

Е.В. Вильчевская, к.м.н., В.В. Кошаченкова, Н.В. Лобкина, О.В. Мельник, ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН Украины», г. Донецк

Гетерогенность экспрессии антигенов, применяемых для мониторинга минимальной резидуальной болезни при В-лимфобластном лейкозе

Введение

Наиболее распространенным вариантом острого лейкоза детского возраста является В-лимфобластный (В-ОЛЛ). Этот вариант считается благоприятным по своему течению и ответу на терапию, однако иногда болезнь рецидивирует. Причиной рецидива являются остаточные опухолевые клетки, которые сохраняются в костном мозге после лечения. Клон таких клеток – минимальная резидуальная болезнь (МРБ). В большинстве протоколов терапии введен мониторинг МРБ как во время индукционного лечения, так и после него, в период консолидации/интенсификации и поддерживающей терапии [6, 7, 8, 10, 17, 18] как независимый критерий оценки ответа на лечение и полноты ремиссии. Определение МРБ заключается в выявлении остаточных лейкоэмических кластов среди избытка нормальных клеток-предшественников (гематононов) в костном мозге пациентов на фоне проводимой терапии. При этом обе популяции морфологически очень схожи, и потенциально гематононы ошибочно могут быть учтены как резидуальные бласты, так как размер предшественников составляет от 10 до 20 μm с частой тенденцией к уменьшению размера [13]. Однако неопластические лимфоциты отличаются от нормальных гематононов особенностями антигенной экспрессии [19]. Совокупность таких фенотипических признаков называют лейкоз-ассоцированным иммунофенотипом (ЛАИФ) [14]. Метод проточной цитометрии позволяет зафиксировать ЛАИФ и выделить злокачественную популяцию на основании данных о параметрах светорассеяния мембранных антигенов на клетках различной степени зрелости [2, 10]. Для мониторинга МРБ при В-ОЛЛ применяют различные комбинации моноклональных антител, что зависит от технических возможностей проточного цитометра и применяемого протокола. При этом единого мирового стандарта до сих пор не существует [10, 19, 20]. Учитывая, что у большинства бластов при В-ОЛЛ определяют CD19⁺/CD10⁺/CD34⁺ фенотип, комбинация антител CD19, CD10, CD34 присутствует во всех цитометрических протоколах [20]. Различные исследовательские группы также

дополнительно оценивают целый ряд молекул с лейкоз-ассоцированным иммунофенотипом (табл. 1).

Следует отметить, что в популяции опухолевых клеток при В-ОЛЛ не все клетки с ЛАИФ экспрессируются гомогенно. Анализ одновременно нескольких параметров позволяет выявлять некоторые несистематизированные комбинации маркеров, неклассические фенотипы (bright/dim), функциональная значимость которых не установлена.

В данной работе проанализирована экспрессия некоторых антигенов, применяемых для мониторинга МРБ: CD34, CD20, CD10, CD58 на В-лимфоидных бластных клетках пациентов с установленным диагнозом В-ОЛЛ. Все эти антигены имеют выраженные различия по интенсивности флуоресценции на клетках различной степени зрелости, что делает возможным их применение для мониторинга МРБ.

Материалы и методы

Объект исследования – костный мозг 68 пациентов с CD10-позитивным вариантом В-ОЛЛ (38 мальчиков и 30 девочек) в возрасте от 1 месяца до 16 лет (средний возраст – 5,7 года), проходивших лечение в Детском онкогематологическом центре с октября 2009 по ноябрь 2013 г. У 54 больных на момент первичной диагностики определен пре-В (ВII) иммуноподвариант острого лимфобластного лейкоза и у 14 детей был диагностирован common-B (ВIII) иммуноподвариант ОЛЛ. Морфологически бласты расценены в большинстве случаев как L1 и L2. Диагноз common- и пре-В-ОЛЛ был установлен в соответствии с ВОЗ-классификацией (EGIL-95) и на основании оценки иммунофенотипа опухолевых клеток методом проточной цитометрии. В качестве материала контрольной группы использовались образцы костного мозга пациентов без онкогематологических заболеваний (n=20). Иммунофенотипирование проводили на проточном цитометре FACSCalibur. Анализ данных осуществлялся с помощью программного обеспечения FACSComp с помощью программы CellQUEST.

Для сравнения уровней экспрессии использовали значения средней интенсивности флуоресценции (Mean Fluorescence Intensity, MFI или СИФ). Гетерогенность распределения клеток по экспрессии исследованных маркеров оценивали качественно и количественно (при помощи коэффициента вариации CV). Также в опухолевой популяции определяли процентное содержание клеток позитивных по конкретному антигену.

Результаты и обсуждение

Современная схема кроветворения человека представляет собой формализованное отображение всего того уровня знаний, который достигнут на момент ее создания (J.E. Till, E.A. Culloch, 1961; A.I. Воробьев, И.Л. Чертков, 1973, 1981). Согласно данной теории в зависимости от стадии развития клетки любой линии дифференцировки экспрессируют стадийно-специфические антигены [4]. В частности, на основании анализа экспрессии CD45, CD34 и CD20 возможно классифицировать различные по степени зрелости популяции В-лимфоцитов, что позволяет при мониторинге МРБ разделять популяции бластных клеток, гематононов, а также зрелых В-лимфоцитов и анализировать экспрессию их антигенов [22, 23]. При этом опухолевые клетки могут иметь свой уникальный иммунофенотип и/или в отличие от нормальных аналогов aberrantly экспрессировать линейно- и стадийно-специфические антигены. Для составления диагностической панели МРБ выбирают антигены (маркеры) с наиболее выраженными отличиями в экспрессии от нормально развивающихся В-предшественников и зрелых В-лимфоцитов. Такие маркеры должны присутствовать на всех злокачественных клетках или на большинстве из них и отличаться стабильностью и индивидуальностью или уникальностью.

В нашей работе проанализирована экспрессия антигенов CD10, CD34, CD58, CD20 на В-лимфоидных бластных клетках пациентов с установленным диагнозом В-ОЛЛ. Все эти антигены имеют выраженные различия по интенсивности флуоресценции на клетках различной степени зрелости, что делает возможным их применение для мониторинга МРБ (табл. 2).

Из таблицы видно, что на бластных клетках В-ОЛЛ зарегистрированы более высокие значения интенсивности флуоресценции антигена CD10 (630 ± 5) по сравнению с нормальными гематононами (209 ± 1) ($p < 0,05$). Экспрессия CD10 В-ОЛЛ и зрелыми В-лимфоцитами находилась на уровне аутофлуоресценции. Для антигена CD34 были получены результаты, свидетельствующие, что параметры интенсивности флуоресценции на бластных клетках (53 ± 3 у.е.) достоверно



Е.В. Вильчевская

($p < 0,05$) ниже, чем на нормальных предшественниках (216 ± 5 у.е.). Как и для антигена CD10, экспрессия CD34 зрелыми В-лимфоцитами находилась на уровне аутофлуоресценции. Экспрессия CD58 опухолевыми клетками была достоверно выше, чем В-лимфоцитами ($p < 0,005$) и нормальными В-гематононами ($p < 0,005$). Для антигена CD20 разница в интенсивности флуоресценции на В-предшественниках и зрелых В-лимфоцитах была статистически незначительной, при этом резидуальные бласты имели достоверно ($p < 0,05$) более низкие значения СИФ (36 ± 2 у.е.).

Проточная цитометрия является методом, позволяющим анализировать одновременно несколько параметров на одной клетке. Множественное мечение позволяет получить более точную информацию о каждой клетке. Это достоверный способ исследования гетерогенности клеток.

Для оценки гетерогенности экспрессии антигенов CD10, CD34, CD58, CD20 на клетках одной популяции была использована схема (рис. 1), отражающая различные варианты коэкспрессии в пространстве двумерной гистограммы, где по оси абсцисс (log) отображена экспрессия исследованного антигена 1 (Ag МРБ), а по оси ординат (log) отображена экспрессия антигена, с которым проведено двойное окрашивание в ходе изучения опухолевых клеток 2 (Ag 2).

Повышение контроля качества окрашивания клеток и анализ интенсивности

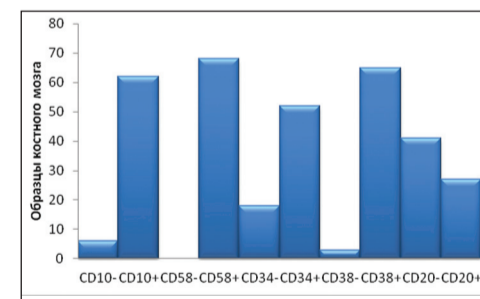


Рис. 2. Гетерогенность экспрессии антигенов на бластных клетках пациентов с В-ОЛЛ

Протокол	Панель МРБ
Госпиталь S. Jude (E. Coustan-Smith et al., 2006)	CD19/CD10 и/или CD19/CD34
AIEOP- BFM- ALL 2008 (J. Basso et al.)	1. CD58/CD10/CD19/CD34 2. CD20/CD10/CD19/CD34 3. CD10/CD34/CD19/CD45 4. CD10/CD11a/CD19/CD45
COG (M. Borowitz et al.)	4-цв. 1. CD20/CD10/CD45/CD19 2. CD34/CD9/CD45/CD19 6-цв. 1. CD20/CD10/CD38/CD58/CD19/CD45 2. CD9/CD13+CD33/CD34/CD10/CD19/CD45

Антиген	Средняя интенсивность флуоресценции (в у.е.)		
	Бластные клетки	Гематононы	Зрелые В-лимфоциты
CD10	630	209	0
CD34	53	216	0
CD58	142	98	0
CD20	36	286	574

Примечание: для всех сравнений $p < 0,05$.

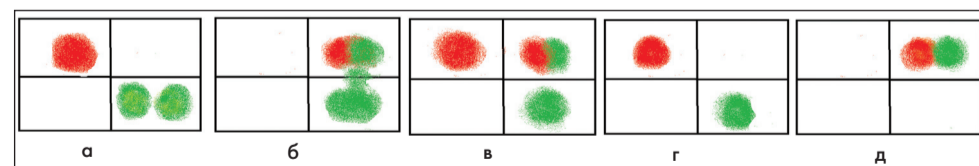


Рис. 1. Гетерогенность экспрессии поверхностных антигенов на мембране бластных клеток

а. Гистограмма демонстрирует однородную экспрессию Ag2 и неоднородную коэкспрессию Ag МРБ клетками той же популяции;
б. На гистограмме показан вариант однородной экспрессии Ag2, при котором неоднородным образом коэкспрессируется Ag МРБ;
в. На гистограмме есть популяция Ag МРБ⁺/Ag2⁺, но при этом оба антигена демонстрируют гетерогенность экспрессии и есть популяция, позитивные только по одному антигену или Ag МРБ⁺ или Ag2⁺;
г. Гистограмма показывает гомогенность экспрессии антигенов Ag МРБ⁺ Ag2⁺;
д. Гистограмма показывает гомогенность экспрессии антигенов Ag МРБ⁺ и Ag2⁺ с наличием коэкспрессии Ag МРБ⁺/Ag2⁺

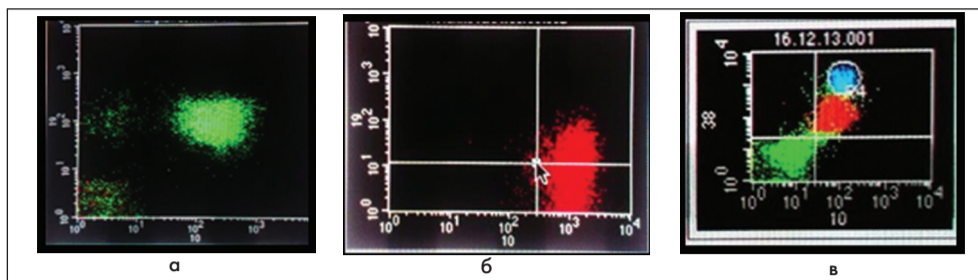


Рис. 3. Неоднородность распределения CD10-положительных клеток в опухолевой популяции на бластных клетках В-ОЛЛ

- а. Гомогенная коэкспрессия антигенов CD19⁺/CD10⁺
- б. Гомогенная экспрессия антигена CD19, коэкспрессия CD19⁺/CD10⁺, гетерогенность экспрессии антигена CD10
- в. Гетерогенная коэкспрессия антигенов CD38⁺/CD10⁺

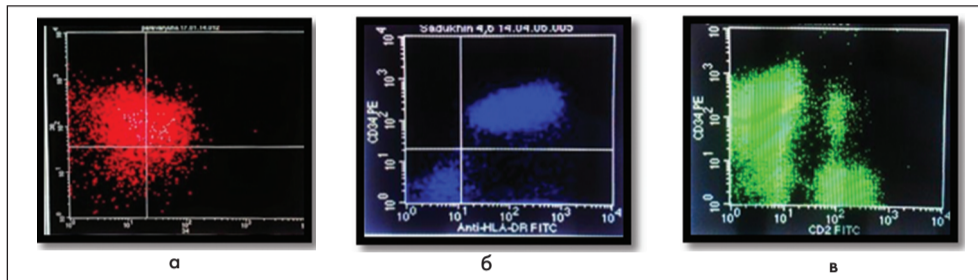


Рис. 4. Неоднородность распределения CD34-положительных клеток в опухолевой популяции на бластных клетках В-ОЛЛ

- а. Гомогенная экспрессия антигена CD34, коэкспрессия CD34⁺/CD38⁺, гетерогенность экспрессии антигена CD38
- б. Гомогенная коэкспрессия антигенов CD34⁺/HLA-DR
- в. Гетерогенная экспрессия антигенов CD34 и CD2

флюоресценции показали разнообразие распределения клеток в опухолевой популяции с положительной экспрессией CD10, CD34, CD58, CD20.

Позитивная экспрессия антигенов CD10 и CD34 отражает определенную степень незрелости В-лимфоцитов. Данные белковые молекулы никогда не экспрессируются в норме на зрелых В-лимфоцитах. Именно этот факт дает основание рассматривать эти маркеры как возможно-применимые для мониторинга МРБ. Их экспрессия, наряду с анализом других стадийно/линейно специфических антигенов (TdT, IgM, CD20), позволяет соотнести иммунофенотип В-лимфоцита с иммуноподвариантом. Однако даже внутри «характерных» для экспрессии CD10 и CD34 иммуноподвариантов наблюдали гетерогенность их экспрессии. Было выявлено, что зачастую маркеры гомогенно экспрессировались далеко не всеми В-лимфоцитами: в 9% (6 из 68 образцов КМ) составляли CD10-негативные В-ОЛЛ, в 26% случаев (n=18) отсутствовала экспрессия CD34 (рис. 2).

При этом в подгруппе CD10⁺ позитивных бластов в 50 случаях из 62 CD10⁺ (80%) экспрессия антигена была гомогенной (только CD10⁺), а в 12 образцах (20%) присутствовали как CD10-позитивные, так и CD10-негативные клетки (рис. 16, в). Двойное окрашивание с антигеном CD38 и CD19 позволило выявить гетерогенность распределения CD10-позитивных клеток в популяции CD38-позитивных В-лимфоцитов (CD19⁺) (рис. 3).

Во всех образцах костного мозга (КМ) с CD34-позитивными бластами (n=50 или 74%) в общем пуле бластных клеток определялись как CD34-позитивные, так и CD34-негативные клетки (CD34⁻, рис. 16, в). В 48 случаях все опухолевые клетки одновременно экспрессировали CD10 и CD34 (рис. 1д). В 2 образцах костного мозга (3%) определялись бласты, не экспрессировавшие ни CD10, ни CD34.

При проведении множественного окрашивания с антигеном CD38, HLA-DR, CD2 была выявлена значительная гетерогенность экспрессии антигенов как CD10, так и CD34 в популяции бластных клеток. Наблюдалось два разных фенотипа: с высоким уровнем экспрессии одного маркера (CD34, либо CD38) и низкий уровень второго, т.е. В-клетки CD34⁺/CD38^{dim} или CD34^{dim}/CD38⁺. При окрашивании с HLA-DR распределение CD34⁺ клеток всегда (в 100% случаев) было гомогенным. В то время как с моноклональными антителами (МКА) других

линий (Т-лимфо), выявляли популяции с тремя различными фенотипами: CD34^{bright}/T^{dim}, CD34/T^{bright}, CD34^{dim}/CD38^{dim} (рис. 4).

У 63 пациентов определяли экспрессию CD58 – МкАТ к молекулам, специфически экспрессируемым опухолевыми клетками в течение всего заболевания и позволяющим более точно определять уровень МРБ. CD58 – антиген, экспрессирующийся на незрелых клетках В-ОЛЛ и отсутствующий на гематоцитах [15]. M. Veltroni et al. показали, эти различия сохраняются в течение всего заболевания [16]. В нашем исследовании все пациенты (100%) демонстрировали позитивную экспрессию данного антигена (от 28 до 83%). Однако экспрессия данного антигена не была гомогенной. При проведении двойного мечения с антигеном CD9 были выявлены субпопуляции с различными фенотипами: часть В-лимфоцитов экспрессирует как CD9, так и CD58 (одно-одно в 35% случаев, рис. 5а). В 60% случаев двойная экспрессия на графике выглядит не так, как гомогенная коэкспрессия или двойственная позитивность: наблюдалась неоднородность распределения CD58⁺ бластов: выявлялись популяции CD9^{dim}/CD58^{bright} (рис. 5б), а также популяции с высоким уровнем обоих антигенов и неоднородностью их распределения (рис. 5в, г).

Были обнаружены не только количественные различия в экспрессии этих «лейкоз-ассоциированных» антигенов на бластных клетках, но и выраженный разброс показателей величины интенсивности флюоресценции данного маркера на мембране (от 32 до 726 у.е.), что отражает плотность распределения его на мембране лимфоцита.

Еще одним исследованным нами стадийно/линейно-специфическим антигеном был антиген CD20. В норме CD20 экспрессируется только на зрелых В-лимфоцитах и никогда на созревающих. Однако при острых лейкозах встречается аномальная экспрессия этого антигена опухолевыми бластами. Так, клетки с четкими признаками незрелости: TdT⁺, CD34⁺, CD10⁺ имели гиперэкспрессию CD20. Появление на бластных клетках нехарактерных для данной стадии развития антигенов является признаком опухолевой трансформации клеток и также может быть применимо для мониторинга МРБ. Экспрессию CD20 определяли во всех 68 образцах. В 41 случае (60%) опухолевые клетки были CD20-негативными, а 27 образцов имели позитивную экспрессию CD20 (40%).

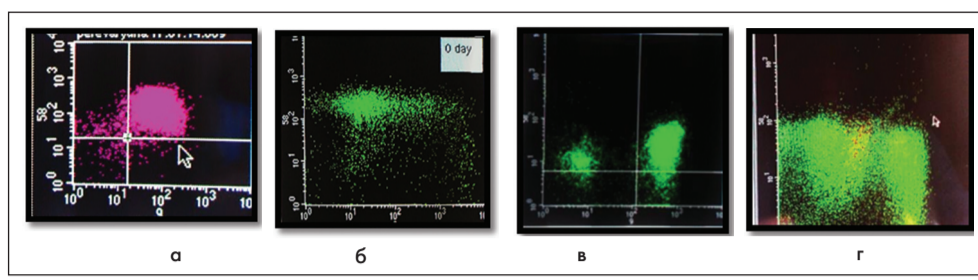


Рис. 5. Неоднородность распределения CD58-положительных клеток в опухолевой популяции на бластных клетках В-ОЛЛ

- а. Гомогенная коэкспрессия антигенов CD58⁺/CD9⁺
- б. Коэкспрессия CD9^{dim}/CD58⁺, гетерогенность экспрессии антигена CD58
- в, г. Гетерогенная экспрессия антигенов CD58 и CD9

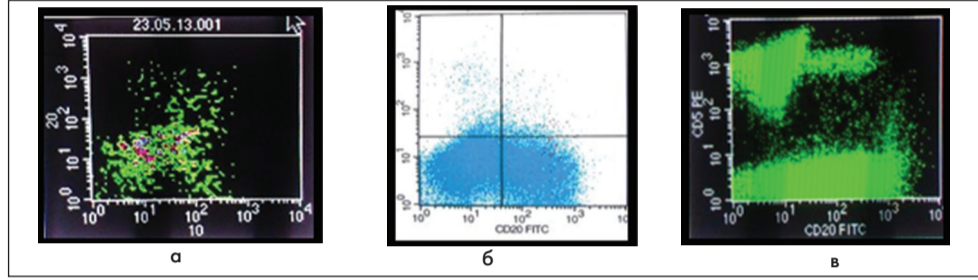


Рис. 6. Неоднородность распределения CD20-положительных клеток в опухолевой популяции на бластных клетках В-ОЛЛ

- а. Гетерогенная экспрессия антигенов CD20 и CD10
- б. Гомогенная коэкспрессия антигенов CD20
- в. Гетерогенная экспрессия антигенов CD20 и CD5

Из позитивных вариантов в 9 случаях (12%) клетки были гомогенно CD20-позитивными, в то время как в костном мозге в 19 случаях (28%) определялись как CD20-позитивные, так и CD20-негативные клетки. В 74% случаев была определена асинхронная экспрессия антигенов CD34⁺/CD20⁺ (n=20) и в большинстве CD20-позитивных образцов (25 из 27, что составило 89%) клетки коэкспрессировали CD10⁺/CD20⁺. Была выявлена неоднородность распределения CD20⁺ клеток в общем пуле В-лимфоцитов при множественном окрашивании (рис. 6).

Для всех исследованных маркеров не было отмечено статистически значимых корреляционных связей экспрессии антигенов с полом и возрастом пациентов, количеством бластов в костном мозге, коэкспрессией миелоидных или Т-лимфоидных маркеров.

Анализ экспрессии антигенов CD10, CD34, CD58, CD20 опухолевыми клетками показал, что в большинстве образцов при наличии гомогенной коэкспрессии со стандартными якорными диагностическими маркерами (CD10⁺/CD19⁺, CD34⁺/HLA-DR⁺) хотя бы один из антигенов CD10, CD34, CD58 или CD20 неравномерно распределялся в популяции В-лимфоцитов. Любые изменения параметров экспрессии мембранных антигенов отражают процессы, происходящие внутри клетки. Таким образом, можно предположить, что популяция В-лимфоидных опухолевых клеток в начале заболевания неоднородна, существуют субпопуляции с различными физическими и функциональными характеристиками, с различной степенью восприимчивости и резистентности к проводимой терапии. Это следует учитывать при проведении мониторинга МРБ: применять многоцветные комбинации антител, контролировать популяции с нестандартным фенотипом.

Литература

1. Basso G., Veltroni M., Valsecchi M.G., Dworzak M.N., Ratei R., Silvestri D. et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow // J Clin Oncol 2009 Nov 1; 27(31): 5168-74.
2. Dworzak M.N., Froschi G., Printz D., Mann G., Potschger U., Muhlegger N. et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia // Blood 2002 Mar 15; 99(6): 1952-8.
3. Patricia Stow, Laura Key, Xiaohua Chen, Qiulu Pan, Geoffrey A. Neale, Elaine Coustan-Smith, Charles G. Mullighan, Yinmei Zhou, Ching-Hon Pui, and Dario Campana. Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia // Blood 2010, 115: 4657-4663.
4. Руководство по гематологии. В 3-х т. Т. 1 / Под ред. А.И. Воробьева М.: Ньодиамед, 2002. – 280 с.
5. Bjorklund E. Flow cytometric follow up of minimal residual disease in bone marrow gives prognostic information in children

- with acute lymphoblastic leukemia / E. Bjorklund, J. Mazur, S. Soderhall, A. Porwit-MacDonald // Leukemia – 2003. – Vol. 17. – P. 138-148.
6. Савва Н.Н. Прогностическое значение минимальной остаточной болезни для безрецидивной выживаемости детей с острым лимфобластным лейкозом на протоколе ОЛЛ-МБ-2002 (однофакторный и многофакторный анализ) / Н.Н. Савва, О.В. Краско, М.В. Беленцев и др. // Онкогематология. – 2009. – № 2. – С. 17-21.
7. Borowitz M.J. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study / M.J. Borowitz, M. Devidas, S.P. Hunger et al. // Blood. – 2008. – Vol. 111, № 12. – P. 5477-5485.
8. Vidrales M.B. Minimal residual disease in adolescent (older than 14 years) and adult acute lymphoblastic leukaemias: early immunophenotypic evaluation has high clinical value / M.B. Vidrales, J.J. Perez, M.C. Lopez-Berges et al. // Blood. – 2003. – Vol. 101, № 12. – P. 4695-4700.
9. Borowitz M.J. Minimal residual disease detection in childhood ALL / M.J. Borowitz // Haematopoiesis Immunology. – 2010. – Vol. 7, № 1. – P. 24-35.
10. Bruggemann M. Standardized MRD quantification in European ALL trials: Proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008 / M. Bruggemann, A. Schrauder, T. Raff et al. // Leukemia. – 2010. – Vol. 24. – P. 521-535.
11. Krampera M. Methodological approach to minimal residual disease detection by flow cytometry in adult B-lineage acute lymphoblastic leukemia / M. Krampera, O. Perbellini, C. Vincenzi et al. // Haematologica. – 2006. – Vol. 91, № 8. – P. 1109-1112.
12. Coustan-Smith E., Sancho J., Hancock M.L., Razzouk B.I., Ribeiro R.C., Rivera G.K. et al. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia // Blood 2002 Oct 1; 100(7): 2399-402.
13. Caldwell C.W., Poje E., Helikson M.A. B-cell precursors in normal pediatric bone marrow // Am J Clin Pathol. 1991; 95: 816-823.
14. McKenna R.W., Asplund S.L., Kroft S.H. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) and neoplastic lymphoblasts by 4-color flow cytometry // Leuk Lymphoma. 2004; 45: 277-285.
15. Melissa Cervania, Matthew J Miller, Serhan Alkan, Raju Pillai. Effective separation of hematogones from precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia (Pre B-ALL) by 5 color single tube assessment. http://www.cytometry.org/public/core_routines/view_abstract
16. Veltroni M. Expression of CD58 in normal, regenerating and leukemic bone marrow B cells: implications for the detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia / M. Veltroni, L. De Zen, M.C. Sanzari et al. // Haematologica. – 2003. – Vol. 88, № 11. – P. 1245-1252.
17. Campana D. Progress of minimal residual disease studies in childhood acute leukemia / D. Campana // Curr. Hematol. Malig. Rep. – 2010. – Vol. 5, № 3. – P. 169-176.
18. Coustan-Smith E. Clinical importance of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia / E. Coustan-Smith, J. Sancho, M.L. Hancock et al. // Blood. – 2000. – Vol. 96, № 8. – P. 2691-2696.
19. Dworzak M.N. Modulation of antigen expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction therapy is partially transient: evidence for a drug-induced regulatory phenomenon. Results of the AIEOP-BFM-ALL-FLOW-MRD-Study group / M.N. Dworzak, G. Gaipa, A. Schumich et al. // Cytometry B Clin. Cytom. – 2010. – Vol. 78B. – P. 147-153.
20. Гривнова Л.Ю., Попа А.В., Серебрякова И.Н., Тушныш Н.Н. / К дальнейшей стандартизации определения остаточных бластных клеток в костном мозге детей В-линейными острыми лимфобластными лейкозами на 15-й день индукционной терапии // Иммунология гематопоза 1/2011 том 9, С.35-55.
21. Вильчевская Е.В., Тютюнник В.В., Рябло А.А., Коломенская С.А. Иммунофенотипические особенности острых лейкозов у детей Донецкой области // Современная педиатрия, 2009, № 1(23). – С. 151-156.
22. Вильчевская Е.В., Тютюнник В.В., Рябло О.О. Спосіб виділення бластної популяції на підставі показників інтенсивності флюоресценції загальнолейкоцитарного маркера CD45/ Патент на корисну модель № 34441, зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на винаходи 11.08.2008 р.
23. Вильчевская Е.В., Тютюнник В.В., Рябло А.А., Коломенская С.А., Московец И.Е., Марченко Е.Н. Использование параметров светорассеяния CD45 при диагностике острых лейкозов у детей / Міжнародний вісник медицини. Том 1, № 1-2, 2008 р.