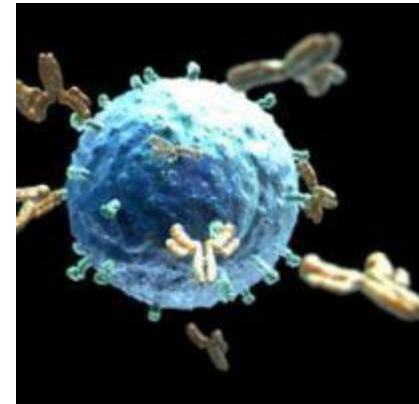


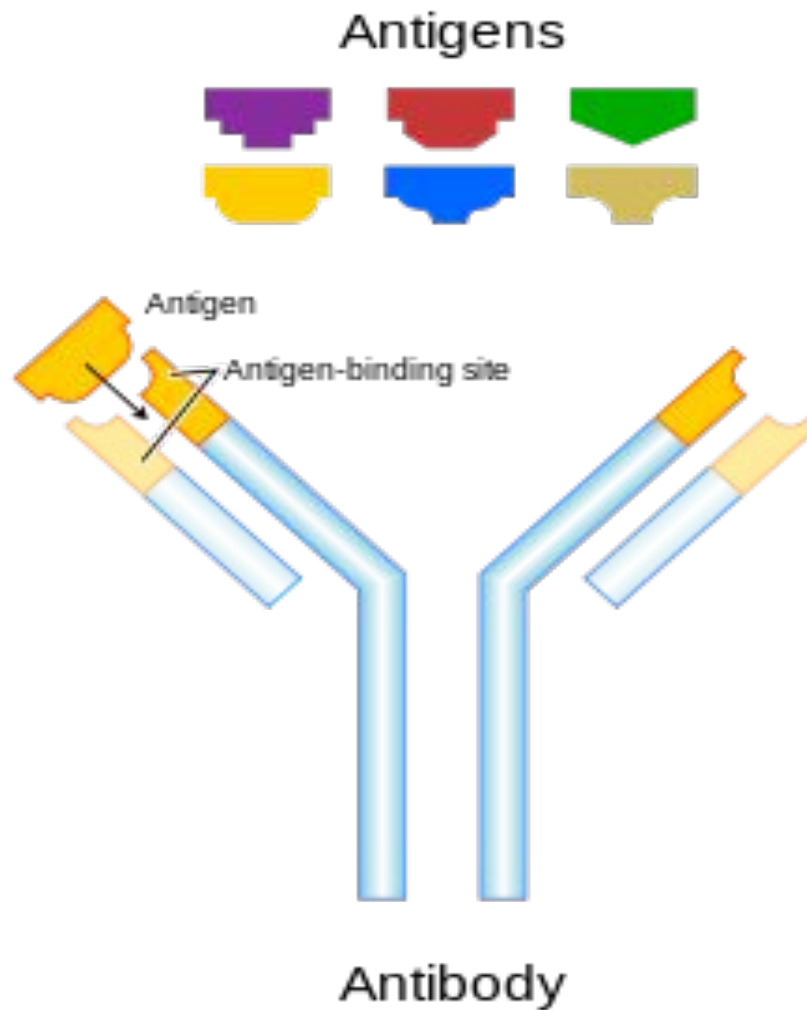
Проточная цитометрия

Иммунофенотипирование

Моноклональные антитела

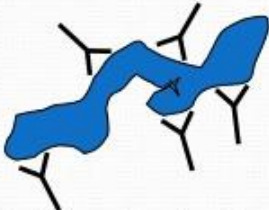
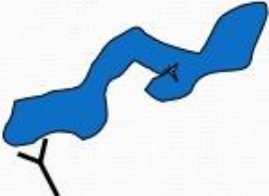


Моноклональные антитела



Поликлональные и моноклональные антитела

Polyclonal vs. monoclonal

Polyclonal	Monoclonal
<ul style="list-style-type: none">• Cheap to produce• Mixed population of antibodies• May bind to different areas of target molecule• Tolerant of small changes in protein structure (denaturation, dimerisation, phosphorylation)	<ul style="list-style-type: none">• Expensive to produce• Single antibody species• Will only bind single specific site• May only recognise a particular protein form (phosphorylation, dimersied)• Infinitely renewable
 <p>Polyclonal antibodies</p>	 <p>Monoclonal antibodies</p>

Гибридомная технология

- **Гибридо́ма** — гибридная клеточная линия, полученная в результате слияния клеток двух видов: способных к образованию антител В-лимфоцитов полученных из селезёнки иммунизированного животного (чаще всего мыши), и раковых клеток миеломы. Слияние клеток производится с помощью нарушающего мембраны агента, такого, как полиэтиленгликоль или вирус Сёндай. Поскольку раковые клетки миеломы «бессмертны», то есть способны делиться большое количество раз, после слияния и соответствующей селекции гибридома, производящая моноклональные антитела против антигена может поддерживаться долгое время. В 1984 г. за открытие принципа получения моноклональных антител Мильштейн, Кёлер и Ерне получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине.

Гибридомная технология

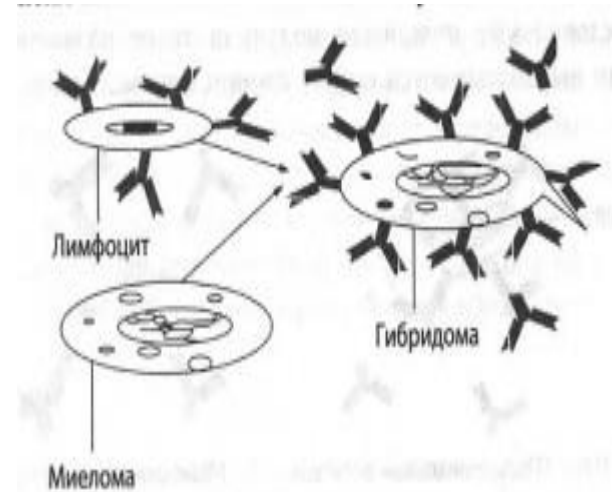
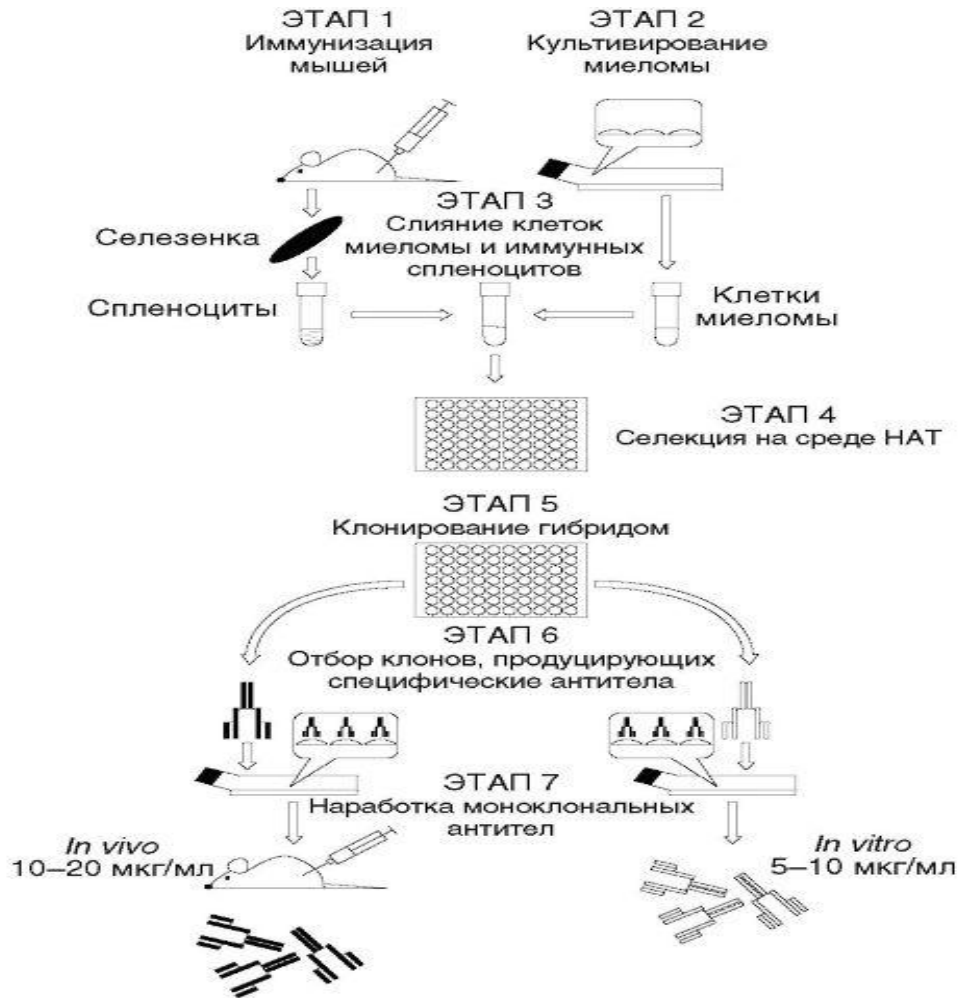
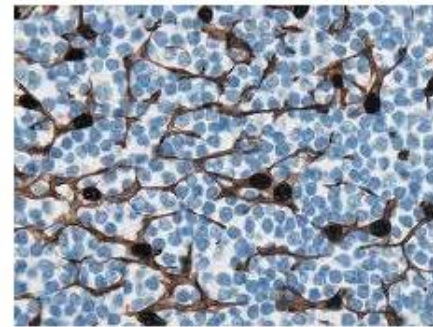
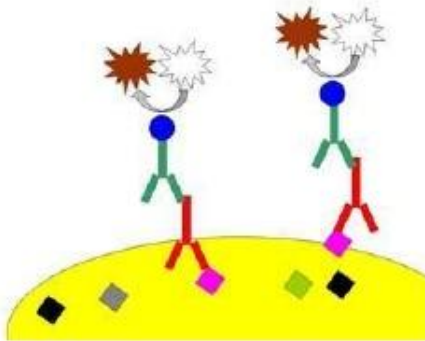


Рис. 6.2. Гибридома

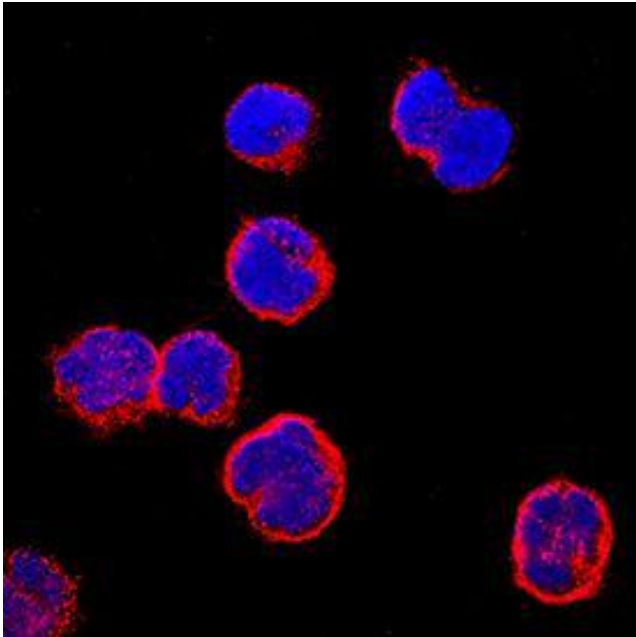
Принцип иммуноцитохимии

Immunocytochemistry

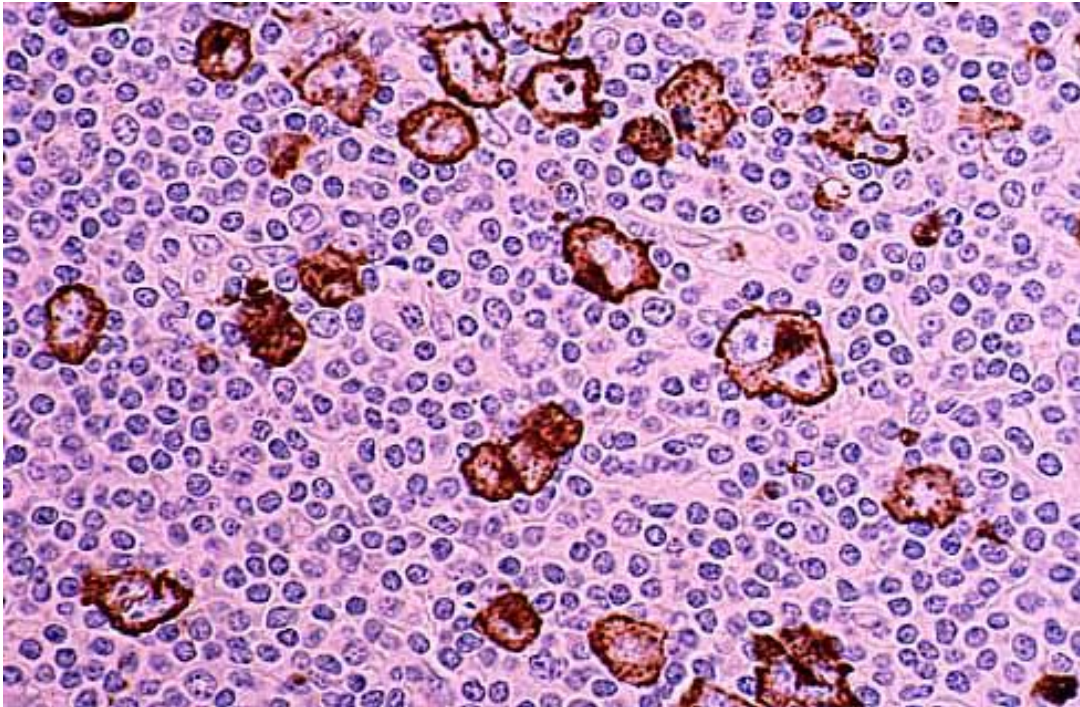
- Uses immune system to generate antibodies against a foreign substance (antigen)
- Antibodies are applied to sectioned tissue
- Label attached to antibody (fluorescent or **color**)
- Location of protein is identified



Люминисцентная ИММУНОЦИТОХИМИЯ



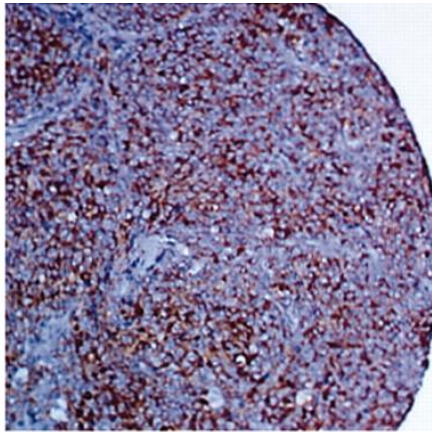
ИММУНОГИСТОХИМИЯ



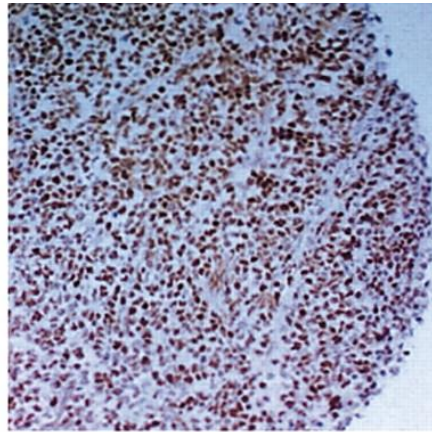
03/06/16

Иммуногистохимия

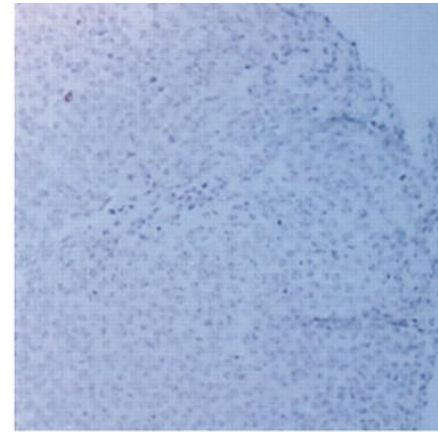
A



CD10

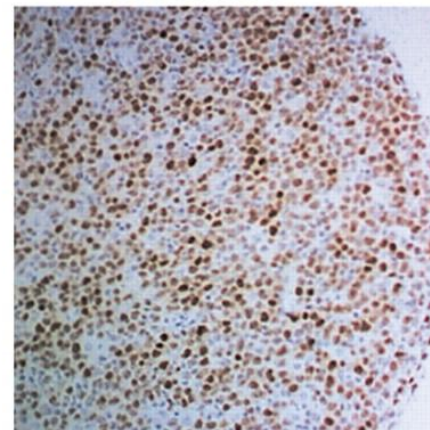
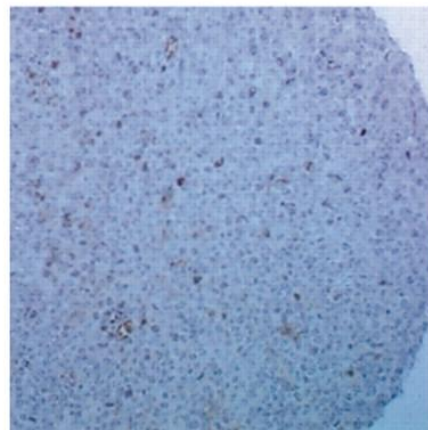
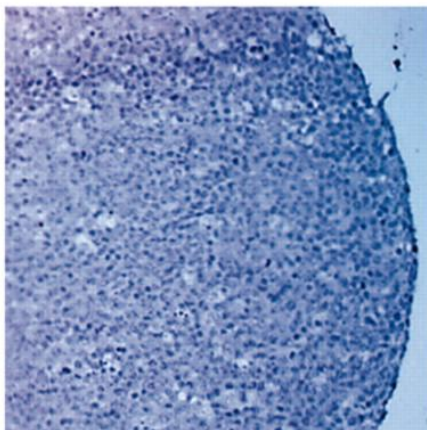


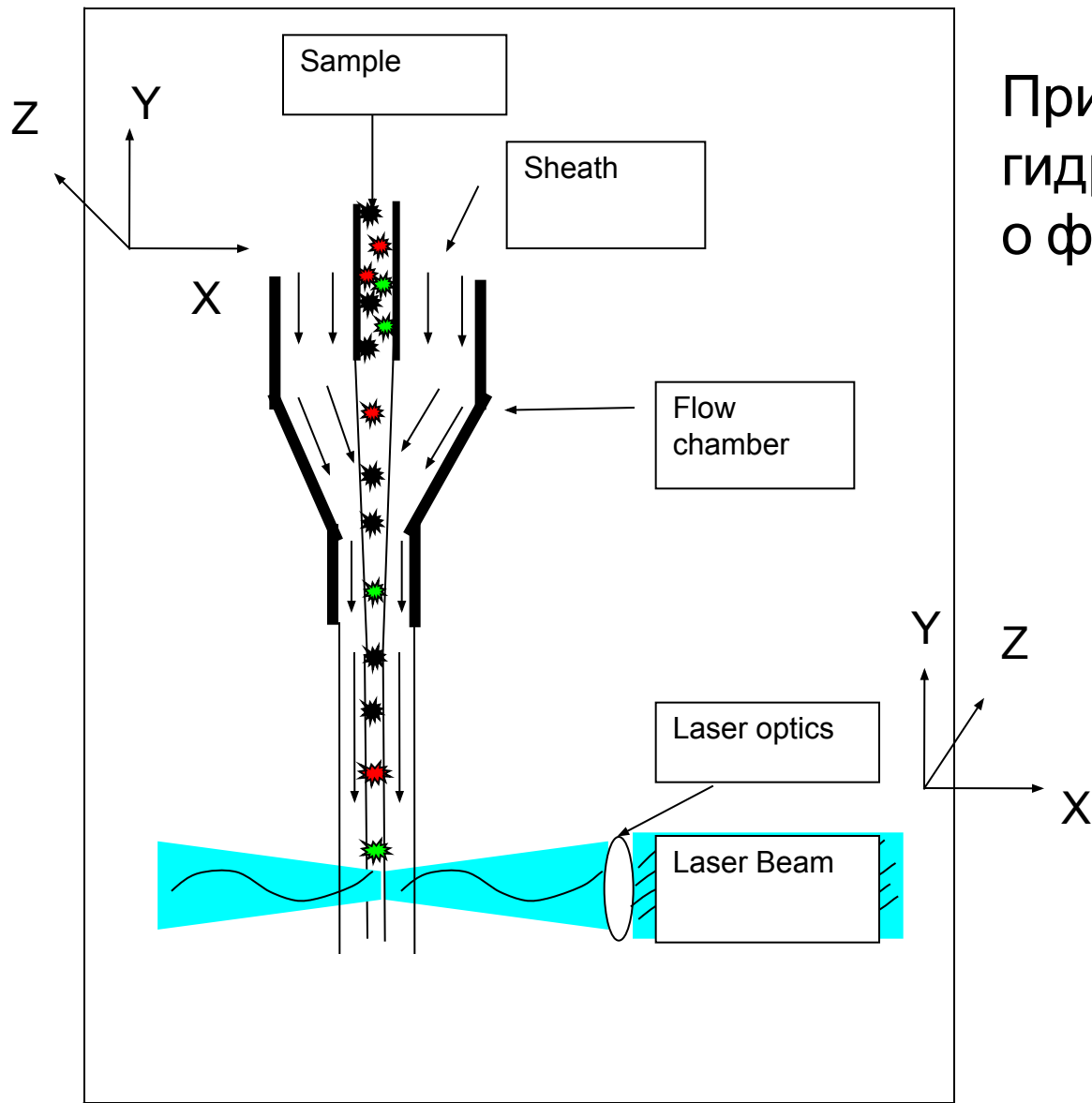
BCL-6



MUM1

B

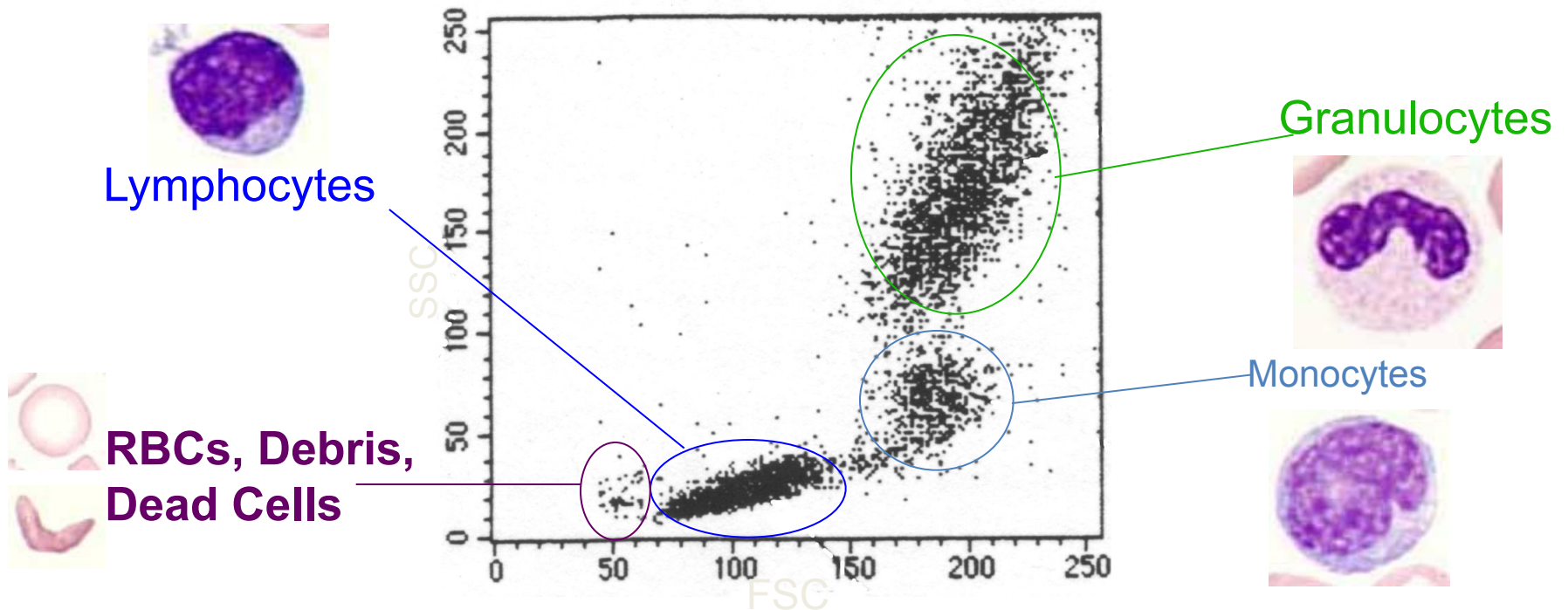




Принцип
гидродинамическог
о фокусирования

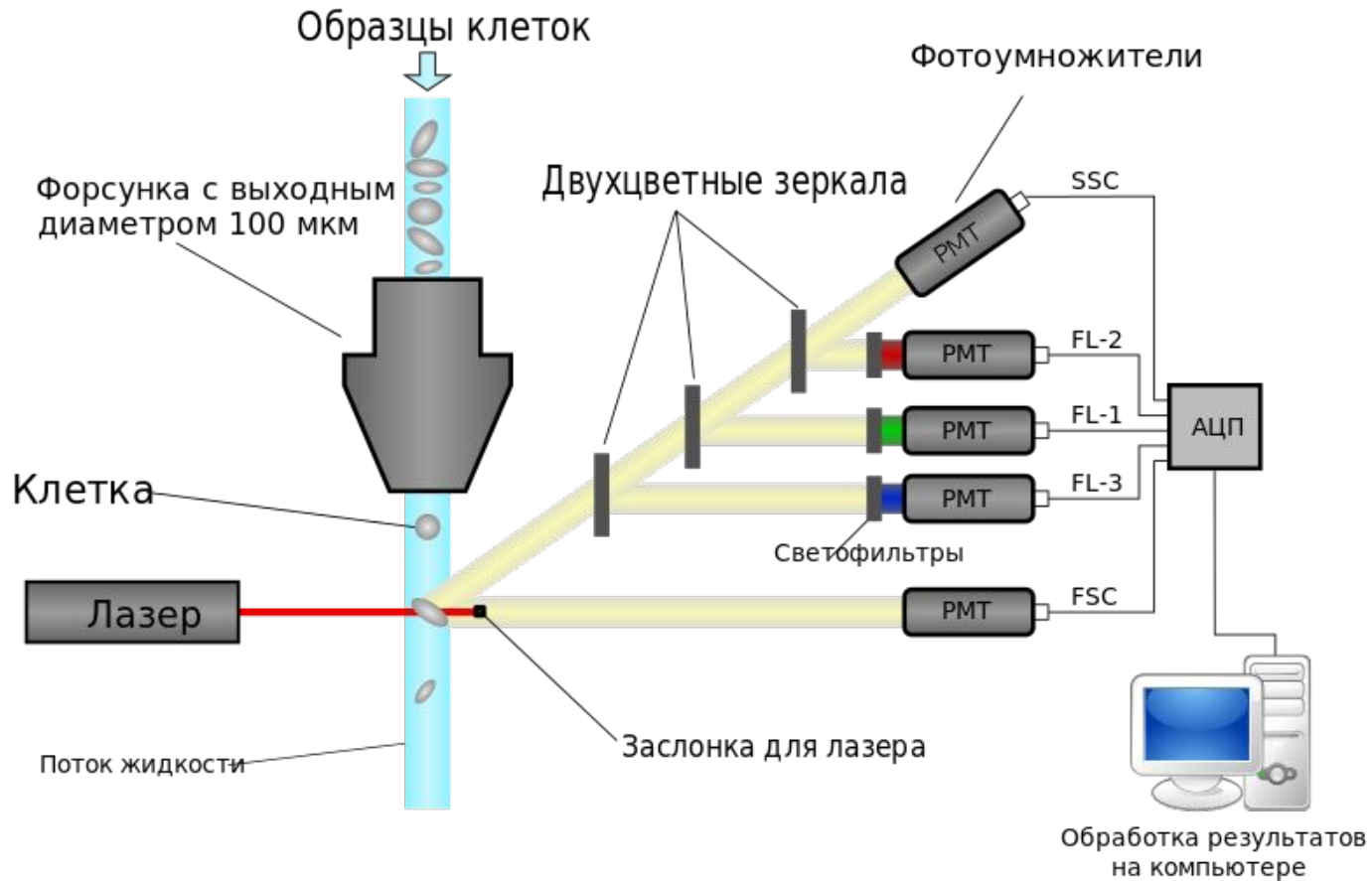
FSC vs SSC

- рассеяние света под малыми углами (от 1° до 10°) (FSC- размеры клеток)
- рассеяние света под углом 90° (SSC- соотношение ядро/цитоплазма, неоднородность и гранулярность клеток)



- Принципы работы
- 1) использование системы гидрофокусировки, которая обеспечивает прохождение клеток в потоке поодиночке;
- 2) облучение клетки лазерным излучением;
- 3) регистрации сигналов светорассеяния и флуоресценции от каждой клетки, причём степень световой дисперсии позволяет получить представление о размерах и структуре клетки
- Кроме того, в ходе анализа учитывается уровень флуоресценции химических соединений, входящих в состав клетки (аутофлуоресценция) или внесённых в образец перед проведением проточной цитометрии.

Устройство проточного цитометра



Методики, выполняемые на проточном цитофлуориметре:

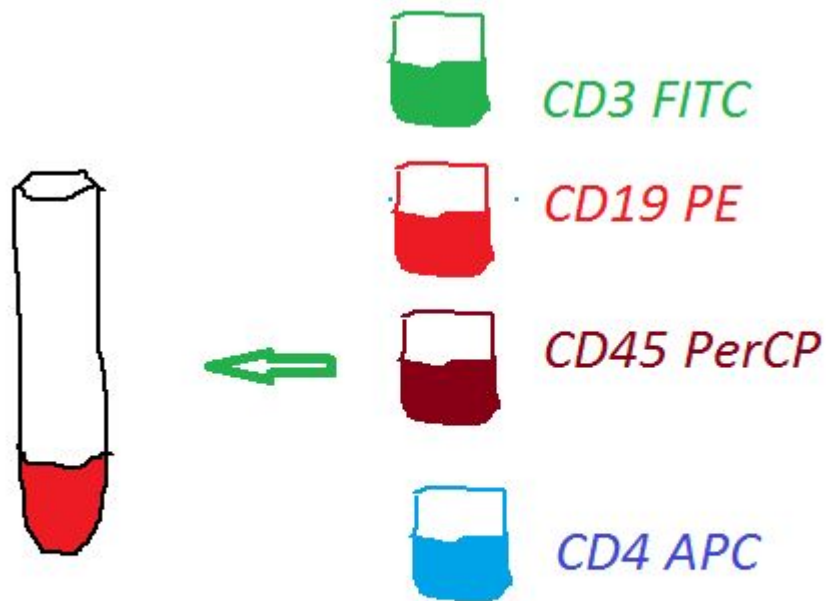


- Иммунофенотипирование острых лейкозов
- Иммунофенотипирование лимфопролиферативных заболеваний
- Определение количества жизнеспособных ГСК в трансплантате
- Оценка минимальной остаточной болезни
- Оценка ПНГ
- Оценка иммунного статуса
- Определение HLAB27

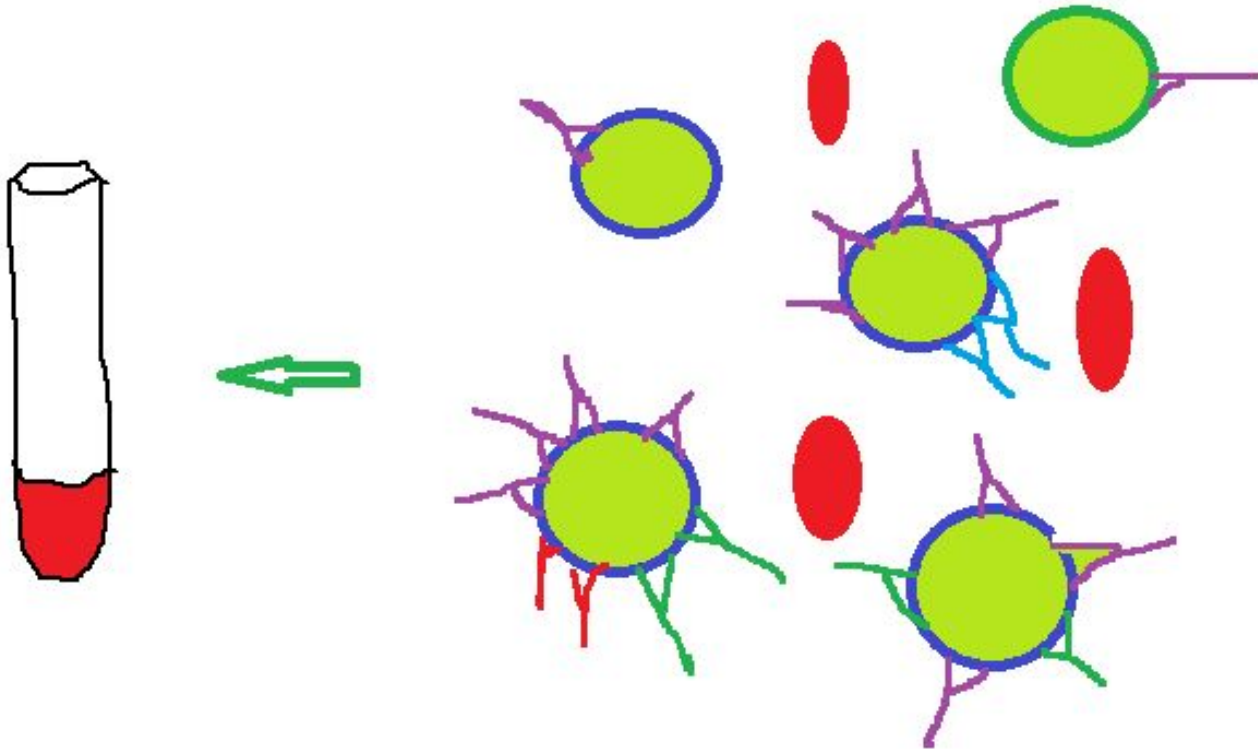
Образцы для проточной цитометрии

- кровь
- КОСТНЫЙ МОЗГ
- ликвор
- суставная жидкость
- плевральная жидкость
- асцитическая жидкость
- суспензированные клетки тканей (например, опухолей)

Пробоподготовка



Пробоподготовка



Пробоподготовка

Отмывка буфером



Лизис эритроцитов







Отмывка →

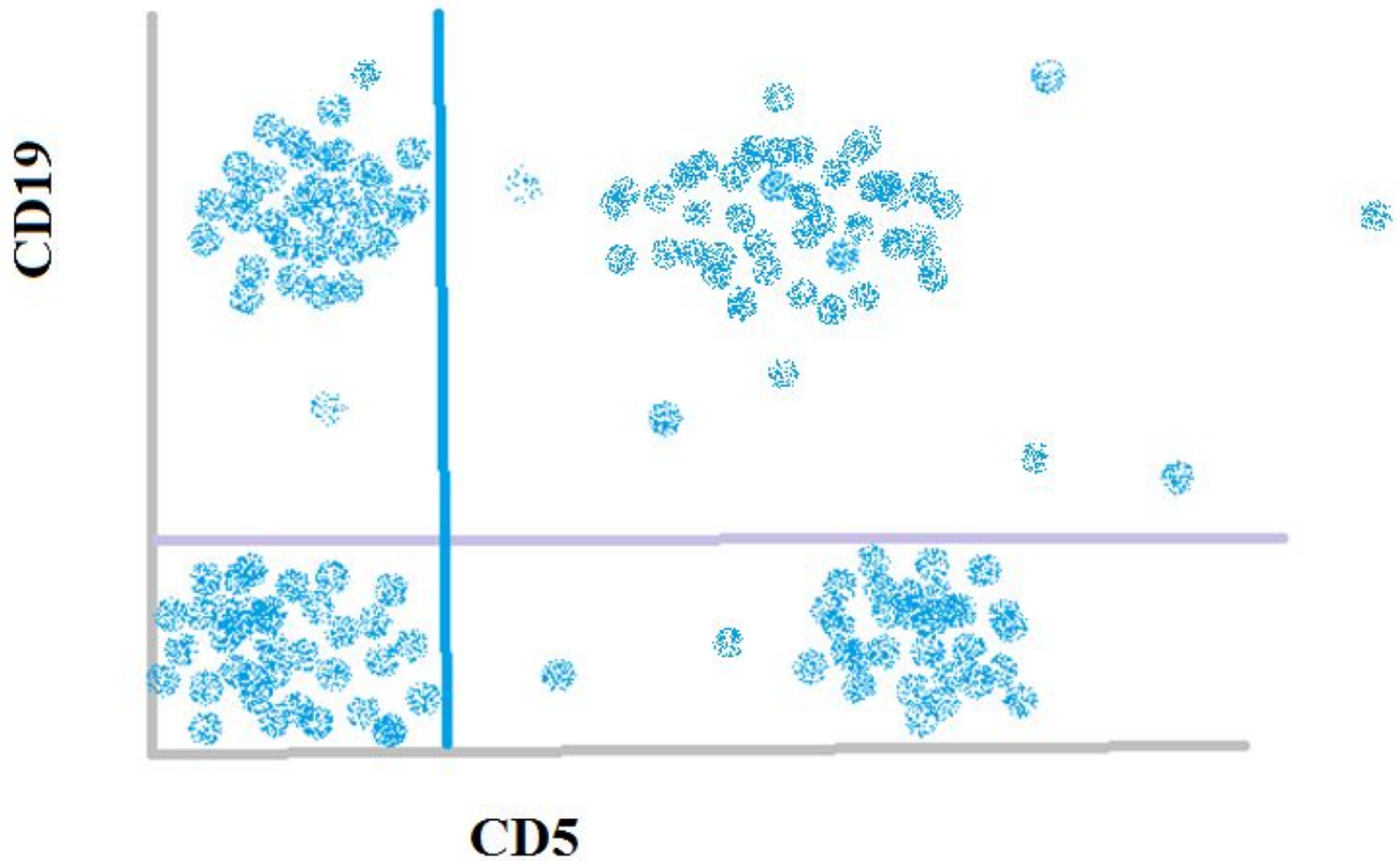
Стабильность 24-48 часов
при комнатной температуре



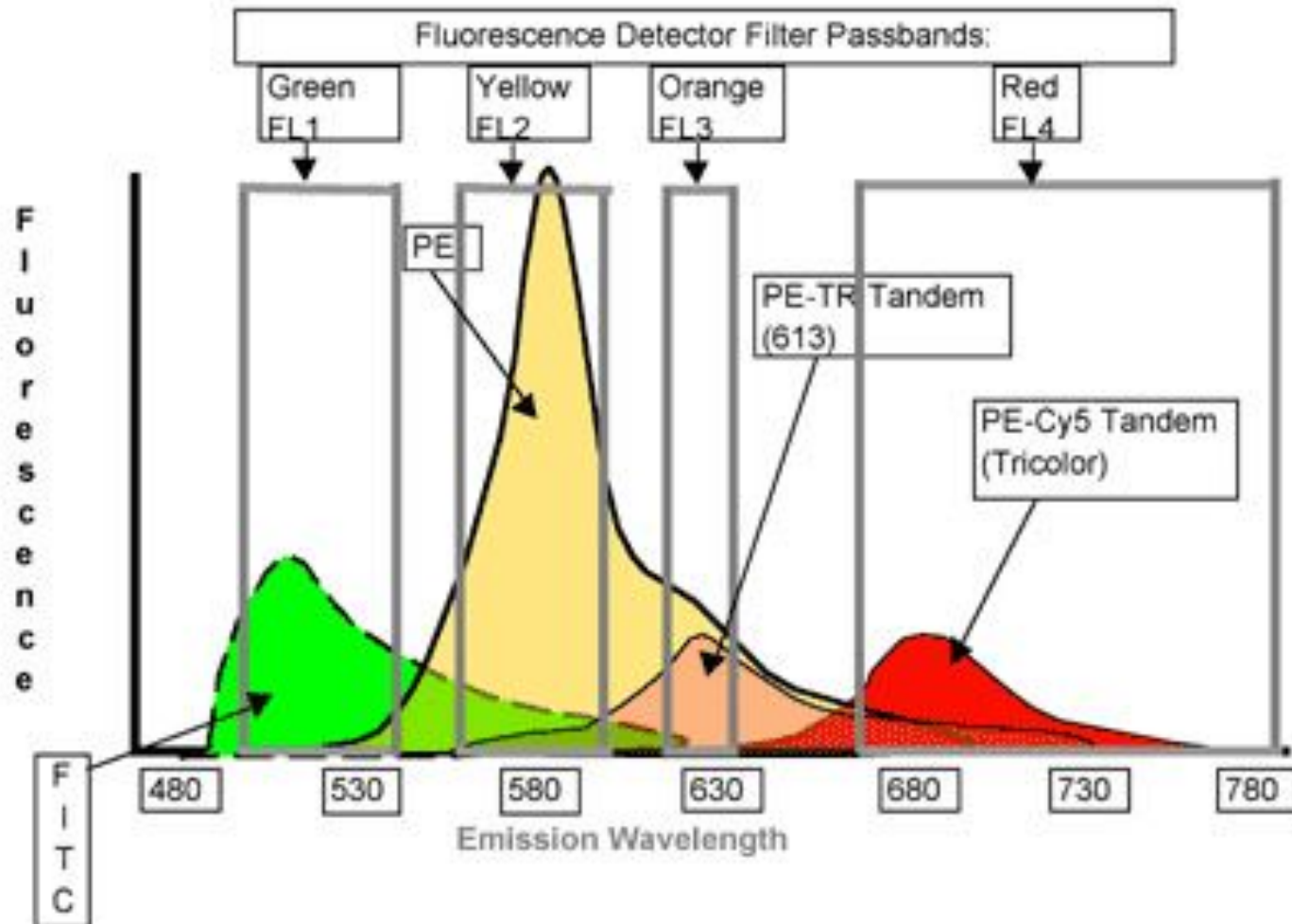
Диагностические панели

	FITC	PE	PER CP	APC
	CD3	CD4	CD45	CD8
	CD19	CD10	CD45	CD20
	CD34	CD13	CD45	CD15
	CD16	CD56	CD45	CD3

Графики DOT PLOT



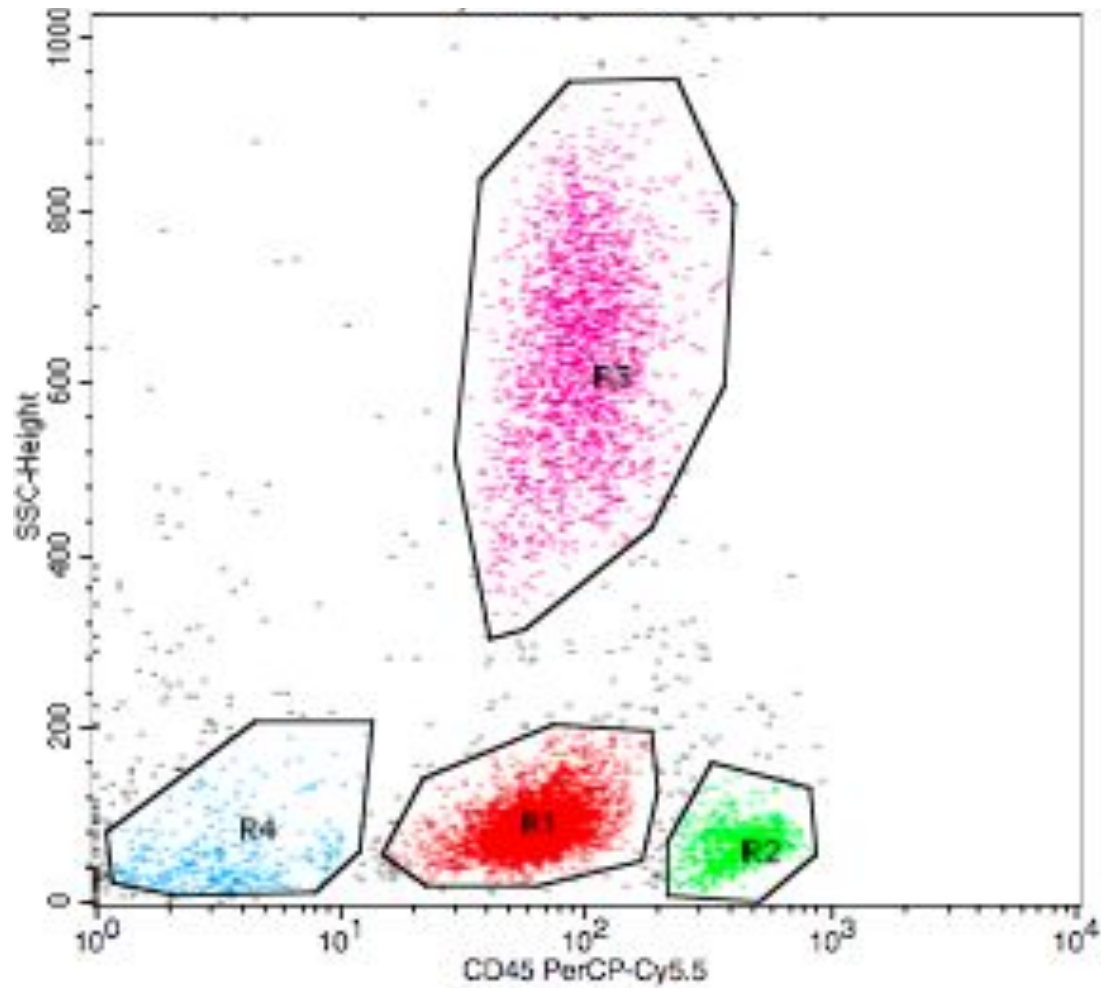
Компенсация



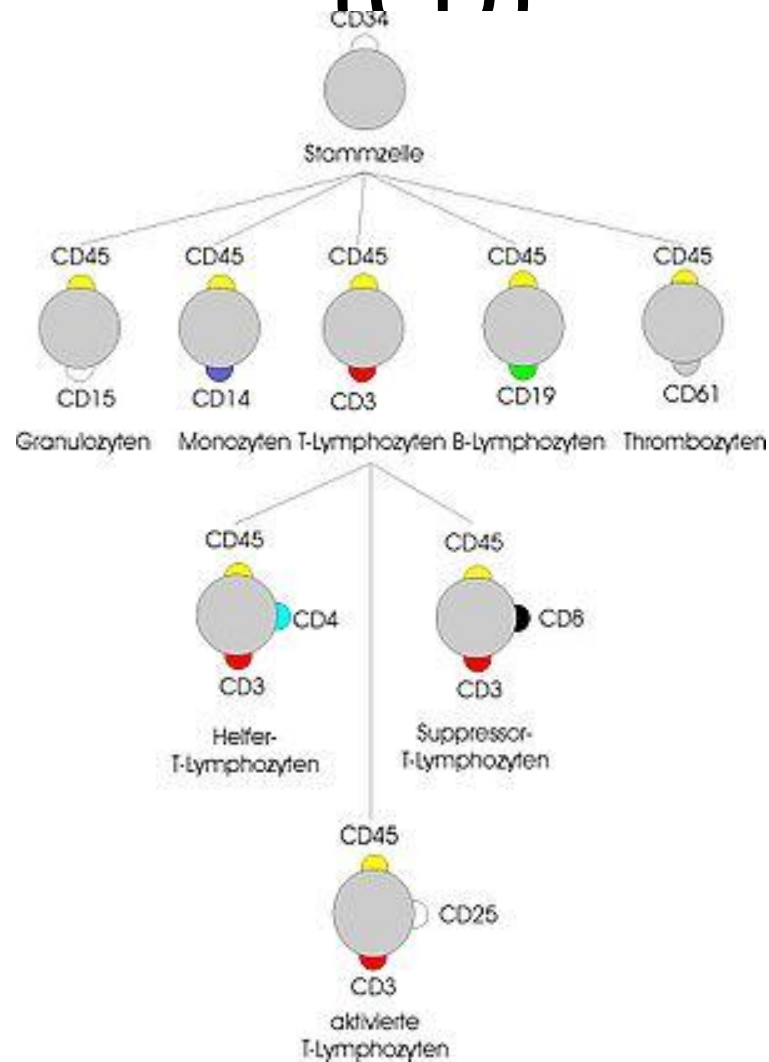
Преимущества проточной цитометрии

- Анализ единственной клетки
- Наличие отрицательного контроля
- Высокая скорость анализа
- Одновременное изучение нескольких параметров в/на клетке
- Количественная оценка

SSC vs CD45



Кластеры дифференцировки (CD)



Antigen Designation Normal Cellular Distribution**PRIMARILY T-CELL ASSOCIATED**

CD1	Thymocytes and Langerhans cells
CD3	Thymocytes, mature T cells
CD4	Helper T cells, subset of thymocytes
CD5	T cells and a small subset of B cells
CD8	Cytotoxic T cells, subset of thymocytes, and some NK cells

PRIMARILY B-CELL ASSOCIATED

CD10	Pre-B cells and germinal-center B cells; also called CALLA
CD19	Pre-B cells and mature B cells but not plasma cells
CD20	Pre-B cells after CD19 and mature B cells but not plasma cells
CD21	EBV receptor; mature B cells and follicular dendritic cells
CD23	Activated mature B cells
CD79a	Marrow pre-B cells and mature B cells

PRIMARILY MONOCYTE- OR MACROPHAGE-ASSOCIATED

CD11c	Granulocytes, monocytes, and macrophages; also expressed by hairy cell leukemias
CD13	Immature and mature monocytes and granulocytes
CD14	Monocytes
CD15	Granulocytes; Reed-Stenberg cells and variants
CD33	Myeloid progenitors and monocytes
CD64	Mature myeloid cells

PRIMARILY NK-CELL ASSOCIATED

CD16	NK cells and granulocytes
CD56	NK cells and a subset of T cells

PRIMARILY STEM CELL-AND PROGENITOR CELL-ASSOCIATED

CD34	Pluripotent hematopoietic stem cells and progenitor cells of many lineages
------	--

ACTIVATION MARKERS

CD30	Activated B cells, T cells, and monocytes; Reed-Stenberg cells and variants
------	---

PRESENT ON ALL LEUKOCYTES

CD45	All leukocytes; also known as leukocyte common antigen (LCA)
------	--

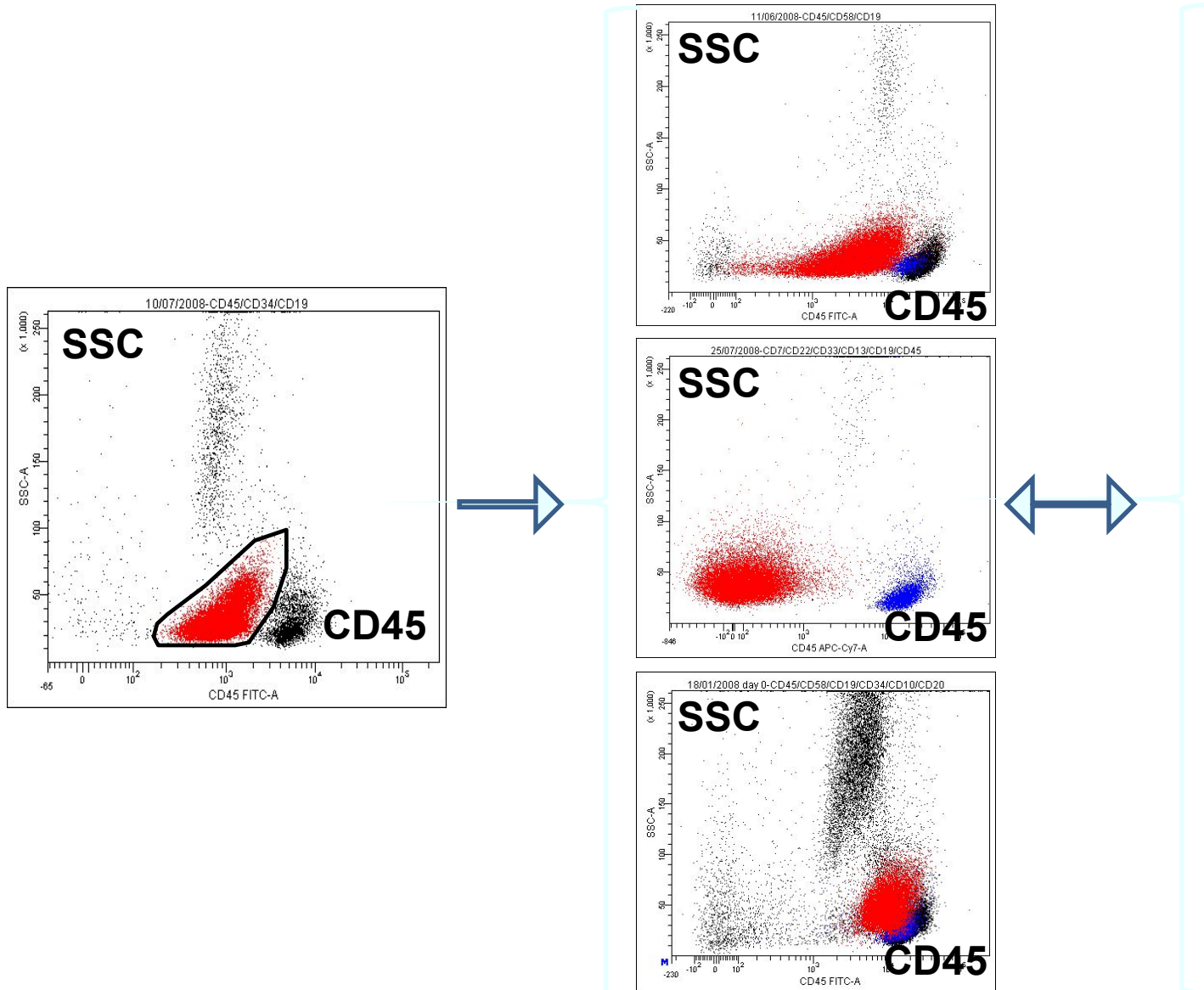
Принципы диагностики гемопоэтических неоплазий

- Сопоставление с нормальными аналогами
- Определение aberrантного опухолевого иммунофенотипа

Основные типы aberrантности фенотипа лейкозных клеток

- Коэкспрессия антигенов нескольких клеточных линий.
- Асинхронная экспрессия антигена-одновременная экспрессия ранних и поздних антигенов, которые в норме находятся на разных этапах дифференцировки клеток.
- Избыточная экспрессия антигена- плотность распределения антигена на лейкозной клетке больше, чем на нормальной клетке костного мозга.
- Отсутствие или низкий уровень экспрессии антигена, характерного для данной стадии дифференцировки (потеря клеткой ряда поверхностных маркеров)
- Фенотипический профиль, практически не встречающийся в норме.

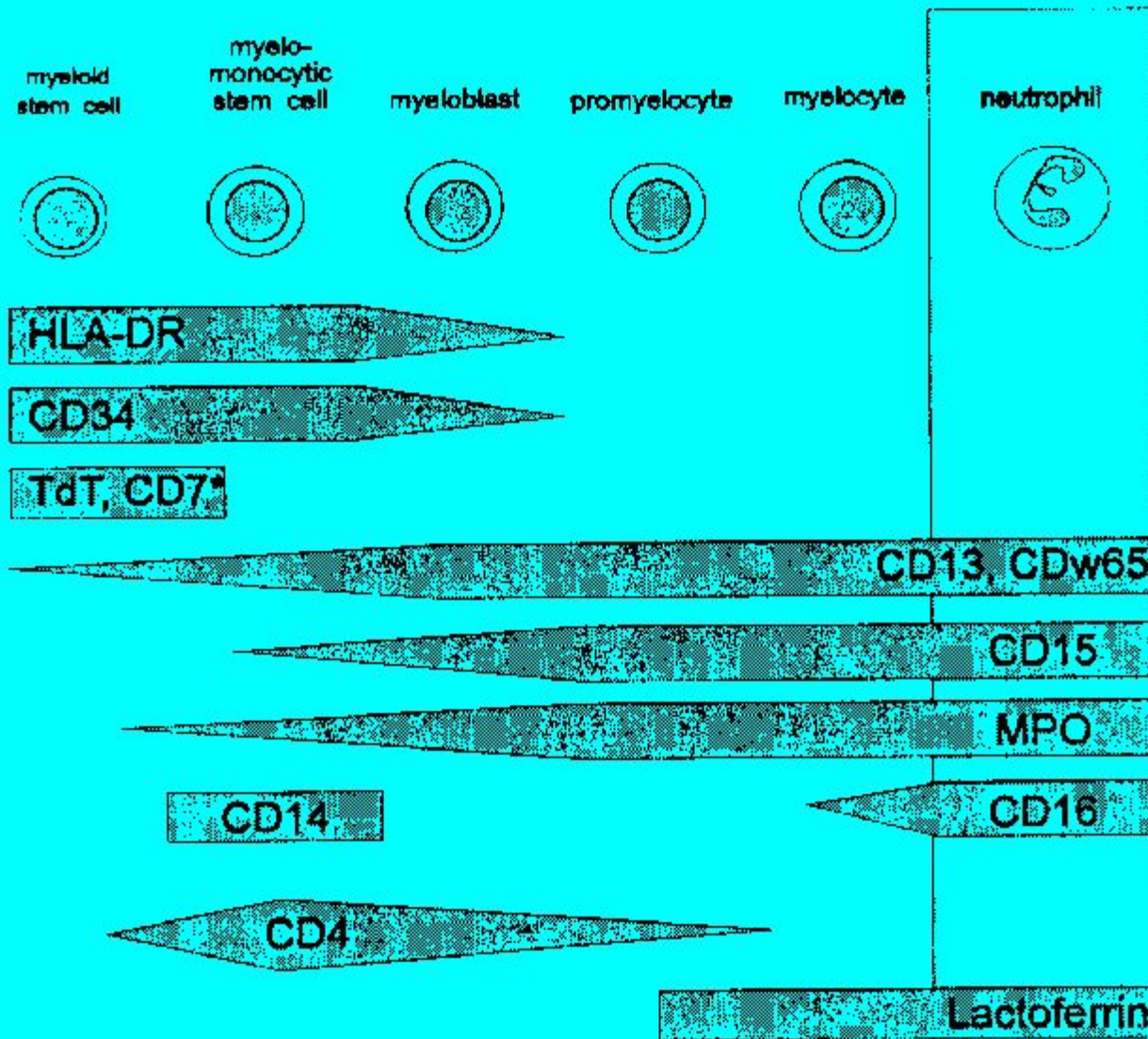
Выделение опухолевых клеток



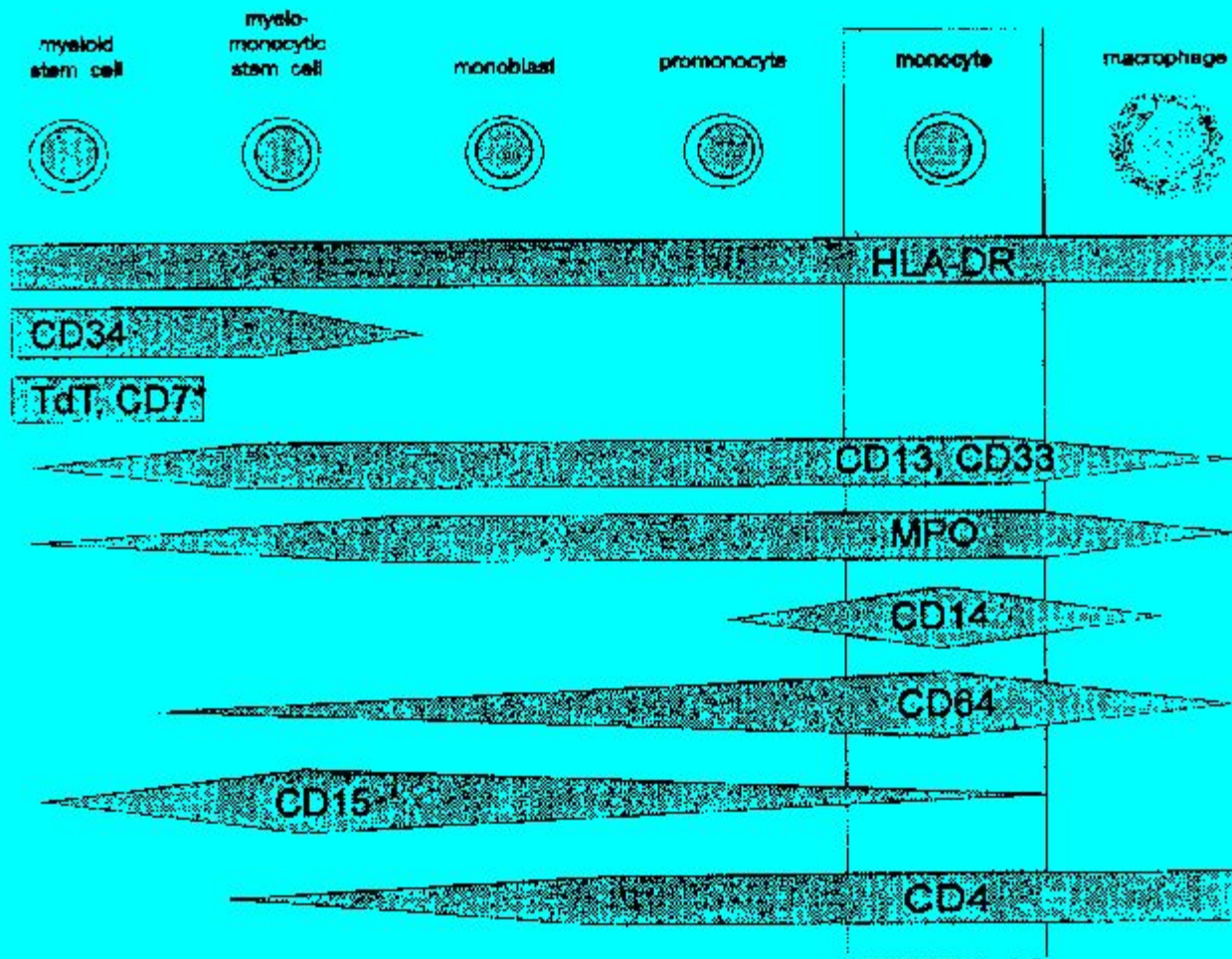
CD7


Острые миелобластные лейкозы

Neutrophil development



Monocyte development

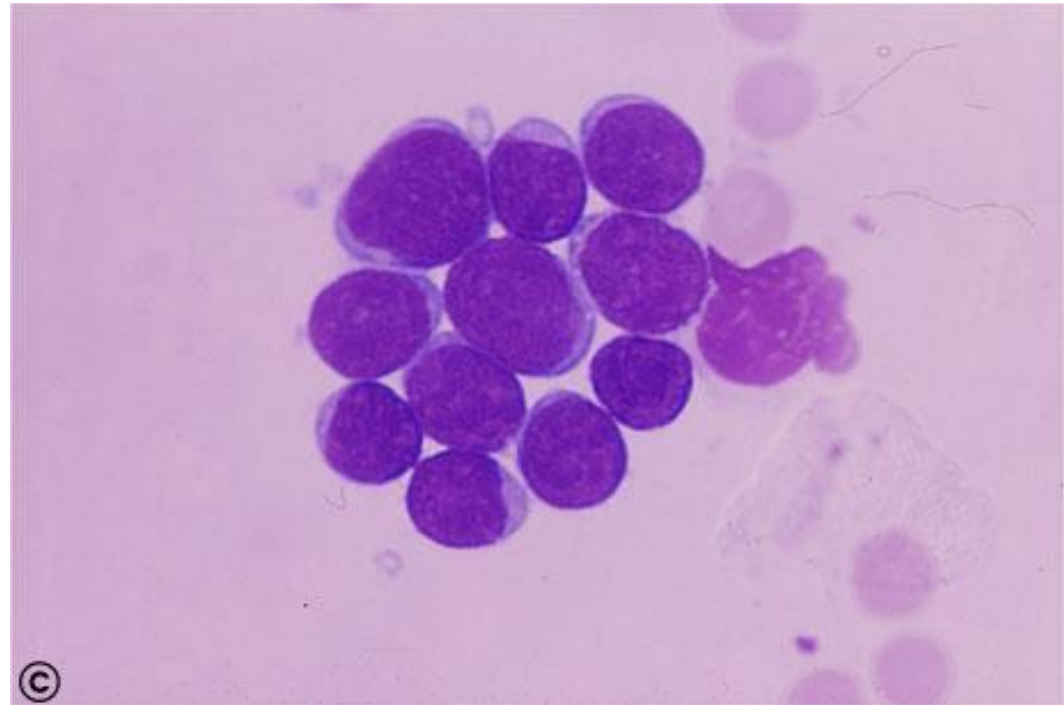


 **Диагностика морфологического
варианта АМЛ
не является задачей
иммунофенотипирования**

ОМЛ

с минимальной дифференцировкой бластов

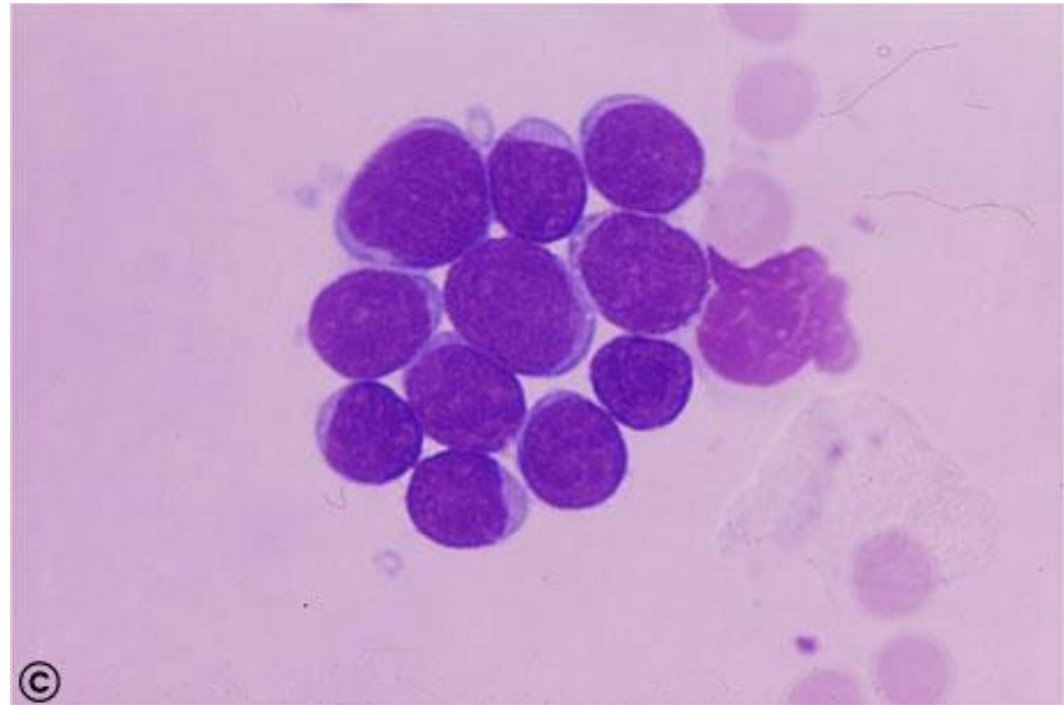
- 3-5% всех ОМЛ
- Бласты неспецифические, больших/средних размеров
- липиды(-), PAS(+)
диффузный фон
- + CD117, CD34, CD38, cytMPO
- +/- HLA-DR, CD13, CD33
- **Коэкспрессия** в 50-70%
TdT, CD7, CD2, CD4, CD10



ОМЛ

с минимальной дифференцировкой бластов

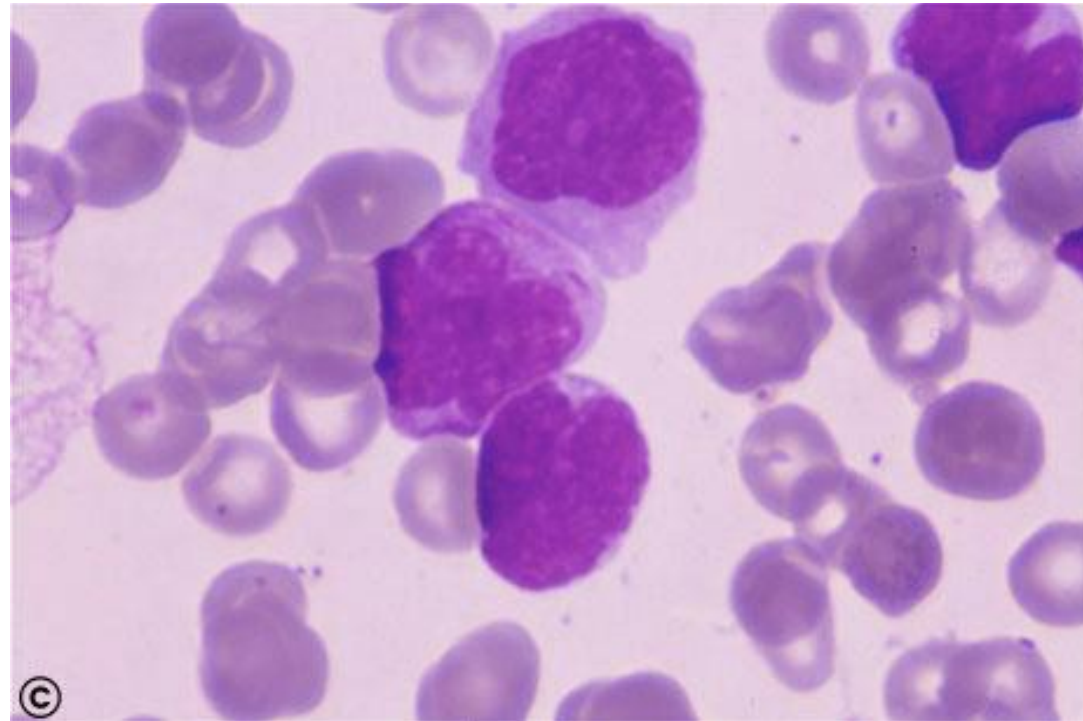
- 3-5% всех ОМЛ
- Бласты неспецифические, больших/средних размеров
- липиды(-), PAS(+)
диффузный фон
- + CD117, CD34, CD38, cytMPO
- +/- HLA-DR, CD13, CD33
- **Коэкспрессия** в 50-70%
TdT, CD7, CD2, CD4, CD10



ОМЛ

острый миелобластный лейкоз без созревания

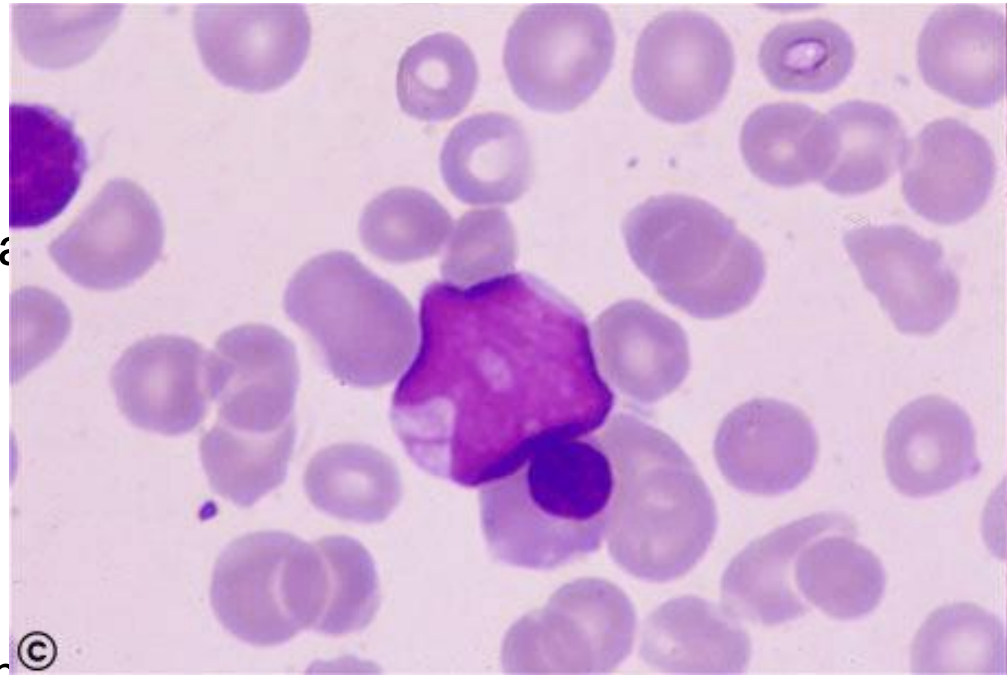
- 15% всех ОМЛ
- Бласты более полиморфны, наличие азурофильной зернистости или п.Ауэра менее 10% клеток
- МПО(+)>3%, липиды(+), α -эстераза(слабо+), PAS(+) в диффузной форме
- + CD33, CD13, CD117, CD65, cMPO, HLADR, CD38
- +/- CD11b, CD15, CD34(менее выражена, чем у M0)
- **Коэкспрессия CD4**



ОМЛ

острый миелобластный лейкоз с созреванием

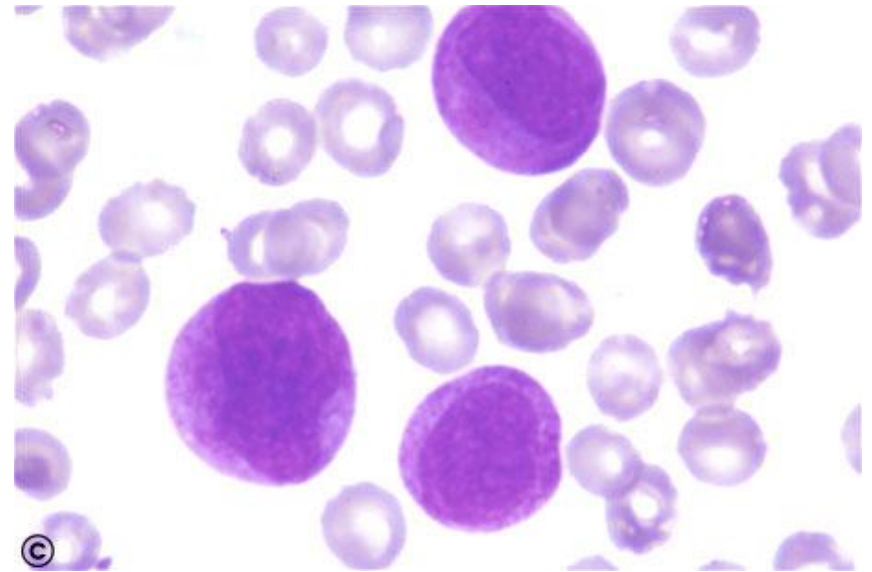
- Бласты средних и крупных размеров, наличие азурофильной зернистости или п.Ауэра
- МПО(+), липиды(+) α-эстераза (слабо+), PAS(+) в диффузной форме
- + CD33, CD13, CD117, CD65, cMPO, CD38
- +/- 50-60% HLADR, CD34;
- Возрастает экспрессия CD11b,[©] CD15, CD65
- **Коэкспрессия** CD2, CD7, CD10 (чаще, чем при M1)



ОМЛ М3

острый промиелоцитарный лейкоз

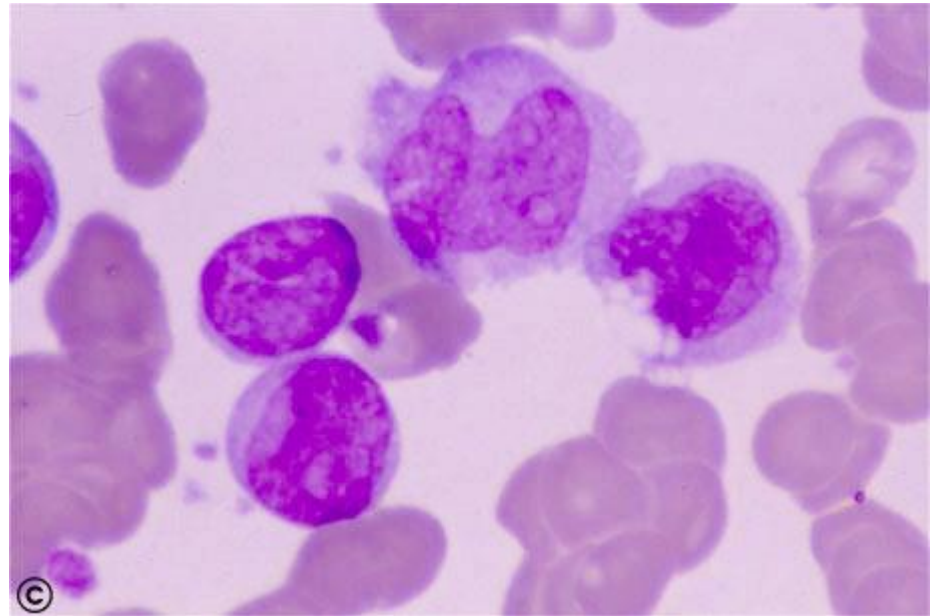
- Гипергранулярный и гипогранулярный вариант (M_{3v})
- Бласты средних размеров с полиморфизмом ядер (лопастные, бобовидной формы), нет нуклеол, ЦП голубого цвета с обильной азурофильной зернистостью, п.Ауэра.
- Бластов с зернистостью не менее 40% от общего числа бластов
- МПО(+++), липиды(+),
- α -эстераза(-)
- + CD33, CD13, CD117, CD65, cMPO, CD38
- +/- CD34(низкий уровень экспрессии), CD11b, CD15



ОМЛ

острый миеломонобластный лейкоз

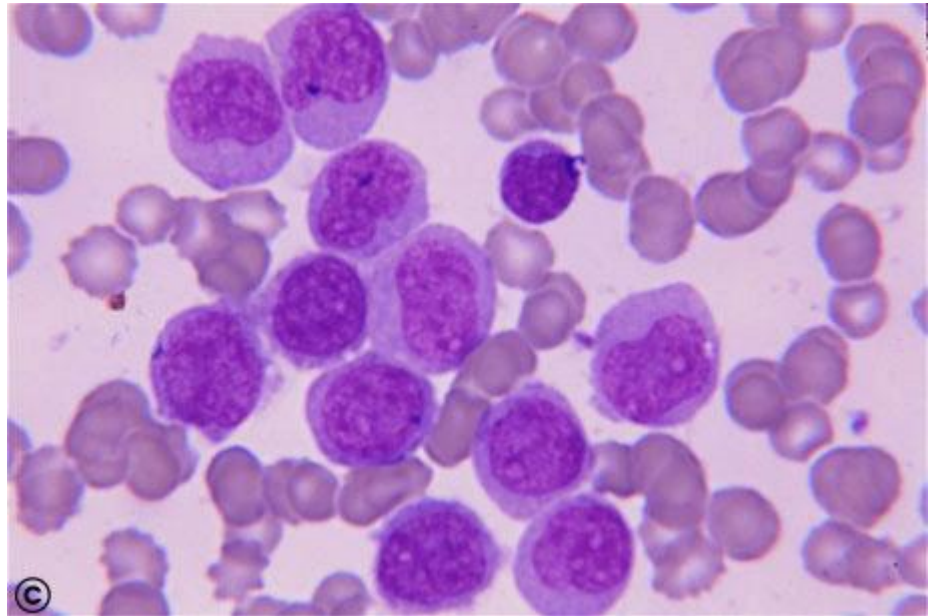
- 20% всех ОМЛ
- Две популяции бластов: миелобласты(М1 или М2) и монобласты(М5а или М5b)
- Монобласты: α-эстераза(+), ингибируется фторидом Na
- + CD33, CD13, CD117, CD65, cMPO, CD38; CD11b, CD11c, CD15, CD14, CD64, HLADR
- +/- CD4(моноцитоподобная направленность), CD2+ коррелирует с M4_{эоз}⁺ аномалии 16 хромосомы, CD34+/-



ОМЛ

острый монобластный лейкоз

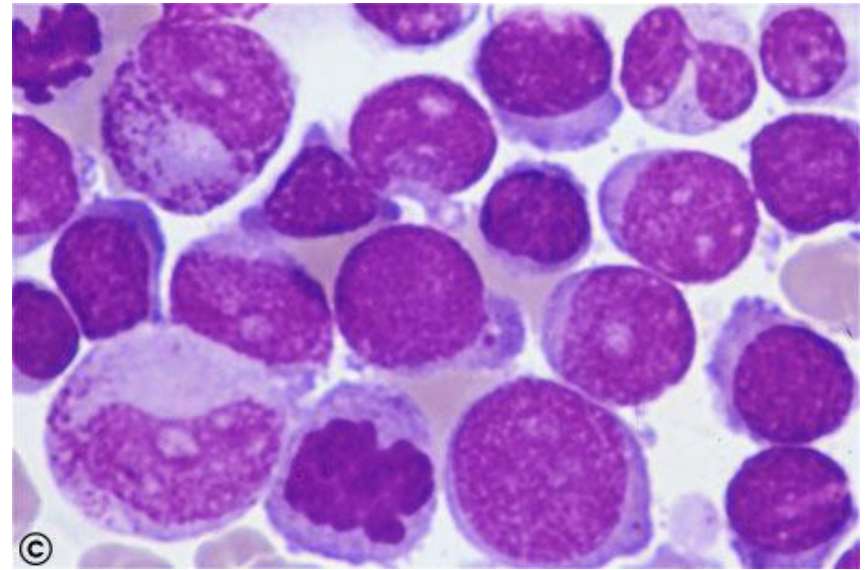
- 10% всех ОМЛ
- M5_a - без созревания, M5_b - с созреванием
- Морфологические критерии монобластов
- α-эстераза(+), ингибируется фторидом Na
- +/- MPO, CD11b, CD11c, CD36, CD4, HLADR, CD33, CD65, CD14, CD64, CD13, CD15
- +/- CD117, CD34(чаще негативны)



ОМЛ

острый эритромиелоз

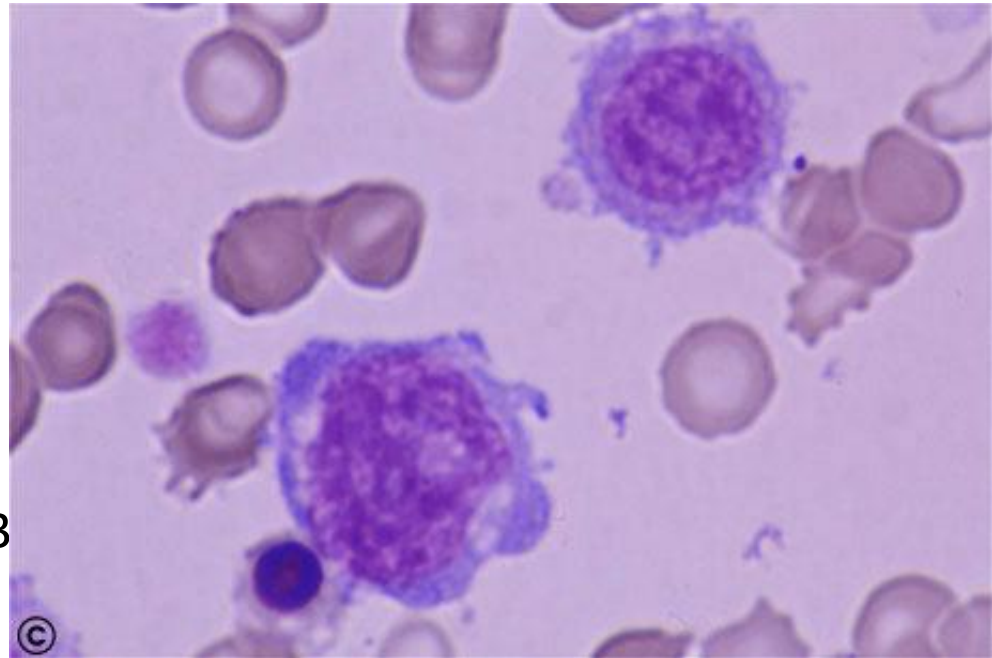
- 5% всех ОМЛ
- Два типа бластов:
эритроидные и миелоидные
- Высокая экспрессия GlyA++;
CD71
- HLADR+, CD38+,
CD34+/- (преобладание ранних
эритроидных
предшественников БОЕ-Э)
- Миелоидный компонент-
CD13, CD33, MPO
- Коэкспрессия CD7+/-



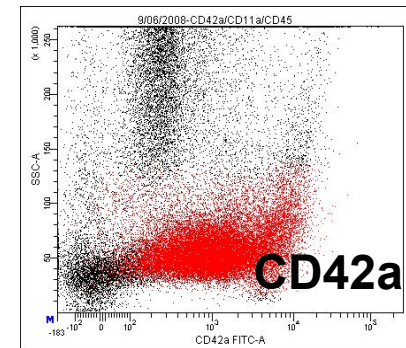
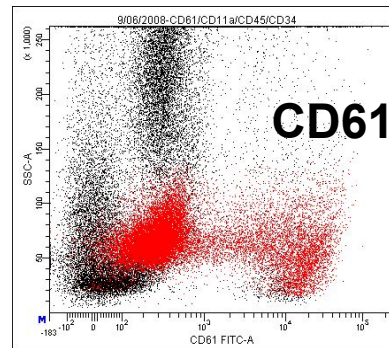
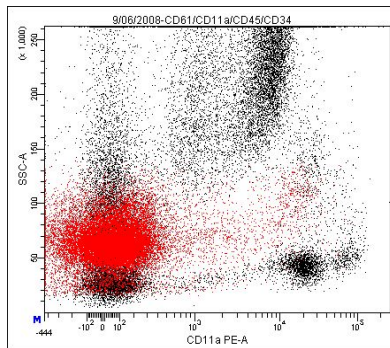
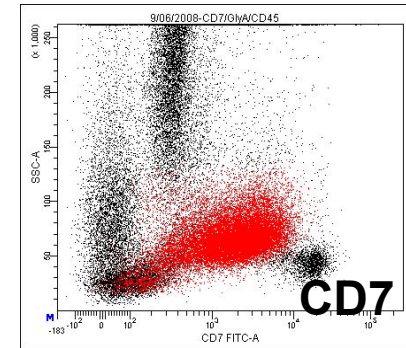
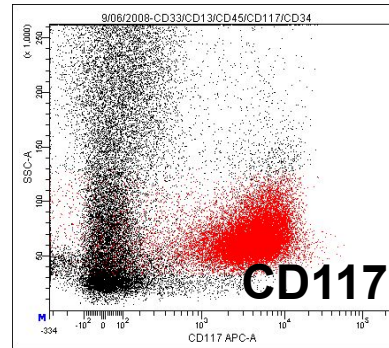
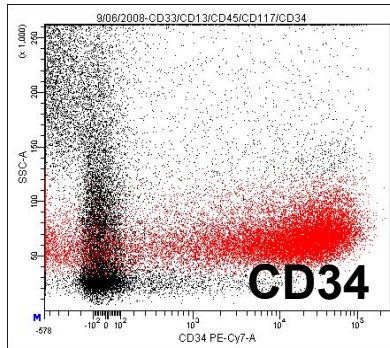
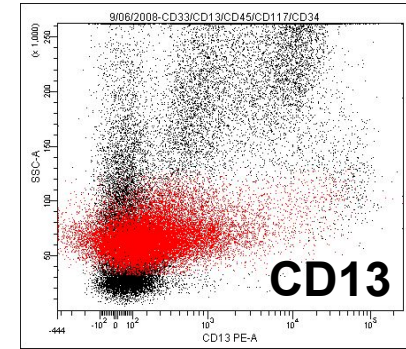
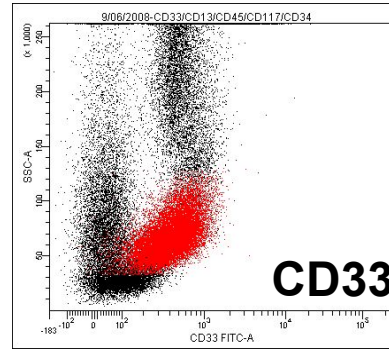
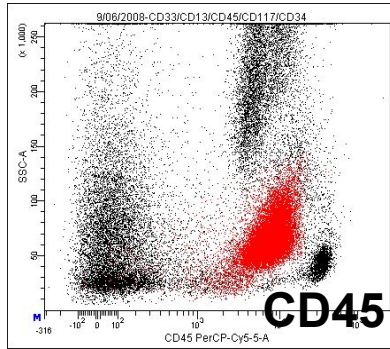
ОМЛ

острый мегакариобластный лейкоз

- 5%
- Бласты с гиперхромией ядерного хроматина, отростчатой, резко базофильной цитоплазмой
- МПО(-), α-эстераза(слабо+), PAS в диффузной форме в отдельных клетках
- + **CD41a, CD42b, CD61**
- + миелоидные антигены CD13 CD33; CD117+/-
- +/- линейно неограниченные антигены HLADR, CD38, CD34

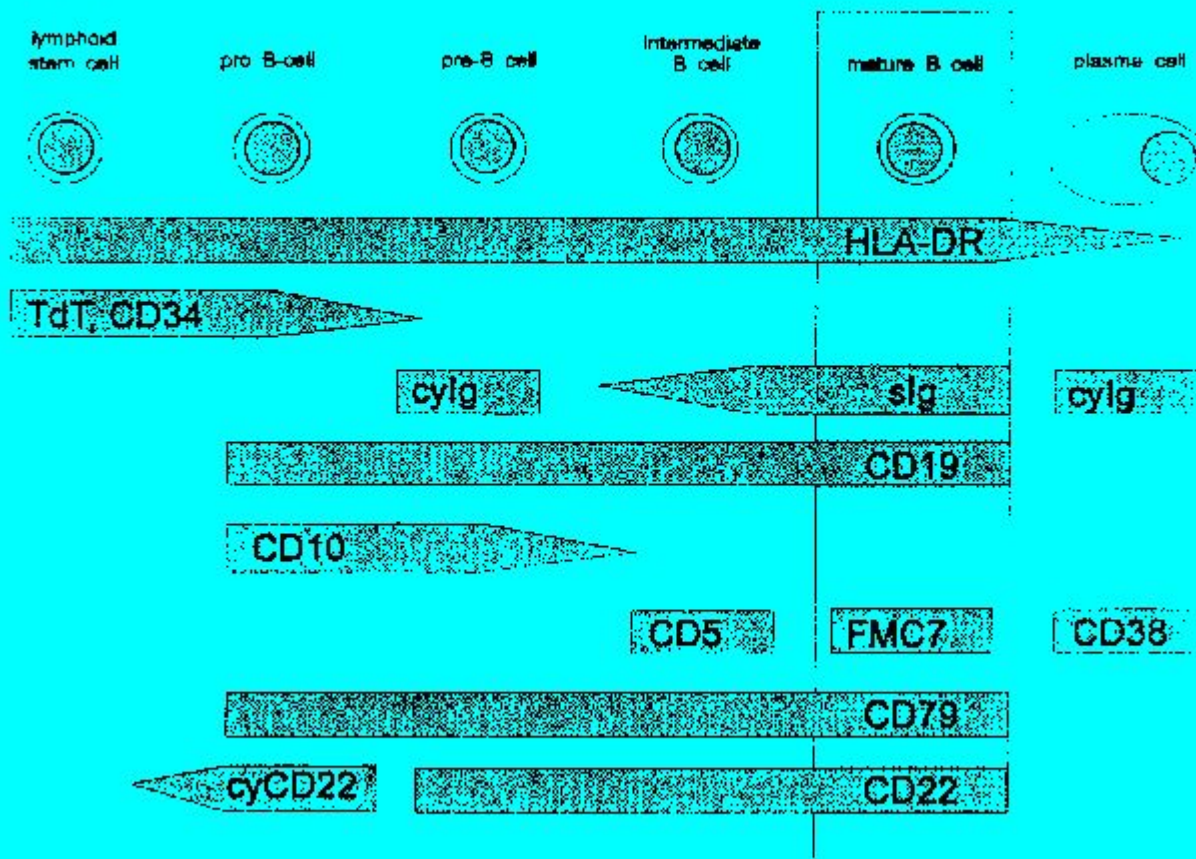


Острый миелоидный лейкоз при синдроме Дауна



Острые лимфобластные лейкозы

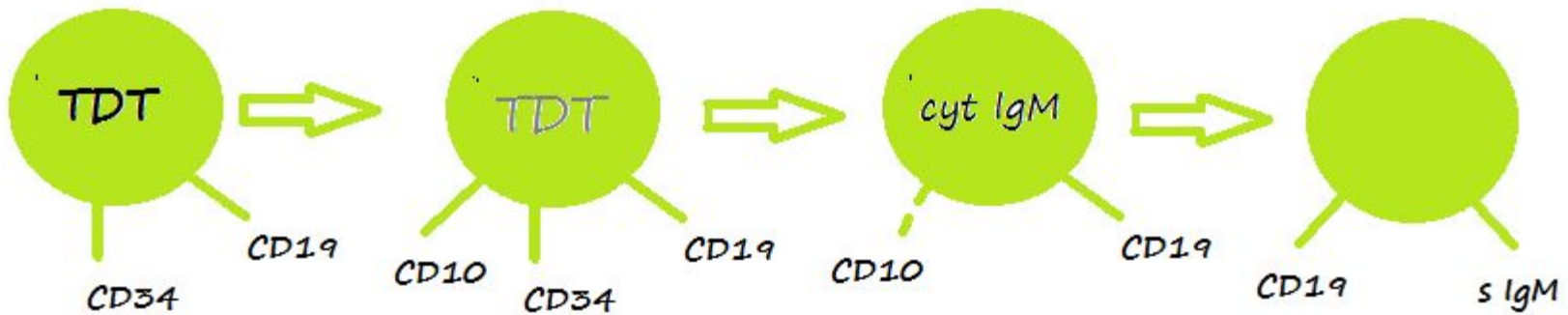
B-cell development



В-линейные острые лимфобластные лейкозы (*EGIL*)

Маркер	Pro-B (BI)	Common B (BII)	Pre-B (BIII)	B-ALL (BIV)
CD19	+	+	+	+
CD22 cyt	+	+	+	+
CD79a cyt	+	+	+	+
CD10	-	+	+/-	+/-
CD20	-/+	+/-	+/-	+/-
CD34	+/-	+/-	-/+	-
HLA-DR	+	+	+	+
TdT	+	+	+/-	-
IgM cyt	-	-	+	+/-
IgM surf	-	-	-	+

В-линейные острые лимфобластные лейкозы

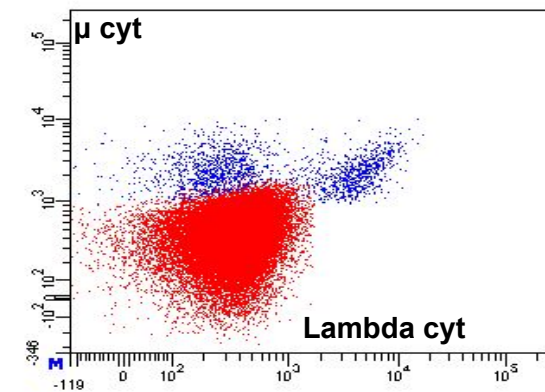
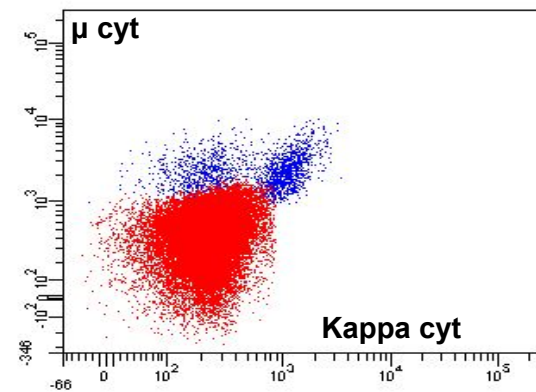
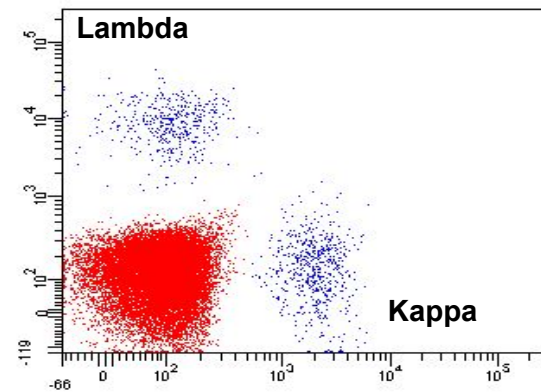
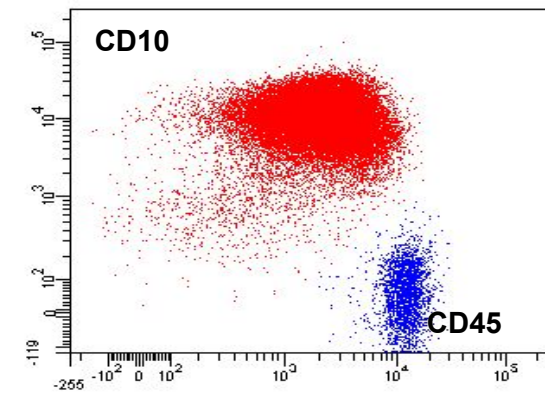
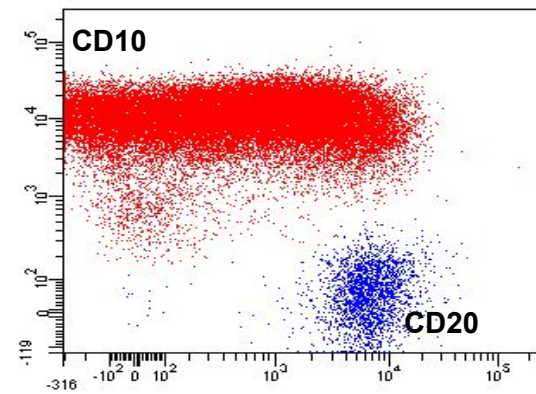
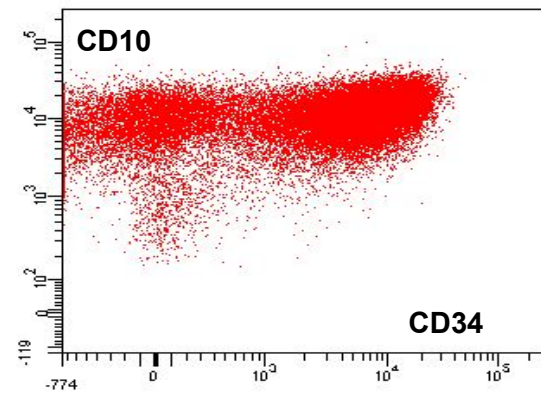
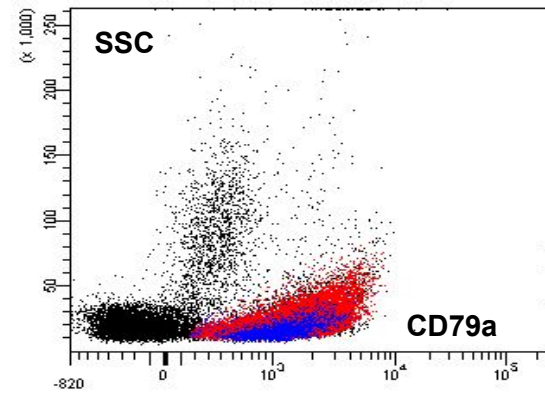
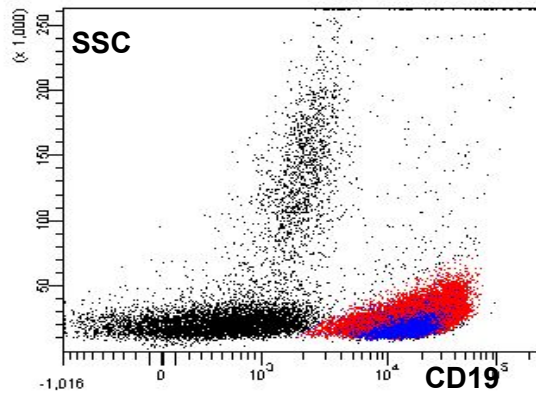
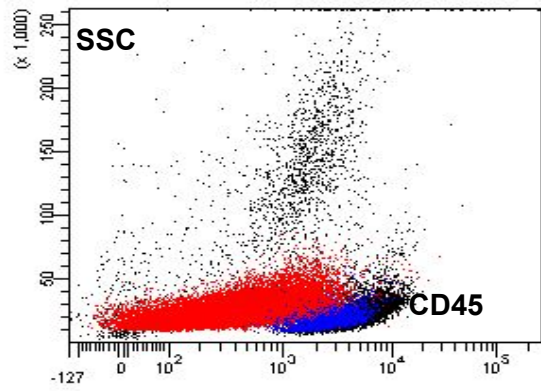


Pro-B (BI)

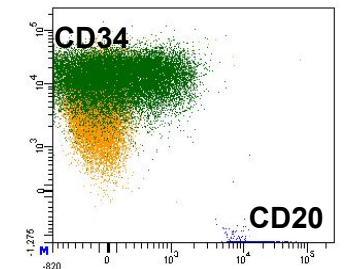
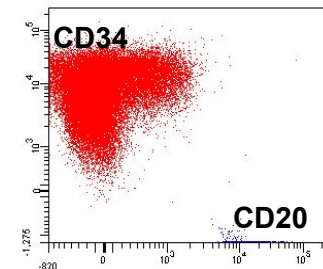
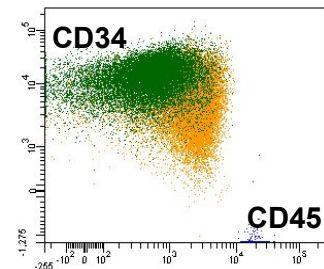
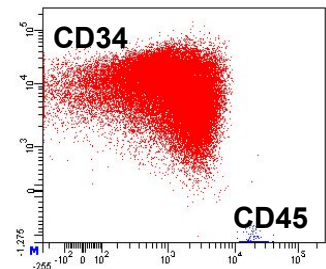
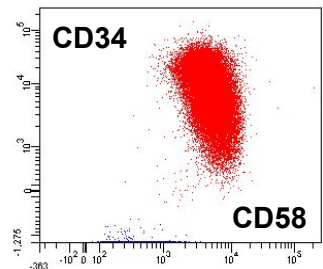
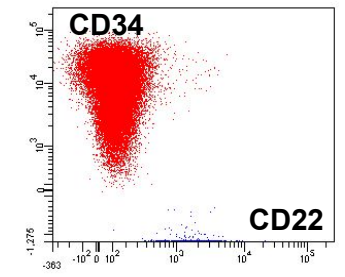
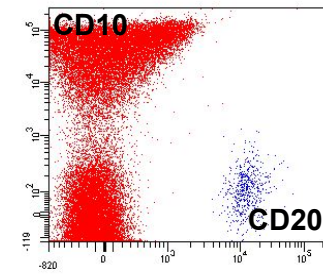
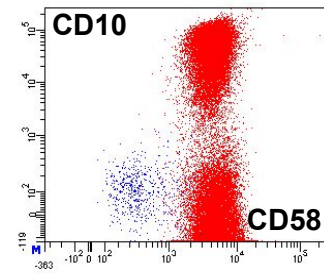
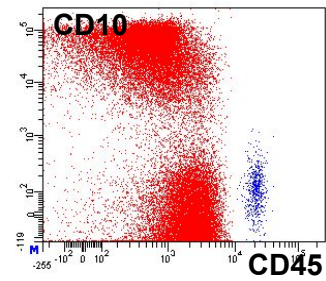
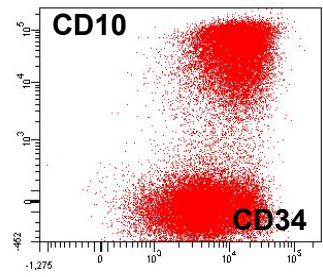
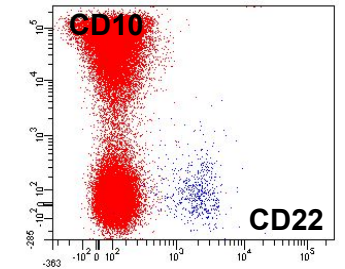
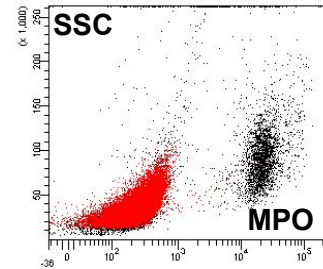
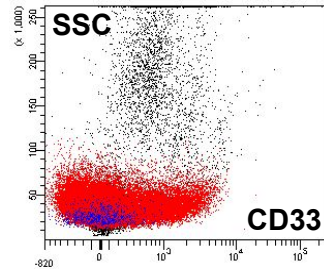
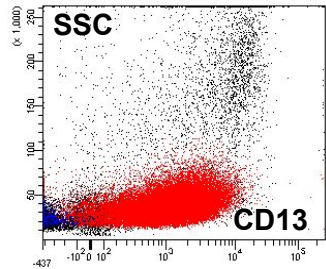
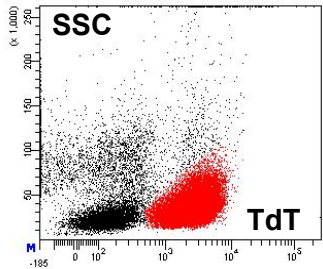
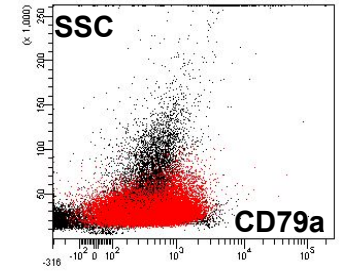
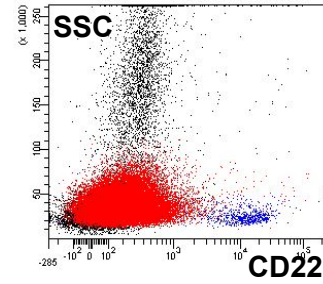
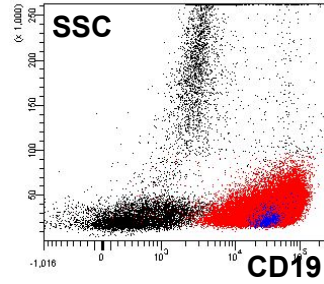
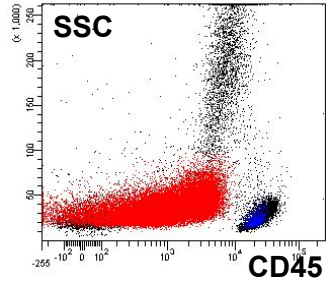
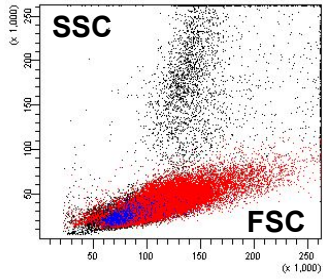
**Common B
(BII) pre-pre-B**

**Pre-B
(BIII)**

B-ALL (BIV)



В-ІІ ОЛЛ

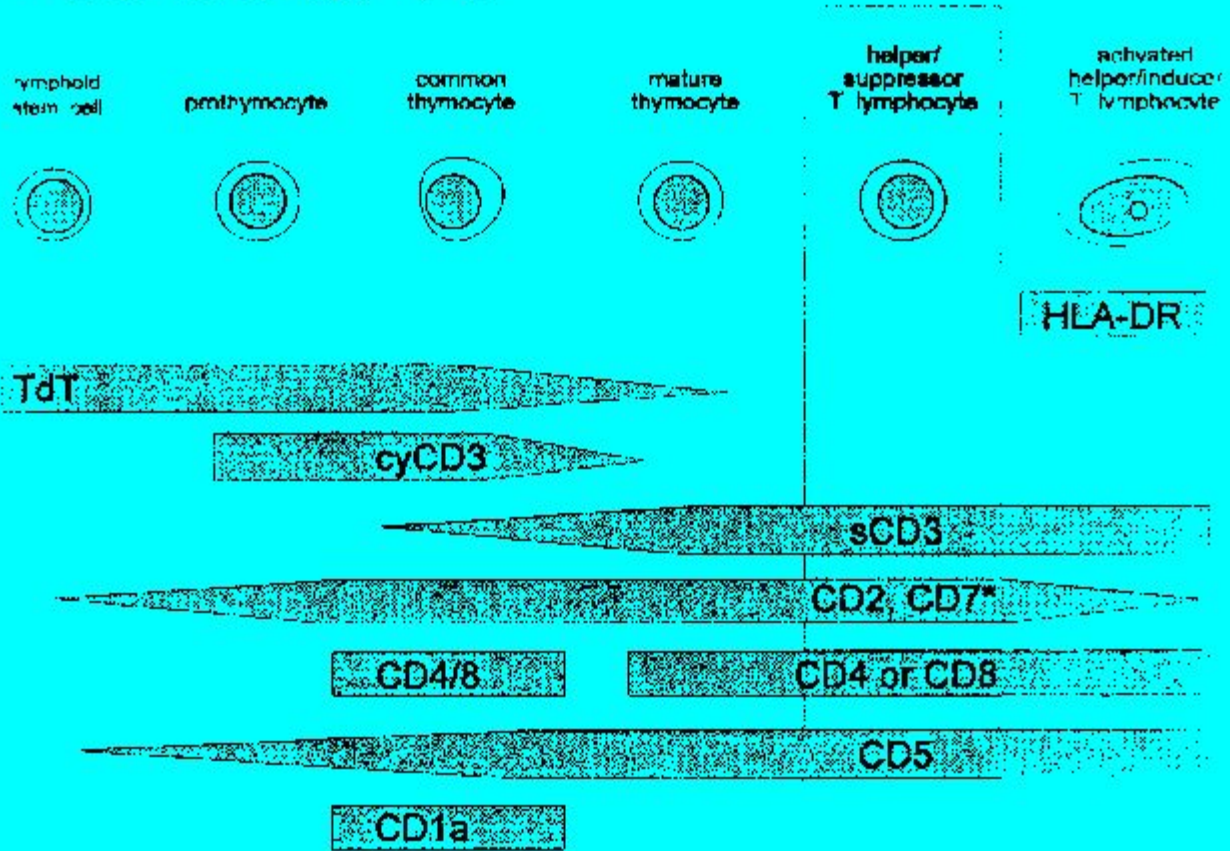


Диагноз: ВІ/ВІІ-ALL, CD13+CD33+

T-линейные острые лимфобластные лейкозы

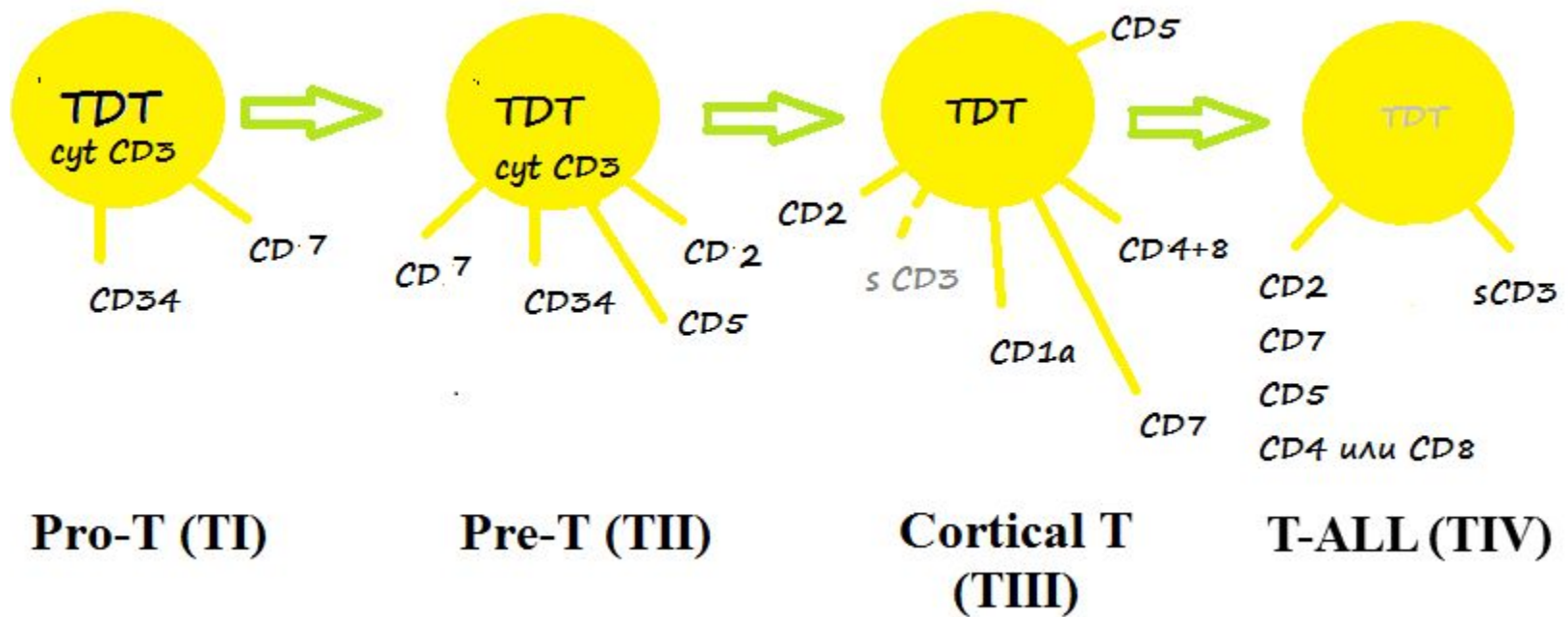
Маркер	Pro-T (TI)	Pre-T (TII)	Cortical T (TIII)	T-ALL (TIV)
TdT	+	+	+	+/-
CD3 cyt	+	+	+/-	-
CD7	+	+	+	+
CD2	-	+	+	+
CD1a	-	-	+	-
CD10	+/-	+/-	-/+	-
CD5	-	+	+	+
CD34	+/-	+/-	-	-
HLA-DR	+/-	-	-	-
CD3 surf	-	-	-/+	+
CD4+8	-	-	+	-
CD4 или CD8	-	-	+/-	+

T-cell development

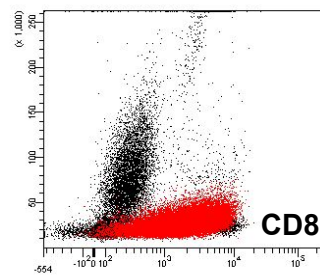
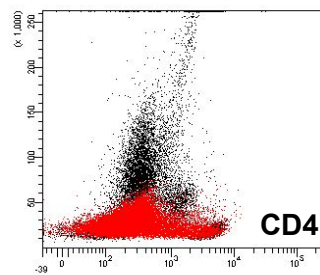
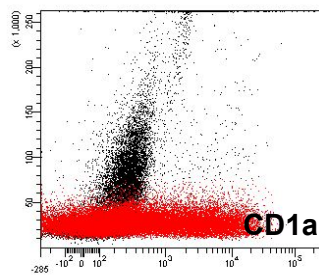
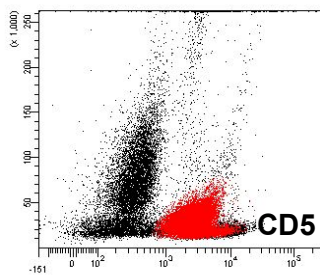
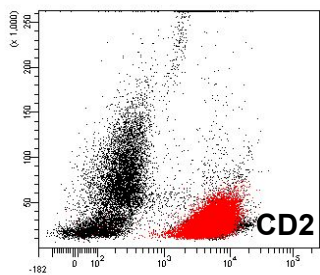
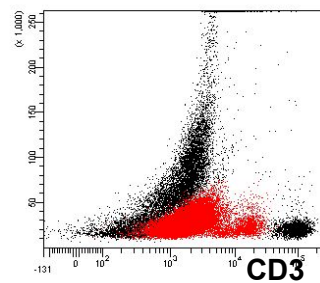
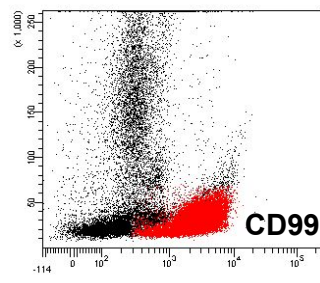
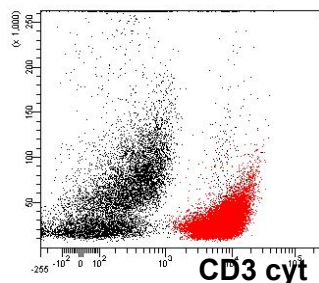
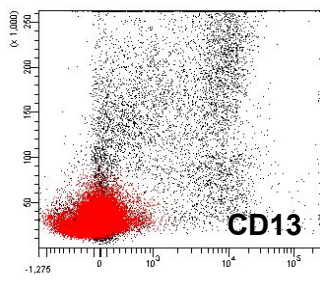
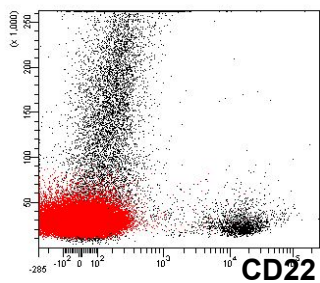
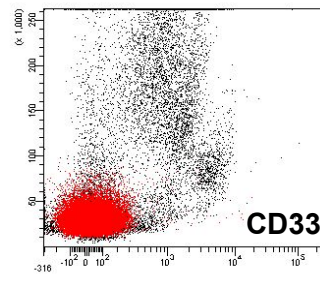
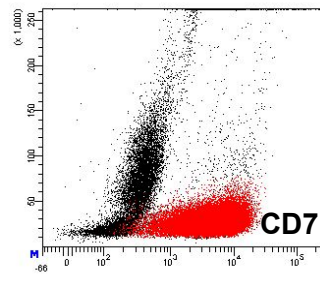
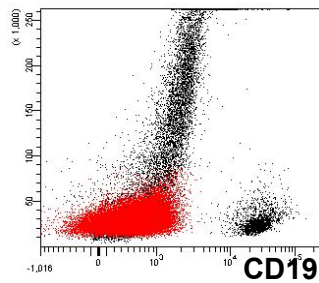
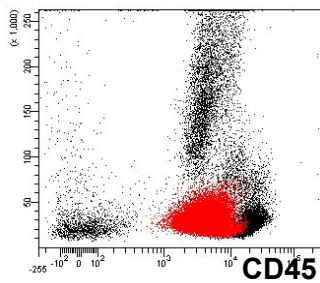
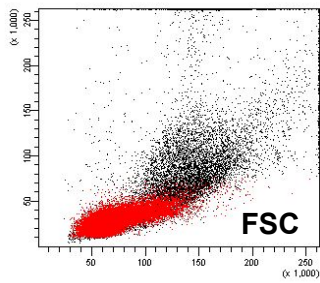


*CD7 is lost during late stages of T memory cell development

T-линейные острые лимфобластные лейкозы

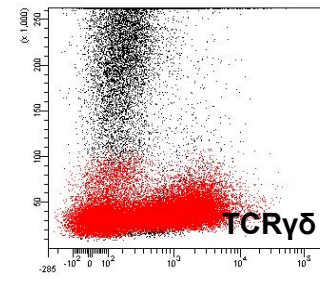
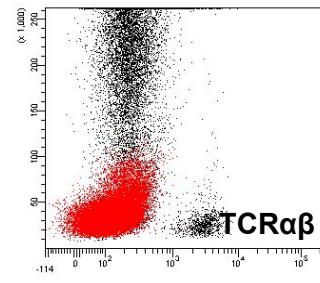
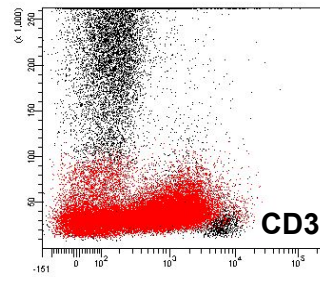
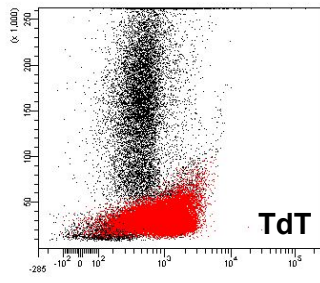
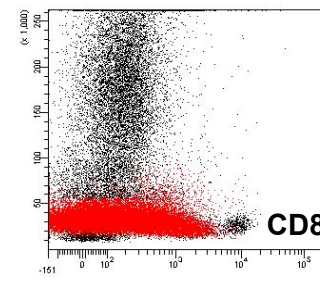
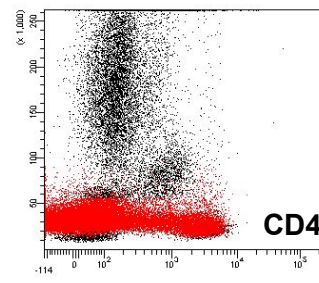
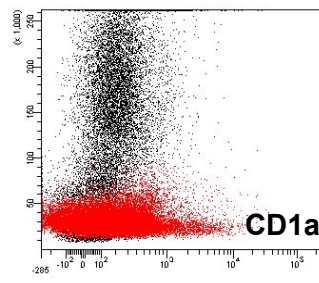
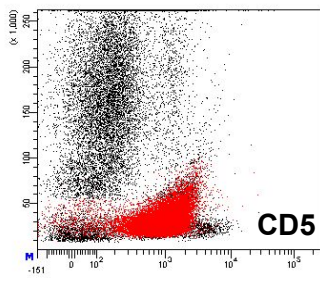
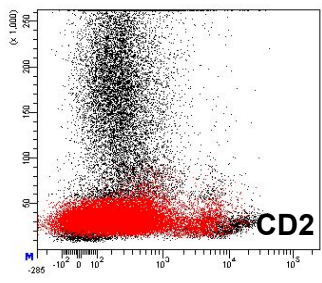
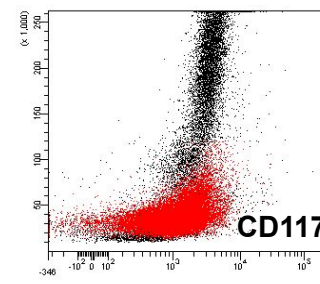
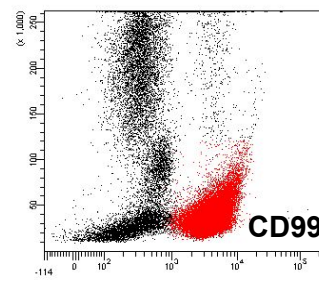
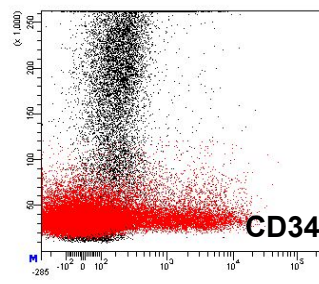
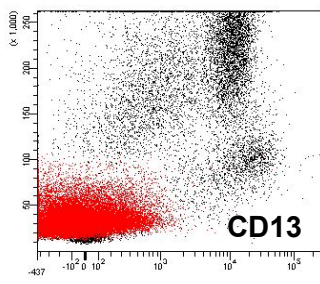
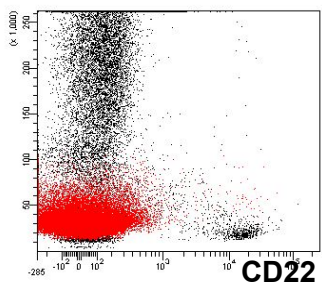
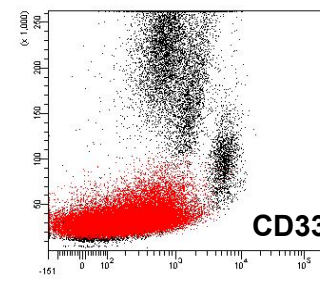
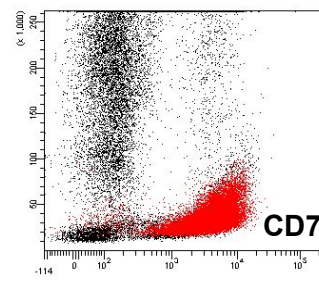
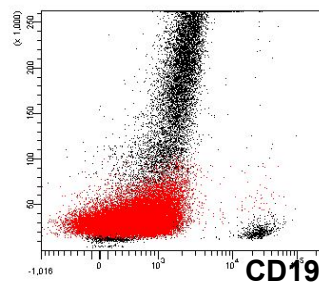
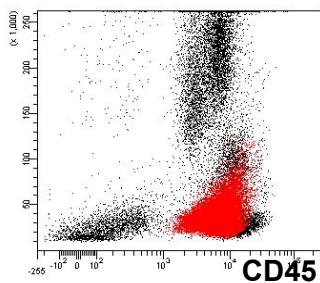
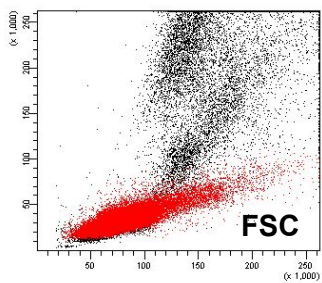


Пациент С.



Диагноз: ТШ-ALL

Пациент Н



Диагноз: TIV-ALL, CD33+

Определение линейной принадлежности опухолевых клеток (ВОЗ, 2008)

✓ Миелоидная линия

✓ Миелопероксидаза, определенная любым методом

или

✓ Не менее двух моноцитарных антигенов (НСЭ, CD11c, CD64, CD14, лизоцим)

✓ Т-линия

✓ Цитоплазматическая экспрессия CD3, определенная методом проточной цитометрии с использованием антител к ξ цепи рецептора

или

✓ Мембранная экспрессия CD3

✓ В-линия

✓ Яркая экспрессия CD19 и как минимум одного из следующих антигенов: CD10, cytCD22, cytCD79a

или

Острый бифенотипический лейкоз EGIL

Баллы	В-линейные	T-линейные	Миелоидные
2	CD79a (s/cyt) CD22 (s/cyt) cytIgM	CD3 (s/cyt) TCR$\alpha\beta$ TCR$\gamma\delta$	MPO
1	CD19 CD20 CD10	CD2 CD5 CD8 CD10	CD13 CD33 CDw65 CD117
0,5	TdT CD24		CD14 CD15 CD64

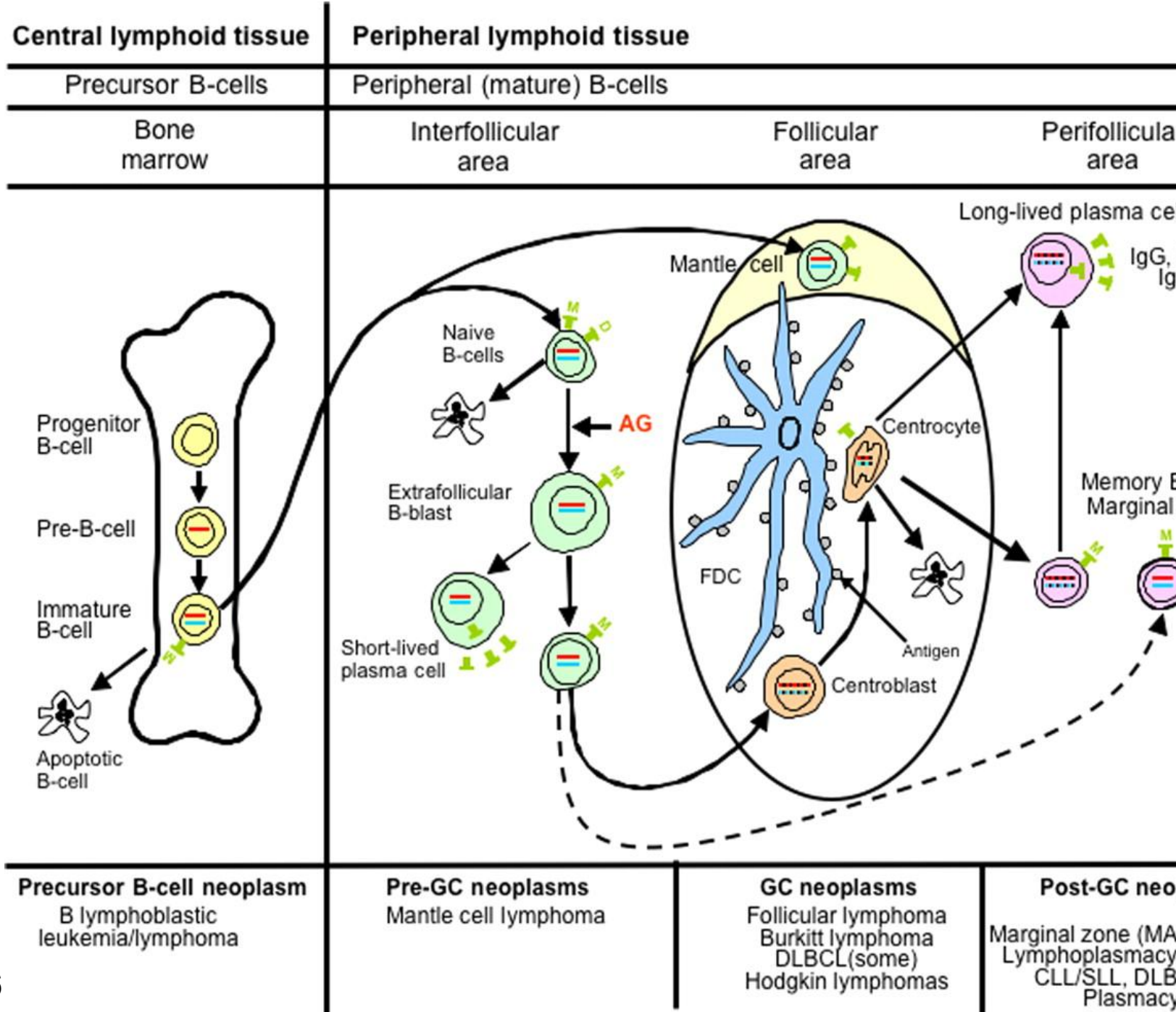
Острый бифенотипический лейкоз

- ✓ Диагноз выставляется при сумме баллов больше 2 для миелоидной и одной из лимфоидных линий

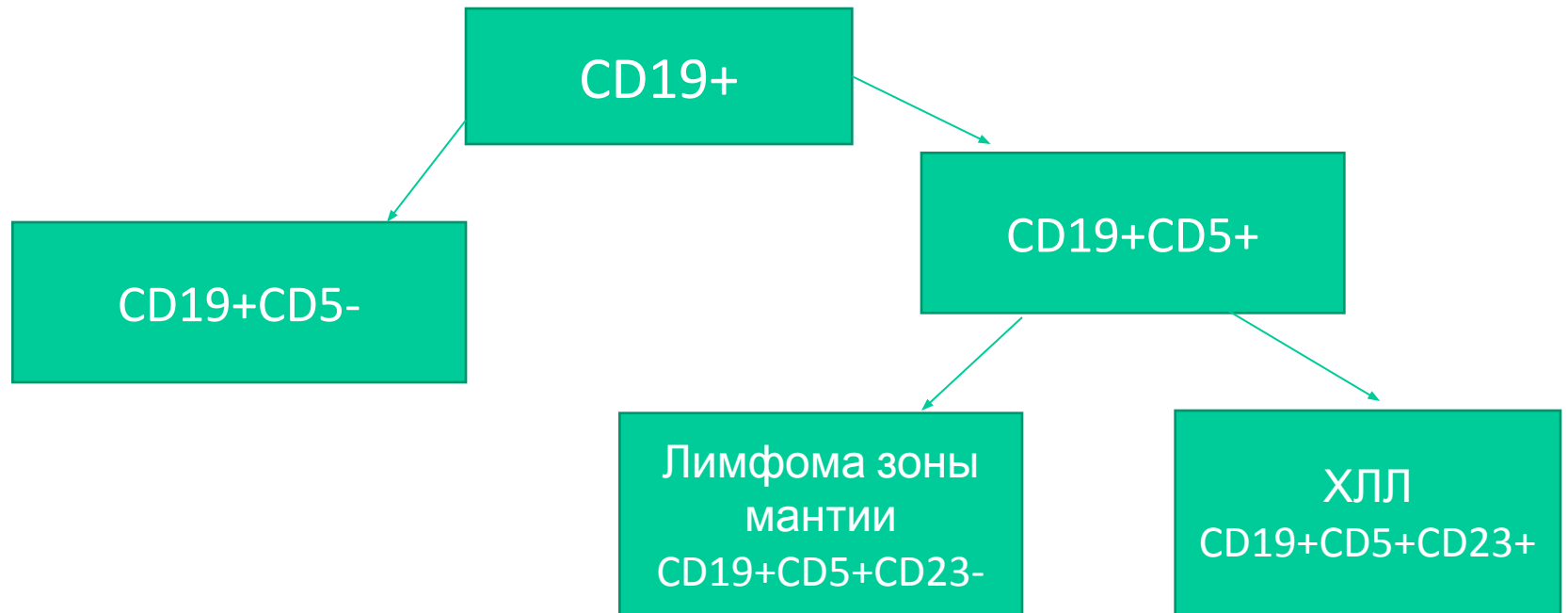
Хронические
лимфопролиферативные
заболевания

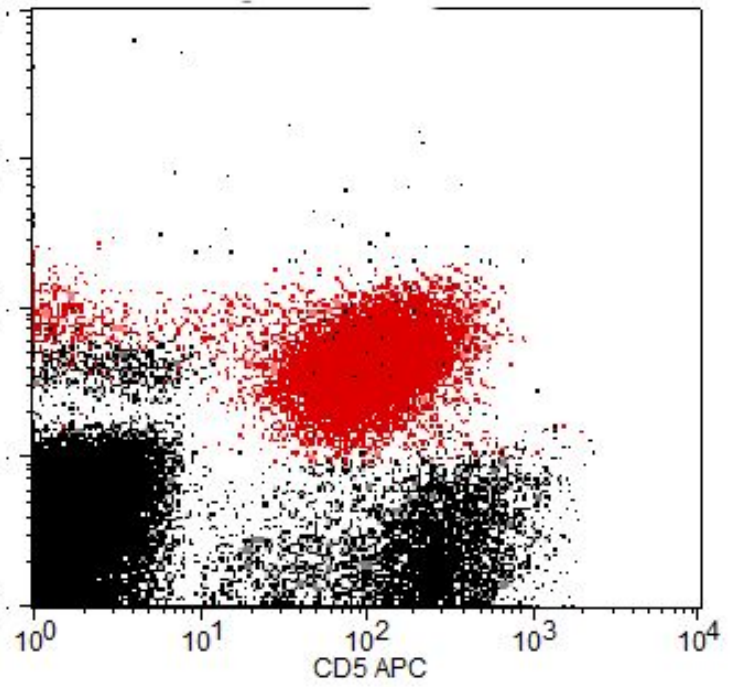
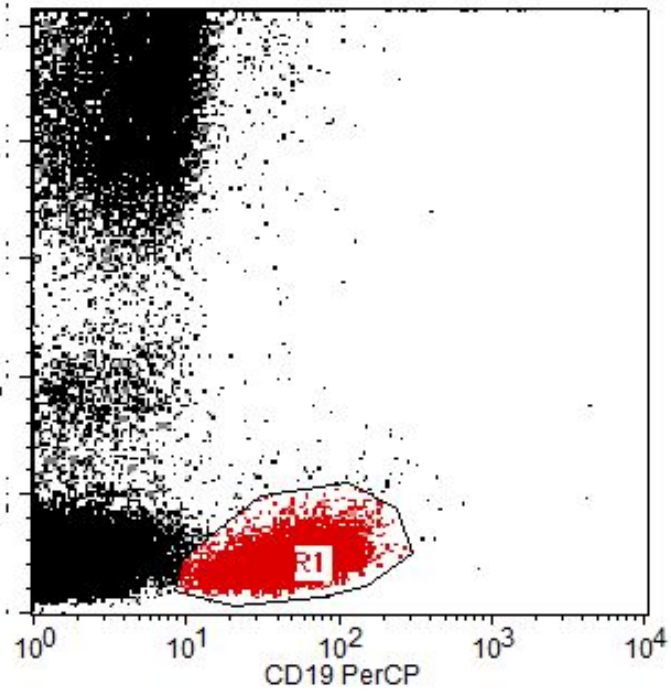
WHO classification of B cell malignancy 2008

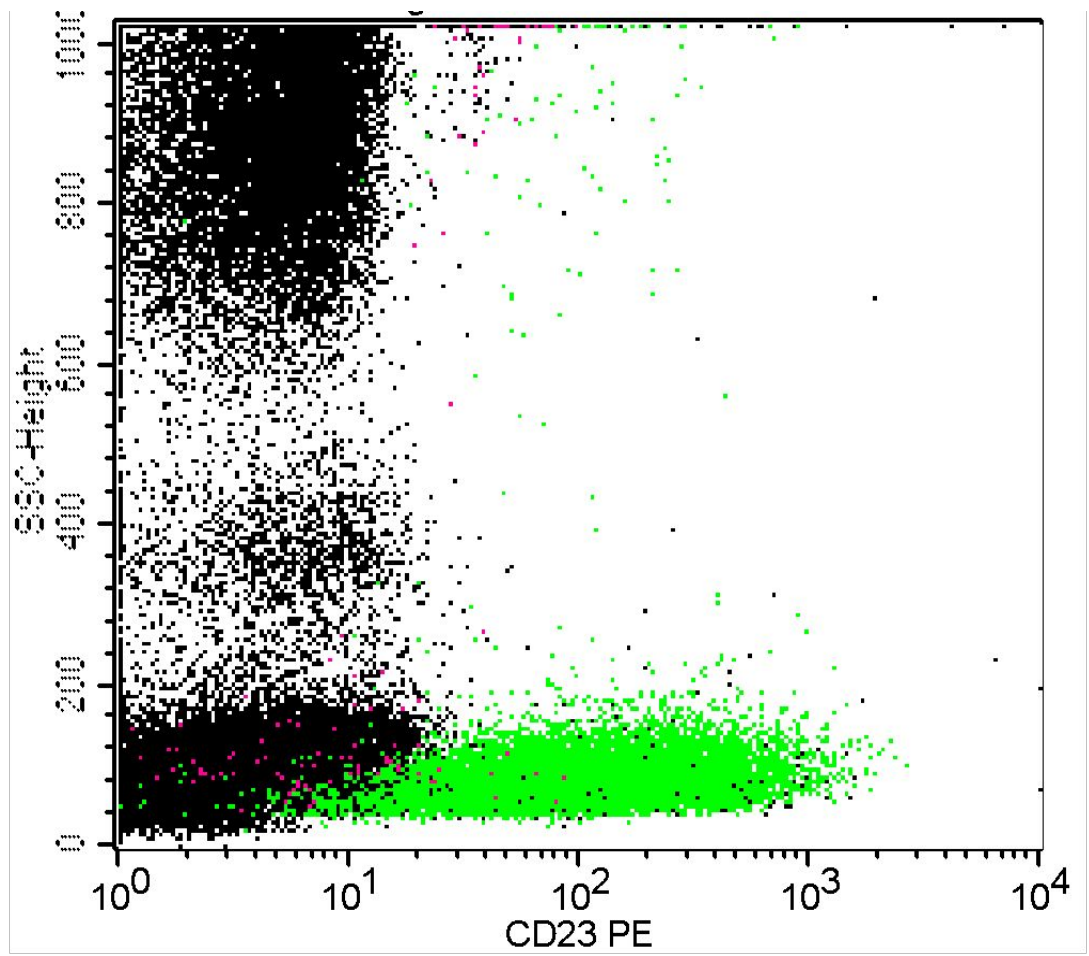
- Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma
- B-cell prolymphocytic leukemia
- Splenic marginal zone lymphoma
- Hairy cell leukemia
- *Splenic lymphoma/leukemia, unclassifiable*
- *Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma**
- *Hairy cell leukemia-variant**
- Lymphoplasmacytic lymphoma
- Waldenström macroglobulinemia
- Heavy chain diseases: Alpha heavy chain
 Gamma heavy chain Mu heavy chain
- Plasma cell myeloma
- Solitary plasmacytoma of bone
- Extranasal plasmacytoma
- Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)
- Nodal marginal zone B-cell lymphoma (MZL)
 - *Pediatric type nodal MZL*
- Follicular lymphoma
 - *Pediatric type follicular lymphoma*
- Primary cutaneous follicle center lymphoma
- Mantle cell lymphoma
- Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), not otherwise specified
 - T cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma
 - *DLBCL associated with chronic inflammation*
 - *Epstein-Barr virus (EBV)+ DLBCL of the elderly*
 - Lymphomatoid granulomatosis
 - Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
 - Intravascular large B-cell lymphoma
 - *Primary cutaneous DLBCL, leg type*
 - ALK+ large B-cell lymphoma
 - Plasmablastic lymphoma
 - Primary effusion lymphoma
 - *Large B-cell lymphoma arising in HHV8-associated multicentric Castleman disease*
- Burkitt lymphoma
 - *B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma*
- B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma

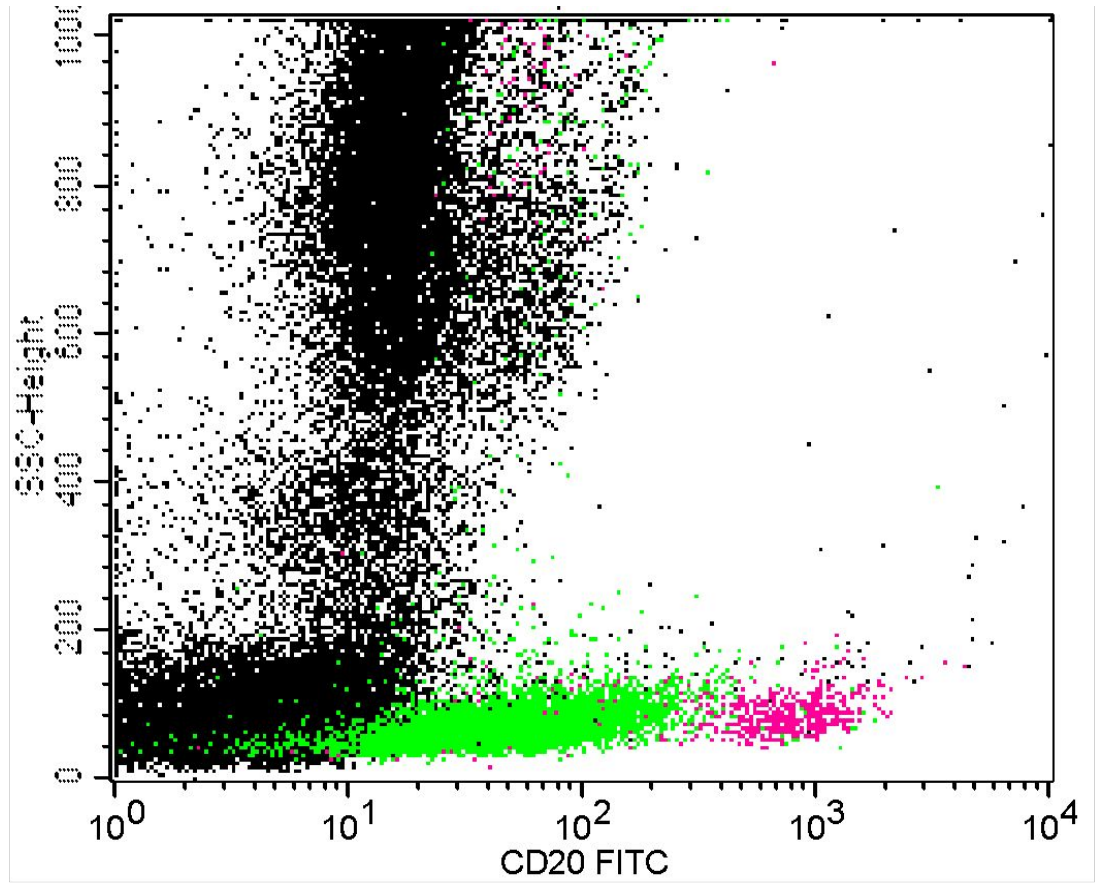


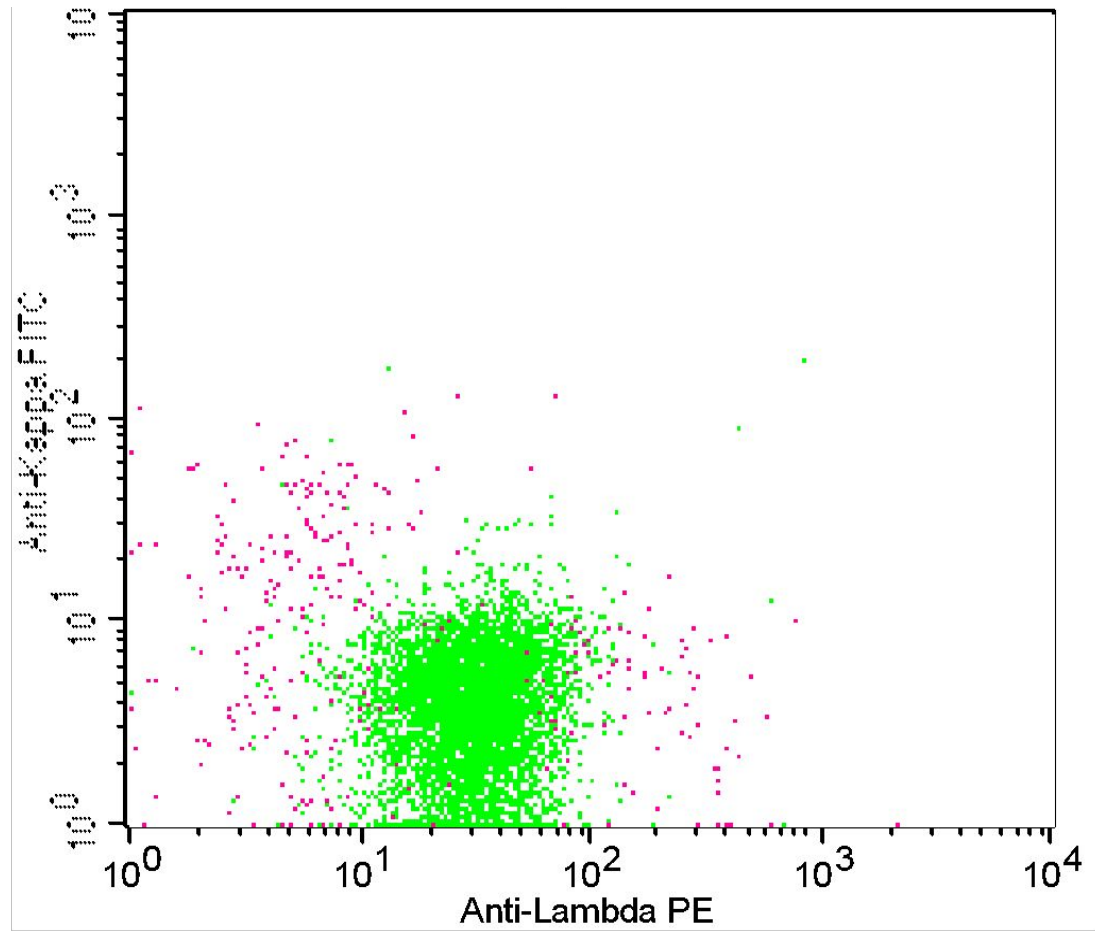
Дифференциальная диагностика ХЛПЗ методом проточной цитометрии











Типичный иммунофенотип ХЛЛ и случаи с атипичным иммунофенотипом

CD19+ CD5+ CD20dim+ CD23+ CD22+/- CD79b+/-
CD43+ CD200+ sIgM dim

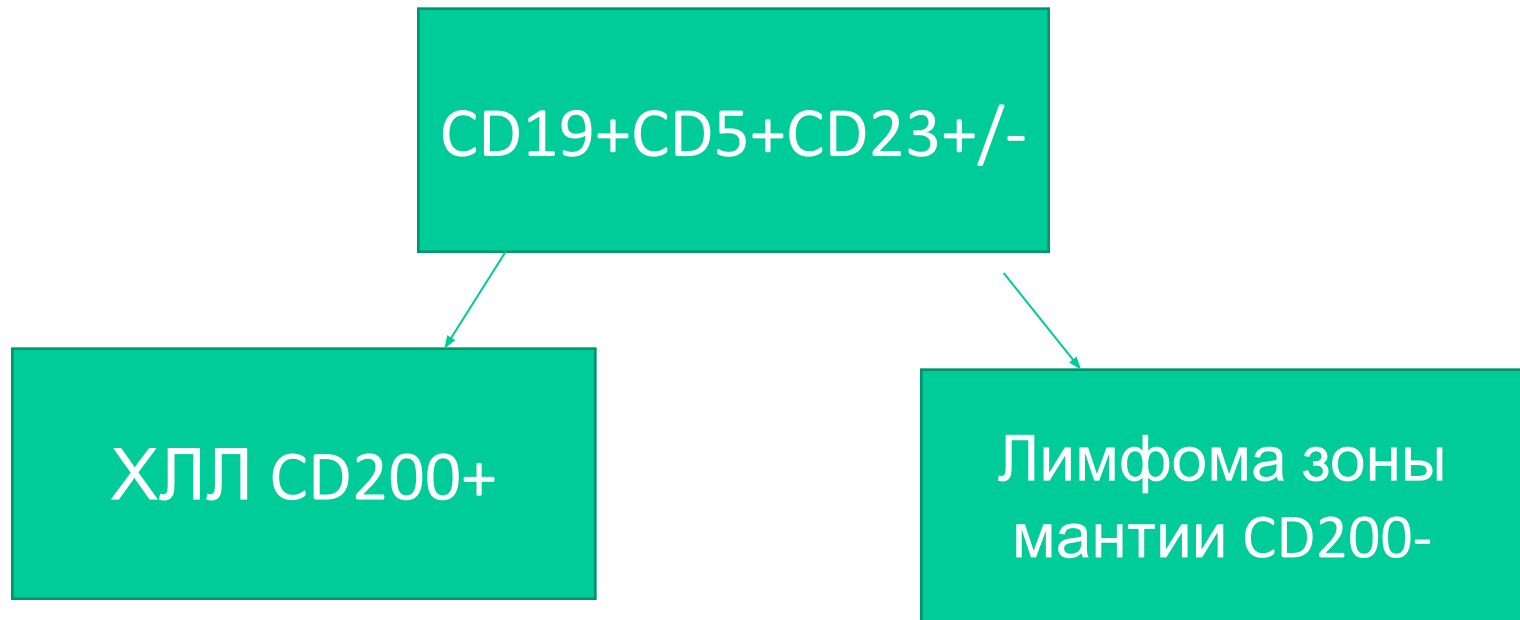
Атипичные варианты CD 5dim CD20bright+
CD23+/- CD22bright CD79bright CD43-
дифференциальная диагностика с
лимфомой зоны мантии, лимфомой
маргинальной зоны,
лимфоплазмочитарной лимфомой

Лимфома зоны мантии

Типичный иммунофенотип

- CD19⁺ CD5⁺ CD20^{bright} CD23⁻ CD22^{bright} CD79b⁺⁺ CD43⁻ CD200⁻
- Атипичные варианты: CD 5dim CD23^{+/-} - дифференциальная диагностика с ХЛЛ, лимфомой маргинальной зоны, лимфоплазмочитарной лимфомой

Дифференциальный диагноз атипичных случаев



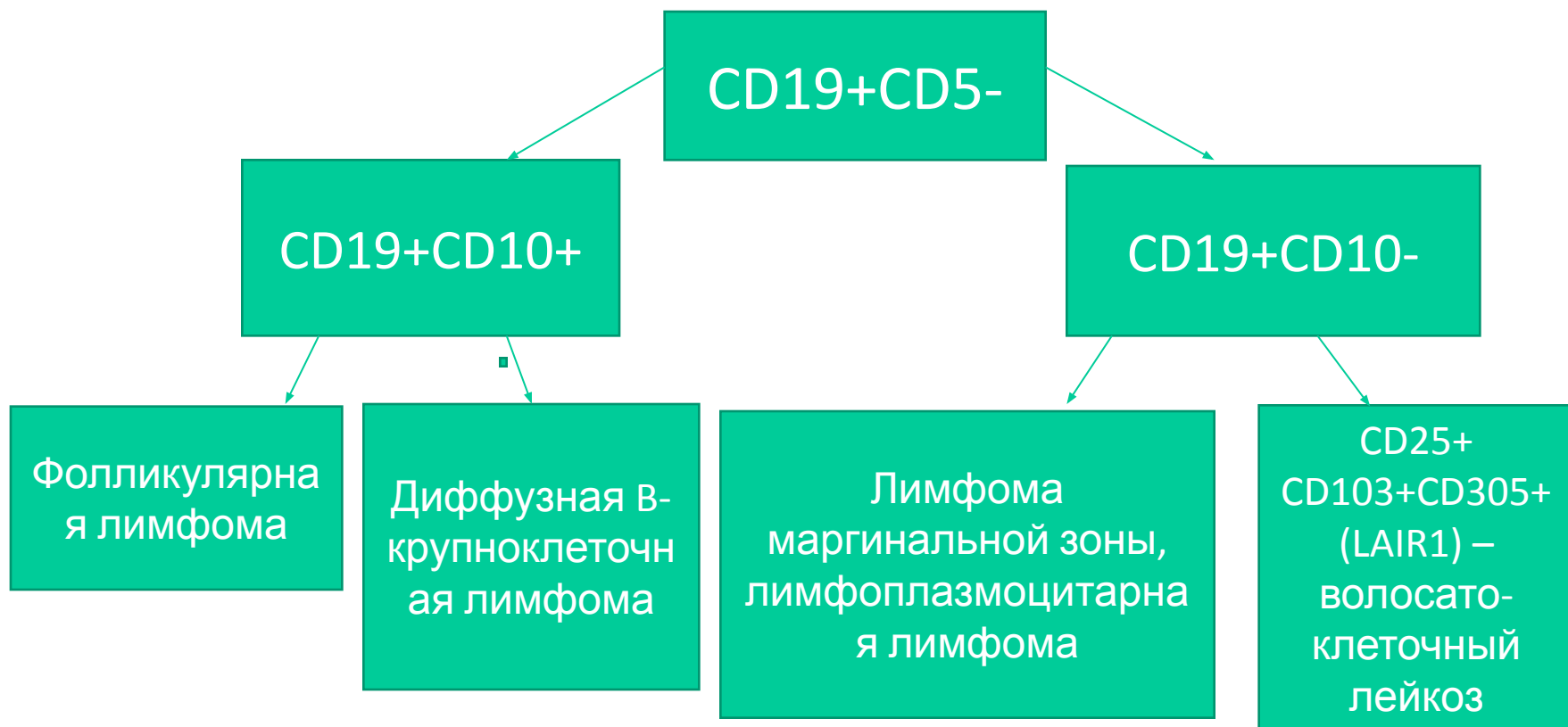
Лимфома зоны мантии

Необходимо цитогенетическое и/или
иммуногистохимическое
подстверждение

Транслокация t (11;14) определяется в
цитогенетической лаборатории методом
FISH

Экспрессия циклина D1 (иммуногистохимия)

Дифференциальная диагностика CD19+CD5- лимфом



Дифференциальная диагностика

Волосато-клеточный лейкоз – морфология, иммунофенотипирование, цитохимия – тартрат-резистентная кислая фосфатаза, мутации *BRAF V600E*, *MAP2K1*

Лимфоплазмочитарная лимфома, макроглобулинемия Вальденстрема – морфология, иммунофенотипирование, секреция IgM (парапротеинемия) мутация *MYD88 L265P*

Фолликулярная лимфома – иммунофенотипирование, транслокация t (14:18)

Лимфома маргинальной зоны – иммунофенотипирование, иммуногистохимическое исследование

Вариант В- НХЛ	+	+/-	-
В-лимфобластная лимфома из клеток предшественников	TdT, CD19, cCD79a, HLADR, CD20	CD10, CD20, CD34	slg
		CD13, CD33	
		CD11c, CD25	
В-ХЛЛ	cCD79a, CD20, CD19, CD23 , CD43, CD5 , CD200 slgdim		CD10 , CD22(or dim)
Пролимфоцитарный лейкоз	cCD79a, CD20, CD19, slg(bright)	CD5 чаще(+)	CD10
ВКЛ	cCD79a, CD20, CD19, CD22, CD25 , CD11b , CD103, slg		CD5 , CD10 , CD43 , CD23
ФЛ	cCD79a, CD20, CD19, CD22, Bcl2, slg	CD10 чаще(+)	CD5 , CD43 , CD11c
Лимфома маргинальной зоны селезенки	cCD79a, CD20, CD19, CD22, slg	CD5 чаще(-)	CD10 , CD23 , CD21, CD35, Bcl6
Лимфома из клеток мантийной зоны	cCD79a, CD20, CD19, CD22, CD43 , slg, CD5 , cyclinD1	CD10+(blastic variant)	CD23 , CD10 , CD11c CD200
ДВККЛ	cCD79a, CD20, CD19, CD22, CD45, Bcl2 , Ki67<90% , slg	CD5 , CD10	
Лимфома Беркита	cCD79a, CD20, CD19, CD22, CD10 , CD38, CD43 , slg, CD21(EBV) , Ki67>90%		Bcl2 , Bcl6 , CD5

Множественная миелома

- CD38bright
- CD138+
- CD45+, small subset CD45low or negative
- CD19-, CD20-, CD22-
- CD79a+/-, CD56+/-
- CD117+/-
- sIg++

*Provisional entities
change from 2008

Mature T- and NK-cell Neoplasms

WHO classification 2016

Mature T-cell Leukemias (leukemic/disseminated)

- T-cell prolymphocytic leukemia (T-PLL)
- T-cell LGL leukemia (T-LGL)
- Chronic LPD of NK cells*
- Aggressive NK-cell leukemia
- # Systemic EBV+ T-cell lymphoma of childhood
- Adult T-cell lymphoma/leukemia (HTLV1+) (ATLL)

Extranodal T-cell Lymphomas

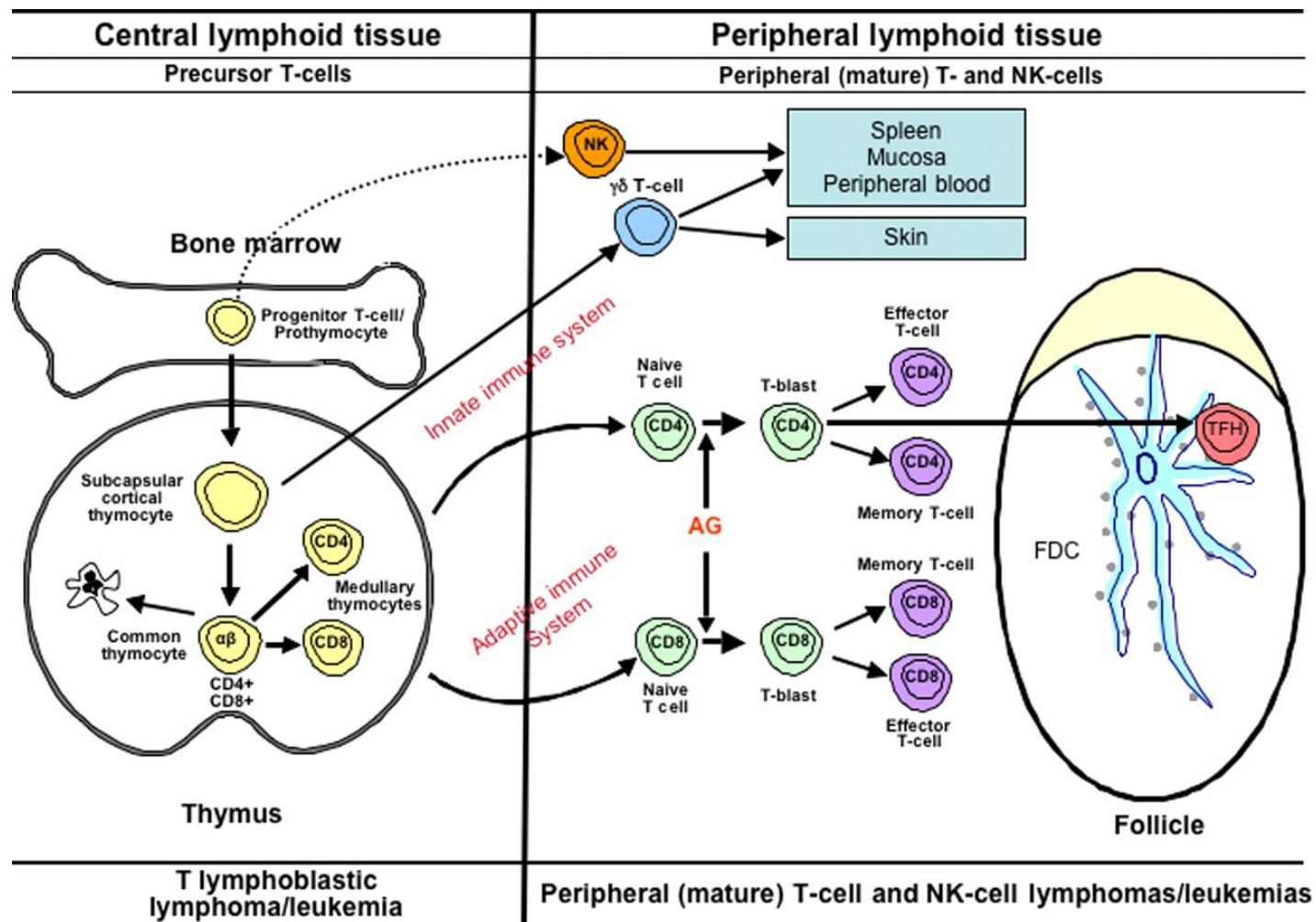
- Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type
- Enteropathy-associated T-cell lymphoma (former EATL type I)
- # Monomorphic epitheliotropic intestinal lymphoma (former EATL type II, now MEITL)
- # Indolent LPD of GI-tract*
- Hepatosplenic T-cell lymphoma (HSTL)
- # Breast-implant-associated anaplastic large cell lymphoma*
- Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma (SPTCL)

Nodal T-cell Lymphomas

- Peripheral T-cell lymphoma, NOS (PTCL-NOS)
- # Nodal peripheral T-cell lymphoma w. TFH phenotype
- Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL)
- # Follicular T-cell lymphoma*
- Anaplastic large cell lymphoma, *ALK+* (*ALK+ALCL*)
- # Anaplastic large cell lymphoma, *ALK-* (*ALK-ACLCL*)

Cutaneous T-cell Lymphomas (extranodal)

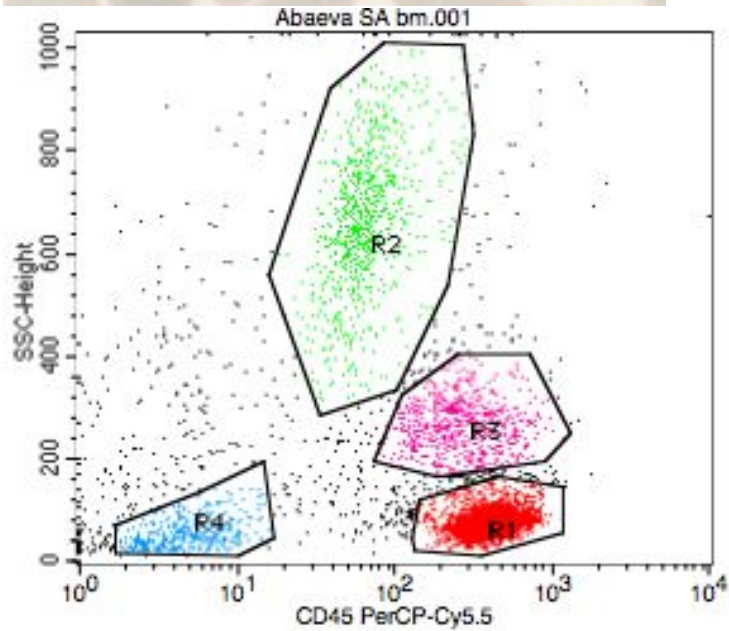
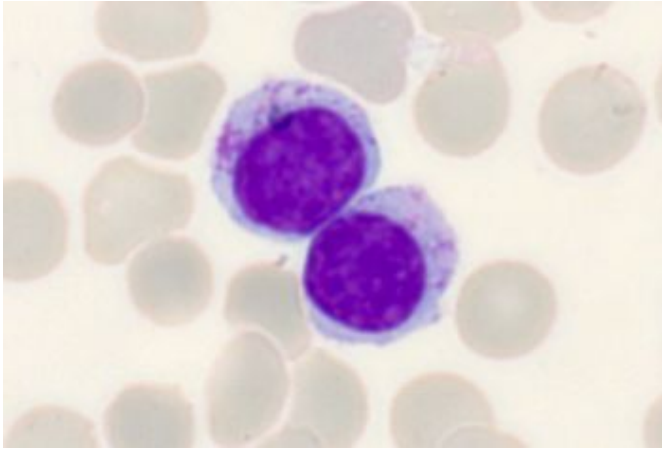
- Sézary syndrome (SS)
- Mycosis fungoides (MF)
- Primary cutaneous CD30+ T-LPD
 - Lymphomatoid papulosis
 - Primary cutaneous ALCL
- Primary cutaneous $\gamma\delta$ T-cell lymphoma
- # Primary cutaneous aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma*
- # Primary cutaneous acral CD8+ T-cell lymphoma*
- # Primary cutaneous CD4+ small/medium LPD*
- # Hydroa-vacciniforme-like LPD



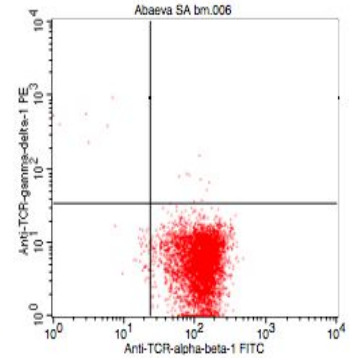
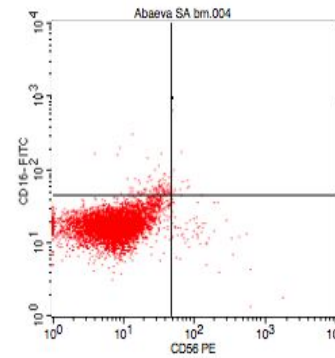
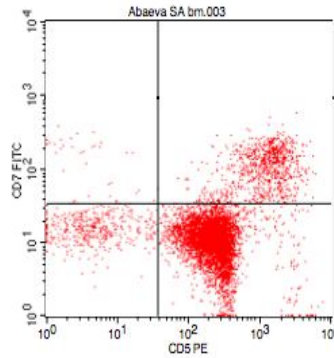
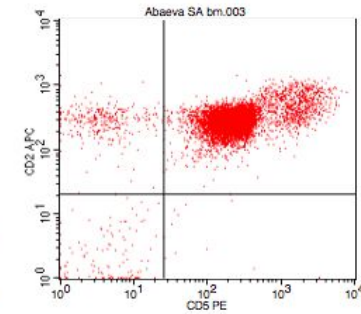
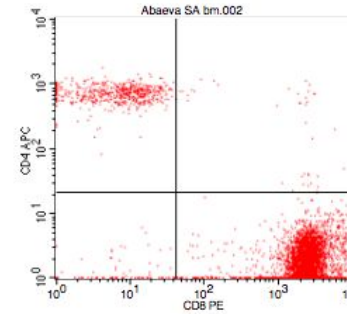
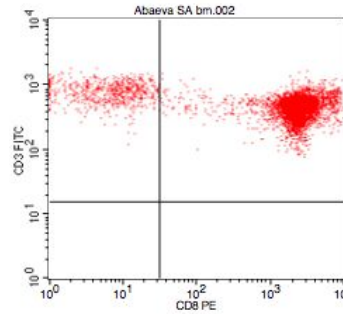
Вариант Т-НХЛ	+	+/-	-
Т-лимфобластная лимфома из клеток предшественников	TdT , cCD3, CD7,	CD1a, CD2, CD5, CD4, CD8, sCD3	
Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз	CD2, CD5, CD7 , CD3, TCRαβ	CD4+/CD8- 65% CD4+/CD8+ 20% CD4-/CD8+ rare	TdT, Cd1a, CD34, CD25 , CD16, CD56
Т-клеточный лейкоз из БГЛ	CD2, CD5, CD7, CD3, TCRαβ, CD8	CD16, CD56, CD57	CD4
Синдром Сезари	CD2, CD5, CD3, TCRαβ, CD4		CD8 , CD7, CD30, CD25, CD26
NK-лейкоз	CD16, CD56, CD2, CD57	CD8	CD3 , CD4

Пример 4

- Популяция лимфоцитов SSC_{low} $CD45_{bright}$



- Лимфоциты представлены (>76%) T-лимфоцитами с aberrантным иммунофенотипом:
- $CD45^{+}_{bright}$ $CD3^{+}$ $CD2^{+}$ $CD8^{+}$ $CD5^{+}_{dim}$ $CD57^{+}$ $TCR\ \alpha\beta^{+}$



**Минимальная остаточная болезнь
(minimal residual disease) –
состояние, обуславливающее
развитие рецидива и связанное с
сохранением опухолевых клеток в
крайне низких концентрациях,
ниже предела чувствительности
морфологических методов**

Основные методы мониторинга МОБ

- ✓ **Количественная полимеразная цепная реакция**
 - ✓ **Определение химерного гена**
 - ✓ **Определение химерного транскрипта**
 - ✓ **Определение клональных перестроек генов тяжелых цепей ИГ и ТкР**
- ✓ **Многоцветная проточная цитометрия**

Проточная цитометрия

✓ Преимущества

- ✓ **Воспроизводимость исследования**
- ✓ **Применимость (>95% ОЛЛ)**
- ✓ **Относительно низкая стоимость**
- ✓ **Относительно короткое время выполнения**
- ✓ **Дополнительная информация об опухолевых и нормальных клетках**

✓ Недостатки

- ✓ **Низкая чувствительность 3-4-цветной проточной**

Определение МОБ при ХЛЛ методом проточной

ЦИТОМЕТРИИ

Кровь или костный мозг?

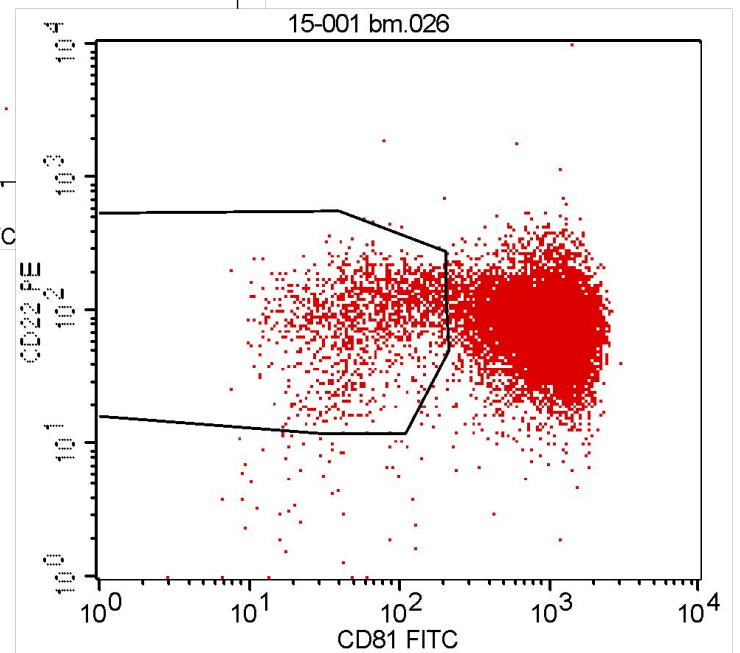
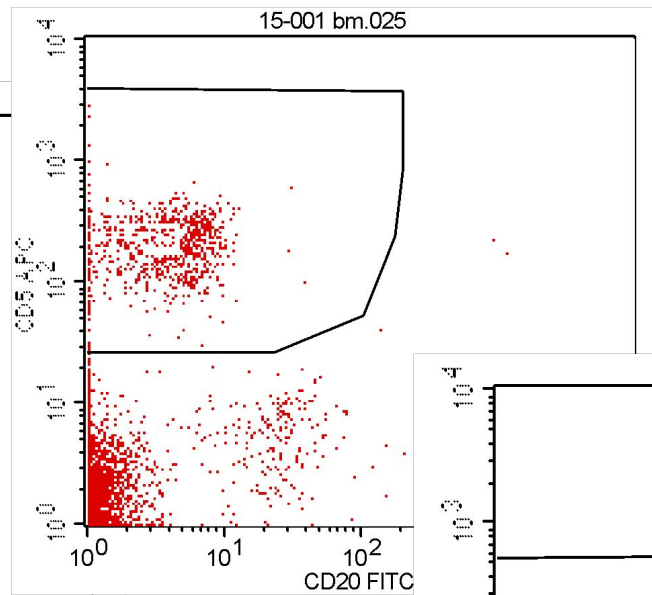
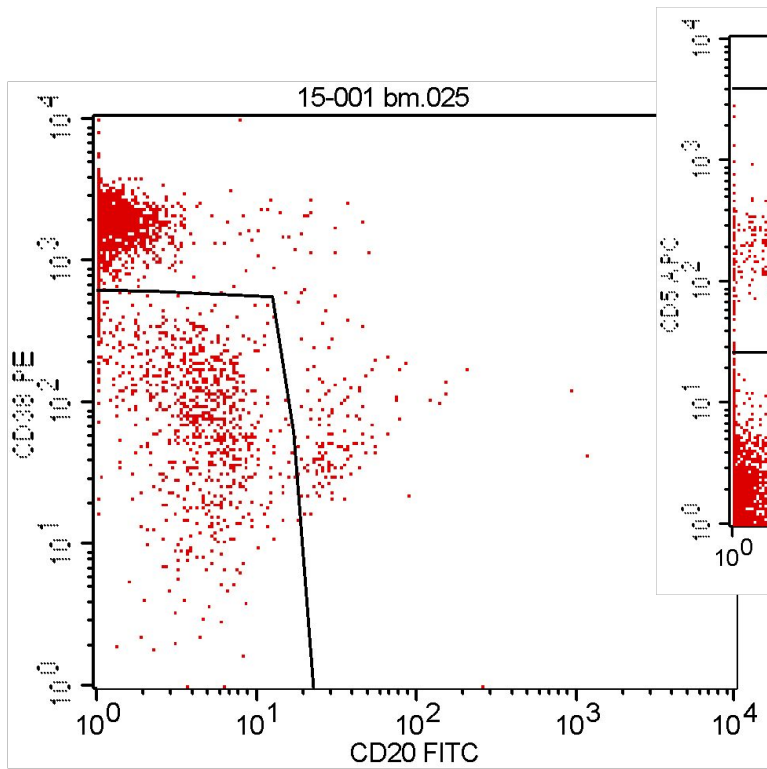
Определение клональности – CD19+ CD5+
каппа/лямбда – самый дешевый и
быстрый метод. Недостатки –
ложноположительные результаты,
трудности определения рестрикции
легких цепей на малых популяциях.
Чувствительность – 1%

Стандартизованные методы

Принцип- выделение aberrантной популяции по наиболее чувствительным и специфичным маркерам

International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia AC Rawstron et al 2007

CD19,CD5,CD20,CD22,CD43,CD38,CD79b,CD81,
каппа,лямбда



<http://www.ericll.org>

Чувствительность и лимит детекции

1 клетка на 10 000 клеток или 0.01% (1 клетка на 100 -1%)

Лимитом детекции (LOD) считается обнаружение хотя бы 20 ХЛЛ-событий

То есть чтобы получить LOD=0,01% надо проанализировать

200 000 лейкоцитов

Лимитом количественного определения(LOQ) считается обнаружение хотя бы 50 ХЛЛ событий.

Чтобы получить LOQ=0,01% надо проанализировать 500 000 лейкоцитов

Стандартная форма ответа по определению МОБ методом проточной цитометрии

Общее количество проанализированных
лейкоцитов

% В-лимфоцитов от всех лейкоцитов

% ХЛЛ-лимфоцитов от всех лейкоцитов

Лимит детекции, лимит количественного
определения

Например: Проанализировано 685 315 лейкоцитов

В-лимфоциты -1.3% от всех лейкоцитов

ХЛЛ- клетки – 0.08% от всех лейкоцитов

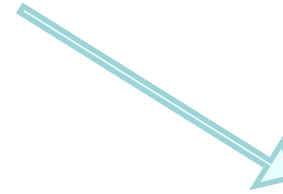
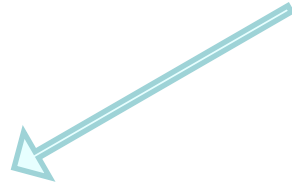
$LOD = 20 / 685315 * 100 = 0,029\%$

$LOQ = 50 / 685315 * 100 = 0,073\%$

Обнаружена МОБ при ХЛЛ

Определение МОБ при острых лейкозах

**Определение лейкоз-ассоциированного
иммунофенотипа**



**Выявление иммунофенотипа,
определенного при диагностике**

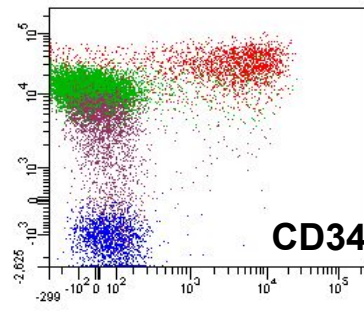
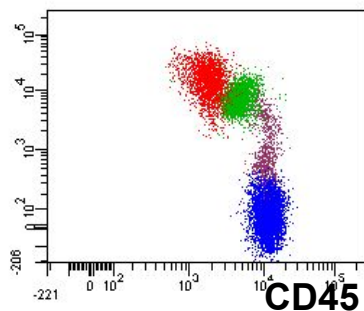
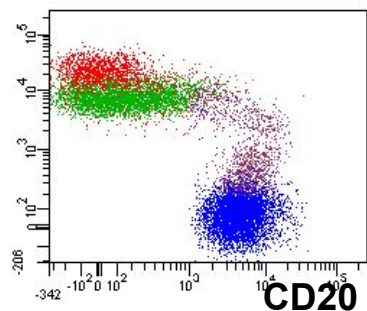
Метод «пустых мест»



**Сравнение иммунофенотипа
с базами данных**

Нормальное созревание В-лимфоцитов

CD10



BCP 1



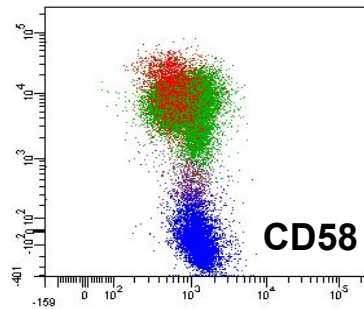
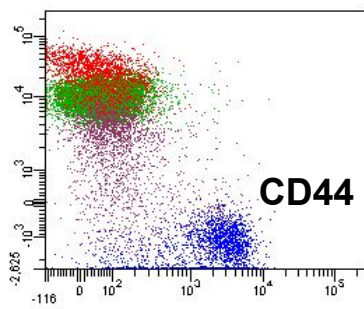
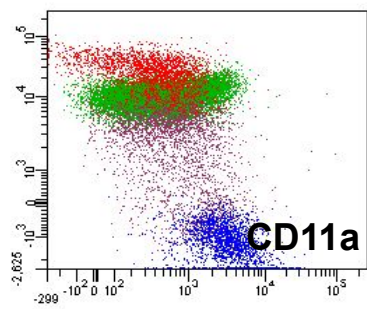
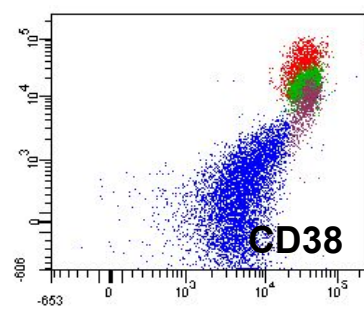
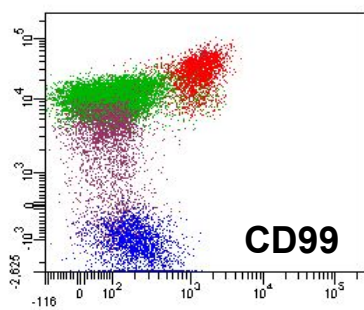
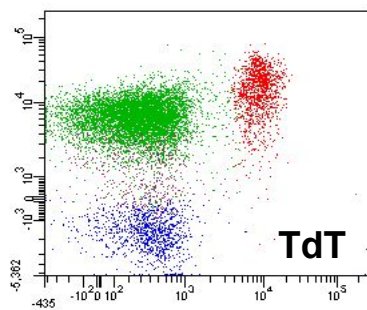
BCP 2



BCP 3



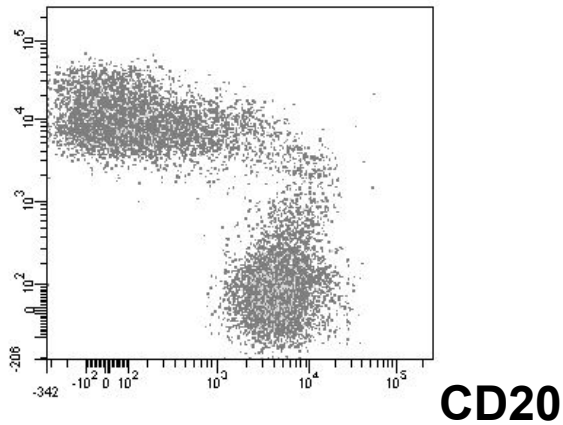
**Зрелые
В-лимфоциты**



Особенности регенерирующего костного мозга

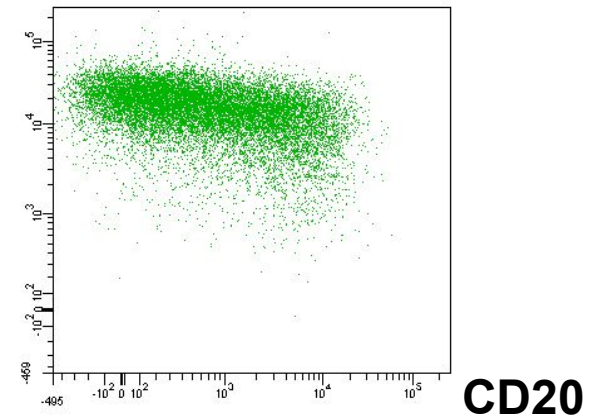
Нормальный КМ

CD10

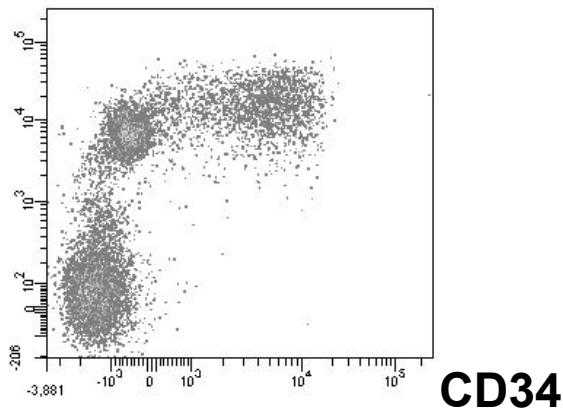


Восстанавливающийся КМ

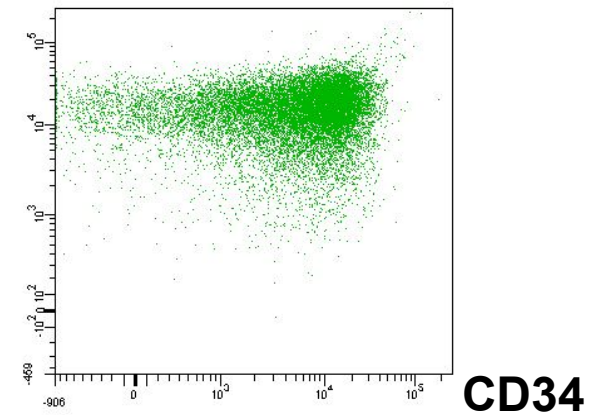
CD10



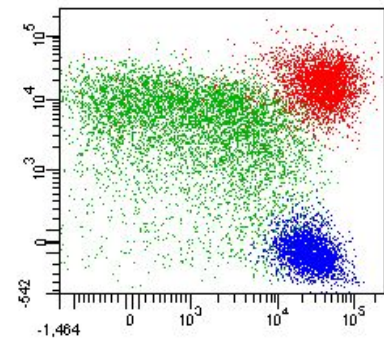
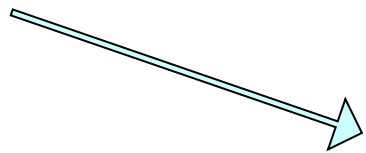
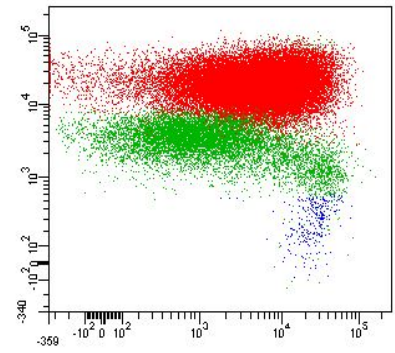
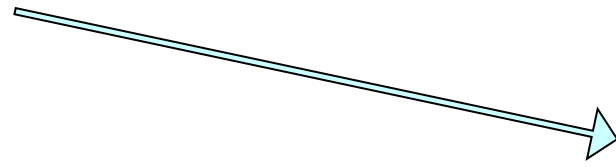
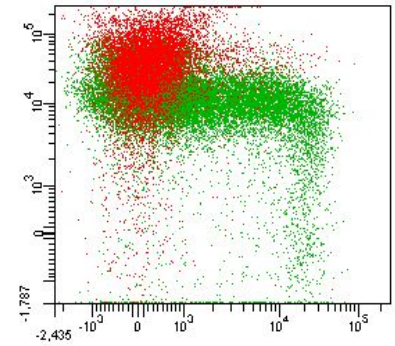
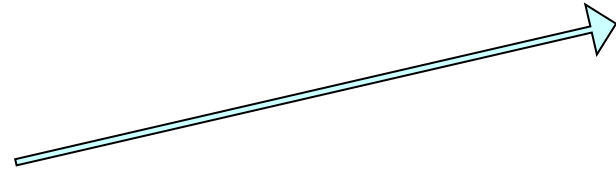
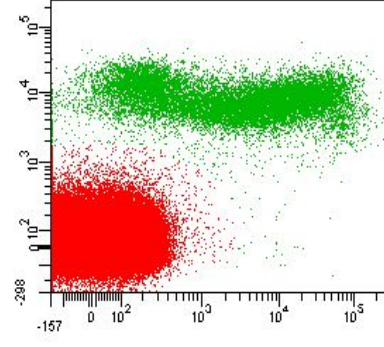
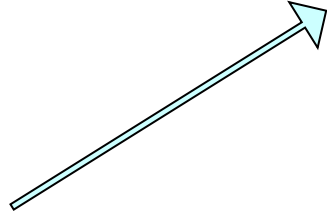
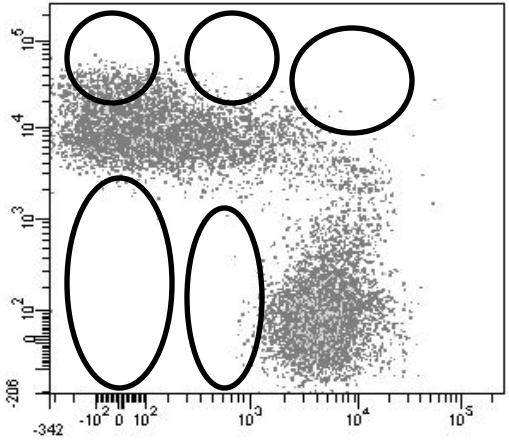
CD10



CD10



CD10



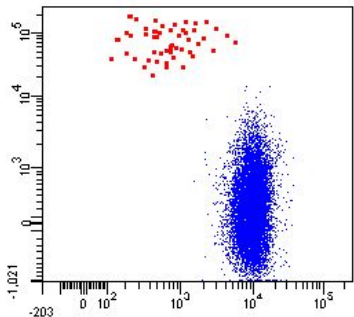
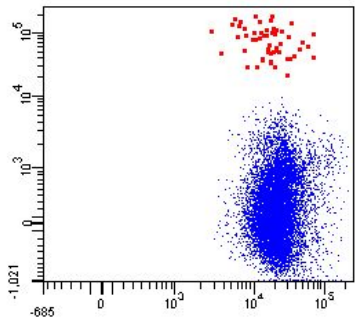
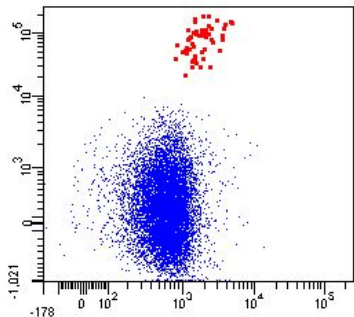
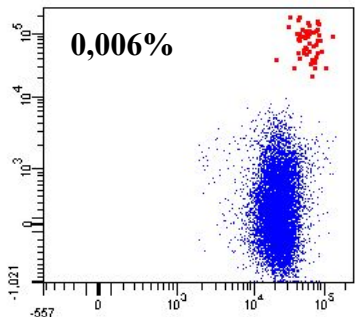
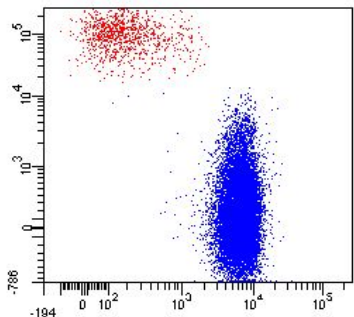
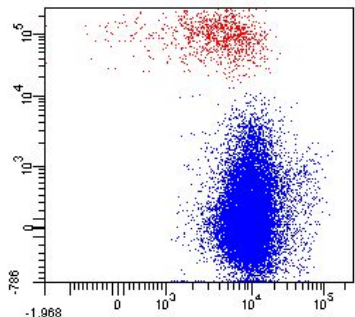
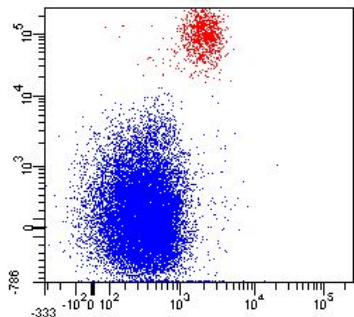
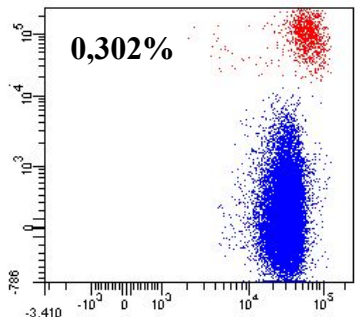
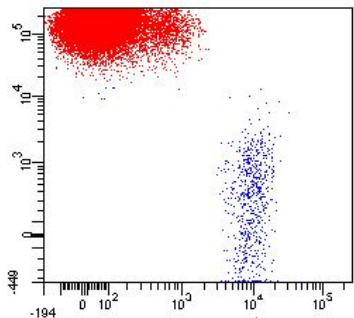
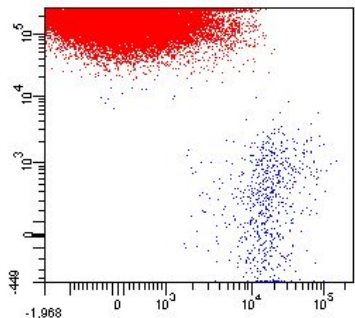
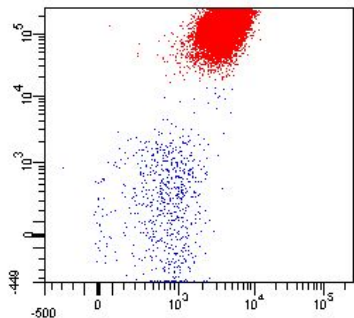
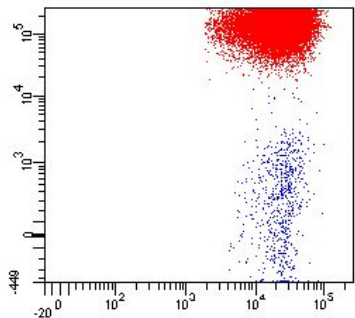
CD20

Пациент С.

День 0

День 15

День 36



CD19

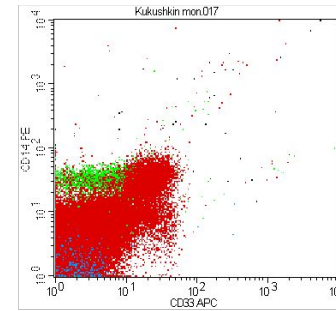
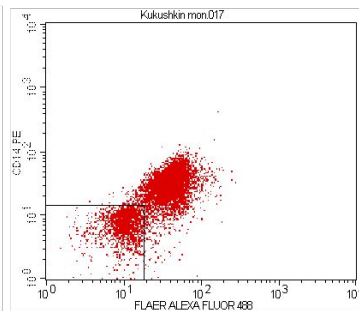
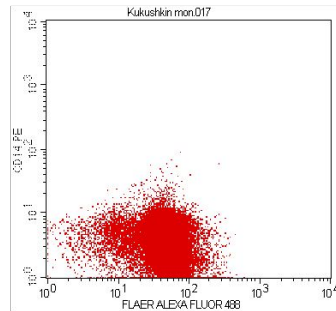
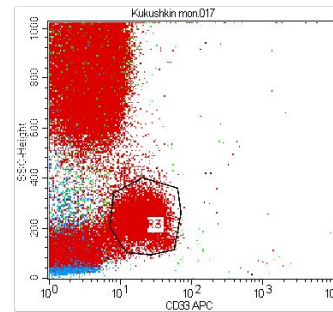
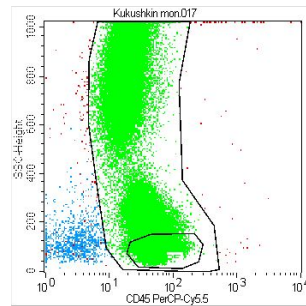
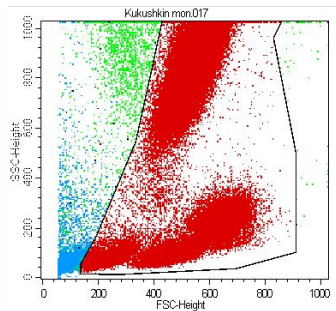
CD58

CD20

CD45

CD10

Диагностика ПНГ методом проточной цитометрии



Образец заключения по ПНГ

Тип биоматериала Периферическая кровь Лейкоциты 3.22 10⁹/л

По данным проточной цитометрии картина крови представлена

Гранулоциты 40.53 % Моноциты 9.64 % Лимфоциты 42.31 %

Процент от гранулоцитов FLAER-/CD24- 12.990 %

Процент от моноцитов FLAER-/CD14- 13.230 %

ПНГ клон от эритроцитов:

Нормальные эритроциты 96.35 %

Клон тип II (частичная потеря GPI) 0.60 %

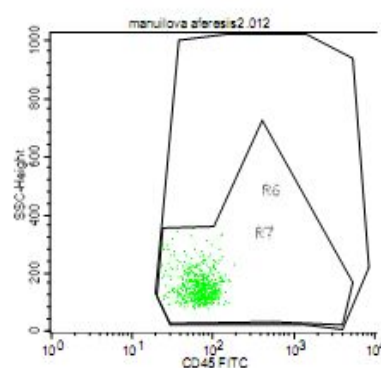
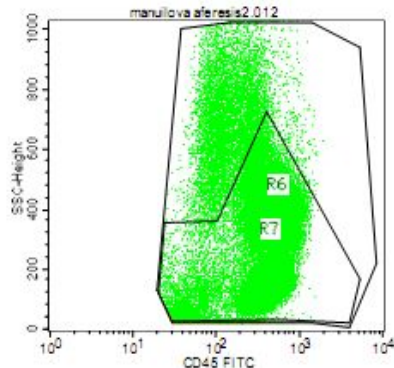
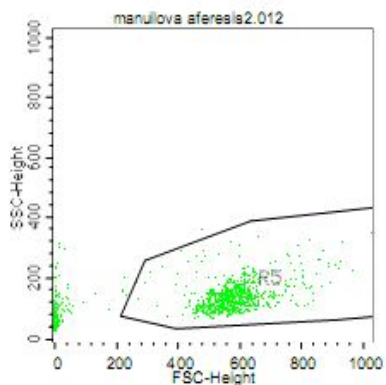
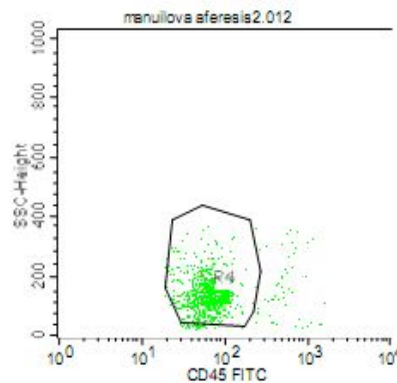
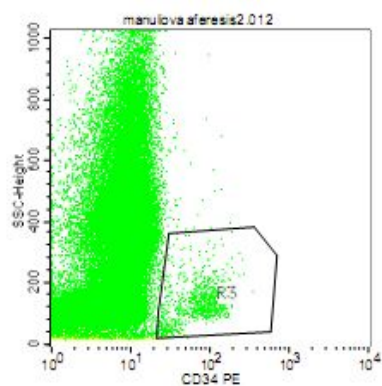
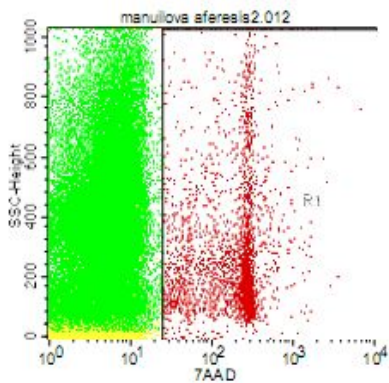
Клон тип III (полная потеря GPI) 3.05 %

Суммарный ПНГ клон эритроцитов 3.65 %

Заключение: По данным проточной цитометрии выявлен ПНГ-клон.

Стандартизация метода определения количества ГСК в трансплантате с международным протоколом ISHAGE

Пример : пациента А, клеточный концентрат периферической крови после афереза



Вес пациента-90 кг

Вес био.мат-ла- 150г

Кол-во ЯСК в литре- $243,4 \cdot 10^9 / \text{л}$

Кол-во ЯСК в дозе- $36,5 \cdot 10^9$

Нежизнеспособные кл.(7AAD)- $1,3 \cdot 10^9$

Жизнеспособные мононуклеары % от жив.ЯСК- 87,92%

Абсолют.кол-во жизнеспособных мононуклеаров- $30,94 \cdot 10^9$

CD34+CD45+ от жив.ЯСК- 0,88%

CD34+CD45+ от жив.мононукл.- 0,99%

Абс.кол-во CD34+CD45+ - $308 \cdot 10^9$

Абс.кол-во CD34+CD45+ на 1кг веса реципиента- $3,42 \cdot 10^9$

Спасибо за внимание!

