

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ  
им. Дмитрия Рогачева»  
Минздрава России  
Поступила 15.08.2024  
Принята к печати 03.02.2025



EDN: OXXNJI

#### Контактная информация:

Кузнецова Софья Алексеевна,  
канд. физ.-мат. наук, ведущий научный  
сотрудник лаборатории биофизики  
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»  
Минздрава России  
Адрес: 117997, Москва,  
ул. Саморы Машела, 1  
E-mail: kuznetsova.sonya@gmail.com

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-96-103

# Морфология чистой популяции гематогонов, изолированной из нормального и обогащенного гематогонами костного мозга

А.О. Закирова<sup>1,2</sup>, М.В. Кормилицина<sup>3</sup>, О.С. Федянина<sup>1,2</sup>, А.Н. Хвастунова<sup>1,2</sup>, А.В. Филатов<sup>4</sup>,  
С.А. Кузнецова<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Московская область, Долгопрудный

<sup>4</sup>ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва

В-клеточные предшественники (гематогоны) составляют менее 5% нормальных ядросодержащих клеток костного мозга (КМ), но при некоторых клинических состояниях их процентное содержание может увеличиваться. Морфология гематогонов была охарактеризована у пациентов с их повышенным количеством. Однако малочисленность гематогонов и невозможность получения их чистой популяции затрудняют детальный морфологический анализ этих клеток в нормальном КМ. У 14 пациентов с повышенным содержанием гематогонов и 12 здоровых доноров с помощью биочипов с иммобилизованными антителами к антигенам кластеров дифференцировки (CD) была выделена чистая популяция гематогонов как CD10<sup>+</sup>-фракция моноклеарных клеток КМ. Были описаны основные морфологические подтипы гематогонов здорового КМ и проанализирована доля этих клеток среди CD19<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> и CD10<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>-моноклеаров КМ. От 1 до 9% гематогонов имеют диаметр 13–17 мкм, базофильную цитоплазму, кружевную или мелкосетчатую бластную структуру хроматина и ярко выраженные ядрышки. Остальные гематогоны представляют собой незрелые лимфоидные клетки с широким распределением по размерам (7–15 мкм в диаметре), скудной цитоплазмой, «смазанным» хроматином и отсутствием ядрышек. От 3 до 25% клеток в последней категории имеют размер более 10 мкм. Клетки CD10<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> не имеют преимущественно бластной морфологии, в то время как некоторые бластоподобные гематогоны экспрессируют CD20. Гематогоны в нормальном КМ неоднородны по морфологии и размеру. Явной корреляции между морфологией гематогонов и их иммунологической стадией созревания обнаружено не было. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Было получено согласие доноров и пациентов на забор КМ и будущие биомедицинские исследования.

**Ключевые слова:** гематогоны, нормальные В-клеточные предшественники, клеточный биочип, CD-антигены, морфология, иммуноцитохимия

Закирова А.О. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (2): 96–103. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-96-103

## Morphology of a pure hematogone population isolated from normal and hematogone-rich bone marrow

A.O. Zakirova<sup>1,2</sup>, M.V. Kormilitsina<sup>3</sup>, O.S. Fedyanina<sup>1,2</sup>, A.N. Khvastunova<sup>1,2</sup>, A.V. Filatov<sup>4</sup>, S.A. Kuznetsova<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow

<sup>3</sup>Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Moscow Region, Dolgoprudny

<sup>4</sup>National Research Center "Institute of Immunology" of the Federal Medical Biological Agency of the Russian Federation, Moscow

B-cell precursors (hematogones) account for less than 5% of normal bone marrow (BM) nucleated cells but in some clinical conditions the number of hematogones can be transiently increased. Their morphology has been characterized in patients with increased numbers of hematogones. However, the scarcity of hematogones and inability to obtain their pure population make it difficult to thoroughly investigate the morphology of these cells in normal BM. A pure population of hematogones was isolated as a fraction of CD10<sup>+</sup> BM mononuclear cells from 14 patients with increased numbers of hematogones and 12 healthy donors using microarrays with immobilized antibodies to cluster of differentiation (CD) antigens. We described the main morphological subtypes of hematogones of normal BM and analyzed the proportion of these cells among CD19<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, and CD10<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> BM mononuclear cells. One to nine percent of hematogones are 13–17 μm in diameter and have basophilic cytoplasm, lacy or finely reticulated, blastic chromatin and prominent nucleoli. The remaining hematogones are immature lymphoid cells that vary considerably in size (7–15 μm in diameter) and have scanty cytoplasm, smudged chromatin and absent nucleoli. Three to twenty-five percent of these cells are larger than 10 μm. CD10<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> cells do not show predominantly blastic morphology, however some blast-like hematogones express CD20. Hematogones in normal BM are heterogeneous in morphology and size. We found no apparent correlation between the morphology of hematogones and their stages of maturation. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation. All donors and patients gave their informed consent to BM aspiration and participation in future biomedical studies.

**Key words:** hematogone, normal B-cell precursors, microarray, CD antigens, morphology, immunocytochemistry

Zakirova A.O., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (2): 96–103.  
DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-96-103

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 15.08.2024  
Accepted 03.02.2025

#### Correspondence:

Sofya A. Kuznetsova,

Cand. Sci. in Physics and Mathematics,  
a leading researcher at the Laboratory  
of Biophysics of the Dmitry Rogachev  
National Medical Research Center of Pediatric  
Hematology, Oncology and Immunology,  
Ministry of Healthcare  
of the Russian Federation  
Address: 1 Samory Mashela St.,  
Moscow 117997, Russia  
E-mail: kuznetsova.sonya@gmail.com

Гематогонии впервые были описаны как незрелые лимфоидные клетки, присутствующие в мазках костного мозга (КМ) [1]. По мере накопления данных о поверхностных антигенах, специфичных для В-лимфоцитов на различных стадиях созревания, было доказано, что гематогонии являются нормальными предшественниками В-клеток и нормальными аналогами бластов при В-клеточном остром лимфобластном лейкозе (В-ОЛЛ) [2–9]. Созревание предшественников В-клеток можно разделить на несколько стадий, распознаваемых по экспрессии нескольких поверхностных или внутриклеточных маркеров. Наименее зрелыми гематогониями (стадия 1) являются  $CD34^{bright}$ ,  $CD10^{bright}$ ,  $CD19^{dim}$ ,  $CD22^{dim}$ ,  $CD20^{-}$ ; промежуточные пре-В-клетки (стадия 2) отрицательны по  $CD34$  и имеют слабую экспрессию  $CD10$ ,  $CD20$ ,  $CD22$  и  $CD19^{bright}$ . На 3-й стадии созревания гематогонии  $CD10^{dim}$  и  $CD22^{dim}$  не только положительны по  $CD19$ , но и приобретают экспрессию  $CD20$  и частично поверхностных иммуноглобулинов [10–12]. Гематогонии составляют не более 5% клеток аспирата здорового КМ [10]. Однако их количество может временно увеличиться более чем на 50% во время восстановления после химиотерапии или трансплантации КМ у пациентов с негематопозитическими новообразованиями, аутоиммунными заболеваниями или инфекциями [13–15]. Это временное увеличение количества нормальных предшественников В-клеток может быть ошибочно принято за В-ОЛЛ, поскольку гематогонии и опухолевые клетки при В-ОЛЛ имеют схожие морфологию и иммунофенотип [7].

Гематогонии были подробно исследованы методом проточной цитометрии у пациентов с их транзиторным доброкачественным увеличением. Большинство этих исследований посвящено критериям дифференциации между гематогониями и бластами, характерными для В-ОЛЛ [11, 15–19]. Основные морфологические характеристики гематогонии также были получены из образцов КМ пациентов с их повышенным количеством [11, 13]. В нескольких исследованиях сообщалось о морфологической гетерогенности гематогонии [19–21] по сравнению с несколько более однородной морфологией бластов при В-ОЛЛ. Полученная таким образом информация является неполной, поскольку незрелые клетки в мазках КМ без дополнительного окрашивания не всегда могут быть надежно классифицированы как гематогонии, а не как клетки-предшественники другой линии.

В.У.Р. Нокланд и соавт. [7] и Т. Фукушима и соавт. [22] использовали более строгий подход к очистке гематогонии и выделили  $CD10^{+}$ -моноклеональные клетки из аспиратов КМ пациентов с острыми лейкозами в стадии полной ремиссии, негематопозитическими опухолями с отсутствием метастазов в КМ, доброкачественными заболеваниями крови (идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, наследственный сфероцитоз) и другими заболеваниями (инфекционный мононуклеоз, гистиоцитоз из клеток Лангерганса) для последующего морфологического исследования с использованием проточного клеточного сортера. Помимо предшественников В-клеток  $CD10$  экспрессируются на зрелых гранулоцитах и лишь небольшой части Т-клеток [23], так что в отсутствие В-ОЛЛ всю популяцию  $CD10^{+}$ -моноклеональных клеток КМ можно рассматривать как гематогонии. Однако морфология гематогонии в нормальном КМ не изучалась из-за малого их количества.

В данной работе описана морфология  $CD10^{+}$ -фракции моноклеональных клеток, выделенной из аспиратов КМ 12 здоровых доноров и 14 пациентов с новообразованиями, не связанными с созреванием В-клеток или незлокачественными заболеваниями крови, приводящими к реактивному увеличению гематогонии.  $CD10^{+}$ -клетки получали из моноклеональной фракции аспирата КМ путем инкубации с клеточным биочипом, прозрачной пластиковой подложкой с иммобилизованными моноклеональными антителами к дифференцировочным CD-антигенам [24]. Ранее было показано, что связывание клеток с биочипом является высокоспецифичным, а захваченные биочипом лейкоциты морфологически идентичны лейкоцитам в мазках крови и КМ. В данном исследовании описаны основные морфологические типы  $CD10^{+}$  В-клеточных предшественников и исследована экспрессия  $CD34$ ,  $CD19$ ,  $CD20$ ,  $CD22$  и иммуноглобулина класса М (IgM) на их поверхности, чтобы соотнести иммунологические стадии созревания гематогонии с их морфологией.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Пациенты

Были исследованы аспираты КМ 12 здоровых доноров в возрасте от 4 до 22 лет (средний возраст 9 лет, 8 пациентов мужского пола, 4 – женского), полученные в ходе подготовки к гаплоидентичной трансплантации КМ, и 14 пациентов в возрасте от 1 до 15 месяцев (средний возраст 8,5 месяцев, 9 мальчиков, 5 девочек) с различными новообразованиями или незлокачественными заболеваниями (8 пациентов с нейробластомой, 2 – с острым миелоидным лейкозом, 2 – с агранулоцитозом, 1 – с аутоиммунным лимфопролиферативным синдромом, 1 – с неизвестным диагнозом, у которого острый лейкоз был исключен) и повышенным уровнем гематогонии по данным проточной цитометрии. Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Было получено согласие

доноров и пациентов на забор КМ и будущие биомедицинские исследования.

### Изготовление клеточных биочипов

Клеточные биочипы были изготовлены путем адсорбции анти-CD-антител на пластиковые покровные стекла, как описано в работе A.N. Khvastunova и соавт. [24]. При изготовлении клеточных биочипов были использованы моноклональные мышинные антитела к человеческому CD2 (клон LT2), CD10 (клон LT10), CD19 (клон LT19), CD20 (клон LT20), CD22 (клон LT22) и IgM (ООО «Сорбент», Россия), к человеческому CD45RA (клон HI100; eBioscience, США) и изотипический контроль (P3.6.2.8.1; eBioscience, США) в качестве отрицательного контроля.

### Сортировка лейкоцитов при помощи клеточного биочипа

Мононуклеарную фракцию аспирата КМ сортировали с помощью клеточного биочипа в соответствии с ранее описанным протоколом [24]. Мононуклеарную фракцию выделяли из аспирата КМ путем центрифугирования в градиенте Histopaque 1077 (Sigma, США) в соответствии с инструкцией производителя, отмывали и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7,2–7,4, с 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA; Sigma, США) и 20% фетальной телячьей сывороткой (FCS; Sigma, США) в концентрации  $5 \times 10^6$  клеток/мл, заливали на биочип и инкубировали в течение 45 мин при 11°C без перемешивания. Далее биочип промывали в PBS с добавлением 1% BSA, затем в PBS, заливали 20 мкл чистой FCS и высушивали в лабораторной цитоцентрифуге. Для морфологического анализа клетки, связавшиеся с биочипами, окрашивали по Май-Грюнвальду–Гимзе и исследовали с помощью микроскопии в светлом поле. Процент мононуклеарных клеток, положительных по каждому CD, включенному в панель биочипа, определяли как плотность связывания мононуклеаров на соответствующем пятне иммобилизованных антител к данному CD на биочипе, нормализованную на плотность связывания клеток в пятне положительного контроля (анти-CD45RA), как было обосновано ранее [24]. Плотность связывания клеток оценивали полуавтоматически на основе анализа микрофотографий клеток, связавшихся с биочипом, при увеличении в 200 раз.

### Иммунофлуоресценция

Мононуклеарную фракцию аспирата КМ, выделенную, как описано выше, и ресуспендированную в PBS с 1% BSA и 20% FCS в концентрации  $10^7$  клеток/мл окрашивали моноклональными мышинными антителами к CD34-FITC (клон 561; Biolegend,

США) в 1% BSA в PBS при комнатной температуре в течение 30 мин, затем промывали в том же буфере. Меченые клетки инкубировали с биочипом, отмывали и сушили, как описано ранее [24]. Затем клетки, связавшиеся с биочипом, фиксировали в 1% растворе формальдегида в PBS при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем альдегидные группы инактивировали в 100 мМ растворе глицина при комнатной температуре в течение 1 мин, далее биочип со связанными клетками промывали в PBS и визуализировали либо непосредственно с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии (Axio Observer.Z1, Carl Zeiss, Германия), либо с помощью протокола ферментативного усиления флуоресцентного сигнала.

### Ферментативное усиление флуоресцентного сигнала

Окрашенные анти-CD34-FITC клетки, связанные с биочипами, приготовленные, как описано выше, инкубировали со вторичными козыми антителами против FITC, конъюгированными со щелочной фосфатазой (ЩФ) (ab6657, Abcam, США) в течение 30 мин при комнатной температуре во влажной камере, промывали TBS (набор для определения PNA ISH, Dako, Дания), а затем инкубировали с субстратом ЩФ BCIP/NBT (набор для определения PNA ISH, Dako, Glostrup, Дания) в течение 45–60 мин при комнатной температуре во влажной камере. Затем образец промывали водопроводной водой, высушивали и хранили при комнатной температуре до 1 нед перед анализом. Анализ проводился методом световой микроскопии в светлом поле.

### Микроскопия светлого поля

Морфологию клеток и результаты иммуноцитохимии с ферментативным усилением изучали с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ni, оснащенного камерой Nikon DS-Ri1 (Nikon, Нидерланды), при увеличении в 1000 и 200 раз. Измерение размера клеток проводилось с использованием программного обеспечения ImageJ. Морфологическая классификация клеток для каждого донора или пациента проводилась независимо двумя морфологами. Для каждого донора или пациента было проанализировано не менее 100 клеток для каждого пятна анти-CD-антител. В качестве контроля для зрелых В-клеток был измерен размер 50 мононуклеаров периферической крови, связавшихся с анти-CD19.

### Оценка количества CD34<sup>+</sup>-клеток

Фотографии мононуклеаров КМ, меченых анти-CD34-FITC, в светлом поле после ферментативного усиления, в пятнах биочипов анти-CD10 (эксперимент) и анти-CD3 (отрицательный контроль) были

сделаны в одинаковых условиях, после чего их преобразовали в оттенки серого, инвертировали и вычли фон. Фотографии флуоресценции анти-CD34-FITC анализировали непосредственно после вычитания фона. Интенсивность сигнала анти-CD34 для каждой клетки оценивали как среднюю в пределах границ клеток. Весь анализ изображений проводился с использованием программного обеспечения ImageJ. В каждом эксперименте строили гистограмму интенсивности сигнала для отрицательного контроля; пороговая интенсивность для CD34<sup>+</sup> была установлена выше 95% клеток отрицательного контроля.

### Статистический анализ

Данные представлены либо в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение, либо в виде диапазона (медианы). При сравнении данных для нормального КМ и КМ, богатого гематононами, использовался критерий Манна-Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Доля мононуклеаров, положительных по различным В-клеточным маркерам, в нормальном костном мозге и костном мозге пациентов с повышенным уровнем гематононов

На рисунке 1 представлена доля клеток, положительных по различным маркерам лимфоцитов, среди мононуклеаров, выделенных из аспирата КМ 14 пациентов с повышенным количеством гематононов и 12 здоровых доноров. У пациентов с повышенным количеством гематононов количество Т- и NK-клеток (CD2<sup>+</sup>) было ниже, а общее количество В-клеток (CD19<sup>+</sup>), гематононов (CD10<sup>+</sup>), зрелых В-клеток (slgM<sup>+</sup>) – выше, чем у здоровых доноров.

### Морфологические характеристики предшественников В-лимфоцитов в нормальном костном мозге

В результате детального анализа CD10<sup>+</sup>-мононуклеаров, выделенных из аспирата нормального КМ, было выделено 3 группы, морфологически отличающиеся между собой (рисунк 2). Самые крупные клетки с высоким и средним ядерно-цитоплазматическим соотношением, синей цитоплазмой с перинуклеарным просветлением, кружевной или мелкосетчатой структурой хроматина и 1–2 ядрышками (рисунк 2А–Г) далее будут иметь название «бласты», поскольку они морфологически наиболее близки к бластам при В-ОЛЛ [21]. Клетки среднего размера с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением и нежным рисунком хроматина, синей цитоплазмой без перинуклеарной зоны и четко видимых ядрышек (рисунк 2Д–З) далее будут называться крупными

предшественниками. Клетки этих 2 морфологических типов обычно идентифицируют в мазках КМ как гематононы. Третья морфологическая группа включает оставшиеся клетки, связавшиеся с антителами к CD10 на биочипе: небольшие клетки с наибольшим соотношением ядра и цитоплазмы, незрелым хроматином и отсутствием видимых ядрышек (рисунк 2И–М). Бласты имеют наибольший размер – 13–17 мкм в диаметре, диаметр крупных предшественников – более 10 мкм и до 15 мкм. Третья группа CD10<sup>+</sup>-клеток имеет наименьший размер – 7–10 мкм в диаметре.

Большинство более мелких CD10<sup>+</sup>-клеток похожи по морфологии на крупные предшественники, имеют сходную структуру с хроматином и ядерно-цитоплазматическое соотношение, но меньший размер, хотя у некоторых из них наблюдается более конденсированный или более грубый хроматин. Средний диаметр зрелых В-клеток, выделенных из периферической крови здоровых доноров, измеренный тем же методом, составляет  $10 \pm 1$  мкм.

### Доля бластов и крупных предшественников среди CD10<sup>+</sup>-, CD19<sup>+</sup>-, CD20<sup>+</sup>-, CD22<sup>+</sup>- и slgM<sup>+</sup>-мононуклеаров костного мозга

Процент бластов и крупных предшественников среди мононуклеаров КМ, положительных по основным В-клеточным маркерам, у здоровых доноров и пациентов с повышенным количеством

Рисунок 1

Процент мононуклеаров, положительных по CD2, CD10, CD19, CD20, CD22 и slgM, в нормальном КМ (доноры) и КМ пациентов с повышенным уровнем гематононов (пациенты), рассчитанный как плотность связывания клеток с различными анти-CD-антителами на биочипе, нормализованная на плотность связывания клеток с анти-CD45 (положительный контроль). Столбиками представлены средние значения, усы – 95% доверительный интервал.

Figure 1

The percentage of mononuclear cells positive for CD2, CD10, CD19, CD20, CD22 and slgM in the normal BM obtained from the donors and in the BM of the patients with an increased number of hematogones calculated as the density of cell binding to different anti-CD-antibodies on a microarray normalized to the density of cell binding to anti-CD45 (positive control).

The bars indicate the mean values, while the whiskers represent a 95% confidence interval.

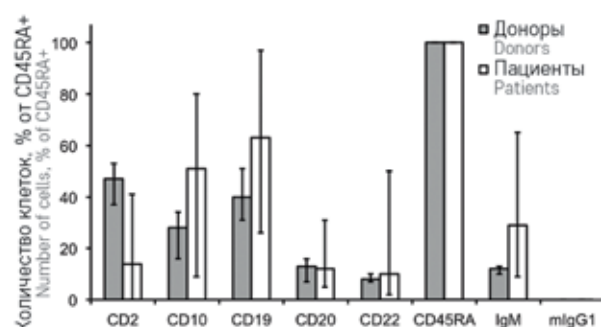


Рисунок 2

Морфологические группы гематогонов в КМ: А–Г – бласты; Д–З – крупные предшественники; И–М – другие. Стрелки указывают на клетки соответствующих типов. Окраска по Романовскому–Гимзе,  $\times 1000$ ; Н – распределение по размеру гематогонов различных морфологических групп. Размеры гематогонов были проанализированы у 3 здоровых доноров, не менее 100 клеток для каждого донора. Ящики обозначают межквартильный интервал, усы – минимальное и максимальные значения, горизонтальная линия – медиану, квадрат – среднее значение.

Figure 2

Morphological groups of hematogones in BM: A–Г – blast cells; Д–З – large precursor cells; И–М – others. The arrows show cells of the corresponding groups. The Romanowsky–Giemsa staining,  $\times 1000$ ; H – the distribution of morphologically different hematogones by size. The size of hematogones was analyzed in 3 healthy donors, at least 100 cells for each donor. The boxes show the interquartile interval, the whiskers represent the minimal and maximal values, the horizontal lines show the medians, and the squares indicate the mean values.

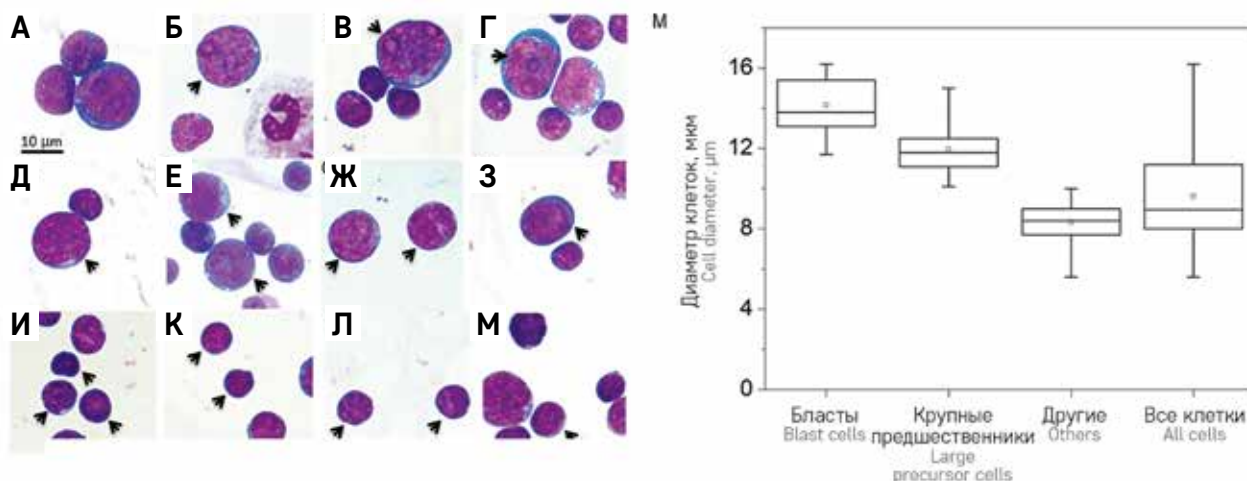
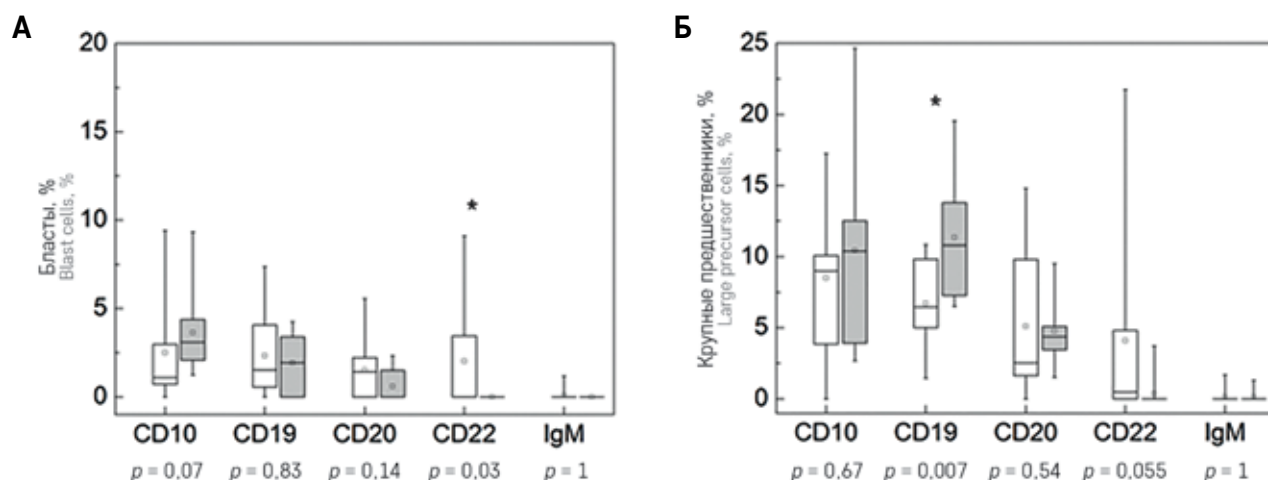


Рисунок 3

Процент клеток с морфологией бластов (А) и крупных предшественников (Б) среди мононуклеаров, связавшихся с анти-CD10, анти-CD19, анти-CD20, анти-CD22 и анти-IgM на клеточном биочипе, для здоровых доноров (серые ящики) и пациентов с повышенным уровнем гематогонов (белые ящики). Ящики обозначают межквартильный интервал, усы – минимальное и максимальные значения, горизонтальная линия – медиану, квадрат – среднее значение; значения  $p$  рассчитаны на основе критерия Манна–Уитни, звездочкой обозначены значимые различия ( $p < 0,05$ ).

Figure 3

The percentage of cells with blast cell morphology (A) and large precursor cell morphology (B) among mononuclear cells bound to anti-CD10, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD22, and anti-IgM on a cell biochip, for the healthy donors (grey boxes) and for the patients with increased numbers of hematogones (white boxes). The boxes show the interquartile interval, the whiskers represent the minimal and maximal values, the horizontal lines show the medians, the squares indicate the mean values;  $p$ -values are calculated using the Mann–Whitney test, the asterisks indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).



гематогонов представлен на рисунке 3. У здоровых доноров количество бластов варьирует в пределах 1,4–9,3% (медиана 3%), доля крупных предшественников составляет 2,7–24,6% (медиана 11%)

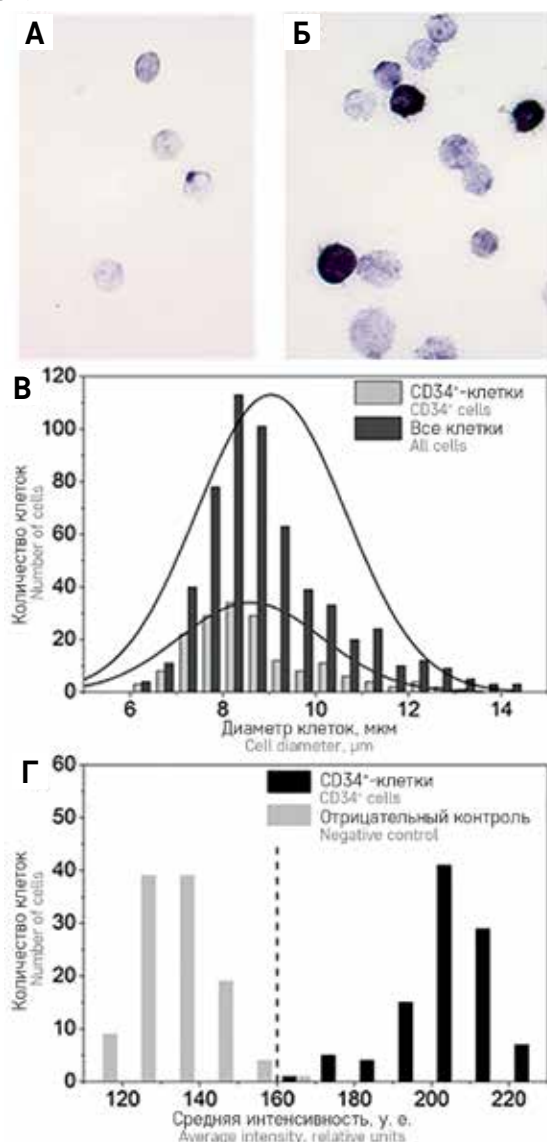
CD10<sup>+</sup>-мононуклеаров. В КМ у большинства здоровых доноров бласты и крупные предшественники также присутствовали среди CD19<sup>+</sup>- и CD20<sup>+</sup>-клеток, но отсутствовали среди CD22<sup>+</sup>- или sIgM<sup>+</sup>-клеток,

Рисунок 4

Иммуноцитохимическое окрашивание гематоносов анти-CD34: А, Б – фотографии окрашенных анти-CD34-FITC мононуклеаров КМ, связавшихся на биочипе с анти-CD3 (А) и анти-CD10 (Б) после ферментативного усиления с использованием вторичных антител к FITC, конъюгированных с щелочной фосфатазой, и субстрата BCIP/NBT (см. раздел «Материалы и методы исследования»),  $\times 1000$ ; В – распределение по размеру CD10<sup>+</sup>- (черный цвет) и CD10<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>- (серый цвет) мононуклеаров, выделенных из нормального КМ (объединенные данные из 3 нормальных образцов КМ, 750 отдельных клеток); Г – определение порогового значения (пунктирная линия) по интенсивности сигнала CD34<sup>+</sup>-клеток (черный цвет) по сравнению с отрицательным контролем (серый цвет)

Figure 4

Immunocytochemical staining of hematogones for CD34 (anti-CD34 stain): А, Б – images of mononuclear cells of BM stained with FITC anti-human CD34 antibody that bound on a microarray to anti-CD3 (А) and anti-CD10 (Б) after enzyme enhancement using FITC secondary antibodies conjugated with alkaline phosphatase and BCIP/NBT substrate (see Materials and Methods),  $\times 1000$ ; В – the distribution of CD10<sup>+</sup> (black color) and CD10<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> (grey color) mononuclear cells isolated from normal BM (collective data obtained from 3 normal BM samples, 750 individual cells) by size; Г – the determination of a threshold value (dash line) of the signal intensity of CD34<sup>+</sup> cells (black color) in comparison with the negative control (grey color)



только в 1 образце здорового КМ были найдены несколько крупных предшественников в пятне анти-CD22. Отсутствие клеток с бластной морфологией и крупных предшественников среди CD22<sup>+</sup>- и sIgM<sup>+</sup>-клеток указывает на их иммунологическую незрелость и согласуется с ранее опубликованными данными [10, 25].

У пациентов с повышенным количеством гематоносов 0–9,4% (медиана 1,1%) среди CD10<sup>+</sup>-мононуклеаров составляли бласты, а 0–17,2% (медиана 9%) – крупные предшественники. Интересно, что у пациентов с повышенным количеством гематоносов значительно больше бластов имели экспрессию CD22 (рисунок 3). Кроме того, крупные предшественники составляли значительно меньший процент клеток CD19<sup>+</sup> у пациентов с повышенным количеством гематоносов, чем в контрольной группе. Это согласуется с тем фактом, что реактивное увеличение количества гематоносов сопровождается увеличением количества зрелых В-клеток (рисунок 1).

#### CD34<sup>+</sup>-гематоносы морфологически не являются преимущественно бластами или крупными предшественниками

Клетки КМ с бластной морфологией обычно считаются наиболее незрелыми. Чтобы выяснить, имеют ли CD34<sup>+</sup>-гематоносы на первой стадии их созревания преимущественно бластную морфологию, мы построили распределение CD34<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>-клеток по размерам в нормальных аспиратах КМ и сравнили его с распределением по размерам всей популяции CD10<sup>+</sup>. Клетки с бластной морфологией имеют диаметр более 13 мкм (рисунок 2), таким образом, если они преобладают среди клеток CD34<sup>+</sup>, то это повлияет на распределение последних по размерам.

Мононуклеарные клетки, выделенные из КМ здоровых доноров, были помечены анти-CD34-FITC и затем проинкубированы с биочипом. Относительное количество CD10<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> и CD10<sup>+</sup>CD34<sup>–</sup> было определено у 6 здоровых доноров, у 3 из них методом прямой иммунофлуоресценции, а у остальных 3 – после ферментативного усиления флуоресценции (рисунок 4А, Б). В среднем  $20 \pm 8\%$  мононуклеарных клеток, связавшихся на биочипе с анти-CD10, были положительны по CD34. На рисунке 4В показано распределение по диаметру клеток CD34<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup> и всех CD10<sup>+</sup>-клеток. Большинство CD34<sup>+</sup>-клеток имеют диаметр менее 12 мкм, и существенных различий между распределением по размеру CD34<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup> и всех CD10<sup>+</sup>-клеток нет. Это означает, что CD34<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>-клетки морфологически не являются преимущественно бластами или крупными предшественниками.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Детальный анализ морфологии гематогонів нормального КМ затруднен из-за их малого количества. Большая часть данных о морфологии гематогонів была получена на образцах КМ пациентов с их реактивным увеличением, поэтому прежде всего необходимо было проверить, можно ли экстраполировать эти данные на нормальный КМ. Анализ гематогонів в мазках КМ дополнительно осложняется неопределенностью в отнесении некоторых клеток незрелой морфологии к гематогонам, а не к миелоидным или Т-клеточным предшественникам. В данной работе проведен морфологический анализ чистой популяции гематогонів, выделенных как CD10<sup>+</sup>-фракция мононуклеарных клеток КМ, с помощью биочипа с иммобилизованными антителами к CD и выполнено сравнение результатов, полученных у пациентов с повышенным содержанием гематогонів и у здоровых доноров. Следует отметить, что в данном исследовании все пациенты с повышенным уровнем гематогонів были младше 2 лет, так как реактивное повышение гематогонів гораздо чаще наблюдается у маленьких детей, в то время как здоровые доноры намного старше.

По своим морфологическим особенностям гематогонів в нормальном КМ делятся на 2 категории: бласты диаметром 13–17 мкм с кружевным или тонкосеточным хроматином и одним или несколькими ядрышками и незрелые лимфоидные клетки с очень высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, нежным рисунком хроматина и отсутствием ядрышек. Небольшая часть клеток последнего морфологического типа имеет диаметр 10–15 мкм и отнесена нами к предварительной категории «крупные предшественники». Стоит отметить, что гематогонів с бластной морфологией по некоторым морфологическим критериям [26] имеют много общих черт с миелоидными бластами, поэтому их нелегко идентифицировать в качестве предшественников В-клеток в мазках КМ.

Фракции CD10<sup>+</sup>-мононуклеаров с бластной морфологией и крупных предшественников в нормальном КМ и КМ пациентов с повышенным процентом гематогонів существенно не различаются, и у пациентов не было обнаружено новых морфологических типов предшественников В-клеток. Эти данные оправдывают использование образцов с повышенным содержанием гематогонів для их морфологического исследования. Доля крупных предшественников в общей популяции В-клеток (CD19<sup>+</sup>) была значительно меньше у пациентов с повышенным содержанием гематогонів по сравнению со здоровыми донорами. Это может быть объяснено тем фактом, что процент зрелых slgM<sup>+</sup> В-клеток при реактивном увеличении гематогонів также растет (рисунки 1).

Увеличение количества slgM<sup>+</sup> В-клеток одновременно с ростом количества гематогонів является

одним из признаков, отличающих реактивное увеличение гематогонів от В-ОЛЛ, поскольку это указывает на отсутствие характерного для В-ОЛЛ блока дифференцировки В-клеток [11, 15]. Хотя среднее процентное содержание CD20<sup>+</sup>- и CD22<sup>+</sup>-клеток в аспиратах КМ здоровых доноров и пациентов с повышенным уровнем гематогонів было одинаковым (рисунки 1), у некоторых пациентов с повышенным уровнем гематогонів оно было выше, чем у здоровых доноров. Эта разница не связана с возрастом, так как процент CD20<sup>+</sup>-клеток в КМ, напротив, с возрастом увеличивается [25]. Поскольку процентное содержание CD20<sup>+</sup>- и CD22<sup>+</sup>-клеток с бластной морфологией и крупных предшественников у некоторых пациентов выше, чем в контрольной группе, это может указывать на то, что увеличение популяций этих двух видов клеток, по крайней мере, частично обусловлено увеличением количества гематогонів.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Самый интересный вопрос заключается в том, существует ли корреляция между морфологией гематогонів и стадией их созревания. Мы частично ответили на этот вопрос, проанализировав распределение по размерам CD34<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>-клеток, что соответствует 1-й стадии созревания гематогонів. Показано, что диаметр CD34<sup>+</sup>-клеток изменяется в пределах от 7 до 14 мкм и, следовательно, морфологически они не относятся исключительно к бластам или крупным предшественникам (рисунки 4В). С другой стороны, некоторые клетки, положительные по CD20 – маркеру, который отсутствует на поверхности В-клеток до 2-й стадии созревания гематогонів, также имеют бластную морфологию (рисунки 3А). Таким образом, корреляции между морфологией и стадией созревания гематогонів не обнаружено. Поскольку нормальные предшественники В-клеток продолжают пролиферировать до стадии малых пре-В-клеток, на которой начинается перестройка легких цепей иммуноглобулинов [27, 28], можно предположить, что разница в морфологии отражает положение клетки в клеточном цикле, а не стадию ее созревания.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа частично поддержана грантом Российского научного фонда №23-45-10039 (<https://rscf.ru/en/project/23-45-10039/>).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ORCID

**Zakirova A.O.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9475-3318>

**Fedyanina O.S.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7131-8006>

**Khvastunova A.N.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7117-0168>

**Filatov A.V.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6460-9427>

**Kuznetsova S.A.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5946-0026>

## Литература / References

1. Vogel P., Erf L.A., Rosenthal N. Hematological Observations on Bone Marrow Obtained by Sternal Puncture. *Am J Clin Pathol* 1937; 7: 498–515.
2. Muehleck S.D., McKenna R.W., Gale P.F., Brunning R.D. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-positive cells in bone marrow in the absence of hematologic malignancy. *Am J Clin Pathol* 1983; 79: 277–84.
3. Janossy G., Bollum F.J., Bradstock K.F., McMichael A., Rapsom N., Greaves M.F. Terminal transferase-positive human bone marrow cells exhibit the antigenic phenotype of common acute lymphoblastic leukemia. *J Immunol* 1979; 123: 1525–9.
4. Janossy G., Bollum F., Bradstock K., Ashley J. Cellular phenotypes of normal and leukemic hematopoietic cells determined by analysis with selected antibody combinations. *Blood* 1980; 56: 430–41.
5. LeBien T.W., Wörmann B., Villablanca J.G., Law C.L., Steinberg L.M., Shah V.O., Loken M.R. Multiparameter flow cytometric analysis of human fetal bone marrow B cells. *Leukemia* 1990; 4: 354–8.
6. Schmitt C., Eaves C.J., Lansdorp P.M. Expression of CD34 on human B cell precursors. *Clin Exp Immunol* 1991; 85: 168–73.
7. Hokland B.Y.P., Rosenthal P., Griffin J.D., Nadler L.M., Daley J., Hokland M., et al. Purification and characterization of fetal hematopoietic cells that express the common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA). *J Exp Med* 1983; 157: 114–29.
8. Brady K.A., Atwater S.K., Lowell C.A. Flow cytometric detection of CD10 (cALLA) on peripheral blood B lymphocytes of neonates. *Br J Haematol* 1999; 107: 712–5.
9. Loken M.R., Shah V.O., Dattilio K.L., Civin C.I. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 1987; 70: 1316–24.
10. Chantepie S.P., Cornet E., Salaün V., Reman O. Hematogones: an overview. *Leuk Res* 2013; 37: 1404–11.
11. McKenna R.W. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. *Blood* 2001; 98: 2498–507.
12. 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: 277–85.
13. Longacre T.A., Foucar K., Crago S., Chen I.M., Griffith B., Dressler L., et al. Hematogones: a multiparameter analysis of bone marrow precursor cells. *Blood* 1989; 2: 543–53.
14. Schuurmans Stekhoven J.H., Langenhuisen C.A., Bakkeren J.A., Holland R., Höller I., De Vaan G.A., Schretlen E.D. Morphology and incidence of the “posttherapeutic lymphoid cell” in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 1986; 124: 46–52.
15. Rimsza L.M., Larson R.S., Winter S.S., Foucar K., Chong Y.Y., Garner K.W., Leith C.P. Benign hematogone-rich lymphoid proliferations can be distinguished from B-lineage acute lymphoblastic leukemia by integration of morphology, immunophenotype, adhesion molecule expression, and architectural features. *Am J Clin Pathol* 2000; 114: 66–75.
16. Ryan D., Chapple C., Kossover S., Sandberg A.A., Cohen H.J. Phenotypic similarities and differences between CALLA-positive acute lymphoblastic leukemia cells and normal marrow CALLA-positive B cell precursors. *Blood* 1987; 70: 814–21.
17. Al-Shieban S., Byrne E., Trivedi P., Morilla R., Matutes E., Naresh K.N. Immunohistochemical distinction of haematogones from B lymphoblastic leukaemia/lymphoma or B-cell acute lymphoblastic leukaemia (B-ALL) on bone marrow trephine biopsies: A study on 62 patients. *Br J Haematol* 2011; 154 (4): 466–70.
18. Don M.D., Lim W., Lo A., Cox B., Huang Q., Kitahara S., et al. Improved recognition of hematogones from precursor B-lymphoblastic leukemia by a single tube flow cytometric analysis. *Am J Clin Pathol* 2020; 153: 790–8.
19. Sevilla D.W., Colovai A.I., Emmons F.N., Bhagat G., Alobeid B. Hematogones: a review and update. *Leuk Lymphoma* 2010; 51: 10–9.
20. Fenneteau O., Lainey E. Valeur diagnostique du myélogramme au cours des pathologies constitutionnelles de l'enfant. *Ann Biol Clin (Paris)* 2007; 65: 483–503.
21. Braham Jmili N., Nsaibia S., Jacob M.C., Omri H., Laatiri M.A., Yacoub S., et al. Immunophenotypic analysis of bone marrow B lymphocyte precursors (hematogones) by flow cytometry. *Clin Lab Sci* 2009; 22: 208–15.
22. Fukushima T., Sumazaki R., Koike K., Tsuchida M., Matsui A., Nakauchi H. Multicolor flow-cytometric, morphologic and clonogenic analysis of marrow CD10-positive cells in children with leukemia in remission of nonmalignant diseases. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998; 20: 222–8.
23. Ortolani C. Flow Cytometry of Hematological Malignancies. Wiley-Blackwell; 2021.
24. Khvastunova A.N., Kuznetsova S.A., Al-Radi L.S., Vylegzhanina A.V., Zakirova A.O., Fedyanina O.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.
25. van Lochem E.G., van der Velden V.H.J., Wind H.K., te Marvelde J.G., Westerdal N.A.C., van Dongen J.J.M. 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: 1–13.
26. Rosenthal S., Canellos G.P., Whang-Peng J., Gralnick H.R. Blast crisis of chronic granulocytic leukemia. Morphologic variants and therapeutic implications. *Am J Med* 1977; 63: 542–7.
27. Mårtensson I.L., Almqvist N., Grimsholm O., Bernardi A.I. The pre-B cell receptor checkpoint. *FEBS Lett* 2010; 584: 2572–9.
28. Karasuyama H., Rolink A., Shinkal Y., Young F., Alt F.W., Melchers F. The expression of Vpre-B/λ5 surrogate light chain in early bone marrow precursor B cells of normal and B cell-deficient mutant mice. *Cell* 1994; 77: 133–43.