

Роль многоцветной проточной цитофлуориметрии в диагностике миелодиспластических синдромов

Ю.О. Давыдова, И.В. Гальцева, А.В. Кохно, Е.Н. Паровичникова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России;
Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4

Контакты: Юлия Олеговна Давыдова juliya89mur@yandex.ru

Миелодиспластические синдромы (МДС) – гетерогенная группа клональных заболеваний системы кроветворения, характеризующихся цитопениями, признаками дисмиелопоэза, высокой частотой аномалий кариотипа и риском трансформации в острые миелоидные лейкозы. Диагностика МДС требует комплексного подхода, но даже при выполнении цитологического, цитохимического, цитогенетического, молекулярно-генетического и гистологического исследований не всегда удается подтвердить диагноз. Многоцветная проточная цитофлуориметрия (МПЦ) – высокотехнологичный метод, часто применяемый в диагностике различных гематологических заболеваний. В течение последних лет активно проводится стандартизация МПЦ для оценки дисплазии во всех ростках кроветворения при МДС. Многими исследовательскими группами были продемонстрированы высокие показатели чувствительности и специфичности этого метода, что свидетельствует о необходимости интеграции МПЦ в диагностические протоколы МДС.

Ключевые слова: миелодиспластические синдромы, проточная цитофлуориметрия, иммунофенотипирование, лабораторная диагностика

Для цитирования: Давыдова Ю.О., Гальцева И.В., Кохно А.В., Паровичникова Е.Н. Роль многоцветной проточной цитофлуориметрии в диагностике миелодиспластических синдромов. Онкогематология 2018;13(1)63–72.

DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-63-72

Multicolor flow cytometry as a diagnostic tool in myelodysplastic syndromes

Yu.O. Davydova, I.V. Galtseva, A.V. Kokhno, E.N. Parovichnikova

National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyi Zykovskiy proezd, 125167 Moscow, Russia

Myelodysplastic syndromes (MDS) are heterogeneous group of clonal hematological neoplasms characterized by cytopenias, signs of dysplasia and high risk of transformation in acute myeloid leukemia. Diagnostics of MDS requires a comprehensive approach, but even when performing cytological, cytogenetic, molecular and histological studies, it is not always possible to establish a diagnosis. Multicolor flow cytometry (MFC) is a high-tech method, increasingly used in the diagnosis of various hematologic diseases. Over the last years, MFC is standardized for assessing of dysplasia in all cell compartments of the bone marrow. Many research groups have demonstrated high sensitivity and specificity of this diagnostic approach, which indicates the necessity of integration of flow cytometric study into diagnostic protocols of MDS.

Key words: myelodysplastic syndromes, flow cytometry, immunophenotyping, diagnostic tools

For citation: Davydova Yu.O., Galtseva I.V., Kokhno A.V., Parovichnikova E.N. Multicolor flow cytometry as a diagnostic tool in myelodysplastic syndromes. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2018;13(1)63–72.

Введение

Миелодиспластические синдромы (МДС) представляют собой гетерогенную группу клональных заболеваний системы крови, характеризующихся цитопениями, признаками дисмиелопоэза, высокой частотой аномалий кариотипа и риском трансформации в острые миелоидные лейкозы. Существуют рекомендации Европейского общества LeukemiaNet по выбору стандартных диагностических процедур и терапевтических подходов для взрослых больных с первичным МДС. Ведущими симптомами являются цитопении, к которым относятся анемия (при уровне гемоглобина <100 г/л), нейтропения (когда абсолютное число нейтрофилов <1,5 × 10⁹/л) и тромбоцитопения (при ко-

личестве тромбоцитов <100 × 10⁹/л). Базовые методы диагностики этих заболеваний – цитологическое, цитохимическое, гистологическое и цитогенетическое исследования костного мозга (КМ) [1].

К цитологическому критерию МДС относится дисплазия в более чем 10 % клеток одной или нескольких линий гемопоэза (эритрокариоциты, нейтрофилы и/или мегакариоциты). Однако признаки дисплазии встречаются и при многих других заболеваниях (например, хронических миелопролиферативных заболеваниях – МПЗ), при реактивных состояниях и вирусных инфекциях (гепатиты В и С, вирус Эпштейна–Барр, парвовирус В19), а также при лечении химиотерапевтическими препаратами. Дизэритропоэз возникает

при мегалобластных анемиях, аутоиммунных, а также некоторых наследственных заболеваниях, например врожденной дизэритропоэтической анемии [2, 3].

Цитогенетическое исследование КМ проводится в обязательном порядке и имеет диагностический, прогностический и терапевтический аспекты. Однако цитогенетические аномалии встречаются только у 40–50 % пациентов с МДС. К наиболее частым аберрациям относят *del* (5q), моносомию 7 или *del* (7q), трисомию 8 и *del* (20q). Потеря Y-хромосомы также обнаруживается нередко, однако эта аномалия часто является возрастным феноменом и не всегда указывает на наличие клонального заболевания [4, 5].

Гистологическое исследование трепанобиоптата позволяет оценить клеточность КМ, состояние стромы, наличие фиброза, морфологические признаки дисплазии, количество и локализацию клеток с бластной морфологией (при иммуногистохимическом исследовании). Гиперклеточность КМ с дефицитом зрелых форм клеток в крови свидетельствует о неэффективности гемопоэза при МДС, но встречается также при реактивных состояниях, МПЗ и анемическом синдроме. Сложными в диагностическом плане являются МДС с гипоплазией КМ, которая характеризуется клеточностью, составляющей <20 % кроветворной ткани в лакунах трепанобиоптата КМ. В этом случае необходимо проводить дифференциальную диагностику с апластической анемией, гипопластическим вариантом острого миелоидного лейкоза [6].

Таким образом, диагностика МДС требует комплексного подхода, и даже при выполнении цитологического, цитохимического, цитогенетического и гистологического исследований может потребоваться дополнительный диагностический критерий, особенно при отсутствии цитогенетических аномалий и/или когда выявляется гипоплазия КМ [7]. Дифференциальная диагностика МДС с другими заболеваниями, протекающими с миелодисплазией, требует полного и тщательного обследования пациента, динамического наблюдения и повторных обследований [8, 9]. Многоцветная проточная цитофлуориметрия (МПЦ) клеток КМ введена в 2007 г. как дополнительный критерий при диагностике МДС [10].

В марте 2008 г. в Амстердаме состоялся первый международный семинар по стандартизации МПЦ в диагностике МДС. В нем принимали участие представители 18 университетов из Европы, работающих в рамках Европейского общества LeukemiaNet, а также эксперты из США и Японии [11]. В ходе последующих семинаров были пересмотрены и дополнены диагностические цитометрические критерии МДС [12–14].

Необходимо отметить, что не существует универсального цитометрического критерия, который бы позволял определить наличие МДС. Необходимо оценивать множество параметров в основных компартментах КМ: зрелом миелоидном (нейтрофилы, моноциты), эритроидном ростках и компартменте

ранних миелоидных и В-клеточных предшественников. Эти цитометрические стратегии базируются на интерпретации экспрессии поверхностных маркеров кластеров дифференцировки (CD). К ним относят повышенную или сниженную по отношению к референсным значениям интенсивность экспрессии антигенов, асинхронную экспрессию антигенов и экспрессию лимфоидных маркеров на миелобластных клетках. Немаловажное значение имеет подсчет доли клеток, составляющих определенные клеточные компартменты (особенно для миелоидных и В-клеточных предшественников) [15].

Скрининговая мини-панель для цитометрической диагностики миелодиспластического синдрома

В скрининговых целях согласно рекомендациям LeukemiaNet может быть использована панель, состоящая из минимального количества моноклональных антител (МКА) и позволяющая оценить 4 параметра. Данная шкала называется Ogata score, это первая разработанная система диагностики МДС методом МПЦ [16]. 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 CD34⁺ миелоидным предшественникам;
- 4) отношение параметра бокового светорассеяния (SSC) на нейтрофилах к лимфоцитам (рис. 1).

При отклонениях в 2 и более параметрах предполагается наличие МДС. Описанная шкала была использована в проспективном исследовании, где изучали 134 образца КМ пациентов с МДС низкого риска и 106 контрольных образцов КМ в 2 центрах – в Японии и Италии. Диагностическая чувствительность составила 65 % и 89 %, а специфичность – 98 % и 90 % для когорт пациентов из Японии и Италии соответственно.

Для клинического применения чувствительность этой шкалы недостаточна, и есть несколько аспектов, которые следует учитывать. Во-первых, в результате разведения периферической кровью образца КМ может быть недооценено количество миелоидных предшественников, кроме того, у некоторых пациентов с МДС на миелобластах антиген CD34 не экспрессируется, что является иммунофенотипической аберрацией. Количество CD34⁺ В-клеточных предшественников варьирует в зависимости от возраста и может снижаться при реактивных состояниях. Необходимо также учитывать, что референсные интервалы для экспрессии CD45 на миелобластах и показателя SSC могут немного отличаться в зависимости от используемых флуорохромов и настроек приборов [17]. Для того чтобы результаты МПЦ были применимы в клинических целях, необходимо использовать расширенную панель МКА, которая бы позволяла исследовать

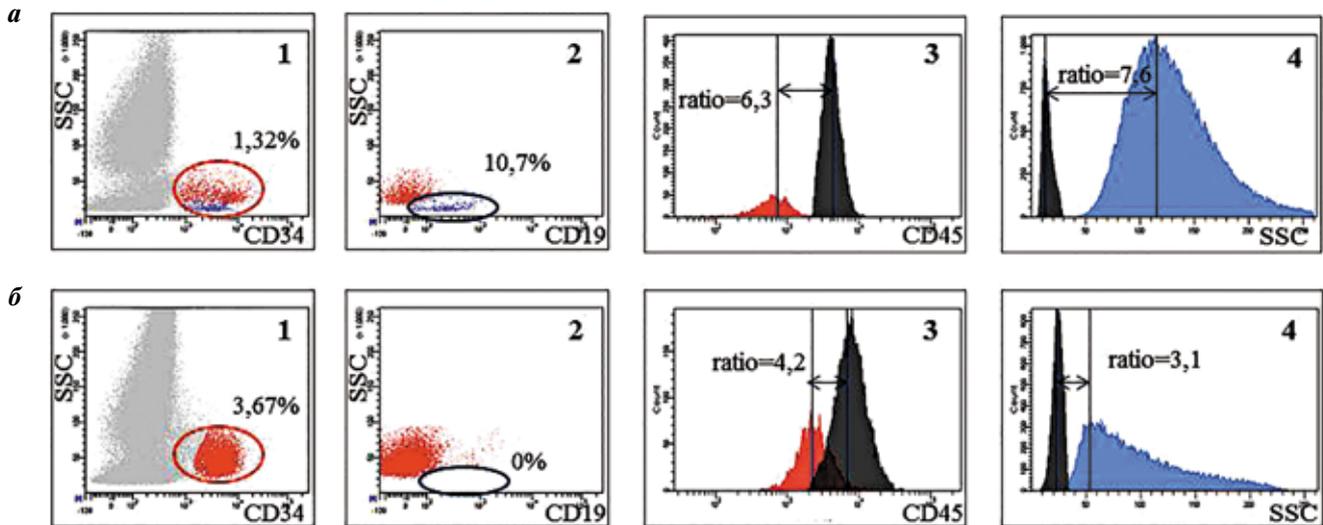


Рис. 1. Пример определения цитометрических параметров по шкале Ogata score в костном мозге здорового донора (а) и примеры аномалий у лиц с миелодиспластическим синдромом (б): 1 – доля $CD34^+$ миелоидных клеток-предшественниц от всех $CD45^+$ клеток (выделено красным); 2 – доля $CD34^+$ В-клеточных предшественников (выделено синим) от всех $CD34^+$ клеток; 3 – отношение экспрессии $CD45$ на лимфоцитах (выделено черным) к $CD34^+$ миелобластам; 4 – отношение параметра бокового светорассеяния (SSC) на нейтрофилах (выделено голубым) к лимфоцитам (фото авторов)

Fig. 1. An example of cytometric parameters by Ogata score scale in the bone marrow of a healthy donor (a) and examples of anomalies in MDS patients (b): 1 – the proportion of $CD34^+$ myeloid progenitor cells from all $CD45^+$ cells (red); 2 – the proportion of $CD34^+$ B-cell progenitors (blue) from all $CD34^+$ cells; 3 – the ratio of $CD45$ expression on lymphocytes (black) to $CD34^+$ myeloblasts; 4 – the ratio of the lateral light scattering parameter (SSC) on neutrophils (in blue) to lymphocytes (photo submitted by the authors)

параметры, рекомендованные LeukemiaNet, представленные в табл. 1 [12, 13].

Далее нами будут рассмотрены иммунофенотипические аномалии, наиболее часто встречающиеся в различных клеточных компартаментах.

Цитометрический анализ незрелых миелоидных предшественников

Подсчет количества незрелых миелоидных предшественников крайне важен, поскольку является основной частью всех прогностических шкал. Обычно отмечается хорошая корреляция 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, и наоборот [18].

Для точного подсчета количества миелоидных клеток-предшественниц недостаточно использования только маркера $CD45$, так как в регионе $CD45^{dim}SSC^{low}$ расположены также В-клеточные предшественники, монобласты, базофилы, эритробласты, плазмоцитонидные дендритные предшественники, а также гипогранулярные нейтрофилы при МДС. Это требует введения в анализ дополнительных МКА к антигенам $CD34$, $CD117$, $CD19$, $CD123$ и $HLA-DR$ [13].

Важен 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, также возможна гомогенность распре-

деления этих антигенов [13]. В некоторых исследованиях отмечаются аномальное отсутствие $CD13$ и/или $CD33$, асинхронная экспрессия «зрелых» маркеров $CD11b$ и $CD15$ на ранних $CD34^+$ клетках [12, 19]. Также обнаруживается экспрессия лимфоидных маркеров на миелоидных предшественниках, однако частота их встречаемости варьирует в широких пределах: $CD5$ определяется только в 1,6–7 % случаев МДС, $CD7$ – в 3,5–30 %, $CD2$ – в 14 %, $CD56$ – в 35 %. При оценке аномальной экспрессии лимфоидных антигенов следует учитывать, что $CD2$, $CD7$ и $CD56$ присутствуют и на нормальных $CD34^+$ предшественниках, но таких клеток немного [17, 20–24].

Цитометрический анализ гранулоцитарного роста

Цитологические признаки дисплазии гранулоцитарного роста выявляют у 60 % пациентов с МДС. К наиболее значимым морфологическим изменениям относят гипогрануляцию нейтрофилов, нарушение сегментации их ядер и повышение доли ранних форм гранулоцитов. Для идентификации нейтрофилов методом МПЦ в основном 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 [25].

Метод МПЦ позволяет определить гранулярность нейтрофилов по соотношению параметра бокового светорассеяния SSC нейтрофилов к SSC лимфоцитов, получая индекс гранулярности. Когда по данным цитологического исследования количество гипогранулярных нейтрофилов составляет менее 10 % (что является

Таблица 1. Параметры, рекомендованные для цитометрического исследования миелодиспластического синдрома

Table 1. Cytometric parameters recommended for MDS

Компартмент костного мозга Bone marrow compartment	Параметры Parameters
CD34 ⁺ миелоидные клетки-предшественницы CD34 ⁺ myeloid progenitor cells	Доля от CD45 ⁺ клеток Proportion of CD45 ⁺ cells Экспрессия CD45, CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33, CD38 Expression of CD45, CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33, CD38 Асинхронная экспрессия CD11b, CD15 Asynchronous expression of CD11b, CD15 Нелинейная экспрессия CD5, CD7, CD19, CD56 Nonlinear expression of CD5, CD7, CD19, CD56
CD34 ⁺ В-клеточные предшественники CD34 ⁺ B-cell progenitors	Доля от всех CD34 ⁺ клеток (с использованием CD19 и/или CD10) The proportion of all CD34 ⁺ cells (using CD19 and/or CD10)
Нейтрофилы Neutrophils	Доля от CD45 ⁺ клеток Proportion of CD45 ⁺ cells Соотношение SSC нейтрофилов к SSC лимфоцитов The ratio of SSC neutrophils to SSC lymphocytes «Паттерны созревания» CD13 и CD11b; CD16 и CD11b; CD13 и CD16; CD15 и CD10 “Maturation patterns” of CD13 and CD11b; CD16 and CD11b; CD13 and CD16; CD15 and CD10
Моноциты Monocytes	Доля от CD45 ⁺ клеток Proportion of CD45 ⁺ cells «Паттерны созревания» HLA-DR и CD11b; CD36 и CD14 “Maturation patterns” of HLA-DR and CD11b; CD36 and CD14 Экспрессии CD13 и CD33 CD13 and CD33 expression Экспрессия CD56 CD56 expression
Эритрокариоциты Erythrocytes	Доля от ядросодержащих клеток КМ The proportion of nucleated BM cells «Паттерны созревания» CD71 и CD235a “Maturation patterns” of CD71 and CD235a Экспрессия CD71 CD71 expression Экспрессия CD36 CD36 expression Доля CD117-позитивных предшественников Proportion of CD117-positive progenitors

критерием диагностики МДС согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения), данные МПЦ могут быть более информативными. Определение индекса гранулярности имеет высокую специфичность, а его снижение наиболее часто происходит именно при МДС [25].

К другим признакам дисплазии гранулоцитарного роста относят изменение так называемых паттернов созревания (соотношение экспрессии 2 антигенов, которое меняется в зависимости от стадии созревания клетки). Наиболее часто при анализе гранулоцитов уделяют внимание 2 паттернам: CD16 и CD11b, CD13 и CD16 [15]. Впервые изменение паттерна CD16 и CD11b в КМ у пациентов с МДС по сравнению с группой здоровых доноров было описано в исследовании В.Н. Davis и соавт. в 1997 г. У лиц с МДС отмечалось повышение доли гранулоцитов с низкой экспрессией CD16 и/или CD11b [26]. Другим значимым паттерном является соотношение CD13 и CD16. По мере созревания нейтрофилов появляется и нарастает экспрессия 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 число зрелых CD13⁺CD16⁺ нейтрофилов снижено (рис. 2). Ошибки при интерпретации данных о паттернах могут возникать в случае включения в гейт нейтрофилов эозинофилов, которые не экспрессируют CD16; нейтрофилы, претерпевающие апоптоз, также теряют CD16. Доказано, что у пациентов с пароксизмальной ночной гемоглобинурией экспрессия CD16 на зрелых нейтрофилах отсутствует, так как этот антиген имеет гликозилфосфатидилинозитольный якорь; кроме того, у некоторых людей имеется генетический полиморфизм антигена CD16, что может ложно интерпретироваться как аномальное отсутствие данного маркера [15].

Еще один признак МДС — повышенная экспрессия антигена CD56 на нейтрофилах. При МДС данная аномалия встречается в 20–30 % случаев, при МПЗ — менее

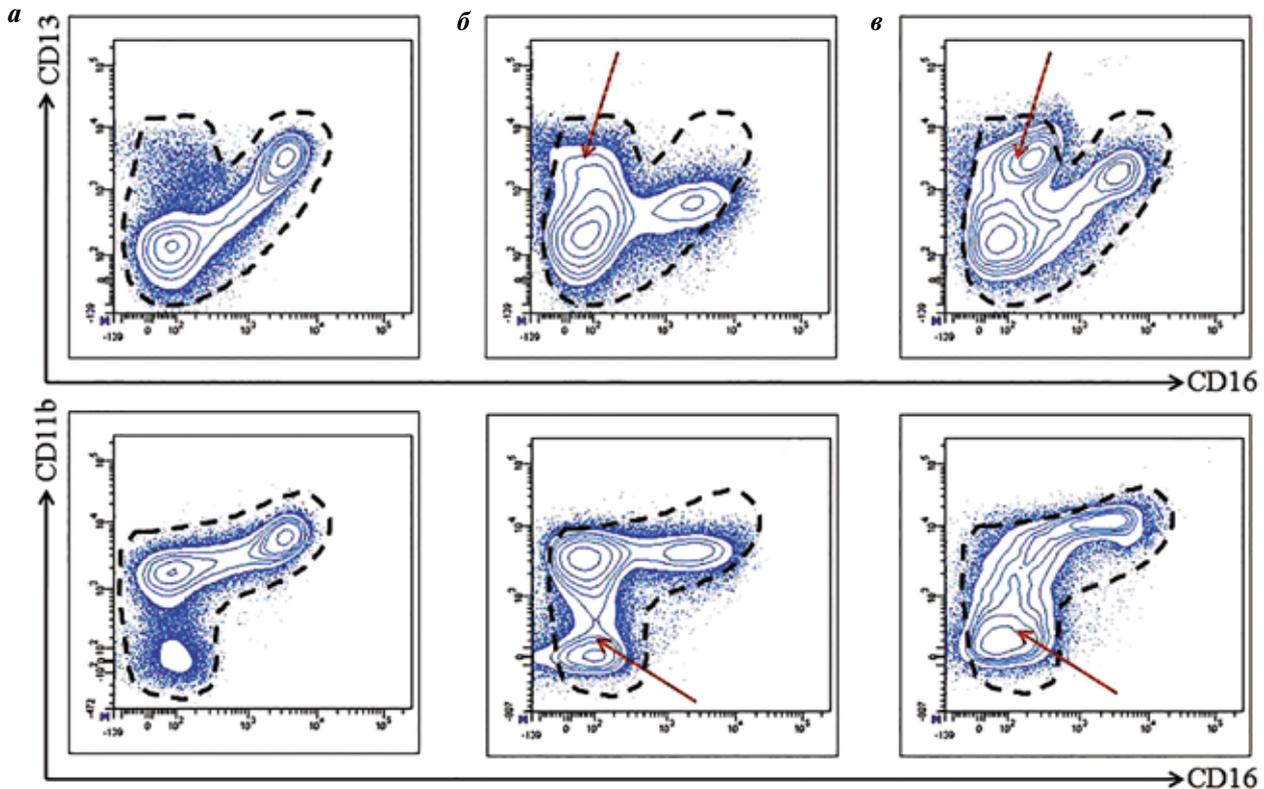


Рис. 2. Паттерны созревания нейтрофилов CD13 и CD16; CD11b и CD16 при анализе костного мозга здорового донора (а) и лиц с миелодиспластическим синдромом (б и в). Стрелками указано повышение доли незрелых гранулоцитов по сравнению с донором (фото авторов)

Fig. 2. Patterns of neutrophils maturation CD13 and CD16; CD11b and CD16 in the bone marrow of a healthy donor (a) and MDS patients (b and v). The arrows indicate an increase in the proportion of immature granulocytes in comparison with donor (photo submitted by the authors)

чем в 20 %, но при идиопатическом миелофиброзе — до 37 % [27, 28]. Однако описано повышение экспрессии данного маркера на нейтрофилах при активации, а также на 10–25 % незрелых гранулоцитов при регенерации КМ [29]. Низкая экспрессия CD56 отмечается у пациентов после химиотерапии и трансплантации аллогенных стволовых клеток, и доля гранулоцитов, экспрессирующих CD56, составляет <10 % [28]. Таким образом, экспрессия молекулы адгезии CD56 на нейтрофилах может быть как признаком аномалии в данном компартменте, так и следствием воздействия полихимиотерапии или других причин.

Одним из цитометрических признаков дисгранулоцитопоза служит 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 [30–32]. Сниженная экспрессия CD10 ассоциирована с повышенной восприимчивостью к инфекциям, так как этот белок играет важную роль в хемотаксисе и координации провоспалительных реакций. Снижение CD10 на нейтрофилах отмечено при аутоиммунной нейтропении [33], а также у пациентов с ВИЧ-инфекцией и расценивается как признак реактивного дисгранулоцитопоза [34].

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 вариабельна и связана с генетическим полиморфизмом. Экспрессия CD36 повышается на нейтрофилах при апоптозе, а HLA-DR начинает экспрессироваться после применения гранулоцитарного колониестимулирующего ростового фактора [14, 15]. Экспрессия CD14 гранулоцитами выявлена у пациентов с 5q-синдромом [35].

Цитометрический анализ моноцитов

Цитологическая оценка дисплазии в моноцитах при верификации МДС не проводится. Однако при дифференциальной диагностике МДС с моноцитозом <1×10⁹/л и хроническим миеломоноцитарным лейкозом (вариант МДС/МПЗ) следует обращать внимание на цитологические особенности 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 применения дополнительных маркеров, таких как CD33, CD45, CD14, CD36 [14].

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 % случаев). 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 (рис. 3). В 92 % случаев МПЦ позволяет обнаружить признаки дисмоноцитопоза [25]. При оценке экспрессии CD14 на моноцитах нужно помнить, что данный белок связан с мембраной через гликозилфосфатидилинозитольный якорь, поэтому у пациентов с ПНГ экспрессия данного маркера снижена или может отсутствовать.

При МДС часто отмечают повышенную экспрессию CD56 на моноцитах, которая встречается также у лиц с МПЗ и/или МДС/МПЗ, в частности с хроническим миеломоноцитарным лейкозом. Кроме того, экспрессия CD56 на моноцитах может быть обусловлена инфекционными процессами и регенерацией КМ после химиотерапии, трансплантации аллогенных стволовых клеток крови [14].

Цитометрический анализ эритрокариоцитов

Морфологические признаки дизэритропоэза являются наиболее яркими и часто встречающимися. Они присутствуют при всех вариантах МДС и остаются единственными морфологическими признаками у пациентов с рефрактерной анемией (РА) и РА с кольцевыми сидеробластами. Однако цитометрическая оценка дизэритропоэза – непростая задача, так как проблематично точно выделить популяцию эритроидных предшественников, а маркеры, по которым можно оценить их аномальность, немногочисленны. Вследствие этого с 2007 по 2012 г. оценка компартамента эритрокариоцитов имела лишь рекомендательный характер [13, 14], в 2014 г. были обозначены обязательные критерии цитометрического анализа эритрокариоцитов [12], но только в 2017 г. опубликованы первые практические результаты введения анализа эритрокариоцитов в интегрированную оценку МДС методом МПЦ [36].

Первым важным моментом становится определение 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.

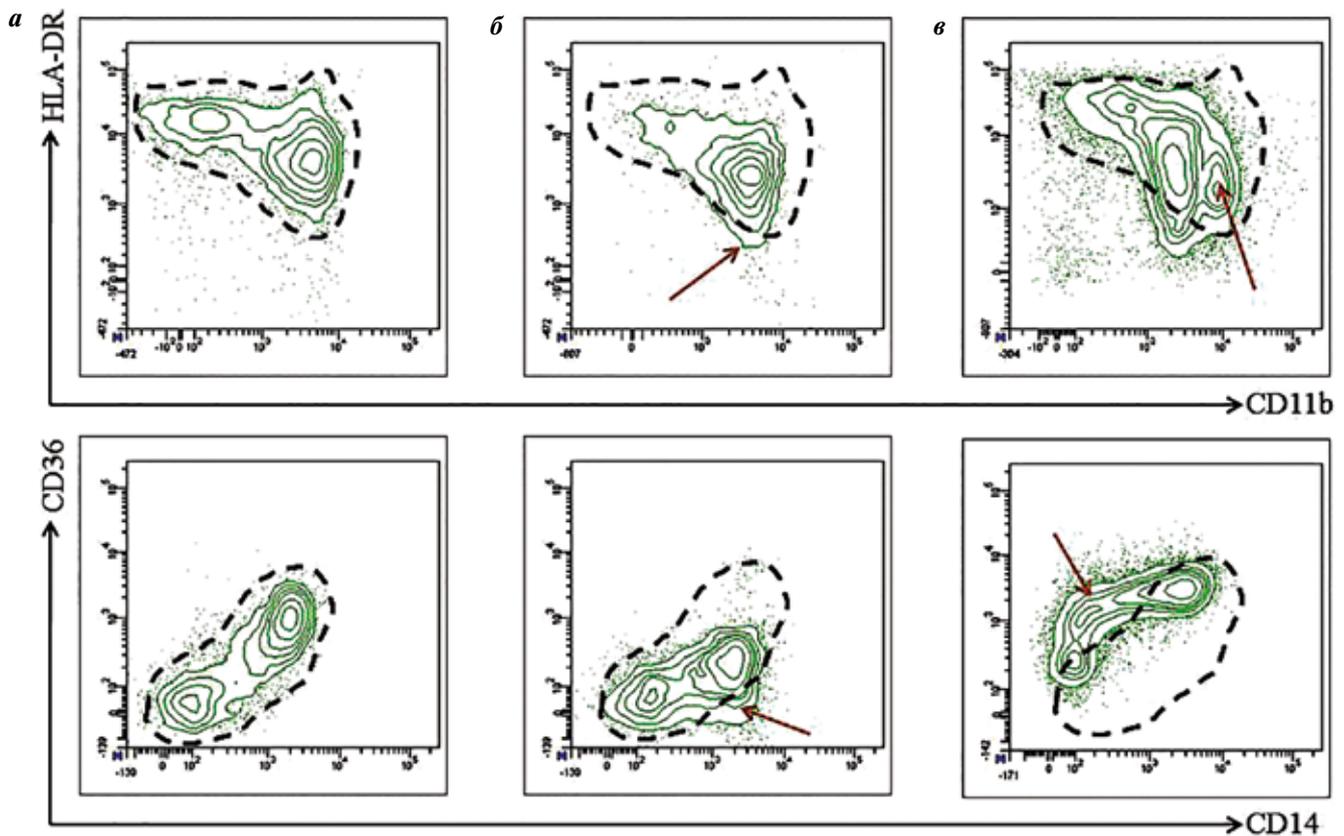


Рис. 3. Паттерны созревания моноцитов HLA-DR и CD11b; CD36 и CD14 при анализе костного мозга здорового донора (а) и лиц с миелодиспластическим синдромом (б и в). Стрелками указаны аномалии в форме паттернов (фото авторов)

Fig. 3. Patterns of monocytes maturation HLA-DR and CD11b; CD36 and CD14 in the bone marrow of a healthy donor (a) and MDS patients (б and в). Arrows indicate anomalies in patterns form (photo submitted by the authors)

Используя антигены CD36, CD71, можно выделить эритрокариоциты более точно. В ходе нормального их созревания происходит постепенное снижение экспрессии CD45, повышение экспрессии CD235a. CD71 – один из самых 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 [37]. Возможно введение в панель МКА нуклеотропных красителей, например CyTRAK orange, DRAQ5, DRAQ7, которые позволяют отделить ядросодержащие предшественники от зрелых эритроцитов даже без проведения лизиса [37]. С другой стороны, в ходе ряда исследований показано, что проведение лизиса позволяет получить более точные количественные характеристики плотности экспрессии антигенов [38].

Согласно данным Европейского общества LeukemiaNet цитометрическими признаками аномального эритрокариоцитопоэза могут быть: повышение доли CD117⁺ эритроидных предшественников, аномальная гетерогенная или сниженная экспрессии CD36 и CD71 и aberrантный паттерн CD71 и CD235a [12]. Анализ этой группы показателей способствует наилучшей дифференциальной диагностике МДС и неклональных цитопений [39].

Цитометрические оценочные системы в диагностике миелодиспластического синдрома

Для диагностики МДС методом МПЦ необходимо исследовать многочисленные характеристики всех основных клеточных компартов КМ. Эти параметры изучали в нескольких центрах, и на основе ретроспективного анализа были разработаны цитометрические оценочные шкалы, обладающие диагностической и прогностической значимостью. В 2003 г. Р. Wells и соавт. из США предложили шкалу, где на основе числа цитометрических aberrаций в компартменте нейтрофилов и моноцитов, а также количества миелобластов подсчитывали конечный балл (табл. 2). Суммарный балл от 0 до 1 классифицировался как минимальный, от 2 до 3 – как средний, >4 – как высокий. В данном исследовании приняли участие 115 лиц с МДС и 104 пациента контрольной группы без МДС и МПЗ. Никто из больных контрольной группы не набрал >2 баллов, однако у 55 % пациентов с МДС было получено 3 и более баллов [40].

Оценка по шкале Wells коррелировала с вариантом МДС по ВОЗ. У лиц с РА и РА с кольцевыми сидеробластами средний балл составил 3, с РА с мультилинейной дисплазией – 4, с РА с избытком бластов – 6 [25]. Цитометрические баллы коррелировали с оценками по шкалам IPSS (International Prognostic Scoring System), WPSS (WHO-adjusted Prognostic Scoring System) и зависимостью от трансфузий. Медиана выживаемо-

Таблица 2. Цитометрическая шкала Wells

Table 2. Cytometric Wells Scale

Балл Score	Описание Description
Основной балл <i>The main score</i>	
0	Отсутствие цитометрических aberrаций Absence of cytometric aberrations
1	Одна aberrация или в гранулоцитах, или в моноцитах One aberration in either granulocytes or monocytes
2	Одна aberrация и в гранулоцитах, и в моноцитах либо... One aberration in both granulocytes and monocytes either... Две или три aberrации или в гранулоцитах, или в моноцитах Two or three aberrations, either in granulocytes or in monocytes
3	Четыре и более aberrаций или в гранулоцитах, или в моноцитах Four or more aberrations, either in granulocytes or monocytes
4	Две или три aberrации и в гранулоцитах, и в моноцитах Two or three aberrations in both granulocytes and monocytes
Дополнительный балл <i>Additional score</i>	
+1	Сниженное миелоидно-лимфоидное соотношение (<1) The decreased myeloid-lymphoid ratio (<1) Нормальное содержание миелобластов (<5 %) с цитометрическими aberrациями The normal content of myeloblasts (<5 %) with cytometric aberrations
+2	Повышенное содержание аномальных миелобластов (5–10 %) Increased content of abnormal myeloblasts (5–10 %)
+3	Повышенное содержание аномальных миелобластов (11–20 %) Increased content of abnormal myeloblasts (11–20 %)
+4	Повышенное содержание аномальных миелобластов (>20 %) Increased content of abnormal myeloblasts (>20 %)

сти у пациентов с минимальным баллом по шкале Wells (0–1) не была достигнута, со средним баллом (2–3) составила 19 мес, с высоким баллом (4–9) – 6 мес [41].

В 2011 г. А. van de Loosdrecht и Т. Westers была предложена объединенная диагностическая шкала с учетом баллов по скрининговой шкале Ogata и количества aberrаций в компартах нейтрофилов и моноцитов [17]. Эта шкала не включала аномалии в эритроидных клетках, а заключение по ней устанавливается в виде буквенного эквивалента. Оценка «А» означает, что по результатам анализа дисмиелопоэза методом проточной цитометрии признаков МДС не выявлено; «В» – что при цитометрическом исследовании

выявляются признаки, которые часто обнаруживаются при МДС, и «С» — результаты цитометрического исследования соответствуют МДС (табл. 3).

Эту шкалу применяли в исследовании (его результаты были опубликованы в 2016 г.) с участием 101 пациента с МДС и 51 пациента контрольной группы без диагноза МДС или МПЗ. Из когорты участников с МДС 15 % получили оценку «А», 24 % — «В» и 61 % — «С». Оценку «А», которая соответствовала отсутствию цитометрических аномалий, имели в основном лица с МДС с изолированными дисэритропоэзом и/или дисмегакариопоэзом. При этом цитогенетические aberrации, типичные для МДС, 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 оценку «А» получили 65 % пациентов, «В» — 29 % и «С» — только 6 % [4].

В 2017 г. была разработана и апробирована интегрированная диагностическая шкала, которая включала аномалии в компартменте эритрокариобластов (табл. 4). Введение в шкалу анализа аномалий эритроидного ряда позволило повысить чувствительность метода с 69 до 80 %, а специфичность незначительно снизилась — с 98 до 95 % [36].

Заключение

Диагностика МДС требует комплексного подхода, основанного на проведении цитологического, цитохимического, цитогенетического и гистологического исследований КМ. Во многих публикациях показано, что метод МПЦ может улучшить диагностику МДС, особенно в трудных случаях, когда результатов, полученных другими методами, недостаточно, однако пока что этот способ является лишь вспомогательным.

Не существует универсального цитометрического признака, который бы позволил уверенно определить

Таблица 3. Объединенная шкала диагностики миелодиспластического синдрома методом многоцветной проточной цитофлуориметрии без учета аномалий в компартменте эритрокариоцитов

Table 3. The combined scale of MDS diagnosis by MFC without taking into account anomalies in the erythrocytes compartment

Шкала Ogata Ogata scale	<2				≥2			
	Цитометрические aberrации в миелоидных предшественниках Cytometric aberrations in myeloid progenitors	–	–	+	+	–	–	+
Цитометрические aberrации: Cytometric aberrations: в гранулоцитах (сниженный индекс гранулярности или 2 и более других aberrаций) in granulocytes (reduced granulation index or two or more other aberrations) в моноцитах (экспрессия CD56 или 2 и более другие aberrации) in monocytes (CD56 expression or two or more other aberrations)	–	+	–	+	–	+	–	+
Оценка Assessment	A	A/B	A/B	C	A/B	B/C	B/C	C

Таблица 4. Интегрированная шкала диагностики миелодиспластического синдрома методом многоцветной проточной цитофлуориметрии с учетом аномалий в компартменте эритрокариоцитов

Table 4. The integrated scale of MDS diagnosis by MFC taking into account anomalies in the erythrocytes compartment

Шкала Ogata Ogata scale	<2								≥2							
	Цитометрические aberrации в миелоидных предшественниках Cytometric aberrations in myeloid progenitors	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	+	+	+
Цитометрические aberrации: Cytometric aberrations: в гранулоцитах (≥2 aberrаций) in granulocytes (≥2 aberrations) в моноцитах (экспрессия CD56 или ≥2 aberrаций) in monocytes (expression of CD56 or ≥2 aberrations)	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	+	+
Цитометрические aberrации (≥2) в эритрокариоцитах Cytometric aberrations (≥2) in erythrocytes	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+
Оценка Assessment	A	B	B	C	B	C	C	C	A/B	C	C	C	C	C	C	C

наличие МДС, и для полноценного исследования требуется провести оценку многочисленных параметров (экспрессию антигенов, их соотношения, нормальность паттернов созревания). Европейским обществом LeukemiaNet в течение нескольких лет проводится работа по стандартизации МПЦ в диагностике МДС.

В настоящее время определены оптимальные антигены и параметры, которые необходимо анализировать в основных клеточных компартаментах КМ: ранних предшественниках, нейтрофилах, моноцитах и эритрокариобластах. Перспективным направлени-

ем дальнейшей работы является уменьшение вероятности возможных ошибок, связанных с отличиями в процессах пробоподготовки, выбора комбинаций МКА и стратегий гейтирования. Немаловажен поиск способов дальнейшего повышения чувствительности и специфичности метода МПЦ в диагностике МДС. Совершенствование цитометрических подходов позволит интегрировать метод МПЦ в диагностические протоколы МДС и тем самым улучшить первичную диагностику данного гематологического заболевания.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Кохно А.В. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению миелодиспластических синдромов взрослых (2015 г.). *Гематология и трансфузиология* 2016;61(1S(4)):1–32. [Savchenko V.G., Parovichnikova E.N., Kokhno A.V. et al. National clinical guidelines for the diagnosis and treatment of adult myelodysplastic syndromes (2015). *Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology* 2016;61(1S(4)):1–32 (In Russ.)]. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-1.
2. Tefferi A., Vardiman J.W. Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med* 2009;361(19):1872–85. DOI: 10.1056/NEJMra0902908. PMID: 19890130.
3. Двирный В.Н., Кохно А.В., Паровичникова Е.Н. Вторичный дисмиелопоэз у больных миелодиспластическими синдромами. *Терапевтический архив* 2014;86(7):97–103. [Dvirnyk V.N., Kokhno A.V., Parovichnikova E.N. Secondary dysmyelopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic archive* 2014;86(7):97–103 (In Russ.)]. PMID: 25314785.
4. Cremers E.M.P., Westers T.M., Alhan C. et al. Multiparameter flow cytometry is instrumental to distinguish myelodysplastic syndromes from non-neoplastic cytopenias. *Eur J Cancer* 2016;54:49–56. DOI:10.1016/j.ejca.2015.11.013. PMID: 26720403.
5. Soenen V., Preudhomme C., Roumier C. et al. 17p Deletion in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Analysis of breakpoints and deleted segments by fluorescence in situ. *Blood* 1998;91(3):1008–15. PMID: 9446663.
6. Ковригина А.М., Глинкина С.А., Байков В.В. Принципы патоморфологической дифференциальной диагностики миелодиспластических синдромов. *Клиническая онкогематология* 2015;8(1):62–8. [Kovrigina A.M., Glinkina S.A., Baykov V.V. Principles of pathomorphological differential diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical oncohematology* 2015;8(1):62–8 (In Russ.)].
7. Della Porta M.G., Malcovati L., Boveri E. et al. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2009;27(5):754–62. DOI:10.1200/JCO.2008.18.2246. PMID: 19103730.
8. Кохно А.В., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г. Миелодиспластический синдром. *Клиническая геронтология* 2009;15(3):33–46. [Kokhno A.V., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G. Myelodysplastic syndrome. *Klinicheskaya gerontologiya = Clinical gerontology* 2009;15(3):33–46. (In Russ.)].
9. Кохно А.В., Пименова М.А., Паровичникова Е.Н. и др. Выявление скрытых аномалий кариотипа при миелодиспластическом синдроме. *Гематология и трансфузиология* 2014;59(1):25–8. [Kokhno A.V., Pimenova M.A., Parovichnikova E.N. et al. Detection of hidden karyotype anomalies in myelodysplastic syndrome. *Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology* 2014;59(1):25–8 (In Russ.)].
10. Valent P., Horny H.P., Bennett J.M. et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res* 2007;31(6):727–36. DOI: 10.1016/j.leukres.2006.11.009. PMID: 17257673.
11. Loken M.R., van de Loosdrecht A., Ogata K. et al. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from a working conference. *Leuk Res* 2008;32(1):5–17. DOI: 10.1016/j.leukres.2007.04.020. PMID: 17576013.
12. Porwit A., van de Loosdrecht A.A., Bettelheim P. et al. 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. *Leukemia* 2014;28(9):1793–8. DOI: 10.1038/leu.2014.191. PMID: 24919805.
13. Westers T.M., Ireland R., Kern W. et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia* 2012;26(7):1730–41. DOI: 10.1038/leu.2012.30. PMID: 22307178.
14. van de Loosdrecht A.A., Alhan C., Bene M.C. et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2009;94(8):1124–34. DOI: 10.3324/haematol.2009.005801. PMID: 19546437.
15. Aanei C.M., Picot T., Tavernier E. et al. Diagnostic Utility of Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes. *Front Oncol* 2016;6:161. DOI: 10.3389/fonc.2016.00161. PMID: 27446807.
16. Ogata K., Kishikawa Y., Satoh C. et al. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood* 2006;108(3):1037–44. DOI: 10.1182/blood-2005-12-4916. PMID: 16574954.
17. van de Loosdrecht A.A., Westers T.M. Cutting edge: flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *J Natl Compr Canc Netw* 2013;11(7):892–902. PMID: 23847222.
18. Bellos F., Kern W. Flow cytometry in the diagnosis of myelodysplastic syndromes (MDS) and the value of myeloid

- nuclear differentiation antigen (MNDA). *Cytometry B Clin Cytom* 2014;92(3):200–6. DOI: 10.1002/cytob.21190. PMID: 25258054.
19. Matarraz S., López A., Barrena S. et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia* 2008;22(6):1175–83. DOI: 10.1038/leu.2008.49. PMID: 18337765.
 20. Chabannon C., Wood P., Torok-Storb B. Expression of CD7 on normal human myeloid progenitors. *J Immunol* 1992;149(6):2110–3. PMID: 1381397.
 21. Tien H.F., Wang C.H. CD7 positive hematopoietic progenitors and acute myeloid leukemia and other minimally differentiated leukemia. *Leuk Lymphoma* 1998;31(1–2):93–8. DOI: 10.3109/10428199809057588. PMID: 9720718.
 22. Ogata K., Nakamura K., Yokose N. et al. Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 2002;100(12):3887–96. DOI: 10.1182/blood-2002-01-0222. PMID: 12393641.
 23. Jorgensen J.L., Chen S.S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia: methods and best applications. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011;11(Suppl 1):S49–53. DOI: 10.1016/j.clml.2011.03.023. PMID: 22035748.
 24. Jaso J.M., Wang S.A., Jorgensen J.L., Lin P. Multi-color flow cytometric immunophenotyping for detection of minimal residual disease in AML: past, present and future. *Bone Marrow Transplant* 2014;49(9):1129–38. DOI: 10.1038/bmt.2014.99. PMID: 24842529.
 25. van de Loosdrecht A.A., Westers T.M., Westra A.H. et al. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood* 2008;111(3):1067–77. DOI: 10.1182/blood-2007-07-098764. PMID: 17971483.
 26. Davis B.H., Foucar K., Szczarkowski W. et al. U.S.-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: medical indications. *Cytometry* 1997;30(5):249–63. PMID: 9383099.
 27. Moon H.W., Huh J.W., Lee M. et al. Immunophenotypic Features of Granulocytes, Monocytes, and Blasts in Myelodysplastic Syndromes. *Korean J Lab Med* 2010;30(2):97. DOI: 10.3343/kjlm.2010.30.2.97. PMID: 20445324.
 28. Gong P., Metrebian F., Dulau-Florea A. et al. Aberrant expression of CD56 on granulocytes and monocytes in myeloproliferative neoplasm. *J Hematop* 2013;6(3):127–34. DOI: 10.1007/s12308-013-0190-z.
 29. Kussick S.J., Wood B.L. Using 4-color flow cytometry to identify abnormal myeloid populations. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127(9):1140–7. DOI: 10.1043/1543–2165(2003)127<1140:UCFCTI>2.0.CO;2. PMID: 12946231.
 30. Stetler-Stevenson M., Arthur D.C., Jabbour N. et al. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood* 2001;98(4):979–87. PMID: 11493442.
 31. Chung J.W., Park C.J., Cha C.H. et al. A combination of CD15/CD10, CD64/CD33, CD16/CD13 or CD11b flow cytometric granulocyte panels is sensitive and specific for diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Ann Clin Lab Sci* 2012;42(3):271–80. PMID: 22964615.
 32. Lorand-Metze I., Ribeiro E., Lima C.S.P. et al. Detection of hematopoietic maturation abnormalities by flow cytometry in myelodysplastic syndromes and its utility for the differential diagnosis with non-clonal disorders. *Leuk Res* 2007;31(2):147–55. DOI: 10.1016/j.leukres.2006.04.010. PMID: 16750852.
 33. Stachurski D., Smith B.R., Pozdnyakova O. et al. 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. *Leuk Res* 2008;32(2):215–24. DOI: 10.1016/j.leukres.2007.06.012. PMID: 17675229.
 34. van de Vyver A., Visser A. Decreased CD10 expression in the bone marrow neutrophils of HIV positive patients. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2010;2(3):e2010032. DOI: 10.4084/mjhid.2010.032. PMID: 21776338.
 35. Keerthivasan G., Mei Y., Zhao B. et al. Aberrant overexpression of CD14 on granulocytes sensitizes the innate immune response in mDia1 heterozygous del(5q) MDS. *Blood* 2014;124(5):780–90. DOI: 10.1182/blood-2014-01-552463. PMID: 24891322.
 36. Cremers E.M.P., Westers T.M., Alhan C. et al. Implementation of erythroid lineage analysis by flow cytometry in diagnostic models for myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2017;102(2):320–6. DOI: 10.3324/haematol.2016.147843. PMID: 27658438.
 37. Della Porta M.G., Picone C. Diagnostic Utility of Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2017;9(1):e2017017. DOI:10.4084/MJHID.2017.017. PMID: 28293405.
 38. Eidenschink Brodersen L., Menssen A.J., Wangen J.R. et al. Assessment of erythroid dysplasia by “difference from normal” in routine clinical flow cytometry workup. *Cytometry B Clin Cytom* 2015;88(2):125–35. DOI: 10.1002/cyto.b.21199. PMID: 25490867.
 39. Westers T.M., Cremers E.M.P., Oelschlaegel U. et al. Immunophenotypic analysis of erythroid dysplasia in myelodysplastic syndromes. A report from the IMDSFlow working group. *Haematologica* 2017;102(2):308–19. DOI: 10.3324/haematol.2016.147835. PMID: 27758818.
 40. Wells D.A., Benesch M., Loken M.R. et al. 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. *Blood* 2003;102(1):394–403. DOI: 10.1182/blood-2002-09-2768. PMID: 12649150.
 41. Chu S.C., Wang T.F., Li C.C. et al. Flow cytometric scoring system as a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2011;35(7):868–73. DOI: 10.1016/j.leukres.2011.02.016. PMID: 21397943.

ORCID авторовЮ.О. Давыдова: <https://orcid.org/0000-0001-5932-0285>**ORCID of authors**Yu. O. Davydova: <https://orcid.org/0000-0001-5932-0285>**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.**Статья поступила:** 27.12.2017. **Принята в печать:** 14.02.2018**Article received:** 27.12.2017. **Accepted for publication:** 14.02.2018