

Исследование морфологии и распределения α -нафтилбутиратэстеразы и нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы в нормальных предшественниках лейкоцитов миелоидного ростка с помощью клеточного биочипа

О.С. Федянина^{1,2}, А.О. Закирова^{1,2}, А.Е. Задорожная³, Н.М. Капранов^{2,4}, А.Н. Хвастунова^{1,2},
П.А. Ядгарова³, А.В. Филатов⁵, О.С. Бурова⁶, Ф.И. Атауллаханов¹⁻³, С.А. Кузнецова^{1,2}

¹ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1;

²ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук»; Россия, 119991 Москва, Ленинский проспект, 38А, корп. 1;

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1;

⁴ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4а;

⁵ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» ФМБА России»; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

⁶ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 23

Контакты: Софья Алексеевна Кузнецова kuznetsova.sonya@gmail.com

В данной работе описано и количественно охарактеризовано распределение моноклеаров, выделенных из аспирата костного мозга здоровых доноров и рассортированных по их поверхностным CD-антигенам на клеточном биочипе, по морфологии (для 11 доноров), а также по наличию или отсутствию в клетках активности α -нафтилбутиратэстеразы и нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы (для 9 доноров). Эти данные могут быть использованы в качестве референсных значений при диагностике острых миелоидных лейкозов с помощью клеточного биочипа.

Ключевые слова: клеточный биочип, нормальный костный мозг, миелоидные предшественники, α -нафтилбутиратэстераза, нафтол-AS-D-хлорацетатэстераза

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-4-74-79

Morphology and distribution of α -naphthyl butyrate esterase and naphthol AS-D chloroacetate esterase in normal myelomonocytic precursors studied by the cell microarray

O.S. Fedyanina^{1,2}, A.O. Zakirova^{1,2}, A.E. Zadorozhnaya³, N.M. Kapranov^{2,4}, A.N. Khvastunova^{1,2}, P.A. Yadgarova³,
A.V. Filatov⁵, O.S. Burova⁶, F.I. Ataulakhonov¹⁻³, S.A. Kuznetsova^{1,2}

¹Federal Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology named after Dmitriy Rogachev;
1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia;

²Center of Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences;
Build. 1, 38A Leninskiy Prospekt, Moscow 119991, Russia;

³M.V. Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia;

⁴Hematological Research Center, Ministry of Health of Russia; 4a Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia;

⁵National Research Center "Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency of Russia";
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

⁶N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 23 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Here we describe and qualitatively characterize the distribution of mononuclear cells isolated from bone marrow aspirate of healthy donors and sorted by their surface CD antigens on a cell microarray by morphology (for 11 donors) and by absence or presence of α -naphthyl butyrate esterase and naphthol AS-D chloroacetate esterase (for 9 donors). These data can be used as a reference for the diagnosis of acute myeloid leukemia using the cell microarray.

Key words: cell microarray, normal bone marrow, myeloid lineages, α -naphthyl butyrate esterase, naphthol AS-D chloroacetate esterase

Введение

Диагностика острых лейкозов основывается на обнаружении в костном мозге (КМ) патологических незрелых (бластных) клеток и определении их линей-

ной принадлежности. Анализ бластной популяции в пунктате КМ проводится параллельно с помощью оценки морфологии в мазках и иммунофенотипирования, т. е. определения на поверхности бластных

клеток маркеров дифференцировки (CD-антигенов) методом проточной цитометрии. При диагностике острых миелобластных лейкозов (ОМЛ) проводится также исследование цитохимической активности в лейкоцитах КМ в мазке, причем для уточнения варианта ОМЛ используются данные о цитохимической активности как опухолевых клеток, так и нормальных лейкоцитов гранулоцитарного и моноцитарного ростков КМ. Одним из перспективных цитохимических методов, применяемых при дифференциальной диагностике ОМЛ, является исследование активности лейкоцитарных эстераз. С. Y. Li и соавт. [1] при разделении экстрактов нормальных и патологических лейкоцитов человека в полиакриламидном геле идентифицировали 9 изоформ эстераз, которые делятся на 2 основные группы: полосы 1, 2, 7, 8 и 9 соответствуют нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразе (так называемой специфической эстеразе), а полосы 3, 4, 5 и 6 — неспецифической, способной расщеплять как α -нафтилбутират, так и α -нафтилацетат. При этом α -нафтилбутират лучше выявляет активность эстераз полосы 4, а α -нафтилацетат — полосы 5 [1]. В той же работе было показано, что в зрелых и созревающих гранулоцитах наиболее активны эстеразы полос 7 и 9, а в зрелых моноцитах — полос 4 и 5, что позволяет использовать анализ на специфическую и неспецифическую эстеразы для разделения гранулоцитарного и моноцитарного ростка при диагностике ОМЛ [1]. Были также предложены протоколы одновременного (параллельного [2, 3] и последовательного [4]) окрашивания на специфическую и неспецифическую эстеразы. Основным достоинством такого окрашивания по сравнению с традиционно используемыми реакциями на миелопероксидазу для определения миелоидных клеток и неспецифическую эстеразу для выявления клеток моноцитарной природы является возможность визуализировать отдельно гранулоцитарный и отдельно моноцитарный компонент одновременно на одном и том же образце.

До недавнего времени не существовало метода, позволяющего совместить определение поверхностных CD-антигенов лейкоцитов с полноценным исследованием морфологии или активности линиеспецифичных ферментов. Нашей группой разработан клеточный биочип, позволяющий рассортировать лейкоциты по их поверхностным CD-антигенам и затем провести на рассортированных клетках морфологическое или цитохимическое исследование [5, 6]. Клеточный биочип представляет собой прозрачную подложку с областями иммобилизованных моноклональных антител к поверхностным дифференцировочным CD-антигенам лейкоцитов [5]. При инкубации биочипа с суспензией лейкоцитов человека клетки, несущие определенный поверхностный антиген, связываются только с соответствующими антителами. После отмывки несвязавшихся клеток на подложке остаются области, заполненные лейкоцитами, несущими разные поверхностные

антигены. Связавшиеся с антителами клетки затем фиксируют и окрашивают для дальнейшего морфологического или цитохимического исследования. Таким образом, клетки оказываются рассортированы в зависимости от присутствующих на их поверхности CD-антигенов, что позволяет определить степень их зрелости и принадлежность к той или иной линии не только по морфологии, но и по иммунофенотипу [5].

В ряде работ качественно описаны результаты окрашивания на двойную эстеразу мазков КМ пациентов с различными вариантами ОМЛ [2–4, 7]. Показано, что в норме специфическая эстераза активна в части миелобластов, присутствует во всех созревающих нейтрофилах начиная со стадии промиелоцита и практически отсутствует в других лейкоцитах КМ [4]. Неспецифическая эстераза, напротив, активна в мегакариocyтах и моноцитах, но зависимость активности ферментов данного типа от зрелости клеток не исследовалась [4]. Однако количественного анализа распределения активности специфической и неспецифической эстераз среди лейкоцитов нормального КМ не проводилось.

Целью данной работы было исследование морфологических особенностей и цитохимической активности специфической и неспецифической эстераз для нормальных лейкоцитов КМ, несущих тот или иной CD-антиген, с помощью клеточного биочипа.

Материалы и методы

Изготовление биочипов

Биочипы изготавливали в соответствии с ранее опубликованным протоколом [5, 6]. В панель биочипа входили антитела к CD2, CD3, CD5, CD7, CD8, CD10, CD16, CD19, CD38, CD45, HLA-DR (ООО «Сорбент», Россия) и CD4, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD33, CD41a, CD61, CD45RA, CD45RO, CD64, CD117, CD123 (eBioscience, США).

Выделение лейкоцитов и их анализ

Выделение лейкоцитов из пунктата КМ и их последующий анализ с помощью клеточного биочипа были выполнены, как описано в [5], с использованием окраски по Паппенгейму.

Цитохимическое окрашивание лейкоцитов на биочипе

В работе использовали протокол последовательного окрашивания на α -нафтилбутиратэстеразу и нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразу [8] с небольшими модификациями. Чип фиксировали 30 с в охлажденном до 4 °C формол-ацетоновом фиксаторе (20 мг Na_2HPO_4 (Sigma), 100 мг KH_2PO_4 (Serva), 45 мл ацетона, 25 мл 40 % формалина, 30 мл воды), отмывали в проточной воде и высушивали. В 20 мл фосфатного буфера (100 мМ, pH 8,0) растворяли 18 мг соли прочного синего BB (Sigma). Далее добавляли 0,4 мл α -нафтилбутирата (4 мг/мл) в ацетоне. Чип инкубировали в полученном растворе

в течение 45 мин в темноте при комнатной температуре, отмывали в проточной воде и высушивали на воздухе. Для определения активности нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы 10 мг соли прочного синего ВВ растворяли в 19 мл фосфатного буфера (66 мМ, рН 7,4), добавляли 1 мл раствора нафтол-AS-D-хлорацетата (Sigma) в N-диметилформамиде (2,5 мг/мл). Этим раствором заливали тот же чип и инкубировали 30 мин в темноте, отмывали в проточной воде, высушивали на воздухе и анализировали.

При использовании прочного синего ВВ в качестве визуализирующего агента продукт реакции неспецифических эстераз с α -нафтилбутиратом выпадает в виде бурого осадка, продукт реакции специфических

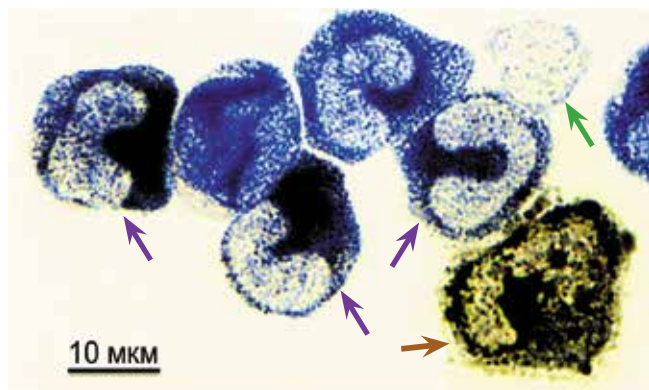


Рис. 1. Мононуклеары нормального костного мозга, связавшиеся с иммобилизованным антителом к CD11b, окрашенные по последовательному протоколу на α -нафтилбутиратэстеразу и нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразу. Клетка с бурой окраской, несущая α -нафтилбутиратэстеразу, указана коричневой стрелкой; неокрашенная клетка — зеленой стрелкой; клетки с двойной окраской, содержащие обе эстеразы, — фиолетовыми стрелками; клетки с синей или фиолетовой окраской, несущие нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразу, не отмечены. $\times 1000$

эстераз с нафтол-AS-D-хлорацетатом — в виде синего или фиолетового осадка [8] (рис. 1).

Анализ данных

Морфологию и цитохимическую активность лейкоцитов на биочипе анализировали с помощью светового микроскопа Nikon Eclipse Ni в светлом поле и камеры Nikon DS-Ri1. Для каждого пятна анти-CD было выполнено не менее 3 фотографий при увеличении $\times 400$ или 1 фотография при увеличении $\times 200$. Для анализа морфологии рассчитывали относительную плотность связывания лейкоцитов с пятнами антител, при этом за 100 % принимали количество клеток, связавшихся с пятном анти-CD45RA. Затем в пятнах антител к миеломоноцитарным маркерам CD11b, CD13, CD15, CD33, CD64, а также к HLA-DR, CD45, CD45RA при увеличении $\times 1000$ было проанализировано 100 клеток, среди которых морфологически определялось количество миело-/монобластов, промиелоцитов и промоноцитов. Для анализа цитохимической активности в данном исследовании определяли

относительные плотности связывания клеток, положительных только по специфической или только по неспецифической эстеразе, положительных или отрицательных по обоим эстеразам, принимая за 100 % плотность заполнения пятна с анти-CD45RA.

Пациенты

Для исследования морфологии были использованы пунктаты КМ 11 добровольных здоровых доноров (7 — мужского пола, 4 — женского) в возрасте от 4 до 16 лет (медиана 8 лет), а для исследования распределения цитохимической активности 2 эстераз — пунктаты КМ 9 добровольных здоровых доноров (4 — мужского пола, 5 — женского) в возрасте от 5 до 46 лет (медиана 25,5 года), взятые в процессе подготовки к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Согласие на забор КМ и будущие биомедицинские исследования было получено.

Результаты и обсуждение

Морфологическая оценка клеточного состава лейкоцитов костного мозга, связавшихся с антителами на клеточном биочипе

В работе исследовано относительное содержание миеломоноцитарных предшественников (миело-/монобластов, промиелоцитов и промоноцитов) среди клеток, связавшихся на биочипе с антителами к CD11b, CD13, CD15, CD33, CD64, HLA-DR и CD45, CD45RA. Миело-/монобласты (рис. 2а) отличались крупным размером (до 18 мкм), большим ядром, занимающим практически все пространство клетки, узкой полоской цитоплазмы голубого цвета, нежным тонким хроматином, четко различимыми одной или несколькими нуклеолами. Промоноциты (рис. 2б) имели более грубый рисунок хроматина, чем миело-/монобласты, менее различимые 1–2 нуклеолы, цитоплазму сероголубого цвета. В некоторых клетках выявлялась пылевидная азурофильная зернистость. Промиеоциты (рис. 2в) представляли собой крупные (до 20 мкм) клетки с большим, чем у миелобластов, количеством базофильной цитоплазмы, содержащей крупные хорошо различимые азурофильные гранулы. Ядро промиелоцита чаще располагалось эксцентрично, хроматин был чуть более конденсирован, чем у миелобласта, но все еще разреженный, ядрышко — менее различимо или отсутствовало.

На диаграмме (рис. 2г) представлена плотность связывания этих морфологических типов клеток с антителами на биочипе, нормированная на плотность связывания клеток с анти-CD45RA.

Поскольку маркер CD11b начинает экспрессироваться на поверхности созревающих гранулоцитов лишь на стадии миелоцитов, а его экспрессия на промоноцитах невысока [9, 10], на биочипе предшественники миелоидного ряда не связывались с антителами к CD11b. Поэтому наличие на биочипе миеломоноцитарных предшественников, положительных по CD11b,

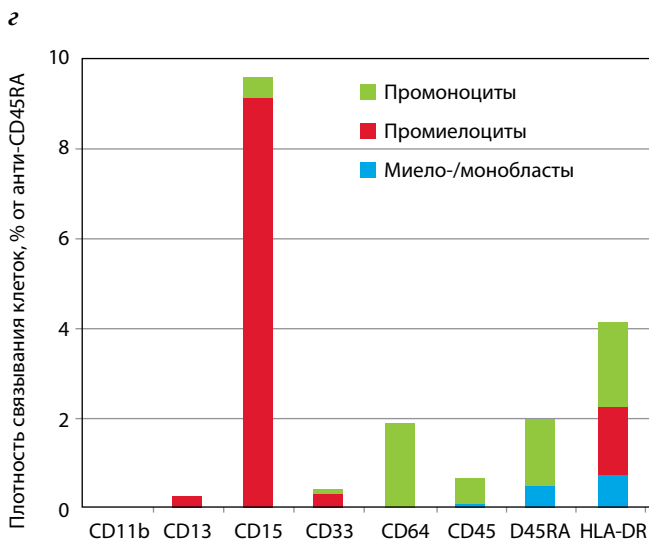
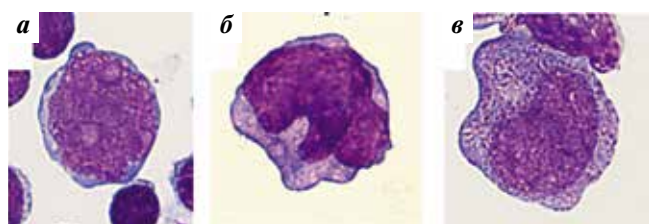


Рис. 2. Морфология нормальных миеломоноцитарных предшественников на клеточном биочипе: а – миело-/монобласт; б – промоноцит; в – промиелоцит; г – диаграмма плотностей связывания миеломоноцитарных предшественников с различными антителами на биочипе, нормированная на плотность связывания лейкоцитов с анти-CD45RA

может служить указанием на нарушение гемопоэза. Наибольшее количество промиелоцитов связывается с анти-CD15 (9 % промиелоцитов от CD45RA), поскольку из всех исследованных миелоидных маркеров плотность экспрессии именно CD15 на них максимальна [9]. Также в небольшом количестве промиелоциты были найдены на пятнах анти-CD33 и анти-HLA-DR (0,5 и 1,0 % соответственно). Промоноциты связывались с антителами к CD64, CD45, CD45RA, HLA-DR с плотностью до 2 % от максимального заполнения, что соответствует данным о наличии этих маркеров на поверхности клеток моноцитарного ряда [8]. В группу миело-/монобластов были включены морфологически неразличимые ранние предшественники обоих ростков лейкоцитарного гемопоэза. Хотя опухолевые миело-/монобласты активно экспрессируют CD13 и CD33 на своей поверхности, в КМ здоровых доноров на биочипе эти клетки были найдены только на пятне анти-HLA-DR в количестве 0,7 %. Отсутствие связывания нормальных миело-/монобластов с анти-CD13 и анти-CD33 на биочипе может быть объяснено низкой экспрессией данных маркеров на их поверхности (менее 100 на 1 клетку) [9–11].

Полученные данные о морфологическом составе миелоидных предшественников, несущих определенный антиген, могут быть использованы при постанов-

ке диагноза ОМЛ по FAB-классификации с помощью биочипа.

Распределение предшественников лейкоцитов на биочипе по содержанию α -нафтилбутират-эстеразы и/или нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы в нормальном костном мозге

На рис. 1 представлены характерные результаты последовательной окраски на α -нафтилбутиратэстеразу и нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразу нормальных мононуклеаров КМ, связавшихся на биочипе с антителами к CD11b. Диаграмма распределения лейкоцитов в пятнах биочипа по наличию в них α -нафтилбутиратэстеразы и нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы показана на рис. 3. Мононуклеары нормального КМ, положительные по CD3, CD5, CD7 и CD19, отрицательны по обоим эстеразам; среди клеток, положительных по CD2 и CD4, 7 ± 5 и 27 ± 11 % соответственно положительны по α -нафтилбутиратэстеразе, что соответствует субпопуляции зрелых моноцитов, экспрессирующих данные маркеры [12]. Небольшое варибельное количество (7 ± 6 % от плотности заполнения анти-CD45RA) CD10⁺ клеток, положительных по нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразе, соответствует сегментоядерным нейтрофилам, оставшимся после их удаления из суспензии центрифугированием в градиенте плотности [12]. Среди всех CD38⁺ нормальных мононуклеаров КМ 12 ± 8 % положительны по α -нафтилбутиратэстеразе и 12 ± 11 % – по нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразе, что согласуется с данными литературы по экспрессии данного маркера на подгруппе моноцитов и части зрелых и незрелых миелоидных клеток [12]. Клетки, положительные по CD123, отрицательны по обоим эстеразам в соответствии с данными литературы [11], и небольшое количество CD123⁺ клеток, положительных по неспецифической эстеразе (до 2 % от максимального заполнения), отражает неспецифическое связывание моноцитов с анти-CD123 на биочипе. Поскольку в 79 % случаев бластные клетки при ОМЛ экспрессируют CD123 с уровнем экспрессии, в десятки раз превышающим экспрессию данного маркера на нормальных миелоидных предшественниках [11], появление значительного количества CD123⁺ клеток, положительных по специфической или неспецифической эстеразе, является указанием на нарушения гемопоэза. Среди HLA-DR⁺ клеток встречается небольшая подгруппа α -нафтилбутиратсодержащих клеток (9 ± 6 % от плотности заполнения анти-CD45RA), соответствующая моноцитам с высоким уровнем экспрессии HLA-DR [12]. По данным литературы, CD13 и CD33 присутствуют с постоянной, но невысокой плотностью с самых ранних этапов дифференцировки как моноцитов, так и гранулоцитов, но их экспрессия невысока [11]. Поэтому CD13⁺ и CD33⁺ клетки содержат как α -нафтилбутиратэстеразу, так и нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразу, но плотность их связывания с антителами к этим маркерам

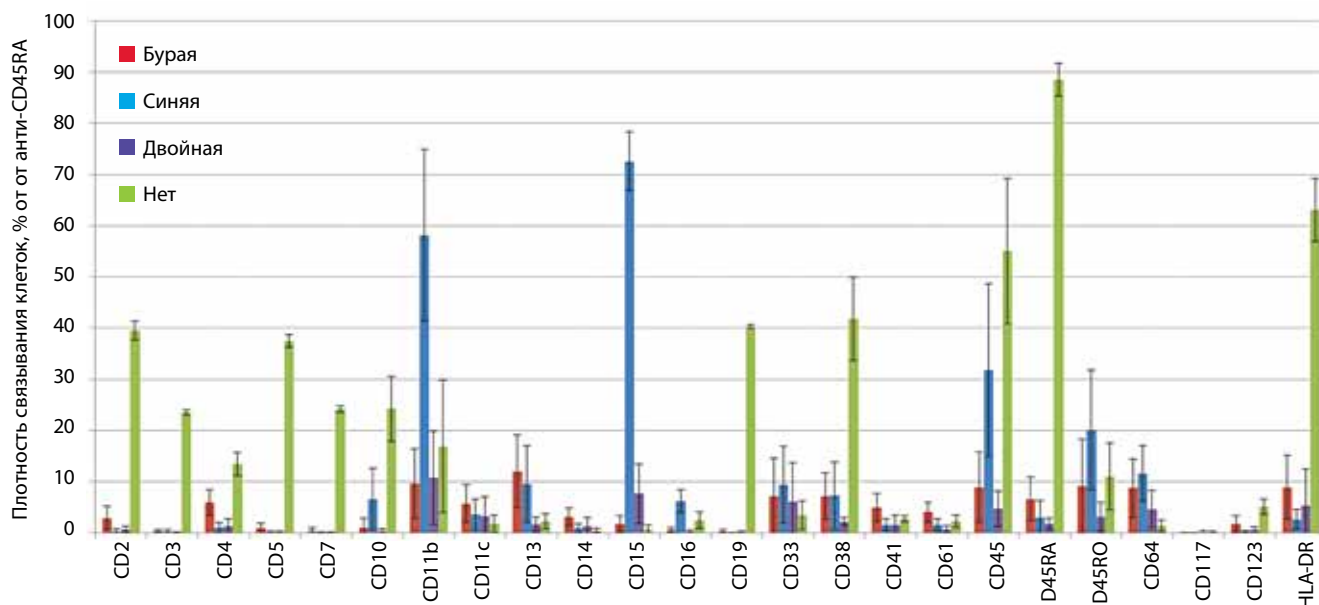


Рис. 3. Диаграмма распределения предшественников лейкоцитов в пятнах биочипа по наличию в них α -нафтилбутиратэстеразы и нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы. Представлены усредненные значения по 9 донорам, в качестве ошибки взято стандартное отклонение. Подсчет и окрашивание выполнены как описано в разделе «Материалы и методы»

на биочипе невелика. Поверхностный CD11c характерен для клеток моноцитарной природы. Пренебрежимо малое количество CD11c-клеток, положительных по специфической эстеразе (4 ± 3 % от плотности заполнения положительного контроля), может отражать небольшое количество CD11c⁺ созревающих гранулоцитов, начиная со стадии миелоцита [12]. CD11b и CD15 появляются на созревающих гранулоцитах на уровне миелоцитов с высокой плотностью, а CD16 — при переходе от палочкоядерных к сегментоядерным нейтрофилам [9, 10]. Поэтому с антителами к данным маркерам связываются с высокой плотностью клетки, положительные по нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразе. Небольшое количество CD15⁺ клеток, положительных по α -нафтилбутиратэстеразе, объясняется промежуточной экспрессией CD15 на промиелоцитах до стадии, экспрессирующей CD14, что хорошо согласуется с представленными выше морфологическими данными о связывании промиелоцитов с анти-CD15 на биочипе (см. рис. 2). Плотность клеток, содержащих неспецифическую эстеразу, примерно одинакова (6–12 % от максимальной плотности связывания) на антителах ко всем антигенам, характерным для моноцитов (CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD33, CD64), и положительном контроле анти-CD45 и соответствует примерно 1–8 % нормы моноцитов в здоровом КМ [10].

Причина появления клеток, окрашивающихся в использованном нами протоколе как на нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразу, так и на α -нафтилбутиратэсте-

разу (двойная окраска), до конца не известна. Часть этих клеток может представлять собой незрелые моноцитарные предшественники (монобласты и промиелоциты), содержащие оба типа эстераз. Однако по представленным в работе морфологическим данным количество этих клеток недостаточно велико, чтобы полностью объяснить наличие клеток с двойной окраской. По данным С.У. Ли и соавт., эстеразы полосы 2, имеющие активность как в отношении α -нафтилбутирата, так и нафтол-AS-D-хлорацетата, присутствуют в части моноцитов и гранулоцитов, вызывая неспецифическую «перекрестную» окраску [1], что также может объяснять присутствие небольшого (до 10 % от максимальной плотности связывания) количества клеток с двойной окраской.

Заключение

В целом полученное в работе распределение на биочипе клеток, несущих одну или обе эстеразы, хорошо согласуется с данными проточной цитометрии об экспрессии различных CD-антигенов на разных стадиях созревания клеток миелоидного и моноцитарного ряда и может быть использовано в качестве референсных значений при диагностике ОМЛ с помощью клеточного биочипа.

Финансирование. Работа была поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 16-34-01030 и № 16-04-00282). А.Н. Хвастунова поддержана стипендией президента СП-1929. 2016.4.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Li C.Y., Lam K.W., Yam L.T. Esterases in human leukocytes. *J Histochem Cytochem* 1973;21(1):1–12. PMID: 4694536.
2. Swirsky D.M. Single incubation double esterase cytochemical reaction using a single coupling reagent. *J Clin Pathol* 1984;37(10):1187–90. PMID: 6593326.
3. Ainoon O., Jabamoney A.J., Cheong S.K. Single incubation double esterase cytochemical reaction using a single coupling reagent. *Malays J Pathol* 1991;13(1):47–9. PMID: 1724544.
4. Yam L.T., Li C.Y., Crosby W.H. Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am J Clin Pathol* 1971;55(3):283–90. PMID: 5549896.
5. Khvastunova A.N., Kuznetsova S.A., Al'-Radi L.S. et al. Anti-CD antibody microarray for human leukocyte morphology examination allows analyzing rare cell populations and suggesting preliminary diagnosis in leukemia. *Sci Rep* 2015;5:12573. DOI: 10.1038/srep12573. PMID: 26212756.
6. Хвастунова А.Н., Аль-Ради Л.С., Капранов Н.М. и др. Использование клеточного биочипа в диагностике волосатоклеточного лейкоза. *Онкогематология* 2015;10(1):58–66. [Khvastunova A.N., Al'-Radi L.S., Kapranov N.M. Cell-binding microarray application in diagnosis of hairy cell leukemia. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2015;10(1):58–66. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2015-1-37-45.
7. Rozenszajn L., Leibovich M., Shoham D., Epstein J. The esterase activity in megaloblasts, leukemic and normal hematopoietic cells. *Br J Hematol* 1968;14(6):605–10. PMID: 5241511.
8. Bain B.J., Bates I., Laffan M.A. *Dacie and Lewis practical haematology*. Elsevier Health Sciences, 2016.
9. Terstappen L.W., Gandour D., Huang S. et al. Assessment of hematopoietic cell differentiation by multidimensional flow cytometry. *J Hematother* 1993;2(3):431–47. DOI: 10.1089/scd.1.1993.2.431. PMID: 7522894.
10. van Lochem E.G., van der Velden V.H., Wind H.K. et al. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;60 (1):1–13. DOI: 10.1002/cyto.b.20008. PMID: 15221864.
11. Ehninger A., Kramer M., Röhlig C. et al. Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J* 2014;4: e218. DOI: 10.1038/bcj.2014.39. PMID: 24927407.
12. Ortolani C. *Flow cytometry of hematological malignancies*. John Wiley & Sons, 2011.