

Изучение признаков дисмиелопоэза методом многоцветной проточной цитофлуориметрии у пациентов с миелодиспластическими синдромами

Ю.О. Давыдова, И.В. Гальцева, Е.Н. Паровичникова, А.В. Кохно, Н.М. Капранов, В.В. Троицкая, Е.А. Михайлова, З.Т. Фидарова, Т.Н. Моисеева, Л.А. Кузьмина, Е.А. Лукина, Т.Н. Обухова, Л.А. Гребенюк, А.М. Ковригина, В.Н. Двирнык, В.Г. Савченко

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

Контакт: Юлия Олеговна Давыдова juliya89mur@yandex.ru

Введение. Миелодиспластические синдромы (МДС) — это гетерогенная группа клональных заболеваний системы кроветворения, характеризующихся дисмиелопоэзом и цитопениями, наличием цитогенетических aberrаций и высоким риском трансформации в острые миелоидные лейкозы. Диагностика МДС требует комплексного подхода и обязательного выполнения цитологического, цитохимического и цитогенетического исследований аспирата костного мозга, а также гистологического исследования трепанобиоптата. Однако в случаях цитопенических синдромов с минимальными проявлениями дисмиелопоэза требуется дополнительный диагностический критерий, который позволил бы верифицировать МДС. Исследование аспирата костного мозга методом многоцветной проточной цитофлуориметрии (МПЦ) можно рассматривать как дополнительный критерий в диагностике МДС.

Цель исследования — оценка частоты встречаемости признаков дисмиелопоэза у пациентов с различными формами МДС методом МПЦ.

Материалы и методы. В исследование включено 79 пациентов с МДС: 8 — с МДС с изолированной делецией 5q, 33 — с МДС без избытка бластных клеток и 38 — с избытком бластных клеток. Исследование аспирата костного мозга проводили методом 6-цветной проточной цитофлуориметрии. В контрольную группу вошло 35 доноров аллогенного костного мозга. В результате анализа составлялось заключение по скрининговой шкале Ogata score, прогностической шкале Wells и объединенной шкале Ogata—Wells.

При применении скринингового метода наличие 2 и более цитометрических признаков МДС было выявлено у 60 (75,9 %) из 79 пациентов с МДС. При использовании более глубокого анализа всех клеточных компартментов показано, что наибольший балл по шкале Wells был у пациентов из группы МДС с избытком бластных клеток. При применении объединенной шкалы Ogata—Wells признаки, характерные для МДС, обнаруживались у 70 (88,6 %) из 79 пациентов с МДС. У пациентов с МДС с избытком бластных клеток частота обнаружения увеличенного количества CD34⁺ и/или CD117⁺ миелоидных клеток была выше, чем у больных с МДС без избытка бластных клеток и МДС с делецией 5q. При этом частота обнаружения аномальных цитометрических параметров (аномальная экспрессия CD34, CD117, доля CD56⁺ миелобластных клеток) в этих группах не отличалась. У пациентов с изолированной делецией 5q и МДС без избытка бластных клеток чаще выявлялась повышенная доля CD7⁺CD34⁺ клеток, чем при МДС с избытком бластных клеток.

Заключение. Таким образом, цитометрические аномалии при МДС встречаются часто, даже у пациентов без избытка бластных клеток. Метод МПЦ может быть использован в качестве дополнительного диагностического метода при первичной диагностике МДС.

Ключевые слова: миелодиспластический синдром, проточная цитофлуориметрия, иммунофенотипирование

Для цитирования: Давыдова Ю.О., Гальцева И.В., Паровичникова Е.Н. и др. Изучение признаков дисмиелопоэза методом многоцветной проточной цитофлуориметрии у пациентов с миелодиспластическими синдромами. Онкогематология 2018;13(4):75–88.

DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-4-75-88

Study of myelodysplastic features in patients with myelodysplastic syndromes by multicolor flow cytometry

Yu.O. Davydova, I.V. Galtseva, E.N. Parovichnikova, A.V. Kokhno, N.M. Kapranov, V.V. Troitskaya, E.A. Mikhailova, Z.T. Fidarova, T.N. Moiseeva, L.A. Kuzmina, E.A. Lukina, T.N. Obukhova, L.A. Grebenyuk, A.M. Kovrigina, V.N. Dvirnyk, V.G. Savchenko
National Research Center for Hematology; 4 Novyi Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia

Background. Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of clonal diseases of the hematopoiesis system characterized by dysmyelopoiesis and cytopenia, the presence of cytogenetic aberrations and a high risk of transformation into acute myeloid leukemias. Diagnosis of MDS requires a comprehensive approach and mandatory performance of cytological, cytochemical and cytogenetic studies of bone marrow aspirate, as well as histological examination of trephine biopsy. However, in some cases it is necessary to undergo a diagnostic test that would allow verification of the MDS. The study of bone marrow aspirate by multicolor flow cytometry (MFC) can be considered as an additional diagnostic criterion in the diagnosis of MDS.

The objective of the study was to estimate the incidence of myelodysplastic features in patients with various forms of MDS by the MFC method. **Materials and methods.** The study included 79 patients with MDS: 8 with MDS with 5q deletion, 33 with MDS without excess blast cells and 38 with excess of blasts. A bone marrow aspirate test was performed by 6-color flow cytometry. The control group included 35 donors of allogeneic bone marrow. The analysis resulted in a conclusion on the Ogata score scale, the Wells prognostic scale and the combined Ogata–Wells scale. When using the screening method, the presence of two or more cytometric signs of MDS was detected in 60 (75.9 %) of 79 MDS patients. Wells score was higher in MDS group with an excess of blast than in others. Using the combined Ogata–Wells scale, cytometric aberrations were found in 70 (88.6 %) of 79 MDS patients. In patients with MDS with an excess of blasts, the incidence of increased CD34⁺ and/or CD117⁺ myeloid cells was higher than in MDS patients without an excess of blasts and an MDS with a 5q deletion. The frequency of abnormal cytometric parameters (anomalous expression of CD34, CD117, CD56⁺ myeloblasts) in these groups did not differ. In patients with isolated 5q deletion and MDS without excess of blasts, an increased proportion of CD7⁺CD34⁺ cells was more often detected than in MDS with an excess of blasts.

Conclusion. Thus, cytometric abnormalities in MDS are common, even in patients without excess of blasts. The MFC method can be used as an additional diagnostic method in the initial diagnosis of MDS.

Key words: myelodysplastic syndrome, flow cytometry, immunophenotyping

For citation: Davydova Yu.O., Galtseva I.V., Parovichnikova E.N. et al. Study of myelodysplastic features in patients with myelodysplastic syndromes by multicolor flow cytometry. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2018;13(4):75–88.

Введение

Миелодиспластические синдромы (МДС) представляют собой гетерогенную группу клональных заболеваний системы кроветворения, характеризующихся цитопениями, наличием дисмиелопоэза, высокой частотой обнаружения аномалий кариотипа и высоким риском трансформации в острые миелоидные лейкозы [1, 2]. Ранние миелоидные предшественники у больных МДС характеризуются избыточным апоптозом, что может быть одной из причин развития цитопений [3]. Выявление цитопении и признаков дисплазии хотя бы в одной линии гемопоэза является необходимым условием для верификации диагноза МДС [3, 4].

Базовыми методами диагностики МДС являются цитологическое, цитохимическое, гистологическое и цитогенетическое исследования костного мозга (КМ). Морфологическим признаком МДС является наличие дисплазии хотя бы в одном ростке гемопоэза. Наличие диспластических признаков в разных линиях миелопоэза само по себе не является 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 [3, 5]. Клеточность костного мозга, наличие фиброза стромы и дисплазии клеток основных ростков кроветворения оцениваются с помощью гистологического исследования трепанобиоптата [6]. Исследование гистоархитектоники ростков миелопоэза, выявление аномальной локализации незрелых предшественников гранулоцитарного ростка и иммуногистохимическое исследова-

ние с антителами к CD34 являются крайне важными 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 (IPSS, WPSS (WHO classification-based Prognostic Scoring System) и IPSS-R (Revised International Prognostic Scoring System)) включены особенности кариотипа. Миелодиспластический синдром 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 [8, 9].

Даже при выполнении цитологического, цитохимического, цитогенетического и гистологического исследований может потребоваться дополнительный диагностический критерий, особенно при отсутствии цитогенетических аномалий и минимальных признаках дисмиелопоэза при морфологическом исследовании КМ. В последнее время в качестве дополнительного метода все чаще используют многоцветную проточную цитофлуориметрию (МПЦ) [10]. В 2003 г. D.A. Wells и соавт. была предложена цитометрическая прогностическая шкала, основанная на подсчете числа цитометрических aberrаций в компартменте нейтрофилов и моноцитов, а также количества аномальных ранних миелоидных клеток. При оценке выживаемо-

сти больных МДС была выявлена ассоциация между суммарным баллом по шкале Wells и продолжительностью жизни, а также вариантом МДС в соответствии с классификацией ВОЗ [11]. Первая работа по стандартизации диагностики МДС методом МПЦ была опубликована в 2009 г. В дальнейшем новые исследования и накопленный опыт привели к пересмотру и дополнению рекомендаций в 2012 и 2014 гг. [12–14]. Согласно классификации Всемирной организации здравоохранения 2017 г., при диагностике МДС выявление не менее 3 цитометрически аномальных параметров в 2 и более клеточных компартментах костного мозга имеют высокую диагностическую значимость при МДС [1].

Целью данного исследования было проведение анализа костного мозга пациентов с МДС методом МПЦ, определение и сравнение частоты встречаемости аномальных цитометрических признаков в разных группах МДС.

Материалы и методы

Пациенты

С января 2016 г. по июль 2017 г. в исследование было включено 79 пациентов с диагнозом МДС, проходивших обследование в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России (НМИЦ гематологии). Из них 8 пациентов с изолированной делецией 5q (МДС с 5q-), 4 пациента с МДС с линейной дисплазией (МДС-ЛД), из них 3 – с рефрактерной анемией, 1 – с рефрактерной нейтропенией), 22 – с МДС с мультилинейной

дисплазией (МДС-МД), 7 – с МДС с кольцевыми сидеробластами (МДС-КС, из них 4 – МДС с МД и КС, 3 – МДС с ЛД и КС), 20 – с МДС с избытком бластов-1 (МДС-ИБ-1), 16 – с МДС с избытком бластов-2 (МДС-ИБ-2). Соотношение мужчин и женщин, возраст пациентов с разными вариантами МДС приведены в табл. 1. Диагноз был установлен на основании клинического течения заболевания, данных морфологического, цитохимического, цитогенетического исследований аспирата КМ и гистологического исследования трепанобиоптата.

Многоцветная проточная цитофлуориметрия

Материалом для исследования служил аспират КМ с антикоагулянтом ЭДТА. Проводили предварительный лизис КМ раствором, содержащим хлорид аммония (Farm Lyse, BD Biosciences, США). После отмывки в растворе CellWash (BD Biosciences, США) 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. Использовали моноклональные антитела, меченные флуорохромами, против CD56 FITC (клон NCAM16.2), CD34 APC (клон 8G12), CD19 PerCP-Cy5.5 (клон SJ25C1), CD117 PE-Cy7 (клон 104D2), CD33 APC (клон P67.6), CD16 PerCP-Cy5.5 (клон 3G8), CD45 APC-Cy7 (клон 2D1), CD11b APC-Cy7 (клон ICRF44), CD36 PerCP-Cy5.5 (клон CB38), CD64 APC (клон 10.1) производства BD Biosciences и CD7 PE (клон 8H8.1), CD45 FITC (клон

Таблица 1. Характеристика пациентов с миелодиспластическим синдромом, включенных в исследование

Table 1. Characteristics of myelodysplastic syndrome patients included in the study

Диагноз Diagnosis	n	Медиана возраста Median age	Минимальный возраст Minimum age	Максимальный возраст Maximum age	Соотношение мужчины:женщины Male:female ratio
МДС с 5q- MDS with 5q-	8	66	63	79	1:3
МДС-ЛД MDS-LD	4	67	57	82	1:1
МДС-КС MDS-RS	7	69	54	79	1:1,3
МДС-МД MDS-MLD	22	56	32	83	1:2,1
МДС-ИБ-1 MDS-EB-1	20	61,5	21	74	1,2:1
МДС-ИБ-2 MDS-EB-2	18	64	20	87	3,5:1

Примечание. МДС – миелодиспластический синдром; МДС-ЛД – МДС с линейной дисплазией; МДС-КС – МДС с кольцевыми сидеробластами; МДС-МД – МДС с мультилинейной дисплазией; МДС-ИБ-1 – МДС с избытком бластов-1; МДС-ИБ-2 – МДС с избытком бластов-2.

Note. MDS – myelodysplastic syndrome; MDS-SLD – MDS with single lineage dysplasia; MDS-RS – MDS with ring sideroblasts; MDS-MLD – MDS with multilineage dysplasia; MDS-EB-1 – MDS with an excess of blasts-1; MDS-EB-2 – MDS with an excess of blasts-2.

Таблица 2. Параметры, учитываемые в ходе цитометрического анализа

Table 2. Parameters analyzed by cytometric analysis

Клеточный компартмент Cell compartment	Анализируемые параметры Analyzed parameters
Компартмент гемопоэтических предшественников Compartment of hematopoietic progenitors	Доля CD34 ⁺ CD19 ⁻ CD117 [±] миелоидных клеток от CD45 ⁺ клеток The proportion of CD34 ⁺ CD19 ⁻ CD117 [±] myeloid cells from CD45 ⁺ cells Средняя интенсивность флуоресценции и коэффициент вариации флуоресценции анти-CD34 и анти-CD117 на CD34 ⁺ CD19 ⁻ CD117 [±] миелоидных клетках The mean fluorescence intensity and fluorescence variation coefficient of anti-CD34 and anti-CD117 on CD34 ⁺ CD19 ⁻ CD117 [±] myeloid cells Отношение средних интенсивностей флуоресценции анти-CD45 на лимфоцитах к анти-CD45 на CD34 ⁺ миелоидных клетках (индекс CD45) The ratio of anti-CD45 mean fluorescence intensity on lymphocytes to anti-CD45 on CD34 ⁺ myeloid cells (CD45 index) Доля CD34 ⁺ CD19 ⁺ В-клеточных предшественников от CD34 ⁺ клеток The proportion of CD34 ⁺ CD19 ⁺ B-cell progenitors from CD34 ⁺ cells Доли CD7 ⁺ и CD56 ⁺ клеток от всех CD34 ⁺ миелоидных клеток The proportion of CD7 ⁺ and CD56 ⁺ cells from all CD34 ⁺ myeloid cells
Компартмент гранулоцитов Compartment of granulocytes	Доля гранулоцитов от CD45 ⁺ клеток The proportion of granulocytes from CD45 ⁺ cells Отношение среднего показателя SSC (Side Scatter) гранулоцитов к среднему показателю SSC лимфоцитов (индекс гранулярности) Ratio of mean granulocytes SSC (Side Scatter) to mean lymphocytes SSC (granularity index) Доля CD56 ⁺ , CD10 ⁺ , CD14 ⁺ гранулоцитов The proportion of CD56 ⁺ , CD10 ⁺ , CD14 ⁺ granulocytes Соотношение экспрессии (паттерны) CD16 против CD13, CD16 против CD11b, CD13 против CD11b Expression ratio (patterns) of CD16 vs CD13, CD16 vs CD11b, CD13 vs CD11b
Компартмент моноцитов Compartment of monocytes	Доля моноцитов от CD45 ⁺ клеток The proportion of monocytes from CD45 ⁺ cells Доля CD56 ⁺ моноцитов The proportion of CD56 ⁺ monocytes Соотношение экспрессии (паттерны) CD11b против HLA-DR, CD13 против CD11b, CD14 против CD36 Expression ratio (patterns) of CD11b vs HLA-DR, CD13 vs CD11b, CD14 vs CD36 Средняя интенсивность флуоресценции анти-CD64 The mean fluorescence intensity of anti-CD64

J33), CD13 PE (клон SJ1D1) и CD14 PE (клон RMO52) производства Beckman Coulter. Исследование выполнено 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).

Анализ основных клеточных компартментов (ранних миелобластных клеток, В-клеточных предшественников, гранулоцитов и моноцитов) проводили в соответствии с рекомендациями Westers Т.М. и соавт. (2012) (табл. 2) [13]. Для оценки экспрессии CD34 и CD117 на CD34⁺ миелоидных клетках учитывали среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) и коэффициент вариации (КВ) флуоресцентного сигнала.

Анализируемые цитометрические параметры были двух типов: качественные и количественные. К качественным параметрам относили соотношения экс-

прессии (паттерны) антигенов на гранулоцитах и моноцитах, остальные параметры (доли клеток, СИФ и КВ флуоресцентного сигнала) – к количественным (см. табл. 2).

Контрольная группа включала 35 здоровых доноров аллогенного костного мозга. Качественные цитометрические параметры оценивались визуальным методом: у пациента паттерн считался аномальным в случае значительных его отличий от контрольной группы. Для каждого количественного параметра рассчитывали референсный интервал, содержащий 95 % всех значений (от 2,5 до 97,5 перцентиля), полученных при анализе КМ доноров. Количественный параметр признавали аномальным в случае его отклонения от референсного интервала. Примеры аномальных цитометрических параметров представлены на рис. 1.

После получения данных по параметрам компартментов ранних миелоидных клеток, популяций гранулоцитов и моноцитов КМ пациентов определяли оценки по шкалам Ogata score, Wells и Ogata–Wells [15, 16].

По шкале Ogata score оценивали параметры, показанные в табл. 3.

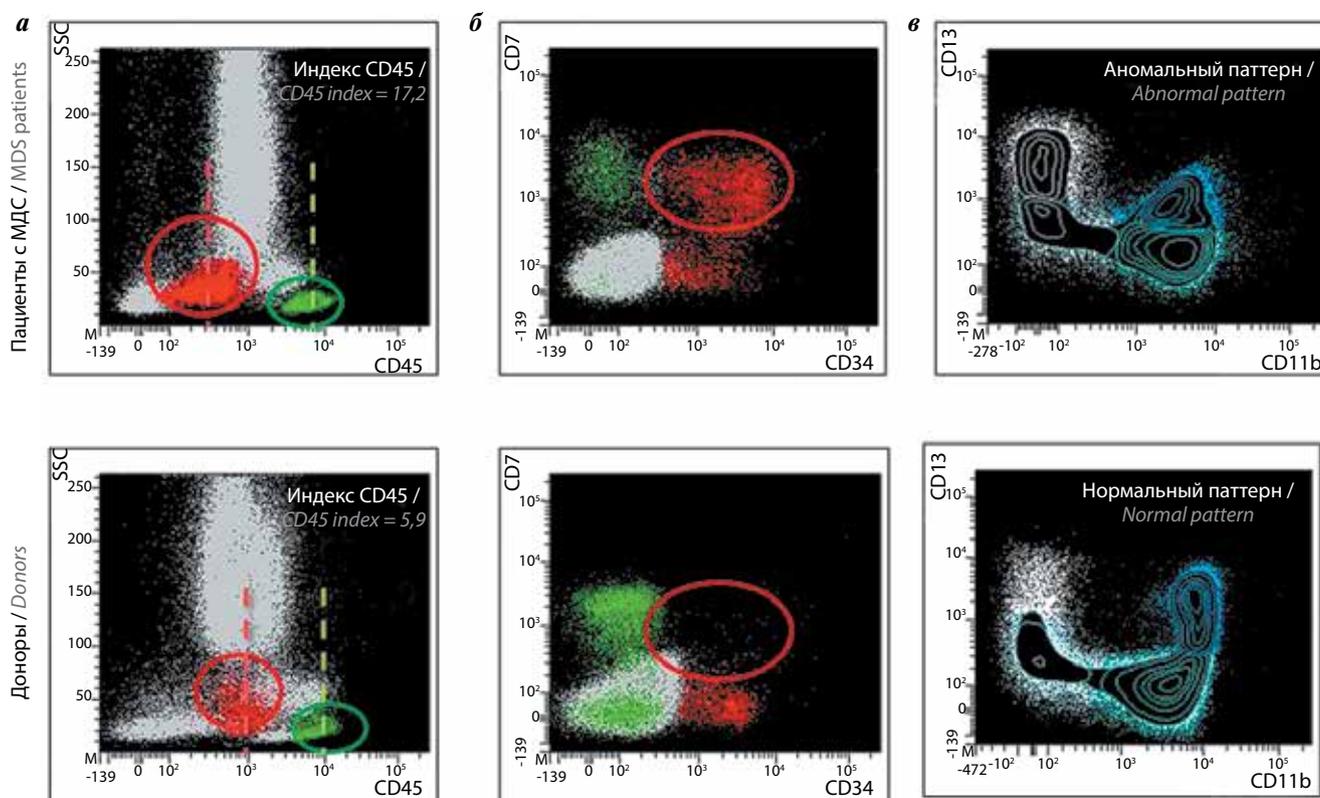


Рис. 1. Примеры аномальных цитометрических параметров у пациентов с МДС: а – повышенное отношение экспрессии CD45 на лимфоцитах (выделены зеленым) к экспрессии CD45 на CD34⁺ миелоидных клетках (выделены красным); б – повышенная доля CD7⁺CD34⁺ миелоидных клеток от всех CD34⁺ миелоидных клеток; в – аномальный паттерн CD13 против CD11b гранулоцитов. Ниже показаны те же параметры у здоровых доноров

Fig. 1. Examples of abnormal cytometric parameters in MDS patients: а – an increased ratio of CD45 expression on lymphocytes (green) to CD45 expression on CD34⁺ myeloid cells (red); б – increased proportion of CD7⁺CD34⁺ myeloid cells from all CD34⁺ myeloid cells; в – abnormal pattern of CD13 vs CD11b on granulocytes. The same parameters for healthy donors are shown below

Согласно рекомендациям Ogata К. и соавт. (2006), при отклонениях от нормальных значений по 2 и более параметрам шкалы Ogata score с высокой вероятностью предполагается наличие МДС [15].

Конечный балл по прогностической шкале Wells подсчитывали, как указано в табл. 4. Итоговый балл от 0 до 1 соответствовал минимальному, от 2 до 3 – среднему, более 4 – высокому [11].

С учетом всех параметров, указанных в табл. 2, в результате анализа КМ пациента давалось также заключение в буквенном эквиваленте по объединенной шкале Ogata–Wells (табл. 5).

Статистический анализ данных

Статистический анализ данных проводили с помощью GraphPad Prism 6. Значимость различий

Таблица 3. Параметры шкалы Ogata score

Table 3. The parameters of Ogata score scale

№	Параметр Parameter
1	Доля CD34 ⁺ CD19 ⁻ миелоидных клеток от CD45 ⁺ клеток The proportion of CD34 ⁺ CD19 ⁻ myeloid cells from CD45 ⁺ cells
2	Доля CD34 ⁺ CD19 ⁺ В-клеточных предшественников от CD34 ⁺ клеток The proportion of CD34 ⁺ CD19 ⁺ B-progenitor cells from CD34 ⁺ cells
3	Отношение средних интенсивностей флуоресценции (СИФ) анти-CD45 на лимфоцитах к СИФ анти-CD45 на CD34 ⁺ миелоидных клетках (индекс CD45) The ratio of the anti-CD45 mean fluorescence intensities (MFI) on lymphocytes to anti-CD45 MFI on CD34 ⁺ myeloid cells (CD45 index)
4	Отношение параметра бокового светорассеяния (SSC) на гранулоцитах к лимфоцитам (индекс гранулярности, ИГ) The ratio of side scattering (SSC) on granulocytes to lymphocytes (granularity index, GI)

Таблица 4. Цитометрическая шкала Wells

Table 4. Wells cytometric scale

Балл Score	Описание Description
Основной балл The main points	
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 ...; Две-три aberrации или в гранулоцитах, или в моноцитах One aberration in both granulocytes and monocytes either... Two or three aberrations in either granulocytes or monocytes
3	Четыре aberrации и более 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 Additional points	
+1	Сниженное миелоидно-лимфоидное соотношение (<1) Нормальное содержание миелобластов (<5 %) с цитометрическими aberrациями Reduced myeloid-lymphoid ratio (<1) Normal myeloblasts count (<5 %) with cytometric aberrations
+2	Повышенное содержание аномальных миелобластов (5–10 %) Increased number of abnormal myeloblasts (5–10 %)
+3	Повышенное содержание аномальных миелобластов (11–20 %) Increased number of abnormal myeloblasts (11–20 %)
+4	Повышенное содержание аномальных миелобластов (>20 %) Increased number of abnormal myeloblasts (>20 %)

Таблица 5. Объединенная шкала Ogata–Wells

Table 5. Combining scale Ogata–Wells

Параметр Parameter	Значение Value							
Шкала Ogata score Ogata score scale	<2				≥2			
Цитометрические аномалии в миелоидных предшественниках Cytometric anomalies in myeloid progenitors	–	–	+	+	–	–	+	+
Цитометрические аномалии: в гранулоцитах (сниженный индекс гранулярности или 2 другие аномалии и более); в моноцитах (экспрессия CD56 или 2 и более других аномалий) Cytometric anomalies: in granulocytes (a reduced granularity index or 2 or more other anomalies); in monocytes (CD56 expression or 2 or more other anomalies)	–	+	–	+	–	+	–	+
Оценка	A	A/B	A/B	C	A/B	B/C	B/C	C

Примечание. А – результаты цитометрического исследования не соответствуют миелодиспластическому синдрому; В – есть признаки, которые часто встречаются при миелодиспластическом синдроме; С – результаты цитометрического исследования соответствуют миелодиспластическому синдрому.

Note. A – cytometric examination results do not correspond to myelodysplastic syndrome; B – there are signs that are often found in myelodysplastic syndrome; C – cytometric examination results correspond to myelodysplastic syndrome.

частоты встречаемости аномальных признаков между группами пациентов с МДС определяли с помощью критерия Фишера. Значимыми признавались отличия при $p < 0,05$. Для сравнения значений баллов по шкалам Ogata score и Wells у пациентов с разными вариантами МДС применяли критерий Краскела–Уоллиса (для ненормальных распределений). Для множественных сравнений использовали поправку Данна. Проверку нормальности распределения проводили с помощью критерия Шапиро–Уилка.

Результаты

В статье Ogata K. 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 %, индекс гранулярности гранулоцитов (ИГ) был выше 6, а отношение экспрессии $CD45$ лимфоцитов к $CD34^+$ миелобластам (индекс $CD45$) находилось в интервале от 4 до 7,5 [15]. В результате проведенного нами исследования у всех доноров доля $CD34^+$ миелобластных клеток была ниже 2 % (максимальное значение – 1,6 %), ИГ 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 5,6–8,9, отличном от полученного в работе K. Ogata и соавт. [15], что, вероятно, связано с различиями в используемых реагентах. В качестве референсного значения мы использовали полученный нами интервал для индекса $CD45$.

Количество баллов по шкале Ogata score 2 и более было у 19 из 20 пациентов с МДС-ИБ-1, у 17 из 18 с МДС-ИБ-2. У пациентов с другими вариантами

МДС реже выявлялось 2 балла и более по шкале Ogata score (МДС с 5q- – 5 из 8; МДС-ЛД – 2 из 4; МДС-КС – 5 из 7; МДС-МД – 12 из 22). В среднем достоверно более высокий балл был у пациентов с МДС с ИБ-1 и ИБ-2 по сравнению с пациентами с МДС с МД (рис. 2а).

Минимальный балл (0–1) по прогностической шкале Wells был только у 1 (25 %) из 4 пациентов группы МДС с ЛД, ни у одного пациента из других групп МДС не было минимального балла. Средний балл (2–3) по шкале Wells был у 4 (50 %) из 8 пациентов с МДС с 5q-, у 2 (50 %) из 4 пациентов МДС с ЛД, у 2 (28,6 %) из 7 МДС с КС, у 6 (27,3 %) из 22 МДС с МД и у 2 (10 %) из 20 МДС-ИБ-1. Высокий балл (4–9) по шкале Wells был у 4 (50 %) из 8 пациентов с МДС с 5q-, у 1 (25 %) из 4 пациентов МДС с ЛД, у 5 (71,4 %) из 7 МДС с КС, у 16 (72,7 %) из 22 МДС с МД, у 18 (90 %) из 20 МДС-ИБ-1 и у всех (100 %) пациентов с МДС-ИБ-2. В среднем достоверно более высокий балл был у пациентов МДС с ИБ-1 по сравнению с пациентами с МДС с 5q- и МДС-ЛД, а также у пациентов с МДС с ИБ-2 по сравнению с пациентами групп МДС с 5q-, МДС с ЛД, КС и ИД (рис. 2б).

По объединенной шкале Ogata–Wells оценка «С» была у 100 % пациентов групп МДС-ИБ-1 и МДС-ИБ-2. Отсутствие признаков МДС (оценка «А») выявили у 1 из 8 пациентов с МДС с 5q-, у 2 из 4 МДС с ЛД, у 1 из 7 МДС с КС и у 5 из 22 МДС с МД (рис. 3).

У 2 пациентов с МДС-ИБ-1 и ИБ-2 на аномальных миелобластных клетках экспрессия $CD34$ отсутствовала. В этих случаях подсчет количества бластных клеток методом МПЦ проводили по маркеру $CD117$.

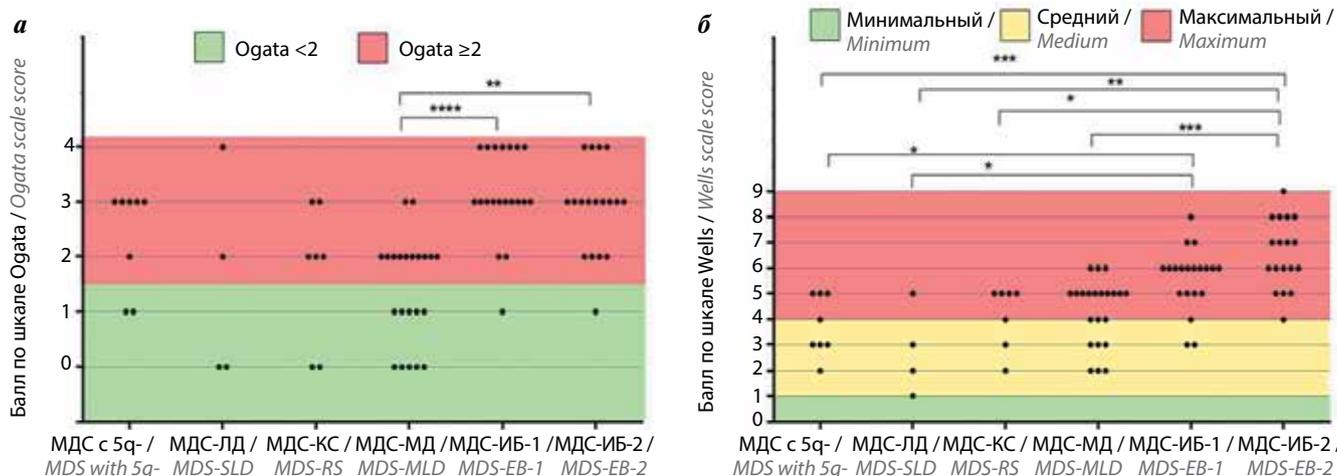


Рис. 2. Баллы, полученные при анализе костного мозга пациентов с миелодиспластическим синдромом по шкалам Ogata score (а) и Wells (б). Звездочками указано наличие достоверных отличий между группами пациентов (**** $p \leq 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p < 0,05$). МДС – миелодиспластический синдром; МДС-ЛД – МДС с линейной дисплазией; МДС-КС – МДС с кольцевыми сидеробластами; МДС-МД – МДС с мультилинейной дисплазией; МДС-ИБ-1 – МДС с избытком бластов-1; МДС-ИБ-2 – МДС с избытком бластов-2

Fig. 2. Scores obtained from bone marrow analysis of myelodysplastic syndrome patients by Ogata score (a) and Wells (b) scales. Asterisks indicate the presence of significant differences between groups of patients (**** $p \leq 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p < 0,05$). MDS – myelodysplastic syndrome; MDS-SLD – MDS with single linear dysplasia; MDS-RS – MDS with ring sideroblasts; MDS-MLD – MDS with multilineage dysplasia; MDS-EB-1 – MDS with an excess of blasts-1; MDS-EB-2 – MDS with an excess of blasts-2

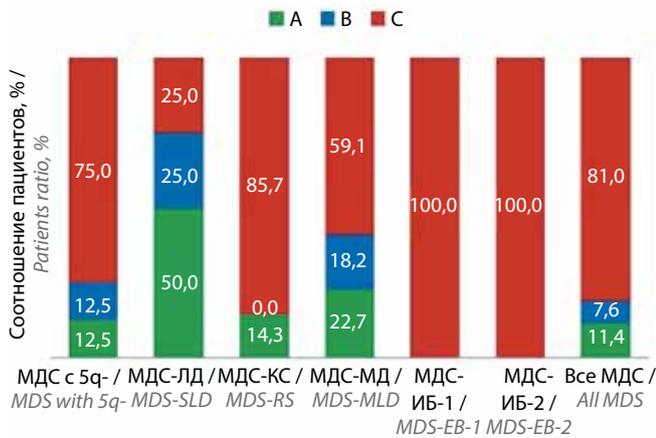


Рис. 3. Баллы, полученные при анализе костного мозга пациентов с миелодиспластическим синдромом по объединенной шкале Ogata–Wells. МДС – миелодиспластический синдром; МДС-ЛД – МДС с линейной дисплазией; МДС-КС – МДС с кольцевыми сидеробластами; МДС-МД – МДС с мультилинейной дисплазией; МДС-ИБ-1 – МДС с избытком бластов-1; МДС-ИБ-2 – МДС с избытком бластов-2

Fig. 3. Scores obtained from bone marrow analysis of myelodysplastic syndrome patients by combined Ogata–Wells scale. MDS – myelodysplastic syndrome; MDS-SLD – MDS with single lineage dysplasia; MDS-RS – MDS with ring sideroblasts; MDS-MLD – MDS with multilineage dysplasia; MDS-EB-1 – MDS with an excess of blasts-1; MDS-EB-2 – MDS with an excess of blasts-2

Мы разделили пациентов МДС на группы с учетом наличия делеции 5q и количества бластных клеток:

- I. МДС с 5q-;
- II. МДС без избытка бластных клеток (МДС-КС, МДС-ЛД, МДС-МД);
- III. МДС с избытком бластных клеток (МДС-ИБ-1, МДС-ИБ-2). В каждой из этих групп была определена частота встречаемости аномальных цитометрических признаков и выполнено их сравнение с помощью критерия Фишера (табл. 6).

У пациентов с МДС с избытком бластных клеток частота встречаемости CD34⁺ миелобластных клеток более 2 % была выше, но при этом доля пациентов с повышенным количеством CD34⁺CD7⁺ миелобластных клеток была меньше, чем у пациентов с МДС с 5q- и МДС без избытка бластных клеток. Частота встречаемости сниженного количества В-клеточных предшественников и аномального индекса CD45 у пациентов с МДС без избытка бластных клеток была ниже, чем у пациентов с МДС с избытком бластов. Повышенная доля CD117⁺ клеток не встречалась у пациентов с МДС с 5q-, однако чаще обнаруживалась у пациентов группы III, чем у пациентов группы II (см. табл. 6).

Частота выявления сниженного индекса гранулярности была выше у пациентов МДС с 5q-, чем у пациентов группы II (МДС без избытка бластных клеток). Сниженная доля CD10⁺ гранулоцитов обнаруживалась с более высокой частотой у пациентов с МДС с избытком бластов, чем у пациентов с МДС без избытка бластных клеток. Аномальные паттерны гранулоцитов CD13 против CD11b и CD11b против CD16, а также повышенная экспрессия CD14 на гранулоцитах встречались

в более высокой пропорции в группе пациентов с МДС с избытком бластных клеток. Доля пациентов со сниженным относительным количеством моноцитов была выше в группе II, чем в группе III. Отличий по другим параметрам компартамента моноцитов в группах пациентов с МДС не выявлено (см. табл. 6).

Обсуждение

С учетом полученных данных и результатов работы Ogata K. и соавт. (2006) в скрининговых целях возможно применять «мини-панель» моноклональных антител, позволяющую произвести расчет оценки по 4-параметровой шкале Ogata score. При отклонении 2 параметров и более от нормальных значений авторы этой шкалы предполагали с большей вероятностью наличие МДС.

По нашим данным, 2 балла и более по шкале Ogata score определялись среди пациентов с МДС-ИБ-1 в 95 % и МДС-ИБ-2 в 94,4 % случаев. Доля пациентов с МДС без избытка бластных клеток с 2 и более баллами по шкале Ogata score составила только 57,6 % (МДС-КС – 71,4 %, МДС-ЛД – 50 % и МДС-МД – 54,5 %). Всего 2 балла и более выявлено у 60 (75,9 %) из 79 пациентов с МДС. У 2 пациентов с МДС обнаружили аномальное отсутствие CD34 на миелобластных клетках, что могло бы привести к неправильному подсчету бластных клеток без включения в анализ CD117. В исследовании, посвященном изучению возможности использования шкалы Ogata score в диагностических целях, диагноз МДС (т. е. наличие 2 и более баллов) подтверждался методом МПЦ у 65 % пациентов с МДС в Японии и у 89 % пациентов с МДС в Италии [15].

Расширенная панель моноклональных антител позволила более подробно изучить компартамент ранних предшественников, популяции гранулоцитов и моноцитов и обнаружить цитометрические аномалии у пациентов с МДС с количеством баллов по Ogata score менее 2. Так, при анализе по шкале Wells наиболее высокий средний балл был у пациентов с МДС-ИБ-1 и МДС-ИБ-2. Высокие баллы (4–9) по шкале Wells получены у 94,7 % пациентов с избытком бластных клеток (МДС-ИБ-1–90 %, МДС-ИБ-2–100 %), у 66,7 % пациентов без избытка бластных клеток (МДС-КС – 71,4 %, МДС-ЛД – 25 % и МДС-МД – 72,7 %) и у 50 % пациентов с МДС с 5q-. Шкала Wells имеет прогностическую ценность: баллы по данной шкале коррелируют с IPSS и WPSS, а также с продолжительностью жизни пациентов. Так, в исследовании Chu S.C. и соавт. (2011) медиана выживаемости у пациентов с минимальным баллом по шкале Wells (0–1) не была достигнута в течение 57 мес наблюдения, со средним баллом (2–3) составляла 19 мес, с высоким баллом (4–9) – 6 мес [17]. В исследовании Wells D.A. и соавт. (2003) показано, что баллы по шкале Wells были ассоциированы с прогнозом у пациентов с МДС, которым проводилась трансплантация

Таблица 6. Частота встречаемости аномальных цитометрических признаков у пациентов с МДС в группах I, II и III, а также оценки по шкалам Ogata и Ogata—Wells
 Table 6. Frequency of abnormal cytometric signs in MDS patients in groups I, II and III, as well as Ogata and Ogata—Wells scales scores

Параметр Parameter	Группа МДС MDS group			p		
	I. МДС с 5q- (n = 8) I. MDS with 5q- (n = 8)	II. МДС без избытка бластных клеток (n = 33) II. MDS without excess of blasts (n = 33)	III. МДС с избытком бластных клеток (n = 38) III. MDS with excess of blasts (n = 38)	I против II I vs II	II против III II vs III	I против III I vs III
Оgata score ≥2 баллов, % Ogata score ≥2, %	62,5	57,6	94,7	Н. д. N. s. d.	0,0004	0,0307
Высокий балл (4—9) по шкале Wells, % High score (4—9) on the Wells scale, %	50	66,7	94,7	Н. д. N. s. d.	0,0042	0,0055
A по Ogata—Wells, % A by Ogata—Wells, %	12,5	24,2	0	Н. д. N. s. d.	0,0001	0,007
B по Ogata—Wells, % B by Ogata—Wells, %	12,5	15,2	0			
C по Ogata—Wells, % C by Ogata—Wells, %	75	60,6	100			
Анализ компартамента предшественников Analysis of precursors compartment						
CD34+ миелобластных клеток ≥2 % от CD45+ клеток, % CD34+ myeloblasts ≥2 % from CD45+ cells, %	12,5	30,3	94,7	Н. д. N. s. d.	<0,0001	<0,001
CD19+CD34+ <5 % от CD34+ клеток, % CD19+CD34+ <5 % from CD34+ cells, %	87,5	66,7	94,7	Н. д. N. s. d.	0,0042	Н. д. N. s. d.
Аномальный индекс CD45, % Abnormal CD45 index, %	50	24,2	65,8	Н. д. N. s. d.	0,007	Н. д. N. s. d.
Повышенная доля CD7+ миелобластных клеток, % An increased proportion of CD7+ myeloblast, %	87,5	57,6	15,8	Н. д. N. s. d.	0,0004	0,0002
Повышенная доля CD56+ миелобластных клеток, % An increased proportion of CD56+ myeloblast, %	28,6	48,5	31,6	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.
Аномальная экспрессия CD117, % CD117 abnormal expression, %	25,0	42,4	57,9	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.
Аномальная экспрессия CD34, % CD34 abnormal expression, %	37,5	24,3	26,3	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.

Продолжение табл. 6
Continuation of table 6

Параметр Parameter	Группа МДС MDS group			p		
	I. МДС с 5q- (n = 8) I. MDS with 5q- (n = 8)	II. МДС без избытка бластных клеток (n = 33) II. MDS without excess of blasts (n = 33)	III. МДС с избытком бластных клеток (n = 38) III. MDS with excess of blasts (n = 38)	I против II I vs II	II против III II vs III	I против III I vs III
Повышенная доля CD117 ⁺ клеток от CD45 ⁺ клеток, % An increased proportion of CD117 ⁺ cells from CD45 ⁺ cells, %	0	18,2	84,2	0,0353	0,0004	<0,0001
Анализ компартмента гранулоцитов Analysis of granulocyte compartment						
Сниженная доля гранулоцитов, % Reduced granulocytes proportion, %	62,5	66,7	78,9	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.
Сниженный индекс гранулярности, % Reduced granularity index, %	75,0	27,3	47,4	0,0352	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.
Повышенная доля CD56 ⁺ клеток, % Increased proportion of CD56 ⁺ cells, %	25,0	45,5	55,3	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.
Сниженная доля CD10 ⁺ клеток, % Reduced CD10 ⁺ cells proportion, %	12,5	9,1	34,2	Н. д. N. s. d.	0,0209	Н. д. N. s. d.
Аномальный CD13 против CD16, % Abnormal CD13 vs CD16, %	28,6	42,4	65,8	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.
Аномальный CD11b против CD16, % Abnormal CD11b vs CD16, %	14,3	39,4	68,4	Н. д. N. s. d.	0,018	0,0117
Аномальный CD13 против CD11b, % Abnormal CD13 vs CD11b, %	14,3	39,4	68,4	Н. д. N. s. d.	0,018	0,0117
Повышенная доля CD14 ⁺ клеток, % Increased proportion of CD14 ⁺ cells, %	0	36,4	57,9	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.	0,004
Анализ компартмента моноцитов Analysis of monocyte compartment						
Повышенная доля моноцитов, % Increased proportion of monocytes, %	12,5	66,7	23,7	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.
Сниженная доля моноцитов, % Reduced monocytes proportion, %	0	33,3	15,8	Н. д. N. s. d.	0,027	Н. д. N. s. d.

Окончание табл. 6
End of table 6

Параметр Parameter	Группа МДС MDS group			P		
	I. МДС с 5q- (n = 8) I. MDS with 5q- (n = 8)	II. МДС без избытка бластных клеток (n = 33) II. MDS without excess of blasts (n = 33)	III. МДС с избытком бластных клеток (n = 38) III. MDS with excess of blasts (n = 38)	I против II I vs II	II против III II vs III	I против III I vs III
Аномальный CD13 против CD11b, % Abnormal CD13 vs CD11b, %	28,6	27,3	36,1	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.
Аномальный CD36 против CD14, % Abnormal CD36 vs CD14, %	14,3	23,1	34,3	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.
Аномальный CD11b против HLA-DR, % Abnormal CD11b vs HLA-DR, %	42,9	33,3	61,1	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.
Повышенная доля CD56+ клеток, % Increased proportion of CD56+ cells, %	25,0	33,3	23,7	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.
Повышенная экспрессия CD64, % Increased CD64 expression, %	12,5	9,1	18,4	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.
Сниженная экспрессия CD64, % Reduced CD64 expression, %	0	6,1	2,6	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.	Н. д. N. s. d.

Примечание. Н. д. – нет достоверных отличий; МДС – миелодиспластический синдром.

Note. N. s. d. – no significant differences; MDS – myelodysplastic syndrome.

аллогенных стволовых клеток крови. Вероятность развития рецидива после трансплантации составляла 3, 15 и 33 % ($p < 0,01$), а общая выживаемость – 74, 40 и 36 % ($p < 0,01$) в группах пациентов с минимальным, средним и высоким баллами соответственно [11].

Согласно рекомендациям по применению МПЦ в диагностике МДС 2014 г. шкалу Wells не рекомендуют использовать в целях верификации МДС [14]. Однако в исследовании Wells D.A. и соавт. (2003) продемонстрировано, что использование порога 3 балла и более позволило дифференцировать больных МДС и пациентов контрольной группы (не МДС) с чувствительностью 55 % и специфичностью 100 % [11]. В нашем исследовании 3 балла и более по шкале Wells было у 72 (91,1 %) из 79 пациентов с МДС: у 7 (87,5) из 8 МДС с 5q-, у 2 (50 %) из 4 с МДС-ЛД, у 6 (85,7 %) из 7 с МДС-КС, у 19 (86,4 %) из 22 с МДС-МД и у всех (100 %) пациентов с МДС-ИБ-1 и МДС-ИБ-2. Однако в нашем исследовании не была определена специфичность порога 3 балла и более Wells в связи с отсутствием контрольной группы пациентов (не МДС), что делает невозможным применять этот порог для верификации диагноза МДС. Нами оценивались и другие цитометрические параметры, которые не анализировались в работе Wells D.A. et al. (2003) (например, паттерны CD11b против CD16 и CD13 против CD11b, экспрессия CD10 и CD14 в компартменте гранулоцитов, паттерн CD36 против CD14 и экспрессия CD64 в компартменте моноцитов), поэтому порог дискриминации МДС может быть не 3 балла, а больше, что требует дальнейшего исследования.

Наиболее значимой для верификации диагноза МДС, согласно рекомендациям 2014 г., признана объединенная шкала Ogata–Wells, которая учитывает как балл по шкале Ogata score, так и более глубокий цитометрический анализ клеток основных линий миелопоэза [14]. В результате проведенного нами исследования применение шкалы Ogata–Wells позволило повысить диагностическую чувствительность метода по сравнению со скрининговой шкалой Ogata score. Оценки В и С были у 70 (88,6 %) из 79 пациентов с МДС. У всех пациентов с МДС-ИБ-1 и МДС-ИБ-2 вычислена оценка С. Из группы пациентов без избытка бластных клеток ($n = 33$) оценка А была у 14,3 % пациентов с МДС-КС, у 50 % пациентов с МДС-ЛД и у 22,7 % пациентов МДС-МД. Только у 1 пациента из группы МДС с 5q- не было цитометрических признаков МДС (оценка А). В исследовании Cremers E.M.P. и соавт. (2016) среди пациентов МДС суммарные оценки В и С были вычислены в 85 % случаев, что сопоставимо с нашими данными. Минимальные признаки дисмиелопоэза, оцененные методом МПЦ, были выявлены у пациентов с МДС с изолиро-

ванными дизэритропоэзом и/или дисмегакариоцитопозом [18], что также обнаружено и в нашем исследовании.

При анализе частоты встречаемости аномальных цитометрических признаков было обнаружено, что аномалии экспрессии CD56, CD34 и CD117 на CD34⁺ клетках у пациентов с МДС без избытка бластных клеток (48,5, 24,3 и 42,4 % соответственно) и с МДС с 5q- (28,6, 37,5 и 25,0 % соответственно) встречались так же часто, как и у пациентов с МДС с избытком бластных клеток (31,6, 26,3 и 57,9 % соответственно). Однако частота повышенной доли CD34⁺CD7⁺ клеток была меньше у пациентов с избытком бластных клеток, чем при МДС с 5q- и МДС без избытка бластных клеток (15,8 против 87,5 %, $p = 0,0002$ и 15,8 % против 57,6 %, $p = 0,0004$ соответственно). У пациентов МДС с избытком бластных клеток чаще выявлялись аномальные паттерны гранулоцитов, а также сниженная доля CD10⁺ гранулоцитов. У пациентов с МДС с 5q- чаще выявлялся сниженный индекс гранулярности гранулоцитов по сравнению с МДС без бластных клеток (75,0 % против 27,3 %, $p = 0,0352$). При анализе компартмента моноцитов выявлено, что у пациентов с МДС без избытка бластных клеток чаще можно обнаружить сниженную долю моноцитов от всех клеток по сравнению с пациентами с МДС с избытком бластных клеток (33,3 % против 15,8 %, $p = 0,027$).

Заключение

У пациентов с МДС часто определяются цитометрические аномальные признаки дисмиелопоэза, но не существует одного универсального цитометрического параметра, который позволил бы достоверно подтверждать наличие диагноза МДС. Сокращенную панель Ogata score не рекомендуется применять в клинико-диагностических целях, так как чувствительность этого подхода невелика. Более глубокий анализ основных компартментов костного мозга (ранних предшественников миелопоэза, популяции гранулоцитов и моноцитов) позволяет повысить диагностическую чувствительность данного метода исследования при применении объединенной шкалы Ogata–Wells. Однако у пациентов с изолированным дизэритропоэзом и/или дисмегакариоцитопозом возможно получение ложнонегативных результатов. Введение в цитометрический анализ исследования эритрокариоцитов, вероятно, будет способствовать повышению чувствительности метода. Следует иметь в виду, что МДС – это крайне гетерогенная группа заболеваний, требующая комплексного подхода в верификации диагноза, и введение в алгоритм обследования пациентов метода многоцветной проточной цитофлуориметрии может улучшить качество диагностики.

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

1. Swerdlow S.H. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th edition, revised. International Agency for research on Cancer, 2017.
2. 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 myelodysplastic syndromes in adults (2015). Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology 2016; 61(1S(4)):1–32. (In Russ.)].
3. Bowen D., Culligan D., Jowitt S. et al. Guidelines for the diagnosis and therapy of adult myelodysplastic syndromes. Br J Haematol 2003;120(2):187–200. PMID: 12542475.
4. Matsuda A., Germing U., Jinnai I., et al. 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. Leukemia 2007;21(4):678–86. DOI: 10.1038/sj.leu.2404571. PMID: 17268513.
5. Двирнык В.Н., Кузьмина Л.А., Кохно А.В. и др. Особенности дисмиелопоэза у больных миелодиспластическими синдромами после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Гематология и трансфузиология 2014;59(S1):91–2. [Dvirnyk V.N., Kuzmina L.A., Kokhno A.V. et al. Dismyelopoiesis features in patients with myelodysplastic syndromes after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation. Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology 2014;59(S1):91–2. (In Russ.)].
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., Baikov V.V. Principles of pathomorphological differential diagnosis of myelodysplastic syndromes. Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical oncohematology 2015;8(1):62–8 (In Russ.)].
7. Soligo D., Delia D., Oriani A. et al. Identification of CD34+ cells in normal and pathological bone marrow biopsies by QBEND10 monoclonal antibody. Leukemia 1991;5(12):1026–30. PMID: 1723130.
8. Rogers H.J., Vardiman J.W., Anastasi J. et al. Complex or monosomal karyotype and not blast percentage is associated with poor survival in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome patients with inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2): a Bone Marrow Pathology Group study. Haematologica 2014;99(5):821–9. DOI: 10.3324/haematol.2013.096420. PMID: 24463215.
9. Паровичникова Е.Н., Пименова М.А., Кохно А.В. и др. Хромосомные аномалии в кроветворных и стромальных клетках-предшественниках при миелодиспластическом синдроме. Гематология и трансфузиология 2013;58(4):33–40. [Parovichnikova E.N., Pimenova M.A., Kokhno A.V. et al. Chromosomal abnormalities in hematopoietic and stromal progenitor cells in myelodysplastic syndrome. Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology 2013;58(4):33–40. (In Russ.)].
10. 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. [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 (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-63-72.
11. 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.
12. 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.
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. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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: 23847222.
18. 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.

Вклад авторов

Ю.О. Давыдова: написание текста рукописи, получение и сбор данных для анализа, проведение статистического анализа;
 И.В. Гальцева, Е.Н. Паровичникова, А.В. Кохно, Н.М. Капранов: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи, сбор и интерпретация данных;
 В.В. Троицкая, Е.А. Михайлова, З.Т. Фидарова, Т.Н. Моисеева, Л.А. Кузьмина, Е.А. Лукина: ведение больных, предоставление материалов;
 Т.Н. Обухова, Л.А. Гребенюк: проведение цитогенетических исследований, верификация диагноза;
 А.М. Ковригина: гистологическое исследование трепанобиоптатов, верификация диагноза;
 В.Н. Двирнык: цитологическое и цитохимическое исследования пунктатов костного мозга, верификация диагноза;
 В.Г. Савченко: концепция и дизайн исследования.

Authors' contributions

Yu.O. Davydova: article writing, data collection, statistical analysis;
 I.V. Galtseva, E.N. Parovichnikova, A.V. Kokhno, N.M. Kapranov: study design, article writing, data collection, interpretation of data;
 V.V. Troitskaya, E.A. Mikhailova, Z.T. Fidarova, T.N. Moiseeva, L.A. Kuzmina, E.A. Lukina: management of patients, provision of materials;
 A.M. Kovrigina: histological examination of trephine biopsy materials, diagnosis verification;
 T.N. Obukhova, L.A. Grebenyuk: performance of cytogenetic study, diagnosis verification;
 V.N. Dvirnyk: performance of cytological and cytochemical examination of bone marrow, diagnosis verification;
 V.G. Savchenko: study concept and design.

ORCID авторов / ORCID of authors

Ю.О. Давыдова / Yu.O. Davydova: <https://orcid.org/0000-0001-5932-0285>
 И.В. Гальцева / I.V. Galtseva: <https://orcid.org/0000-0002-8490-6066>
 Е.Н. Паровичникова / E.N. Parovichnikova: <https://orcid.org/0000-0001-6177-3566>
 А.В. Кохно / A.V. Kokhno: <https://orcid.org/0000-0003-0261-5941>
 Н.М. Капранов / N.M. Kapranov: <https://orcid.org/0000-0002-6512-910X>
 В.В. Троицкая / V.V. Troitskaya: <https://orcid.org/0000-0002-4827-8947>
 Е.А. Михайлова / E.A. Mikhailova: <https://orcid.org/0000-0002-2449-2682>
 З.Т. Фидарова / Z.T. Fidarova: <https://orcid.org/0000-0003-0934-6094>
 Л.А. Кузьмина / L.A. Kuzmina: <https://orcid.org/0000-0001-6201-6276>
 Е.А. Лукина / E.A. Lukina: <https://orcid.org/0000-0002-8774-850X>
 А.М. Ковригина / A.M. Kovrigina: <https://orcid.org/0000-0002-1082-8659>
 В.Н. Двирнык / V.N. Dvirnyk: <https://orcid.org/0000-0002-9877-0796>
 В.Г. Савченко / V.G. Savchenko: <http://orcid.org/0000-0001-8188-5557>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.