя бы один из следующих антигенов: HLA-DR, CD34, миелоидные маркеры (CD13, CD33, CD11b, CD117) [23, 43]. Эта опухоль происходит из ранних тимических предшественников, сохраняющих способность к дифференцировке как в Т-лимфоциты, так и в миелоидные клетки [29, 44]. ЕТР-ОЛЛ имеет общие биологические черты с ОЛСФ (при сочетании признаков Т-ОЛЛ и ОМЛ) [29], часто плохо отвечает на «лимфоидный» тип противоопухолевой химиотерапии [43, 45], а при рецидиве или прогрессии может трансформироваться в ОМЛ или ОЛСФ [45]. Данная подгруппа Т-ОЛЛ может соответствовать как TI-, так и TII-варианту по классификации EGIL [23, 46], однако представляет собой отдельную классификационную группу, требующую упоминания параллельно с подтипом по EGIL [47]. При выявлении ЕТР-ОЛЛ мы рекомендуем в итоговом заключении обращать внимание, прежде всего, именно на соответствие лейкоза критериям ЕТР-ОЛЛ, но при этом обязательно указывать подвариант по EGIL (например: ЕТР-ОЛЛ (TII-ОЛЛ)).

Следует учитывать, что экспрессия любых антигенов, в том числе и тех, которые определяют принадлежность ОЛЛ к тому или иному иммуноварианту, может изменяться при рецидиве по сравнению с инициальной диагностикой [48]. В таком случае, соответственно, изменяется и вариант ОЛЛ по сравнению с первично диагностированным.

При ОМЛ роль ИФТ в точном классифицировании опухоли существенно меньше, чем при ОЛЛ. Только острый эритробластный и острый мегакариобластный лейкозы могут быть относительно точно определены по антигенному профилю опухолевых клеток [24]. Все остальные варианты должны быть обозначены просто как ОМЛ, без дальнейших уточнений. Следует отметить, что существенную роль ИФТ играет только в диагностике так называемого чистого эритробластного лейкоза, когда весь опухолевый субстрат представлен эритроидными клетками с явными aberrациями антигенного профиля. Именно такие ОМЛ в настоящее время в классификации ВОЗ отнесены к эритробластному лейкозу [28]. В то же время М6-вариант ОМЛ по FAB-классификации [49] предусматривает гораздо более гетерогенный набор случаев, большая часть которых сейчас может быть отнесена к другим вариантам ОМЛ или миелодиспластическому синдрому [50], в диагностике которых роль ИФТ, соответственно, весьма ограничена. При эритробластном лейкозе опухолевые эритроидные предшественники (CD45-отрицательные) экспрессируют как предшественнический антиген CD117, так и эритроидный маркер CD235a (гликофорин А) [37]. В противоположность эритроидному ОМЛ мегакариобластный лейкоз имеет четкие иммунофенотипические критерии диагностики [37]. Опухолевые клетки экспрессируют тромбоцитарные маркеры CD41 и CD61 (реже используются CD42a и CD42b). Однако применение данных антигенов в диагностике ОМЛ подразумевает качественную пробоподготовку, исключаящую налипание на бласты тромбоцитов, также экспрессирующих CD41 и CD61 [51]. Важно отметить, что оба данных антигена представляют собой части одного рецепторного комплекса тромбоцитов, поэтому их экспрессия характеризуется высокой степенью синхронности и на точечных графиках формирует характерное диагональное распределение, которое именно для данных антигенов не должно быть ошибочно интерпретировано как случай неадекватной настройки проточного цитометра. Другие особенности иммунофенотипа мегакариобластного лейкоза, такие как отсутствие экспрессии CD11a [51], часто выявляемого при других ОМЛ, являются дополнительными признаками, не определяющими итоговый диагноз. Важно отметить, что распространенный ранее нарратив о том, что мегакариобластный лейкоз – CD45-негативная опухоль [52], оказался ошибочным: большинство случаев данного варианта ОМЛ CD45-позитивны [53]. В целом же мегакариобластный лейкоз представляет собой очень гетерогенную группу ОМЛ [53, 54], в которой можно выделить как разные генетические варианты, так и подгруппы с различным антигенным профилем. При некоторых вариантах мегакариоб-

ластного ОМЛ ключевым вопросом диагностического ИФТ становится дифференциальная диагностика с метастазами солидных опухолей [55].

#### **Описание результатов диагностического иммунофенотипирования**

Процентное содержание лейкоэмических клеток в КМ указывается только по данным проточной цитометрии. Большее или меньшее количество бластов, определяемое цитологически, никакого значения не имеет, так как может быть легко объяснено как техническими, так и биологическими причинами. Описание общей картины КМ и клеточного состава неопухолевых популяций может быть внесено в заключение в виде отдельного раздела при наличии соответствующего запроса, однако ни в каком случае не должно быть включено в заключение по ИФТ опухолевых клеток, поскольку описание антигенного профиля сразу нескольких популяций, только одна из которых является опухолевой, может привести к неправильной интерпретации результата исследования лечащим врачом.

Если при исследовании КМ не было обнаружено опухолевых клеток, в том числе если выявленные бласты с учетом оценки маркеров aberrантности представляют собой нормальные клетки-предшественники, в заключении должно быть указано, что данных за ОЛ в исследуемом материале нет. Эта ситуация кардинально отличается от ситуации, когда опухолевые клетки обнаруживаются, но в количествах, не превышающих пороговый уровень для диагностики ОЛ (20%). В случае лимфоидной природы опухолевых клеток все равно целесообразно указание соответствия иммунофенотипа тому или иному варианту ОЛЛ. Однако это может быть сделано только в том случае, если данная популяция четко идентифицируется при помощи ИФТ. При этом как раз играет свою роль именно то, что заключение ИФТ не является диагнозом, а лишь указывает на наличие в КМ точного количества опухолевых клеток с антигенным профилем, соответствующим определенному типу лейкоза. В тех случаях, когда бластов слишком мало для уточнения окончательного варианта ОЛЛ, это должно быть отражено в комментариях. То же правило может быть применено и при миелоидной природе опухолевых клеток, однако только в том случае, если опухолевая популяция превышает 15% всех ядросодержащих клеток (ЯСК). В других случаях, часто соответствующих миелодиспластическому синдрому или другим онкогематологическим заболеваниям, целесообразно просто указание на миелоидную направленность дифференцировки бластов.

При наличии в КМ нескольких четко идентифицируемых методом проточной цитометрии популяций

опухолевых клеток их отдельное описание приемлемо далеко не во всех случаях. Так, при ОМЛ вследствие «созревания» лейкоэмических бластов нередко может наблюдаться несколько субпопуляций опухолевых клеток, различающихся иммунофенотипически и цитоморфологически. Однако отдельное описание опухолевого пула в данном случае не приведет к изменению итогового заключения о миелоидной природе опухолевых клеток, но может ввести в заблуждение лечащего врача.

Отдельное описание нескольких популяций бластов должно выполняться только в том случае, если указанные популяции относятся к разным линиям гемопоэза или если как минимум одна из них соответствует ОЛСФ. В том случае, если меньшая популяция составляет более 10% всех ЯСК КМ, иммунофенотип обеих субпопуляций описывается одинаково подробно. Если доля меньшей составляющей лейкоэмического пула превышает 5%, но не превышает 10% – подробно описывается антигенный профиль большей популяции, но после основной части заключения делается уточнение, что выявляется минорная популяция клеток, возможно, опухолевых, с указанием их процента от ЯСК, суммарного иммунофенотипа и при возможности линейной принадлежности.

Экспрессия антигенов опухолевой популяцией описывается в формате указания процентного содержания позитивных опухолевых клеток среди всей лейкоэмической популяции. Несмотря на то, что подобное описание зачастую не позволяет составить более или менее точное представление о биологии опухолевых клеток и субпопуляционной структуре лейкоэмической популяции, оно является наиболее понятным и однозначно воспринимаемым для клинических врачей. В то же время такой вариант представления данных наиболее пригоден для гармонизации ИФТ в рамках многоцентровых исследований, поскольку, по сути, результат в данном случае зависит практически только от корректного определения границ негативности/позитивности при проведении проточной цитометрии и аккуратности выбора области анализа целевой популяции бластов. При этом степень влияния настроек прибора существенно ниже, а различиями в используемых сочетаниях антител и флуорохромов в большинстве случаев можно пренебречь. В качестве суммарного иммунофенотипа указывается сочетание антигенов, экспрессия которых определяется на более чем 20% опухолевых клеток в случае мембранного окрашивания, и более чем 10% – при внутриклеточном окрашивании. Указывать в данной графе антигены, экспрессия которых не выявлена, не рекомендуется. Итогом описания результатов ИФТ является указание на то, какому варианту ОЛ соответствует

антигенный профиль опухолевой популяции. Некорректно формулировать итоговое заключение в виде утверждения, что в КМ выявлен тот или иной вариант ОЛ. Должно быть указано лишь, что иммунофенотип опухолевых клеток соответствует той или иной классификационной категории ОЛ. Кроме классификационной категории в итоговом заключении необходимо указать коэкспрессию всех маркеров линий гемопоэза, отличных от линии опухолевой популяции, а также важных маркеров негемопоэтических клеток (например, NG2).

Кроме указанной выше информации в заключение могут быть внесены любые комментарии, касающиеся проведенного исследования, прежде всего его технической стороны. Например, может быть указано на низкую клеточность или плохое качество материала. Пространных рассуждений относительно биологических особенностей опухоли, косвенно базирующихся на данных ИФТ, в комментариях следует избегать. Исключение может быть сделано только в случае дифференциальной диагностики ОЛЛ и лейкоемизации некоторых лимфом, прежде всего лимфомы Беркитта. В том случае, если все дополнительные цитометрические исследования были проведены (рисунки 8), допустим комментарий о возможной природе исследуемой опухоли. Любые размышления о наличии тех или иных молекулярно-генетических перестроек или соответствии ОЛ какой-либо морфологической категории (например, по FAB-классификации) считаются недопустимыми.

Следует отметить, что конкретное иммунофенотипическое заключение не может быть сформулировано только в случае существенных технических сложностей, но не фенотипических особенностей опухоли. Даже при гетерогенном профиле экспрессии антигенов итоговое его описание должно заканчиваться сформулированным заключением.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработанный и представленный в данной работе гармонизированный подход к ИФТ ОЛ методом проточной цитометрии позволит в дальнейшем применять данную диагностическую технологию в системе референсных лабораторий в российско-белорусских многоцентровых исследованиях по терапии ОЛ у детей.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено при финансовой поддержке благотворительного фонда «Подари жизнь» и фонда «Наука – детям».

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

## ORCID

Popov A.M. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0889-6986>

Verzhbitskaya T.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9329-1828>

Karachunskiy A.I. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9300-5198>

Novichkova G.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2322-5734>

## Литература

1. Faderl S., O'Brien S., Pui C.H., Stock W., Wetzler M., Hoelzer D., et al. Adult acute lymphoblastic leukemia: concepts and strategies. *Cancer* 2010; 116 (5): 1165–76.
2. Hunger S.P., Mullighan C.G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med* 2015; 373 (16): 1541–52.
3. Van Dongen J.J., Orfao A., EuroFlow C. EuroFlow: Resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. *Leukemia* 2012; 26 (9): 1899–907.
4. Bene M.C., Nebe T., Bettelheim P., Buldini B., Bumbea H., Kern W., et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* 2011; 25 (4): 567–74.
5. Антипова А.С., Баранова О.Ю., Френкель М.А., Тупицын Н.Н., Купрышина Н.А., Обухова Т.Н. и др. Острые лейкозы со смешанным фенотипом: клинико-лабораторные особенности и прогноз. *Клиническая онкогематология* 2015; 8 (2): 136–50.
6. Зуева Е.Е., Афанасьев Б.В., Тотолян А.А. Иммунофенотипическая диагностика острых лейкозов методом проточной цитометрии. *Медицинская иммунология* 2004; 6 (1–2): 9–24.
7. Попов А.М., Лагойко С.Н., Румянцев Ю.В., Луговская С.А., Фечина Л.Г., Румянцев С.А. и др. Проблемы иммунофенотипирования в России: опыт работы референсного центра кооперированной клинической группы «Москва–Берлин». *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2015; 14 (1): 58–61.
8. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Зуева Е.Е., Ананьева О.В., Бабенко Е.В., Байдун Л.В. и др. Результаты внешнего контроля качества диагностики острого лимфобластного лейкоза методом проточной цитометрии. *Онкогематология* 2016; 11 (3): 68–75.
9. Румянцев А.Г., Карачунский А.И. Оптимизация терапии острого лимфобластного лейкоза у детей в России. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского* 2009; 88 (4): 19–27.
10. Паровичникова Е.Н., Алешина О.А., Троицкая В.В., Чабаева Ю.А., Соколов А.Н., Исинова Г.А. и др.

- Сравнение результатов лечения взрослых больных острыми Rh-негативными лимфобластными лейкозами по протоколам Российских многоцентровых исследований «ОЛЛ-2009» и «ОЛЛ-2016». Гематология и трансфузиология 2022; 67 (4): 460–77.
11. Новикова И.А., Вержбицкая Т.Ю., Мовчан Л.В., Цаур Г.А., Белевцев М.В., Попов А.М. Стандарт российско-белорусской кооперативной группы по иммунофенотипированию острого лимфобластного лейкоза у детей. Онкогематология 2018; 13 (1): 73–82.
  12. Bozzi F., Collini P., Aiello A., Barzano E., Gambirasio F., Podda M., et al. Flow cytometric phenotype of rhabdomyosarcoma bone marrow metastatic cells and its implication in differential diagnosis with neuroblastoma. Anticancer Res 2008; 28 (3A): 1565–9.
  13. Bozzi F., Gambirasio F., Luksch R., Collini P., Brando B., Fossati-Bellani F. Detecting CD56+/NB84+/CD45– immunophenotype in the bone marrow of patients with metastatic neuroblastoma using flow cytometry. Anticancer Res 2006; 26 (5A): 3281–7.
  14. Ferreira-Facio C.S., Milito C., Botafogo V., Fontana M., Thiago L.S., Oliveira E., et al. Contribution of multiparameter flow cytometry immunophenotyping to the diagnostic screening and classification of pediatric cancer. PLoS One 2013; 8 (3): e55534.
  15. Ferreira-Facio C.S., Botafogo V., Ferrao P.M., Canellas M.C., Milito C.B., Romano S., et al. Flow Cytometry Immunophenotyping for Diagnostic Orientation and Classification of Pediatric Cancer Based on the EuroFlow Solid Tumor Orientation Tube (STOT). Cancers (Basel) 2021; 13 (19).
  16. Popov A., Druy A., Shorikov E., Verzhbitskaya T., Solodovnikov A., Saveliy L., et al. Prognostic value of initial bone marrow disease detection by multiparameter flow cytometry in children with neuroblastoma. J Cancer Res Clin Oncol 2019; 145 (2): 535–42.
  17. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Фечина Л.Г., Шестопалов А.В., Плясунова С.А. Острые лейкозы: различия иммунофенотипа бластных клеток и их неопухолевых аналогов в костном мозге. Клиническая онкогематология 2016; 9 (3): 302–13.
  18. Зеркаленкова Е.А., Илларионова О.И., Казакова А.Н., Пономарева Н.И., Байдун Л.В., Осипова Е.Ю. и др. Смена линейной дифференцировки в рецидиве острого лейкоза с перестройкой гена *MLL* (*KMT2A*). Обзор литературы и описание случаев. Онкогематология 2016; 11 (2): 21–9.
  19. Semchenkova A., Mikhailova E., Komkov A., Gaskova M., Abasov R., Matveev E., et al. Lineage Conversion in Pediatric B-Cell Precursor Acute Leukemia under Blinatumomab Therapy. Int J Mol Sci 2022; 23 (7).
  20. Dorantes-Acosta E., Pelayo R. Lineage switching in acute leukemias: a consequence of stem cell plasticity? Bone Marrow Res 2012; 2012: 406796.
  21. Djokic M., Bjorklund E., Blennow E., Mazur J., Soderhall S., Porwit A. Overexpression of CD123 correlates with the hyperdiploid genotype in acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 2009; 94 (7): 1016–9.
  22. Zerkalnikova E., Mikhaylova E., Lebedeva S., Illarionova O., Baidun L., Kashpor S., et al. Quantification of NG2-positivity for the precise prediction of *KMT2A* gene rearrangements in childhood acute leukemia. Genes Chromosomes Cancer 2021; 60 (2): 88–99.
  23. Dworzak M.N., Buldini B., Gaipa G., Ratei R., Hrusak O., Luria D., et al. AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of Pediatric acute lymphoblastic leukemia. Cytometry B Clin Cytom 2018; 94 (1): 82–93.
  24. Bene M.C., Castoldi G., Knapp W., Ludwig W.D., Matutes E., Orfao A., 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.
  25. Matutes E., Pickl W.F., Van't Veer M., Morilla R., Swansbury J., Strobl H., et al. Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification. Blood 2011; 117 (11): 3163–71.
  26. Mejstrikova E., Volejnikova J., Fronkova E., Zdrahalova K., Kalina T., Sterba J., et al. Prognosis of children with mixed phenotype acute leukemia treated on the basis of consistent immunophenotypic criteria. Haematologica 2010; 95 (6): 928–35.
  27. Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A., Brunning R.D., Borowitz M.J., Porwit A., et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood 2009; 114 (5): 937–51.
  28. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M.J., Le Beau M.M., et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood 2016; 127 (20): 2391–405.
  29. Alexander T.B., Gu Z., Iacobucci I., Dickerson K., Choi J.K., Xu B., et al. The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia. Nature 2018; 562 (7727): 373–9.
  30. Demina I., Zerkalnikova E., Semchenkova A., Volchikov E., Boychenko E., Prudnikova M., et al. Rare case of pediatric trilineal mixed-phenotype acute leukemia with t(11;19)(q23.3;p13)/*KMT2A::ELL*. Leuk Res 2023; 125: 107018.
  31. Kotrova M., Musilova A., Stuchly J., Fiser K., Starkova J., Mejstrikova E., et al. Distinct bilineal leukemia immunophenotypes are not genetically determined. Blood 2016; 128 (18): 2263–6.
  32. Mikhailova E., Gluhanyuk E., Illarionova O., Zerkalnikova E., Kashpor S., Miakova N., et al. Immunophenotypic changes of leukemic blasts in children with relapsed/refractory B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, who have been treated with Blinatumomab. Haematologica 2021; 106 (7): 2009–12.
  33. Mikhailova E., Illarionova O., Shelihova L., Zerkalnikova E., Moloskova O., Olshanskaya Y., et al. Immunophenotypic changes in leukemic blasts in children with relapsed/

- refractory B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia after treatment with CD19-directed chimeric antigen receptor (CAR)-expressing T cells. *Haematologica* 2022; 107 (4): 970–4.
34. Mejstrikova E., Klinger M., Markovic A., Zugmaier G., Locatelli F. CD19 expression in pediatric patients with relapsed/refractory B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia pre- and post-treatment with blinatumomab. *Pediatr Blood Cancer* 2021; 68 (12): e29323.
  35. Libert D., Yuan C.M., Masih K.E., Galera P., Salem D., Shalabi H., et al. Serial evaluation of CD19 surface expression in pediatric B-cell malignancies following CD19-targeted therapy. *Leukemia* 2020; 34 (11): 3064–9. DOI: 10.1038/s41375-020-0760-x
  36. Mikhailova E., Itov A., Zerkalenskaya E., Roumiantseva J., Olshanskaya Y., Karachunskiy A., et al. B-lineage antigens that are useful to substitute CD19 for minimal residual disease monitoring in B cell precursor acute lymphoblastic leukemia after CD19 targeting. *Cytometry B Clin Cytom* 2022; 102 (5): 353–9. DOI: 10.1002/cyto.b.22088
  37. Khoury J.D., Solary E., Abala O., Akkari Y., Alaggio R., Apperley J.F., et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022; 36 (7): 1703–19.
  38. Bene M.C., Bernier M., Casasnovas R.O., Castoldi G., Knapp W., Lanza F., et al. The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. The European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL). *Blood* 1998; 92 (2): 596–9.
  39. Attarbaschi A., Mann G., Konig M., Steiner M., Strehl S., Schreiberhuber A., et al. Mixed lineage leukemia-rearranged childhood pro-B and CD10-negative pre-B acute lymphoblastic leukemia constitute a distinct clinical entity. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (10): 2988–94.
  40. Demina I., Zerkalenskaya E., Illarionova O., Olshanskaya Y., Verzhbitskaya T., Semchenkova A., et al. Heterogeneity of childhood acute leukemia with mature B-cell immunophenotype. *J Cancer Res Clin Oncol* 2019; 145 (11): 2803–11.
  41. Demina I., Zerkalenskaya E., Zhogov V., Lagoyko S., Semchenkova A., Dubrovina M., et al. The use of additional immunophenotypic criteria for the differential diagnosis of Burkitt lymphoma/leukemia: An exemplary case report. *Leuk Res* 2021; 110: 106662.
  42. Demina I., Voropayev A., Semchenkova A., Zerkalenskaya E., Olshanskaya Y., Samochatova E., et al. Additional flow cytometric studies for differential diagnosis between Burkitt lymphoma/leukemia and B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2021; 100: 106491.
  43. Coustan-Smith E., Mullighan C.G., Onciu M., Behm F.G., Raimondi S.C., Pei D., et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* 2009; 10 (2): 147–56.
  44. Weerkamp F., Baert M.R., Brugman M.H., Dik W.A., de Haas E.F., Visser T.P., et al. Human thymus contains multipotent progenitors with T/B lymphoid, myeloid, and erythroid lineage potential. *Blood* 2006; 107 (8): 3131–7.
  45. Permikin Z., Popov A., Verzhbitskaya T., Riger T., Plekhanova O., Makarova O., et al. Lineage switch to acute myeloid leukemia during induction chemotherapy for early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with the translocation t(6;11)(q27;q23)/KMT2A-AFDN: A case report. *Leuk Res* 2022; 112: 106758.
  46. Шарлай А.С., Илларионова О.И., Федюкова Ю.Г., Вержбицкая Т.Ю., Фечина Л.Г., Бойченко Э.Г. и др. Иммунофенотипическая характеристика острого лимфобластного лейкоза из ранних Т-клеточных предшественников. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2019; 18 (2): 66–74.
  47. Попов А.М., Мовчан Л.В., Вержбицкая Т.Ю., Гривцова Л.Ю., Луговская С.А. Рекомендованный формат заключения по результатам диагностического иммунофенотипирования костного мозга при острых лейкозах. *Лабораторная служба* 2020; 9 (1): 90–5.
  48. Borowitz M.J., Pullen D.J., Winick N., Martin P.L., Bowman W.P., Camitta B. 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; 68 (1): 18–24.
  49. Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A., Gralnick H.R., et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976; 33 (4): 451–8.
  50. Weinberg O.K., Arber D.A. Erythroleukemia: an Update. *Curr Oncol Rep* 2021; 23 (6): 69.
  51. Boztug H., Schumich A., Potschger U., Muhlegger N., Koleno A., Reinhardt K., et al. Blast cell deficiency of CD11a as a marker of acute megakaryoblastic leukemia and transient myeloproliferative disease in children with and without Down syndrome. *Cytometry B Clin Cytom* 2013; 84 (6): 370–8.
  52. Илларионова О.И., Горчакова М.В., Русанова Е.Б., Прохорова Ю.А., Салогуб Г.Н., Осипова Е.Ю. и др. Конспект клинической цитометрии: острый мегакариобластный лейкоз. *Клиническая лабораторная диагностика* 2015; 60 (7): 42–9.
  53. Алексенко М.Ю., Илларионова О.И., Вержбицкая Т.Ю., Зеркаленкова Е.А., Новикова И.А., Панферова А.В. и др. Иммунофенотипическая характеристика острого мегакариобластного лейкоза у детей. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2019; 18 (3): 35–40.
  54. Brouwer N., Matarraz S., Nierkens S., Hofmans M., Novakova M., da Costa E.S., et al. Immunophenotypic Analysis of Acute Megakaryoblastic Leukemia: A EuroFlow Study. *Cancers (Basel)* 2022; 14 (6).
  55. Zangrando A., Cavagnero F., Scarparo P., Varotto E., Francescato S., Tregnago C., et al. CD56, HLA-DR, and CD45 recognize a subtype of childhood AML harboring CBFA2T3-GLIS2 fusion transcript. *Cytometry A* 2021; 99 (8): 844–50.

# Правила оформления статей

**1. Статья должна быть представлена в электронном виде (в отдельных файлах: текст статьи со списком литературы, таблицы, графики, рисунки, подписи к рисункам, резюме).**

Все страницы пронумерованы.

Шрифт – Times New Roman, 14 пунктов, 1,5 интервала.

**2. На 1-й странице: название статьи, инициалы и фамилии всех авторов, полное название учреждений, в которых выполнена работа, их полный адрес с индексом.**

В конце статьи: контактные телефоны, рабочий адрес с указанием индекса, факс, адрес электронной почты и фамилия, имя, отчество, занимаемая должность, ученая степень, ученое звание авторов.

**3. Объем статей: оригинальная – не более 12 стр.; описание наблюдений, заметки из практики – не более 5 стр.; обзор литературы – до 20 стр.**

К статье должно быть приложено резюме на русском и английском языках: название статьи, фамилии и инициалами авторов, название учреждений, содержание работы; для оригинальных статей – структурированное резюме (введение, материалы и методы, результаты и т.д.). Объем резюме – до 1500 знаков с пробелами; количество ключевых слов – до 10.

## 4. Иллюстративный материал:

- фотографии должны быть контрастными; рисунки, графики и диаграммы – четкими;

- фотографии представляются в оригинале или электронном виде в формате TIFF, JPG, CMYK с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм);

- графики, схемы и рисунки – в формате EPS. Adobe Illustrator 7.0-10.0.

- Все рисунки должны быть пронумерованы и снабжены подписными подписями на отдельном листе, фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита. Все сокращения и обозначения, использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подписной подписи;

- все таблицы пронумерованы, иметь название; все сокращения расшифрованы в примечании к таблице;

- ссылки на таблицы, рисунки и др. иллюстративные материалы приводятся по тексту статьи в круглых скобках.

## 5. Единицы измерений даются в СИ.

Аббревиатуры в тексте полностью расшифрованы при первом употреблении. Использование необ-

щепринятых сокращений не допускается. Название генов пишется курсивом, название белков – обычным шрифтом.

## 6. Список цитируемой литературы:

- список ссылок в порядке цитирования; все источники пронумерованы, их нумерация должна строго соответствовать нумерации в тексте статьи;

- для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 6, указывают первые 6, далее «и др.» в русском или «et al.» – в английском тексте);

- при ссылке на статьи из журналов указывают название статьи; журнала, год, том, номер выпуска, страницы;

- при ссылке на монографии указывают полное название книги, место издания, название издательства, год издания;

- при ссылке на авторефераты диссертаций – полное название работы, докторская или кандидатская, год и место издания;

- при ссылке на данные, полученные из Интернета, указывают электронный адрес цитируемого источника;

- все ссылки на литературные источники печатают арабскими цифрами в квадратных скобках: например [5];

- количество цитируемых работ: в оригинальных статьях желательно не более 20-25 источников, в обзорах литературы – не более 60.

**7. Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.**

**8. Все статьи, в том числе подготовленные аспирантами и соискателями ученой степени кандидата наук по результатам собственных исследований, принимаются к печати бесплатно, в порядке общей очереди.**

Статьи, не соответствующие данным требованиям, к рассмотрению не принимаются.

Все поступающие статьи рецензируются.

Присланные материалы обратно не возвращаются.

Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.

Электронная почта: [journal@fnkc.ru](mailto:journal@fnkc.ru)