

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Давыдова Юлия Олеговна

**Иммунофенотипическая оценка дисмиелопоэза у больных
миелодиспластическими синдромами**

14.01.21 – Гематология и переливание крови

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук Паровичникова Елена Николаевна,
кандидат медицинских наук Гальцева Ирина Владимировна

Москва, 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. Обзор литературы.....	10
1.1. Классификация и прогностические шкалы миелодиспластических синдромов	10
1.2. Основные подходы в диагностике миелодиспластических синдромов	15
1.3. Иммунофенотипические признаки дисмиелопоэза.....	22
1.4. Скрининговая мини-панель для цитометрической диагностики миелодиспластических синдромов.....	23
1.5. Цитомерический анализ незрелых миелоидных и В-клеточных предшественников.....	26
1.6. Цитомерический анализ гранулоцитов.....	29
1.7. Цитомерический анализ моноцитов.....	32
1.8. Цитомерический анализ эритрокариоцитов.....	34
1.9. Цитометрические оценочные системы в диагностике миелодиспластических синдромов	35
Глава 2. Материалы и методы.....	40
2.1. Пациенты.....	40
2.2. Подготовка проб для анализа методом проточной цитофлуориметрии	44
2.3. Стратегия гейтирования и анализируемые параметры	46
2.4. Цитометрические оценочные системы	56
2.5. Статистический анализ данных	57
Глава 3. Результаты и их обсуждение	59
3.1. Клинико-лабораторная характеристика пациентов с миелодиспластическими синдромами	59

3.2. Референсные интервалы для количественных параметров	61
3.3. Частота встречаемости цитометрических aberrаций в компартменте ранних предшественников гемопоэза	78
3.4. Частота встречаемости цитометрических aberrаций в компартменте гранулоцитов	84
3.5. Частота встречаемости цитометрических aberrаций в компартменте моноцитов	89
3.6. Оценка дисмиелопоэза согласно цитометрическим шкалам	93
3.7. Диагностическая значимость цитометрических оценочных шкал	97
3.8. Сопоставление цитометрических шкал дисмиелопоэза с результатами цитогенетического исследования	103
3.9. Сопоставление результатов цитометрического анализа дисмиелопоэза с результатами гистологического исследования	113
3.10. Сопоставление результатов цитометрического анализа дисмиелопоэза с результатами цитологического исследования.....	122
3.11. Изучение взаимосвязи цитометрических шкал дисмиелопоэза с цитогенетическим прогнозом и интернациональной шкалой риска	127
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	136
ВЫВОДЫ	143
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	144
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	147

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Миелодиспластические синдромы (МДС) представляют собой гетерогенную группу клональных заболеваний системы крови, которые характеризуются цитопениями, наличием дисмиелопоэза, высокой частотой обнаружения аномалий кариотипа и высоким риском трансформации в острые миелоидные лейкозы [12]. К базовым методам диагностики МДС относятся цитологическое, цитохимическое, гистологическое и цитогенетическое исследования костного мозга (КМ) [86].

Цитологическим признаком МДС является наличие дисплазии хотя бы в одном ростке гемопоэза. Согласно рекомендациям всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) значимой признана дисплазия в более чем 10% эритрокариоцитов, гранулоцитов и/или мегакариоцитов, которые исследуют в цитологическом препарате КМ [65]. Однако наличие диспластических признаков в разных ростках гемопоэза не является само по себе критерием клонального патологического процесса. Дисплазия эритрокариоцитов также выявляется в случаях дефицита витамина В12, фолиевой кислоты, меди, а также при воздействии тяжелых металлов (мышьяка, цинка). Изониазид способен вызывать формирование кольцевых сидеробластов. Ко-тримоксазол, такролимус, мофетила микофенолат вызывают значительную гипосегментацию ядер нейтрофилов. Парвовирус В19 может приводить к снижению количества эритрокариоцитов, появлению гигантских форм пронормобластов [4].

Гистологическое исследование трепанобиоптата необходимо выполнять с целью получения информации о клеточности КМ, наличии фиброза стромы и оценки дисплазии клеток основных ростков кроветворения. Исследование гистоархитектоники КМ, выявление аномальной локализации незрелых предшественников и иммуногистохимическое исследование являются особенно ценными в случае МДС, протекающего с фиброзом и/или гипоклеточным КМ,

когда морфологический подсчет бластных клеток и оценка выраженности дисплазии в аспирате КМ могут быть затруднены [7].

Исключительно важную роль в диагностике МДС играют цитогенетические исследования, а ряд хромосомных aberrаций связан с определенным клиническим течением и прогнозом заболевания. В существующие шкалы оценки продолжительности жизни больных МДС включены особенности кариотипа. МДС с изолированной делецией $del(5q)$ (или при наличии дополнительной aberrации, за исключением аномалий хромосомы 7) выделяют как отдельный вид МДС (МДС с изолированной делецией 5q), нередко характеризующийся наличием мегакариоцитов с гиполобулярными ядрами, макроцитарной анемией, нормальным или повышенным количеством тромбоцитов и благоприятным прогнозом. Комплексный кариотип (≥ 3 цитогенетических aberrаций) ассоциирован с неблагоприятным прогнозом. Изолированная $del(20q)$ ассоциирована с дисмегакариоцитопозом и тромбоцитопенией, а $inv(3)(q21.3q26.2)$ или $t(3;3)(q21.3;q26.2)$ - с дисмегакариоцитопозом и тромбоцитозом. Потеря Y-хромосомы обнаруживается также нередко, однако эта aberrация является возрастным феноменом, поэтому не всегда указывает на наличие клонального заболевания [10].

Дифференциальная диагностика МДС с другими заболеваниями, протекающими с миелодисплазией и цитопениями, требует тщательного обследования пациента и динамического наблюдения. Но даже при выполнении всех базовых исследований (цитологического, цитохимического, цитогенетического и гистологического) может потребоваться дополнительный диагностический критерий, особенно при отсутствии цитогенетических aberrаций и/или минимальных признаках дисмиелопоэза при цитологическом исследовании КМ. В качестве такого дополнительного критерия может быть применен метод многоцветной проточной цитофлуориметрии (МПЦ). Однако не существует универсального цитометрического критерия, обладающего значительной «диагностической силой», который бы позволял определить наличие МДС [56].

Существует большое количество работ по оценке признаков дисмиелопоэза методом МПЦ, которые различаются по количеству исследованных параметров, кластер-дифференцировочных антигенов (CD – clusters of differentiation) и форматом заключения. В 2002 году исследователями К. Огата с соавт. опубликована первая диагностическая шкала «Ogata score», включавшая всего четыре параметра. При отклонениях от нормальных значений в двух и более параметрах предполагалось наличие МДС. В 2003 году исследователями Д. Вэллс и соавт. была предложена цитометрическая прогностическая шкала, основанная на подсчете числа цитометрических аберраций в компартменте гранулоцитов и моноцитов, а также количества аномальных миелоидных клеток-предшественниц гемопоэза [94]. При оценке выживаемости больных МДС была выявлена ассоциация между суммарным баллом по шкале «Wells» и продолжительностью жизни, а так же вариантом МДС в соответствии с классификацией ВОЗ [32]. Первая работа, включавшая рекомендации по диагностике МДС методом МПЦ, была опубликована в 2009 году [56]. В дальнейшем новые исследования и накопленный опыт привели к пересмотру и дополнению рекомендаций в 2012 и 2014 годах и появлению объединенной шкалы «Ogata-Wells» [76, 97]. Согласно классификации ВОЗ 2017 года при диагностике МДС выявление не менее 3-х цитометрически аномальных параметров в двух и более клеточных компартментах КМ имеют высокую диагностическую значимость при МДС [86].

При МДС крайне важным является определение риска прогрессирования заболевания, так как это определяет тактику терапии. В настоящее время используются прогностические шкалы, такие как интернациональная прогностическая шкала IPSS (International Prognostic Scoring System) и пересмотренная интернациональная прогностическая шкала IPSS-R (Revised International Prognostic Scoring System) [41] [43, 79]. Цитометрические аномалии также имеют прогностическое значение [58], поэтому сопоставление результатов иммунофенотипического исследования с параметрами практически применяемых шкал риска представляет интерес.

Цель исследования

Определить роль иммунофенотипической оценки дисмиелопоэза в диагностике миелодиспластических синдромов.

Задачи исследования

1. Подобрать оптимальное сочетание моноклональных антител для определения аберрантной экспрессии антигенов кластеров дифференцировки на клетках миелопоэза у больных МДС;
2. Оценить частоту встречаемости и профиль аберрантной экспрессии иммунофенотипических маркеров на CD34-позитивных клетках, гранулоцитах и моноцитах у пациентов в зависимости от варианта МДС;
3. Определить степень дисмиелопоэза методом проточной цитофлуориметрии по оценочным шкалам МДС;
4. Определить чувствительность и специфичность методов оценки дисмиелопоэза с помощью трех цитометрических шкал «Ogata score», «Wells» и объединенной шкалы «Ogata-Wells»;
5. Сопоставить результаты цитометрической оценки дисмиелопоэза с результатами цитологического, цитогенетического и гистологического исследований и выделить те варианты МДС, при которых выполнение иммунофенотипического исследования необходимо.

Научная новизна

Подобранное оригинальное сочетание моноклональных антител к антигенам кластеров дифференцировки позволило с высокой специфичностью (87,6%) и чувствительностью (87,3%) провести иммунофенотипическую оценку дисмиелопоэза по трем цитометрическим шкалам у пациентов с любым вариантом МДС. Впервые проведена комплексная сравнительная оценка данных

цитологического, гистологического, цитогенетического исследований, прогностических групп по шкале IPSS-R и встречаемости цитометрических аномалий у пациентов с различными вариантами МДС. Исследование признаков дисмиелопоэза имеет особенно важное диагностическое значение для МДС без выраженного дисмиелопоэза и с отсутствием типичных цитогенетических аномалий.

Практическая значимость

У тех пациентов, у которых верификация диагноза затруднена - без избытка бластов, кольцевых сидеробластов и типичных цитогенетических aberrаций - интеграция метода иммунофенотипической оценки дисмиелопоэза в протокол обследования пациентов позволила подтвердить наличие МДС с чувствительностью 65,4% и специфичностью 87,6%.

Положения, выносимые на защиту

1. Подобранный оригинальный набор моноклональных антител к различным антигенам кластеров дифференцировки клеток миелопоэза позволило оценить степень и частоту встречаемости иммунофенотипических aberrаций при всех вариантах МДС с высокой степенью совпадения с основными методами диагностики МДС и группами риска по шкале IPSS-R;

2. Параметры чувствительности и специфичности у объединенной шкалы «Ogata-Wells» составляют 87,3% и 87,6%, соответственно, поэтому иммунофенотипическая оценка дисмиелопоэза может быть интегрирована в алгоритм первичной диагностики у пациентов с подозрением на наличие МДС.

Структура диссертации

Диссертационная работа включает «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы».

Текст диссертации изложен на 162 страницах, содержит 46 рисунков и 32 таблицы. Список литературы состоит из 13 отечественных и 84 зарубежных источников.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Классификация и прогностические шкалы миелодиспластических синдромов

Определение и классификация миелодиспластических синдромов

Миелодиспластические синдромы являются гетерогенной группой клональных заболеваний системы кроветворения, которые характеризуются цитопениями, признаками дисмиелопоэза и высоким риском трансформации в острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) [12; 86].

МДС чаще всего встречается у пожилых людей, с возрастом риск развития МДС возрастает, достигая максимума у лиц старше 70 лет. Это, вероятно, связано с тем, что с возрастом увеличивается риск формирования опухолевых клонов из гемопоэтических клеток-предшественниц вследствие генетических, эпигенетических и иммунологических изменений. Ранние миелоидные предшественники у больных МДС склонны к избыточному апоптозу, что является одной из причин развития цитопений [26]. Воздействие химических и физических мутагенов (например, лучевая терапия или химиотерапия у пациентов с опухолями) может привести к возникновению «вторичного» МДС. С другой стороны, врожденные заболевания костного мозга (анемия Фанкони, нейрофиброматоз, врожденный дискератоз) также могут приводить к развитию миелодиспластического синдрома [5; 42].

Миелодиспластические синдромы характеризуются выраженной гетерогенностью, и первая их классификация, основанная на цитоморфологических особенностях, была представлена кооперативной франко-американско-британской группой [22; 23].

В период с 2001 по 2017 годы ВОЗ предложила несколько обновленных версий классификации МДС [18; 92].

В основе классификации МДС по рекомендациям ВОЗ 2017 года лежат данные морфологического, цитохимического и цитогенетических исследований

пунктата КМ и периферической крови. Выделяют следующие нозологические формы МДС:

- 1) МДС с линейной дисплазией (МДС-ЛД):
 - МДС-ЛД: рефрактерная анемия;
 - МДС-ЛД: рефрактерная цитопения;
 - МДС-ЛД: рефрактерная тромбоцитопения;
- 2) МДС с мультилинейной дисплазией (МДС-МД);
- 3) МДС с кольцевыми сидеробластами (МДС-КС):
 - МДС-КС и линейной дисплазией;
 - МДС-КС и мультилинейной дисплазией;
- 4) МДС с изолированной делецией длинного плеча 5-й хромосомы (МДС с 5q-);
- 5) МДС с избытком бластов-1 (МДС-ИБ-1) (определяется бластных клеток в КМ 5-9% или в периферической крови – 2-4%, палочки Ауэра отсутствуют);
- 6) МДС с избытком бластов-2 (МДС-ИБ-2) (определяется бластных клеток в КМ 10-19% или в периферической крови – 5-19%, могут обнаруживаться палочки Ауэра);
- 7) МДС неклассифицируемый [86].

В редакции ВОЗ 2017 года по сравнению с редакцией 2008 термин «рефрактерная анемия/цитопения» заменен на термин «миелодиспластический синдром». Этим подчеркивается то, что цитологические признаки дисплазии и количество бластных клеток важнее самого факта цитопении, не всегда связанным с дисплазией соответствующей линии дифференцировки миелопоэза [6].

В пределах категорий МДС, выделенных ВОЗ, прогноз и течение заболевания значительно различаются и зависят также от возраста, сопутствующих заболеваний, а также цитогенетических и молекулярно-генетических особенностей опухолевого клона [2; 39; 46; 82]. Поэтому помимо

классификации МДС были предложены прогностические шкалы, которые определяют риск прогрессирования и прогноз при данном заболевании.

Прогностические шкалы МДС

Для выбора оптимальной терапии в соответствии с риском прогрессирования МДС были разработаны прогностические шкалы. Первой такой шкалой была шкала IPSS, опубликованная в 1997 году. В ней учитывается доля бластных клеток в КМ, наличие определенных цитогенетических аномалий и количество ростков кроветворения, в которых наблюдается цитопения [41]. Прогностическая балльная система ВОЗ (WHO Classification-based Prognostic Scoring System, WPSS) является более продвинутой и учитывает особенности кариотипа и потребность в гемотрансфузиях [13; 62].

В 2012 году шкала IPSS была пересмотрена и опубликован новый доработанный вариант – IPSS-R (Revised International Prognostic Scoring System), учитывающий большее количество цитогенетических aberrаций [43; 79]. Особенности кариотипа определяют 5 цитогенетических групп риска (Таблица 1).

Таблица 1 – Цитогенетические группы прогноза при МДС [43; 79]

Цитогенетическая группа прогноза	Цитогенетические аномалии	Доля пациентов по исследованию П. Гринберг с соавт. (2012), n = 7012	Доля пациентов по исследованию Д. Шанц с соавт. (2012), n = 2754
Очень хороший	-Y, del(11q)	4%	3%
Хороший	Нормальный кариотип, del(5q), del(12p), del(20q), двойные с del(5q)	72%	66%
Промежуточный	del(7q), +8, +19, i(17q), а также другие одиночные или двойные аномалии	13%	19%
Плохой	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), двойные, включающие -7/del(7q), комплексные – с 3 аномалиями	4%	5%
Очень плохой	Комплексные – с более, чем 3 аномалиями	7%	7%

Группы цитогенетического прогноза коррелируют с выживаемостью пациентов с МДС (Рисунок 1) [43].

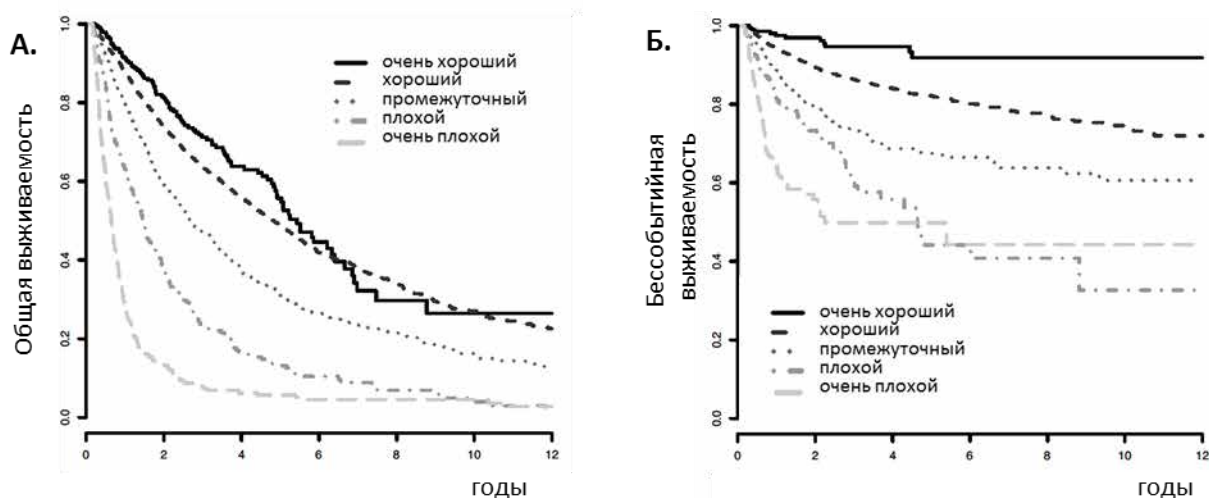


Рисунок 1 – Влияние цитогенетического прогноза на общую выживаемость пациентов с МДС (А) и бессобытийной выживаемостью, где в качестве события принимали трансформацию МДС в ОМЛ (Б) [43]

Шкала IPSS-R учитывает цитогенетическую группу прогноза, а также количество бластных клеток по данным миелограммы и глубину цитопении (Таблица 2) [43].

Таблица 2 – Факторы, учитываемые для определения категории риска по шкале IPSS-R [43]

Прогностические факторы	балл						
	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Цитогенетический прогноз	очень хороший	–	хороший	–	промежуточный	плохой	очень плохой
Бласты в КМ, %	≤ 2	–	> 2 , но < 5	–	5–10	> 10	–
Гемоглобин, г/л	≥ 100	–	80– < 100	–	–	–	–
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	≥ 100	50– < 100	< 50	–	–	–	–
Абсолютное число нейтрофилов, $\times 10^9/\text{л}$	$\geq 0,8$	$< 0,8$	–	–	–	–	–

Категория прогностического риска IPSS-R определяется путем подсчета суммарного количества баллов, полученных по каждому из прогностических факторов, указанных в Таблице 2. Категории IPSS-R, определяемые по итоговому баллу, показаны в Таблице 3.

Таблица 3 – Категории риска по шкале IPSS-R [43]

Категория риска	Общий балл
Очень низкий	$\leq 1,5$
Низкий	$>1,5 - 3$
Промежуточный	$>3 - 4,5$
Высокий	$>4,5 - 6$
Очень высокий	>6

В исследовании П. Гринберг 2012 года, включившем 7012 пациентов с МДС, категории прогноза по шкале IPSS-R были взаимосвязаны с общей выживаемостью и трансформацией МДС в ОМЛ (Рисунок 2), а доли пациентов, попавших в категории очень низкого, низкого, промежуточного, высокого и очень высокого рисков составили 19%, 38%, 20%, 13% и 10%, соответственно [43].

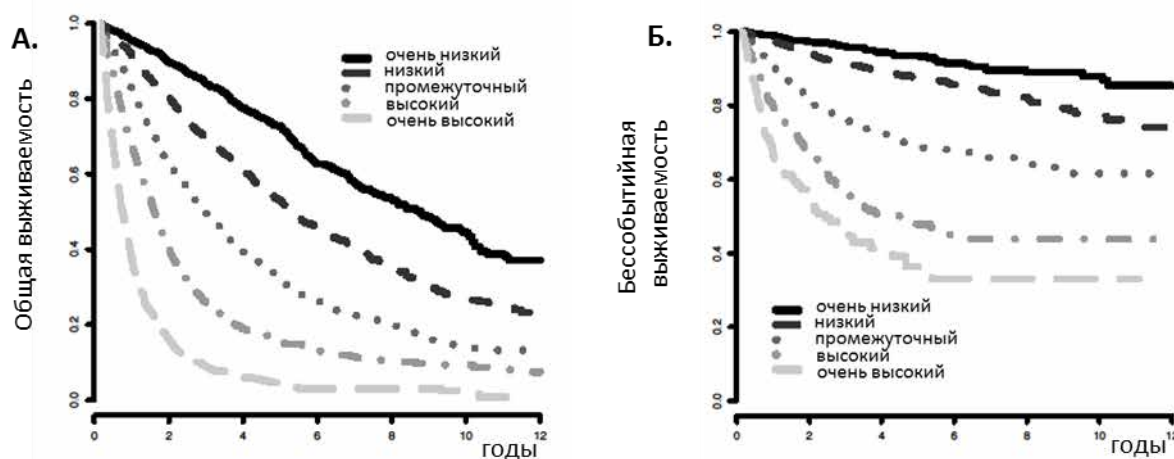


Рисунок 2. Риск IPSS-R и взаимосвязь с общей выживаемостью пациентов с МДС (А) и бессобытийной выживаемостью, где в качестве события принимали трансформацию МДС в ОМЛ (Б) [43]

Таким образом, шкала IPSS-R является важной для определения прогностического статуса пациентов с МДС и учитывается в определении

терапевтической тактики. Появляются новые исследования, показывающие прогностическую ценность точечных мутаций [20] и иммунофенотипических аномалий дисмиелопоэза, изучаемых методом МПЦ [58]. Определение их взаимосвязи со шкалой IPSS-R является обоснованным и представляет интерес. Более того, некоторые исследователи подчёркивают необходимость в глубоком изучении молекулярных и иммунофенотипических aberrаций с целью дальнейшего их включения в предстоящие уточнения шкалы IPSS-R [91].

1.2. Основные подходы в диагностике миелодиспластических синдромов

Существуют рекомендации Европейского общества по изучению лейкозов (ELN - European Leukemia Net) по выбору терапевтических подходов и диагностических методов у пациентов с МДС. Основным проявлением МДС являются цитопении, а именно анемия (при концентрации гемоглобина (Hb) менее 100 г/л), нейтропения (при абсолютном числе нейтрофилов менее $1,8 \times 10^9/\text{л}$) и/или тромбоцитопения (при количестве тромбоцитов менее $100 \times 10^9/\text{л}$). Однако диагноз МДС может быть установлен и в случаях умеренной анемии (у мужчин при Hb < 130 г/л, у женщин < 120 г/л) или тромбоцитопении (< $150 \times 10^9/\text{л}$) при наличии специфических морфологических изменений клеток и/или цитогенетических аномалий. К базовым методам диагностики МДС относят цитологическое, цитохимическое, гистологическое и цитогенетическое исследование КМ [12].

К цитологическому критерию МДС относится дисплазия в более чем 10% клеток одной или нескольких линий гемопоэза (эритрокариоцитах, гранулоцитах и/или мегакариоцитах). Однако в некоторых исследованиях обсуждается, что более специфичным порогом является дисплазия в 30-40% мегакариоцитов [65].

Необходимо подчеркнуть, что понятие «дисплазия ростков миелопоэза» не тождественна понятию «миелодиспластический синдром». Цитологические признаки дисплазии можно обнаружить при многих других заболеваниях (например, хронических миелопролиферативных заболеваниях (ХМПЗ)), а также

реактивных состояниях, вирусных инфекциях (гепатитах В и С, вирусе Эпштейна-Барр, парвовирусе В19), при лечении химиотерапевтическими препаратами и лекарственными средствами (изониазид, ко-тримоксазол, такролимус, мофетила микофенолат). Дизэритропоэз встречается при В12-дефицитной анемии, пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ), аутоиммунных, некоторых наследственных заболеваниях (например, врожденной дизэритропоэтической анемии) [3; 4; 7; 88].

Дисгранулопоэз может наблюдаться из-за влияния лекарственных средств (например, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, иммунодепрессантов), вирусных инфекциях, поражении КМ при лимфомах и/или лейкозах. Дисмегакариоцитопоэз появляется при вирусной инфекции иммунодефицита человека (ВИЧ), трансплантации костного мозга, после проведенной химиотерапии [7].

Таким образом, ряд реактивных состояний и других патологий может спровоцировать легкую или даже выраженную дисплазию в нормальных (поликлональных) клетках КМ с цитопенией или без нее (Таблица 4).

Стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ) КМ является обязательным и имеет диагностический, прогностический и терапевтический аспекты. СЦИ клеток КМ должно быть проведено всем пациентам с подозрением на наличие МДС. В случаях отсутствия митозов клеток рекомендуется проведение исследования методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization — FISH) [25; 78; 89]. Анализ FISH должен охватывать, по крайней мере, следующие области: 5q31, сер7, 7q31, 20q, сер8, серY и р53. Однако некоторые из перестроек (20q, сер8, серY, р53) не являются определяющими для МДС. Также следует учитывать, что панель зондов FISH не может заменить СЦИ вследствие значительной гетерогенности цитогенетических изменений при МДС [11; 47; 67].

Таблица 4 – Возможные причины развития цитопении и дисплазии клеток костного мозга [91]

Причина	Диагностика
Врожденные синдромы костномозговой недостаточности	Семейная история, генетические тесты
Миелоидные неоплазии	Диагностические критерии по ВОЗ
Лимфопролиферативные заболевания	Диагностические критерии по ВОЗ
Пароксизмальная ночная гемоглобинурия	Проточная цитофлуориметрия
Красноклеточная аплазия	Гистология, цитоморфология, количество ретикулоцитов в крови
Серьезная атрофия костного мозга	Гистология
Витамин В12 или фолатная недостаточность	Уровень в сыворотке крови, цитоморфология
Дефицит меди	Семейная история, уровень меди в сыворотке
Вирусные инфекции (цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус иммунодефицита человека, парвовирус В19, гепатит и другие)	Вирусологические исследования
Бактериальные исследования	Бактериологические исследования
Висцеральный лейшманиоз	Паразитологические исследования и цитология
Аутоиммунные заболевания	Иммунологические диагностические алгоритмы
Хронические воспалительные процессы	Исследования, указывающие на наличие воспалительного процесса
Хроническая почечная недостаточность	Нефрологические диагностические алгоритмы
Хроническая печеночная недостаточность	Гепатологические диагностические алгоритмы
Лекарственное воздействие	Изучение истории принимаемых лекарственных препаратов
Химиотерапия	Онкологический анамнез
Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток	-
Радиационное воздействие	Измерение поглощенной дозы излучения
Токсическое повреждение	Токсикологические исследования

Цитогенетические аномалии выявляются только у 40-50% пациентов МДС. К наиболее частым абберациям относятся: делеция длинного плеча 5-й хромосомы (del(5q)), которая встречается в 15% случаях; моносомия 7-й хромосомы (-7) или делеция длинного плеча 7-й хромосомы (del(7q)), которые обнаруживаются в 10% случаев; трисомия хромосомы 8 (+8), выявляющаяся в 10% случаев [1; 45; 69]. Наличие определенных хромосомных аномалий позволяют установить МДС даже в случаях, когда морфологические признаки МДС не убедительны (Таблица 5).

Таблица 5 – Хромосомные аномалии, рассматривающиеся как диагностический критерий МДС в случаях персистирующей цитопении неопределенного происхождения, но при отсутствии цитологических признаков МДС [92]

Несбалансированные аберрации	Сбалансированные аберрации
-7 или del(7q)	t(11;16)(q23;p13.3)
-5 или del(5q)	t(3;21)(q26.2;q22.1)
i(17q) или t(17p)	t(1;3)(p36.3;q21.1)
-13 или del(13q)	t(2;11)(p21;q23)
del(11q)	inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26.2)
del(12p) или t(12p)	t(6;9)(p23;q34)
del(9q)	
idic(X)(q13)	

Важно отметить, что некоторые часто встречающиеся при МДС цитогенетические нарушения, в частности del(20q), +8 и -Y, не включены в этот список. Имеются данные, что эти нарушения встречались у больных апластической анемией (АА), у которых наблюдался хороший ответ на иммуносупрессивную терапию [44; 61; 83]. Потеря Y-хромосомы часто является возрастным феноменом и не всегда указывает на наличие клонального заболевания [35; 80].

В существующие шкалы оценки продолжительности жизни больных МДС (IPSS, WPSS, IPSS-R) включены особенности кариотипа. МДС с изолированной делецией del(5q) (или при наличии дополнительной аберрации, за исключением аномалий хромосомы 7) выделяют как отдельный вид МДС, нередко характеризующийся наличием мегакариоцитов с гиполобулярными ядрами, макроцитарной анемией, нормальным или повышенным количеством тромбоцитов и благоприятным прогнозом. Комплексный кариотип (≥ 3 -х цитогенетических аберраций) ассоциирован с неблагоприятным прогнозом. Изолированная del(20q) связана с дисмегакариоцитопозом, тромбоцитопенией и хорошим прогнозом, а inv(3)(q21.3q26.2) или t(3;3)(q21.3;q26.2) ассоциированы с дисмегакариоцитопозом, тромбоцитозом и неблагоприятным прогнозом заболевания.

Всем пациентам с подозрением на МДС должно быть проведено тщательное гистологическое исследование трепанобиоптатов, которое позволяет исключить миелоидные и лимфопролиферативные заболевания, серозную атрофию, инфекционные процессы, а также опухолевое поражение КМ [48; 73; 89–91].

При гистологическом исследовании трепанобиоптата КМ в патоморфологическом описании обращают внимание на клеточность кроветворной ткани (относительно возрастной нормы) и наличие/отсутствие фиброза стромы [6; 48; 73; 90; 91]. Гиперклеточность КМ с дефицитом зрелых форм клеток в крови свидетельствует о неэффективности гемопоэза, но встречается также при ХМПЗ, реактивных состояниях, анемическом синдроме. В диагностическом плане сложными являются МДС с гипоплазией КМ, которые требуют дифференциальной диагностики с АА и гипопластическим вариантом ОМЛ. Выделение гипопластической формы МДС является клинически важной, так как в этом случае эффективна иммуносупрессивная терапия. Выявление аномальной локализации незрелых предшественников и иммуногистохимическое исследование с антителом против маркера CD34 является особенно ценным в случае МДС, протекающего с фиброзом и/или гипоклеточным КМ [7].

Признаки дисплазии гистологическим методом оцениваются в двух ростках миелопоэза: мегакариоцитарном (микроформы, клетки с фрагментированными ядрами, монобилобулярные формы) и эритроидном (атипичные митозы, признаки апоптоза в эритрокариоцитах, а также «блок» дифференцировки эритроидного ростка). Признаки дисгранулопоэза можно оценить, как правило, только при цитологическом исследовании [6].

Диагностика МДС требует комплексного подхода, и даже при выполнении цитологического, цитогенетического и гистологического исследований может потребоваться дополнительный диагностический критерий, особенно при отсутствии типичных для МДС цитогенетических аномалий, когда морфологические признаки дисмиелопоэза не выражены и/или КМ характеризуется гипоплазией [51; 74].

Существуют рекомендации по диагностике МДС, сведенные в Таблице 6. Для установления диагноза требуется соответствие двум необходимым критериям и хотя бы одному большому критерию. В случаях, когда не выполняются большие критерии, однако остаются подозрения на наличие МДС, рекомендуется установление соответствия ко-критериям. При выполнении такого диагностического плана могут потребоваться повторные исследования КМ в процессе наблюдения для установления окончательного диагноза МДС [27; 37; 91].

Таблица 6 – Рекомендации по диагностике МДС [91]

<p>А. Необходимые критерии (должны выполняться оба):</p> <p>1) Персистирующая (не менее 4 месяцев) цитопения: анемия, нейтропения и/или тромбоцитопения (исключение: в случае избытка бластов и соответствующих МДС цитогенетических аномалиях диагноз МДС может быть установлен безотлагательно);</p> <p>2) Исключение всех других гематологических и негематологических заболеваний как первичной причины цитопении/дисплазии*.</p>
<p>Б. Большие критерии (соответствие не менее чем одному критерию):</p> <p>1) Дисплазия не менее чем в 10% клеток одного ростка миелопоэза (эритроидного, гранулоцитарного или мегакариоцитарного), определенная в мазке КМ;</p> <p>2) $\geq 15\%$ кольцевых сидеробластов или $\geq 5\%$ кольцевых сидеробластов в присутствии мутации гена <i>SF3B1</i>;</p> <p>3) 5-19% миелобластов в мазках КМ или 2-19% миелобластов в мазке крови;</p> <p>4) Типичные для МДС хромосомные аномалии, выявленные методом СЦИ или с помощью FISH**.</p>
<p>В. Ко-критерии (когда выполнены критерии А, но не Б; должно быть установлено соответствие двум и более пунктам):</p> <p>1) Аномалии, обнаруженные при гистологическом и/или цитохимическом исследовании трепанобиоптатов, соответствующие МДС***;</p> <p>2) Иммунофенотипические аномалии, обнаруженные при исследовании костного мозга методом проточной цитофлуориметрии;</p> <p>3) Наличие клональной популяции миелоидных клеток с мутациями, соответствующими МДС, определенными с помощью молекулярных исследований.</p>

Примечания:

*Нередко у пациентов диагностируются два сосуществующих новообразования системы кроветворения. В редких случаях диагноз МДС может быть установлен даже в случае другого заболевания, вызывающего цитопению;

**Указаны в Таблице 5;

***Примеры: кластеры CD34⁺ клеток, диспластичные мегакариоциты, выявленные с помощью иммуногистохимии.

Таким образом, проведение дифференциальной диагностики МДС с другими заболеваниями, протекающими с миелодисплазией, требует полного и тщательного обследования пациента, динамического наблюдения и повторных обследований [8; 9].

МПЦ клеток КМ как дополнительный критерий в диагностике МДС была введена в 2007 году [89]. Одним из примеров интеграции МПЦ в диагностику МДС может служить схема, предложенная К. Дуэц с соавт. в 2019 году (Рисунок 3).

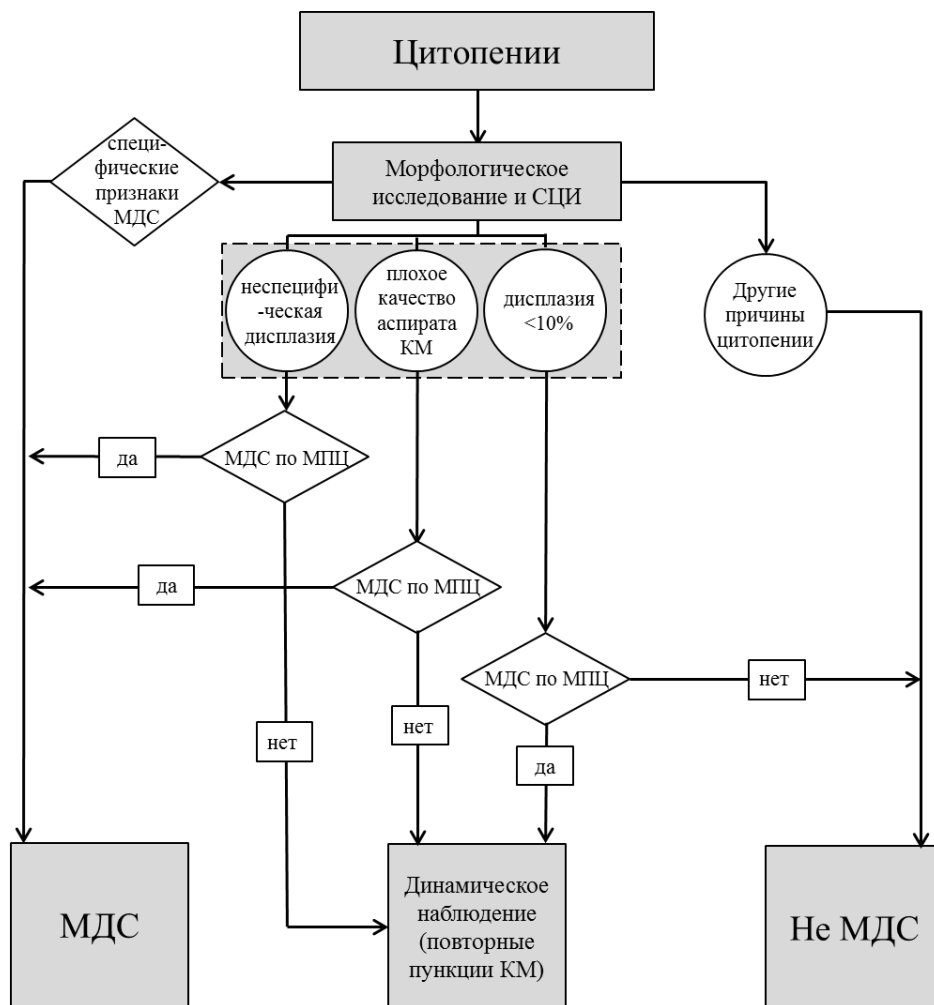


Рисунок 3 – Пример интеграции МПЦ в диагностический процесс МДС [37].

Данная схема демонстрирует, как МПЦ может помочь в первичной диагностике у пациентов с цитопениями и подозрением на наличие МДС. По

результатам морфологического исследования и СЦИ (а также FISH) могут быть обнаружены специфические для МДС аномалии (избыток бластов, наличие более 15% кольцевых сидеробластов или типичных для МДС хромосомных аномалий), тогда диагноз МДС может быть установлен сразу. Если выявлена другая четкая причина цитопении по морфологическому или цитогенетическому методу, то проведение МПЦ (по панели оценки дисмиелопоэза) не требуется. В остальных случаях МПЦ может помочь в диагностике МДС (Рисунок 3) [37].

Таким образом, переходя к комплексной диагностике МДС, следует иметь в виду, что наличие и длительность цитопений, исключение других причин цитопений, цитологическое исследование КМ и периферической крови, цитогенетическое исследование являются базовыми. Однако наличие таких аномалий, как +8, -Y, del(20q) не являются определяющими для диагноза МДС при отсутствии цитологических признаков дисплазии. Иммуногистохимическое исследование трепанобиоптата КМ с определением CD34⁺ клеток-предшественниц и метод МПЦ являются дополнительными методами, а молекулярно-генетические исследования (выявление соматических мутаций генов) не имеют собственного диагностического значения (за исключением мутации гена *SF3B1*) и используются как факторы прогноза и доказательства клональности гемопоэза [6; 86].

1.3. Иммунофенотипические признаки дисмиелопоэза

В марте 2008 года в Амстердаме состоялся первый международный семинар по стандартизации МПЦ в диагностике МДС. В этом совещании принимали участие 18 европейских университетов, работающих в рамках ELN, а также эксперты из США и Японии [55]. В последующих семинарах были пересмотрены и дополнены диагностические цитометрические критерии МДС [56; 76; 97].

Необходимо уделить внимание тому, что не существует универсального цитометрического критерия, обладающего достаточной диагностической

значимостью, который бы позволял определить наличие МДС. Необходимо оценивать множество параметров в основных компартментах КМ: зрелом миелоидном (гранулоциты, моноциты) и эритроидном ростках, в компартменте ранних миелоидных и В-клеточных предшественников. Эти цитометрические стратегии базируются на интерпретации экспрессии поверхностных маркеров кластеров дифференцировки. К ним относят повышенную или сниженную, асинхронную и нелинейную экспрессию антигенов. Немаловажное значение имеет подсчет доли клеток, составляющих определенные клеточные компартменты (особенно для миелоидных и В-клеточных предшественников) [14].

1.4. Скрининговая мини-панель для цитометрической диагностики миелодиспластических синдромов

В скрининговых целях согласно рекомендациям ELN может быть использована панель, состоящая из минимального количества моноклональных антител и позволяющая оценить четыре параметра. Эта шкала называется «Ogata score» и является первой разработанной системой дифференциальной диагностики МДС методом МПЦ [70].

К параметрам «Ogata score» относятся: 1) доля $CD34^+$ миелоидных клеток-предшественниц от всех $CD45^+$ клеток КМ (в норме до 2%); 2) доля $CD34^+$ В-клеточных предшественников от всех $CD34^+$ клеток (в норме не менее 5%); 3) отношение экспрессии CD45 на лимфоцитах к экспрессии CD45 на $CD34^+$ миелоидных предшественниках (индекс CD45); 4) индекс гранулярности (ИГ) гранулоцитов как отношение параметра бокового светорассеяния (SSC – side scatter) на гранулоцитах к SSC на лимфоцитах (в норме более 6) (Рисунок 4). При отклонениях от нормальных значений в двух и более параметрах предполагается наличие МДС.

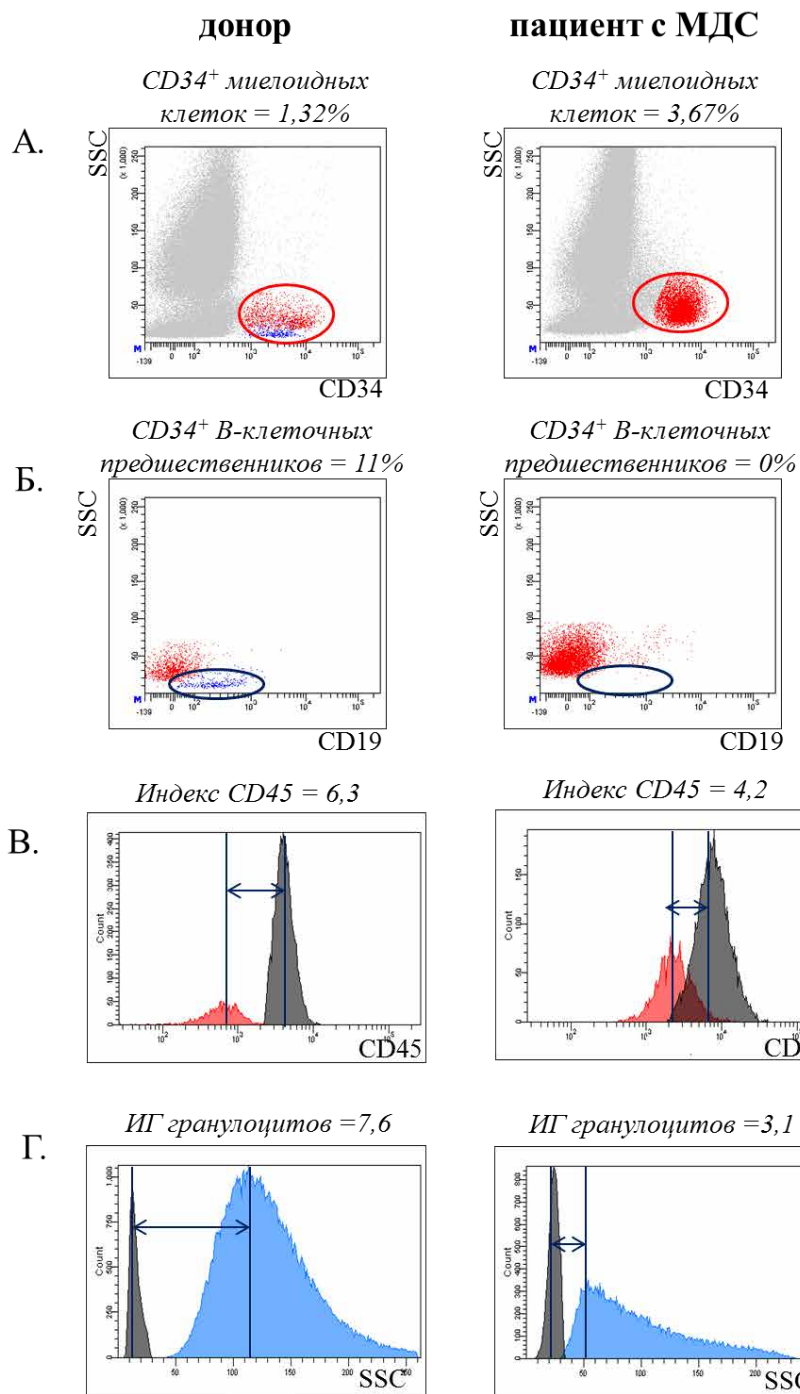


Рисунок 4 – Пример определения цитометрических параметров по шкале «Ogata score» в костном мозге здорового донора и примеры аномалий у пациентов с МДС: А. Доля $CD34^+$ миелоидных клеток-предшественниц (выделены красным цветом) от всех $CD45^+$ клеток; Б. Доля $CD34^+$ В-клеточных предшественников (выделены синим цветом) от всех $CD34^+$ клеток; В. Отношение экспрессии CD45 на лимфоцитах (показаны черным цветом) к $CD34^+$ миелобластам (индекс CD45); Г. Отношение параметра бокового светорассеяния (SSC) на гранулоцитах (показаны голубым цветом) к лимфоцитам (ИГ гранулоцитов)

Описанная шкала была использована в проспективном исследовании, включившем 134 образца КМ пациентов с МДС (без избытка бластных клеток) и 106 контрольных образцов КМ в двух центрах в Японии и Италии. Диагностическая чувствительность составила 30,8% и 67,3%, а специфичность 98% и 90% при изучении когорт пациентов из Японии и Италии, соответственно [72]. Для клинического применения чувствительность этой шкалы недостаточна, и есть несколько аспектов, которые обязательно нужно учитывать. Во-первых, в случаях разведения периферической кровью образца КМ может происходить недооценка количества миелоидных предшественников. Кроме того, у некоторых пациентов с МДС антиген CD34 не экспрессируется на миелобластах. Количество CD34⁺ В-клеточных предшественников варьирует от возраста и может снижаться при реактивных состояниях, например, при вирусных и бактериальных инфекциях [59].

Следует также учитывать, что референсные интервалы для экспрессии CD45 на миелобластах и показателя SSC могут немного отличаться в зависимости от используемых флюорохромов и настроек приборов [57].

Для того чтобы результаты МПЦ были применимы в клинических целях, необходимо использовать расширенную панель моноклональных антител, которая бы позволяла исследовать параметры, рекомендованные ELN, представленные в Таблице 7 [76; 97].

Таблица 7 – Параметры, рекомендованные для цитометрического исследования МДС

Компартмент КМ	Параметры
CD34 ⁺ миелоидные клетки-предшественницы	Доля от CD45 ⁺ клеток Экспрессия CD45, CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33, CD38 Асинхронная экспрессия CD11b, CD15 Нелинейная экспрессия CD5, CD7, CD19, CD56
CD34 ⁺ В-клеточные предшественники	Доля от всех CD34 ⁺ клеток (с использованием CD19 и/или CD10)
Гранулоциты	Доля от CD45 ⁺ клеток Соотношение SSC гранулоцитов к SSC лимфоцитов «Паттерны созревания» CD13 и CD11b; CD16 и CD11b; CD13 и CD16; CD15 и CD10
Моноциты	Доля от CD45 ⁺ клеток «Паттерны созревания» HLA-DR и CD11b; CD36 и CD14 Экспрессии CD13 и CD33 Экспрессия CD56
Эритрокариоциты	Доля от ядросодержащих клеток КМ «Паттерны созревания» CD71 и CD235a Экспрессия CD71 Экспрессия CD36 Доля CD117-позитивных предшественников

Далее будут рассмотрены иммунофенотипические аномалии, наиболее часто встречающиеся в различных клеточных компартментах КМ.

1.5. Цитомерический анализ незрелых миелоидных и В-клеточных предшественников

Подсчет количества незрелых миелоидных предшественников крайне важен, так как является основной частью всех прогностических шкал. Обычно отмечается взаимосвязь между количеством бластных клеток, подсчитанных цитологическим методом и МПЦ. Иногда можно выявить заниженное количество незрелых предшественников в ходе цитометрического анализа вследствие разведения КМ периферической кровью [21].

Для точного подсчета количества миелоидных клеток-предшественниц недостаточно использовать только маркер CD45, так как в регионе CD45^{dim}SSC^{low}

расположены также В-клеточные предшественники, монобласты, базофилы, эритробласты, плазмцитоидные дендритные предшественники, а также гипогранулярные нейтрофилы при МДС. Это требует введения в анализ дополнительных моноклональных антител к антигенам CD34, CD117, CD19, CD123 и HLA-DR [97]. Доля CD34⁺ миелоидных клеток имеет прогностическое значение: пациенты промежуточного риска IPSS-R с количеством CD34⁺ миелоидных клеток >1% имели более высокую вероятность трансформации в ОМЛ, чем пациенты с количеством CD34⁺ миелоидных клеток ≤1% (p=0,03) (Рисунок 5) [29].

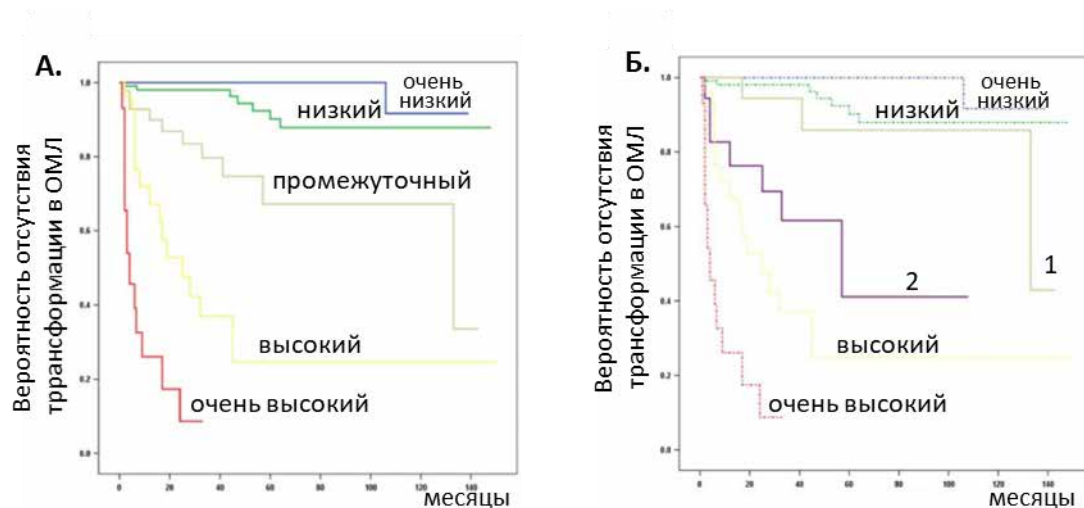


Рисунок 5. Вероятность отсутствия трансформации в ОМЛ у пациентов с МДС в зависимости от риска по шкале IPSS-R (А), а также у пациентов промежуточного риска IPSS-R (Б) при доле CD34⁺ миелоидных бластов ≤1% (1) и >1% (2) [29]

Важным является не только подсчет миелоидных предшественников, но и изучение их иммунофенотипа. Часто при МДС снижается или отсутствует экспрессия CD34, CD117, CD45, CD38 и/или HLA-DR, хотя экспрессия CD34 и CD117 на аномальных клетках может быть также повышена или отмечается гомогенность распределения этих антигенов. В некоторых исследованиях выявляется изменение в соотношениях экспрессии CD13 и CD33, асинхронная экспрессия CD11b и CD15 [63; 97].

Также обнаруживается нелинейная экспрессия лимфоидных маркеров на миелоидных предшественниках, но частота их встречаемости варьирует в широких пределах: CD5 определяется только в 1,6-7% случаев МДС, CD7 – в 3,5-30%, CD2 – 14%, CD56 – 35%. При оценке аномальной экспрессии лимфоидных антигенов следует учитывать, что CD2, CD7 и CD56 присутствуют и на нормальных CD34⁺ предшественниках, но таких клеток небольшое количество [28; 49; 50; 57; 71].

Было отмечено, что иммунофенотип миелоидных предшественников имеет бóльшую прогностическую значимость в отношении ответа на терапию, чем их количество. В исследовании К. Алхан с соавт. 2014 года отсутствие аберраций в миелоидных предшественниках (ко-экспрессии CD11b, CD5, CD19, CD56, CD25, CD7) было ассоциировано с гематологическим улучшением (увеличением количества эритроцитов, тромбоцитов и/или нейтрофилов) при лечении азацитидином ($p = 0,02$). Медиана выживаемости пациентов с аберрантными миелоидными предшественниками составила 14,2 мес, а пациентов без аномальной экспрессии антигенов – 26,8 мес ($p = 0,03$) [17].

В исследовании Т.М. Вестерс 2010 года, включавшем 45 пациентов с МДС низкого и промежуточного риска по шкале IPSS, было показано, что наличие ответа на терапию эритропоэтином зависит не только от инициального уровня эритропоэтина в крови, но и от аберраций в миелоидных предшественниках КМ [95].

Определение доли CD34⁺ В-клеточных предшественников также входит в шкалу «Ogata score». В исследованиях К. Огата 2006 и 2009 годов CD34⁺ В-клеточные предшественники определялись как CD34⁺ клетки с более низкими показателями экспрессии CD45 и бокового светорассеяния [70; 72]. Для более четкого выделения В-клеточных предшественников по рекомендациям ELN следует применять CD19 и/или CD10 [76; 97]. При МДС количество CD34⁺ В-клеточных предшественников снижается. Это, вероятно, связано с тем, что клональные трансформированные CD34⁺ клетки приобретают преимущества в выживании с нормальными CD34⁺ клетками, дифференцируются в направлении

миелоидной линии, теряя способность к дифференцировке в лимфоидную линию. Так, было показано значительное подавление экспрессии генов, связанных с В-клеточным созреванием, в CD34⁺ клетках, выделенных у пациентов с МДС [84].

В исследовании З. Чен с соавт. 2019 года показано, что сохранение CD34⁺ В-клеточных предшественников у пациентов с МДС является благоприятным фактором: у пациентов с $\geq 5\%$ CD34⁺ В-клеточных предшественников медиана ОВ не достигалась, у пациентов с $<5\%$ медиана достигалась через 93 месяца ($p = 0,008$) [31].

1.6. Цитомерический анализ гранулоцитов

Для идентификации гранулоцитов методом МПЦ наиболее часто применяют сочетание маркера CD45 и параметра SSC, однако рекомендуется проводить еще и анализ антигенов CD64 и CD33 для более четкого разграничения гипогранулярных гранулоцитов и моноцитов [58].

Цитологические признаки дисплазии гранулоцитарного ростка отмечают у около 60% пациентов с МДС. К наиболее значимым морфологическим отклонениям относят гипогрануляцию нейтрофилов, нарушение сегментации их ядер и повышение доли ранних форм гранулоцитов. Методом МПЦ также определяют гранулярность нейтрофилов: по соотношению параметра бокового светорассеяния SSC нейтрофилов к SSC лимфоцитов, получая индекс гранулярности. В случаях, когда по данным цитологического исследования доля гипогранулярных нейтрофилов менее 10%, данные МПЦ могут быть более информативны. Определение ИГ имеет высокую специфичность, и снижение ИГ наиболее часто наблюдается именно при МДС [58]. По некоторым данным сниженный индекс гранулярности гранулоцитов является неблагоприятным фактором при МДС [17].

К другим признакам дисплазии гранулоцитарного ростка относят изменение так называемых паттернов созревания. Паттерн созревания – это соотношение

экспрессии двух антигенов, которое меняется в зависимости от стадии созревания клетки. Впервые изменение паттерна «CD16 и CD11b» в КМ у пациентов МДС по сравнению с группой здоровых доноров было описано в исследовании Б. Дэвис и соавт. в 1997 году. У пациентов с МДС отмечалось повышение доли гранулоцитов с низкой экспрессией CD16 и/или CD11b [36].

Другим значимым паттерном является соотношение «CD13 и CD16». По мере созревания нейтрофилов происходит появление и нарастание экспрессии CD16, в то время как экспрессия CD13 сначала снижается, а затем от стадии метамиелоцитов до сегментоядерных нейтрофилов вновь повышается. У пациентов с МДС количество клеток, иммунофенотипически соответствующих миелоцитам и метамиелоцитам, повышено, а количество зрелых CD13⁺CD16⁺ нейтрофилов снижено (Рисунок 6). Ошибки при интерпретации данных о паттернах могут происходить, когда в гейт гранулоцитов попадают эозинофилы, которые не экспрессируют CD16. Известно, что нейтрофилы, претерпевающие апоптоз, теряют CD16. Доказано, что у пациентов с ПНГ экспрессия CD16 на зрелых нейтрофилах отсутствует. При ПНГ на мембране клеток нет гликозилфосфатидилинозитольного (ГФИ) якоря, а антиген CD16 закреплен через ГФИ якорь. Кроме того у некоторых людей присутствует генетический полиморфизм антигена CD16, что может быть ложно интерпретировано как аномальное отсутствие данного маркера [14].

Еще одним признаком МДС является повышенная экспрессия антигена CD56 на нейтрофилах. При МДС данная аномалия встречается в 20-30% случаев, при ХМПЗ – менее чем в 20% случаев, но при идиопатическом миелофиброзе – до 37% [40; 68]. Однако описано повышение экспрессии этого маркера на нейтрофилах при активации, а также на 10-25% незрелых гранулоцитов при регенерации КМ [54]. Низкая экспрессия CD56 отмечается у пациентов после химиотерапии и трансплантации аллогенных стволовых клеток, но доля гранулоцитов, экспрессирующих CD56, ниже 10% [40]. Таким образом, экспрессия молекулы адгезии CD56 на нейтрофилах может быть как признаком

аномальности в данном компартменте, так и следствием раннего интенсивного гранулоцитопоза после полихимиотерапии и других причин.

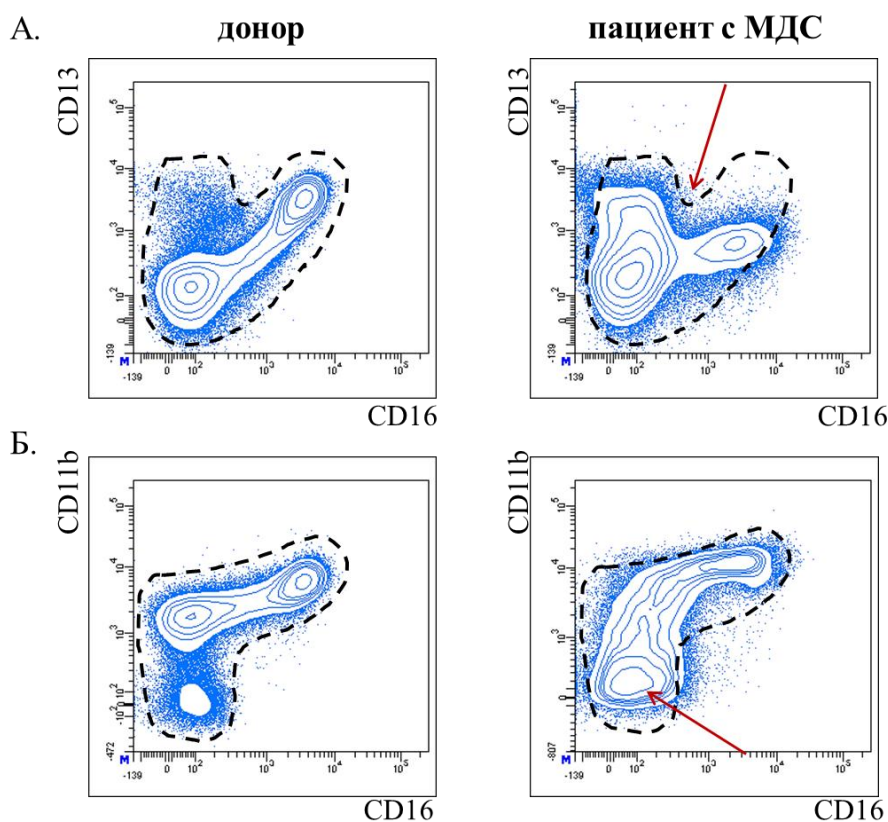


Рисунок 6 – Паттерны созревания нейтрофилов «CD13 и CD16» (А) и «CD11b и CD16» (Б) при анализе костного мозга здорового донора и пациента с МДС. Стрелками указано повышение доли незрелых гранулоцитов по сравнению с донором

Одним из цитометрических признаков дисгранулоцитопоза является снижение экспрессии антигена CD10 (в норме экспрессируется на самых зрелых нейтрофилах). Частота встречаемости этого признака широко варьирует в разных исследованиях: от 11% до 74% в зависимости от применяемого референсного значения [33; 60; 85]. Сниженная экспрессия CD10 ассоциирована с повышенной восприимчивостью к инфекциям, так как этот белок играет важную роль в хемотаксисе и координации провоспалительных реакций. Снижение экспрессии CD10 на нейтрофилах отмечено при аутоиммунной нейтропении [81], а также у

пациентов с ВИЧ-инфекцией, и расценивается как признак вторичной дисплазии [93].

Более редкими аномалиями при МДС являются изменения в экспрессии антигенов CD33 и CD64, появление HLA-DR, CD36 и CD14 на нейтрофилах. При МДС описывают в основном снижение экспрессии CD33 и CD64 на гранулоцитах, однако следует относиться к этим признакам с осторожностью, так как их экспрессия переменчива и связана с генетическим полиморфизмом. Экспрессия CD36 повышается на нейтрофилах при апоптозе, а HLA-DR начинает экспрессироваться после применения гранулоцитарного колониестимулирующего ростового фактора [14; 56]. Экспрессия CD14 гранулоцитами выявлена у пациентов с МДС с 5q- [52].

1.7. Цитомерический анализ моноцитов

Морфологическая оценка дисмоноцитопоза не проводится, обычно указывается только наличие выраженного моноцитоза или преобладание ранних форм моноцитов. Идентификация моноцитов при МПЦ нередко производится только на основе анализа экспрессии маркера CD45 и параметра SSC. Однако, как было упомянуто ранее, при МДС могут встречаться нейтрофилы со сниженной гранулярностью, в этом случае их популяция «пересекается» с популяцией моноцитов, что диктует необходимость в применении дополнительных маркеров, таких как CD33, CD45, CD14, CD36 [24; 56].

В ходе цитометрического анализа моноцитов необходимо оценить их долю от всех CD45⁺ клеток, паттерны «HLA-DR и CD11b», «CD36 и CD14», экспрессию антигенов CD13, CD33 и CD56. При МДС может встречаться как относительная моноцитопения (в 40% случаев), так и моноцитоз (в 12%). Параметр SSC моноцитов, так же, как и гранулоцитов, у пациентов с МДС может быть снижен. В большинстве случаев отмечается аномальное созревание моноцитов, выражающееся в аномальной экспрессии CD14, CD36, CD11b и HLA-DR

(Рисунок 7). В 92% случаев МПЦ позволяет обнаружить признаки дисмоноцитопоза [58]. При оценке экспрессии CD14 на моноцитах нужно помнить, что данный белок связан с мембраной через ГФИ-якорь, поэтому у пациентов с ПНГ экспрессия данного маркера снижена или может отсутствовать.

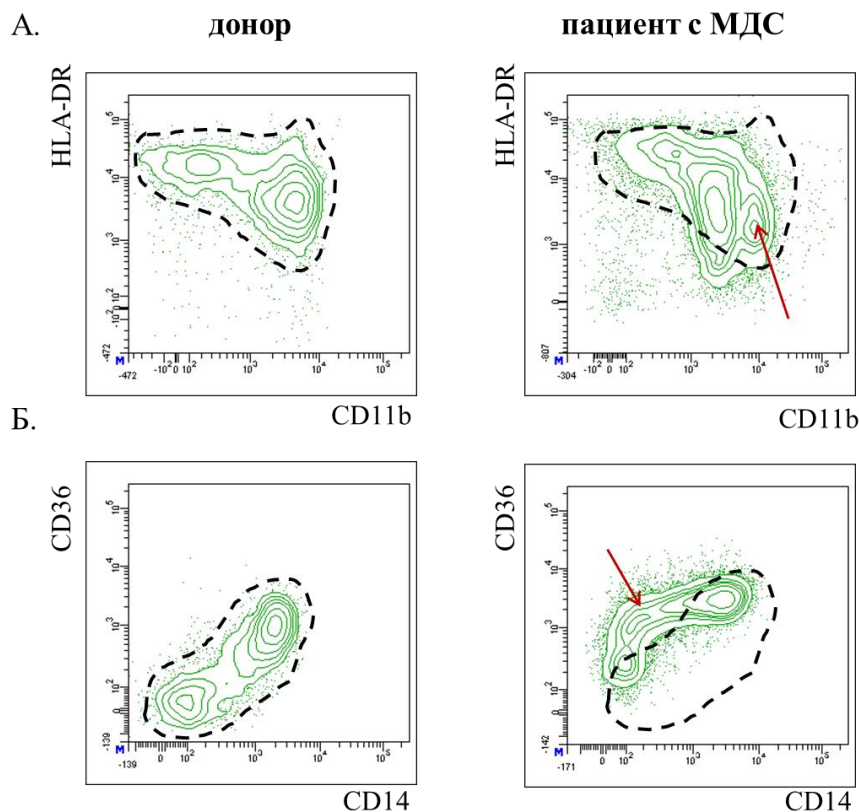


Рисунок 7 – Паттерны созревания моноцитов «HLA-DR и CD11b» (А) и «CD36 и CD14» (Б) при анализе костного мозга здорового донора и пациента с МДС. Стрелками указаны аномалии в формах паттернов «HLA-DR и CD11b» и «CD36 и CD14»

При МДС часто отмечают повышенную экспрессию CD56 на моноцитах, которая встречается также у пациентов с ХМПЗ и хроническим моноцитарным лейкозом. Однако экспрессия CD56 на моноцитах может быть обусловлена инфекционными процессами и регенерацией КМ после химиотерапии, трансплантации аллогенных стволовых клеток крови [56].

1.8. Цитомерический анализ эритрокариоцитов

Морфологические признаки дизэритропоэза являются наиболее яркими и часто встречающимися. Однако цитометрическая оценка дизэритропоэза представляется непростой задачей, так как сложно точно выделить популяцию эритроидных предшественников, и маркеры, по которым можно оценить их аномальность, немногочисленны. Вследствие этого с 2007 по 2012 годы оценка компартамента эритрокариоцитов носила лишь рекомендательный характер [56; 97], в 2014 году были обозначены обязательные критерии цитометрического анализа эритрокариоцитов [76], и только в 2017 году опубликованы первые практические результаты введения анализа эритрокариоцитов в интегрированную оценку МДС методом МПЦ [35].

Первым важным моментом становится определение популяции эритрокариоцитов методом МПЦ. Эритроидная популяция выделяется по слабой/негативной экспрессии CD45 и низким параметрам прямого и бокового светорассеяния. Однако в этот регион также попадают нелизированные эритроциты и клеточный дебрис. Используя антигены CD36, CD71, можно выделить эритрокариоциты более точно. В ходе нормального созревания эритрокариоцитов происходит постепенное снижение экспрессии CD45, повышение экспрессии CD235a. CD71 – один из наиболее ранних маркеров, который экспрессируется в течение всего периода эритроцитопоэза, он остается на ретикулоцитах после энуклеации и перестает экспрессироваться только после деградации РНК. Таким образом, основываясь на экспрессии CD71, можно исключить из анализа все зрелые эритроциты [75]. Возможно введение в панель моноклональных антител нуклеотропных красителей, например CyTRAK orange, DRAQ5, DRAQ7, которые позволяют отделить ядродержащие предшественники от зрелых эритроцитов даже без проведения лизиса [75]. С другой стороны, ряд исследований показывает, что проведение лизиса позволяет получить более точные количественные характеристики плотности экспрессии антигенов [38].

Согласно данным ELN цитометрическими признаками аномального эритрокариоцитопоза могут быть повышение доли CD117⁺ эритроидных предшественников, аномальная гетерогенная или сниженная экспрессии CD36 и CD71 и aberrantный паттерн CD71 и CD235a [76]. Анализ этой группы показателей способствует наилучшей дифференциальной диагностике МДС и неклональных цитопений [96].

На основе изучения экспрессии CD71 и CD36 на эритрокариоцитах в цельном, нелизированном образце КМ с помощью нуклеотропного красителя CyTRAK orange, с учетом уровня гемоглобина в крови, С. Матис с соавт. в 2013 году сформировали шкалу «красной оценки». В этой шкале учитываются коэффициенты вариации (КВ) флуоресценции меченых моноклональных антител против антигенов CD71 и CD36, которые отражают степень вариабельности в экспрессии этих антигенов: чем выше КВ, тем более гетерогенна экспрессия. Общий балл по «красной оценке» варьирует от 0 до 7 и комбинируется из 3 баллов при повышении КВ CD71 ≥ 80 , 2 баллов при КВ CD36 ≥ 65 и 2 баллов при снижении уровня гемоглобина на 15 г/л от референсного интервала в зависимости от пола. Если общий балл «красной оценки» составлял 3 и более, делалось заключение о наличии МДС. Чувствительность и специфичность шкалы составили 77,5% и 90%, соответственно [64].

Иммунофенотипические особенности эритроидных предшественников имеют прогностическую значимость в отношении применения эритропозз-стимулирующих агентов. В исследовании А. Рэймболт с соавт. 2019 года было показано, что доля CD117⁺ эритрокариоцитов была выше в группе пациентов с МДС, ответивших на терапию эритропозз-стимулирующими препаратами (медиана 4,7% против 2,2%, $p = 0,0005$) [77].

1.9. Цитометрические оценочные системы в диагностике миелодиспластических синдромов

Для диагностики МДС методом МПЦ необходимо исследовать многочисленныe характеристики всех основных клеточных компартментов КМ. На основе ретроспективного анализа были разработаны цитометрические оценочные шкалы, обладающие диагностической и прогностической значимостью. В 2003 году исследователями Д. Вэллс и соавт. из США была предложена шкала, где на основе числа цитометрических аберраций в компартменте гранулоцитов и моноцитов, а также количества миелобластов, подсчитывался конечный балл (Таблица 8). Балл 0–1 классифицировался как минимальный, 2–3 – как средний, более 4 – как высокий. В данное исследование было включено 115 пациентов МДС и 104 пациента контрольной группы (не МДС, и не ХМПЗ). Ни у кого из пациентов контрольной группы не было балла 3, у 55% пациентов с МДС было 3 балла и более [94].

Таблица 8 – Цитометрическая шкала «Wells» [94]

Балл	Описание
Основной балл	
0	Отсутствие цитометрических аберраций
1	Одна аберрация или в гранулоцитах, или в моноцитах
2	-Одна аберрация и в гранулоцитах, и в моноцитах либо... -Две-три аберрации или в гранулоцитах, или в моноцитах
3	Четыре и более аберраций или в гранулоцитах, или в моноцитах
4	Две или три аберрации и в гранулоцитах, и в моноцитах
Дополнительный балл	
+1	-Сниженное миелоидно-лимфоидное соотношение (<1) -Нормальное содержание миелобластов (<5%) с цитометрическими аберрациями
+2	Повышенное содержание аномальных миелобластов (5-10%)
+3	Повышенное содержание аномальных миелобластов (11-20%)
+4	Повышенное содержание аномальных миелобластов (>20%)

Оценка по шкале «Wells» коррелирует с вариантом МДС по ВОЗ. У пациентов с рефрактерной анемией (РА) и РА с кольцевыми сидеробластами (РАКС) средний балл составил 3, рефрактерной цитопенией с мультилинейной дисплазией (РЦМД) – 4, рефрактерной анемией с избытком бластов (РАИБ) – 6 [58]. Цитометрические баллы коррелируют с оценками по шкалам IPSS, WPSS и зависимостью от трансфузий. Медиана выживаемости у пациентов с

минимальным баллом по шкале «Wells» (0–1) не достигалась, со средним баллом (2–3) достигалась через 19 мес., с высоким баллом (4–9) – через 6 мес [32].

В 2013 году А. ван де Лострехт и Т. М. Вэстерс была предложена объединенная диагностическая шкала, учитывающая баллы по скрининговой шкале «Ogata score» и количество аберраций в компартментах гранулоцитов и моноцитов [57]. Эта шкала не включала аномалии в эритроидных клетках. Заключение по этой шкале устанавливается в виде буквенного эквивалента. Оценка «А» означает, что по результатам анализа дисмиелопоэза методом МПЦ признаков МДС не выявлено; «В» – цитометрическое исследование выявляет признаки, которые часто обнаруживаются в случае МДС и «С» – результаты цитометрического исследования соответствуют МДС (Таблица 9).

Таблица 9 – Объединенная шкала диагностики МДС методом МПЦ без учета аномалий в компартменте эритрокариоцитов [57]

Шкала «Ogata»	<2				≥2			
	Цитометрические аберрации в миелоидных предшественниках	-	-	+	+	-	-	+
Цитометрические аберрации: -в гранулоцитах (сниженный индекс гранулярности или две и более других аберраций) -в моноцитах (экспрессия CD56 или две и более других аберраций)	-	+	-	+	-	+	-	+
Оценка по шкале «Ogata-Wells»	A	A/B	A/B	C	A/B	B/C	B/C	C

Эта шкала применялась в исследовании, результаты которого были опубликованы в 2016 году, включившем 101 пациента МДС и 51 пациента контрольной группы с диагнозом не МДС или ХМПЗ. Из когорты пациентов МДС оценка «А» получена у 15%, «В» - у 24% и «С» - у 61%. Оценка «А», которая соответствовала отсутствию цитометрических аномалий, была в основном у пациентов с МДС с изолированными дизэритропоэзом и/или дисмегакариоцитопоэзом. При этом во всей изучаемой когорте МДС цитогенетические аберрации, типичные для МДС, были выявлены только у 23% пациентов, другие цитогенетические аномалии – у 21% и нормальный кариотип – у 56%. Таким образом, цитометрические аномалии при МДС встречались чаще,

чем цитогенетические. В контрольной группе оценка «А» получена у 65% пациентов, «В» – у 29% и «С» – только у 6% [35].

В 2017 году была разработана и апробирована интегрированная диагностическая шкала, которая включала аномалии в компартменте эритрокариоцитов (Таблица 10) [34].

Таблица 10 – Интегрированная шкала диагностики МДС методом МПЦ с учетом аномалий в компартменте эритрокариоцитов [35]

Шкала «Ogata»	< 2								≥ 2							
	Цитометрические аберрации в миелоидных предшественниках	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Цитометрические аберрации: -в гранулоцитах (≥2 аберраций) -в моноцитах (экспрессия CD56 или ≥2 аберраций)	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Цитометрические аберрации (≥2) в эритрокариоцитах	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Оценка	A	B	B	C	B	C	C	C	A/B	C	C	C	C	C	C	C

Введение в шкалу анализа аномалий эритроидного ряда позволило повысить чувствительность метода с 69% до 80%, а специфичность незначительно снизилась с 98% до 95% [34].

Таким образом, диагностика МДС требует комплексного обследования пациентов с учетом цитологического, цитохимического, цитогенетического и гистологического исследований, а также динамического наблюдения. Метод МПЦ рекомендуется как дополнительный в случаях, когда диагностика МДС вызывает затруднения. Не существует универсального цитометрического критерия, который бы позволил установить наличие МДС, и многими авторами предлагается исследование разнообразных параметров в основных клеточных компартментах костного мозга, которые инкорпорированы в диагностические

цитометрические шкалы. Помимо диагностической значимости, некоторые исследования демонстрируют прогностическую значимость некоторых параметров: доли CD34⁺ миелоидных и В-клеточных предшественников влияют на общую выживаемость пациентов с МДС и вероятность трансформации в ОМЛ, а наличие иммунофенотипических аномалий в миелоидных предшественниках и доля CD117⁺ эритроидных предшественников ассоциированы с прогнозом ответа на терапию гипометилирующими и эритропоэз-стимулирующими препаратами. С учетом представленного обзора литературных данных актуальность изучения цитометрических признаков дисмиелопоэза не вызывает сомнений.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Пациенты

С января 2016 по июль 2017 года в исследование включено 102 пациента с впервые установленным диагнозом МДС и 83 пациента группы сравнения с гематологическими и не гематологическими заболеваниями, отличными от МДС и ХМПЗ. Все пациенты ранее не получали специфической терапии по поводу основного гематологического заболевания. Исследование включало контрольную группу 35 здоровых доноров аллогенного КМ. Пациенты, включенные в исследование, проходили обследование в следующих подразделениях Федерального государственного бюджетного учреждения (ФГБУ) «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения:

- 1) Консультативное гематологическое отделение с дневным стационаром по проведению интенсивной высокодозной химиотерапии (заведующая отделением – к.м.н. Т.Н. Моисеева);
- 2) Отделение интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с круглосуточным и дневным стационаром (заведующая отделением – к.м.н. В.В. Троицкая);
- 3) Отделение орфанных заболеваний (заведующая отделением – д.м.н. Е.А. Лукина);
- 4) Отделение интенсивной высокодозной химиотерапии гематологических заболеваний с круглосуточным и дневным стационарами (заведующая отделением – к.м.н. Е.О. Грибанова);
- 5) Отделение хирургии (заведующий отделением – д.м.н. К.И. Данишян);
- 6) Отделение интенсивной высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга с круглосуточным и дневным стационарами (заведующая отделением – к.м.н. Л.А. Кузьмина).

Работа выполнена на базе научно-клинической лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга (заведующая лабораторией – к.м.н. И.В. Гальцева).

Лабораторные исследования, необходимые для верификации диагноза, были выполнены на базе следующих лабораторий:

- 1) Централизованная клиничко-диагностическая лаборатория (заведующая лабораторией – к.м.н. В.Н. Двирнык);
- 2) Лаборатория кариологии (заведующая лабораторией – к.м.н. Т.Н. Обухова);
- 3) Патологоанатомическое отделение (заведующая лабораторией – д.б.н. А.М. Ковригина).

Клиническая часть работы выполнена совместно с ведущим научным сотрудником отделения интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с круглосуточным и дневным стационарами, к.м.н. А.В. Кохно. Лабораторная часть работы выполнена совместно с заведующей централизованной клиничко-диагностической лабораторией, к.м.н. В.Н. Двирнык.

Диагноз устанавливали на основании клинического течения заболевания, данных цитологического, цитохимического, цитогенетического исследований аспирата КМ и гистологического исследования трепанобиоптата, а также других необходимых лабораторных и инструментальных видов исследования. В сложных диагностических случаях диагноз устанавливался при длительном динамическом наблюдении и требовал выполнения повторных лабораторных исследований. Проба аспирата КМ для исследования признаков дисмиелопоэза методом МПЦ забиралась один раз в период первичной диагностики пациентов. Полученные данные МПЦ не учитывались при установлении диагноза.

Среди пациентов с установленным диагнозом МДС были: 7 (6,9%) пациентов с МДС с делецией del(5q) (МДС с 5q-), 4 (3,9%) пациента с МДС-ЛД (из них 3 – с рефрактерной анемией, 1 – с рефрактерной нейтропенией), 30 (29,4%) – с МДС-МД, 13 (12,7%) – с МДС-КС (из них 6 – МДС с МД и КС, 7 – МДС с ЛД и КС), 26 (25,5%) – с МДС-ИБ-1, 22 (21,6%) – МДС-ИБ-2.

Соотношение мужчин и женщин, возраст пациентов с разными вариантами МДС приведены в Таблице 11.

Таблица 11 – Характеристика пациентов с МДС

Вариант МДС	n	Минимальный возраст, годы	Максимальный возраст, годы	Медиана возраста, годы	Соотношение мужчин к женщинам
МДС с 5q-	7	62	79	65	1/6 (1:6)
МДС-ЛД	4	32	81	63,5	2/2 (1:1)
МДС-КС	13	22	88	69	5/8 (1:1,6)
МДС-МД	30	24	82	56,5	11/19 (1:1,7)
МДС-ИБ-1	26	20	83	63	15/11 (1,4:1)
МДС-ИБ-2	22	20	87	57,5	18/4 (4,5:1)

Из 102 пациентов с МДС результаты СЦИ и/или FISH получены у 99. У 2 пациентов с МДС-ИБ-1 и 1 с МДС-ИБ-2 кариотип не удалось исследовать вследствие отсутствия митозов, а FISH-исследование проведено не было. У 8 (7,8%) из 102 пациентов группы МДС (1 пациент с МДС с 5q-, 2 – МДС-МД, 3 – МДС-ИБ-1 и 2 – МДС-ИБ-1) и 8 (9,6%) из 83 пациентов группы сравнения трепанобиопсия не выполнялась, либо гистологическое исследование было проведено в других лечебных учреждениях.

В группу сравнения вошло 83 пациента (соотношение мужчин к женщинам составило 30/53 (1:1,8); минимальный возраст – 19, максимальный – 82, медиана – 42 года). В группу сравнения вошли пациенты с цитопенией (анемией, нейтропенией и/или тромбоцитопенией), причиной которой был не МДС. Характеристика пациентов группы сравнения представлена в Таблице 12.

Таблица 12 – Характеристика пациентов группы сравнения

Диагноз	n	Минимальный возраст, годы	Максимальный возраст, годы	Медиана возраста, годы	Соотношение мужчин к женщинам
аутоиммунная гемолитическая анемия (АИГА)	8	31	74	52	0:8
В12-дефицитная анемия (В12-ДА)	8	23	61	43	1:1
железодефицитная анемия (ЖДА)	6	41	51	43,5	1:2
апластическая анемия (АА)	11	19	69	34	5/6 (1:1,2)
анемия Фанкони	1	36	36	36	0:1
наследственная дизэритропоэтическая анемия (НДА)	2	29	29	29	0:2
наследственная микросфероцитарная гемолитическая анемия (НМГА)	1	25	25	25	0:1
наследственная гемолитическая анемия неуточненная (НГА)	1	20	20	20	0:1
пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ)	10	26	58	35	7/3 (2,3:1)
β -талассемия	1	42	42	42	1:0
врожденный дискератоз	1	24	24	24	1:0
иммунная тромбоцитопения (ИТП)	16	24	82	43	1:3
вторичная тромбоцитопения	2	26	59	42,5	1:1
лимфома маргинальной зоны (ЛМЗ) без поражения КМ	4	37	68	53	0:4
лимфома Беркитта	1	47	47	47	0:1
лимфома из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ) без поражения КМ	1	69	69	69	1:0
макроглобулинемия Вальденстрема (МВ)	2	64	70	67	2:0
диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) без поражения КМ	2	23	48	35,5	1:1
лимфома из больших гранулярных лимфоцитов (БГЛ)	1	54	54	54	0:1
Гепатит С	1	50	50	50	0:1
ВИЧ	1	39	39	39	1:0
аутоиммунный тиреозит	1	55	55	55	0:1
цитопения на фоне гнойно-воспалительного процесса	1	57	57	57	0:1

В контрольную группу включено 35 доноров аллогенного костного мозга. Соотношение мужчин к женщинам составило 24/11 (2,2:1), медиана возраста – 33 года, минимальный возраст – 20 лет, максимальный – 62 года.

2.2. Подготовка проб для анализа методом проточной цитофлуориметрии

Материалом для исследования служил аспират КМ с антикоагулянтом Na ЭДТА-К3 (этилендиаминтетраацетат калия 3-х замещенный). Образец КМ объемом 1 мл переносили в полипропиленовую центрифужную пробирку на 15 мл и добавляли 9 мл предварительно разведенного дистиллированной водой (1:10) лизирующего раствора Pharm Lyse (BD Biosciences, США), оставляли на 10 минут при комнатной температуре. Далее образец центрифугировали при 400 g 3,5 мин на центрифуге Z32 6K (HERMLE Labortechnik GmbH, Германия). После центрифугирования надосадочную жидкость сливали, а к клеточному осадку добавляли 2 мл раствора CellWash (BD Biosciences, США), перемешивали с помощью вортекса V-1 plus (Biosan, Латвия) и вновь центрифугировали при 400 g 3,5 мин. Далее надосадочную жидкость удаляли, добавляли 1 мл раствора CellWash, перемешивали на вортексе и подсчитывали содержание ядросодержащих клеток в образце на гематологическом анализаторе Abacus Junior 30 (Diatron, Венгрия). Для окраски моноклональными антителами отбирали 3×10^5 клеток в 100 мкл раствора CellWash в 4 круглодонные полипропиленовые пробирки объемом 5 мл (Falcon, Мексика). Добавляли моноклональные антитела, меченые флюорохромами, согласно Таблице 13, инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут. Панель моноклональных антител была подобрана с учетом конфигураций используемого проточного цитофлуориметра и рекомендаций ELN по исследованию МДС методом МПЦ [95]. Характеристика моноклональных антител, применявшихся в исследовании, показана в Таблице 14.

Таблица 13 – Панель моноклональных антител, применявшаяся для оценки дисмиелопоэза методом проточной цитофлуориметрии

№ пробирки / флюорохром	FITC	PE	APC	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC-Cy7
1	CD56	CD7	CD34	CD19	CD117	CD45
2	CD45	CD13	CD33	CD16	HLA-DR	CD11b
3	CD45	CD14	CD33	CD36	CD56	
4	CD45	CD10	CD64			

Примечание: FITC - флуоресцеина изотиоцианат (fluorescein isothiocyanate), PE – фикоэритрин (phycoerythrin), APC – алофикоцианин (allophycocyanine), PerCP-Cy5.5 – перидинин-хлорофилл протеин – цианин 5.5 (Peridinin Chlorophyll Protein Complex - cyanine 5.5), PE-Cy7 – фикоэритрин-цианин 7, APC-Cy7 – алофикоцианин-цианин 7.

Таблица 14 – Характеристика моноклональных антител, применявшихся для оценки дисмиелопоэза методом проточной цитофлуориметрии

№	Антигенная специфичность	Флуорохром	Клон	Класс	Вид	Популяции клеток, на которых экспрессируется антиген
1	CD56	FITC	NCAM16.2	IgG2b, κ	мышь	НК-клетки, Т-клетки
2	CD45	FITC	J33	IgG1	мышь	все лейкоциты
3	CD7	PE	8H8.1	IgG2a	мышь	НК-клетки, Т-клетки, ГСК
4	CD13	PE	SJ1D1	IgG1	мышь	гранулоциты, моноциты, ГСК
5	CD14	PE	RMO52	IgG2a	мышь	гранулоциты, моноциты
6	CD10	PE	HI10a	IgG1, κ	мышь	ГСК, нейтрофилы
7	CD34	APC	8G12	IgG1, κ	мышь	ГСК, эндотелий
8	CD33	APC	P67.6	IgG1, κ	мышь	гранулоциты, моноциты, ГСК
9	CD64	APC	10.1	IgG1, κ	мышь	моноциты, макрофаги
10	CD19	PerCP-Cy5.5	SJ25C1	IgG1, κ	мышь	В-клетки
11	CD16	PerCP-Cy5.5	3G8	IgG1, κ	мышь	нейтрофилы, моноциты, НК-клетки
12	CD36	PerCP-Cy5.5	CB38	IgM, κ	мышь	моноциты, тромбоциты
13	CD117	PE-Cy7	104D2	IgG1	мышь	ГСК, тучные клетки
14	CD56	PE-Cy7	NCAM16.2	IgG2b, κ	мышь	НК-клетки, Т-клетки
15	HLA-DR	PE-Cy7	L243	IgG2a, κ	мышь	ГСК, моноциты, Т-клетки, В-клетки
16	CD11b	APC-Cy7	ICRF44	IgG1, κ	мышь	нейтрофилы, моноциты, Т-клетки, В-клетки
17	CD45	APC-Cy7	2D1	IgG1, κ	мышь	все лейкоциты

Примечание: НК-клетки – клетки натуральные киллеры, ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

Чтобы избавиться от несвязавшихся антител, в пробирки вносили по 2 мл раствора CellWash, перемешивали на вортексе, центрифугировали при 400 g 3,5 мин, надосадочную жидкость сливали. После чего добавляли по 100 мкл раствора CellWash, и клеточную взвесь анализировали на 6-цветном проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (BD Biosciences, США). Настройку компенсаций флуоресценции проводили с помощью BD CompBeads (BD Biosciences, США). Регулировка напряжения на фотоумножителях для поддержания значений выходного сигнала проводилась рутинно с применением Cytometer Setup & Tracking Beads kit (BD Biosciences, США).

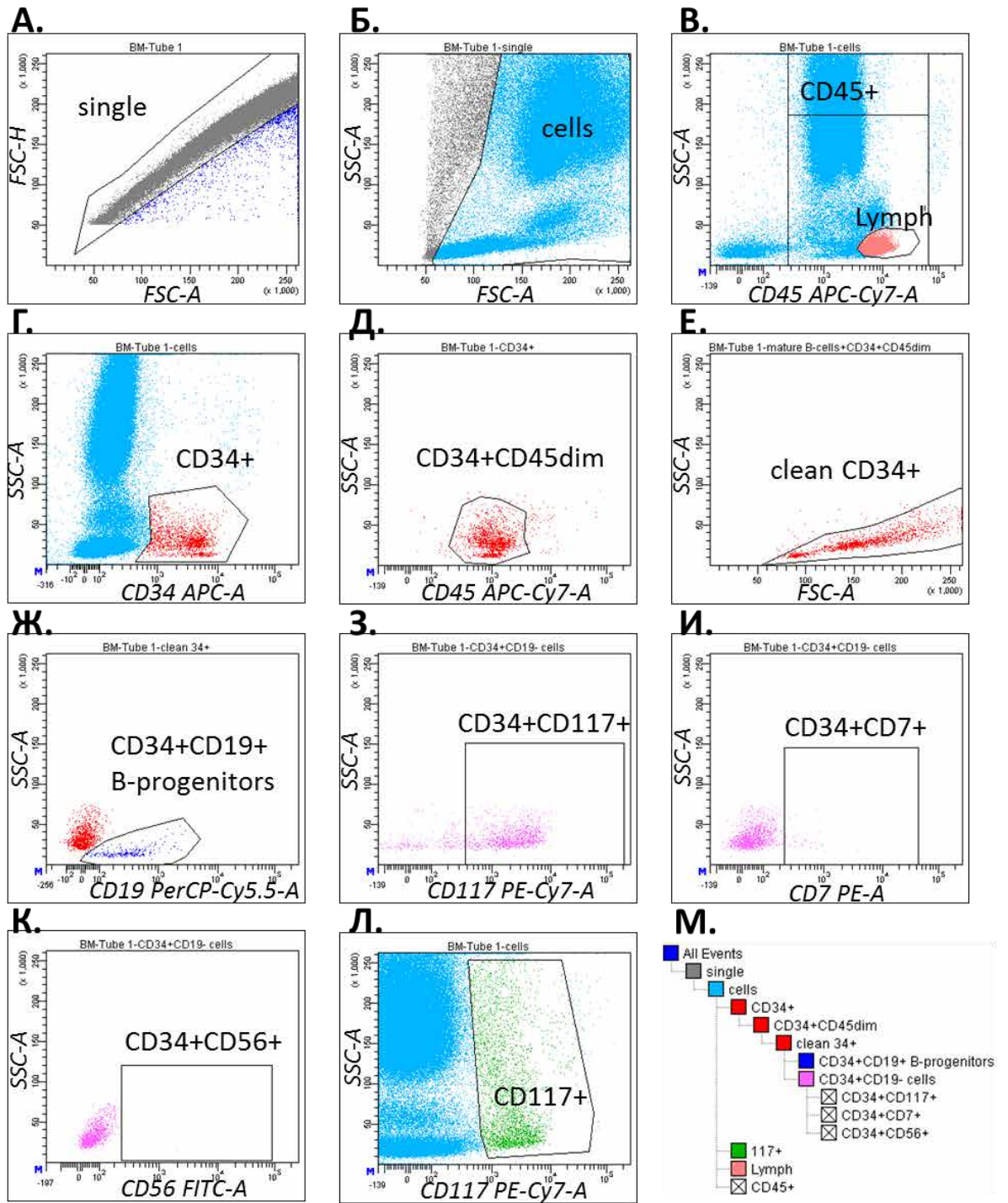
2.3. Стратегия гейтирования и анализируемые параметры

Гейтирование и получение основных цитометрических параметров (количество событий, средняя интенсивность флуоресценции, стандартное отклонение флуоресценции) проводили в программном обеспечении BD FACSDiva Software Version 6.1.3. Стратегия гейтирования представлена ниже на примере анализа КМ здорового донора.

В первой пробирке окрашивались клетки КМ с моноклональными антителами против антигенов CD45, CD34, CD117, CD7, CD56, CD19, что позволяло дать оценку компартмента ранних миелоидных клеток и В-клеточных предшественников. Стратегия гейтирования представлена на Рисунке 8.

Первым этапом исключали из анализа агрегированные клетки на диаграмме «FSC-A и FSC-H» с помощью гейта «single» (Рисунок 8А), затем исключали дебрис на диаграмме «FSC-A и SSC-A» с помощью гейта «cells» (Рисунок 8Б) и лейкоциты определяли как CD45⁺ события и ограничивали на диаграмме «CD45 APC-Cy7-A и SSC-A» с помощью гейта «CD45⁺» (Рисунок 8В). На диаграмме «CD45 APC-Cy7-A и SSC-A» определяли лимфоциты как популяцию клеток с высокой экспрессией CD45 и низким показателем SSC гейтом «Lymph» (Рисунок 8В). Далее определяли CD34⁺ клетки из событий гейта «cells». На диаграмме

«CD34 APC-A и SSC-A» ограничивали клетки гейтом «CD34+» (Рисунок 2.1Г), которые последовательно уточняли гейтами «CD34+CD45dim» на диаграмме «CD45 APC-Cy7-A и SSC-A» (Рисунок 8Д) и «clean CD34+» на диаграмме «SSC-A и FSC-A» (Рисунок 8Е). От всех CD34⁺ клеток гейта «clean CD34+» ограничивали CD34⁺ В-клеточные предшественники на диаграмме «CD19 PerCP-Cy5.5-A и SSC-A» гейтом «CD34+CD19⁺ B-progenitors» (Рисунок 8Ж). CD34⁺ клетки, не попавшие в этот гейт, обозначались как «CD34+CD19⁻ cells», от которых отделяли CD34⁺CD117⁺ клетки гейтом «CD34+CD117+» на диаграмме «CD117 PE-Cy7-A и SSC-A» (Рисунок 8З), CD34⁺CD7⁺ клетки гейтом «CD34+CD7+» на диаграмме «CD7 PE-A и SSC-A» (Рисунок 8И) и CD34⁺CD56⁺ клетки гейтом «CD34+CD56+» на диаграмме «CD56 FITC-A и SSC-A» (Рисунок 8К). От клеток гейта «cells» ограничивали CD117⁺ клетки на диаграмме «CD117 PE-Cy7-A и SSC-A» с помощью гейта «CD117+» (Рисунок 8Л).



Н.

Популяция	события	CD117 СИФ	CD117 СОФ	CD34 СИФ	CD34 СОФ	CD45 СИФ
cells	106,732	91	1,300	293	1,415	2,683
clean 34+	1,372	1,956	2,037	3,333	2,038	1,138
CD34+CD19+ B-progenitors	253	60	278	3,935	2,163	1,071
CD34+CD19- cells	1,119	2,385	2,019	3,197	1,985	1,153
CD34+CD117+	940	2,820	1,913	3,468	1,958	1,062
CD34+CD7+	36	1,257	1,073	2,385	2,237	1,533
CD34+CD56+	2	425	332	777	31	3,002
117+	2,634	2,667	3,326	2,193	4,571	4,598
Lymph	11,436	-36	178	161	149	8,045
CD45+	102,652	59	645	269	958	2,648

Рисунок 8 – Стратегия гейтирования и анализируемые параметры в первой пробирке в панели моноклональных антител, используемой для оценки

дисмиелопоэза в компартменте ранних миелоидных и В-клеточных предшественников методом МПЦ: А-Л – диаграммы светорассеяния, М – иерархическое дерево гейтирования, Н – параметры, учитываемые в анализе (СИФ – средняя интенсивность флуоресценции, СОФ – стандартное отклонение флуоресценции)

На Рисунке 8Н отображены параметры, которые использовали для расчета следующих показателей:

- 1) Доля $CD34^+$ миелоидных клеток от $CD45^+$ клеток: число событий из популяции « $CD34+CD19^-$ cells» делили на число событий популяции « $CD45^+$ » и умножали на 100%, то есть $1119 : 102652 \times 100\% = 1,09\%$;
- 2) Доля $CD34^+$ В-клеточных предшественников от всех $CD34^+$ клеток: число событий популяции « $CD34+CD19^+$ В-progenitors» делили на число событий популяции «clean $CD34^+$ », то есть $253 : 1372 \times 100\% = 18,44\%$;
- 3) Доля $CD34^+CD117^+$ клеток от $CD34^+$ миелоидных клеток: число событий « $CD34+CD117^+$ » делили на число событий « $CD34+CD19^-$ cells», то есть $940 : 1119 \times 100\% = 84,00\%$;
- 4) Доля $CD34^+CD7^+$ клеток от $CD34^+$ миелоидных клеток: число событий « $CD34+CD7^+$ » делили на число событий « $CD34+CD19^-$ cells», то есть $36 : 1119 \times 100\% = 3,22\%$;
- 5) Доля $CD34^+CD56^+$ клеток от $CD34^+$ миелоидных клеток: число событий « $CD34+CD56^+$ » делили на число событий « $CD34+CD19^-$ cells», то есть $2 : 1119 \times 100\% = 0,18\%$;
- 6) Доля $CD117^+$ клеток от $CD45^+$ клеток: число событий из гейта « $CD117^+$ » делили на число событий « $CD45^+$ », то есть $2634 : 102652 \times 100\% = 2,57\%$;
- 7) Средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) антитела анти- $CD34$ на миелоидных $CD34^+$ клетках гейта « $CD34+CD19^-$ cells» как СИФ $CD34$: 3197;

- 8) Стандартное отклонение флуоресценции (СОФ) антитела анти-CD34 на миелоидных CD34⁺ клетках гейта «CD34+CD19- cells» как СОФ CD34: 1985;
- 9) СИФ анти-CD117 на миелоидных CD34⁺ клетках гейта: 2385;
- 10) СОФ анти-CD117 на миелоидных CD34⁺ клетках гейта «CD34+CD19-cells»: 2019;
- 11) Индекс CD45 миелоидных CD34⁺ клеток как отношение СИФ CD45 лимфоцитов «Lymph» к СИФ CD45 CD34⁺ миелоидных клеток «CD34+CD19- cells», то есть $8045 : 1153 = 6,98$.

Во второй пробирке окрашивали клетки КМ с моноклональными антителами против антигенов CD45, CD33, CD11b, CD16, CD13, HLA-DR, анализ экспрессии которых использовали для характеристики компартов гранулоцитов и моноцитов. Стратегия гейтирования представлена на Рисунке 9.

Так же, как и в первой пробирке сначала исключали все слипшиеся клетки (Рисунок 9А) и дебрис (Рисунок 9Б) с помощью гейтов «single» и «cells». На диаграмме «CD45 FITC-A и SSC-A» выбирали лейкоциты по наличию экспрессии антигена CD45 в гейте «CD45+», а также лимфоциты с помощью гейта «Lymphocytes» (Рисунок 9В). На диаграмме «CD33 APC-A и SSC-A» ограничивали две популяции клеток: гранулоциты «Granulocytes» по высокому показателю SSC и средним значениям флуоресценции анти-CD33 и моноциты «Monocytes» по более низкому показателю SSC и высоким значениям флуоресценции анти-CD33 (Рисунок 9Г). На рисунках 9Д и 9Е показаны паттерны моноцитов «CD11b и CD13» и «CD11b и HLA-DR», соответственно, а на рисунках 9Ж, 9З и 9И – паттерны гранулоцитов «CD11b и CD13», «CD16 и CD13» и «CD16 и CD11b», соответственно. На Рисунке 9Л отображены значения, использованные для подсчета параметров:

- 1) Доля гранулоцитов по отношению ко всем лейкоцитам. Определялась как доля числа событий «Granulocytes» к числу событий «CD45+»: $50962 : 65959 \times 100\% = 77,26\%$;

- 2) Доля моноцитов по отношению ко всем лейкоцитам как доля числа событий «Monocytes» к числу событий «CD45+»: $3619 : 65959 \times 100\% = 5,49\%$;
- 3) Лимфоидно-миелоидное отношение как отношение числа событий «Lymphocytes» к сумме событий «Granulocytes» и «Monocytes»: $7707 : (50962 + 3619) = 0,14$;
- 4) Индекс гранулярности гранулоцитов как отношение СИФ SSC-A «Granulocytes» к СИФ SSC-A «Lymphocytes»: $181705 : 21068 = 8,62$;
- 5) Индекс гранулярности моноцитов как отношение СИФ SSC-A «Monocytes» к СИФ SSC-A «Lymphocytes»: $61564 : 21068 = 2,92$;
- 6) СИФ анти-CD33 на гранулоцитах «Granulocytes»: 1082;
- 7) СИФ анти-CD33 на моноцитах «Monocytes»: 3468;
- 8) Индекс CD33 как отношение СИФ анти-CD33 на моноцитах к СИФ анти-CD33 на гранулоцитах: $3468 : 1082 = 3,21$;
- 9) Индекс CD45 гранулоцитов как отношение СИФ CD45 лимфоцитов к СИФ CD45 гранулоцитов: $11320 : 3172 = 3,57$;
- 10) Индекс CD45 моноцитов как отношение СИФ CD45 лимфоцитов к СИФ CD45 моноцитов: $11320 : 8003 = 1,41$.

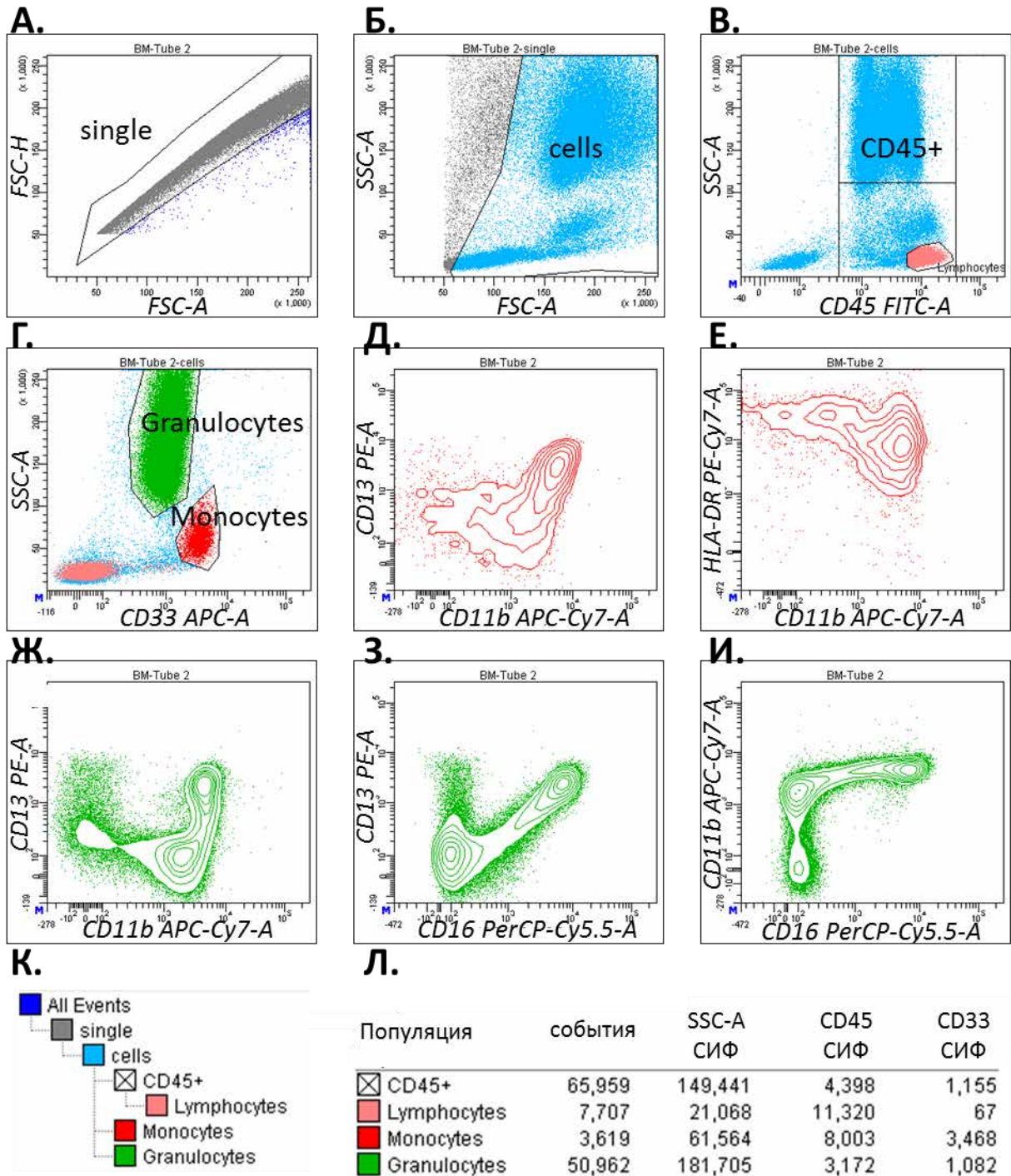


Рисунок 9 – Стратегия гейтирования и анализируемые параметры во второй пробирке в панели моноклональных антител, используемой для оценки дисмиелопоэза в компартменте гранулоцитов и моноцитов методом проточной цитофлуориметрии: А-И – диаграммы светорассеяния, К – иерархическое дерево гейтирования, Л – параметры, учитываемые в анализе

Вследствие того, что используемый проточный цитометр BD FACSCanto II способен детектировать одновременно сигналы только от шести флуорохромных красителей, для анализа компартментов гранулоцитов и моноцитов использовали еще третью и четвертую пробирки. В третьей пробирке содержалась смесь антител против CD45, CD33, CD14, CD36, CD56; стратегия гейтирования продемонстрирована на рисунке 10. Так же, как и при анализе второй пробирки, из анализа были исключены агрегированные клетки (Рисунок 10А), дебрис (Рисунок 10Б), определены CD45⁺ клетки, лимфоциты (Рисунок 10В), гранулоциты «Granulocytes» и моноциты «Monocytes» (Рисунок 10Г). Из всех клеток гейта «Granulocytes» определены клетки, позитивные по маркерам CD56 (Рисунок 10Д) и CD14 (Рисунок 10Е). Из гейта «Monocytes» определялись CD56⁺ моноциты (Рисунок 10Д), а также оценивался паттерн «CD14 и CD36» (Рисунок 10Ж). Используя эту стратегию гейтирования, нами подсчитывались следующие параметры (Рисунок 10И):

- 1) Доля CD56⁺ гранулоцитов по отношению ко всем гранулоцитам как доля числа событий «CD56+ Gran» к числу событий «Granulocytes»: $466 : 64743 \times 100\% = 0,72\%$;
- 2) Доля CD56⁺ моноцитов по отношению ко всем моноцитам как доля числа событий «CD56+ Mono» к числу событий «Monocytes»: $1545 : 3324 \times 100\% = 46,48\%$;
- 3) Доля CD14⁺ гранулоцитов по отношению ко всем гранулоцитам как доля числа событий «CD14+ Gran» к числу событий «Granulocytes»: $145 : 64743 \times 100\% = 0,22\%$.

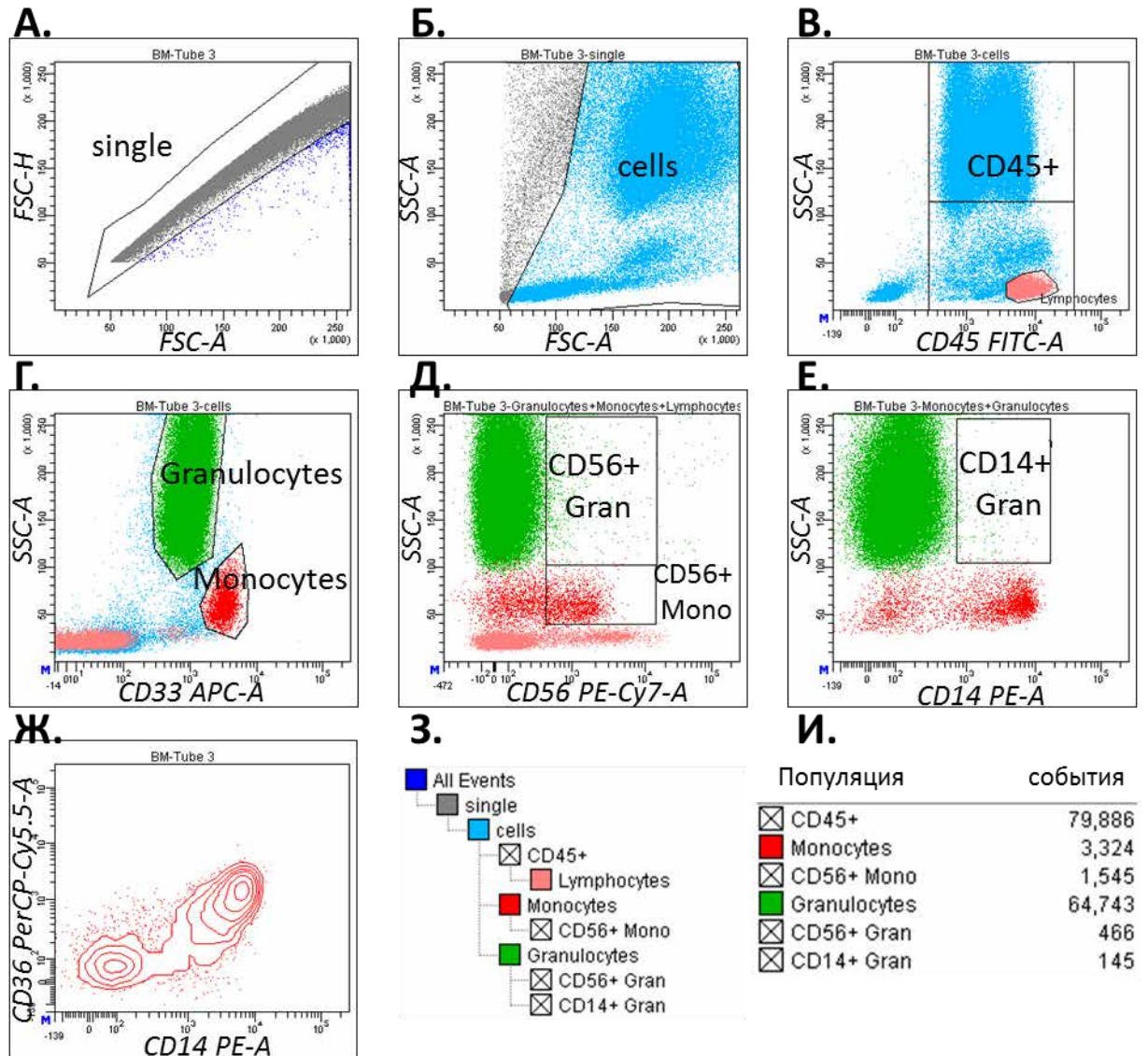


Рисунок 10 – Стратегия гейтирования и анализируемые параметры в третьей пробирке в панели моноклональных антител, используемой для оценки дисмиелопоэза в компартаментах гранулоцитов и моноцитов методом проточной цитофлуориметрии: А-Ж – диаграммы светорассеяния, З – иерархическое дерево гейтирования, И – параметры, учитываемые в анализе.

В четвертой пробирке скомбинированы антитела против антигенов CD45, CD64 и CD10. Это позволяло проанализировать дополнительные параметры компарментов гранулоцитов и моноцитов. Стратегия гейтирования и анализируемые параметры показаны на Рисунке 11.

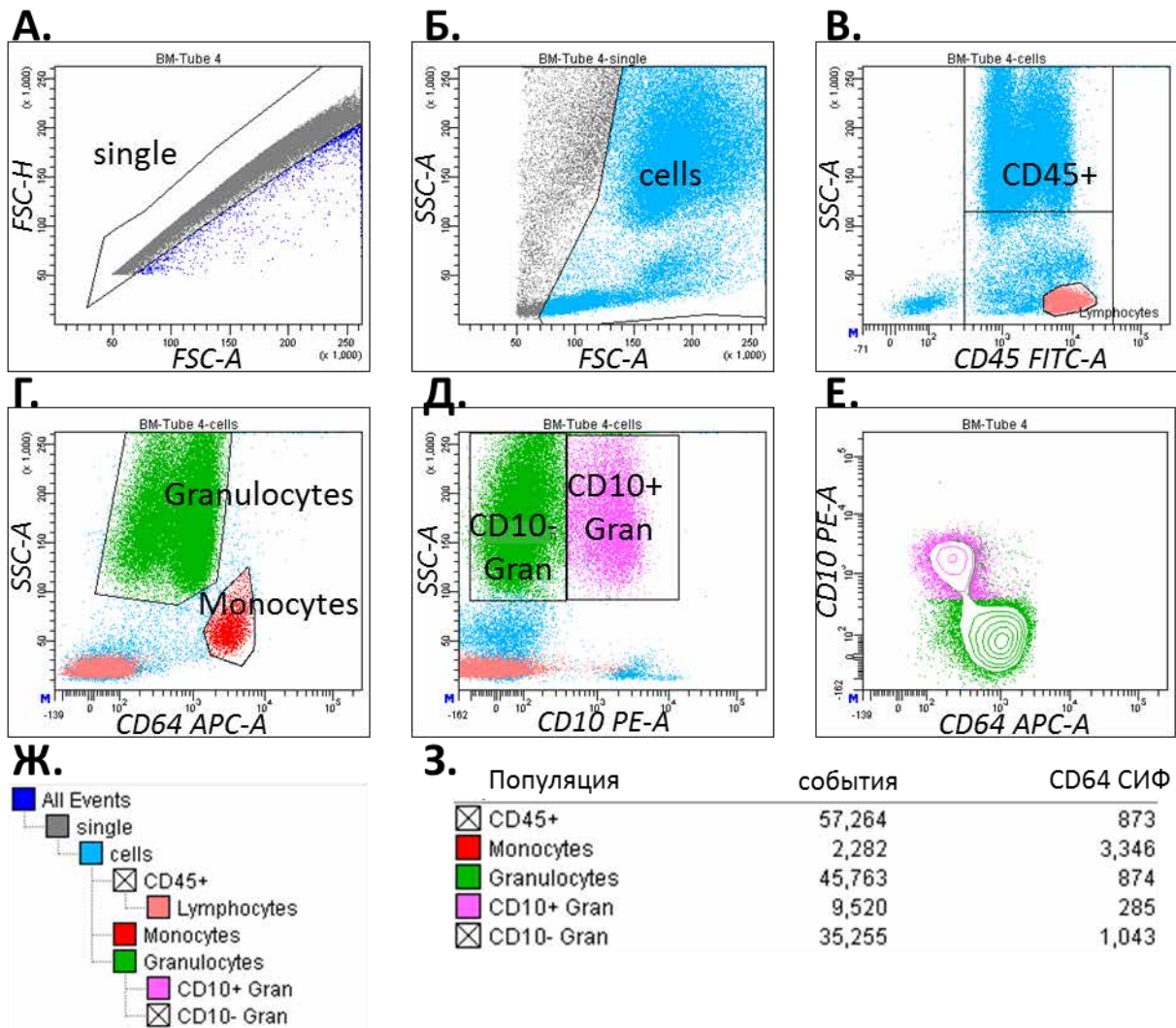


Рисунок 11 – Стратегия гейтирования и анализируемые параметры в четвертой пробирке в панели моноклональных антител, используемой для оценки дополнительных параметров дисмиелопоэза в компартменте гранулоцитов и моноцитов методом проточной цитофлуориметрии: А-Е – диаграммы светорассеяния, Ж – иерархическое дерево гейтирования, З – параметры, учитываемые в анализе

Так же как при анализе второй и третьей пробирок на первом этапе выделяли гейты «single» (Рисунок 11А) и «cells» (Рисунок 11Б), определялись CD45⁺ клетки (Рисунок 11В). На диаграмме «CD64 APC-A и SSC-A» выявлялись две популяции: моноцитов «Monocytes» по высокому значению экспрессии CD64 и среднему показателю SSC и гранулоцитов «Granulocytes» по среднему и

низкому значению экспрессии CD64 и высокому SSC (Рисунок 11Г). Из гейта «Granulocytes» на диаграмме «CD10 PE-A и SSC-A» определялась субпопуляция гранулоцитов с коэкспрессией CD10 «CD10+ Gran», остальные CD10⁻ гранулоциты обозначены как «CD10- Gran» (Рисунок 11Д). Как видно на диаграмме «CD64 APC-A и CD10 PE-A», CD10⁺ гранулоциты имеют меньшую плотность экспрессии CD64, чем CD10⁻ гранулоциты (Рисунок 11Е). Используя эту стратегию гейтирования, нами подсчитывались следующие параметры (Рисунок 11З):

- 1) Доля CD10⁺ гранулоцитов по отношению ко всем гранулоцитам как доля числа событий из гейта «CD10+ Gran» к числу событий «Granulocytes»: $9520 : 45763 \times 100\% = 20,80\%$;
- 2) СИФ анти-CD64 на моноцитах «Monocytes»: 3346;
- 3) СИФ анти-CD64 на CD10⁻ гранулоцитах «CD10- Gran»: 1043.

2.4. Цитометрические оценочные системы

После получения данных по параметрам компартментов ранних миелоидных клеток, популяций гранулоцитов и моноцитов КМ пациентов определяли баллы по шкалам «Ogata score», «Wells» и «Ogata-Wells» .

По шкале «Ogata score» оценивали параметры, показанные в Таблице 15.

Таблица 15 – Параметры шкалы «Ogata score»

№	Параметр
1	Доля CD34 ⁺ миелоидных клеток от CD45 ⁺ клеток
2	Доля CD34 ⁺ CD19 ⁺ В-клеточных предшественников от CD34 ⁺ клеток
3	Индекс CD45 CD34 ⁺ миелоидных клетках
4	Индекс гранулярности гранулоцитов

Согласно рекомендациям К. Огата (2006) при отклонениях от нормальных значений в двух и более параметров из шкалы «Ogata score» с высокой вероятностью предполагается наличие МДС.

Конечный балл по прогностической шкале «Wells» подсчитывали, как указано в Таблице 8. Итоговый балл от 0 до 1 соответствовал минимальному, от 2 до 3 – среднему, более 4 – высокому. В результате анализа КМ пациента давалось также заключение в буквенном эквиваленте по объединенной шкале «Ogata-Wells» (Таблица 9).

2.5. Статистический анализ данных

Статистический анализ данных проводили с помощью GraphPad Prism 6 и R 3.4.4. Значимость различий частоты встречаемости аномальных признаков между группами пациентов с МДС и группы сравнения определяли с помощью критериев χ^2 и Фишера с поправкой Бенджамини-Хохберга на множественные сравнения. Значимыми признавались отличия при $p < 0,05$. Проверку нормальности распределения проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка. При $p < 0,05$ распределение считали ненормальным. Для сравнения значений баллов по шкалам «Ogata score» и «Wells», а также цитометрических параметров у пациентов с разными вариантами МДС применяли критерий Краскела-Уоллиса, так как большинство распределений баллов было ненормальным. Для множественных сравнений использовали поправку Данна. Для сравнения значений баллов по шкалам «Ogata score» и «Wells» в зависимости от наличия или отсутствия цитогенетических aberrаций в пределах одной группы пациентов с МДС применяли критерий Манна-Уитни. Значимыми признавались отличия при $p < 0,05$.

Звездочками на рисунках указывали наличие достоверных отличий между группами пациентов: **** – $p \leq 0,0001$; *** – $p \leq 0,001$; ** – $p \leq 0,01$; * – $p < 0,05$.

Оценку специфичности, чувствительности, определение оптимального порогового значения баллов по шкалам «Ogata score», «Wells» и «Ogata-Wells»

проводили с помощью ROC-анализа (ROC – receiver operating characteristic, рабочая характеристика приёмника).

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1. Клинико-лабораторная характеристика пациентов с миелодиспластическими синдромами

На основе показателей периферической крови, данных цитоморфологического и цитогенетического исследований у пациентов с МДС определена группа цитогенетического прогноза и риска по шкале IPSS-R.

Частота встречаемости цитогенетических aberrаций при различных вариантах МДС представлена в Таблице 16. Цитогенетические aberrации наиболее часто обнаруживались при МДС-ЛД (75% случаев) и МДС-ИБ-1 (66,7%).

Таблица 16 – Частота обнаружения цитогенетических aberrаций при различных вариантах МДС

Вариант МДС	n	нет цитогенетических aberrаций n (%)	есть цитогенетические aberrации n (%)
МДС с 5q-	7	0 (0%)	7 (100%)
МДС-ЛД	4	1 (25%)	3 (75%)
МДС-КС	13	9 (69,2%)	4 (30,8%)
МДС-МД	30	18 (60%)	12 (40%)
МДС-ИБ-1	24	8 (33,3%)	16 (66,7%)
МДС-ИБ-2	21	11 (52,4%)	10 (47,6%)

Распределение пациентов по группам цитогенетического прогноза показано в Таблице 17. Чаще всего встречался хороший прогноз (65,7%).

Таблица 17 – Распределение пациентов с МДС по цитогенетической оценке прогноза по шкале IPSS-R

Вариант МДС	очень хороший n (%)	Хороший n (%)	Промежуточный n (%)	Плохой n (%)	очень плохой n (%)
МДС с 5q-	0 (0%)	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
МДС-ЛД	2 (50%)	1 (25%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)
МДС-КС	1 (7,7%)	11 (84,6%)	1 (7,7%)	0 (0%)	0 (0%)
МДС-МД	1 (3,3%)	20 (66,7%)	4 (13,3%)	2 (6,7%)	3 (10%)
МДС-ИБ-1	0 (0%)	13 (54,2%)	5 (20,8%)	2 (8,3%)	4 (16,7%)
МДС-ИБ-2	(0%)	13 (61,9%)	3 (14,3%)	3 (14,3%)	2 (9,5%)
Всего от всех пациентов с МДС	4 (4%)	65 (65,7%)	13 (13,1%)	8 (8,1%)	9 (9,1%)

Распределение пациентов по шкале IPSS-R показано в Таблице 18. Наиболее часто встречался низкий риск по шкале IPSS-R.

Таблица 18 – Распределение пациентов с МДС по шкале IPSS-R

Вариант МДС	очень низкий n (%)	Низкий n (%)	Средний n (%)	Высокий n (%)	очень высокий n (%)
МДС с 5q-	1 (14,3%)	5 (71,4%)	1 (14,3%)	0 (0%)	0 (0%)
МДС-ЛД	2 (50%)	1 (25%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)
МДС-КС	0 (0%)	8 (61,5%)	3 (23,1%)	2 (15,4%)	0 (0%)
МДС-МД	0 (0%)	13 (43,3%)	11 (36,7%)	3 (10%)	3 (10%)
МДС-ИБ-1	0 (0%)	6 (25%)	6 (25%)	5 (20,8%)	7 (29,2%)
МДС-ИБ-2	0 (0%)	0 (0%)	1 (4,8%)	11 (52,4%)	9 (42,9%)
Всего от всех пациентов с МДС	3 (3%)	33 (33,3%)	23 (23,2%)	21 (21,2%)	19 (19,2%)

Далее будет изучена взаимосвязь цитометрических шкал дисмиелопоэза с цитогенетическим прогнозом и шкалой IPSS-R (33,3%).

3.2. Референсные интервалы для количественных параметров

Анализируемые цитометрические параметры были двух типов: качественные и количественные. К качественным параметрам относили соотношения экспрессии (паттерны) антигенов на гранулоцитах и моноцитах, остальные параметры (доли клеток (%), СИФ и СОФ флуоресцентного сигнала (в относительных единицах)) – к количественным.

По результатам анализа КМ 35 здоровых доноров были получены референсные интервалы для количественных параметров, используемых в оценке дисмиелопоэза методом проточной цитофлуориметрии. Минимальная и максимальные границы (2,5 и 97,5 процентиля) показаны в Таблице 19. В статье К. Огата и соавт. (2006) были опубликованы референсные интервалы для 4-параметровой шкалы «Ogata score»: доля $CD34^+$ миелобластных клеток в норме не превышала 2%, доля $CD34^+$ В-клеточных предшественников от $CD34^+$ клеток была не ниже 5%, ИГ гранулоцитов был выше 6, а отношение экспрессии CD45 лимфоцитов к $CD34^+$ миелоидным клеткам (индекс CD45) находилось в интервале от 4 до 7,5 [70]. В результате проведенного нами исследования у всех доноров доля $CD34^+$ миелоидных клеток была ниже 2% (максимальное значение – 1,6%), ИГ гранулоцитов у всех доноров был выше 6. Однако у 3 из 35 доноров доля $CD34^+$ В-клеточных предшественников от $CD34^+$ клеток была ниже 5%, а индекс CD45 находился в интервале 5,58-8,9, отличном от полученного в работе К. Огата и соавт., что, вероятно, связано с различиями в используемых реагентах, в частности моноклональных антителах. В качестве референсного значения мы использовали полученный нами интервал для индекса CD45 для $CD34^+$ миелоидных клеток.

Таблица 19 – Нижняя и верхние границы референсных интервалов количественных параметров, применяемых в оценке дисмиелопоэза методом МПЦ, полученные в результате анализа КМ здоровых доноров

Параметр	Нижняя граница	Верхняя граница
Доля CD34 ⁺ миелоидных клеток от CD45 ⁺ клеток, %	0,31	1,88
Доля CD34 ⁺ В-клеточных предшественников от CD34 ⁺ клеток, %	2,7	34,9
Индекс CD45 CD34 ⁺ миелоидных клеток	5,58	8,9
Доля CD117 ⁺ от CD34 ⁺ миелоидных клеток, %	73,2	93,1
Доля CD7 ⁺ от CD34 ⁺ миелоидных клеток, %	1,1	12,6
Доля CD56 ⁺ от CD34 ⁺ миелоидных клеток, %	0	1,1
Доля CD117 ⁺ миелоидных клеток от CD45 ⁺ клеток, %	1,54	5,35
СИФ CD34 на CD34 ⁺ миелоидных клетках, отн. ед.	1491	6954
СОФ CD34 на CD34 ⁺ миелоидных клетках, отн. ед.	797	4414
СИФ CD117 на CD34 ⁺ миелоидных клетках, отн. ед.	1230	3427
СОФ CD117 на CD34 ⁺ миелоидных клетках, отн. ед.	1245	3145
Доля гранулоцитов от CD45 ⁺ клеток, %	66,4	93,2
Индекс гранулярности гранулоцитов	6,29	9,89
Индекс CD45 на гранулоцитах	2,26	6,31
Доля CD56 ⁺ гранулоцитов от гранулоцитов, %	0,1	2,2
Индекс CD33	1,9	5,6
СИФ анти-CD33 на гранулоцитах, отн. ед.	166	1821
СИФ анти-CD64 на CD10 ⁺ гранулоцитах, отн. ед.	339	1813
Доля CD14 ⁺ гранулоцитов от гранулоцитов, %	0	0,9
Доля CD10 ⁺ гранулоцитов от гранулоцитов, %	6	50,1
Доля моноцитов от CD45 ⁺ клеток, %	1,1	7,4
Индекс гранулярности моноцитов	2,18	3,17
Индекс CD45 на моноцитах	0,86	2,06
Доля CD56 ⁺ моноцитов от моноцитов, %	3,9	46,5
СИФ CD33 на моноцитах, отн. ед.	316	6394
СИФ CD64 на моноцитах, отн. ед.	1208	4953
Лимфоидно-миелоидное соотношение	0,01	0,3

Примечание: отн. ед. – относительные единицы.

Таким образом, у пациентов в качестве цитометрических aberrаций принимали:

- 1) Увеличение доли CD34⁺ миелоидных клеток от CD45⁺ клеток более 2%;
- 2) Снижение доли CD34⁺ В-клеточных предшественников от всех CD34⁺ клеток менее 5%;

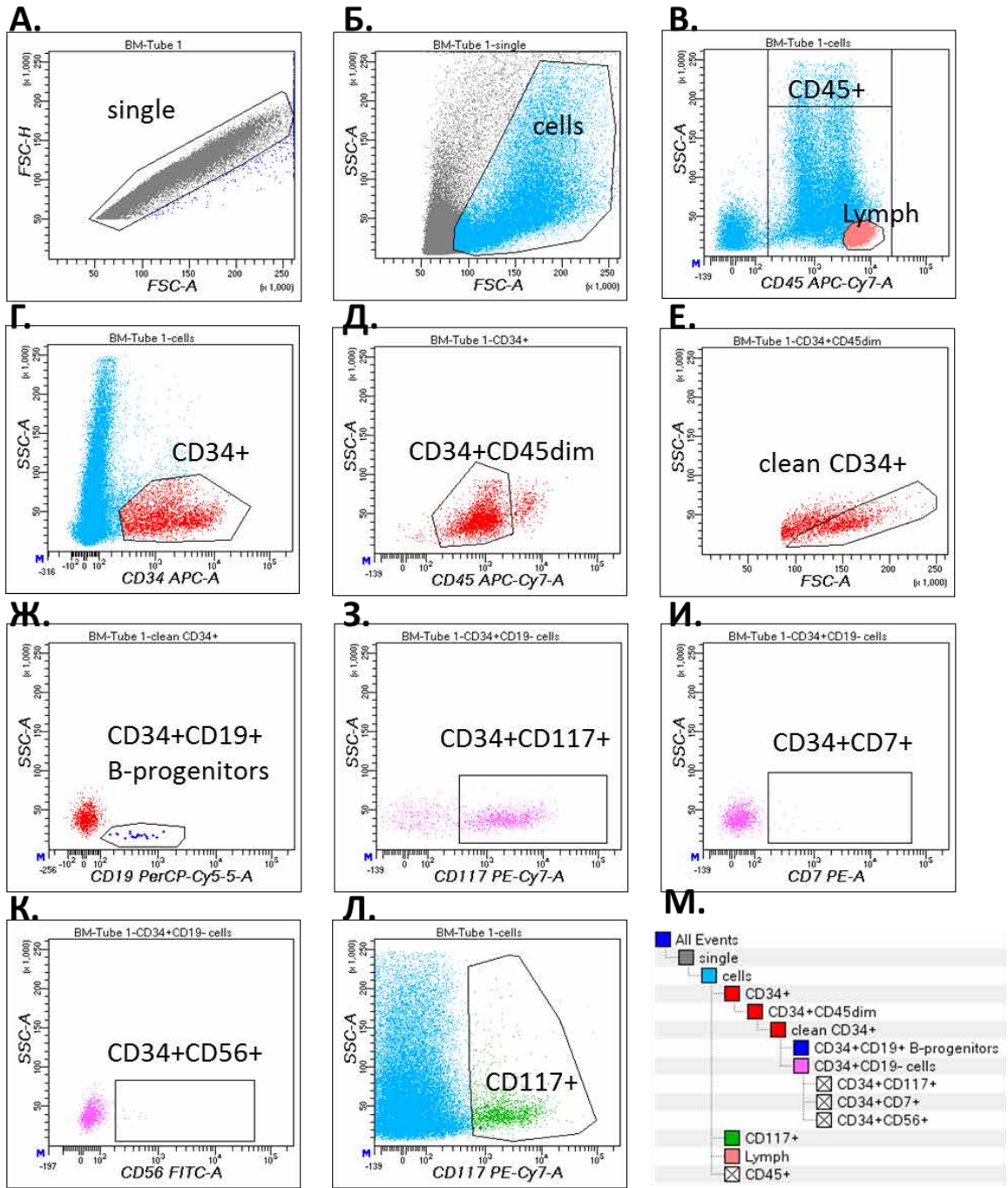
- 3) Аномальный индекс $CD45^+ CD34^+$ миелоидных клеток, если он принимал значения менее 5,58 или более 8,9;
- 4) Аномальную долю $CD117^+ CD34^+$ от $CD34^+$ миелоидных клеток, если она была ниже 73,2% или выше 93,1%;
- 5) Повышенную долю $CD7^+ CD34^+$ и $CD56^+ CD34^+$ клеток от $CD34^+$ клеток при их увеличении более 12,6% и 1,1%, соответственно;
- 6) Увеличение доли $CD117^+$ клеток от $CD45^+$ клеток более 5,35%;
- 7) Аномальную экспрессию $CD34$ и $CD117$ на $CD34^+$ миелоидных клетках в случае изменения СИФ или СОФ более 10% от границ полученных референсных интервалов;
- 8) Сниженную долю гранулоцитов менее 66,4%;
- 9) Уменьшение индекса гранулярности гранулоцитов менее 6;
- 10) Аномальный индекс $CD45$ гранулоцитов при его уменьшении менее 2,26 или увеличении более 6,31;
- 11) Аномальный индекс $CD33$ при его уменьшении менее 1,9 или увеличении более 5,6;
- 12) Повышенную долю $CD56^+$ и $CD14^+$ гранулоцитов при их увеличении более 2,2% и 0,9%, соответственно;
- 13) Сниженную долю $CD10^+$ гранулоцитов при ее уменьшении менее 5%;
- 14) Повышенную долю моноцитов при ее увеличении более 7,4%;
- 15) Уменьшение индекса гранулярности гранулоцитов менее 2,18;
- 16) Аномальный индекс $CD45$ моноцитов при его уменьшении менее 0,86 или увеличении более 2,06;
- 17) Повышенную долю $CD56^+$ моноцитов при ее увеличении более 46,5%;
- 18) Аномальную экспрессию $CD33$ и $CD64$ на гранулоцитах и моноцитах при изменении СОФ более 10% от границ полученных референсных интервалов;
- 19) Повышение лимфоидно-миелоидного соотношения более 1.

Примеры цитомерического анализа дисмиелопоэза у пациентов и формирование баллов по цитометрическим шкалам

Пример №1.

Пациентка С.С.Б. 54 лет считает себя больной с января 2016 года, когда появилась слабость, бледность кожных покровов, учащенное сердцебиение. С мая 2016 г. наблюдалась в поликлиническом отделении «НМИЦ гематологии», где установлен диагноз МДС с мультилинейной дисплазией, протекающий с гипоплазией кроветворения. В общем анализе крови уровень гемоглобина составлял 39 г/л, тромбоцитов – 160×10^9 /л, абсолютное число нейтрофилов – $1,4 \times 10^9$ /л. В миелограмме – 1,1% бластных клеток. По данным гистологического исследования трепанобиоптата – данных в пользу МДС не получено. По данным стандартного цитогенетического исследования пунктата костного мозга – хромосомные aberrации не выявлены. Риск по шкале IPSS-R оценен как низкий (2,5 балла).

Анализ миелоидных и В-клеточных предшественников представлен на Рисунке 12.



Н.

Популяция	события	CD117 СИФ	CD117 СОФ	CD34 СИФ	CD34 СОФ	CD45 СИФ
cells	31,352	170	1,116	291	1,041	2,613
clean CD34+	1,156	2,178	2,587	3,336	2,395	1,012
CD34+CD19+ B-progenitors	19	58	209	1,642	1,066	781
CD34+CD19- cells	1,137	2,214	2,594	3,364	2,402	1,016
CD34+CD117+	853	2,925	2,634	3,917	2,402	1,090
CD34+CD7+	15	1,102	749	2,758	2,930	1,122
CD34+CD56+	12	2,635	1,843	3,314	1,524	1,349
CD117+	1,464	2,823	3,159	3,223	3,071	1,434
Lymph	6,959	52	289	31	61	6,107
CD45+	27,197	187	1,058	327	1,110	3,006

Рисунок 12 – Анализ компартамента предшественников КМ пациентки С.С.Б. А-Л – диаграммы светорассеяния, М – иерархическое дерево гейтирования, Н – параметры, учитываемые в анализе

С помощью параметров статистики, показанных в таблице на Рисунке 12Н, были получены следующие результаты:

- 1) Доля $CD34^+$ миелоидных клеток от $CD45^+$ клеток: $1137 : 27197 \times 100\% = 4,18\%$;
- 2) Доля $CD34^+$ В-клеточных предшественников от всех $CD34^+$ клеток: $19 : 1156 \times 100\% = 1,64\%$;
- 3) Доля $CD34^+CD117^+$ клеток от $CD34^+$ миелоидных клеток: $853 : 1137 \times 100\% = 75,02\%$;
- 4) Доля $CD34^+CD7^+$ клеток от $CD34^+$ миелоидных клеток: $15 : 1137 \times 100\% = 1,32\%$;
- 5) Доля $CD34^+CD56^+$ клеток от $CD34^+$ миелоидных клеток: $12 : 1137 \times 100\% = 1,06\%$;
- 6) Доля $CD117^+$ клеток от $CD45^+$: $1464 : 27197 \times 100\% = 5,38\%$;
- 7) СИФ анти- $CD34$ на миелоидных $CD34^+$ клетках: 3364;
- 8) СОФ анти- $CD34$ на миелоидных $CD34^+$ клетках: 2402;
- 9) СИФ анти- $CD117$ на миелоидных $CD34^+$ клетках: 2214;
- 10) СОФ анти- $CD117$ на миелоидных $CD34^+$ клетках: 2594;
- 11) Индекс $CD45$ миелоидных $CD34^+$ клеток: $6107 : 1016 = 6,01$.

С помощью анализа, продемонстрированного на Рисунке 13, выявлены аномальные паттерны гранулоцитов « $CD11b$ и $CD13$ » (Рисунок 13Ж), « $CD16$ и $CD11b$ » (Рисунок 13И); и моноцитов « $CD11b$ и $HLA-DR$ » (Рисунок 13Е). Также рассчитаны следующие показатели (Рисунок 13Л):

- 1) Доля гранулоцитов по отношению ко всем лейкоцитам: $10531 : 20609 \times 100\% = 77,26\%$;
- 2) Доли моноцитов по отношению ко всем лейкоцитам: $1223 : 20609 \times 100\% = 11,61\%$;
- 3) Лимфоидно-миелоидное отношение: $5439 : (10531+1223) = 0,46$;
- 4) Индекс гранулярности гранулоцитов: $95918 : 25130 = 3,82$;
- 5) Индекс гранулярности моноцитов: $52984 : 25130 = 2,11$;
- 6) СИФ анти- $CD33$ на гранулоцитах: 537;

7) СИФ анти-CD33 на моноцитах: 2570;

8) Индекс CD33: $2570 : 537 = 4,79$;

9) Индекс CD45 гранулоцитов: $10777 : 3653 = 2,95$;

10) Индекс CD45 моноцитов: $10777 : 9574 = 1,13$.

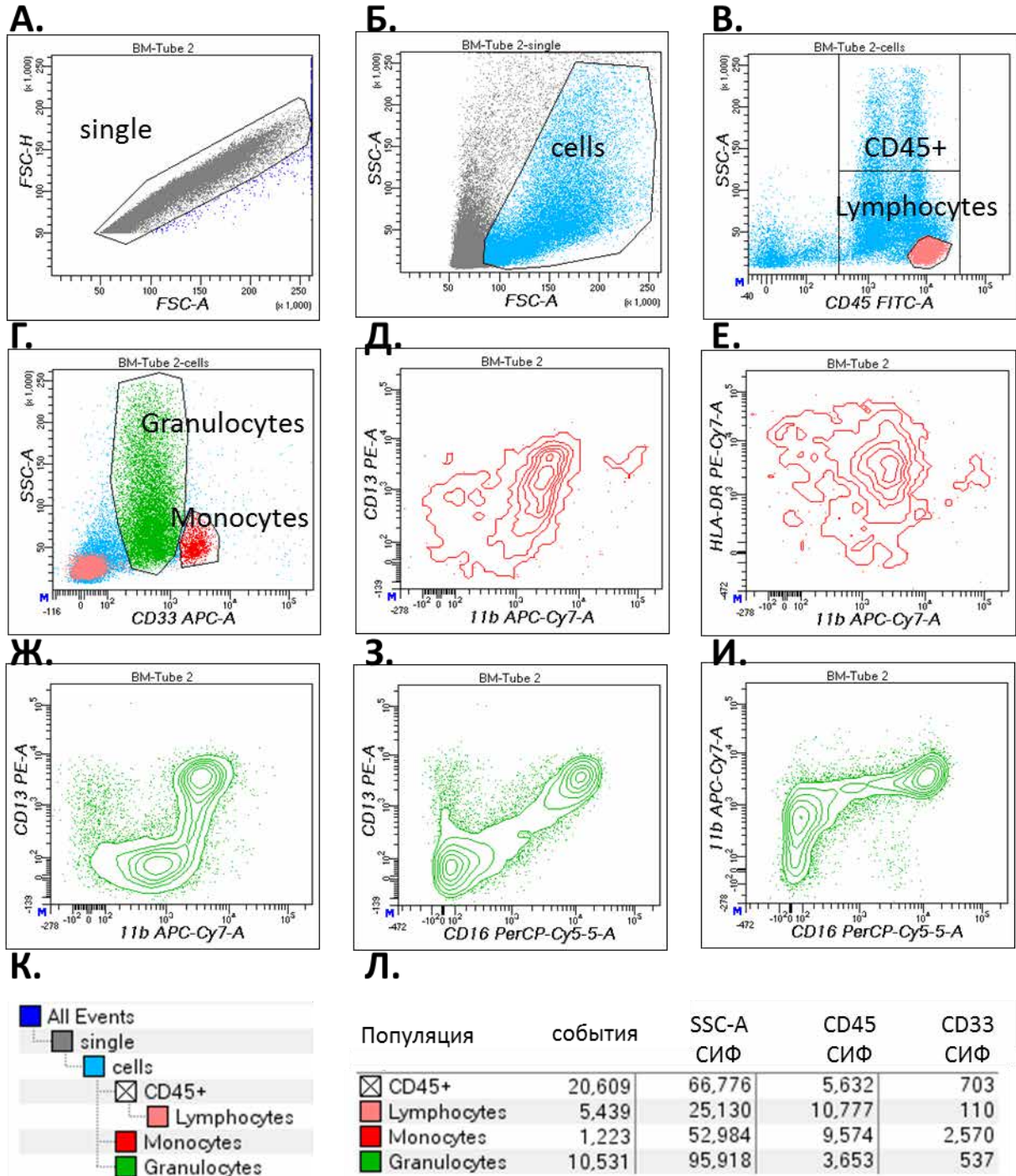


Рисунок 13 – Анализ компартамента гранулоцитов и моноцитов пациентки С.С.Б. с помощью антител против CD45, CD33, CD13, CD11b, CD16, HLA-DR: А-

И – диаграммы светорассеяния, К – иерархическое дерево гейтирования, Л – параметры окна статистики

С помощью анализа, представленного в таблице на Рисунке 14И, рассчитаны следующие показатели:

- 1) Доля CD56⁺ гранулоцитов: $436 : 16247 \times 100\% = 2,68\%$;
- 2) Доля CD56⁺ моноцитов: $327 : 1318 \times 100\% = 24,81\%$;
- 3) Доля CD14⁺ гранулоцитов: $4500 : 16247 \times 100\% = 27,70\%$.

Паттерн моноцитов «CD14 и CD36» расценен как аномальный (Рисунок 14Ж).

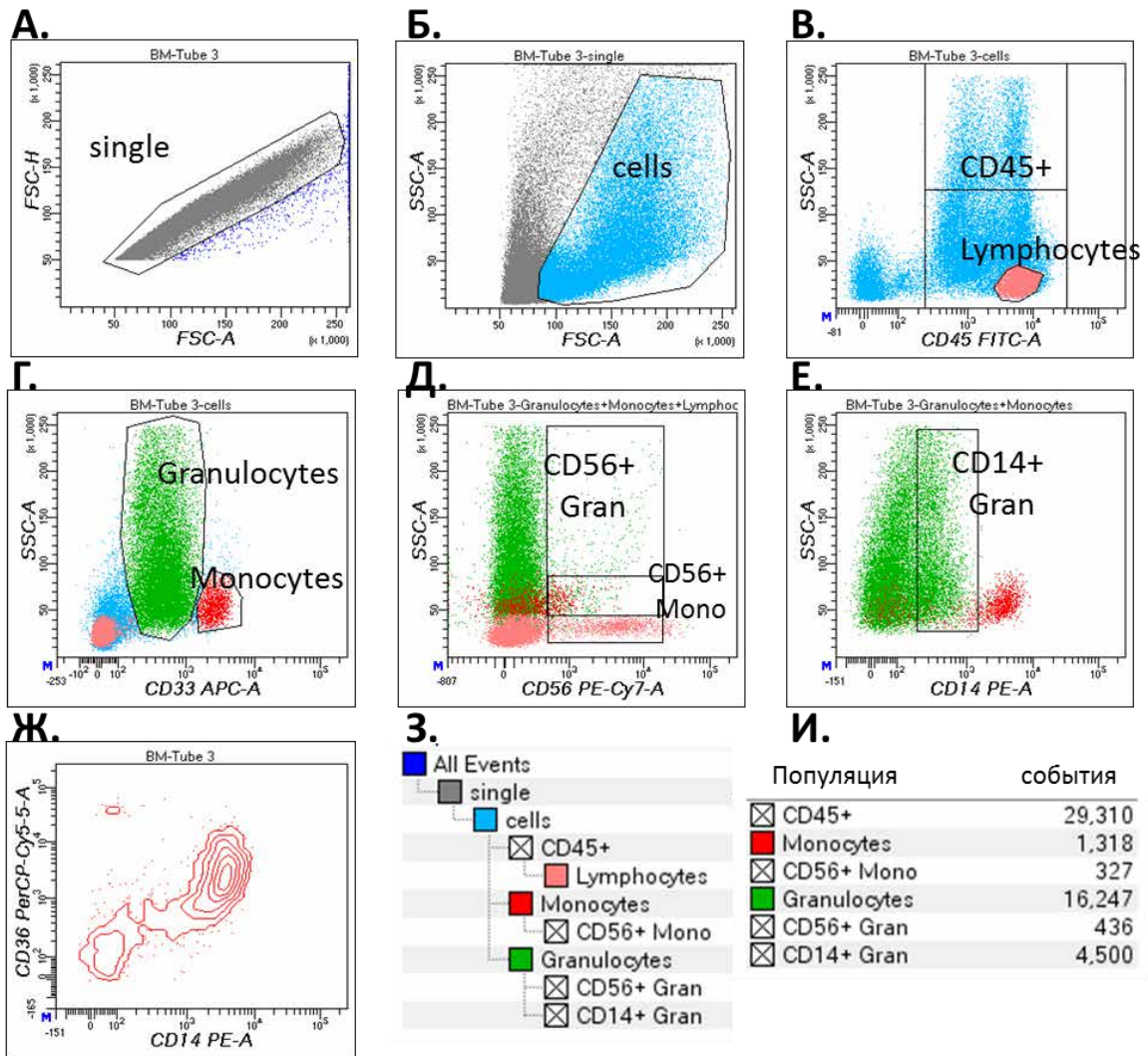


Рисунок 14 – Анализ компартамента гранулоцитов и моноцитов пациентки С.С.Б. с помощью антител против CD45, CD33, CD56, CD14, CD36: А-Ж –

диаграммы светорассеяния, З – иерархическое дерево гейтирования, И – параметры окна статистики

С помощью анализа, продемонстрированного на Рисунке 15, рассчитаны следующие показатели:

- 1) Доля $CD10^+$ гранулоцитов по отношению ко всем гранулоцитам: $4142 : 14937 \times 100\% = 27,73\%$;
- 2) СИФ анти-CD64 на моноцитах: 786;
- 3) СИФ анти-CD64 на $CD10^-$ гранулоцитах « $CD10^-$ Gran»: 277.

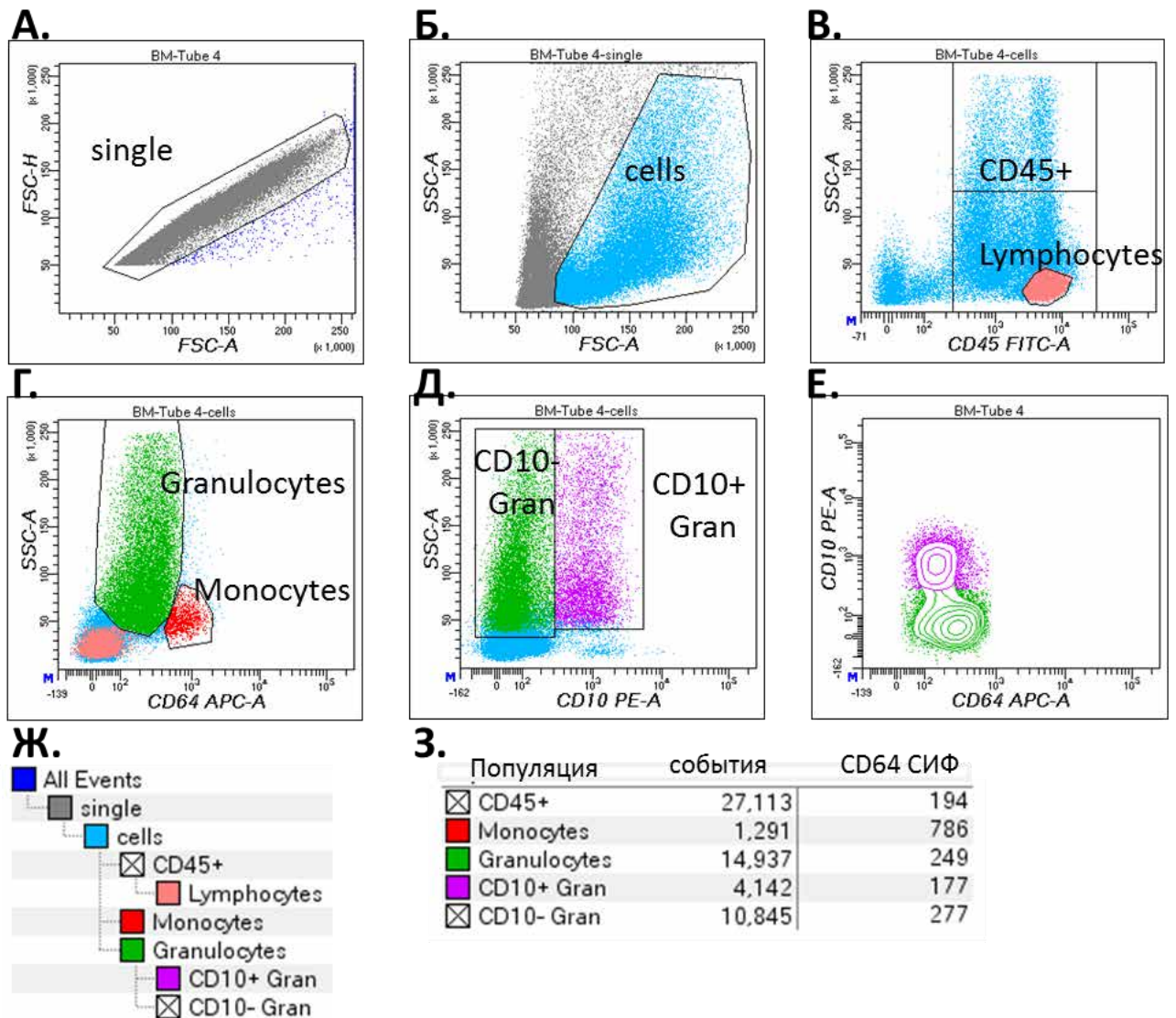


Рисунок 15 – Анализ компартамента гранулоцитов и моноцитов пациентки С.С.Б. с помощью антител против CD45, CD64, CD10: А-Е – диаграммы

светорассеяния, Ж – иерархическое дерево гейтирования, З – параметры окна статистики

В результате проведенного цитометрического исследования пациентки С.С.Б. выявлено увеличение количества CD34⁺ и CD117⁺ миелоидных клеток (иммунофенотипические aberrации среди CD34⁺ миелоидных клеток отсутствуют) и снижение количества CD34⁺ В-клеточных предшественников (Таблица 20).

Обнаружено 6 аномалий в компартменте гранулоцитов: снижение ИГ, увеличение доли CD56⁺ и CD14⁺ гранулоцитов, снижение плотности экспрессии CD64, аномальные паттерны «CD11b и CD13» и «CD16 и CD11b» и 5 аномалий в компартменте моноцитов: повышение доли моноцитов, снижение ИГ, снижение плотности экспрессии CD64 и аномальные паттерны «CD11b и HLA-DR» и «CD14 и CD36», лимфоидно-миелоидное соотношение повышено (Таблица 20).

Исходя из полученных данных, балл по шкале «Ogata» (Таблица 15) составил 3, по шкале «Wells» (Таблица 8) – 5 (основной балл – 4, дополнительный +1), по объединенной шкале «Ogata-Wells» (Таблица 9) поставлена оценка «С».

Таблица 20 – Результаты, полученные при анализе костного мозга пациентки С.С.Б. методом проточной цитофлуориметрии

Параметр	Параметры пациента	Нижняя граница РИ*	Верхняя граница РИ*
Доля CD34 ⁺ миелоидных клеток от CD45 ⁺ клеток, %	4,18	0,31	1,88
Доля CD34 ⁺ В-предшественников от CD34 ⁺ клеток, %	1,64	2,7	34,9
Индекс CD45 CD34 ⁺ миелоидных клеток	6,01	5,58	8,9
Доля CD117 ⁺ от CD34 ⁺ миелоидных клеток, %	75,02	73,2	93,1
Доля CD7 ⁺ от CD34 ⁺ миелоидных клеток, %	1,32	1,1	12,6
Доля CD56 ⁺ от CD34 ⁺ миелоидных клеток, %	1,06	0	1,1
Доля CD117 ⁺ миелоидных клеток от CD45 ⁺ клеток, %	5,38	1,54	5,35
СИФ CD34 на CD34 ⁺ миелоидных клетках, отн. ед.	3364	1491	6954
СОФ CD34 на CD34 ⁺ миелоидных клетках, отн. ед.	2402	797	4414
СИФ CD117 на CD34 ⁺ миелоидных клетках, отн. ед.	2214	1230	3427
СОФ CD117 на CD34 ⁺ миелоидных клетках, отн. ед.	2594	1245	3145
Доля гранулоцитов от CD45 ⁺ клеток, %	77,26	66,4	93,2
Индекс гранулярности гранулоцитов	3,82	6,29	9,89
Индекс CD45 на гранулоцитах	2,95	2,26	6,31
Доля CD56 ⁺ гранулоцитов от гранулоцитов, %	2,68	0,1	2,2
Индекс CD33	4,79	1,9	5,6
СИФ CD33 на гранулоцитах, отн. ед.	537	166	1821
СИФ CD64 на CD10 ⁺ гранулоцитах, отн. ед.	277	339	1813
Доля CD14 ⁺ гранулоцитов от гранулоцитов, %	27,70	0	0,9
Доля CD10 ⁺ гранулоцитов от гранулоцитов, %	27,73	6	50,1
Доля моноцитов от CD45 ⁺ клеток, %	11,61	1,1	7,4
Индекс гранулярности моноцитов	2,11	2,18	3,17
Индекс CD45 на моноцитах	1,13	0,86	2,06
Доля CD56 ⁺ моноцитов от моноцитов, %	24,81	3,9	46,5
СИФ CD33 на моноцитах, отн. ед.	2570	316	6394
СИФ CD64 на моноцитах, отн. ед.	786	1208	4953
Лимфоидно-миелоидное соотношение	0,46	0,01	0,3
Паттерн «CD11b и CD13» гранулоцитов	аномальный	нормальный	
Паттерн «CD16 и CD13» гранулоцитов	нормальный	нормальный	
Паттерн «CD16 и CD11b» гранулоцитов	аномальный	нормальный	
Паттерн «CD11b и CD13» моноцитов	нормальный	нормальный	
Паттерн «CD11b и HLA-DR» моноцитов	аномальный	нормальный	
Паттерн «CD14 и CD36» моноцитов	аномальный	нормальный	

Примечание: *РИ – референсный интервал

Таким образом, несмотря на отсутствие данных в пользу МДС по результатам гистологического исследования и отсутствие цитогенетических aberrаций, по результатам исследования КМ методом МПЦ признаки МДС обнаружены.

Пример №2.

Пациент А.В.Я. 82 лет. В общем анализе крови уровень гемоглобина составлял 91 г/л, тромбоцитов – 51×10^9 /л, лейкоцитов – $3,4 \times 10^9$ /л. В миелограмме <5% бластных клеток, доля гранулоцитов с признаками дисплазии составила 20-49%, эритрокариоцитов – 20-49% и мегакариоцитов $\geq 50\%$. По данным гистологического исследования трепанобиоптата – данных в пользу МДС не получено, отмечается глубокая гипоплазия КМ. По данным стандартного цитогенетического исследования пунктата КМ выявлен клон с комплексным нарушением кариотипа (43, XY, -5, add(6)(p25), t(7;12)(q35;q10), del(11)(p15), -12, t(15;19)(q15;q13), -15, der(21)[55]/46, XY[5]). Риск по шкале IPSS-R оценен как очень высокий (5,5 баллов). Цитометрический анализ компартамента ранних предшественников показан на Рисунке 16. Цитометрический анализ гранулоцитов и моноцитов продемонстрирован на Рисунках 17, 18, 19.

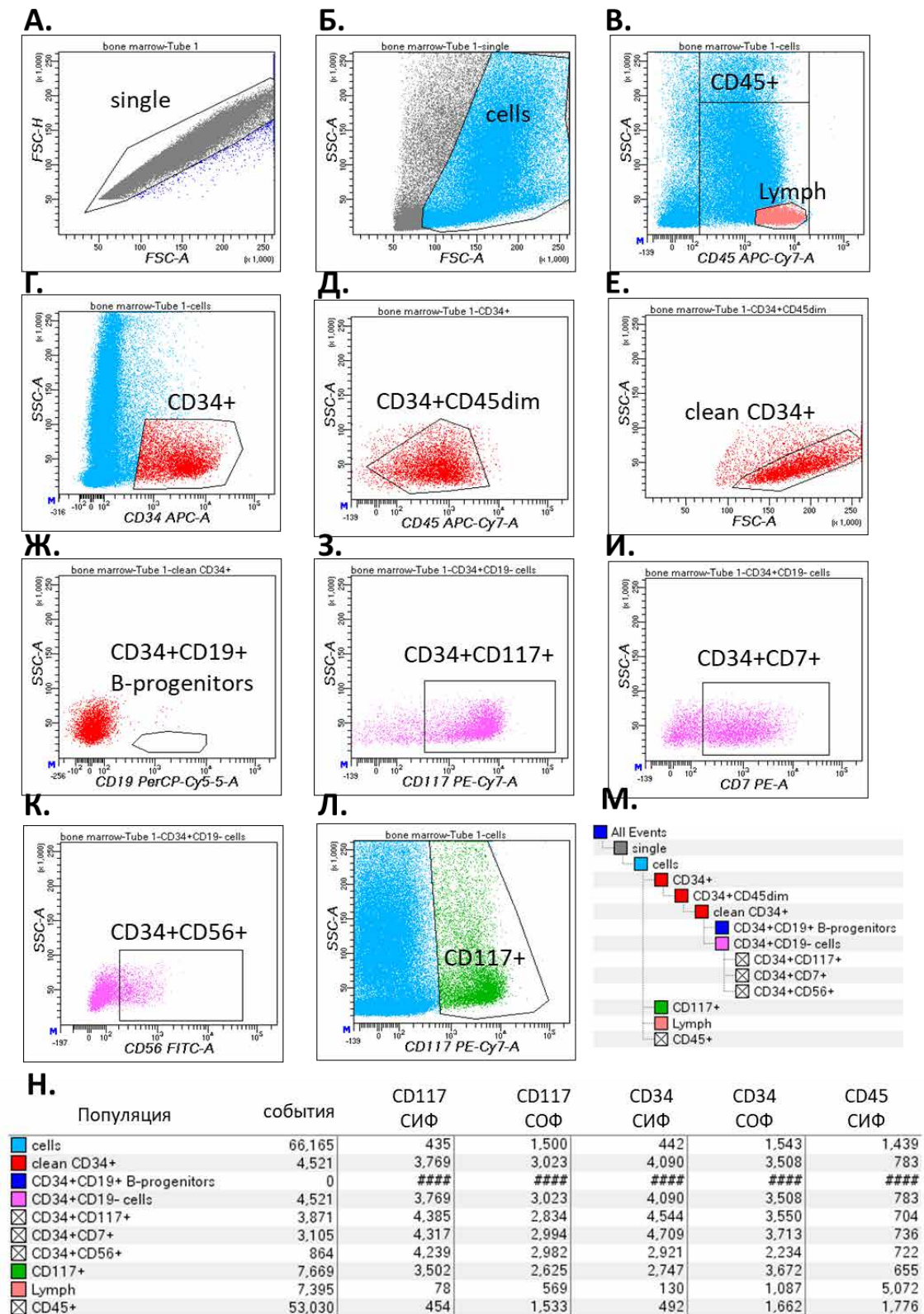


Рисунок 16 – Анализ компартамента предшественников костного мозга пациента А.В.Я.: А-Л – диаграммы светорассеяния, М – иерархическое дерево гейтирования, Н – параметры, учитываемые в анализе

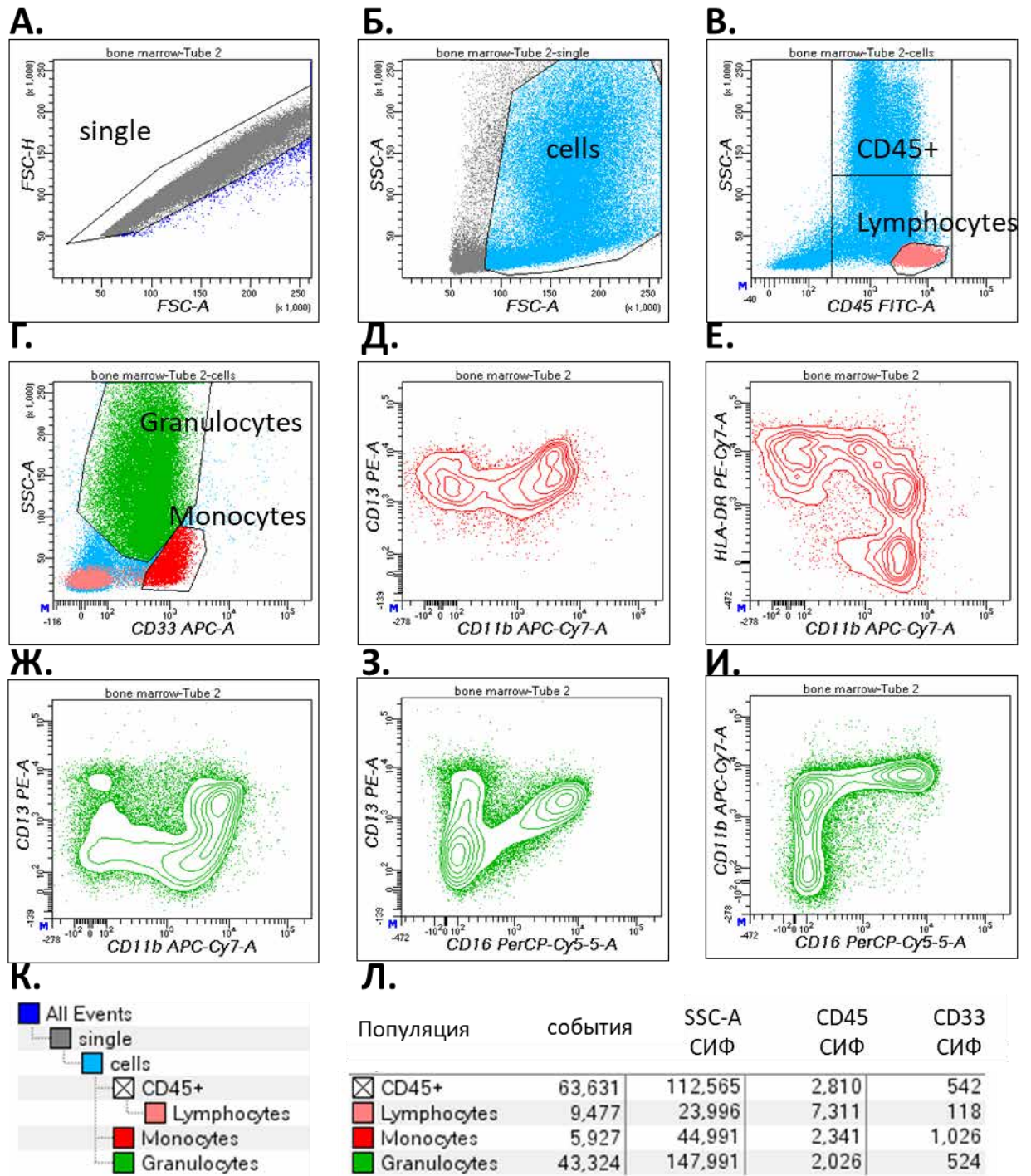


Рисунок 17 – Анализ компартмента гранулоцитов и моноцитов пациента А.В.Я. с помощью антител против CD45, CD33, CD13, CD11b, CD16, HLA-DR: А-И – диаграммы светорассеяния, К – иерархическое дерево гейтирования, Л – параметры окна статистики

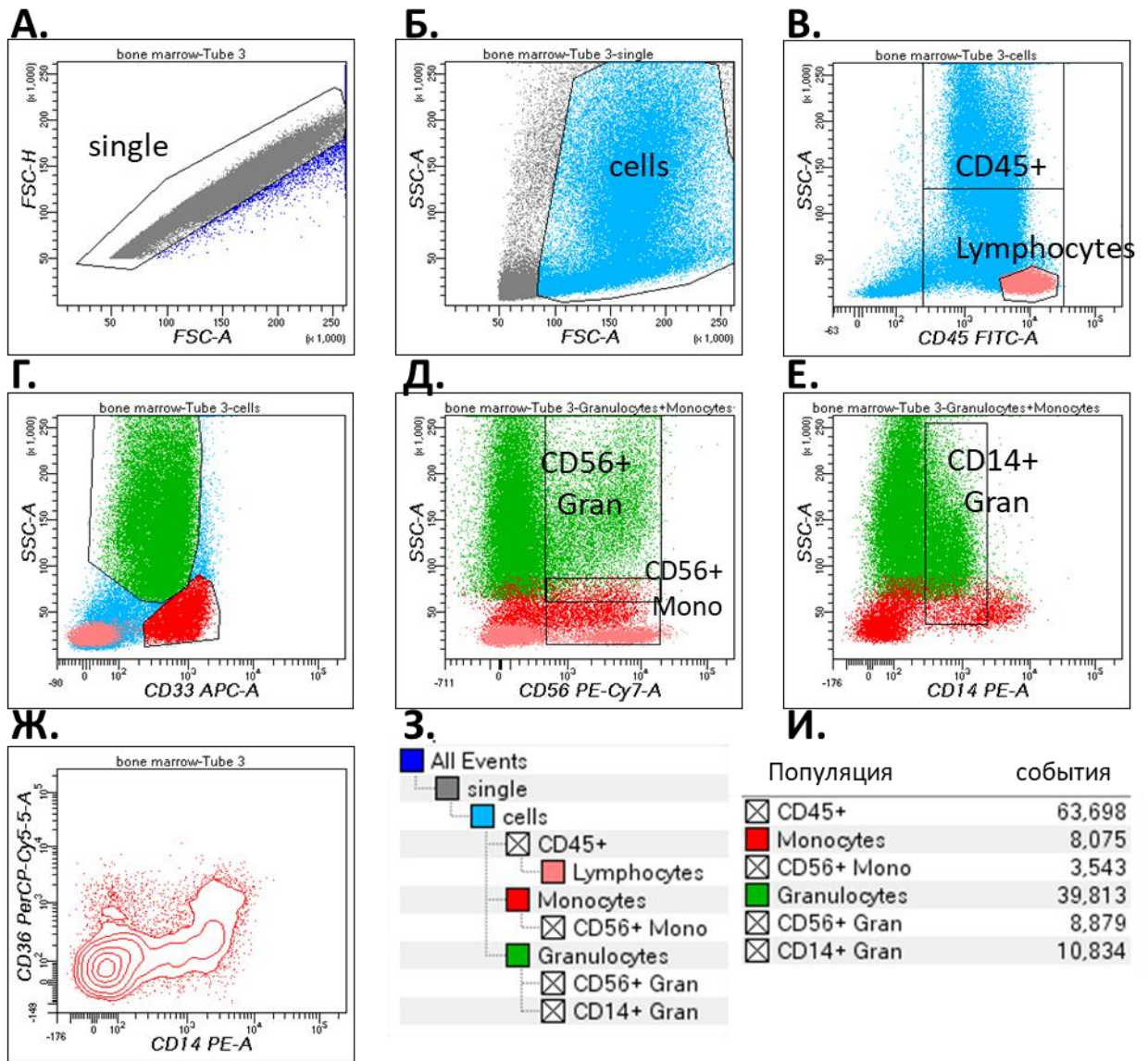


Рисунок 18 – Анализ компартамента гранулоцитов и моноцитов пациента А.В.Я. с помощью антител против CD45, CD33, CD56, CD14, CD36: А-Ж – диаграммы светорассеяния, З – иерархическое дерево гейтирования, И – параметры окна статистики

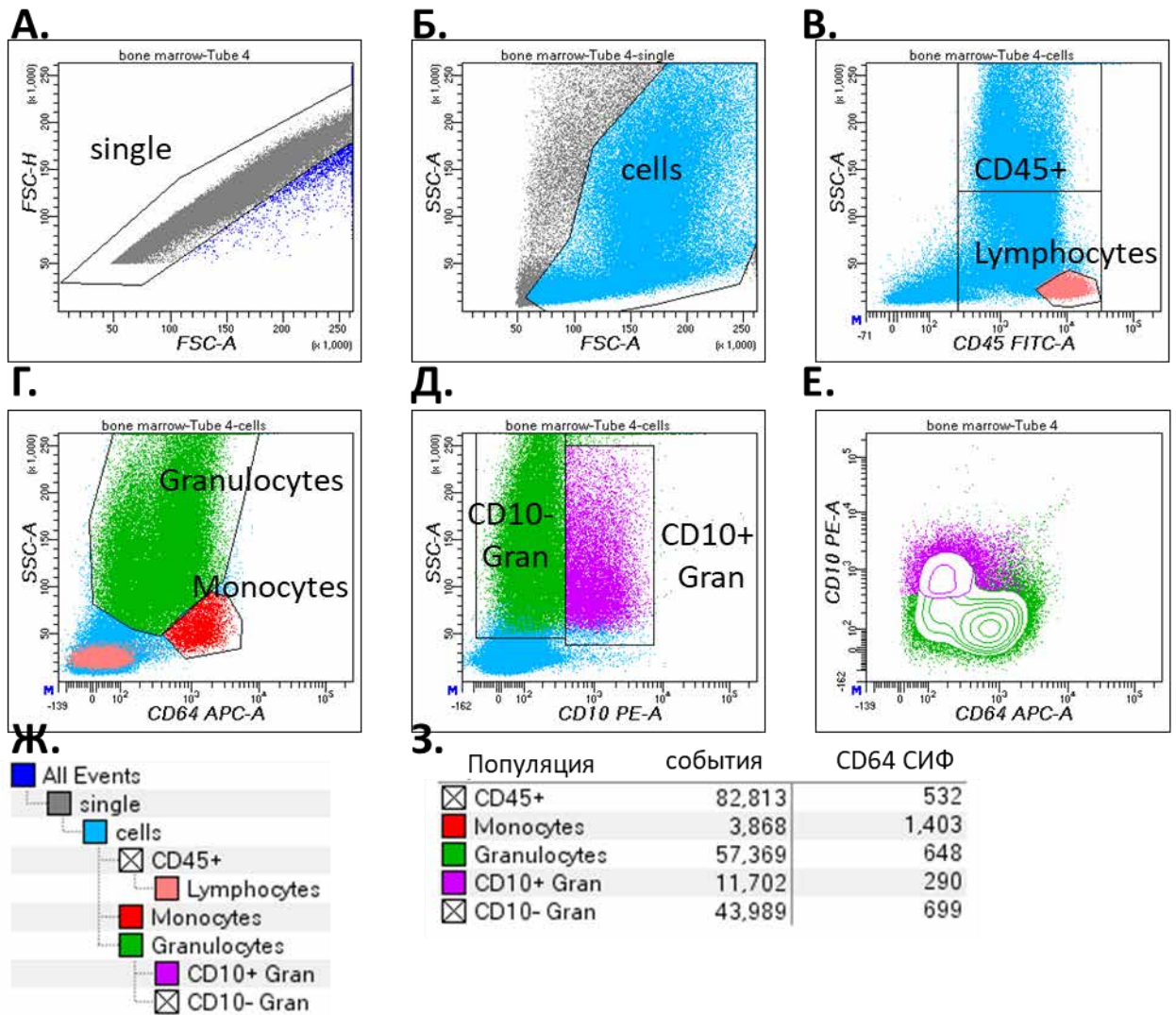


Рисунок 19 – Анализ компартамента гранулоцитов и моноцитов пациента А.В.Я. с помощью антител против CD45, CD64, CD10: А-Е – диаграммы светорассеяния, Ж – иерархическое дерево гейтирования, З – параметры окна статистики

В результате проведенного цитометрического исследования КМ пациента А.В.Я. отмечено увеличение доли $CD34^+$ миелоидных клеток до 8,53% с аномальной экспрессией CD56, CD7, CD117, отсутствие $CD34^+$ В-клеточных предшественников, 4 аномалии в компартамте гранулоцитов (аномальный паттерн «CD11b и CD13», сниженный ИГ, повышенные доли $CD56^+$ и $CD14^+$ гранулоцитов) и 6 аномалий в компартамте моноцитов (повышенная доля,

аномальные ИГ и индекс CD45, аномальные паттерны «CD11b и CD13», «CD11b и HLA-DR» и «CD14 и CD36») (Таблица 21).

Таблица 21 – Результаты, полученные при анализе костного мозга пациента А.В.Я. методом МПЦ

Параметр	Параметры пациента	Нижняя граница РИ*	Верхняя граница РИ*
Доля CD34 ⁺ миелоидных клеток от CD45 ⁺ клеток, %	8,53	0,31	1,88
Доля CD34 ⁺ В-предшественников от CD34 ⁺ клеток, %	0	2,7	34,9
Индекс CD45 CD34 ⁺ миелоидных клеток	6,48	5,58	8,9
Доля CD117 ⁺ от CD34 ⁺ миелоидных клеток, %	85,62	73,2	93,1
Доля CD7 ⁺ от CD34 ⁺ миелоидных клеток, %	68,68	1,1	12,6
Доля CD56 ⁺ от CD34 ⁺ миелоидных клеток, %	19,11	0	1,1
Доля CD117 ⁺ миелоидных клеток от CD45 ⁺ клеток, %	14,46	1,54	5,35
СИФ CD34 на CD34 ⁺ миелоидных клетках, отн. ед.	4090	1491	6954
СОФ CD34 на CD34 ⁺ миелоидных клетках, отн. ед.	3508	797	4414
СИФ CD117 на CD34 ⁺ миелоидных клетках, отн. ед.	3769	1230	3427
СОФ CD117 на CD34 ⁺ миелоидных клетках, отн. ед.	3023	1245	3145
Доля гранулоцитов от CD45 ⁺ клеток, %	68,09	66,4	93,2
Индекс гранулярности гранулоцитов	6,17	6,29	9,89
Индекс CD45 на гранулоцитах	3,61	2,26	6,31
Доля CD56 ⁺ гранулоцитов от гранулоцитов, %	22,3	0,1	2,2
Индекс CD33	1,96	1,9	5,6
СИФ CD33 на гранулоцитах, отн. ед.	524	166	1821
СИФ CD64 на CD10 ⁺ гранулоцитах, отн. ед.	699	339	1813
Доля CD14 ⁺ гранулоцитов от гранулоцитов, %	27,21	0	0,9
Доля CD10 ⁺ гранулоцитов от гранулоцитов, %	20,4	6	50,1
Доля моноцитов от CD45 ⁺ клеток, %	9,31	1,1	7,4
Индекс гранулярности моноцитов	1,87	2,18	3,17
Индекс CD45 на моноцитах	3,12	0,86	2,06
Доля CD56 ⁺ моноцитов от моноцитов, %	43,88	3,9	46,5
СИФ CD33 на моноцитах, отн. ед.	1026	316	6394
СИФ CD64 на моноцитах, отн. ед.	1403	1208	4953
Лимфоидно-миелоидное соотношение	0,19	0,01	0,3
Паттерн «CD11b и CD13» гранулоцитов	аномальный	нормальный	
Паттерн «CD16 и CD13» гранулоцитов	нормальный	нормальный	
Паттерн «CD16 и CD11b» гранулоцитов	нормальный	нормальный	
Паттерн «CD11b и CD13» моноцитов	аномальный	нормальный	
Паттерн «CD11b и HLA-DR» моноцитов	аномальный	нормальный	
Паттерн «CD14 и CD36» моноцитов	аномальный	нормальный	

Примечание: *РИ – референсный интервал

Исходя из полученных данных, балл по шкале «Ogata» (Таблица 15) составил 3, по шкале «Wells» (Таблица 8) – 6 (основной балл – 4, дополнительный +2), по объединенной шкале «Ogata-Wells» (Таблица 9) поставлена оценка «С». Таким образом, результаты исследования КМ методом МПЦ согласуются с результатами других исследований и подтверждают диагноз.

3.3. Частота встречаемости цитометрических аберраций в компартменте ранних предшественников гемопоэза

Нами была проанализирована частота встречаемости аномальных иммунофенотипических признаков в компартменте ранних CD34⁺ и CD117⁺ клеток в различных группах пациентов с МДС и группе сравнения (Таблица 22). Значимых отличий не было определено только в частоте выявления повышенной доли CD56⁺CD34⁺ клеток, по всем остальным признакам были выявлены статистически достоверные отличия.

Повышенная доля CD56⁺ клеток от всех CD34⁺ миелоидных клеток отмечена в 37 случаях МДС (36,6%) из 101 (у одного пациента с МДС-МД достаточного количества CD34⁺ клеток для анализа получить не удалось) и встречалась преимущественно в группе МДС-МД. В группе сравнения повышенная доля CD56⁺CD34⁺ клеток наблюдалась у 23 пациентов (29,5%) из 78 (у 5 пациентов группы сравнения достаточного количества CD34⁺ клеток проанализировать не удалось): 4 (из 6) пациентов с АА, 7 (из 10) ПНГ, 2 (из 7) В12-ДА, 2 (из 16) ИТП, 1 (из 8) АИГА, 2 (из 4) ЛМЗ, 1 (из 2) пациентов с наследственной дизэритропоэтической анемией, 1 – с анемией Фанкони, 1 – с ВИЧ, 1 – с врожденным дискератозом, 1 – с наследственной микросфероцитарной гемолитической анемией.

Таблица 22 – Частота выявления аномальных цитометрических признаков в компартменте ранних предшественников гемопоэза

%	МДС с 5q-	МДС-ЛД	МДС-КС	МДС-МД	МДС-ИБ-1	МДС-ИБ-2	Группа сравнения	Р
n	7	4	13	30	26	22	83	-
Доля CD34 ⁺ миелоидных клетках от CD45 ⁺ клеток ≥2%	28,6	25,0	30,8	36,7	92,3	100,0	8,4	< 0,001
Доля CD34 ⁺ В-предшественников от CD34 ⁺ клеток < 5 %	85,7	50,0	69,2	70,0	100,0	90,9	37,3	< 0,001
Аномальный индекс CD45 на CD34 ⁺ миелоидных клетках*	57,1	25,0	15,4	31,0	57,7	68,2	14,1	< 0,001
Аномальная доля CD117 ⁺ от CD34 ⁺ миелоидных клеток*	0,0	0,0	30,8	51,7	61,5	81,8	16,7	< 0,001
Повышенная доля CD7 ⁺ от CD34 ⁺ миелоидных клеток*	100,0	25,0	53,8	62,1	15,4	22,7	19,2	< 0,001
Повышенная доля CD56 ⁺ от CD34 ⁺ миелоидных клеток*	14,3	25,0	15,4	51,7	34,6	18,2	29,5	0,143
Повышенная доля CD117 ⁺ от CD45 ⁺ клеток*	0,0	25,0	76,9	34,5	73,1	95,5	28,2	< 0,001
Аномальная экспрессия CD34 на CD34 ⁺ миелоидных клетках*	28,6	25,0	15,4	27,6	30,8	45,5	11,5	0,013
Аномальная экспрессия CD117 на CD34 ⁺ миелоидных клетках*	14,3	0,0	46,2	72,4	61,5	54,5	11,5	< 0,001

Примечание: * отмечены параметры, оцененные у 29 пациентов с МДС-МД и 78 пациентов группы сравнения, вследствие крайне низкого количества CD34⁺ клеток у 1 пациента МДС-МД и 5 пациентов группы сравнения.

По исследованиям зарубежных коллег частота выявления CD34⁺ миелоидных клеток с повышенной экспрессией CD56 была ниже. Так, в исследовании В. Керн с соавт. 2010 года аномальная ко-экспрессия CD56 при МДС встречалась только в 3,3% случаев, а в контрольной группе не встретилась ни у одного пациента [53]. Полученные отличия в частотах встречаемости аномальной экспрессии CD56 можно объяснить различиями в используемых

реагентах, настройках приборов, а также установленного порога аномальности. Так, в исследовании В. Керн с соавт. аномальным признавалось наличие CD56 на более 20% CD34⁺ миелоидных клеток, собственные референсные интервалы в данном исследовании не применяли.

Частота выявления доли CD34⁺ миелоидных клеток более 2% была выше у пациентов с МДС-КС (30,8%), МДС-МД (36,7%), МДС-ИБ-1 (92,3%) и МДС-ИБ-2 (100%), чем у пациентов группы сравнения (8,4%), при этом у пациентов с МДС-ИБ-1 и МДС-ИБ-2 она была выше, чем у пациентов с другими вариантами МДС (Рисунок 20А). Повышенная доля CD34⁺ миелоидных клеток отмечалась у 7 из 83 пациентов группы сравнения, из них 3 пациента – с В12-ДА, 1 – с β-талассемией, 1 – с ИТП и 2 – с гемолитическими анемиями.

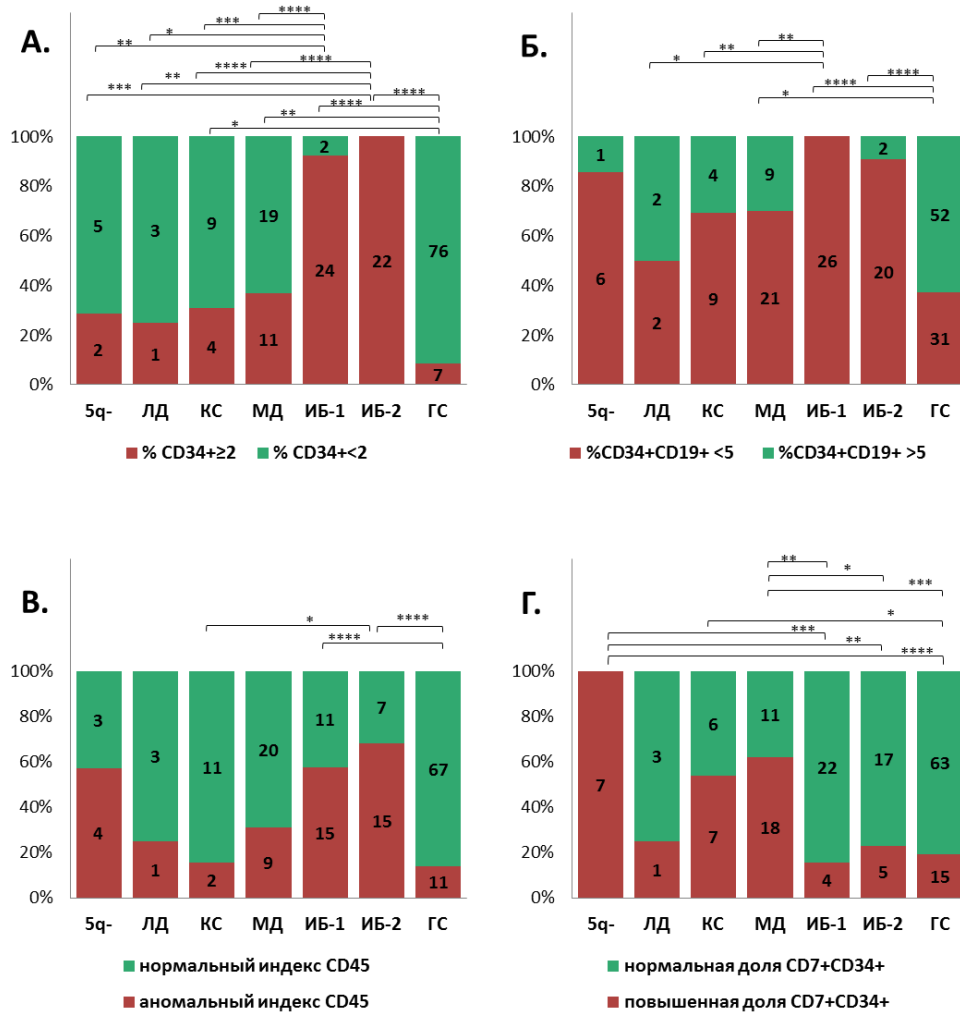


Рисунок 20 – Частоты встречаемости цитометрических aberrаций в компартменте ранних предшественников гемопоэза у пациентов с разными

вариантами МДС и у пациентов группы сравнения (ГС): А. – Распределение пациентов в зависимости от количества CD34⁺ миелоидных предшественников от всех CD45⁺ клеток; Б. – Распределение пациентов в зависимости от количества CD34⁺ В-клеточных предшественников от всех CD34⁺ клеток; В. – Распределение пациентов в зависимости от индекса CD45; Г. – Распределение пациентов в зависимости от доли CD7-положительных CD34⁺ миелоидных предшественников. Звездочками указано наличие достоверных отличий (**** – $p \leq 0,0001$; *** – $p \leq 0,001$; ** – $p \leq 0,01$; * – $p < 0,05$)

Доля CD34⁺ В-предшественников менее 5% чаще выявлялась у пациентов с МДС-МД (70,0%), МДС-ИБ-1 (100,0%) и МДС-ИБ-2 (90,9%), чем у пациентов группы сравнения (37,3%) (Рисунок 20Б). Аномальный индекс CD45 CD34⁺ миелоидных предшественников чаще обнаруживался у пациентов с МДС-ИБ-1 (57,7%), МДС-ИБ-2 (68,2%), чем у пациентов группы сравнения (14,1%), и чаще у пациентов с МДС-ИБ-2, чем при МДС-КС (15,4%) (Рисунок 20В). В исследовании В. Бардет с соавт. (2015), включившем 218 пациентов с МДС низкого риска (МДС-ЛД, МДС-МД, МДС-КС, МДС с 5q-), 128 пациентов высокого риска (МДС-ИБ-1 и МДС-ИБ-2), а также 253 пациентов контрольной группы (ЖДА, В12-ДА, аутоиммунные цитопении, АА и др), было получено, что частота выявления доли CD34⁺ миелоидных клеток более 2% составила 46% в группе МДС высокого риска, 12% в группе низкого риска и 2% в контрольной группе, что несколько меньше, чем частоты, полученные в нашем исследовании. В том же исследовании аномальный индекс CD45 миелоидных предшественников встретился в 40% МДС высокого риска, 33% МДС низкого риска и 14,4% контрольной группы. Частота доли CD34⁺ В-предшественников менее 5% в данном исследовании была наибольшей в группе МДС с избытком бластов (80%), при МДС низкого риска встречалась в 61%, в контрольной группе – в 38% [19], что соотносится с результатами нашего исследования.

Повышенная экспрессия CD7 на CD34⁺ миелоидных предшественниках отмечена в 42 случаях (41,6%) из 101 МДС и у 15 из (19,2%) 78 пациентов группы

сравнения (2 – В12-ДА, 1 – АА, 6 – ПНГ, 3 – ИТП, 1 – врожденный дискератоз, 1 – наследственная микросфероцитарная анемия, 1 – наследственная дизэритропоэтическая анемия).

Частота повышенной доли $CD7^+CD34^+$ клеток была наибольшей у пациентов с МДС с 5q- (100%). При сравнении других групп МДС была выше при МДС-КС (53,8%) и МДС-МД (62,1%), чем у пациентов с избытком бластных клеток (15,4% и 22,7%) (Рисунок 21Г).

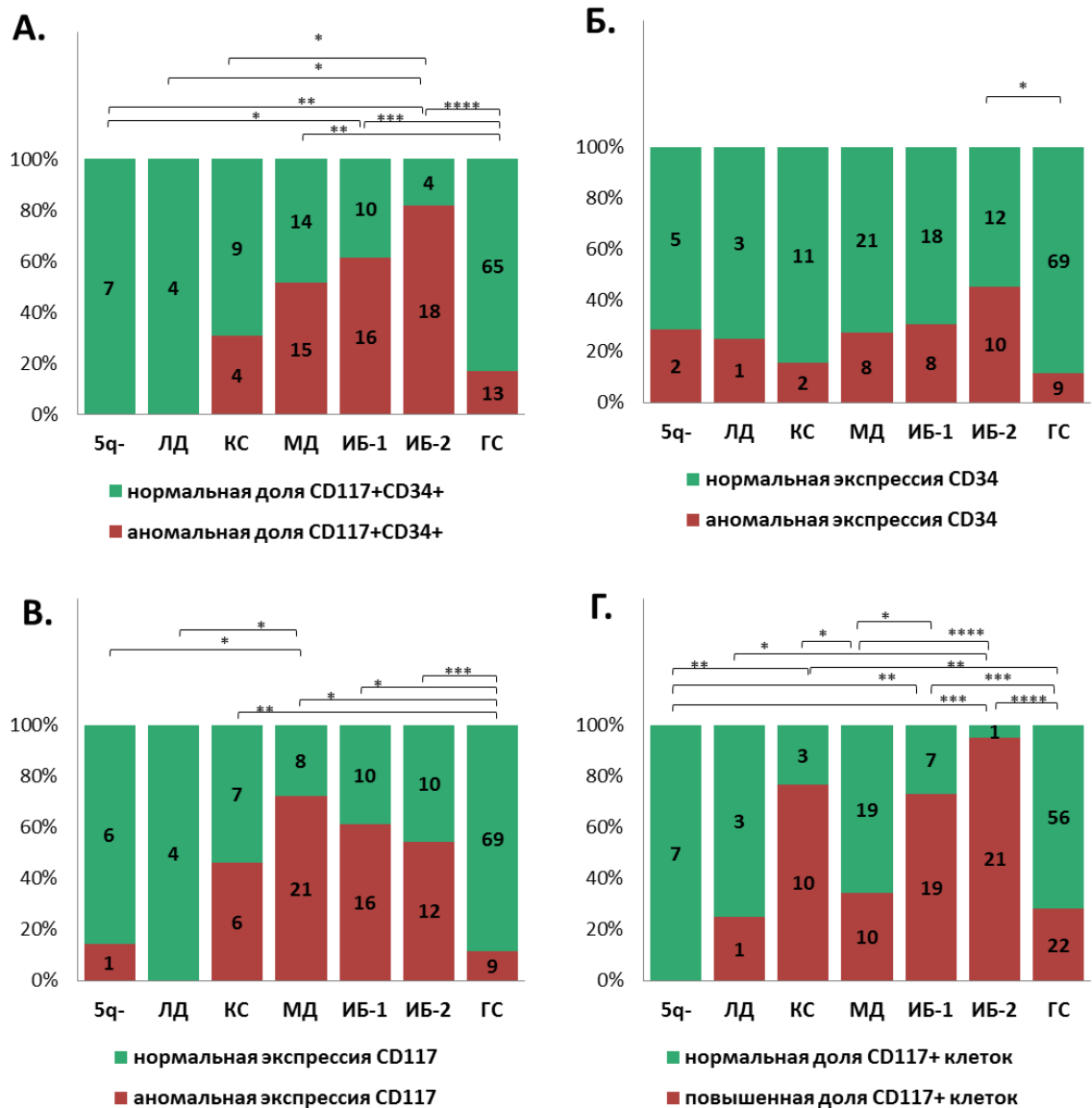


Рисунок 21 – Частоты встречаемости цитометрических aberrаций в компартменте ранних предшественников гемопоэза у пациентов с разными вариантами МДС и у пациентов группы сравнения (ГС): А. – Распределение

пациентов в зависимости от доли CD117-положительных CD34⁺ миелоидных предшественников; Б. – Распределение пациентов в зависимости от экспрессии CD34 на CD34⁺ клетках; В. – Распределение пациентов в зависимости от экспрессии CD117 на CD34⁺ клетках; Г. – Распределение пациентов в зависимости от доли CD117-положительных предшественников от всех CD45⁺ клеток. Звездочками указано наличие достоверных отличий (**** – $p \leq 0,0001$; *** – $p \leq 0,001$; ** – $p \leq 0,01$; * – $p < 0,05$)

В исследовании В. Керн с соавт. 2010 года аномальная ко-экспрессия CD7 при МДС встречалась только в 3,5% случаев, а в контрольной группе – в 0,5% [53]. В исследовании В. Бардет с соавт. 2015 года повышенная доля CD7⁺CD34⁺ клеток наблюдалась у 9% пациентов с МДС и 3,6% пациентов контрольной группы [19], в основном аномальная экспрессия CD7 обнаруживалась при МДС низкого риска (в 55%), что соотносится с данными нашего исследования. Однако следует учесть, что в исследовании В. Бардет с соавт. аномальным признавалось наличие CD7 на более 30% CD34⁺ миелоидных клеток, собственные референсные интервалы в данном исследовании не применяли [19].

Аномальная доля CD117⁺CD34⁺ клеток с более высокой частотой обнаруживалась у пациентов с МДС-ИБ-1 (61,5%) и МДС-ИБ-2 (81,8%), чем при других вариантах МДС и пациентов группы сравнения (16,7%) (Рисунок 21А).

Аномальная экспрессия CD34 и CD117 на CD34⁺ миелоидных клетках с большей частотой встречалась у пациентов с МДС с избытком бластных клеток, чем у пациентов группы сравнения (Рисунок 3.21Б, В). Повышенная доля CD117⁺ клеток не обнаруживалась у пациентов с МДС с 5q-, и ее частота была наибольшей у пациентов с МДС с избытком бластных клеток (73,1% и 95,5%) (Рисунок 21Г).

Таким образом, у пациентов со всеми вариантами МДС иммунофенотипические aberrации компартамента ранних предшественников встречались с большей частотой, чем у пациентов группы сравнения. При МДС с избытком бластных клеток доля пациентов с повышенным количеством CD34⁺

клеток (более 2% от CD45⁺ клеток) была выше, чем при других вариантах МДС. Повышенная доля CD7⁺ клеток среди CD34⁺ миелоидных предшественников чаще всего определялась при МДС с делецией 5q.

3.4. Частота встречаемости цитометрических аберраций в компартменте гранулоцитов

Нами была оценена частота встречаемости аномальных иммунофенотипических признаков в компартменте гранулоцитов у пациентов с МДС и пациентов группы сравнения (Таблица 23). Значимых отличий не было выявлено в частоте встречаемости сниженной доли гранулоцитов, аномального индекса CD45 и CD33 и аномальной экспрессии CD64 на гранулоцитах; для остальных параметров показаны достоверные отличия.

Таблица 23 – Частота выявления аномальных цитометрических признаков в компартменте гранулоцитов

%	МДС с 5q-	МДС-ЛД	МДС-КС	МДС-МД	МДС-ИБ-1	МДС-ИБ-2	группа сравнения	Р
n	7	4	13	30	26	22	83	-
Сниженная доля гранулоцитов	71,4	75,0	69,2	70,0	80,8	81,8	54,2	0,097
Индекс гранулярности гранулоцитов	85,7	25,0	30,8	16,7	53,8	45,5	3,6	< 0,001
Аномальный индекс CD45 на гранулоцитах	28,6	25,0	0,0	16,7	42,3	18,2	19,3	0,071
Повышенная доля CD56 ⁺ гранулоцитов	14,3	25,0	46,2	56,7	50,0	54,5	22,9	0,003
Аномальный индекс CD33*	0,0	0,0	0,0	18,5	18,2	29,4	14,9	0,469
Аномальный паттерн «CD13 и CD16»**	33,3	25,0	53,8	43,3	57,7	72,7	15,7	< 0,0001
Аномальный паттерн «CD11b и CD16»**	16,7	25,0	30,8	33,3	61,5	72,7	13,3	< 0,001
Аномальный паттерн «CD13 и CD11b»	0,0	50,0	53,8	40,0	57,7	81,8	16,9	< 0,001

Продолжение Таблицы 23

%	МДС с 5q-	МДС-ЛД	МДС-КС	МДС-МД	МДС-ИБ-1	МДС-ИБ-2	группа сравнения	р
Аномальная экспрессия CD33 на гранулоцитах*	0,0	0,0	0,0	3,7	18,2	35,3	1,4	< 0,001
Аномальная экспрессия CD64 на гранулоцитах	28,6	25,0	0,0	23,3	19,2	22,7	8,4	0,07
Повышенная доля CD14 ⁺ гранулоцитов	0,0	25,0	46,2	26,7	57,7	54,5	9,6	< 0,001
Сниженная доля CD10 ⁺ гранулоцитов	0,0	25,0	7,7	20,0	46,2	50,0	3,6	< 0,001

Примечание: * отмечены параметры, оцененные у 3 пациентов МДС-ЛД, 11 – МДС-КС, 27 – МДС-МД, 22 – МДС-ИБ-1, 17 – МДС-ИБ-2 и 74 пациентов группы сравнения, ** отмечены параметры, оцененные у 6 пациентов с МДС с 5q-.

Сниженный ИГ гранулоцитов обнаружился в 40 случаях (39,2%) из 102 МДС и 3 (3,6%) из 83 группы сравнения (1 – АА, 1 – ПНГ и 1 – лимфома из маргинальной зоны). Частота встречаемости сниженного ИГ гранулоцитов была достоверно выше у пациентов с МДС с 5q- (85,7%), МДС-КС (30,8%), МДС-ИБ-1 (53,8%) и МДС-ИБ-2 (45,5%) по сравнению с пациентами группы сравнения (3,6%). У пациентов с МДС-МД (16,7%) эта частота была ниже, чем у пациентов МДС с 5q- (85,7%) и МДС-ИБ-1 (53,8%) (Рисунок 22). В исследовании В. Бардет с соавт. (2015) сниженный ИГ гранулоцитов выявлялся у 11% пациентов контрольной группы, 49% МДС низкого риска и 55% МДС с избытком бластов, что сравнимо с результатами, полученными в нашей работе [19] (Таблица 23).

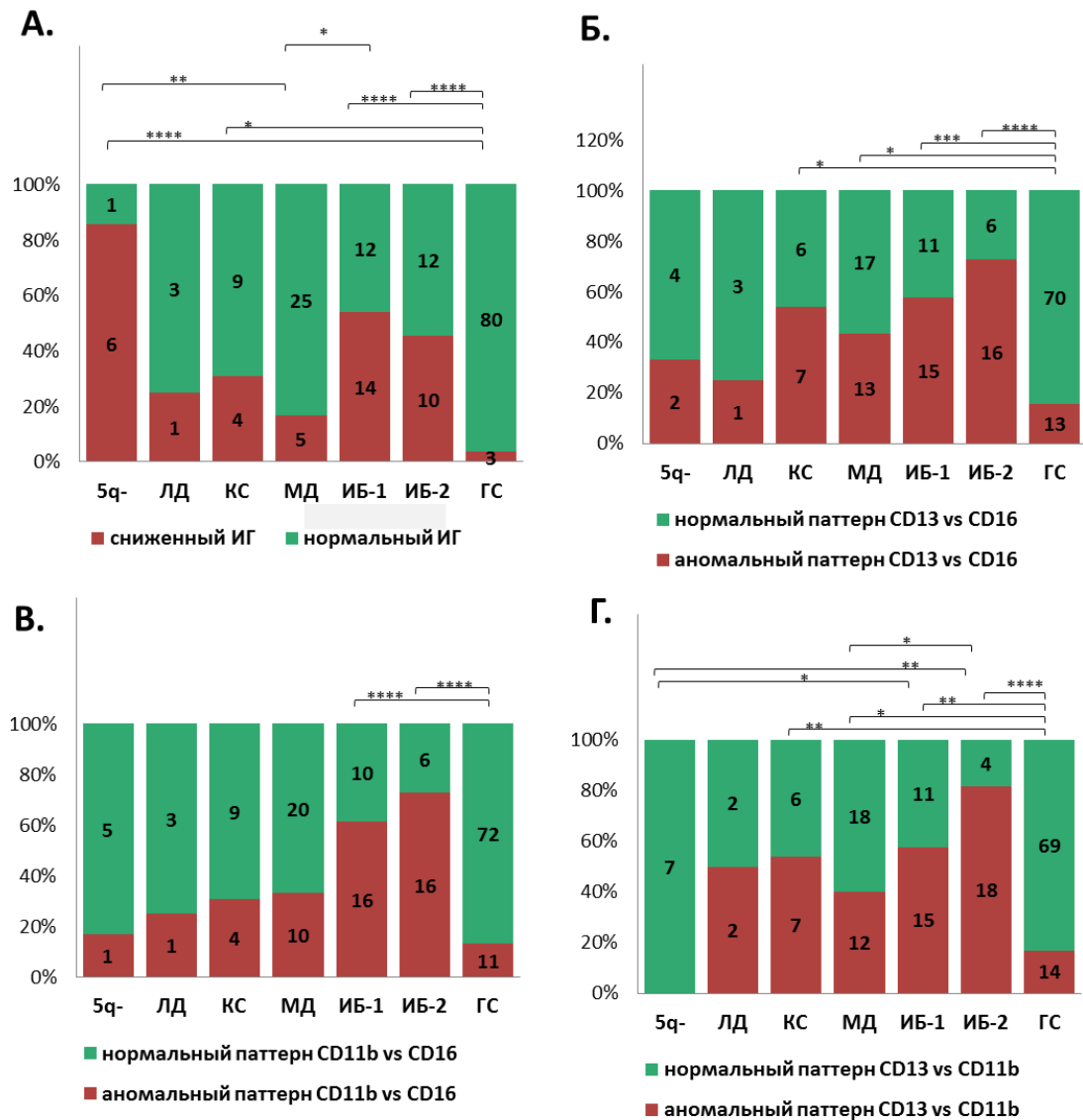


Рисунок 22 – Частоты встречаемости цитометрических аберраций в компартменте гранулоцитов у пациентов с разными вариантами МДС и группы сравнения (ГС): А. – Распределение пациентов в зависимости от ИГ гранулоцитов; Б. – Распределение пациентов в зависимости от паттерна созревания гранулоцитов «CD13 и CD16»; В. – Распределение пациентов в зависимости от паттерна созревания гранулоцитов «CD11b и CD16»; Г. – Распределение пациентов в зависимости от паттерна созревания гранулоцитов «CD13 и CD11b». Звездочками указано наличие достоверных отличий (**** – $p \leq 0,0001$; *** – $p \leq 0,001$; ** – $p \leq 0,01$; * – $p < 0,05$)

Частота обнаружения аномальных паттернов гранулоцитов была выше при МДС-КС, МДС-МД, МДС-ИБ-1 и МДС-ИБ-2, чем у пациентов группы сравнения (Рисунок 22Б–Г). У пациентов с МДС с 5q- аномальный паттерн «CD13 и CD11b» не выявлялся. Частота встречаемости аномального паттерна «CD13 и CD11b» была выше при МДС-ИБ-1 (81,8%), чем при МДС-МД (40,0%) (Рисунок 22Г).

В исследовании В. Керн с соавт. (2010) аномальный паттерн «CD13 и CD16» гранулоцитов обнаруживался в 42,9% группы пациентов с МДС и 9% контрольной группы, а аномальный паттерн «CD11b и CD16» – в 28% и 3,2%, соответственно [53]. А в исследовании Д. Вэллс с соавт. (2003) аномальный паттерн «CD13 и CD16» отмечался в 23% случаев МДС и 12% контрольной группы [94].

Повышенная доля CD56⁺ гранулоцитов чаще наблюдалась у пациентов с МДС-МД (56,7%), чем у пациентов группы сравнения (22,9%) (Рисунок 23А). В исследовании Д. Вэллс с соавт. 2003 года повышенная экспрессия CD56 на гранулоцитах обнаруживалась у 16% пациентов с МДС и в 8% случаев контрольной группы пациентов не с МДС, в том числе в 4% случаев АА [94]. В исследовании В. Керн с соавт. частота повышенной экспрессии CD56 на гранулоцитах составила 17,6% среди пациентов с МДС и 3,6% пациентов группы сравнения [53].

Частота обнаружения аномальной экспрессии CD33 выше при МДС-ИБ-2 (35,3%), чем у пациентов группы сравнения (1,4%) (Рисунок 23Б). Известно, что для маркера CD33 характерна высокая степень генетического полиморфизма, т.е. у здоровых лиц плотность экспрессии CD33 может варьировать в широких пределах [97]. Вероятно, с этим связана низкая частота выявляемости аномальной экспрессии CD33 у пациентов с МДС.

Повышенная доля CD14⁺ гранулоцитов чаще определялась при МДС-КС (46,2%), МДС-ИБ-1 (57,7%) и МДС-ИБ-2 (54,5%), чем у пациентов группы сравнения (9,6%), а у пациентов с МДС с 5q- данной аномалии выявлено не было (Рисунок 23В).

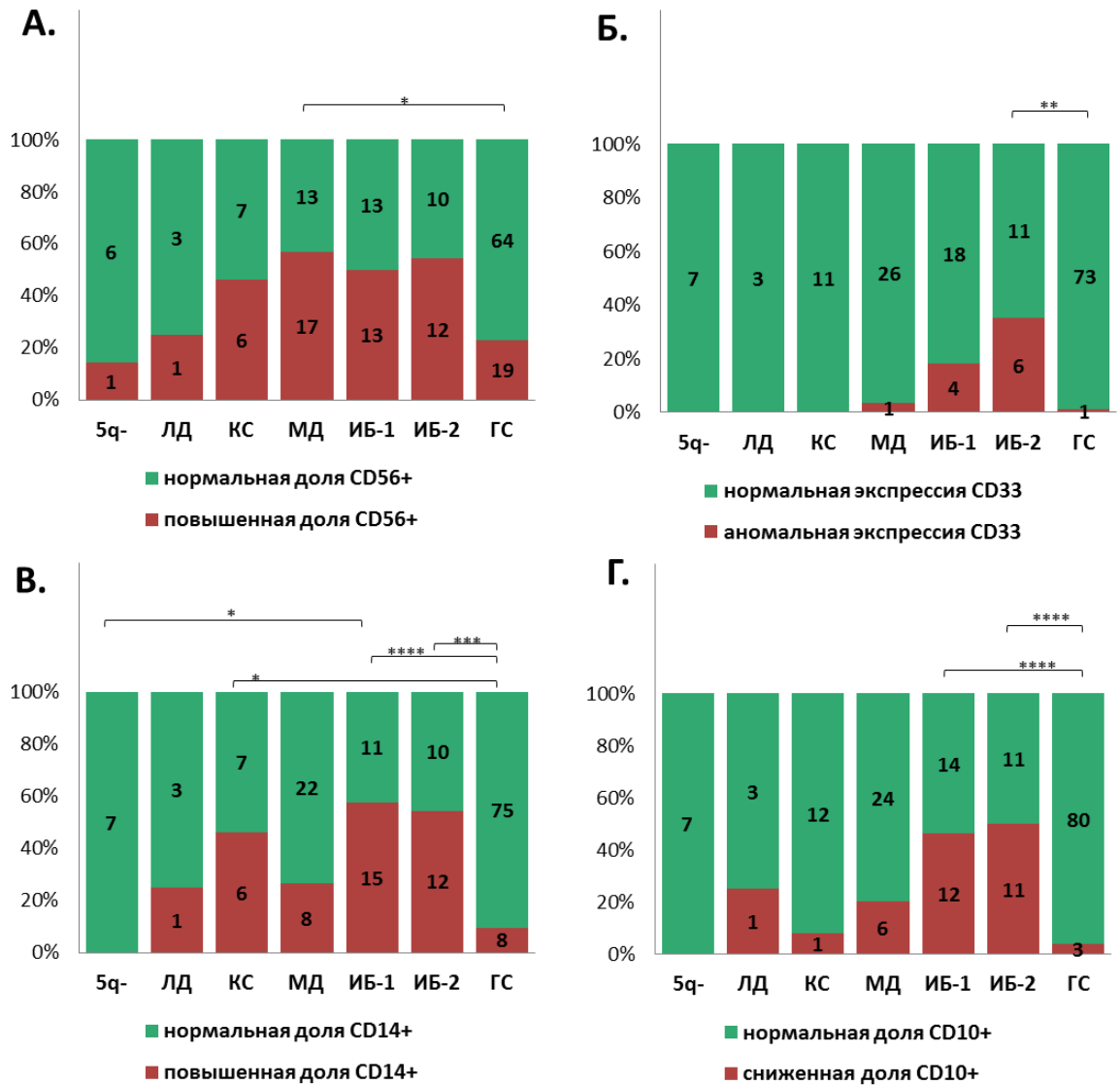


Рисунок 3.23 – Частоты встречаемости цитометрических aberrаций в компартменте гранулоцитов у пациентов с разными вариантами МДС и группы сравнения (ГС): А. – Распределение пациентов в зависимости от наличия повышенной доли CD56⁺ гранулоцитов; Б. – Распределение пациентов в зависимости от экспрессии CD33 на гранулоцитах; В. – Распределение пациентов в зависимости от наличия повышенной доли CD14⁺ гранулоцитов; Г. – Распределение пациентов в зависимости от наличия сниженной доли CD10⁺ гранулоцитов. Звездочками указано наличие достоверных отличий (**** – $p \leq 0,0001$; *** – $p \leq 0,001$; ** – $p \leq 0,01$; * – $p < 0,05$)

Однако, в исследовании Г. Киртивасан с соавт. (2014), наоборот, указывалось, что для МДС с 5q- характерна повышенная экспрессия CD14 на гранулоцитах [52]. С другой стороны, в работе К. Ченг с соавт. (2019) сообщалось, что среди 15 пациентов с МДС с 5q- чрезмерная экспрессия CD14 наблюдалась только в 2 случаях у пациентов, принимавших леналидомид, а повышенная доля гранулоцитов с коэкспрессией CD14 отмечалась при миелоидных неоплазиях с моносомией 7 хромосомы [30].

Частота обнаружения сниженной доли CD10⁺ гранулоцитов была выше у пациентов с МДС-ИБ-1 (46,2%) и МДС-ИБ-2 (50,0%), чем у пациентов группы сравнения (3,6%) (Рисунок 23Г).

В исследовании И. Лоранд-Метце с соавт. (2007) потеря экспрессии CD10 наблюдалась в 6% случаев МДС [60]. В исследовании Д.В. Чанг (2012) оценивали со-экспрессию CD10 и CD15, показав ее аномальность в 72,4% случаев МДС [33]. В исследовании А. Айрес с соавт. (2018), в котором в качестве материала использовалась периферическая кровь, экспрессия CD10 на нейтрофилах пациентов с МДС низкого риска (МДС-ЛД, МДС-КС, МДС-МД и МДС с 5q-) была ниже, чем в группе здоровых добровольцев ($p < 0,001$), а частота встречаемости сниженной экспрессии CD10 на гранулоцитах составила 64% [15].

Таким образом, сниженный индекс гранулярности встречался чаще практически при всех вариантах МДС (кроме МДС-ЛД и МДС-МД), чем у пациентов группы сравнения. Аномальные паттерны гранулоцитов и сниженная доля CD10⁺ гранулоцитов чаще обнаруживались у пациентов с МДС с избытком бластных клеток. Наиболее редко встречалась аномальная экспрессия CD33 на гранулоцитах.

3.5. Частота встречаемости цитометрических aberrаций в компартменте моноцитов

Нами была оценена частота встречаемости аномальных иммунофенотипических признаков в компартменте моноцитов у пациентов с

МДС и в группе сравнения (Таблица 24). Значимых отличий не было выявлено в частоте встречаемости повышенной доли моноцитов, аномального паттерна «CD36 и CD14» и аномальной экспрессии маркеров CD56, CD33 и CD64 на моноцитах; остальные параметры имеют статистически достоверные отличия.

Таблица 24 – Частота выявления аномальных цитометрических признаков в компартменте моноцитов

%	МДС с 5q-	МДС-ЛД	МДС-КС	МДС-МД	МДС-ИБ-1	МДС-ИБ-2	Группа сравнения	Р
n	7	4	13	30	26	22	83	-
Повышенная доля моноцитов	0,0	0,0	23,1	23,3	34,6	18,2	12,0	0,146
Сниженный индекс гранулярности моноцитов	14,3	25,0	23,1	16,7	34,6	54,5	14,5	0,009
Аномальный индекс CD45 на моноцитах	0,0	0,0	15,4	10,0	26,9	45,5	18,1	0,039
Повышенная доля CD56 ⁺ моноцитов	14,3	25,0	15,4	33,3	19,2	22,7	8,4	0,053
Аномальный паттерн «CD13 и CD11b»	16,7	50,0	23,1	30,0	50,0	35,0	16,9	0,032
Аномальный паттерн «CD36 и CD14»	16,7	33,3	44,4	13,6	33,3	33,3	12,1	0,056
Аномальный паттерн «CD11b и HLA-DR»	33,3	0,0	53,8	30,0	70,8	55,0	23,2	0,0005
Аномальная экспрессия CD33 на моноцитах	0,0	0,0	0,0	0,0	4,5	5,9	2,7	0,676
Аномальная экспрессия CD64 на моноцитах	14,3	25,0	0,0	16,7	23,1	36,4	13,3	0,112

Примечание: Паттерн «CD13 и CD11b» оценивали у 6 пациентов с МДС-5q-, 24 – МДС-ИБ-1, 20 – МДС-ИБ-2; паттерн «CD36 и CD14» оценивали у 6 с МДС-5q-, 3 – МДС-ЛД, 9 – МДС-КС, 22 – МДС-МД, 22 – МДС-ИБ-1, 18 – МДС-ИБ-2, 66 – группы сравнения; паттерн «CD11b и HLA-DR» оценивали у 6 с МДС-5q-, 24 – МДС-ИБ-1, 20 – МДС-ИБ-2 и 82 – группы сравнения; экспрессия CD33 оценивалась у 6 с МДС-5q-, 3 – МДС-ЛД, 11 – МДС-КС, 27 – МДС-МД, 22 – МДС-ИБ-1, 17 – МДС-ИБ-2 и 74 – группы сравнения.

Повышенная доля CD56⁺ моноцитов выявлена у 24 (23,5%) из 102 пациентов с МДС и у 7 (8,4%) из 83 пациентов группы сравнения (2 – ПНГ, 1 – ИТП, 2 – ЖДА, 1 – наследственная гемолитическая анемия). В исследовании Д.

Вэллс (2003) доля обнаруживаемой высокой экспрессии CD56 на моноцитах составила 17% у пациентов с МДС и 3% среди пациентов контрольной группы, а в исследовании В. Керн (2010) – 43,1% и 9,4%, соответственно [53, 94]. Таким образом, частота выявления аномальной экспрессии CD56 на моноцитах в разных исследованиях различается. Это может быть связано с одной стороны, с отличиями в применяемых реагентах, а с другой стороны, с составом контрольной группы. В исследовании В. Керн контрольную группу составляли пациенты с реактивными состояниями, а в исследовании Д. Вэллс – пациенты с апластической анемией, лимфомой Ходжкина, а также здоровые доноры [53, 94].

У пациентов с МДС-ИБ-2 частота выявления сниженного ИГ моноцитов была выше (54,5%), чем у пациентов группы сравнения (14,5%) (Рисунок 24А). Аномальный индекс CD45 моноцитов реже определялся при МДС-МД (10%), чем при МДС-ИБ-2 (45,5%) (Рисунок 24Б). Аномальный паттерн «CD13 и CD11b» моноцитов с более высокой частотой выявлялся у пациентов с МДС-ИБ-1 (50,0%), чем у пациентов группы сравнения (16,9%) (Рисунок 24В). Частота выявления аномального паттерна «CD11b и HLA-DR» была выше при МДС-ИБ-1 (70,8%), чем в группе сравнения (23,2%) (Рисунок 24Г).

В исследовании Д. Вэллс (2003) частота встречаемости аномального паттерна «CD11b и HLA-DR» у пациентов с МДС составила только 4% [94]. А в статье А. ван де Лосдрехт с соавт. (2008), указывалось, что цитометрические признаки дисмоноцитопоза удалось обнаружить в 92% МДС, которые в основном выражались в аномальном соотношении экспрессии CD14, CD36, CD11b и HLA-DR [58]. Однако в проведенной нами работе, частота выявляемых aberrаций в компартменте моноцитов была не такой высокой.

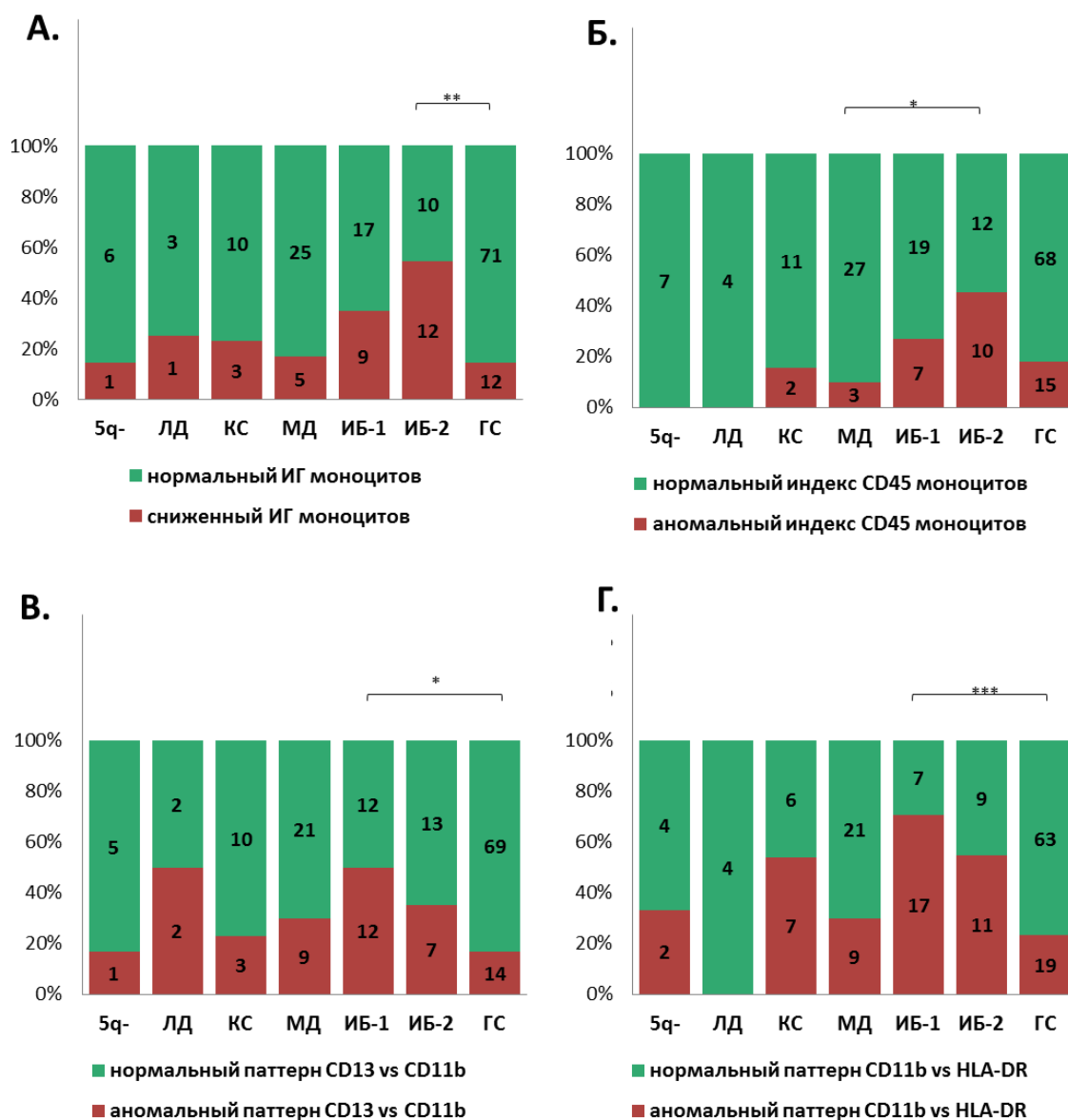


Рисунок 24 – Частоты встречаемости цитометрических aberrаций в компартменте моноцитов у пациентов с разными вариантами МДС и у пациентов группы сравнения: А. – Распределение пациентов в зависимости от индекса гранулярности моноцитов; Б. – Распределение пациентов в зависимости от индекса CD45; В. – Распределение пациентов в зависимости от паттерна «CD13 и CD11b»; Г. – Распределение пациентов в зависимости от паттерна «CD11b и HLA-DR». Звездочками указано наличие достоверных отличий (***) – $p \leq 0,001$; ** – $p \leq 0,01$; * – $p < 0,05$)

Таким образом, отличий в частотах иммунофенотипических аномалий моноцитов у пациентов с разными вариантами МДС и у пациентов группы сравнения было меньше, чем в компартменте ранних миелоидных предшественников и гранулоцитов.

3.6. Оценка дисмиелопоэза согласно цитометрическим шкалам

С учетом всех проанализированных цитометрических параметров у каждого пациента был определен балл по шкалам «Ogata score», «Wells» и «Ogata-Wells» (Таблица 25).

Таблица 25 – Результаты оценочных систем дисмиелопоэза методом проточной цитофлуориметрии у пациентов с МДС и группы сравнения

Параметры	МДС с 5q-	МДС-ЛД	МДС-КС	МДС-МД	МДС-ИБ-1	МДС-ИБ-2	группа сравнения
n	7	4	13	30	26	22	83
Медиана балла по шкале «Ogata score»	3	1	2	2	3	3	1
Медиана балла по шкале «Wells»	3	2,5	4	5	6	6,5	2
Доля пациентов с «Ogata score» < 2, %	14,3	50,0	46,2	36,7	7,7	4,5	90,4
Доля пациентов с «Ogata score» ≥ 2, %	85,7	50,0	53,8	63,3	92,3	95,5	9,6
Доля пациентов с низким баллом «Wells», %	0,0	25,0	7,7	0,0	0,0	0,0	38,6
Доля пациентов со средним баллом «Wells», %	57,1	50,0	15,4	30,0	7,7	0,0	43,4
Доля пациентов с высоким баллом «Wells», %	42,9	25,0	76,9	70,0	92,3	100,0	18,1
Доля пациентов с оценкой «А», %	14,3	50,0	15,4	26,7	0,0	0,0	86,7
Доля пациентов с оценкой «В», %	14,3	25,0	15,4	16,7	0,0	0,0	10,8
Доля пациентов с оценкой «С», %	71,4	25,0	69,2	56,7	100,0	100,0	2,4

У пациентов группы сравнения медиана балла по шкале «Ogata score» была ниже, чем у пациентов с МДС 5q-, МДС-МД, МДС-ИБ-1, МДС-ИБ-2, а у пациентов с МДС с избытком бластных клеток – выше, чем при МДС-КС и МДС-МД (Рисунок 25).

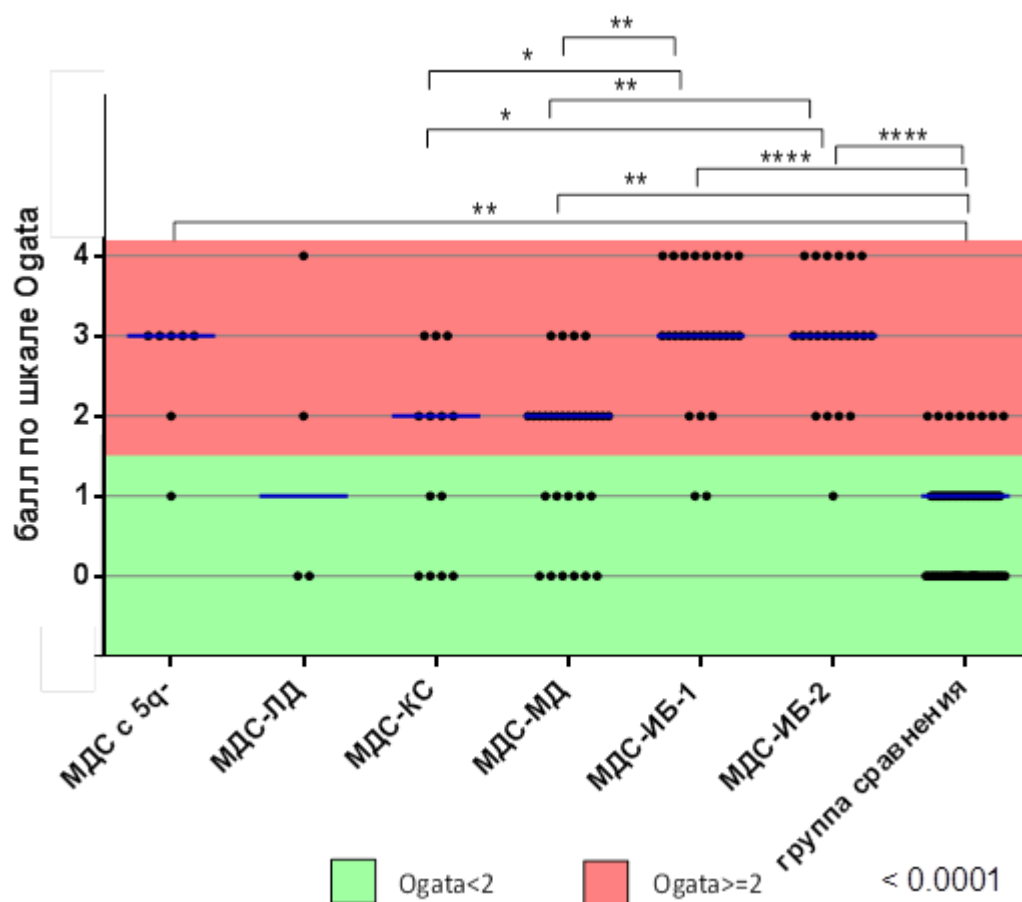


Рисунок 25 – Оценки по баллам «Ogata score», полученные при анализе костного мозга пациентов с разными вариантами МДС и пациентов группы сравнения. Горизонтальной синей чертой отмечена медиана. Звездочками указано наличие достоверных отличий (**** – $p \leq 0,0001$; ** – $p \leq 0,01$; * – $p < 0,05$)

Аналогичные данные были получены в других исследованиях. В исследовании А. Такеучи и соавт. (2019), включавшем 66 пациентов с МДС, доля пациентов с баллом ≥ 2 по шкале «Ogata score» также была выше среди МДС с избытком бластов. В этой работе распределение пациентов с разными вариантами МДС с баллом ≥ 2 было следующим: МДС-ЛД (40,0%; 4 из10); МДС-МД (50,0%; 5

из 10); МДС-КС (25,5%; 1 из 4); МДС-ИБ-1 (77,8%; 7 из 9); МДС-ИБ-2 (100,0%; 13 из 13); МДС с 5q- (33,3%; 2 из 6) [87]. А в работе В. Бардет с соавт. ≥ 2 баллов по шкале «Ogata score» имело 65% пациентов с МДС низкого риска, 88% МДС-ИБ-1, 94% МДС-ИБ-2 и 12% в контрольной группе [19].

Наибольшие медианы баллов по шкале «Wells» были у пациентов с МДС-ИБ-2 (6,5 балла) по сравнению с МДС-ЛД (2,5 балла), МДС-КС (4 балла) и МДС-МД (5 баллов), но у пациентов с МДС-КС, МДС-МД и МДС-ИБ-1 баллы были выше, чем у пациентов группы сравнения (2 балла) (Рисунок 26).

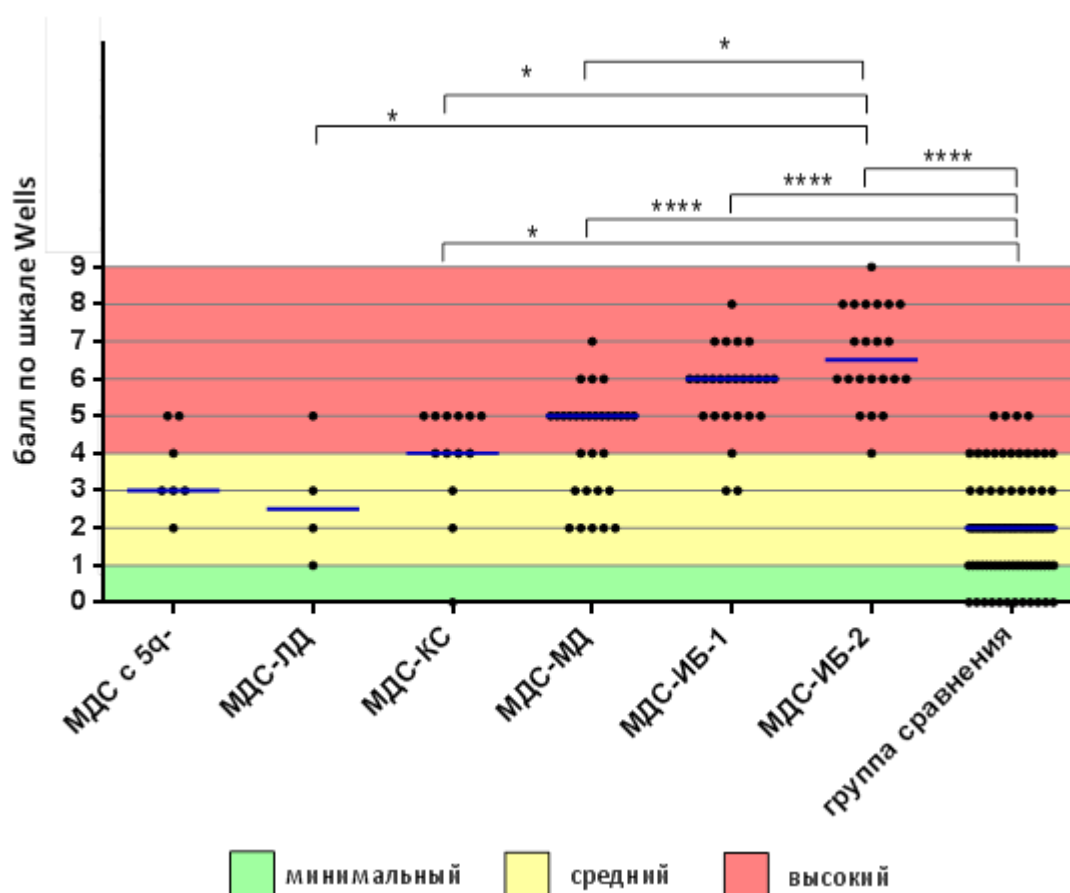


Рисунок 26 – Оценки по баллам «Wells», полученные при анализе костного мозга пациентов с разными вариантами МДС и пациентов группы сравнения. Горизонтальной синей чертой отмечена медиана баллов. Звездочками указано наличие достоверных отличий (**** – $p \leq 0,0001$; * – $p < 0,05$)

Полученные данные сопоставимы с результатами других исследований. В работе А. ван де Лосдрехт с соавт. (2008) медианы баллов по шкале «Wells» для

группы пациентов с РА и РАКС составила 3 балла, для РЦМД – 4 балла, РАИБ-1 – 7 баллов, РАИБ-2 – 6 баллов, в контрольной группе – 0 баллов [58]. В работе С. Чу с соавт. (2011) медиана балла по шкале «Wells» для пациентов с РА составила 1 балл, для РЦМД – 2 балла, РАИБ-1 – 3,5 балла и РАИБ-2 – 4 балла [32].

Среди пациентов с МДС оценка «А» по шкале «Ogata-Wells» была получена у 12,7% пациентов, «В» – 11,3%, «С» – 78,4%. Частота оценок «В» и «С» были выше при всех вариантах МДС, чем у пациентов группы сравнения. Однако у части пациентов с МДС с 5q-, МДС-ЛД, МДС-МД были выявлены оценки «А» в отличие от пациентов с МДС с избытком бластных клеток (Рисунок 27).

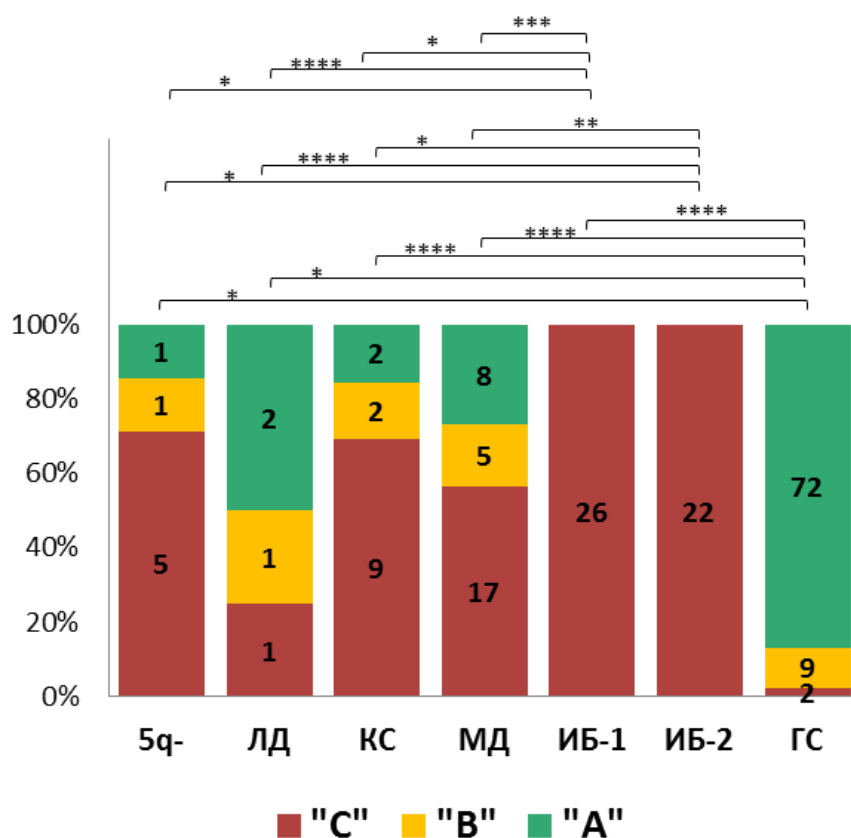


Рисунок 27 – Доли оценок «А», «В» и «С» по объединенной шкале «Ogata-Wells», полученные при анализе костного мозга пациентов с разными типами МДС и пациентов группы сравнения. Звездочками указано наличие достоверных отличий (**** – $p \leq 0,0001$; *** – $p \leq 0,001$; ** – $p \leq 0,01$; * – $p < 0,05$)

В исследовании Е.М.П. Кремерс и соавт. 2016 года, включавшем 101 пациента с МДС (2 пациента с МДС с 5q-, 5 - с рефрактерной цитопенией с

однолинейной дисплазией, 9 пациентов с РА с кольцевыми сидеробластами, 56 – РЦМД, 10 – РАИБ-1, 13 – РАИБ-2, 5 – с гипопластической формой МДС, 1 – МДС/ХМПЗ), оценка «А» по шкале «Ogata-Wells» была получена у 15% пациентов, «В» – 24%, «С» – 61% [35].

В группе сравнения оценка «А» была у 86,7% пациентов, «В» – у 10,8% «С» – у 2,4% (Таблица 25). В исследовании Е.М.П. Кремерс (2016) так же были получены оценки «В» (29%) и «С» (6%) в контрольной группе пациентов без МДС [35].

В проведенном нами исследовании оценка «В» была у 2 пациентов с АА, 4 пациентов с ПНГ, 1 – с В12-дефицитной анемией, 1 – с БГЛ и 1 – с лимфомой маргинальной зоны, а оценка «С» у 1 пациента с ПНГ и у 1 – с В12-дефицитной анемией.

Таким образом, частоты выявления 2-х и более аномальных параметров по шкале «Ogata score», а также высоких баллов по шкале «Wells» и оценок «В» и «С» по шкале «Ogata-Wells» были выше у пациентов с МДС по сравнению с пациентами без МДС, что соотносится с данными исследований зарубежных авторов. Далее будет проведена оценка диагностической значимости каждой из цитометрических шкал МДС.

3.7. Диагностическая значимость цитометрических оценочных шкал

Статистическими показателями эффективности диагностического теста являются клиническая чувствительность и специфичность. Чувствительность (истинно положительная пропорция) отражает долю положительных результатов, которые правильно идентифицированы как таковые. В контексте нашего исследования, чувствительность диагностического теста определения дисмиелопоэза методом МПЦ показывает вероятность того, что пациент с МДС будет классифицирован именно как пациент с МДС. Специфичность (истинно отрицательная пропорция) отражает долю отрицательных результатов, которые

правильно идентифицированы как таковые. То есть в нашем случае специфичность МПЦ будет отражать вероятность того, что пациент группы сравнения будет классифицирован как пациент без МДС.

Для оценки диагностической значимости оценочных шкал МДС «Ogata score», «Wells» и «Ogata-Wells» и расчета оптимального порогового балла проводили ROC-анализ. Качество теста было охарактеризовано путем расчета показателя площади под ROC-кривой AUC (Area Under Curve). Наибольшим значением AUC обладала шкала «Ogata-Wells» и составила 0,911, у шкалы «Wells» AUC составила 0,904, а у шкалы «Ogata score» 0,864 (Рисунок 28А).

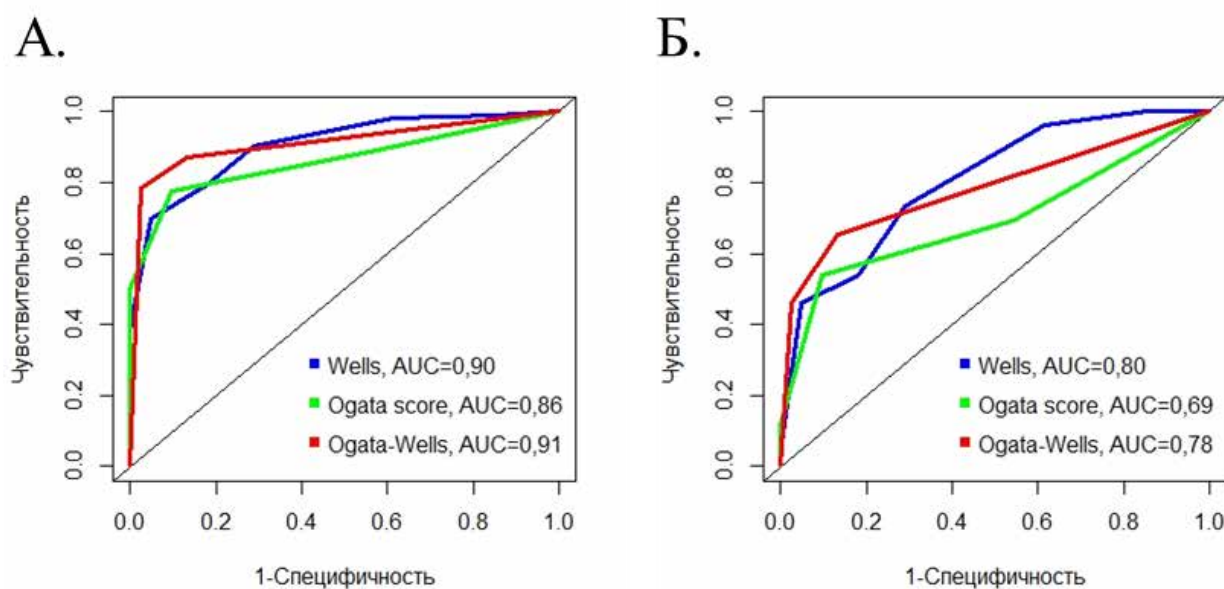


Рисунок 28 – ROC-кривые для баллов, полученных по шкалам «Ogata score», «Wells» и «Ogata-Wells»: А. с учетом всех пациентов с МДС; Б. с учетом пациентов с МДС без кольцевых сидеробластов, избытка бластов и типичных для МДС цитогенетических аномалий

Оптимальным пороговым уровнем для разграничения МДС и не МДС по шкале «Ogata score» был определен суммарный балл 2 с чувствительностью 77% и специфичностью 90% (Рисунок 29А), для шкалы «Wells» – балл 4 с чувствительностью 79% и специфичностью 82% (Рисунок 29Б). Для шкалы

«Ogata-Wells» оптимальным пороговым уровнем была оценка «В» с чувствительностью 87,3% и специфичностью 87,6% (Рисунок 29В).

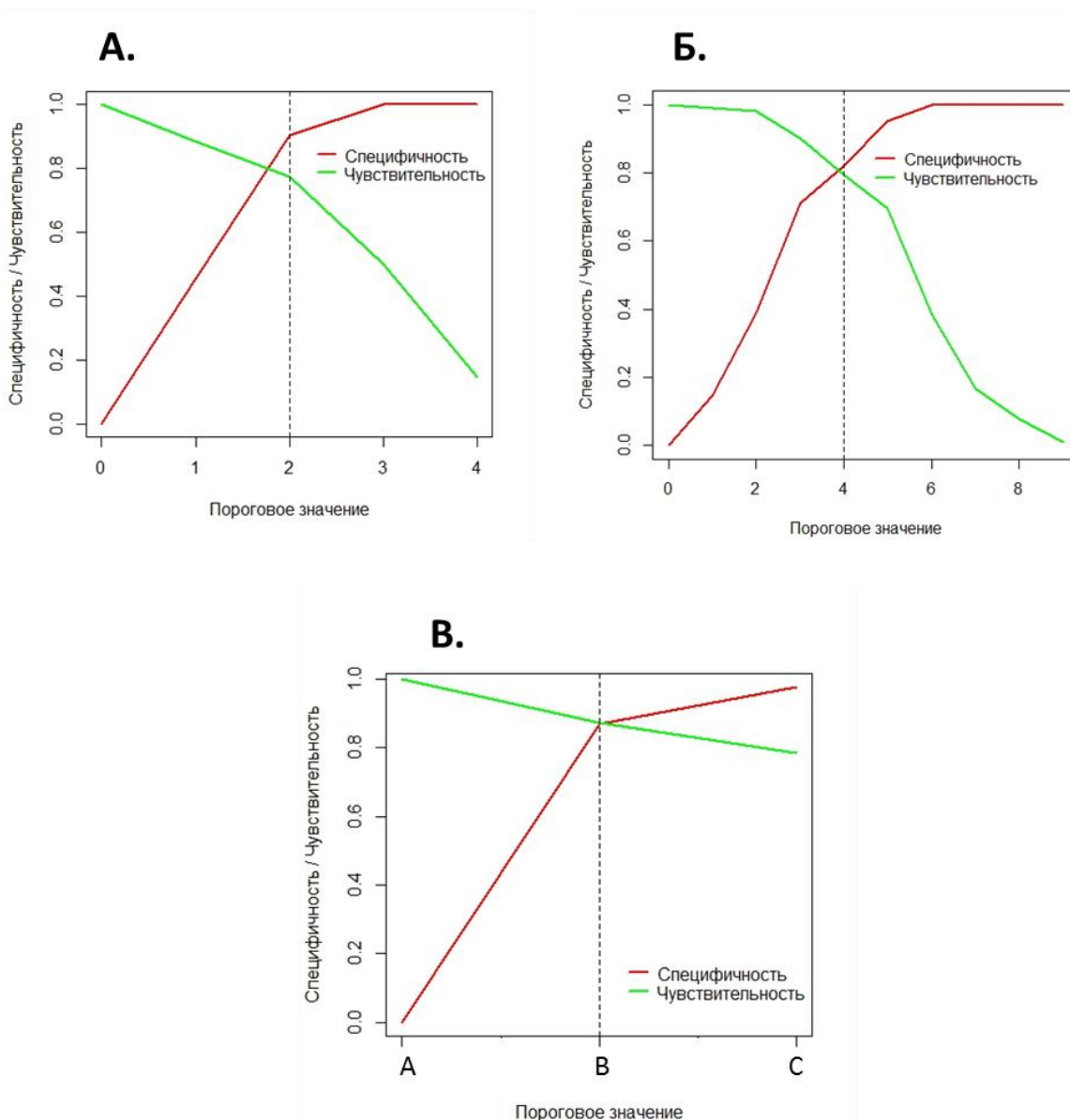


Рисунок 29 – Оптимальные пороговые значения по шкалам «Ogata score» (А), «Wells» (Б) и «Ogata-Wells» (В)

По исследованию А. Такеучи 2019 года, включавшем 60 случаев МДС (МДС-ЛД – 10, МДС-МД – 10, МДС-КС – 4, МДС-ИБ-1 – 9, МДС-ИБ-2 – 13, МДС с 5q- – 6 и неклассифицируемый МДС – 5, МДС/ХМПЗ – 3) и 177

исследований контрольной когорты пациентов (не с МДС) чувствительность и специфичность составили 58% и 83%, соответственно [87]. Эти показатели уступают показателям чувствительности и специфичности, полученным в нашем исследовании (77% и 90%, соответственно), что, вероятно, объясняется некоторыми различиями в цитометрическом анализе данных: А. Такеучи и соавт. для выявления CD34⁺ В-клеточных предшественников не использовали антиген CD19, а для индекса CD45 использовали референсный интервал от 4 до 7,5, указанный в исследовании К. Огата с соавт. 2009 года, а не собственный. Однако, как указывалось ранее, референсные интервалы для оценки экспрессии CD45 на миелобластах могут немного отличаться в зависимости от используемых флюорохромов и настроек приборов [57]. Можно так же предположить, что цитометрические, так же как и цитоморфологические аномалии при МДС могут отличаться между этническими группами [66, 72].

Шкала «Wells» в большинстве исследований описывается как прогностическая, однако, определив оптимальный пороговый балл, ее можно применять для диагностики МДС. В нашем исследовании пороговый балл 4 с чувствительностью и специфичностью 79% и 82%, соответственно, был определен как оптимальный. В исследовании Д. Вэллс и соавт. (2003) оптимальным пороговым был выбран балл 2 с чувствительностью 70% и специфичностью 93%. Полученные различия в пороговом балле, специфичности и чувствительности связаны с тем, что нами оценивались цитометрические параметры, которые не анализировались в работе Д. Вэллс и соавт. (2003) [94]: паттерны гранулоцитов «CD11b и CD16», «CD13 и CD11b», экспрессия CD14 и CD10 на гранулоцитах, паттерн «CD14 и CD36» и экспрессия CD64 на моноцитах.

Результаты анализа, оцененные как «В» или «С» по шкале «Ogata-Wells» свидетельствовали о наличии МДС с чувствительностью 87% и специфичностью 87%. Однако в работе Е.М.П. Кремерс и соавт. свидетельством наличия МДС считали только оценку «С» с чувствительностью 61% и специфичностью 94% [34, 35].

Наибольшие трудности в диагностике вызывают случаи МДС без избытка бластных клеток, кольцевых сидеробластов и типичных для МДС цитогенетических аномалий (Таблица 5). В нашей выборке пациентов с МДС было 26 таких случаев (3 МДС-ЛД, 23 МДС-МД, 19 из них с нормальным кариотипом, 3 случая – с потерей Y-хромосомы, 1 – del(20q), 1 - del(1q), 1 – t(2;3), 1 – с трисомией 8 хромосомы). В результате проведенного ROC-анализа AUC у шкалы «Ogata-Wells» составила 0,783, «Wells» - 0,803, а «Ogata score» – 0,693 (Рисунок 28Б). С учетом вычисленных ранее пороговых значений чувствительность шкал «Ogata score» и «Wells» составила 53,8% (Рисунок 30А,Б), а «Ogata-Wells» - 65,4% (Рисунок 30В) для таких пациентов. Распределение баллов в данной группе пациентов представлено на Рисунке 30.

У пациентов же с наличием избытка бластов и/или $\geq 15\%$ кольцевых сидеробластов, и/или типичных цитогенетических аномалий чувствительность шкал «Ogata score», «Wells» и «Ogata-Wells» составили 85,5%, 88,2% и 94,7%, соответственно.

Итак, в выборке пациентов с МДС без типичных морфологических и цитогенетических признаков МДС чувствительность и специфичность шкалы «Ogata score» составили 53,8% и 90,4%, соответственно. В исследовании К. Огата с соавт. (2009), включавшем 134 пациента с МДС без избытка бластных клеток (81 – без кольцевых сидеробластов и цитогенетических аномалий), чувствительность также была невысока и составила 30,8% и 67,3% для когорт из Японии и Италии, соответственно [72].

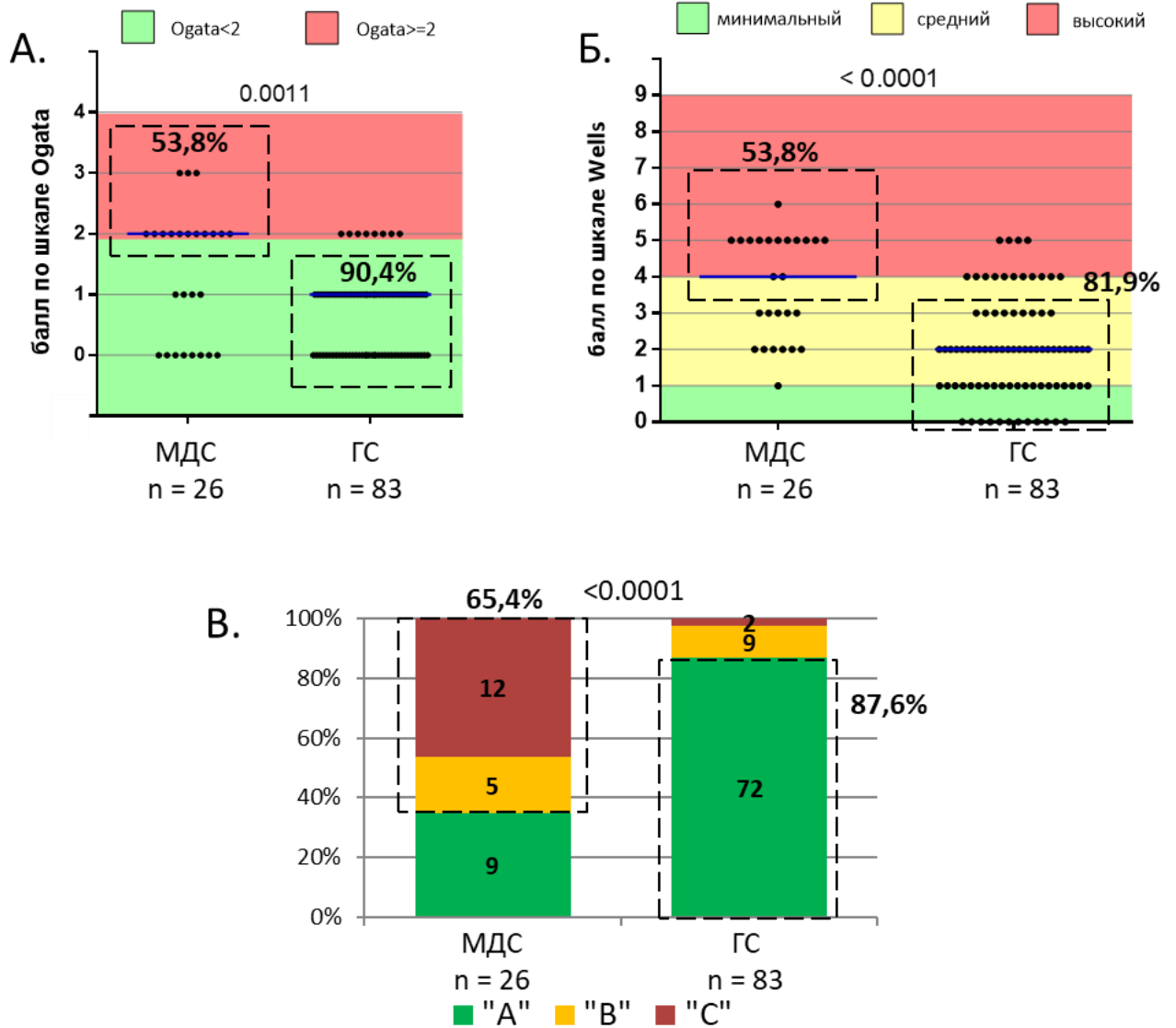


Рисунок 30 – Распределение баллов, а также чувствительность и специфичность цитометрических шкал, полученных в случаях МДС без избытка бластных клеток, сидеробластов и типичных цитогенетических аномалий, с учетом группы сравнения (ГС): А. шкала «Ogata score»; Б. шкала «Wells»; В. шкала «Ogata-Wells»

Таким образом, специфичность шкал «Ogata score», «Wells» и «Ogata-Wells» составила 90%, 82% и 88%, соответственно. Во всей когорте пациентов МДС чувствительность шкал «Ogata score», «Wells» и «Ogata-Wells» высокая и составила 77%, 79% и 87%, соответственно. Однако в группе пациентов с МДС, вызывающей наибольшие диагностические трудности (без избытка бластных

клеток, кольцевых сидеробластов и типичных цитогенетических аномалий) чувствительность шкал «Ogata score», «Wells» снижается до 54%. В этой группе МДС наибольшей чувствительностью (65%) обладала шкала «Ogata-Wells».

3.8. Сопоставление цитометрических шкал дисмиелопоэза с результатами цитогенетического исследования

МДС были разделены на 4 группы: МДС с нормальным кариотипом ($n=47$), с делецией длинного плеча 5 хромосомы (в сочетании с любой другой абберацией, кроме -7 или $del(7q)$) ($n=13$), с типичными (Таблица 5) для МДС абберациями ($n = 23$, из них с моносомией 7 или $del(7q) - 9$; $del(13q) - 1$; изохромосомой 17 - 1; $t(3;21) - 2$; $t(1;3) - 1$; с комплексным кариотипом - 9) и с неспецифичными для МДС абберациями ($n = 16$, из них с потерей Y-хромосомы - 4; трисомией 8 - 3; трисомией 13 - 1; трисомией 16 - 1; $del(20q) - 3$; $del(17p) - 1$, $del(1q) - 1$; $t(1;7) - 1$, $t(2;3) - 1$). Каждая из этих групп также была разделена на МДС с избытком бластных клеток и без избытка бластных клеток.

Медианы баллов по шкале «Ogata score» были выше при МДС с избытком бластных клеток, чем без избытка у больных МДС с нормальным кариотипом (3 против 1,5, $p < 0,001$), с типичными абберациями (3 против 1,5, $p < 0,05$) и МДС с неспецифичными абберациями (3 против 2, $p < 0,001$). В случаях МДС без избытка бластов в группе нормального кариотипа медиана «Ogata score» была меньше, чем в группе $del(5q)$ (3 против 1,5, $p < 0,05$) (Рисунок 31).

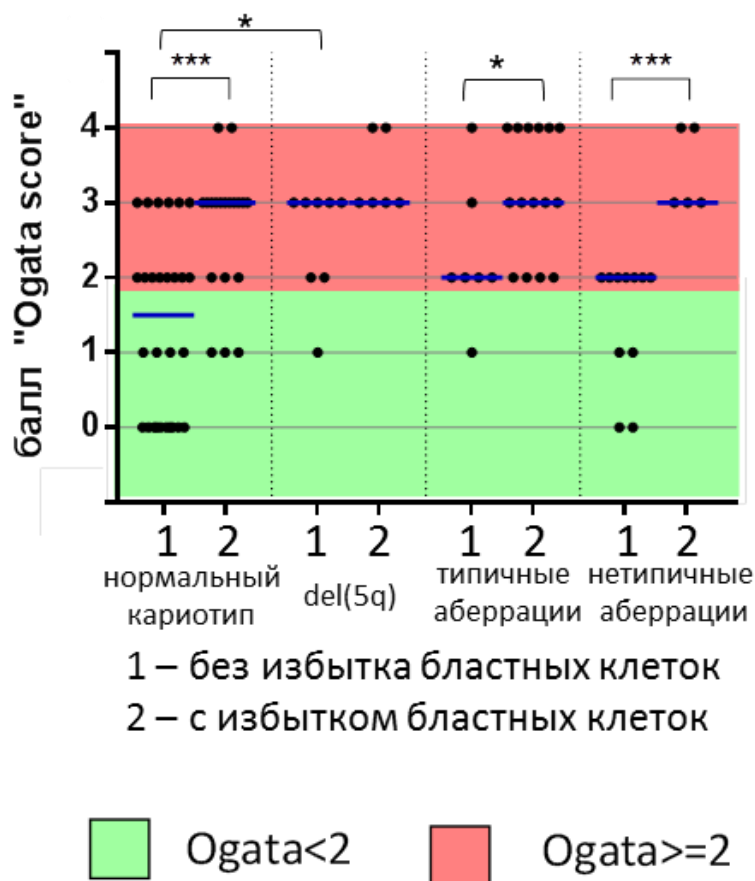


Рисунок 31 – Баллы по шкале «Ogata score» в зависимости от наличия или отсутствия цитогенетических aberrаций и избытка бластных клеток у пациентов с МДС. Горизонтальной синей чертой показана медиана. Звездочками указано наличие достоверных отличий (***) – $p \leq 0,001$; * – $p < 0,05$)

По шкале «Wells» баллы были выше в группе с избытком бластов, чем без, при МДС с нормальным кариотипом (6 против 4,5, $p < 0,0001$), с del(5q) (6 против 3, $p < 0,001$) и с неспецифичными aberrациями (6 против 4, $p < 0,001$). В группе МДС с типичными aberrациями без избытка бластных клеток медиана «Wells» была выше, чем при МДС с нормальным кариотипом (5 против 4,5; $p < 0,05$) (Рисунок 32).

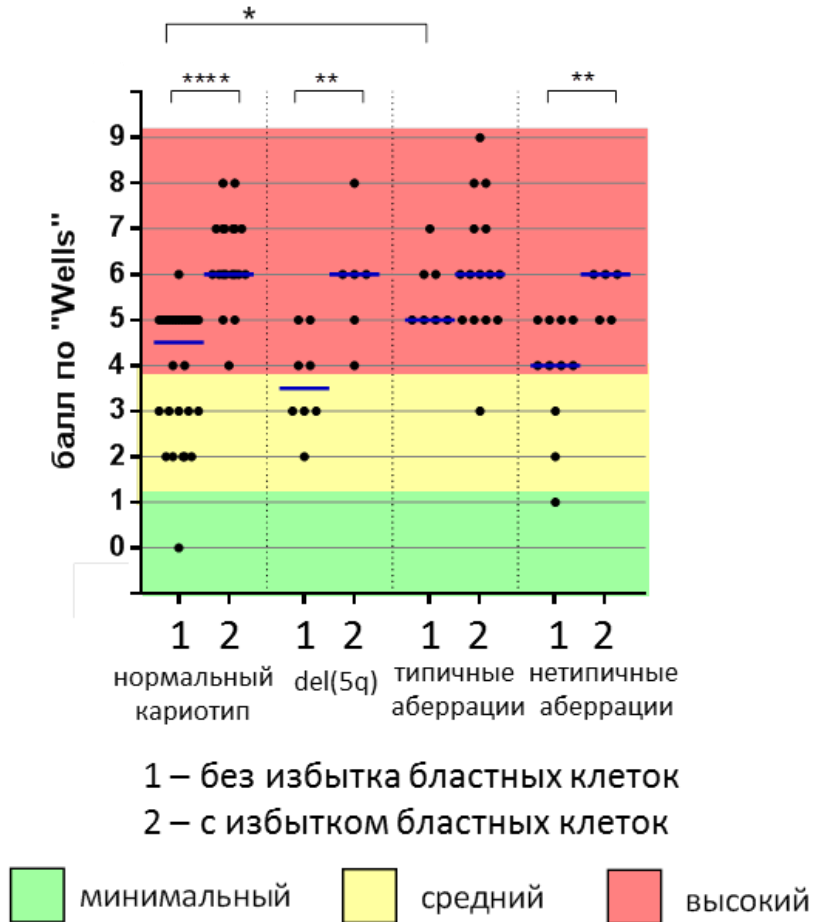


Рисунок 32 – Баллы по шкале «Wells» в зависимости от наличия или отсутствия цитогенетических aberrаций и избытка бластных клеток у пациентов с МДС. Горизонтальной синей чертой показана медиана. Звездочками указано наличие достоверных отличий (**** – $p \leq 0,0001$; ** – $p \leq 0,01$; * – $p < 0,05$)

Частоты оценок по шкале «Ogata-Wells» достоверно отличались только в группе МДС с нормальным кариотипом в зависимости от наличия избытка бластов (Рисунок 33).



Рисунок 33 – Частоты оценок по шкале «Ogata-Wells» в зависимости от наличия или отсутствия цитогенетических aberrаций и избытка бластных клеток у пациентов с МДС. Звездочками указано наличие достоверных отличий (** – $p \leq 0,01$)

Нами были изучены особенности цитометрических параметров (Таблица 26) и частоты встречаемости цитометрических аномалий в компартментах гранулоцитов и моноцитов в группах МДС с разным кариотипом в зависимости от наличия избытка бластных клеток.

Таблица 26 – Цитометрические параметры у пациентов с МДС в зависимости от цитогенетических aberrаций и наличия избытка бластных клеток

Показатель (медиана)	избыток бластов	нормальный кариотип	p	del(5q)	p	другие типичные aberrации	p	неспецифичные aberrации	p	p
n	нет	28	-	7	-	8	-	11	-	-
	есть	19		6		15		5		-
Компартмент ранних предшественников										
% CD34 ⁺ миелобластов	нет	1,12	<0,001	0,88	0,005	2,095	0,001	1,17	0,001	0,349
	есть	9,22		6,12		8,4		6,61		0,330
% В-клеточных предшественников	нет	2	0,002	0,3	0,38	0,25	0,91	2,5	0,034	0,05
	есть	0,1		0,05		0,1		0		0,920
индекс CD45 CD34 ⁺ миелобластов	нет	6,37	0,012	5,54	0,36	6,58	0,08	6,17	0,05	0,133
	есть	8,01		6,36		5,37		4,98		0,001
%CD7 ⁺ от CD34 ⁺ миелобластов	нет	12,7	0,005	23,7	0,022	23,1	0,0003	18	0,208	0,04
	есть	2,1		13,45		3,8		1		0,299
%CD56 ⁺ от CD34 ⁺ миелобластов	нет	1,2	0,005	0,3	0,26	1,1	0,25	0,3	0,39	0,103
	есть	0,2		1,7		0,4		4,3		0,380
%CD117 ⁺ от CD34 ⁺ миелобластов	нет	83,8	<0,001	91,7	0,60	89,5	0,42	83,2	0,026	0,137
	есть	95,9		85,25		94,7		95		0,390
%CD117 ⁺ от CD45 ⁺ клеток	нет	4,85	<0,001	1,93	0,17	11,49	0,179	6,57	0,27	0,014
	есть	17,17		8,19		12,83		9,64		0,075
Компартмент гранулоцитов										
% гранулоцитов	нет	62,1	0,027	55,6	0,70	45,45	0,41	63,1	0,07	0,017
	есть	45,4		60,8		32		43,1		0,150
ИГ гранулоцитов	нет	7	0,6	5,12	0,27	6	0,98	7	0,03	0,005
	есть	6,4		4,9		6,3		4,57		0,008
%CD56 ⁺ от гранулоцитов	нет	2,45	0,19	1,1	0,008	10,10	0,35	1,5	0,36	0,078
	есть	1,6		9,8		2,7		4		0,05
Компартмент моноцитов										
% моноцитов	нет	4,6	0,006	4,5	0,81	4,9	0,58	3,8	0,068	0,570
	есть	1,9		4,1		7,2		7,9		0,006
ИГ моноцитов	нет	2,4	0,67	2,21	0,35	2,37	0,047	2,36	0,12	0,750
	есть	2,38		2,18		2,07		2,28		0,040
%CD56 ⁺ моноцитов	нет	36,95	0,25	19,40	0,36	43,35	0,15	27,3	0,14	0,19
	есть	24,1		29,9		24,3		9,8		0,720

Вне зависимости от наличия и вида цитогенетических aberrаций доля CD34⁺ миелоидных предшественников была выше в случае избытка бластных клеток (Таблица 26). Нормальное количество CD34⁺ В-клеточных предшественников встречалось преимущественно при МДС с нормальным

кариотипом и с неспецифичными для МДС абберациями без избытка бластных клеток (Таблица 26, Рисунок 34А). Индекс CD45⁺ CD34⁺ миелоидных предшественников при МДС с нормальным кариотипом и избытком бластных клеток (медиана 8,01) был выше, чем при МДС с нормальным кариотипом без избытка бластных клеток (медиана 6,37), МДС с типичными (медиана 5,37) и неспецифичными абберациями (медиана 4,98) и избытком бластных клеток (Таблица 26, Рисунок 34Б). В группах МДС с нормальным кариотипом, del(5q) и типичными абберациями доля CD7⁺ клеток от CD34⁺ миелоидных предшественников была выше в случае отсутствия бластных клеток по сравнению с МДС с избытком бластов (Таблица 26, Рисунок 34В). Доля CD56⁺ от CD34⁺ миелоидных предшественников была выше при МДС с нормальным кариотипом без бластных клеток, чем с нормальным кариотипом с избытком бластных клеток (медиана 1,2% против 0,2%, $p = 0,005$) (Таблица 26, Рисунок 34Г). Доля CD117⁺ клеток от CD34⁺ миелоидных предшественников выше при МДС с избытком бластов, чем без в группах с нормальным кариотипом (95,9% против 83,8%, $p < 0,001$) и неспецифичными для МДС абберациями (95% против 83,2%, $p = 0,026$). Доля CD117⁺ клеток от CD45⁺ клеток в группе с нормальным кариотипом была выше при МДС с избытком бластных клеток, чем без (17,17% против 4,85%, $< 0,001$), а в группе без избытка бластных клеток при наличии del(5q) меньше, чем при типичных абберациях (1,93% против 11,49%, $p < 0,05$) (Таблица 26).

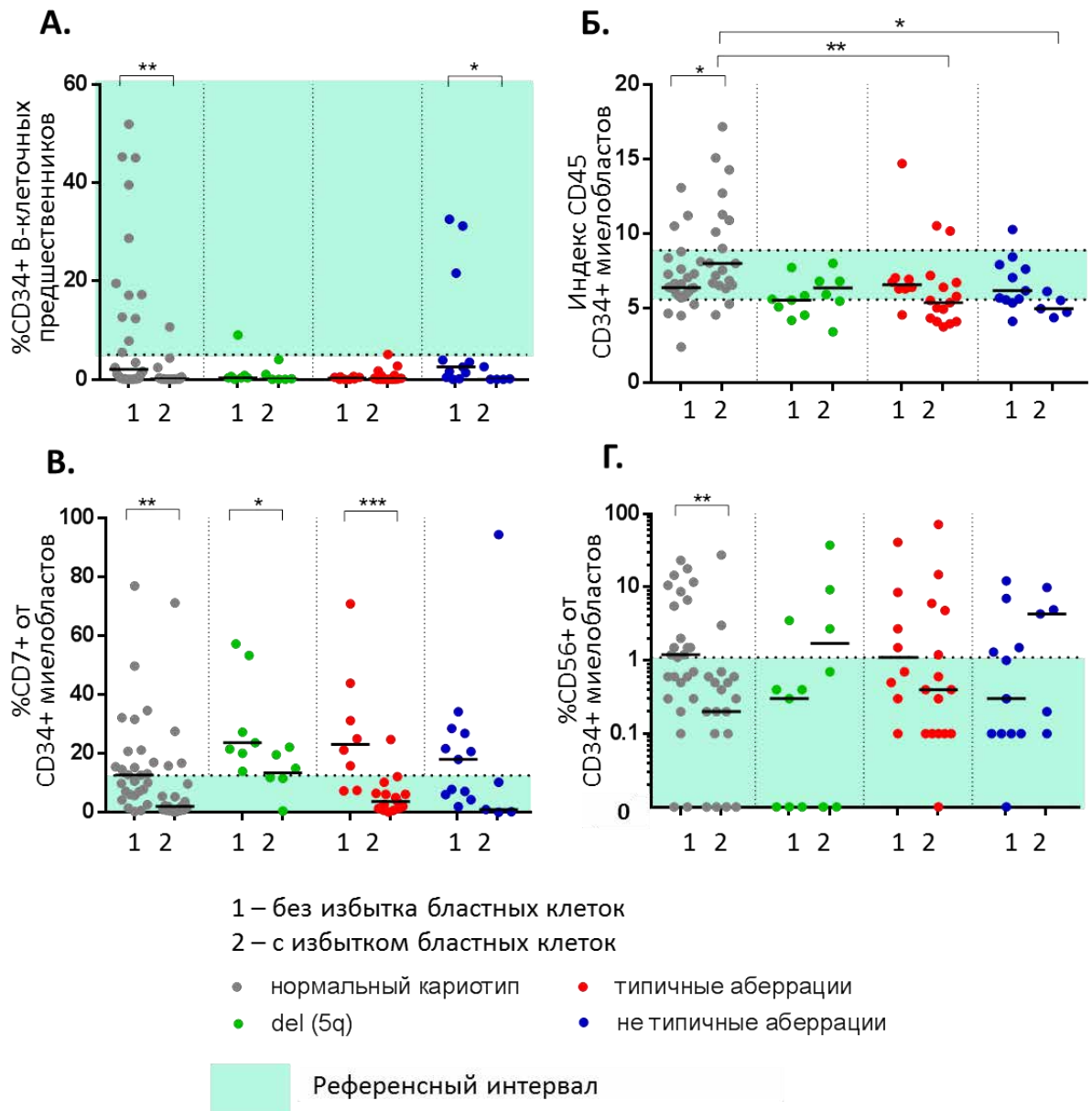


Рисунок 34 – Цитометрические показатели компартамента ранних предшественников у пациентов с МДС в зависимости от цитогенетических aberrаций и избытка бластных клеток: А. Доля $CD34^+$ В-клеточных предшественников в зависимости от всех $CD34^+$ клеток; Б. Индекс $CD45$ $CD34^+$ миелоидных предшественников; В. Доля $CD7^+$ клеток от $CD34^+$ миелоидных предшественников; Г. Доля $CD56^+$ клеток от $CD34^+$ миелоидных предшественников. Звездочками указано наличие достоверных отличий (***) – $p \leq 0,001$; ** – $p \leq 0,01$; * – $p < 0,05$)

Доля гранулоцитов от CD45⁺ клеток была выше при МДС с нормальным кариотипом без избытка бластов, чем с избытком (62,1% против 45,4%, $p = 0,027$). В группе МДС без избытка бластных клеток доля гранулоцитов была ниже в случае наличия типичных aberrаций (медиана 45,45%), чем с нормальным кариотипом (62,1%) и неспецифичными для МДС аномалиями (63,1%) (Таблица 26, Рисунок 35А). В группе МДС с неспецифичными aberrациями индекс гранулярности гранулоцитов был меньше в случае избытка бластов, чем без избытка (4,57 против 7,00, $p = 0,03$). ИГ гранулоцитов меньше при del(5q) (медиана – 5,12), чем при нормальном кариотипе (медиана – 7) и неспецифичных для МДС aberrациях (медиана – 7) ($p < 0,01$) в случае отсутствия избытка бластов, а при избытке бластов ИГ гранулоцитов так же меньше при del(5q) (медиана – 4,9), чем при типичных aberrациях (медиана – 6,3, $p < 0,05$) (Таблица 26, Рисунок 35Б). Доля CD56⁺ гранулоцитов ниже у пациентов с del(5q) без избытка бластов (медиана – 1,1%), чем у пациентов с del(5q) с избытком бластов (9,8%, $p = 0,005$) (Таблица 26, Рисунок 35В). Частоты встречаемости аномальных паттернов «CD13 и CD16», «CD11b и CD16» и «CD13 и CD11b» гранулоцитов были выше в группе МДС с нормальным кариотипом с избытком бластных клеток, чем без избытка. В группе МДС без избытка бластов повышенная доля CD14⁺ гранулоцитов не встречалась только у пациентов с del(5q), однако в случае избытка бластов при del(5q) частота повышенной доли CD14⁺ гранулоцитов увеличивалась до 83,3% ($p = 0,005$) (Таблица 27).

В исследовании Г. Киртивасан с соавт. (2014) повышение доли гранулоцитов с ко-экспрессией CD14 встречалось только при МДС с 5q- ($n = 11$), а для других МДС ($n = 12$) подобная аномалия не была характерна. Также было отмечено, что все пациенты с МДС и ко-экспрессией CD14 имели высокую частоту и длительное течение инфекций [52]. В исследовании К. Чен с соавт. (2019) экспрессия CD14 на гранулоцитах встречалась только у 2 из 15 пациентов с МДС с 5q-, которые проходили терапию леналидомидом, а повышенную долю CD14⁺ гранулоцитов часто обнаруживали при миелоидных неоплазиях с моносомией 7 или del(7q) [30]. В нашем исследовании показано, что при МДС с

5q- без избытка бластов повышения доли гранулоцитов с ко-экспрессией CD14 не отмечалось, но в случае избытка бластов и наличия del(5q) повышенная доля CD14⁺ обнаруживалась в большинстве случаев.

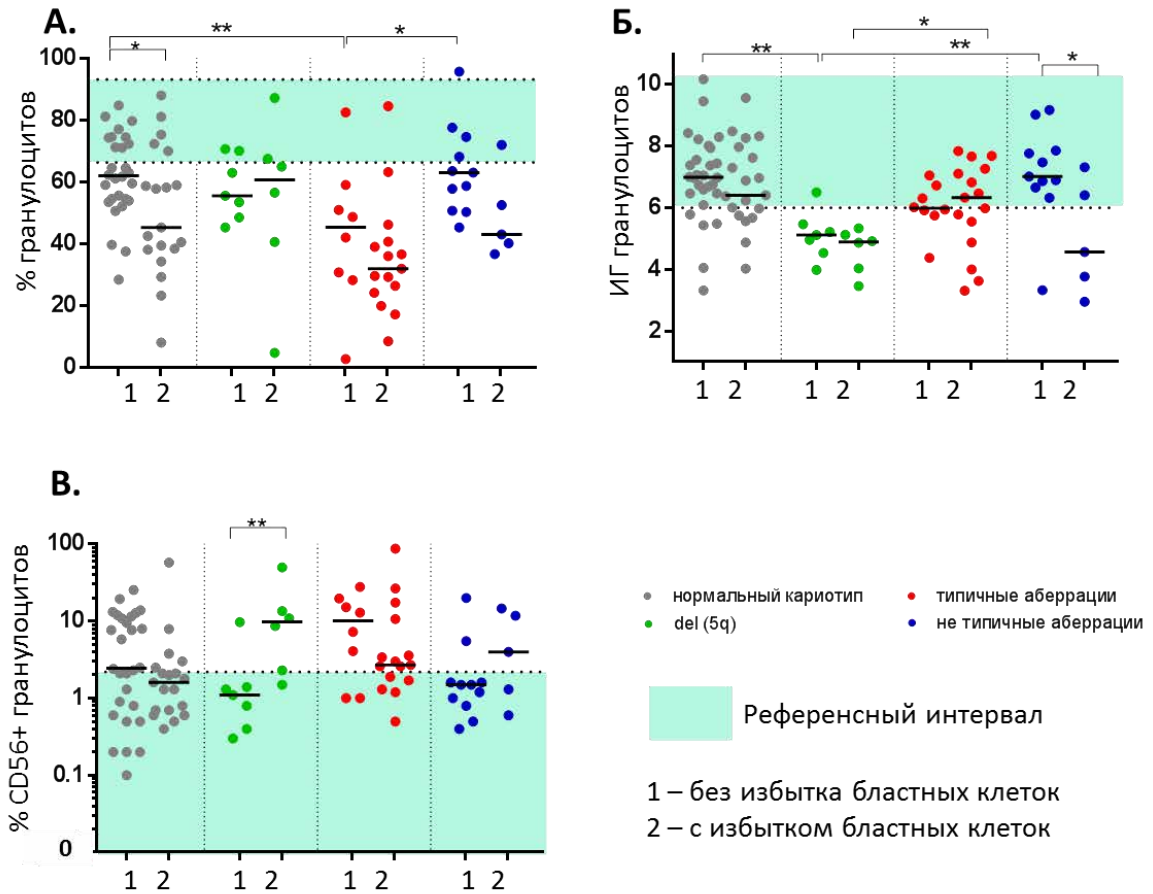


Рисунок 35 – Цитометрические показатели компартамента гранулоцитов у пациентов с МДС в зависимости от цитогенетических aberrаций и избытка бластных клеток: А. Доля гранулоцитов от CD45⁺ клеток; Б. Индекс гранулярности гранулоцитов; В. Доля CD56⁺ гранулоцитов от всех гранулоцитов. Звездочками указано наличие достоверных отличий (** – $p \leq 0,01$; * – $p < 0,05$)

У больных МДС с нормальным кариотипом доля моноцитов была ниже при избытке бластов, чем без избытка бластных клеток (1,9% против 4,6%, $p = 0,006$). При МДС с избытком бластных клеток в случаях с нормальным кариотипом доля моноцитов меньше, чем при наличии типичных для МДС aberrаций (1,9% против

7,2%, $p < 0,01$). Различий в доле $CD56^+$ моноцитов отмечено не было. ИГ моноцитов в группе МДС с типичными aberrациями был выше в случаях без избытка бластов, чем с избытком (2,37 против 2,07, $p = 0,047$). При МДС с избытком бластов и нормальным кариотипом ИГ моноцитов выше, чем в группе МДС с типичными aberrациями и избытком бластов (2,38 против 2,07, $p < 0,05$) (Таблица 26). Различий в частотах встречаемости аномальных паттернов моноцитов не было (Таблица 27).

Таблица 27 – Частота иммунофенотипических аномалий гранулоцитов и моноцитов у пациентов с МДС в зависимости от цитогенетических aberrаций и наличия избытка бластных клеток

показатель (%)	избыток бластов	нормальный кариотип	p	del(5q)	p	другие типичные aberrации	p	не специфичные aberrации	p	p
Компартмент гранулоцитов										
аномальный паттерн "CD13 и CD16"	нет	35,7	0,017	33,3	1	75,0	1	45,5	0,31	0,24
	есть	73,7		50,0		66,7		80,0		0,68
аномальный паттерн "CD11b и CD16"	нет	28,6	0,016	20,0	0,55	62,5	0,62	27,3	0,11	0,23
	есть	68,4		50,0		80,0		80,0		0,54
аномальный паттерн "CD13 и CD11b"	нет	35,7	0,007	0,0	0,18	50,0	0,63	63,6	1	0,07
	есть	78,9		50,0		73,3		80,0		0,55
повышенная доля $CD14^+$ гранулоцитов	нет	17,9	0,099	0,0	0,005	50,0	0,66	54,5	1	0,019
	есть	42,1		83,3		66,7		60,0		0,26
Компартмент моноцитов										
аномальный паттерн "CD13 и CD11b"	нет	28,6	1	20,0	1	37,5	0,67	27,3	0,11	0,86
	есть	26,7		16,7		53,3		80,0		0,08
аномальный паттерн "CD36 и CD14"	нет	10,5	0,38	20,0	0,24	33,3	1	16,7	0,5	0,89
	есть	7,7		66,7		38,5		50,0		0,058
Аномальный паттерн "CD11b и HLA-DR"	нет	32,1	0,24	16,7	1	37,5	0,22	36,4	0,034	0,84
	есть	53,3		33,3		66,7		100,0		0,13

Таким образом, различия в иммунофенотипических параметрах $CD34^+$ миелоидных клеток связаны преимущественно с наличием избытка бластных клеток, а не типом цитогенетических аномалий: при избытке бластных клеток доля $CD34^+$ миелоидных клеток от $CD45^+$ больше, а доля $CD7^+$ клеток от $CD34^+$ миелоидных клеток меньше, чем у пациентов без избытка бластов, хотя

повышенный индекс CD45 в большей степени характерен для МДС с избытком бластов с нормальным кариотипом, чем при наличии цитогенетических aberrаций. Нормальная доля CD34⁺ В-клеточных предшественников сохраняется при МДС без избытка бластов в случаях с нормальным кариотипом или с неспецифичными для МДС aberrациями. Для МДС с del(5q) без избытка бластов характерны гранулоциты с низким индексом гранулярности, но с редкой частотой встречаемости других цитометрических аномалий. Для МДС с типичными aberrациями и отсутствием избытка бластов характерна более низкая доля гранулоцитов, но с высокой экспрессией CD56 на них. У больных МДС с нормальным кариотипом частота аномальных паттернов гранулоцитов выше при избытке бластных клеток. Оценки по шкалам «Ogata score» и «Wells» были выше у пациентов с избытком бластов, чем без избытка, во всех группах МДС, разделенных по цитогенетическим aberrациям. Однако при отсутствии бластных клеток балл по шкале «Ogata score» и «Wells» выше в группе МДС с del(5q) и типичными aberrациями, чем у больных МДС с нормальным кариотипом. Оценки по шкале «Ogata-Wells» не зависели от вида цитогенетических aberrаций, но в случаях МДС с нормальным кариотипом частота оценки «А» была выше у пациентов без избытка бластов. Таким образом, впервые были показаны взаимосвязи между отдельными цитометрическими aberrациями и цитогенетическими аномалиями, однако получение высоких баллов по цитометрическим шкалам дисмиелопоэза в большей степени зависит от наличия или отсутствия бластных клеток, чем от выявленного кариотипа.

3.9. Сопоставление результатов цитометрического анализа дисмиелопоэза с результатами гистологического исследования

В работе были проанализированы результаты гистологических исследований, выполненных в патологоанатомическом отделении ФГБУ «НМИЦ гематологии» (заведующая лабораторией – д.б.н. А.М. Ковригина) у 94 (92,2%)

пациентов группы МДС и 75 (90,4%) пациентов группы сравнения. По результатам этих исследований у 8 (8,5%) пациентов с МДС и 6 (8%) пациентов группы сравнения материал трепанобиопсии был неинформативным (Таблица 28). Частота неинформативных трепанобиопсий значимо не отличалась в группах пациентов с разными вариантами МДС и группы сравнения ($p = 0,808$). Только при МДС с 5q- частота неинформативного материала была выше при получении оценки «А» по шкале «Ogata-Wells», чем «С» (100% vs 16,7%, $p = 0,014$). При всех других вариантах МДС и в группе сравнения доля неинформативного материала не отличалась при разных оценках по шкале «Ogata-Wells» (Таблица 28).

Таблица 28 – Число пациентов с различными вариантами МДС и пациентов группы сравнения с учетом балла по цитометрической шкале «Ogata-Wells» в зависимости от информативности гистологического исследования

Группа пациентов	«Ogata-Wells»	Количество пациентов, n	Неинформативный материал, n (%)	p
МДС с 5q-	A	1	1 (100%)	0,014
	B	0	0	
	C	5	0	
	всего	6	1 (16,7%)	
МДС-ЛД	A	2	0	-
	B	1	0	
	C	1	0	
	всего	4	0	
МДС-КС	A	2	0	0,786
	B	2	0	
	C	9	1 (11,1%)	
	всего	13	1 (7,7%)	
МДС-МД	A	8	2 (25%)	0,374
	B	4	1 (25%)	
	C	16	1 (6,25%)	
	всего	28	4 (14,3%)	
МДС-ИБ-1	A	0	0	-
	B	0	0	
	C	23	1 (4,3%)	
МДС-ИБ-2	A	0	0	-
	B	0	0	
	C	20	1 (5%)	
группа сравнения	A	64	6 (8,3%)	0,571
	B	9	0	
	C	2	0	
	всего	75	6 (8%)	

У одного пациента с диагнозом МДС-ИБ-2 было сделано гистологическое заключение о наличии первичного миелофиброза (степень фиброза стромы при окраске по Gomori MF-1), и еще у одного пациента с МДС-ИБ-2 гистологически был определен гипопластический вариант ОМЛ.

Таким образом, в сравнительный анализ результатов гистологического и цитометрического методов исследования включено 87 (85,3%) пациентов с МДС и 69 (83,1%) пациентов группы сравнения с информативным материалом трепанобиопсий.

Результаты гистологического исследования представлены в виде численного балльного эквивалента по степени соответствия картины наличию МДС:

1. Оценка 1: Данных в пользу МДС не получено;
2. Оценка 2: Картина подозрительна по принадлежности к МДС;
3. Оценка 3: Результаты исследования в наибольшей степени соответствуют МДС;
4. Оценка 4: Картина характеризует субстрат МДС.

Частота гистологической оценки 1 была выше у пациентов группы сравнения, чем у пациентов всех вариантов МДС. Доля оценки 4 была выше при МДС-ИБ-1, чем МДС-ЛД и МДС-КС, и выше при МДС-ИБ-2, чем при МДС-КС и МДС-МД. У всех пациентов МДС с 5q- получена гистологическая оценка 4. В 2 случаях из 4 МДС-ЛД, 5 из 11 МДС-КС, 5 из 25 МДС-МД, 1 из 22 МДС-ИБ-1 и 1 из 20 МДС-ИБ-2 (50%; 45,5%; 20%; 4,5% и 5%, соответственно) по результатам исследования трепанобиоптатов данных в пользу МДС не было получено (Рисунок 36). Таким образом, гистологические признаки дисмиелопоза наиболее часто отсутствовали при МДС-ЛД и МДС-КС. Действительно, МДС с кольцевыми сидеробластами представляет сложности для гистологической диагностики, так как в этих случаях могут отсутствовать признаки дисплазии других ростков кроветворения [7].

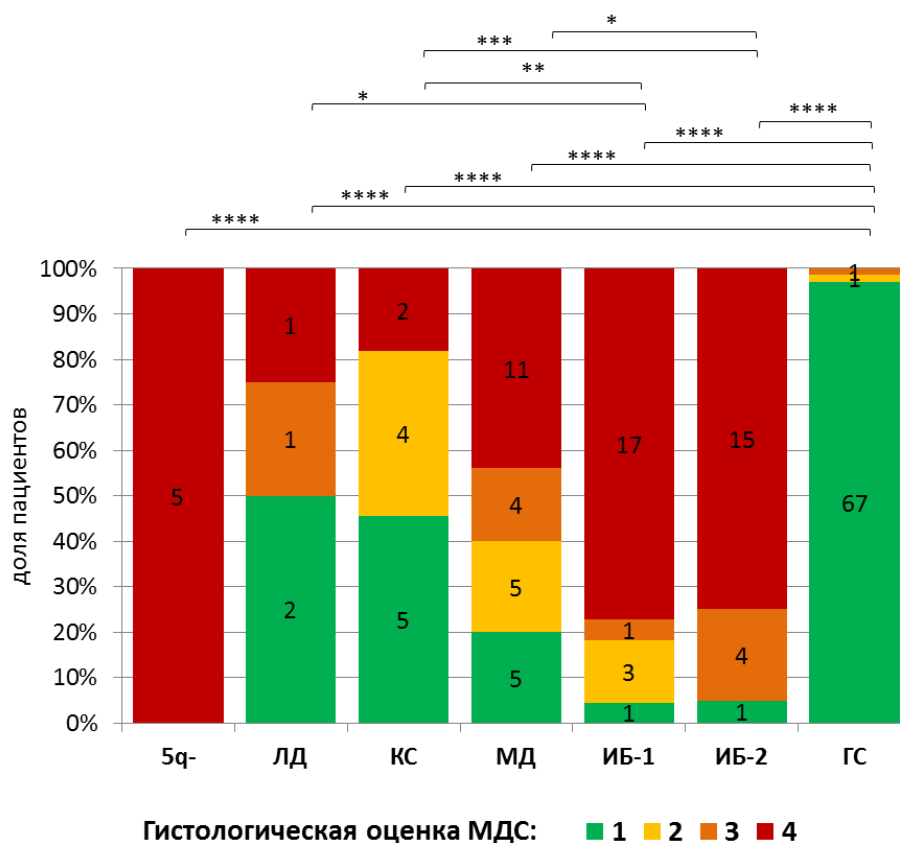


Рисунок 36 – Доли гистологических оценок (1, 2, 3 и 4), полученных при анализе трепанобиоптатов пациентов с разными вариантами МДС и пациентов группы сравнения (ГС)

При анализе пациентов с МДС баллы по шкале «Ogata score» были выше при гистологической оценке 4, чем при гистологической оценке 1 ($p \leq 0,01$) (Рисунок 37А).

Балл по шкале «Wells» был выше у пациентов с МДС с гистологической оценкой 4, чем с оценками 1 и 2 ($p < 0,05$) (Рисунок 37Б).

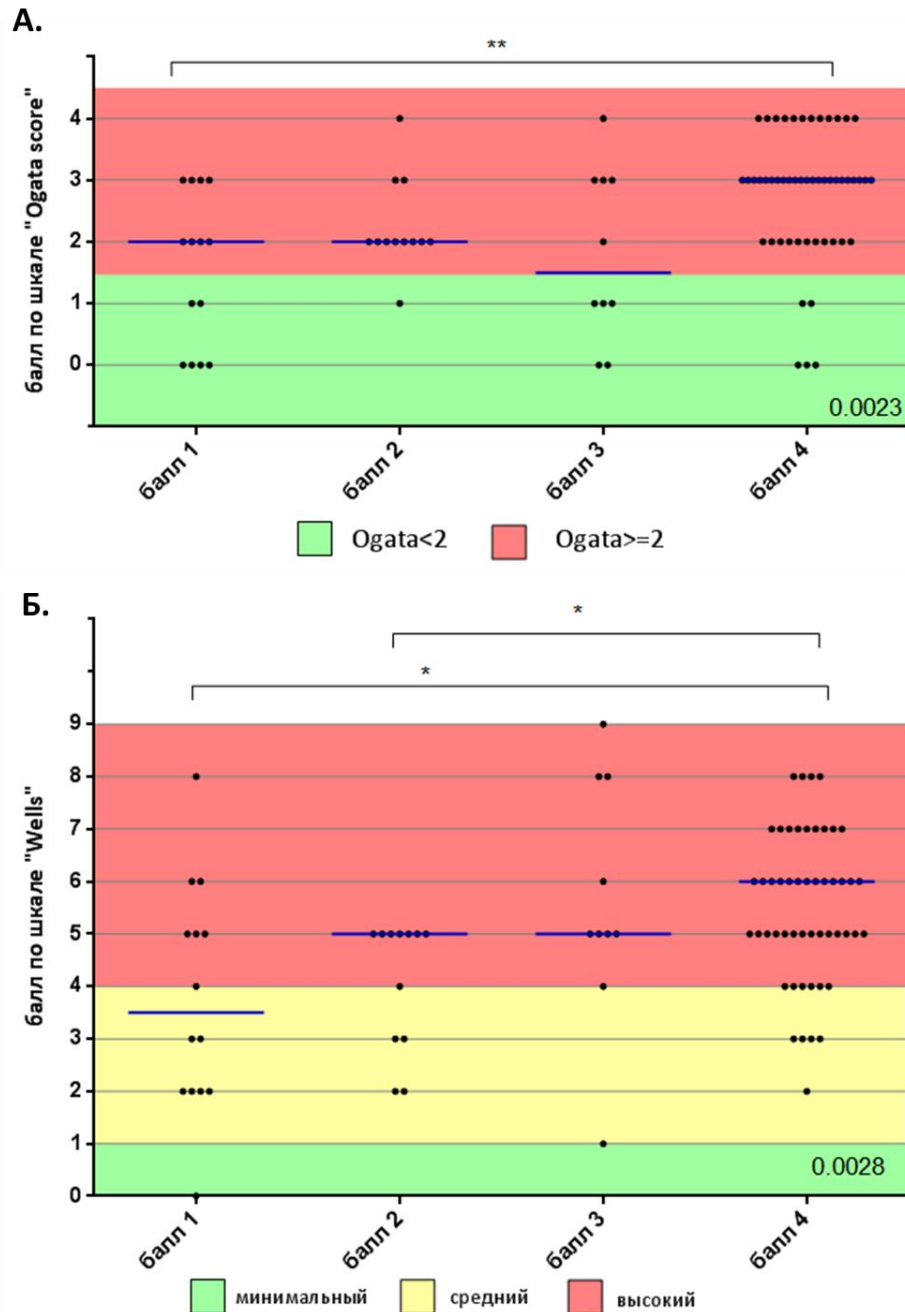


Рисунок 37 – Баллы по шкалам «Ogata score» (А) и «Wells» (Б) в зависимости от гистологической оценки (1,2,3 и 4) у пациентов с МДС. Горизонтальной синей чертой отмечена медиана. Звездочками указано наличие достоверных отличий (** – $p \leq 0,01$; * – $p < 0,05$)

При сопоставлении данных цитометрического и гистологического исследований было продемонстрировано совпадение результатов. У пациентов с МДС, у которых получена оценка «С» по шкале «Ogata-Wells», доля гистологической оценки 4 была значимо выше, чем в группе пациентов с оценкой

«Ogata-Wells» «А» ($p \leq 0,01$) (Рисунок 38А). У 5 пациентов с МДС (1 МДС-ЛД, 2 МДС-КС и 2 МДС-МД) отсутствовали как цитометрические (оценка «А»), так и гистологические признаки дисмиелопоэза (оценка 1) (Рисунок 38А, 39 Б,В,Г).

Гистологические признаки МДС чаще отсутствовали (балл 1) у пациентов из группы сравнения, имеющих оценку «А» по шкале «Ogata-Wells», чем у пациентов этой группы с оценкой «С» ($p \leq 0,001$) (Рисунок 38Б).

У 2 пациентов группы сравнения обнаруживались признаки МДС по результатам гистологического исследования (баллы 2 и 3) (Рисунок 36, 38Б). Это были 2 пациента с ЖДА, не имеющих цитометрических признаков дисмиелопоэза (Рисунок 38Б).

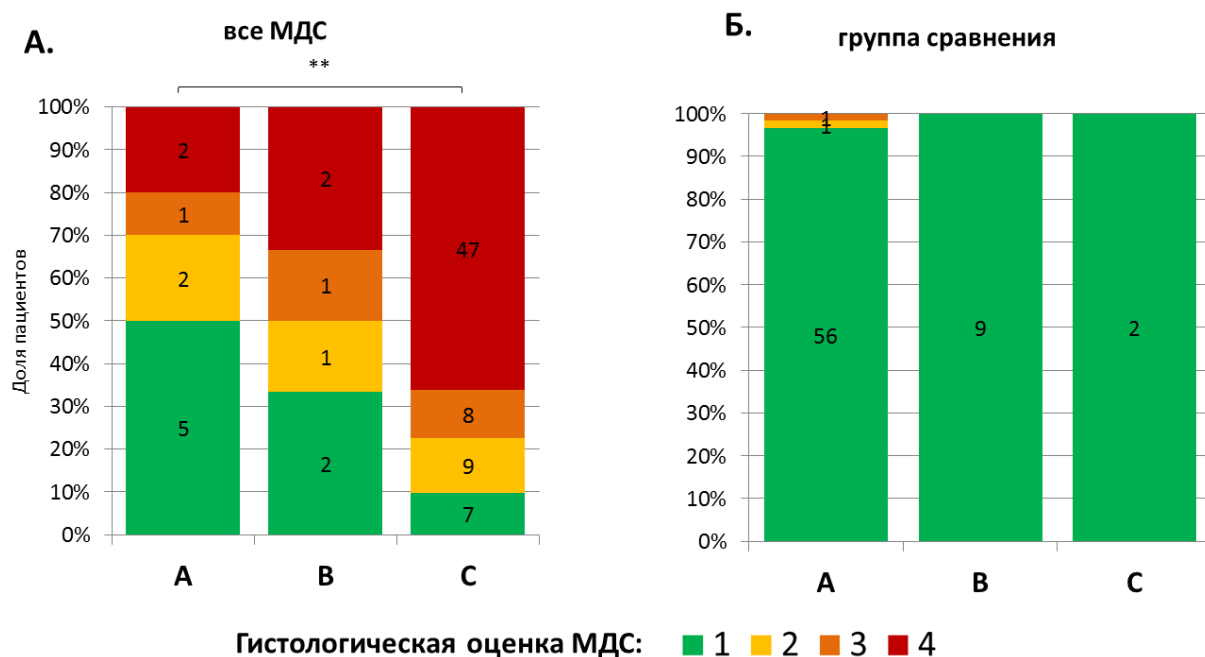


Рисунок 38 – Доли гистологических оценок (1, 2, 3 и 4), полученных при анализе трепанобиоптатов в зависимости от балла по шкале «Ogata-Wells»: А. – в группе пациентов с МДС; Б. – в группе сравнения. Звездочками указано наличие достоверных отличий (** – $p \leq 0,01$)

При МДС с 5q-, МДС-ИБ-1 и МДС-ИБ-2 у всех пациентов по шкале «Ogata-Wells» был балл «С», однако у 2 пациентов с избытком бластов при

гистологическом исследовании данных в пользу МДС не получено (Рисунок 39А, Д, Е).

У пациента из группы МДС-ЛД с баллом «С» была получена гистологическая оценка 4, с баллом «В» – оценка 1, среди двоих пациентов с баллом «А» у одного пациента были гистологические признаки МДС (оценка 3), у второго – не было (оценка 1) (Рисунок 39Б).

Среди пациентов с МДС-КС у 2 пациентов с баллом «А» гистологических данных за МДС не выявлено (оценка 1); у пациента с оценкой «В» морфологическая картина была подозрительна по принадлежности к МДС (оценка 2); у 2 (25%) пациентов из 8 с баллом «С» была гистологическая оценка 4, у 3 (37,5%) пациентов – оценка 2 и у 3 (37,5%) пациентов – оценка 1 (Рисунок 39В).

При МДС-МД частота гистологических оценок значимо не отличалась у пациентов в зависимости от балла по шкале «Ogata-Wells». Из 6 пациентов МДС-МД с баллом «А» у 2 (33,3%) была оценка 1, у 2 (33,3%) – оценка 2 и у 2 (33,3%) – оценка 4. Среди 4 пациентов МДС-МД с баллом «В» у 1 (25%) гистологических данных в пользу МДС не получено, у 1 (25%) картина в наибольшей степени соответствовала МДС, и у 2 (50%) картина характеризовала субстрат МДС. Среди 15 пациентов МДС-МД с баллом «С» у 2 (13,3%) была гистологическая оценка 1; у 3 (20%) – оценка 2, у 3 (20%) – оценка 3 и у 7 (46,7%) – оценка 4 (Рисунок 3.28Г).

В когорте пациентов с МДС (n=26), вызывающих наибольшие диагностические трудности (отсутствие избытка бластных клеток, кольцевых сидеробластов, типичных для МДС цитогенетических аберраций), у 2 пациентов трепанобиоптат был неинформативным, у 1 трепанобиопсия не выполнялась, гистологическая оценка 1 была у 6 пациентов, оценка 2 – у 4, оценка 3 – у 4, оценка 4 – у 9 пациентов. Среди 23 пациентов с МДС этой группы с информативными данными исследования трепанобиоптата балл «А» по шкале «Ogata-Wells» был у 8, балл «В» – 4 и «С» - у 11 пациентов.

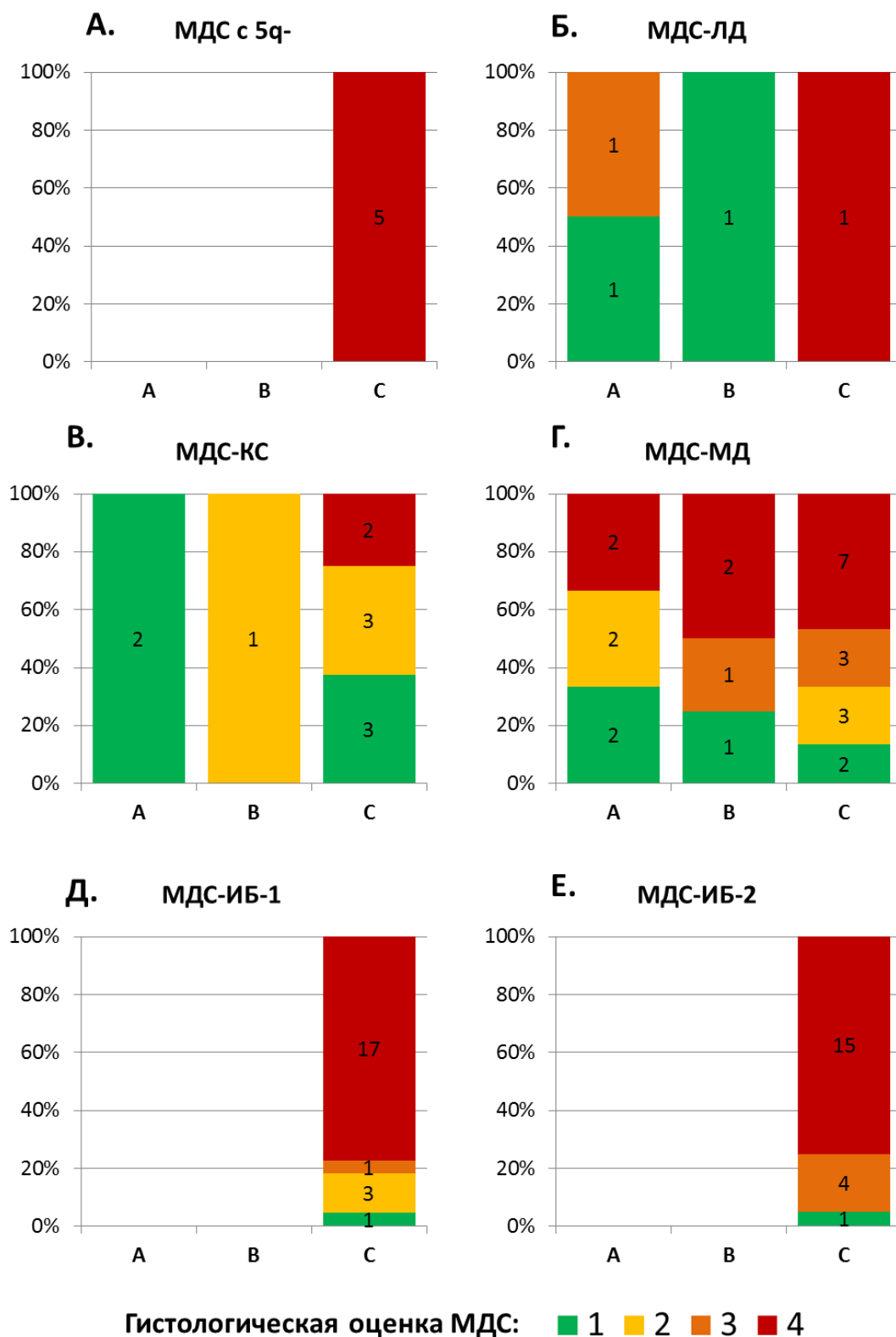


Рисунок 39 – Доли пациентов с различными гистологическими оценками (1, 2, 3 и 4), полученными при анализе трепанобиоптатов в зависимости от балла по шкале «Ogata-Wells»: А. – у пациентов с МДС с 5q-; Б. – у пациентов с МДС-ЛД; В. – у пациентов с МДС-КС; Г. – у пациентов с МДС-МД; Д. – у пациентов с МДС-ИБ-1; Е. - у пациентов с МДС-ИБ-2

Соответствие гистологических оценок и цитометрических в этой группе пациентов показано на Рисунке 40. У 3 пациентов (13%) из 23 и цитометрические, и гистологические признаки МДС отсутствовали, у 12 пациентов (52,3%) были и цитометрические, и гистологические признаки МДС (из них у 1 пациента была $del(1q)$, у 1 - $t(2;3)$, у 1 - $del(20q)$ и у 1 - трисомия 8), у 5 (21,7%) пациентов присутствовали только гистологические признаки МДС (у 2 из них была потеря Y-хромосомы) и у 3 (13%) пациентов присутствовали только цитометрические признаки МДС (у 1 их них была потеря Y-хромосомы).

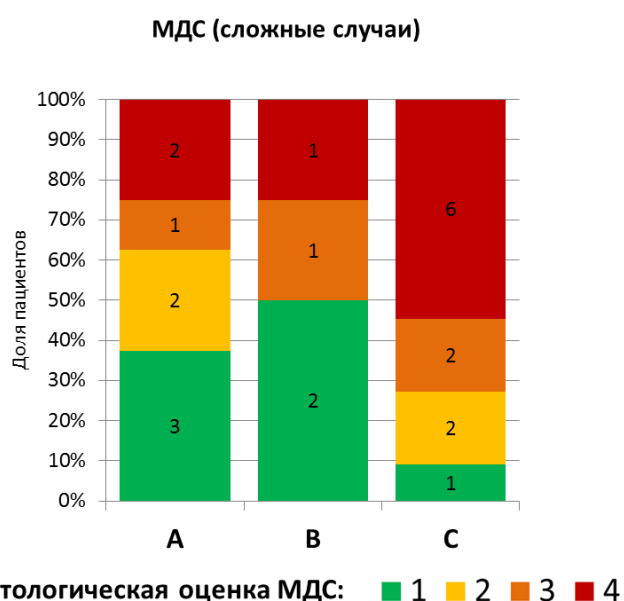


Рисунок 40 – Доли больных с различными гистологическими оценками (1, 2, 3 и 4), полученными при анализе трепанобиоптатов в зависимости от балла по шкале «Ogata-Wells» у пациентов с МДС без избытка бластов, кольцевых сидеробластов и типичных для МДС цитогенетических аномалий (сложные случаи)

Таким образом, только у 8 из 94 (8,5%) пациентов из группы МДС материал трепанобиопсии был неинформативным, однако анализ пунктата костного мозга методом проточной цитофлуориметрии был возможен, и в 5 из этих 8 (62,5%) случаев в результате цитометрического исследования были обнаружены признаки наличия МДС (баллы «В» и «С» по шкале «Ogata-Wells»). При сопоставлении

результатов цитометрического анализа дисмиелопоэза с результатами гистологического анализа информативных трепанобиоптатов выявлена высокая степень соответствия. Однако у 14 (17,9%) из 78 пациентов с МДС гистологические признаки дисмиелопоэза отсутствовали, однако в 9 (64,3%) из этих 14 случаев были обнаружены цитометрические черты МДС (баллы «В» и «С»). С другой стороны, балл «А» по шкале «Ogata-Wells» был у 10 пациентов с МДС (12,8%), при этом в 5 (50%) случаях гистологические признаки МДС обнаруживались (оценки 2-4). В группе больных МДС, вызывающей диагностические сложности (без избытка бластных клеток, кольцевых сидеробластов и типичных цитогенетических аберраций), также выявлена высокая степень совпадения гистологических и цитометрических признаков МДС (65,3%): только гистологические признаки МДС присутствовали в 21,7% и только цитометрические – в 13% случаев. Таким образом, доказано совпадение гистологического и цитометрического анализов, и показано, что они являются взаимодополняющими типами исследования.

3.10. Сопоставление результатов цитометрического анализа дисмиелопоэза с результатами цитологического исследования

Цитологическая оценка степени дисплазии в гранулоцитарном, эритроидном и мегакариоцитарном ростках кроветворения была выполнена в централизованной клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ гематологии» (заведующая лабораторией – к.м.н. Двирнык В.Н.) у 99 (97%) пациентов группы МДС. В этой выборке пациентов с МДС доля цитологических препаратов с гипоклеточным КМ была высокой и составила 54,5%; в зависимости от нозологической формы МДС по классификации ВОЗ 2017 г. частота гипоклеточного пунктата варьировала от 23,1% до 100% (Таблица 29). Встречаемость гипоклеточного КМ была выше при МДС с 5q- (100%), чем при МДС-КС (23,1%, $p = 0,005$) и МДС-ИБ-2 (45%, $p = 0,039$), а при МДС-ЛД - выше, чем при МДС-КС (100% против 23,1%, $p = 0,024$).

Таблица 29 – Клеточность пунктата костного мозга у пациентов с МДС

Клеточность пунктата	Нозологическая форма МДС					
	МДС с 5q-, n=7	МДС-ЛД, n=4	МДС-КС, n=13	МДС-МД, n=29	МДС-ИБ-1, n=26	МДС-ИБ-2, n=20
гипоклеточный	7 (100%)	4 (100%)	3 (23,1%)	16 (55,2%)	15 (57,7%)	9 (45%)
нормоклеточный	0 (0%)	0 (0%)	8 (61,5%)	12 (41,4%)	9 (34,6%)	8 (40%)
гиперклеточный	0 (0%)	0 (0%)	2 (15,4%)	1 (3,4%)	2 (7,7%)	3 (15%)

Степень дисплазии определялась как доля клеток с диспластичными признаками по отношению ко всем клеткам данного ряда, при этом в гранулоцитарном и эритроидном ростках анализировали не менее 100 клеток, а в мегакариоцитарном – не менее 30 клеток. Дисплазию эритроидного, гранулоцитарного и мегакариоцитарного рядов кроветворения диагностировали при наличии более 10% измененных форм [86]. Для каждого ростка приведены интервалы долей клеток с признаками дисплазии: 0–9%, 10–19%, 20–49%, 50% и более. В случаях, когда не удавалось произвести подсчет 100 эритрокариоцитов/гранулоцитов и/или 30 мегакариоцитов, оценка степени дисплазии в этих ростках была невозможной.

Частота встречаемости дисплазии варьировала в гранулоцитарном ряду от 50% до 100%, в эритроидном – от 28,6% до 90%, в мегакариоцитарном – от 0% до 40% в зависимости от нозологической формы МДС (Таблица 30). При МДС-ИБ-1 встречаемость дисплазии гранулоцитарного ростка была выше, чем при МДС с 5q- (100% против 71,4%, $p = 0,04$), МДС-ЛД (100% против 50,0%, $p = 0,014$) и МДС-КС (100% против 76,9%, $p = 0,031$). Частота дисплазии клеток эритроидного ряда была ниже при МДС с 5q-, чем при МДС-КС (28,6% против 92,3%, $p = 0,007$) и МДС-ИБ-2 (28,6% против 90%, $p = 0,011$). Частота дисплазии мегакариоцитарного ростка была выше при МДС-ИБ-2, чем при МДС-КС (40% против 0%, $p = 0,012$) и МДС-МД (40% против 6,9%, $p = 0,009$) (Таблица 30).

Таблица 30 – Дисплазия клеток КМ у пациентов с МДС

наличие дисплазии	нозологическая форма МДС					
	МДС с 5q-, n=7	МДС-ЛД, n=4	МДС-КС, n=13	МДС-МД, n=29	МДС-ИБ-1, n=26	МДС-ИБ-2, n=20
дисплазия гранулоцитарного роста	5 (71,4%)	2 (50%)	10 (76,9%)	25 (86,2%)	26 (100%)	19 (95%)
дисплазия эритроидного роста	2 (28,6%)	2 (50%)	12 (92,3%)	18 (62,1%)	18 (69,2%)	18 (90%)
дисплазия мегакариоцитарного роста	1 (14,3%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (6,9%)	5 (19,2%)	8 (40%)

По результатам исследования значимых отличий в степени дисплазии гранулоцитарного, эритроидного и мегакариоцитарного ростков при разных формах МДС не было обнаружено (Рисунок 41А,Б,В). Сравнение выполнено с помощью точного критерия Фишера, значение p составило 0,3 для гранулоцитарного ряда, 0,06 – для эритроидного и 0,05 – для мегакариоцитарного рядов.

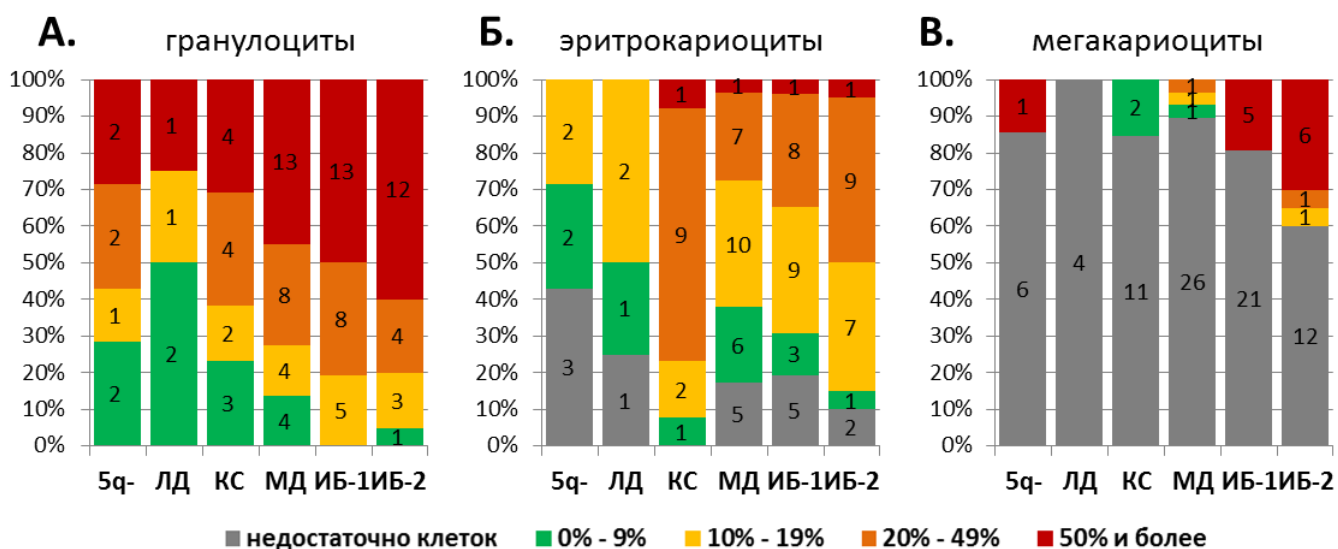


Рисунок 41 – Степень дисплазии при разных нозологических формах МДС в гранулоцитарном (А), эритроидном (Б) и мегакариоцитарном (В) рядах

Нами была оценена частота встречаемости цитометрических абберантных признаков гранулоцитов в зависимости от степени дисгранулопоэза, определенной с помощью цитологического метода (Таблица 31). Показано, что

при доле гранулоцитов с цитологическими признаками дисплазии 50% и более частота обнаружения аномального паттерна «CD11b и CD16» была выше, чем при долях 0–9% (64,4% против 27,3%, $p < 0,05$) и 10–19% (64,4% против 18,8%, $p < 0,05$). Значимых отличий в частоте встречаемости других цитометрических признаков МДС (сниженная доля гранулоцитов, сниженный индекс гранулярности, аномальный индекс CD45, повышенная доля CD56⁺ гранулоцитов, аномальные паттерны «CD13 и CD16» и «CD13 и CD11b», сниженная доля CD10, сниженная доля CD14) в зависимости от степени дисплазии гранулоцитов обнаружено не было (Таблица 31). В исследовании М. Стетлер-Стивенсон и соавт. 2001 года также не было выявлено взаимосвязи между морфологическими и цитометрическими данными анализа дисмиелопоэза [85].

Таблица 31 – Частота встречаемости аномальных цитометрических признаков гранулоцитов в зависимости от степени дисгранулопоэза, оцененного цитологическим методом

Частота признака,%	Степень дисгранулопоэза				p
	0–9% n = 12	10–19% n = 16	20–49% n = 26	50% и более n = 45	
Сниженная доля гранулоцитов	83,3	68,8	76,9	73,3	0,89
Сниженный индекс гранулярности	25,0	25,0	50,0	42,2	0,283
Аномальный индекс CD45	16,7	37,5	26,9	13,3	0,182
Повышенная доля CD56 ⁺ гранулоцитов	50,0	56,3	46,2	48,9	0,937
аномальный паттерн «CD13 и CD16»	45,5	43,8	53,8	62,2	0,535
аномальный паттерн «CD11b и CD16»	27,3	18,8	50,0	64,4	0,007
аномальный паттерн «CD13 и CD11b»	54,5	31,3	57,7	60,0	0,248
сниженная экспрессия CD10	8,3	12,5	15,4	33,3	0,105
повышенная экспрессия CD14	33,3	43,8	38,5	44,4	0,891

Наибольшие диагностические трудности вызывают случаи МДС без очевидных цитологических признаков МДС (когда кольцевых сидеробластов < 15% и нет избытка бластных клеток) и специфических цитогенетических aberrаций, указанных в Таблице 5. В нашем исследовании было 26 таких случаев МДС, при этом отсутствие признаков дисплазии в мегакариоцитарном и

эритроидном ростках было в 9 (34,6%) из них. Среди этих 9 у 3 пациентов также не было признаков дисплазии гранулоцитарного ряда, однако цитометрические признаки дисплазии были выявлены (получены 2 оценки «В» и одна «С» по шкале «Ogata-Wells»). В остальных 6 случаях дисплазия гранулоцитов присутствовала, однако КМ был гипоклеточным. Из них у 1 пациента была оценка «В» и у 3 – «С» по шкале «Ogata-Wells». Такие случаи также вызывают диагностические трудности, так как в гипоклеточном пунктате КМ нередко отмечается высокая степень дисплазии гранулоцитов за счет гипогранулярности, однако в таких случаях оценка не вполне корректна вследствие отсутствия незрелых форм гранулоцитов. Таким образом, в 9 случаях МДС с наибольшими диагностическими трудностями (без избытка бластных клеток, с < 15% кольцевых сидеробластов, при отсутствии специфических цитогенетических aberrаций, отсутствии дисплазии эритроидного и мегакариоцитарного ростков, а также отсутствии дисплазии гранулоцитарного ряда или в случаях гипоклеточного КМ) цитометрические признаки дисплазии обнаружены у 7 (77,7%) пациентов.

Отсутствие цитометрических признаков дисмиелопоэза (оценка «А» по шкале «Ogata-Wells») было у 13 (13,1%) из 99 пациентов с МДС с оцененной степенью дисплазии цитологическим методом. Ни у кого из них не было признаков дисплазии мегакариоцитарного ряда, у 2 отсутствовала дисплазия эритроидного ростка и у 1 – гранулоцитарного. В 8 случаях из 13 (61,5%) цитологические препараты КМ были гипоклеточными. Таким образом, цитометрическая оценка «А» отмечена преимущественно в случаях гипоклеточных цитологических препаратов. В исследовании Е.М.П. Кремерс также применялась шкала «Ogata-Wells», а оценки «А» были получены у пациентов с изолированными признаками дизэритропоэза и/или дисмегакариоцитопоэза, вследствие чего был сделан вывод, что введение в цитометрический анализ компартмента эритроидных клеток может повысить чувствительность метода [35].

Таким образом, не удалось выявить значимую взаимосвязь между цитологическими и цитометрическими признаками дисгранулопоэза. Отсутствие

признаков МДС методом МПЦ наблюдалось преимущественно у пациентов с гипоклеточными образцами КМ. Случаи МДС без значимых цитологических признаков дисплазии, кольцевых сидеробластов, избытка бластных клеток и типичных для МДС цитогенетических аберраций немногочисленны, однако в 77,7% случаев из них обнаружены цитометрические признаки МДС.

3.11. Изучение взаимосвязи цитометрических шкал дисмиелопоэза с цитогенетическим прогнозом и интернациональной шкалой риска

Суммарный балл по шкале «Ogata score» не отличался у пациентов с МДС разного цитогенетического риска (Рисунок 42А); в группе очень высокого риска по шкале IPSS-R балл по шкале «Ogata score» был выше (медиана 3 балла), чем в группе очень низкого риска (медиана 1 балл, $p \leq 0,01$) (Рисунок 42Б).

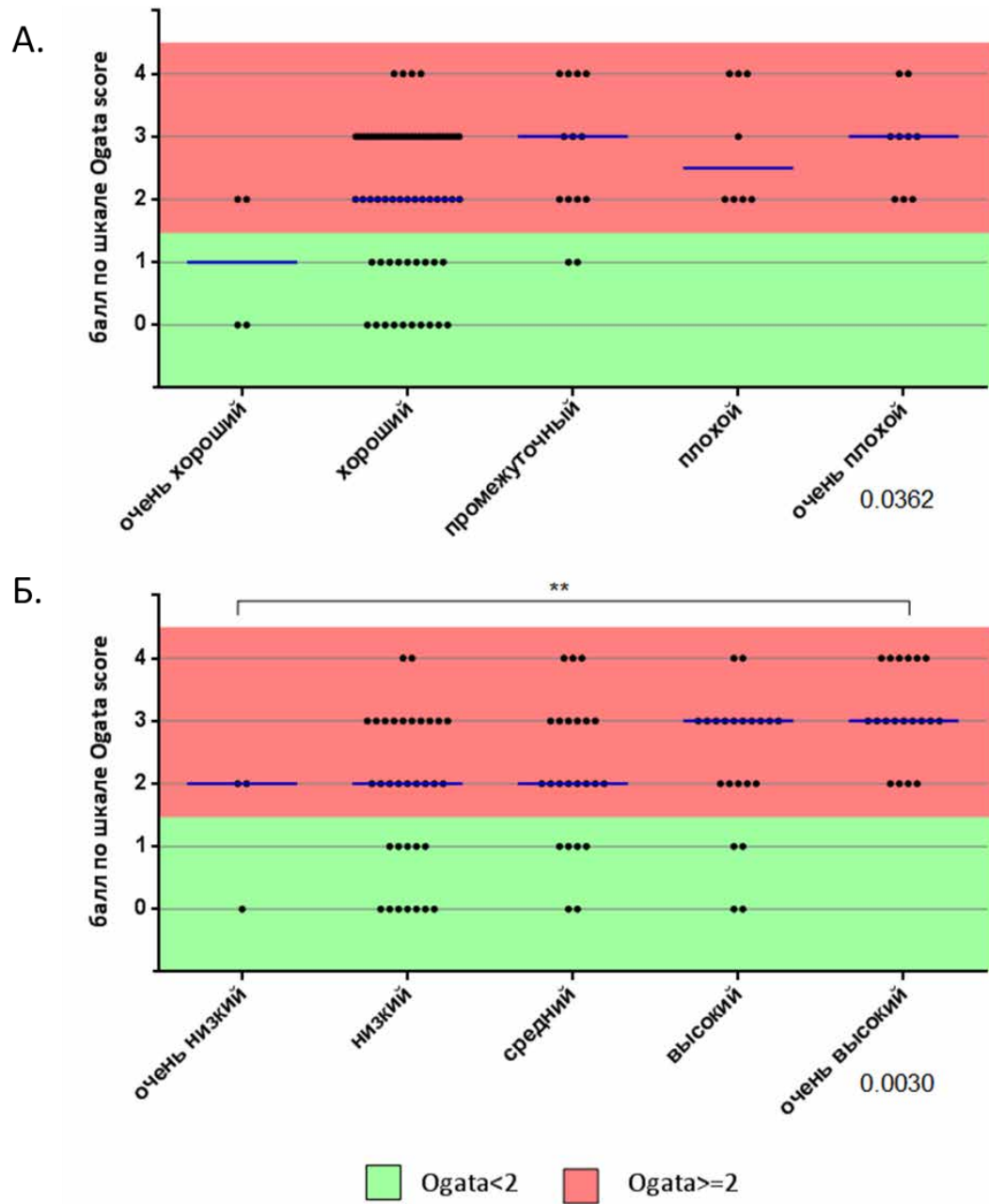


Рисунок 42 – Баллы по шкале «Ogata score» в зависимости от цитогенетического прогноза (А) и риска IPSS-R (Б). Горизонтальной синей чертой отмечена медиана. Звездочками указано наличие достоверных отличий (** – $p \leq 0,01$)

Была выявлена взаимосвязь между баллами по шкале «Wells» с цитогенетическим прогнозом и риском по шкале IPSS-R. У пациентов с МДС с очень хорошим цитогенетическим прогнозом балл по шкале «Wells» был ниже, чем в группе плохого и очень плохого прогнозов (Рисунок 43А).

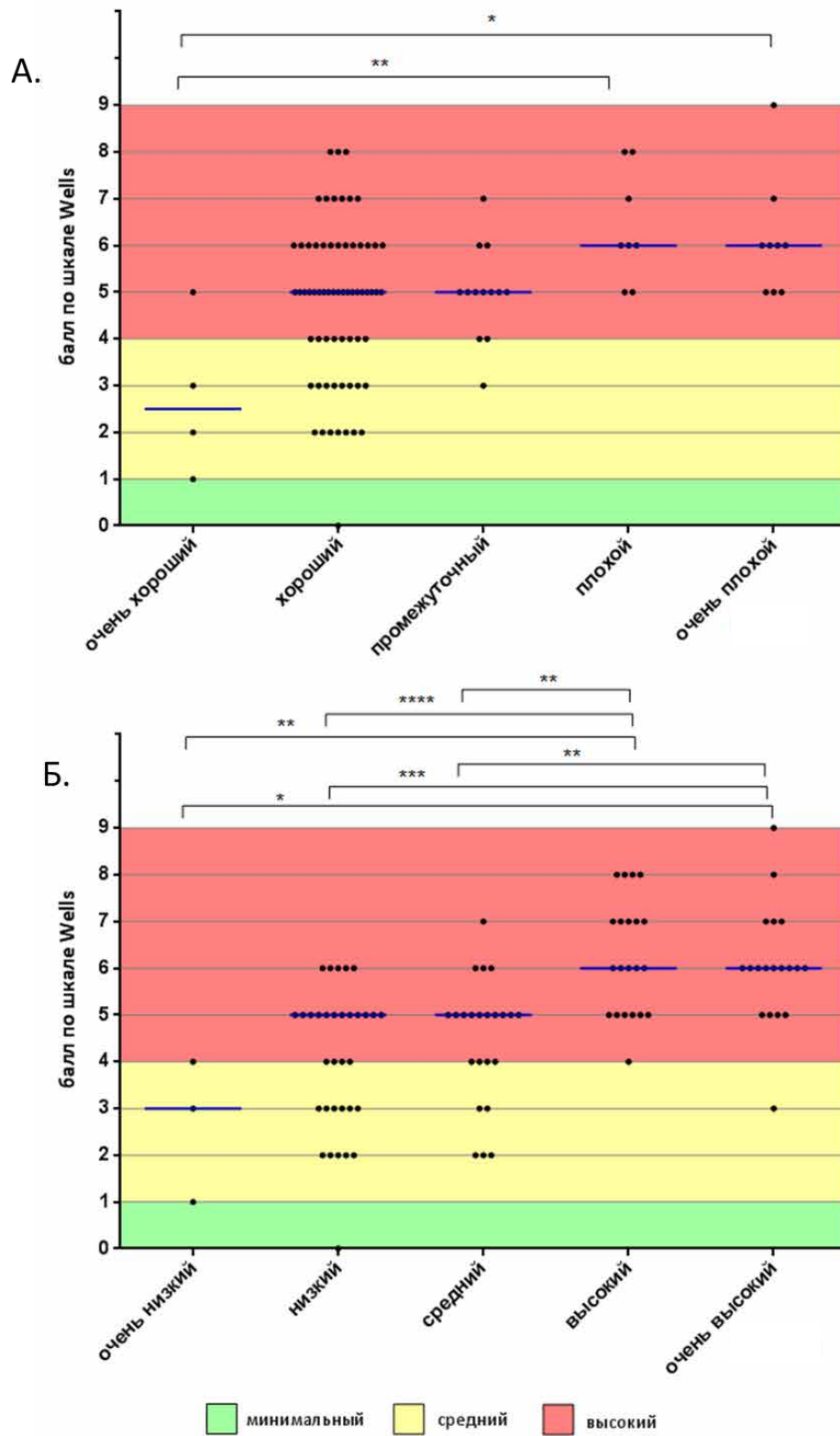


Рисунок 43 – Баллы по шкале «Wells» в зависимости от цитогенетического прогноза (А) и риска IPSS-R (Б). Горизонтальной синей чертой отмечена медиана. Звездочками указано наличие достоверных отличий (**** – $p \leq 0,0001$; *** – $p \leq 0,001$; ** – $p \leq 0,01$; * – $p < 0,05$)

В исследованиях К. Алхан с соавт. (2014), А. ван де Лосдрехт с соавт. (2008) и С. Чу с соавт. (2011), также обнаружена значимая корреляция между баллами по шкале «Wells» и группами цитогенетического прогноза и баллами IPSS-R [16; 32; 58]. Вероятно, это указывает на то, что при более сложных цитогенетических неблагоприятных абберациях обнаруживается больше цитометрических аномалий, чем при единичных благоприятных цитогенетических аномалиях или при нормальном кариотипе. Однако, несмотря на наличие такой корреляции, распределение баллов «Wells» в отдельных группах цитогенетического прогноза и риска IPSS-R было гетерогенным. Аналогичные данные получены и в других исследованиях.

В группе пациентов МДС с высоким и очень высоким рисками по шкале IPSS-R итоговый балл по шкале «Wells» был выше, чем в группах с очень низким, низким и средним рисками (Рисунок 43Б).

Частота оценки «С» по шкале «Ogata-Wells» была ниже в группе пациентов очень хорошего цитогенетического прогноза, чем в группе плохого и очень плохого прогнозов (Рисунок 44А). Частота оценки «С» по шкале «Ogata-Wells» была выше в группах высокого и очень высокого рисков IPSS-R, чем в группах очень низкого и низкого рисков, также в группе очень высокого риска частота оценки «С» была выше, чем в группе среднего риска (Рисунок 44Б).

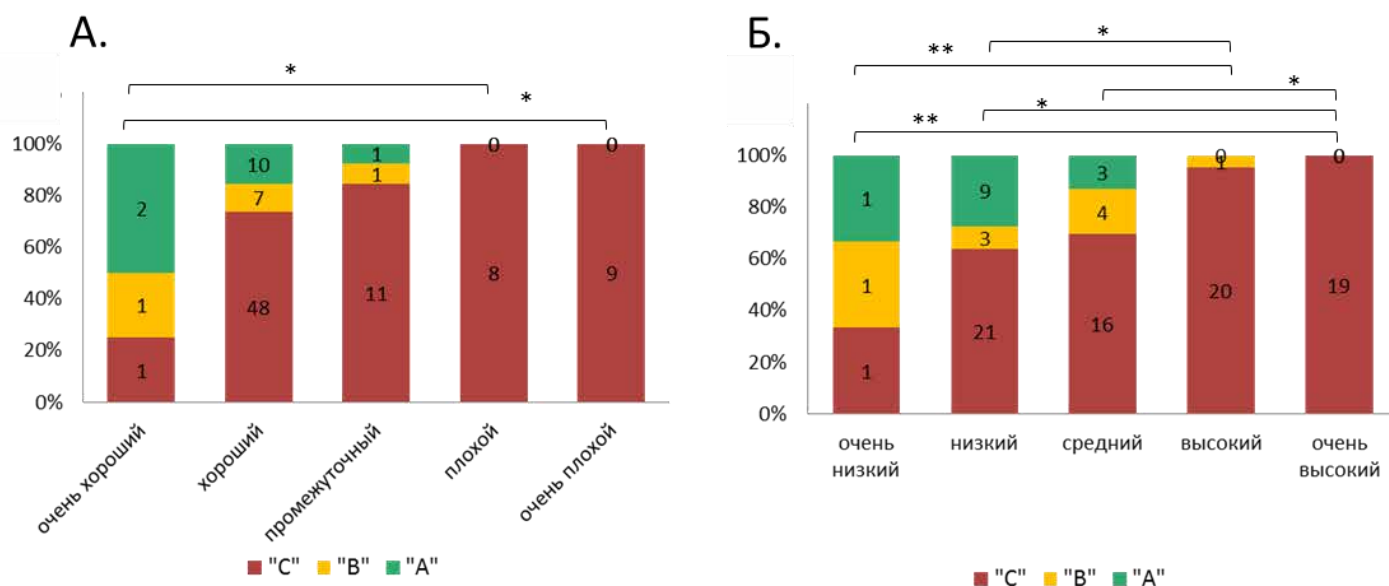


Рисунок 44 – Частота баллов по шкале «Ogata-Wells» в зависимости от цитогенетического прогноза (А) и риска IPSS-R (Б). Звездочками указано наличие достоверных отличий (** – $p \leq 0,01$; * – $p < 0,05$)

Как было указано ранее, при всех МДС-ИБ-1 и МДС-ИБ-2 получены оценки «С» по шкале «Ogata-Wells». Поэтому мы разделили МДС на две группы: с избытком и без избытка бластов, и подсчитали оценки «Ogata-Wells» в каждой группе в зависимости от цитогенетического прогноза (Таблица 32). В группе очень хорошего цитогенетического прогноза случаев МДС с избытком бластов не было. При отсутствии избытка бластных клеток подтверждение наличия МДС методом МПЦ («В» и «С» по «Ogata-Wells») было получено у 50% (2 из 4) пациентов с очень хорошим цитогенетическим прогнозом, у 74,4% (29 из 39) пациентов с хорошим прогнозом, у 80% (4 из 5) пациентов с промежуточным прогнозом и у всех пациентов с плохим и очень плохим прогнозом.

Таблица 32 – Оценки «Ogata-Wells» при разных цитогенетических прогнозах в зависимости от наличия избытка бластов.

-	цитогенетический прогноз									
	Очень хороший, n = 4		Хороший, n = 65		Промежуточный, n = 13		Плохой, n = 8		Очень плохой, n = 9	
«Ogata-Wells»	«А»	«В» и «С»	«А»	«В» и «С»	«А»	«В» и «С»	«А»	«В» и «С»	«А»	«В» и «С»
Избыток бластов	0	0	0	26	0	8	0	5	0	6
Нет избытка бластов	2	2	10	29	1	4	0	3	0	3

Так же рассмотрели баллы по шкале «Wells» в зависимости от наличия избытка бластных клеток в каждой группе цитогенетического прогноза (Рисунок 45). Среди МДС хорошего цитогенетического прогноза у пациентов с избытком бластов медиана балла «Wells» была выше, чем в группе без бластных клеток (6 против 4, $p < 0,001$). В других группах цитогенетического прогноза такой закономерности не обнаружено. У пациентов с очень хорошим цитогенетическим прогнозом медиана балла «Wells» ниже, чем в группе очень плохого прогноза без избытка бластов (2,5 против 6, $p < 0,05$) (Рисунок 45).

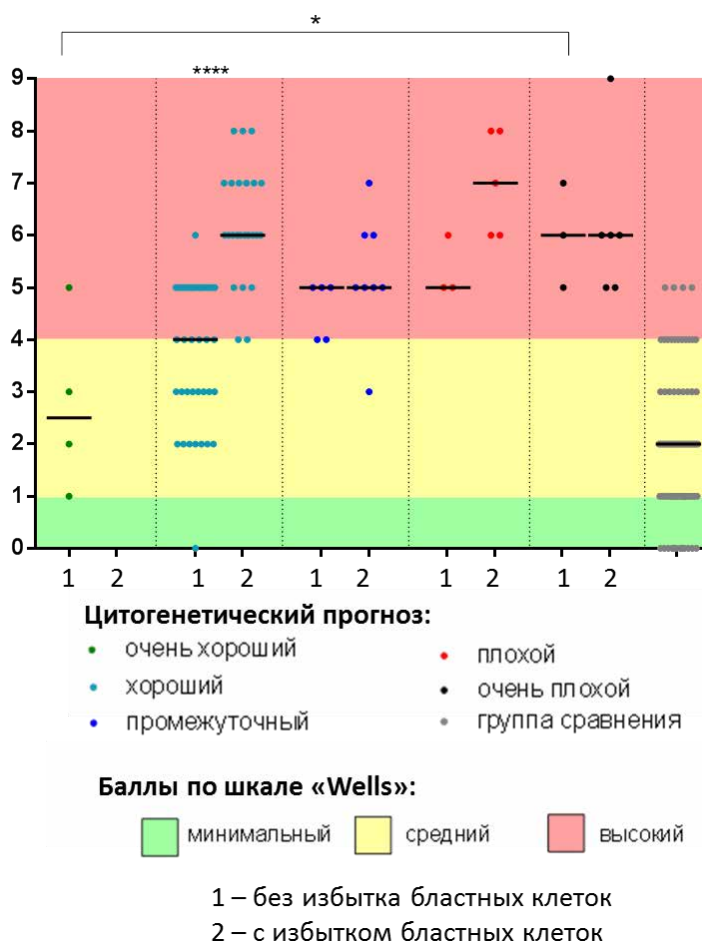


Рисунок 45 – Баллы «Wells» при разных цитогенетических прогнозах в зависимости от наличия избытка бластов. Звездочками указано наличие достоверных отличий (**** – $p \leq 0,0001$; * – $p < 0,05$)

Суммарный балл «Wells» зависит от количества аномальных миелоидных клеток (Таблица 8), поэтому мы оценили также долю $CD34^+$ миелоидных предшественников в разных группах цитогенетического прогноза в зависимости от наличия избытка бластов (Рисунок 46). Медианы доли $CD34^+$ клеток были выше в случае избытка бластных клеток, чем при отсутствии избытка бластов в группах хорошего (1,2% против 8,4%, $p < 0,0001$), промежуточного (1,2% против 6,6%, $p = 0,0016$) и плохого (2,2% против 13,7%, $p = 0,036$) цитогенетических прогнозов.

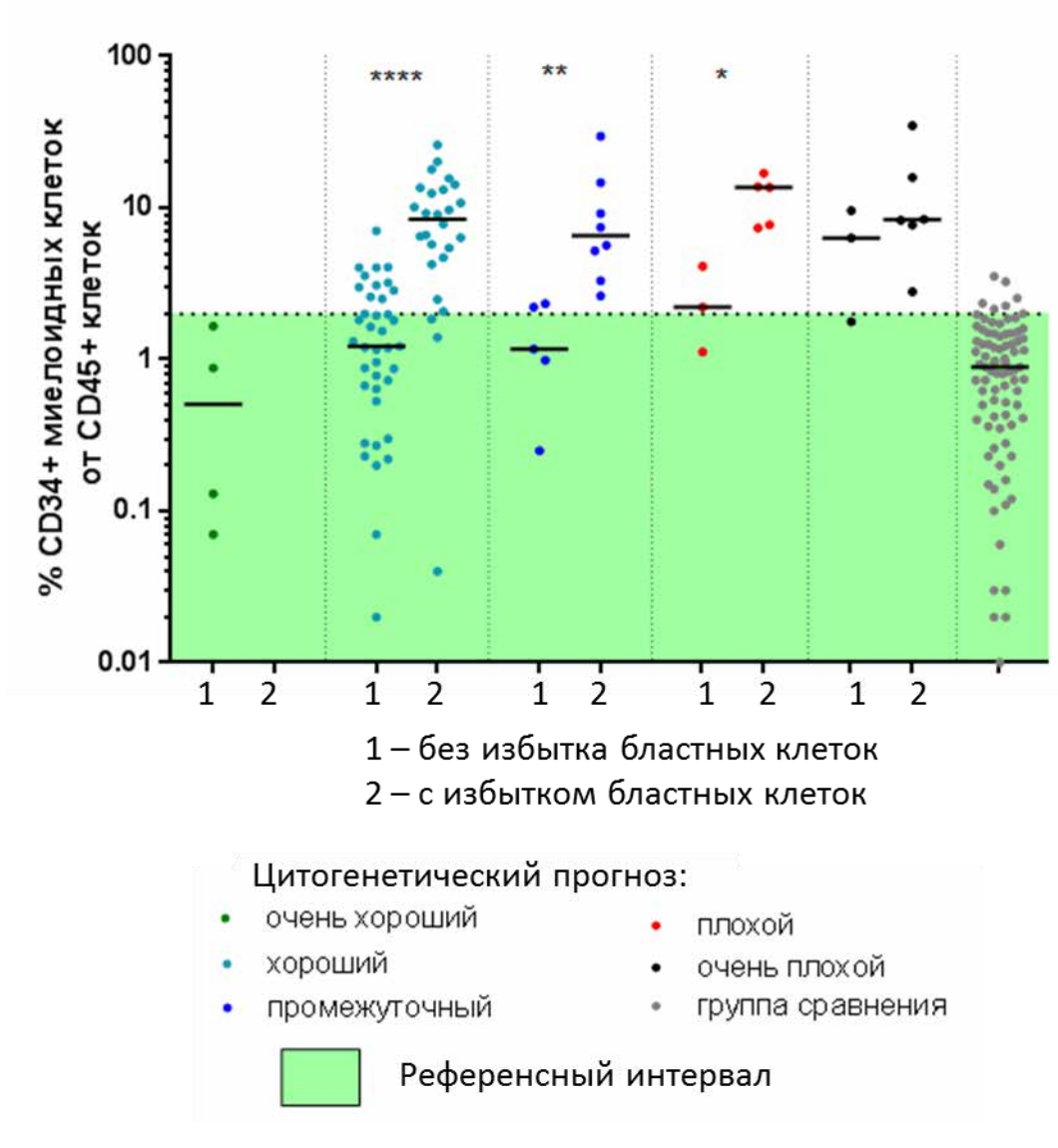


Рисунок 46 – Доля $CD34^+$ миелоидных клеток при разных цитогенетических прогнозах в зависимости от наличия избытка бластов. Звездочками указано наличие достоверных отличий (**** – $p \leq 0,0001$; ** – $p \leq 0,01$; * – $p < 0,05$)

Среди пациентов без избытка бластных клеток повышение доли $CD34^+$ миелоидных клеток ($\geq 2\%$) было у 12 (30,8%) из 39 МДС хорошего риска; 2 (40%) из 5 промежуточного риска, а также 2 (66,7%) из 3 плохого и очень плохого рисков. В группе очень хорошего цитогенетического риска ни у кого не было превышения $CD34^+$ миелоидных клеток $\geq 2\%$ (Рисунок 46). Как было показано в исследовании Т. Ченг-Лианг и соавт. (2018), в средней группе риска IPSS-R у пациентов с большей долей $CD34^+$ миелоидных клеток вероятность

трансформации в ОМЛ выше, а ОВ – ниже [29]. Можно предположить, что прогноз у пациентов хорошего и промежуточного цитогенетических рисков может быть уточнен с помощью данных проточной цитометрии: доли CD34⁺ миелоидных клеток или результатами цитометрических шкал дисмиелопоэза, так как нами получена неоднородность в этих параметрах у пациентов с МДС этих цитогенетических групп.

Таким образом, нами была показана взаимосвязь между цитометрическими шкалами дисмиелопоэза с цитогенетическим прогнозом и риском IPSS-R. У пациентов с МДС высокого и очень высокого рисков по шкале IPSS-R балл по шкале «Wells» был выше, чем при МДС очень низкого, низкого и среднего рисков. Только при МДС очень низкого, низкого и среднего рисков были получены оценки «А» по объединенной шкале «Ogata-Wells». Баллы по шкале «Wells» были гетерогенны (от 2 до 8) в когорте пациентов с МДС промежуточного цитогенетического прогноза, а также низкого и среднего рисков по шкале IPSS-R. Повышенная доля CD34⁺ миелоидных клеток обнаруживалась у части пациентов с МДС без избытка бластных клеток хорошего, промежуточного, плохого и очень плохого цитогенетических рисков. Вероятно, полученные результаты могут указывать, что внутри групп цитогенетического прогноза и риска по шкале IPSS-R могут быть выделены подгруппы с разным «цитометрическим прогнозом».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Миелодиспластические синдромы вызывают трудности в диагностике вследствие гетерогенности клинико-лабораторных симптомов. Необходимо выполнение комплекса разнообразных лабораторных исследований, а также тщательного обследования и наблюдения за пациентом для проведения дифференциальной диагностики МДС и других состояний, характеризующихся цитопениями. Основными лабораторными признаками МДС являются морфологические признаки дисплазии гранулоцитарного, эритроидного и/или мегакариоцитарного рядов (не менее 10% клеток с дисплазией в пределах одного ростка), избыток бластных клеток (2-19% в периферической крови, 5-19% в пунктате костного мозга) и/или $\geq 15\%$ кольцевых сидеробластов (или $\geq 5\%$ кольцевых сидеробластов в присутствии мутации гена *SF3B1*). Однако наличие морфологических признаков дисплазии не означает наличие МДС. Нейтрофилы, эритрокариоциты, мегакариоциты с признаками дисплазии могут обнаруживаться при различных гематологических и негематологических заболеваниях [6; 86].

В случае отсутствия значимых морфологических признаков дисплазии диагноз МДС может быть подтвержден при наличии типичных для МДС aberrаций, таких как моносомии 5, 7, 13 хромосом (или *del(7q)*, *del(5q)*, *del(13q)*), *t(11;16)*, *t(3;21)*, *t(1;3)* и др (Таблица 5). Наличие неспецифических цитогенетических aberrаций не позволяет установить диагноз МДС при отсутствии других признаков МДС. Так, потеря Y-хромосомы может являться возраст-ассоциированным феноменом, а трисомия 8 и *del(20q)* нередко обнаруживаются у больных апластической анемией [86].

При отсутствии очевидных морфологических признаков МДС и типичных цитогенетических аномалий рекомендуют провести дополнительные исследования: гистологическое и иммуногистохимическое исследование трепанобиоптата, иммунофенотипирование клеток КМ методом МПЦ или молекулярное исследование, позволяющее подтвердить наличие клональной популяции миелоидных клеток. В таком диагностическом плане гистологическое

исследование выступает в роли дополнительного метода, однако многие исследователи рекомендуют проводить данное исследование у всех пациентов при подозрении на наличие МДС, так как этот метод позволяет исключить другие миелоидные или лимфоидные гематологические заболевания, метастатическое поражение костного мозга и др. Метод МПЦ был рекомендован как дополнительный в диагностике МДС в 2007 году [55]. Основным его недостатком является низкая стандартизация вследствие того, что не существует одного универсального критерия, который позволил бы судить о наличии МДС. Для подробного анализа необходимо исследовать экспрессию большого числа антигенов на разных клеточных субпопуляциях (ранних предшественниках миелопоэза, гранулоцитах, моноцитах, эритрокариоцитах и т.д.), что привело к появлению разного рода диагностических и прогностических цитометрических шкал («Ogata score», «Wells», «красная оценка» и объединенный шкалы «Ogata-Wells» с учетом и без учета цитометрических аномалий в эритроидных клетках).

В наше исследование было включено 102 пациента с МДС (разных нозологических форм по классификации ВОЗ 2017, разным цитогенетическим прогнозом и риском по шкале IPPS-R) и 83 пациента с цитопениями, но без диагноза МДС (группа сравнения). Каждому пациенту проведено иммунофенотипирование клеток КМ методом проточной цитометрии и изучены компартменты миелоидных и В-клеточных предшественников, гранулоцитов и моноцитов. Референсные интервалы получены на основе анализа костного мозга 35 здоровых доноров. На основе качества и количества цитометрических aberrаций были получены оценки по шкалам «Ogata score», «Wells» и «Ogata-Wells».

По результатам анализа частот выявления цитометрических аномальных признаков показано, что не существует универсального признака, который бы встречался с высокой частотой при всех вариантах МДС и не встречался в группе сравнения. Однако нами были выявлены некоторые закономерности. При МДС с избытком бластных клеток доля пациентов с повышенным количеством CD34⁺ миелоидных (более 2% от CD45⁺ клеток) и CD117⁺ клеток (более 5,35%) была

выше, чем при других вариантах МДС. Повышенная доля CD7⁺ клеток среди CD34⁺ миелоидных предшественников (более 12,6%) при МДС с делецией 5q встречалась в 100% случаев, при других формах МДС – от 15,4% до 62,1%, а группе сравнения – только в 19,2% случаев ($p \leq 0,0001$). Повышенная же доля CD56⁺ клеток от CD34⁺ миелоидных предшественников (более 1,1%) значимо не отличалась в МДС и группе сравнения (Таблица 22). В компартменте гранулоцитов наиболее часто встречающимися aberrациями были аномальные паттерны гранулоцитов и повышенная доля CD56⁺ гранулоцитов (более 2,2%). Сниженный индекс гранулярности гранулоцитов (≤ 6) встречался у пациентов группы сравнения только в 3,6% случаев, что указывает на высокую специфичность данной аномалии, что подчеркивают также и другие исследователи [58]. Аномальные признаки в компартменте моноцитов встречались не так часто, как в компартменте ранних предшественников и гранулоцитов. Наиболее частой aberrацией среди моноцитов был аномальный паттерн «CD11b и HLA-DR», однако в группе сравнения он встречался в 23,2% случаев, что говорит о невысокой специфичности данного признака. Таким образом, не оставляет сомнений, что для более полного изучения признаков дисмиелопоэза необходимо исследовать экспрессию большого количества антигенов в основных клеточных компартментах, так как цитометрические аномалии встречаются с разной частотой при разных вариантах МДС, и кроме того, некоторые из них могут обнаруживаться и у пациентов без МДС.

Самой первой диагностической цитометрической шкалой стала «Ogata score», которая включала 4 параметра, а при отклонении от нормальных значений в 2-х из них и более делался вывод о наличии МДС [72]. В нашем исследовании не менее 2 баллов «Ogata score» было получено у 85,7%, 50%, 53,8%, 63,3%, 92,3%, 95,5% и 9,6% в группах МДС с 5q-, МДС-ЛД, МДС-КС, МДС-МД, МДС-ИБ-1, МДС-ИБ-2 и пациентов группы сравнения, соответственно. Диагностическая чувствительность и специфичность этой шкалы составили 77% и 90%.

Шкала «Wells», разработанная в 2003 году, имеет в большей степени прогностический характер и во многих исследованиях баллы по шкале «Wells» (от 0 до 9) коррелируют с цитогенетическим прогнозом и риском по шкале IPSS-R [32, 94]. В нашем исследовании медианы баллов «Wells» составили для МДС с 5q- – 3; МДС-ЛД – 2,5; МДС-КС – 4; МДС-МД – 5; МДС-ИБ-1 – 6; МДС-ИБ-2 – 6,5; а для группы сравнения – 2 ($p \leq 0,0001$). В группе хорошего цитогенетического прогноза МДС медиана балла по шкале «Wells» была выше, чем при плохом и очень плохом прогнозе (2,5 против 6 и 6, соответственно, $p < 0,05$). Медианы баллов «Wells» в группах высокого и очень высокого рисков по шкале IPSS-R были выше (6 и 6 баллов), чем в группах очень низкого, низкого и среднего рисков IPSS-R (3, 5 и 5 баллов, соответственно ($p < 0,05$)). В группах хорошего цитогенетического прогноза, а также низкого и среднего рисков IPSS-R балл «Wells» был распределен неравномерно. Возможно, цитометрические аномалии также могут иметь прогностическое значение, и их совмещение вместе с другими параметрами IPSS-R сможет уточнить прогноз у этих пациентов, разделив их на несколько подгрупп внутри одной категории IPSS-R. Это было показано во многих других исследованиях [16; 32; 58]. В нашей работе мы также определили оптимальный пороговый балл шкалы «Wells» для дискриминации пациентов с МДС и группы сравнения, который составил 4 балла, а чувствительность и специфичность составили 79% и 82%, соответственно.

В 2013 году была опубликована объединенная шкала, где с учетом балла по шкале «Ogata score», количества и качества aberrаций в компартаментах гранулоцитов и моноцитов делалось три варианта заключения: «А» – нет признаков МДС, «В» – есть некоторые признаки МДС и «С» – результаты соответствуют МДС [57]. В нашем исследовании суммы долей оценок «В» и «С» составили 85,7% у пациентов с МДС с 5q-; 50% - МДС-ЛД; 84,6% - МДС-КС; 73,4% - МДС-МД; 100% - МДС-ИБ-1; 100% - МДС-ИБ-2 и 2,4% у пациентов группы сравнения. Чувствительность и специфичность составили 87% и 87%, соответственно.

Наибольшие диагностические трудности вызывают МДС без избытка бластных клеток, кольцевых сидеробластов и типичных для МДС цитогенетических aberrаций. В наше исследование было включено 26 таких пациентов. В данной когорте пациентов чувствительности шкал снизились и составили для «Ogata score» и «Wells» 53,8%, а для объединенной шкалы «Ogata-Wells» – 65,4%. Эти данные свидетельствуют о том, что в первичной диагностике МДС целесообразно применять именно шкалу «Ogata-Wells», так как она имеет наибольшую чувствительность из изучаемых в данной работе шкал и позволяет выявить цитометрические признаки дисмиелопоэза у 65,4% пациентов с МДС без избытка бластных клеток, кольцевых сидеробластов и типичных для МДС цитогенетических aberrаций.

При сопоставлении данных цитометрического исследования с цитогенетическими aberrациями было показано, что значимых отличий в оценках по шкале «Ogata-Wells» в группах пациентов с МДС с цитогенетическими aberrациями и без них не было. Однако были выявлены некоторые закономерности. Нормальная доля CD34⁺ В-клеточных предшественников выявлялась преимущественно в группах МДС без цитогенетических aberrаций и с неспецифическими для МДС aberrациями в случае отсутствия избытка бластных клеток. Доля CD34⁺ миелоидных предшественников была выше при МДС с избытком бластов вне зависимости от цитогенетических aberrаций. Для пациентов с МДС с del(5q) и типичными aberrациями без избытка бластных клеток характерна высокая доля CD34⁺ миелоидных клеток с ко-экспрессией CD7 (25,5% и 21,2%, соответственно), которая снижается в случаях с такими же цитогенетическими аномалиями, но с избытком бластов (13,45% и 3,8%, соответственно, $p < 0,05$). Для МДС с 5q- характерны сниженный индекс гранулярности гранулоцитов и низкая частота встречаемости других цитометрических аномалий среди гранулоцитов. Аномальные паттерны созревания гранулоцитов, высокая доля гранулоцитов с ко-экспрессией CD14 и/или CD56 чаще обнаруживаются у пациентов с избытком бластов и/или с типичными для МДС aberrациями. В компартменте моноцитов значимо

отличалась только их доля и индекс гранулярности в зависимости от наличия избытка бластов.

Сравнительный анализ данных гистологического и цитометрического исследований показал высокую степень сходимости результатов (в 78,2% случаев показано наличие и цитометрических, и гистологических признаков МДС; в 5,7% признаки МДС отсутствовали в результате обоих исследований; в 5,7% присутствовали только гистологические признаки МДС, в 10,4% – только цитометрические). В группе МДС без избытка бластных клеток, кольцевых сидеробластов и типичных цитогенетических для МДС aberrаций совпадение результатов гистологического и цитометрического методов составило 65,3%, только гистологические признаки МДС присутствовали в 21,7%, а только цитометрические – в 13% случаев. Таким образом, гистологическое и цитометрическое исследование являются взаимодополняющими методами.

При сопоставлении данных цитометрического анализа с цитологическими признаками дисплазии не удалось выявить закономерности в частотах встречаемости аномальных признаков гранулоцитов со степенью дисгранулоцитопоза. Отсутствие цитометрических признаков дисплазии было отмечено преимущественно у пациентов с МДС с гипоклеточным пунктатом костного мозга и изолированными признаками дизэритропоза. Поэтому введение в цитометрический анализ компартамента эритрокариоцитов может способствовать увеличению чувствительности метода. Было также отмечено, что в случаях гипопластичного костного мозга цитологическая оценка дисплазии затруднена: отсутствует достаточное для подсчета количество эритрокариоцитов и мегакариоцитов, а гранулоциты часто представлены преимущественно зрелыми формами. В таких случаях (а также при отсутствии избытка бластов, кольцевых сидеробластов, дисплазии эритроидного и мегакариоцитарного рядов и типичных для МДС цитогенетических aberrаций) признаки МДС были выявлены цитометрическим методом в 77,7% случаев.

Таким образом, нами была подобрана комбинация моноклональных антител, которая позволяет оценить наличие иммунофенотипических аномалий в

компартементе незрелых предшественников, а также гранулоцитов и моноцитов и установить наличие признаков МДС. Был проведен комплекс цитологического, цитогенетического и гистологического исследований у большой когорты пациентов с МДС разных нозологических форм по классификации ВОЗ 2017 и группы сравнения (пациентов не с МДС). Впервые определена диагностическая значимость цитометрических шкал дисмиелопоэза и оптимальной для первичной диагностики выбрана объединенная шкала «Ogata-Wells».

Можно сделать вывод о том, что, МДС – это гетерогенная группа заболеваний, требующая комплексного подхода в верификации диагноза, и введение в алгоритм обследования пациентов метода многоцветной проточной цитофлуориметрии может улучшить качество диагностики. Для определения когорты пациентов, для которых метод МПЦ будет входить в обязательные диагностические методы, необходимо продолжить исследование.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что метод многоцветной проточной цитометрии с использованием оригинального сочетания моноклональных антител выявляет признаки дисмиелопоэза у 94,7% больных МДС с выраженными цитологическими и цитогенетическими признаками дисплазии и у 65,4% больных МДС с отсутствием характерных цитологических и цитогенетических изменений.
2. Выявлено, что профиль аномальных цитометрических признаков дисмиелопоэза зависит от варианта МДС. Увеличенное количество ($\geq 2\%$) CD34⁺ миелоидных клеток встречалось с большей частотой при МДС с избытком бластов-1 (92,3%) и МДС с избытком бластов-2 (100%) по сравнению с другими вариантами: МДС с 5q- (28,5%), МДС с линейной дисплазией (25,0%), МДС с кольцевыми сидеробластами (30,8%) и МДС с мультилинейной дисплазией (36,7%) ($p < 0,05$). Сниженный индекс гранулярности гранулоцитов и повышенная доля CD34⁺CD7⁺ клеток наиболее характерны для МДС с 5q-.
3. Доказано, что оптимальной цитометрической шкалой для диагностики МДС является объединенная шкала «Ogata-Wells», у которой показатели чувствительности и специфичности составили 87,3% и 87,6%, соответственно.
4. Установлено совпадение результатов цитометрического и гистологического исследований костного мозга по оценке дисмиелопоэза (в 83,9% случаев), при этом не выявлено отличий в цитометрической оценке в зависимости от наличия цитогенетических aberrаций и степенью дисгранулоцитопоэза, определенной цитологическим методом.
5. Обнаружена взаимосвязь цитометрических шкал с цитогенетическими прогностическими группами и шкалой риска IPSS-R. Частота оценки «С» по шкале «Ogata-Wells» была выше у пациентов в группах плохого и очень плохого цитогенетического прогноза по сравнению с пациентами из группы очень хорошего прогноза (100% против 25%, $p < 0,05$), а также из группы высокого и очень высокого рисков по IPSS-R.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АА – апластическая анемия;
- АИГА – аутоиммунная гемолитическая анемия;
- БГЛ – лимфома из больших гранулярных лимфоцитов;
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека;
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;
- ГС – группа сравнения;
- ГСК – гемопоэтические стволовые клетки;
- ГФИ-якорь – гликозилфосфатидилинозитольный якорь;
- ДВККЛ – диффузная В-крупноклеточная лимфома;
- ЖДА – железодефицитная анемия;
- ИГ – индекс гранулярности;
- ИТП – иммунная тромбоцитопения;
- КМ – костный мозг;
- ЛКМЗ – лимфома из клеток мантийной зоны;
- ЛМЗ – лимфома маргинальной зоны;
- МВ – макроглобулинемия Вальденстрема;
- МДС – миелодиспластические синдромы;
- МДС с 5q- – МДС с изолированной делецией длинного плеча 5-й хромосомы;
- МДС-ИБ-1 – МДС с избытком бластов-1;
- МДС-ИБ-2 – МДС с избытком бластов-2;
- МДС-КС – МДС с кольцевыми сидеробластами;
- МДС-ЛД – МДС с линейной дисплазией;
- МДС-МД – МДС с мультилинейной дисплазией;
- МПЦ – многоцветная проточная цитофлуориметрия;
- НГА – наследственная гемолитическая анемия (неуточненная);
- НДА – наследственная дизэритропоэтическая анемия;
- НК-клетки – клетки натуральные киллеры;
- НМГА – наследственная микросфероцитарная гемолитическая анемия;

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз;
отн. ед. – относительные единицы;
ПНГ – пароксизмальная ночная гемоглобинурия;
РА – рефрактерная анемия;
РАИБ – рефрактерная анемия с избытком бластов;
РАКС – рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами;
РИ – референсный интервал;
РЦМД – рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией;
СИФ – средняя интенсивность флуоресценции;
СОФ – стандартное отклонение флуоресценции;
СЦИ – стандартное цитогенетическое исследование;
США – Соединённые Штаты Америки;
ХМПЗ – хронические миелопролиферативные заболевания;
ЭДТА-КЗ – этилендиаминтетраацетат калия 3-х замещенный;
APC – allophycocyanine (алофикоцианин);
APC-Cy7 – allophycocyanine-cyanine 7 (алофикоцианин-цианин 7);
В12-ДА – В12-дефицитная анемия;
CD – clusters of differentiation (кластер-дифференцировочный антиген);
ELN – European Leukemia Net (Европейское общество по изучению лейкозов);
FISH – fluorescence *in situ* hybridization (флуоресцентная гибридизация *in situ*);
FITC – fluorescein isothiocyanate (флуоресцеин изотиоцианат);
FSC – forward scatter (прямое светорассеяние);
Hb – hemoglobin (гемоглобин);
HLA-DR – Human Leukocyte Antigens DR (человеческие лейкоцитарные антигены DR);
IPSS – International Prognostic Scoring System (интернациональная прогностическая шкала);
IPSS-R – Revised International Prognostic Scoring System (пересмотренная интернациональная прогностическая шкала);
PE – phycoerythrin (фикоэритрин);

PE-Cy7 – phycoerythrin-cyanine 7 (фикоэритрин-цианин 7);

PerCP-Cy5.5 – Peridinin Chlorophyll Protein Complex - cyanine 5.5 (перидинин-хлорофилл протеин – цианин 5.5);

ROC – receiver operating characteristic (рабочая характеристика приёмника);

SF3B1 – subunit 1 of the splicing factor 3b protein complex (субъединица 1 фактора сплайсинга 3b);

SSC – side scatter (боковое светорассеяние);

WPSS – WHO Classification-based Prognostic Scoring System (прогностическая балльная система ВОЗ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гребенюк, Л. А. Аномалии хромосом 5, 7, 11 и 17 в комплексном кариотипе при миелодиспластических синдромах и острых миелоидных лейкозах / Л. А. Гребенюк, Т. Н. Обухова, Е. Н. Паровичникова, Г. А. Алимova, Л. А. Шишигина, В. В. Троицкая, А. В. Кохно, В. Г. Савченко // Медицинская генетика. – 2018. – Т. 17. – № 6. – с. 39–47.
2. Грицаев, С. В. Прогностический потенциал морфологических и цитогенетических показателей у больных с миелодиспластическим синдромом / С. В. Грицаев, И. С. Мартынкевич, К. М. Абдулкадыров, С. А. Тиранова, М.П. Бакай, Л.С. Мартыненко, Л.А. Дзявго // Терапевтический архив. – 2005. – Т. 77. – № 7. – с. 22–27.
3. Двирнык, В. Н. Вторичный дисмиелопоэз у больных миелодиспластическими синдромами / В. Н. Двирнык, А. В. Кохно, Е. Н. Паровичникова // Терапевтический архив. – 2014. – Т. 86. – № 7. – с. 97–103.
4. Двирнык, В. Н. Особенности дисмиелопоэза у больных миелодиспластическими синдромами после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток / В. Н. Двирнык, Л. А. Кузьмина, А. В. Кохно, Э. Г. Гемджян, Е. Н. Паровичникова // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59. – № S1. – с. 91–92.
5. Зельцер, А. Н. Миелодиспластический синдром: трудности и успехи диагностики / А. Н. Зельцер, С. В. Морданов, И. В. Снежко, Ю. В. Шатохин, О. Н. Шатохина // Журнал фундаментальной медицины и биологии. – 2017. – Т. 1. – с. 27–37.
6. Ковригина, А.М. Пересмотренная Классификация ВОЗ опухолей гемопоэтической и лимфоидной ткани, 2017 (4-е издание): миелоидные неоплазии / А. М. Ковригина // Архив патологии. – 2018. – Т. 6. – № 3. – с. 127–134.
7. Ковригина, А. М. Принципы патоморфологической дифференциальной

диагностики миелодиспластических синдромов / А. М. Ковригина, С. А. Глинкина, В. В. Байков // клиническая онкогематология. – 2015. – Т. 8. – № 1. – с. 62–68.

8. Кохно, А. В. Миелодиспластический синдром / А. В. Кохно, Е. Н. Паровичникова, В. Г. Савченко // Клиническая геронтология. – 2009. – Т. 15. – № 3. – с. 33–46.

9. Кохно, А. В. Выявление скрытых аномалий кариотипа при миелодиспластическом синдроме / А. В. Кохно, М. А. Пименова, Е. Н. Паровичникова, Е. В. Домрачева, В. Г. Савченко // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59. – № 1. – с. 25–28.

10. Паровичникова, Е. Н. Хромосомные аномалии в кроветворных и стромальных клетках-предшественницах при миелодиспластическом синдроме / Е. Н. Паровичникова, М. А. Пименова, А. В. Кохно, В. Г. Савченко // Гематология и трансфузиология. – 2013. – Т. 58. – № 4. – с. 33–40.

11. Пименова, М. А. Цитогенетическая характеристика гемопоэтических и стромальных клеток-предшественниц при миелодиспластическом синдроме / М. А. Пименова, Е. Н. Паровичникова, А. В. Кохно, Е. В. Домрачева, Т. Е. Манакова, Ю. С. Мальцева, М. Л. Коннова, Л. А. Шишигина, В. Г. Савченко // Терапевтический архив (архив до 2018 г.). – 2013. – Т. 85. – № 7. – с. 34–42.

12. Савченко, В. Г. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению миелодиспластических синдромов взрослых (2015 г.) / В. Г. Савченко, Е. Н. Паровичникова, А. В. Кохно, С. В. Семочкин, Б. В. Афанасьев, Е. В. Морозова, С. В. Грицаев, Г. А. Дудина, А. Д. Ширин, Т. С. Константинова, О. С. Самойлова, Ю. В. Шатохин, В. В. Троицкая, Л. А. Кузьмина, Т. Н. Обухова, В. Н. Двирнык, А. М. Ковригина, В. В. Байков // Гематология и трансфузиология. – 2016. – Т. 61. – № 1S(4). – с. 1–32.

13. Семочкин, С. В. Миелодиспластические синдромы: терапевтические проблемы и решения (обзор литературы) / С. В. Семочкин, Т. Н. Толстых, А. Г.

Румянцев // Онкогематология. – 2014. – Т. 7. – № 2. – с. 57–66.

14. Aanei, C. M. Diagnostic Utility of Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes / C. M. Aanei, T. Picot, E. Tavernier, D. Guyotat, L. Campos Catafal // *Front. Oncol.* – 2016. – vol. 6. – p. 161.

15. Aires, A. A. Pilot study on the usefulness of peripheral blood flow cytometry for the diagnosis of lower risk myelodysplastic syndromes: the “MDS thermometer” / A. Aires, M. D. A. Teixeira, C. Lau, C. Moreira, A. Spínola, A. Mota, I. Freitas, J. Coutinho, M. Lima // *BMC Hematol.* – 2018. – vol. 18. – № 1. – p. 6.

16. Alhan, C. High flow cytometric scores identify adverse prognostic subgroups within the revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. / C. Alhan, T. M. Westers, E. M. P. Cremers, C. Cali, B. I. Witte, G. J. Ossenkoppele, A. A. van de Loosdrecht // *Br. J. Haematol.* – 2014. – vol. 167. – № 1. – pp. 100–109.

17. Alhan, C. Absence of aberrant myeloid progenitors by flow cytometry is associated with favorable response to azacitidine in higher risk myelodysplastic syndromes / C. Alhan, T. M. Westers, L. H. van der Helm, C. Eeltink, G. Huls, B. I. Witte, F. Buchi, V. Santini, G. J. Ossenkoppele, A. A. van de Loosdrecht // *Cytom. Part B Clin. Cytom.* – 2014. – vol. 86. – № 3. – pp. 207–215.

18. Arber, D.A. Reclassifying myelodysplastic syndromes: what’s where in the new WHO and why. / D. A. Arber, R. P. Hasserjian // *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.* – 2015. – vol. 2015. – № 1. – pp. 294–298.

19. Bardet, V. Multicentric study underlining the interest of adding CD5, CD7 and CD56 expression assessment to the flow cytometric Ogata score in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms / V. Bardet, O. Wagner-Ballon, J. Guy, C. Morvan, C. Debord, F. Trimoreau, E. Benayoun, N. Chapuis, N. Freynet, C. Rossi, S. Mathis, M.-P. Gourin, A. Toma, M. C. Bene, J. Feuillard, E. Guerin, Groupe Francophone des Myélodysplasies (GFM), Groupe d’Etude Immunologique des Leucémies (GEIL) // *Haematologica.* – 2015. – vol. 100. – № 4. – pp. 472–478.

20. Bejar, R. Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes / R. Bejar, K. Stevenson, O. Abdel-Wahab, N. Galili, B. Nilsson, G. Garcia-Manero, H. Kantarjian, A. Raza, R. L. Levine, D. Neuberg, B. L. Ebert // *N. Engl. J. Med.* – 2011. – vol. 364. – № 26. – pp. 2496–2506.
21. Bellos, F. Flow cytometry in the diagnosis of myelodysplastic syndromes (MDS) and the value of myeloid nuclear differentiation antigen (MNDA) / F. Bellos, W. Kern // *Cytom. Part B Clin. Cytom.* – 2014. – n/a-n/ac.
22. Bennett, J. M. The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia: Proposals by the French - American - British Cooperative Leukaemia Group / J. M. Bennett, D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. G. Galton, H. Gralnick, C. Sultan, C. Cox // *Br. J. Haematol.* – 1994. – vol. 87. – № 4. – pp. 746–754.
23. Bennett, J. M. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes / J. M. Bennett, D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. G. Galton, H. R. Gralnick, C. Sultan // *Br. J. Haematol.* – 1982. – vol. 51. – № 2. – pp. 189–199.
24. Bento, L. C. The Use of Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes: A Review / L. C. Bento, R. P. Correia, C. L. Pitangueiras Mangueira, R. De Souza Barroso, F. A. Rocha, N. S. Bacal, L. C. Marti // *Front. Oncol.* – 2017. – vol. 7– p. 270.
25. Bernasconi, P. Is FISH a relevant prognostic tool in myelodysplastic syndromes with a normal chromosome pattern on conventional cytogenetics? A study on 57 patients / P. Bernasconi, P. M. Cavigliano, M. Boni, S. Calatroni, C. Klersy, I. Giardini, B. Rocca, N. Crosetto, M. Caresana, M. Lazzarino, C. Bernasconi // *Leukemia.* – 2003. – vol. 17. – vol. 11. – pp. 2107–2112.
26. Bowen, D. Guidelines for the diagnosis and therapy of adult myelodysplastic syndromes. / D. Bowen, D. Culligan, S. Jowitt, S. Kelsey, G. Mufti, D. Oscier, J. Parker // *Br. J. Haematol.* – 2003. – vol. 120. – № 2. – pp. 187–200.
27. Burbury, K. L. Role of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: diagnosis, classification, prognosis and response assessment. / K. L. Burbury, D. A. Westerman //

Leuk. Lymphoma. – 2014. – vol. 55. – № 4. – pp. 749–760.

28. Chabannon, C. Expression of CD7 on normal human myeloid progenitors. / C. Chabannon, P. Wood, B. Torok-Storb // J. Immunol. – 1992. – vol. 149. – № 6. – pp. 2110–2113.

29. Chen-Liang, T.-H. An increased percentage of myeloid CD34+ bone marrow cells stratifies intermediate IPSS-R myelodysplastic syndrome patients into prognostically significant groups / T.-H. Chen-Liang, A. M. Casado-Prieto, V. Campos-Rodríguez, A. M. Hurtado, M. L. Amigo, M. D. García-Malo, V. Vicente, F. J. Ortuño, A. Jerez // Int. J. Lab. Hematol. – 2018. – vol. 40. – № 5. – pp. 549–555.

30. Chen, X. Immunophenotypic Features of Myeloid Neoplasms Associated with Chromosome 7 Abnormalities. / X. Chen, B. L. Wood, S. Cherian // Cytometry B. Clin. Cytom. – 2019. – vol. 96. – № 4. – pp. 300–309.

31. Chen, Z. Low-Grade Myelodysplastic Syndromes with preserved CD34+ B-Cell Precursors (CD34+ hematogones). / Z. Chen, C. Y. Ok, W. Wang, M. Goswami, G. Tang, M. Routbort, J. L. Jorgensen, L. J. Medeiros, S. A. Wang // Cytometry B. Clin. Cytom. – 2020. – vol. 98. – №1. – pp. 36–42.

32. Chu, S.-C. Flow cytometric scoring system as a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes / S.-C. Chu, T.-F. Wang, C.-C. Li, R.-H. Kao, D.-K. Li, Y.-C. Su, D. A. Wells, M. R. Loken // Leuk. Res. – 2011. – vol. 35. – № 7. – pp. 868–873.

33. Chung, J.-W. A combination of CD15/CD10, CD64/CD33, CD16/CD13 or CD11b flow cytometric granulocyte panels is sensitive and specific for diagnosis of myelodysplastic syndrome. / J.-W. Chung, C.-J. Park, C.-H. Cha, Y.-U. Cho, S. Jang, H.-S. Chi, E.-J. Seo, J.-H. Lee, J.-H. Lee, K.-H. Lee, H. J. Im, J.-J. Seo // Ann. Clin. Lab. Sci. – 2012. – vol. 42. – № 3. – pp. 271–280.

34. Cremers, E. M. P. Implementation of erythroid lineage analysis by flow cytometry in diagnostic models for myelodysplastic syndromes. / E. M. P. Cremers, T. M. Westers, C. Alhan, C. Cali, H. A. Visser-Wisselaar, D. A. Chitu, V. H. J. van der Velden, J. G. Te Marvelde, S. K. Klein, P. Muus, E. Vellenga, G. E. de Greef, M.-C. C.

- J. C. Legdeur, P. W. Wijermans, M. J. P. L. Stevens-Kroef, P. da Silva-Coelho, J. H. Jansen, G. J. Ossenkoppele, A. A. van de Loosdrecht, A study on behalf of the HOVON89 study group // *Haematologica*. – 2017. – vol. 102. – № 2. – pp. 320–326.
35. Cremers, E. M. P. Multiparameter flow cytometry is instrumental to distinguish myelodysplastic syndromes from non-neoplastic cytopenias. / E. M. P. Cremers, T. M. Westers, C. Alhan, C. Cali, M. J. Wondergem, P. J. Poddighe, G. J. Ossenkoppele, A. A. van de Loosdrecht // *Eur. J. Cancer*. – 2016. – vol. 54. – pp. 49–56.
36. Davis, B. H. U.S.-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: medical indications. / B. H. Davis, K. Foucar, W. Szczarkowski, E. Ball, T. Witzig, K. A. Foon, D. Wells, P. Kotylo, R. Johnson, C. Hanson, D. Bessman // *Cytometry*. – 1997. – vol. 30. – № 5– pp. 249–263.
37. Duetz, C. Clinical Implication of Multi-Parameter Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes. / C. Duetz, T. M. Westers, A. A. van de Loosdrecht // *Pathobiology*. – 2019. – vol. 86. – № 1– pp. 14–23.
38. Eidenschink Brodersen, L. Assessment of erythroid dysplasia by “difference from normal” in routine clinical flow cytometry workup. / L. Eidenschink Brodersen, A. J. Menssen, J. R. Wangen, C. F. Stephenson, M. E. de Baca, B. K. Zehentner, D. A. Wells, M. R. Loken // *Cytometry B. Clin. Cytom.* – 2015. – vol. 88. – № 2. – pp. 125–135.
39. Giagounidis, A. Morphology, cytogenetics and classification of MDS. / A. Giagounidis, D. Haase // *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* – 2013. – vol. 26. – № 4. – pp. 337–353.
40. Gong, P. Aberrant expression of CD56 on granulocytes and monocytes in myeloproliferative neoplasm / P. Gong, F. Metrebian, A. Dulau-Florea, Z.-X. Wang, R. Bajaj, G. Gulati, S. C. Peiper, J. Z. Gong // *J. Hematop.* – 2013. – vol. 6. – № 3. – 127–134.
41. Greenberg, P. International scoring system for evaluating prognosis in

myelodysplastic syndromes. / P. Greenberg, C. Cox, M. M. LeBeau, P. Fenaux, P. Morel, G. Sanz, M. Sanz, T. Vallespi, T. Hamblin, D. Oscier, K. Ohyashiki, K. Toyama, C. Aul, G. Mufti, J. Bennett // *Blood*. – 1997. – vol. 89. – № 6. – pp. 2079–2088.

42. Greenberg, P. L. Myelodysplastic Syndromes, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. / P. L. Greenberg, R. M. Stone, A. Al-Kali, S. K. Barta, R. Bejar, J. M. Bennett, H. Carraway, C. M. De Castro, H. J. Deeg, A. E. DeZern, A. T. Fathi, O. Frankfurt, K. Gaensler, G. Garcia-Manero, E. A. Griffiths, D. Head, R. Horsfall, R. A. Johnson, M. Juckett, V. M. Klimek, R. Komrokji, L. A. Kujawski, L. J. Maness, M. R. O'Donnell, D. A. Pollyea, P. J. Shami, B. L. Stein, A. R. Walker, P. Westervelt, A. Zeidan, D. A. Shead, C. Smith // *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* – 2017. – vol. 15. – № 1. – pp. 60–87.

43. Greenberg, P. L. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. / P. L. Greenberg, H. Tuechler, J. Schanz, G. Sanz, G. Garcia-Manero, F. Solé, J. M. Bennett, D. Bowen, P. Fenaux, F. Dreyfus, H. Kantarjian, A. Kuendgen, A. Levis, L. Malcovati, M. Cazzola, J. Cermak, C. Fonatsch, M. M. Le Beau, M. L. Slovak, O. Krieger, M. Luebbert, J. Maciejewski, S. M. M. Magalhaes, Y. Miyazaki, M. Pfeilstöcker, M. Sekeres, W. R. Sperr, R. Stauder, S. Tauro, P. Valent, T. Vallespi, A. A. van de Loosdrecht, U. Germing, D. Haase // *Blood* – 2012. – vol. 120. – № 12. – pp. 2454–2465.

44. Gupta, V. Clinical relevance of cytogenetic abnormalities at diagnosis of acquired aplastic anaemia in adults / V. Gupta, C. Brooker, J. A. Tooze, Q. Yi, D. Sage, D. Turner, P. Kangasabapathy, J. C. W. Marsh // *Br. J. Haematol.* – 2006. – vol. 134. – № 1. – pp. 95–99.

45. Haase, D. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. / D. Haase, U. Germing, J. Schanz, M. Pfeilstöcker, T. Nösslinger, B. Hildebrandt, A. Kundgen, M. Lübbert, R. Kunzmann, A. A. N. Giagounidis, C. Aul, L. Trümper, O. Krieger, R. Stauder, T. H. Müller, F. Wimazal, P. Valent, C. Fonatsch, C. Steidl // *Blood*. – 2007. – vol. 110. – № 13. – pp. 4385–4395.

46. Hofmann, W.-K. Myelodysplastic Syndrome / W.-K. Hofmann, H. P. Koeffler // *Annu. Rev. Med.* – 2005. – vol. 56. – № 1. – pp. 1–16.
47. Hong, M. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myelodysplastic syndromes / M. Hong, G. He // *J. Transl. Intern. Med.* – 2017. – vol. 5. – № 3. – pp. 139–143.
48. Horny, H.-P. Diagnostic value of histology and immunohistochemistry in myelodysplastic syndromes / H.-P. Horny, K. Sotlar, P. Valent // *Leuk. Res.* – 2007. – vol. 31. – № 12. – pp. 1609–1616.
49. Jaso, J. M. Multi-color flow cytometric immunophenotyping for detection of minimal residual disease in AML: past, present and future. / J. M. Jaso, S. A. Wang, J. L. Jorgensen, P. Lin // *Bone Marrow Transplant.* – 2014. – vol. 49. – № 9. – pp. 1129–1138.
50. Jorgensen, J. L. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia: methods and best applications. / J. L. Jorgensen, S. S. Chen // *Clin. Lymphoma. Myeloma Leuk.* – 2011. – vol. 11. Suppl 1. – pp. S49-53.
51. Kárai, B. Flow Cytometry in the Diagnosis of Myelodysplastic Syndromes. / B. Kárai, E. Szánthó, J. Kappelmayer, Z. Hevessy // *EJIFCC* – 2013. – vol. 2.3 – № 4. – pp. 109–116.
52. Keerthivasan, G. Aberrant overexpression of CD14 on granulocytes sensitizes the innate immune response in mDial heterozygous del(5q) MDS. / G. Keerthivasan, Y. Mei, B. Zhao, L. Zhang, C. E. Harris, J. Gao, A. A. Basiorka, M. J. Schipma, J. McElherne, J. Yang, A. K. Verma, A. Pellagatti, J. Boulwood, A. F. List, D. A. Williams, P. Ji // *Blood* – 2014. – vol. 124. – № 5. – pp. 780–790.
53. Kern, W. Clinical utility of multiparameter flow cytometry in the diagnosis of 1013 patients with suspected myelodysplastic syndrome: correlation to cytomorphology, cytogenetics, and clinical data. / W. Kern, C. Haferlach, S. Schnittger, T. Haferlach // *Cancer* – 2010. – vol. 116. – № 19. – pp. 4549–4563.

54. Kussick, S. J. Using 4-color flow cytometry to identify abnormal myeloid populations. / S. J. Kussick, B. L. Wood // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2003. – vol. 127. – № 9. – pp. 1140–1147.
55. Loken, M. R. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from a working conference / M. R. Loken, A. van de Loosdrecht, K. Ogata, A. Orfao, D. A. Wells // *Leuk. Res.* – 2008. – vol. 32. – № 1. – pp. 5–17.
56. Loosdrecht, A. A. van de. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes / A. A. van de Loosdrecht, C. Alhan, M. C. Bene, M. G. Della Porta, A. M. Dräger, J. Feuillard, P. Font, U. Germing, D. Haase, C. H. Homburg, R. Ireland, J. H. Jansen, W. Kern, L. Malcovati, J. G. te Marvelde, G. J. Mufti, K. Ogata, A. Orfao, G. J. Ossenkoppele, A. Porwit, F. W. Preijers, S. J. Richards, G. J. Schuurhuis, D. Subira, P. Valent, V. H. J. van der Velden, P. Vyas, A. H. Westra, T. M. de Witte, D. A. Wells, M. R. Loken, T. M. Westers // *Haematologica.* – 2009. – vol. 94. – № 8. – pp. 1124–1134.
57. Loosdrecht, A.A. van de. Cutting edge: flow cytometry in myelodysplastic syndromes. / A. A. van de Loosdrecht, T. M. Westers // *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* – 2013. – vol. 11. – № 7. – pp. 892–902.
58. Loosdrecht, A.A. van de. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. / A. A. van de Loosdrecht, T. M. Westers, A. H. Westra, A. M. Dräger, V. H. J. van der Velden, G. J. Ossenkoppele // *Blood.* – 2008. – vol. 111. – № 3. – pp. 1067–1077.
59. Lorand-Metze, I. Normal variation of bone marrow B-cell precursors according to age - reference ranges for studies in myelodysplastic syndromes in Brazil. / I. Lorand-Metze, A. L. Longhini, G. Oliveira-Duarte, R. P. Correia, M. C. Santos-Silva, M. Yamamoto, A. F. Sandes, A. F. Oliveira, E. X. Souto, M. R. V Ikoma, F. G. Pereira-Cunha, M. Beltrame, K. Metze, Brazilian Group of Flow Cytometry (GBCFLUX) // *Cytometry B. Clin. Cytom.* – 2018. – vol. 94. – № 5. – pp. 644–650.

60. Lorand-Metze, I. Detection of hematopoietic maturation abnormalities by flow cytometry in myelodysplastic syndromes and its utility for the differential diagnosis with non-clonal disorders. / I. Lorand-Metze, E. Ribeiro, C. S. P. Lima, L. S. Batista, K. Metzke // *Leuk. Res.* – 2007. – vol. 31 – № 2– pp. 147–155.
61. Maciejewski, J. P. Distinct clinical outcomes for cytogenetic abnormalities evolving from aplastic anemia. / J. P. Maciejewski, A. Risitano, E. M. Sloand, O. Nunez, N. S. Young // *Blood.* – 2002. – vol. 99. – № 9. – pp. 3129–3135.
62. Malcovati, L. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. / L. Malcovati, U. Germing, A. Kuendgen, M. G. Della Porta, C. Pascutto, R. Invernizzi, A. Giagounidis, B. Hildebrandt, P. Bernasconi, S. Knipp, C. Strupp, M. Lazzarino, C. Aul, M. Cazzola // *J. Clin. Oncol.* – 2007. – vol. 25. – № 23. – pp. 3503–3510.
63. Matarraz, S. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. / S. Matarraz, A. López, S. Barrena, C. Fernandez, E. Jensen, J. Flores, P. Bárcena, A. Rasillo, J. M. Sayagues, M. L. Sánchez, P. Hernandez-Campo, J. M. Hernandez Rivas, C. Salvador, N. Fernandez-Mosteirín, M. Giralt, L. Perdiguier, A. Orfao // *Leukemia.* – 2008. – vol. 22. – № 6. – pp. 1175–1183.
64. Mathis, S. Flow cytometric detection of dyserythropoiesis: a sensitive and powerful diagnostic tool for myelodysplastic syndromes. / S. Mathis, N. Chapuis, C. Debord, A. Rouquette, I. Radford-Weiss, S. Park, F. Dreyfus, C. Lacombe, M. C. Béné, O. Kosmider, M. Fontenay, V. Bardet // *Leukemia.* – 2013. – vol. 27. – № 10. – pp. 1981–1987.
65. Matsuda, A. Improvement of criteria for refractory cytopenia with multilineage dysplasia according to the WHO classification based on prognostic significance of morphological features in patients with refractory anemia according to the FAB classification / A. Matsuda, U. Germing, I. Jinnai, M. Iwanaga, M. Misumi, A.

Kuendgen, C. Strupp, Y. Miyazaki, H. Tsushima, M. Sakai, M. Bessho, N. Gattermann, C. Aul, M. Tomonaga // *Leukemia*. – 2007. – vol. 21. – № 4. – pp. 678–686.

66. Matsuda, A. Difference in clinical features between Japanese and German patients with refractory anemia in myelodysplastic syndromes. / A. Matsuda, U. Germing, I. Jinnai, M. Misumi, A. Kuendgen, S. Knipp, M. Aivado, M. Iwanaga, Y. Miyazaki, H. Tsushima, M. Sakai, M. Bessho, M. Tomonaga // *Blood*. – 2005. – vol. 106. – № 8. – pp. 2633–2640.

67. Montalban-Bravo, G. Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management / G. Montalban-Bravo, G. Garcia-Manero // *Am. J. Hematol.* – 2018. – vol. 93. – № 1. – pp. 129–147.

68. Moon, H.W. Immunophenotypic Features of Granulocytes, Monocytes, and Blasts in Myelodysplastic Syndromes / H. W. Moon, J. W. Huh, M. Lee, K. S. Hong, W. S. Chung // *Korean J. Lab. Med.* – 2010. – vol. 30. – № 2. – p. 97.

69. Nybakken, G. E. The genetic basis and expanding role of molecular analysis in the diagnosis, prognosis, and therapeutic design for myelodysplastic syndromes. / G. E. Nybakken, A. Bagg // *J. Mol. Diagn.* – 2014. – vol. 16. – № 2. – pp. 145–158.

70. Ogata, K. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. / K. Ogata, Y. Kishikawa, C. Satoh, H. Tamura, K. Dan, A. Hayashi // *Blood*. – 2006. – vol. 108. – № 3. – pp. 1037–1044.

71. Ogata, K. Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome. / K. Ogata, K. Nakamura, N. Yokose, H. Tamura, M. Tachibana, O. Taniguchi, R. Iwakiri, T. Hayashi, H. Sakamaki, Y. Murai, K. Tohyama, S. Tomoyasu, Y. Nonaka, M. Mori, K. Dan, Y. Yoshida // *Blood*. – 2002. – vol. 100. – № 12. – pp. 3887–3896.

72. Ogata, K. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. / K. Ogata, M. G. Della Porta, L. Malcovati, C. Picone, N. Yokose, A. Matsuda, T. Yamashita, H. Tamura, J. Tsukada, K. Dan // *Haematologica*. – 2009. – vol. 94. – № 8. – pp. 1066–1074.

73. Orazi, A. Myelodysplastic Syndromes / A. Orazi, M. B. Czader // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2009. – vol. 132. – № 2. – pp. 290–305.
74. Porta, M. G. Della. Clinical Relevance of Bone Marrow Fibrosis and CD34-Positive Cell Clusters in Primary Myelodysplastic Syndromes / M. G. Della Porta, L. Malcovati, E. Boveri, E. Travaglino, D. Pietra, C. Pascutto, F. Passamonti, R. Invernizzi, A. Castello, U. Magrini, M. Lazzarino, M. Cazzola // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – vol. 27. – № 5. – pp. 754–762.
75. Porta M.G. Della. Diagnostic Utility of Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes. / M. G. Della Porta, C. Picone // *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* – 2017. – vol. 9. – № 1. – pp. e2017017.
76. Porwit, A. Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes-proposal from the International/European LeukemiaNet Working Group for Flow Cytometry in MDS. / A. Porwit, A. A. van de Loosdrecht, P. Bettelheim, L. E. Brodersen, K. Burbury, E. Cremers, M. G. Della Porta, R. Ireland, U. Johansson, S. Matarraz, K. Ogata, A. Orfao, F. Preijers, K. Psarra, D. Subirá, P. Valent, V. H. J. van der Velden, D. Wells, T. M. Westers, W. Kern, M. C. Béné // *Leukemia.* – 2014. – vol. 28. – № 9. – pp. 1793–1798.
77. Raimbault, A. The fraction of CD117/c-KIT-expressing erythroid precursors predicts ESA response in low-risk myelodysplastic syndromes. / A. Raimbault, R. Itzykson, L. Willems, A. Rousseau, N. Chapuis, S. Mathis, S. Clauser, I. Radford-Weiss, D. Bouscary, M. Fontenay, O. Kosmider, V. Bardet // *Cytometry B. Clin. Cytom.* – 2019. – vol. 96. – № 3. – pp. 215–222.
78. Romeo, M. Comparison of cytogenetics with FISH in 40 myelodysplastic syndrome patients. / M. Romeo, M. de L. Chauffaille, M. R. R. Silva, D. M. M. Bahia, J. Kerbauy // *Leuk. Res.* – 2002. – vol. 26. – № 11. – pp. 993–996.
79. Schanz, J. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. / J. Schanz, H. Tüchler, F. Solé, M.

Mallo, E. Luño, J. Cervera, I. Granada, B. Hildebrandt, M. L. Slovak, K. Ohyashiki, C. Steidl, C. Fonatsch, M. Pfeilstöcker, T. Nösslinger, P. Valent, A. Giagounidis, C. Aul, M. Lübbert, R. Stauder, O. Krieger, G. Garcia-Manero, S. Faderl, S. Pierce, M. M. Le Beau, J. M. Bennett, P. Greenberg, U. Germing, D. Haase // *J. Clin. Oncol.* – 2012. – vol. 30. – № 8. – pp. 820–829.

80. Soenen, V. 17p Deletion in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Analysis of breakpoints and deleted segments by fluorescence in situ. / V. Soenen, C. Preudhomme, C. Roumier, A. Daudignon, J. L. Lai, P. Fenaux // *Blood* – 1998. – vol. 91. – № 3. – pp. 1008–1015.

81. Stachurski, D. Flow cytometric analysis of myelomonocytic cells by a pattern recognition approach is sensitive and specific in diagnosing myelodysplastic syndrome and related marrow diseases: emphasis on a global evaluation and recognition of diagnostic pitfalls. / D. Stachurski, B. R. Smith, O. Pozdnyakova, M. Andersen, Z. Xiao, A. Raza, B. A. Woda, S. A. Wang // *Leuk. Res.* – 2008. – vol. 32. – № 2. – pp. 215–224.

82. Stauder, R. Impact of age and comorbidity in myelodysplastic syndromes. / R. Stauder, T. Nösslinger, M. Pfeilstöcker, W. R. Sperr, F. Wimazal, O. Krieger, P. Valent // *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* – 2008. – vol. 6. – № 9. – pp. 927–934.

83. Steensma, D. P. Clonal cytogenetic abnormalities in bone marrow specimens without clear morphologic evidence of dysplasia: a form fruste of myelodysplasia? / D. P. Steensma, G. W. Dewald, J. M. Hodnefield, A. Tefferi, C. A. Hanson // *Leuk. Res.* – 2003. – vol. 27. – № 3. – pp. 235–242.

84. Sternberg, A. Evidence for reduced B-cell progenitors in early (low-risk) myelodysplastic syndrome. / A. Sternberg, S. Killick, T. Littlewood, C. Hatton, A. Peniket, T. Seidl, S. Soneji, J. Leach, D. Bowen, C. Chapman, G. Standen, E. Massey, L. Robinson, B. Vadher, R. Kaczmarski, R. Janmohammed, K. Clipsham, A. Carr, P. Vyas // *Blood*. – 2005. – vol. 106. – № 9. – pp. 2982–2991.

85. Stetler-Stevenson, M. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in

myelodysplastic syndrome. / M. Stetler-Stevenson, D. C. Arthur, N. Jabbour, X. Y. Xie, J. Molldrem, A. J. Barrett, D. Venzon, M. E. Rick // *Blood*. – 2001. – vol. 98. – № 4. – pp. 979–987.

86. Swerdlow, S. H. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues / S. H. Swerdlow, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. – 2017. – pp. 1-585.

87. Takeuchi, A. Diagnostic value of flow cytometry standardized using the European LeukemiaNet for Myelodysplastic Syndrome / A. Takeuchi, O. Imataki, H. Kubo, A. Kondo, K. Seo, M. Uemura, G. Yamaoka, K. Murao // *Acta Haematol.* – 2019. – 1. – p. 6.

88. Tefferi, A. Myelodysplastic Syndromes / A. Tefferi, J. W. Vardiman // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – vol. 361. – № 19. – pp. 1872–1885.

89. Valent, P. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. / P. Valent, H.-P. Horny, J. M. Bennett, C. Fonatsch, U. Germing, P. Greenberg, T. Haferlach, D. Haase, H.-J. Kolb, O. Krieger, M. Loken, A. van de Loosdrecht, K. Ogata, A. Orfao, M. Pfeilstöcker, B. Rüter, W. R. Sperr, R. Stauder, D. A. Wells // *Leuk. Res.* – 2007. – vol. 31. – № 6. – pp. 727–736.

90. Valent, P. Standards and impact of hematopathology in myelodysplastic syndromes (MDS). / P. Valent, A. Orazi, G. Büsche, A. Schmitt-Gräff, T. I. George, K. Sotlar, B. Streubel, C. Beham-Schmid, S. Cerny-Reiterer, O. Krieger, A. van de Loosdrecht, W. Kern, K. Ogata, F. Wimazal, J. Várkonyi, W. R. Sperr, M. Werner, H. Kreipe, H.-P. Horny // *Oncotarget* – 2010. – vol. 1. – № 7. – pp. 483–496.

91. Valent, P. Proposed minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes (MDS) and potential pre-MDS conditions. / P. Valent, A. Orazi, D. P. Steensma, B. L. Ebert, D. Haase, L. Malcovati, A. A. van de Loosdrecht, T. Haferlach, T. M. Westers, D. A. Wells, A. Giagounidis, M. Loken, A. Orfao, M. Lübbert, A. Ganser, W.-K. Hofmann, K. Ogata, J. Schanz, M. C. Béné, G. Hoermann, W. R. Sperr, K. Sotlar, P.

Bettelheim, R. Stauder, M. Pfeilstöcker, H.-P. Horny, U. Germing, P. Greenberg, J. M. Bennett // *Oncotarget*. – 2017. – vol. 8. – № 43. – pp. 73483–73500.

92. Vardiman, J. W. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. / J. W. Vardiman, J. Thiele, D. A. Arber, R. D. Brunning, M. J. Borowitz, A. Porwit, N. L. Harris, M. M. Le Beau, E. Hellström-Lindberg, A. Tefferi, C. D. Bloomfield // *Blood*. – 2009. – vol. 114. – № 5– pp. 937–951.

93. Vyver, A. van de. Decreased CD10 expression in the bone marrow neutrophils of HIV positive patients / A. van de Vyver, A. Visser // *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* – 2010. – vol. 2. – № 3. – p. 2010032.

94. Wells, D. A. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. / D. A. Wells, M. Benesch, M. R. Loken, C. Vallejo, D. Myerson, W. M. Leisenring, H. J. Deeg // *Blood*. – 2003. – vol. 102. – № 1. – pp. 394–403.

95. Westers, T. M. Aberrant immunophenotype of blasts in myelodysplastic syndromes is a clinically relevant biomarker in predicting response to growth factor treatment. / T. M. Westers, C. Alhan, M. E. D. Chamuleau, M. J. D. L. van der Vorst, C. Eeltink, G. J. Ossenkoppele, A. A. van de Loosdrecht // *Blood*. – 2010. – vol. 115. – № 9. – pp. 1779–1784.

96. Westers, T.M. Immunophenotypic analysis of erythroid dysplasia in myelodysplastic syndromes. A report from the IMDSFlow working group. / T. M. Westers, E. M. P. Cremers, U. Oelschlaegel, U. Johansson, P. Bettelheim, S. Matarraz, A. Orfao, B. Moshaver, L. E. Brodersen, M. R. Loken, D. A. Wells, D. Subirá, M. Cullen, J. G. Te Marvelde, V. H. J. van der Velden, F. W. M. B. Preijers, S.-C. Chu, J. Feuillard, E. Guérin, K. Psarra, A. Porwit, L. Saft, R. Ireland, T. Milne, M. C. Béné, B. I. Witte, M. G. Della Porta, W. Kern, A. A. van de Loosdrecht, IMDSFlow Working Group // *Haematologica*. – 2017. – vol. 102. – № 2. – pp. 308–319.

97. Westers, T. M. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. / T. M. Westers, R. Ireland, W. Kern, C. Alhan, J. S. Balleisen, P. Bettelheim, K. Burbury, M. Cullen, J. A. Cutler, M. G. Della Porta, A. M. Dräger, J. Feuillard, P. Font, U. Germing, D. Haase, U. Johansson, S. Kordasti, M. R. Loken, L. Malcovati, J. G. te Marvelde, S. Matarraz, T. Milne, B. Moshaver, G. J. Mufti, K. Ogata, A. Orfao, A. Porwit, K. Psarra, S. J. Richards, D. Subirá, V. Tindell, T. Vallespi, P. Valent, V. H. J. van der Velden, T. M. de Witte, D. A. Wells, F. Zettl, M. C. Béné, A. A. van de Loosdrecht // *Leukemia*. – 2012. – vol. 26. – № 7. – pp. 1730–1741.