

На правах рукописи

ДАВЫДОВА ЮЛИЯ ОЛЕГОВНА

**ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ДИСМИЕЛОПОЭЗА У
БОЛЬНЫХ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИМИ СИНДРОМАМИ**

14.01.21 – гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные руководители:

Доктор медицинских наук Паровичникова Елена Николаевна
Кандидат медицинских наук Гальцева Ирина Владимировна

Официальные оппоненты:

Семочкин Сергей Вячеславович – доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Луговская Светлана Алексеевна – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2020 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д208.135.01 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 125167 г. Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте www.blood.ru.

Автореферат разослан « » _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Сысоева Елена Павловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Миелодиспластические синдромы (МДС) представляют собой гетерогенную группу клональных заболеваний системы крови, которые характеризуются цитопениями, наличием дисмиелопоэза, высокой частотой обнаружения аномалий кариотипа и высоким риском трансформации в острые миелоидные лейкозы. К базовым методам диагностики МДС относятся цитологическое, цитохимическое, гистологическое и цитогенетическое исследования костного мозга (КМ) (Swerdlow S., 2017).

Цитологическим признаком МДС является наличие дисплазии хотя бы в одном ростке гемопоэза. Согласно рекомендациям всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) значимой признана дисплазия в более чем 10% эритрокариоцитов, гранулоцитов и/или мегакариоцитов, которые исследуют в цитологическом препарате КМ (Matsuda A. et al., 2007). Однако наличие диспластических признаков в разных ростках гемопоэза не является само по себе критерием клонального патологического процесса. Дисплазия эритрокариоцитов также выявляется в случаях дефицита витамина В12, фолиевой кислоты, меди, а также при воздействии тяжелых металлов (мышьяка, цинка). Изониазид способен вызывать формирование кольцевых сидеробластов. Ко-тримоксазол, такролимус, мофетила микофенолат вызывают значительную гипосегментацию ядер нейтрофилов. Парвовирус В19 может приводить к снижению количества эритрокариоцитов, появлению гигантских форм пронормобластов (Двирнык В. Н. с соавт., 2014). Гистологическое исследование трепанобиоптата необходимо выполнять с целью получения информации о клеточности КМ, наличии фиброза стромы и оценки дисплазии клеток основных ростков кроветворения. Исследование гистоархитектоники КМ, выявление аномальной локализации незрелых предшественников и иммуногистохимическое исследование являются особенно ценными в случае МДС, протекающего с фиброзом и/или гипоклеточным КМ, когда морфологический подсчет бластных клеток и оценка выраженности дисплазии в аспирате КМ могут быть затруднены (Ковригина А. М. с соавт., 2015).

Исключительно важную роль в диагностике МДС играют цитогенетические исследования, а ряд хромосомных aberrаций связан с определенным клиническим течением и прогнозом заболевания. МДС с изолированной делецией del(5q) (или при наличии дополнительной aberrации, за исключением аномалий хромосомы 7) выделяют как отдельный вид МДС (МДС с изолированной делецией 5q), нередко характеризующийся наличием мегакариоцитов с гиполобулярными ядрами, макроцитарной анемией, нормальным или повышенным количеством тромбоцитов и

благоприятным прогнозом (Паровичникова Е. Н. с соавт., 2013; Пименова М. А. с соавт., 2013; Кохно А.В. с соавт., 2014).

Дифференциальная диагностика МДС с другими заболеваниями, протекающими с миелодисплазией и цитопениями, требует тщательного обследования пациента и динамического наблюдения. Но даже при выполнении всех базовых исследований (цитологического, цитохимического, цитогенетического и гистологического) может потребоваться дополнительный диагностический критерий, особенно при отсутствии цитогенетических aberrаций и/или минимальных признаках дисмиелопоэза. В качестве такого дополнительного критерия может быть применен метод многоцветной проточной цитофлуориметрии (МПЦ). Однако не существует универсального цитометрического критерия, обладающего достаточной диагностической значимостью, который бы позволял определить наличие МДС (van de Loosdrecht A. A. et al., 2009). Существует большое количество работ по оценке признаков дисмиелопоэза методом МПЦ, которые различаются по количеству исследованных параметров, кластер-дифференцировочных антигенов (CD – clusters of differentiation) и форматом заключения. В 2002 году исследователями К. Огата с соавт. опубликована первая диагностическая шкала «Ogata score», включавшая всего четыре параметра (Ogata K. et al., 2002). В 2003 году исследователями Д. Вэллс и соавт. была предложена цитометрическая прогностическая шкала, основанная на подсчете числа цитометрических aberrаций в компартменте гранулоцитов и моноцитов, а также количества аномальных миелоидных клеток-предшественниц гемопоэза (Wells D. et al., 2003). При оценке выживаемости больных МДС была выявлена связь между суммарным баллом по шкале «Wells» и продолжительностью жизни, а так же вариантом МДС в соответствии с классификацией ВОЗ (Chu S.-C. et al., 2011). Первая работа, включавшая рекомендации по диагностике МДС методом МПЦ, была опубликована в 2009 году (van de Loosdrecht A. A. et al., 2009). В дальнейшем новые исследования и накопленный опыт привели к пересмотру и дополнению рекомендаций в 2012 и 2014 годах и появлению объединенной шкалы «Ogata-Wells» (Westers T. M. et al. 2012; Porwit A. et al., 2014).

При МДС крайне важным является определение риска прогрессирования заболевания, так как это определяет тактику терапии. В настоящее время используются прогностические шкалы, такие как интернациональная прогностическая шкала IPSS (International Prognostic Scoring System) и пересмотренная интернациональная прогностическая шкала IPSS-R (Revised International Prognostic Scoring System) (Greenberg P. et al., 1997; Greenberg P. et al., 2012). Цитометрические аномалии также имеют прогностическое значение (van de Loosdrecht A. A. et al., 2008), поэтому сопоставление результатов

иммунофенотипического исследования с параметрами практически применяемых шкал риска представляет интерес.

Цель исследования

Определить роль иммунофенотипической оценки дисмиелопоэза в диагностике миелодиспластических синдромов.

Задачи исследования

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

Научная новизна

Подобранное оригинальное сочетание моноклональных антител к антигенам кластеров дифференцировки позволило с высокой специфичностью (87,6%) и чувствительностью (87,3%) провести иммунофенотипическую оценку дисмиелопоэза по трем цитометрическим шкалам у пациентов с любым вариантом МДС. Впервые проведена комплексная сравнительная оценка данных цитологического, гистологического, цитогенетического исследований, прогностических групп по шкале IPSS-R и встречаемости цитометрических аномалий у пациентов с различными вариантами МДС. Исследование признаков дисмиелопоэза имеет особенно важное диагностическое значение для МДС без выраженного дисмиелопоэза и с отсутствием типичных цитогенетических аномалий.

Практическая значимость

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

Положения, выносимые на защиту

1. Подобранный оригинальный набор моноклональных антител к различным антигенам кластеров дифференцировки клеток миелопоэза позволило оценить степень и частоту встречаемости иммунофенотипических aberrаций при всех вариантах МДС с высокой степенью совпадения с основными методами диагностики МДС и группами риска по шкале IPSS-R;
2. Параметры чувствительности и специфичности у объединенной шкалы «Ogata-Wells» составляют 87,3% и 87,6%, соответственно, поэтому иммунофенотипическая оценка дисмиелопоэза может быть интегрирована в алгоритм первичной диагностики у пациентов с подозрением на наличие МДС.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в практическую деятельность лаборатории иммунофенотипирования крови и костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, осуществляющей обследование больных МДС.

Апробация

Полученные результаты были представлены в виде устных сообщений на V Евразийском гематологическом форуме (XXVI EAFO семинар по онкопатологии «Клиническая гематология», 2017), XXII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Теория и практика клинической лабораторной диагностики» (2017), научно-практической конференции «Лейкозы и лимфомы. Терапия и фундаментальные исследования» (2017), I Конгрессе «Настоящее и перспективы российской онкогематологии» в рамках проведения II Международного форума онкологов и радиологов. (2019), I Научно-практической конференции «Парадигмы лекарственной терапии у онкологических больных» (2019), Семинаре «Современные подходы к диагностике и лечению миелодиспластического синдрома» (2019) и стендовых докладов на 22nd Congress of EHA (2017): 7^h SOHO Annual Meeting (2019), 15th International symposium on myelodysplastic syndromes (2019), XII симпозиум памяти Р.М. Горбачевой «Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Генная и клеточная терапия» (2019).

Апробация диссертации состоялась на заседании проблемной комиссии «Фундаментальные и клинические исследования в гематологии; проблемы клинической и производственной трансфузиологии» ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России 20.01.2020 г

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 работ, из них 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

Объём и структура работы

Диссертационная работа включает «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Текст диссертации изложен на 162 страницах, содержит 46 рисунков и 32 таблицы. Список литературы состоит из 13 отечественных и 84 зарубежных источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациенты

В исследование включено 102 пациента с впервые установленным диагнозом МДС и 83 пациента группы сравнения (ГС) с гематологическими и не гематологическими заболеваниями, отличными от МДС и ХМПЗ. Все пациенты ранее не получали специфической терапии по поводу основного гематологического заболевания. Исследование включало контрольную группу 35 здоровых доноров аллогенного КМ. Пациенты, включенные в исследование, проходили обследование в подразделениях ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Клиническая часть работы выполнена совместно с ведущим научным сотрудником отделения интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с круглосуточным и дневным стационарами, к.м.н. А.В. Кохно.

Соотношение мужчин и женщин, возраст пациентов с разными вариантами МДС приведены в Таблице 1.

В группу сравнения вошло 83 пациента (соотношение мужчин к женщинам составило 30/53 (1:1,8);, медиана возраста – 42 года). Характеристика пациентов группы сравнения представлена в Таблице 2.

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

Таблица 1 – Характеристика пациентов с МДС

Вариант МДС	n	Медиана возраста, годы	Соотношение мужчин к женщинам
МДС с изолированной делецией длинного плеча 5-й хромосомы (МДС с 5q-)	7	65	1/6 (1:6)
МДС с линейной дисплазией (МДС-ЛД)	4	63,5	2/2 (1:1)
МДС с кольцевыми сидеробластами (МДС-КС)	13	69	5/8 (1:1,6)
МДС с мультилинейной дисплазией (МДС-МД)	30	56,5	11/19 (1:1,7)
МДС с избытком бластов-1 (МДС-ИБ-1)	26	63	15/11 (1,4:1)
МДС с избытком бластов-2 (МДС-ИБ-2)	22	57,5	18/4 (4,5:1)

Таблица 2 – Характеристика пациентов группы сравнения

Диагноз	n	Медиана возраста, годы	Соотношение мужчин к женщинам
аутоиммунная гемолитическая анемия (АИГА)	8	52	0:8
В12-дефицитная анемия (В12-ДА)	8	43	1:1
железодефицитная анемия (ЖДА)	6	43,5	1:2
апластическая анемия (АА)	11	34	5/6 (1:1,2)
анемия Фанкони	1	36	0:1
наследственная дизэритропоэтическая анемия	2	29	0:2
наследственная микросфероцитарная гемолитическая анемия (НМГА)	1	25	0:1
наследственная гемолитическая анемия неуточненная	1	20	0:1
пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ)	10	35	7/3 (2,3:1)
β -талассемия	1	42	1:0
врожденный дискератоз	1	24	1:0
иммунная тромбоцитопения (ИТП)	16	43	1:3
вторичная тромбоцитопения	2	42,5	1:1
лимфома маргинальной зоны	4	53	0:4
лимфома Беркитта	1	47	0:1
лимфома из клеток мантийной зоны	1	69	1:0
макроглобулинемия Вальденстрема	2	67	2:0
диффузная В-крупноклеточная лимфома	2	35,5	1:1
лимфома из больших гранулярных лимфоцитов	1	54	0:1
гепатит С	1	50	0:1
вирус иммунодефицита человека	1	39	1:0
аутоиммунный тиреоидит	1	55	0:1
цитопения на фоне гнойно-воспалительного процесса	1	57	0:1

Цитологическое исследование и анализ его результатов выполнены совместно с заведующей централизованной клинико-диагностической лабораторией, к.м.н. В.Н. Двирнык. Степень дисплазии, выявляемая цитологическим методом, определялась как доля клеток с диспластичными признаками по отношению ко всем клеткам данного ряда, при этом в гранулоцитарном и эритроидном ростках анализировали не менее 100 клеток, а в мегакариоцитарном – не менее 30 клеток. Дисплазию эритроидного, гранулоцитарного и мегакариоцитарного рядов кроветворения диагностировали при наличии более 10% измененных форм (Swerdlow S., 2017). Для каждого ростка приведены интервалы долей клеток с признаками дисплазии: 0–9%, 10–19%, 20–49%, 50% и более. В случаях, когда не удавалось произвести подсчет 100 эритрокариоцитов/гранулоцитов и/или 30 мегакариоцитов, оценка степени дисплазии в этих ростках была невозможной.

В работе были проанализированы результаты гистологических исследований, выполненных в патологоанатомическом отделении ФГБУ «НМИЦ гематологии» (заведующая лабораторией – д.б.н. А.М. Ковригина) у 94 (92,2%) пациентов группы МДС и 75 (90,4%) пациентов группы сравнения.

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

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

Из 102 пациентов с МДС результаты стандартного цитогенетического исследования и/или FISH (fluorescence *in situ* hybridization) получены у 99, исследование выполнялось в лаборатории кариологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» (заведующая лабораторией – к.м.н. Т. Н. Обухова). У 2 пациентов с МДС-ИБ-1 и 1 с МДС-ИБ-2 кариотип не удалось исследовать вследствие отсутствия митозов, а FISH-исследование проведено не было.

Проточная цитофлуориметрия

Проба аспирата КМ с ЭДТА для исследования признаков дисмиелопоэза методом МПЦ забиралась один раз в период первичной диагностики пациентов. Пробоподготовку проводили по схеме «лизис-отмывка-окраска-отмывка». Лизис эритроцитов проводили с помощью раствора Pharm Lyse (BD Biosciences, США). Для окраски моноклональными антителами отбирали 3×10^5 клеток в 100 мкл раствора CellWash. Подсчет лейкоцитов осуществляли на гематологическом анализаторе Abacus Junior 30 (Diatron, Венгрия). Панель моноклональных антител была подобрана с учетом конфигураций используемого проточного цитофлуориметра и рекомендаций ELN по исследованию МДС методом МПЦ и представлена в Таблице 3.

Таблица 3 – Панель моноклональных антител, применявшаяся для оценки дисмиелопоэза методом проточной цитофлуориметрии

№ пробирки / флюорохром	FITC (fluorescein isothiocyanate)	PE (phycoerythrin)	APC (allophycocyanin)	PerCP-Cy5.5 (Peridinin Chlorophyll Protein - cyanine 5.5)	PE-Cy7 (phycoerythrin-cyanine 7)	APC-Cy7 (allophycocyanin-cyanine 7)
1	CD56	CD7	CD34	CD19	CD117	CD45
2	CD45	CD13	CD33	CD16	HLA-DR	CD11b
3	CD45	CD14	CD33	CD36	CD56	-
4	CD45	CD10	CD64	-	-	-

Клеточную взвесь анализировали на 6-цветном проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (BD Biosciences, США). Регулировка напряжения на фотоумножителях для поддержания значений выходного сигнала проводилась

рутинно с применением Cytometer Setup & Tracking Beads kit (BD Biosciences, США).

Гейтирование и получение основных цитометрических параметров проводили в программном обеспечении BD FACSDiva Software Version 6.1.3. Анализируемые цитометрические параметры были двух типов: качественные и количественные. К качественным параметрам относили соотношения экспрессии (паттерны) антигенов на гранулоцитах и моноцитах, остальные параметры (доли клеток (%), среднюю интенсивность флуоресценции и их отношения) – к количественным. По результатам анализа КМ 35 здоровых доноров были получены референсные интервалы для количественных параметров, используемых в оценке дисмиелопоэза методом проточной цитофлуориметрии.

После получения данных определяли баллы по шкалам «Ogata score», «Wells» (Таблица 4) и «Ogata-Wells» (Таблица 5).

В шкалу «Ogata score» входит 4 параметра: 1) доля CD34⁺ миелоидных клеток от CD45⁺ клеток; 2) доля CD34⁺ В-клеточных предшественников от CD34⁺ клеток; 3) индекс CD45 CD34⁺ миелоидных клеток (отношение средней интенсивности флуоресценции (СИФ) CD45 лимфоцитов к СИФ CD45 CD34⁺ миелоидных клеток); 4) индекс гранулярности (ИГ) гранулоцитов (отношение бокового светорассеяния на гранулоцитах к боковому светорассеянию лимфоцитов). Согласно рекомендациям К. Огата (2006) при отклонениях от нормальных значений в двух и более параметров предполагается наличие МДС.

Суммарный балл по шкале «Wells» 0–1 классифицировался как минимальный, 2–3 – как средний, более 4 – как высокий.

Таблица 4 – Цитометрическая шкала «Wells» (Wells D. et al., 2003)

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

Заключение по шкале «Ogata-Wells» устанавливается в виде буквенного эквивалента. Оценка «А» означает, что по результатам анализа дисмиелопоэза

методом МПЦ признаков МДС не выявлено; «В» – цитометрическое исследование выявляет признаки, которые часто обнаруживаются в случае МДС и «С» – результаты цитометрического исследования соответствуют МДС.

Таблица 5 – Объединенная шкала «Ogata-Wells» диагностики МДС методом МПЦ (van de Loosdrecht A. A. et al., 2013)

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

Статистический анализ данных проводили с помощью GraphPad Prism 6 и R 3.4.4. Значимость различий частот определяли с помощью критерия Фишера с поправкой Бенджамини-Хохберга на множественные сравнения. Проверку нормальности распределения проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка. При $p < 0,05$ распределение считали ненормальным. Для сравнения значений баллов «Wells» применяли критерий Краскела-Уоллиса, так как большинство распределений баллов было ненормальным. Для множественных сравнений использовали поправку Данна. Значимыми признавались отличия при $p < 0,05$. Звездочками на рисунках указывали наличие достоверных отличий между группами пациентов: **** – $p \leq 0,0001$; *** – $p \leq 0,001$; ** – $p \leq 0,01$; * – $p < 0,05$. Оценку специфичности, чувствительности, определение оптимального порогового значения баллов по шкалам «Ogata score», «Wells» и «Ogata-Wells» проводили с помощью ROC-анализа (ROC – receiver operating characteristic).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Частота встречаемости цитометрических аберраций в компартменте ранних предшественников гемопоэза, гранулоцитов и моноцитов

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

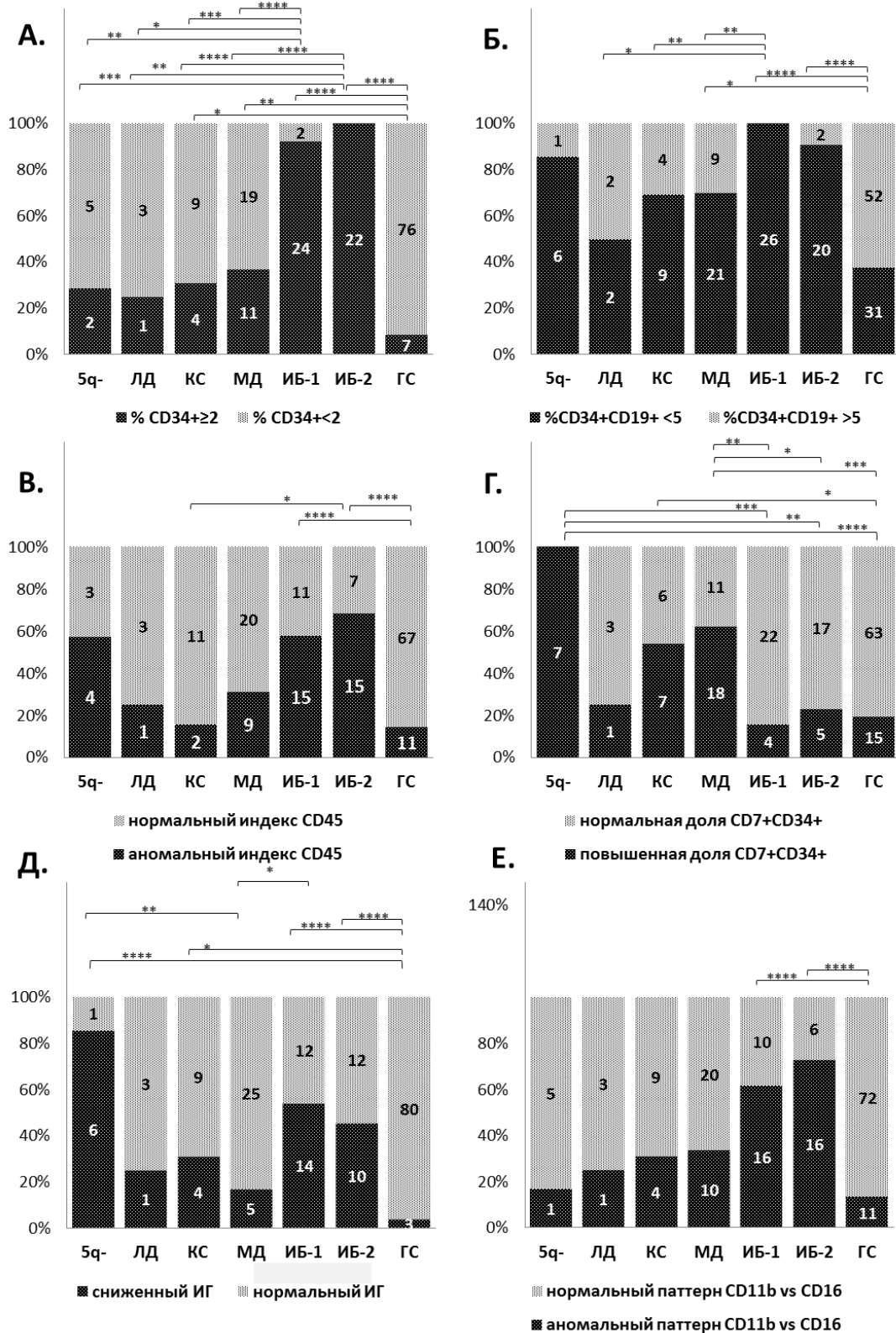


Рисунок 1 – Частоты встречаемости аномальных цитометрических признаков при МДС и в группе сравнения (ГС): А. повышенной доли CD34⁺ миелоидных клеток; Б. сниженной доли CD34⁺ В-клеточных предшественников; В. аномального индекса CD45 CD34⁺ миелоидных клеток; Г. повышенной доли CD7⁺CD34⁺ клеток; Д. сниженного индекса гранулярности гранулоцитов; Е. аномального паттерна «CD11b и CD16» гранулоцитов

Доля CD34⁺ В-предшественников менее 5% чаще выявлялась у пациентов с МДС-МД (70,0%), МДС-ИБ-1 (100,0%) и МДС-ИБ-2 (90,9%), чем у пациентов группы сравнения (37,3%) (Рисунок 1Б). Аномальный индекс CD45 CD34⁺ миелоидных предшественников чаще обнаруживался у пациентов с МДС-ИБ-1 (57,7%), МДС-ИБ-2 (68,2%), чем у пациентов группы сравнения (14,1%), и чаще у пациентов с МДС-ИБ-2, чем при МДС-КС (15,4%) (Рисунок 1В). Повышенная доля CD7⁺CD34⁺ (>12,6% от CD34⁺ миелоидных клеток) клеток отмечена в 42 случаях (41,6%) из 101 МДС и у 15 из (19,2%) 78 пациентов группы сравнения (2 – В12-дефицитная анемия, 1 – АА, 6 – ПНГ, 3 – ИТП, 1 – врожденный дискератоз, 1 – наследственная микросфероцитарная анемия, 1 – наследственная дизэритропоэтическая анемия). Повышенная доля CD7⁺CD34⁺ клеток была наибольшей у пациентов с МДС с 5q- (100%). При сравнении других групп МДС она была выше при МДС-КС (53,8%) и МДС-МД (62,1%), чем у пациентов с избытком бластных клеток (15,4% и 22,7%) (Рисунок 1Г). Аномальную долю CD117⁺CD34⁺ клеток (< 73,2% или > 93,1% от CD34⁺ миелоидных клеток) с более высокой частотой обнаруживали у пациентов с МДС-ИБ-1 (61,5%) и МДС-ИБ-2 (81,8%), чем при других вариантах МДС и пациентов группы сравнения (16,7%).

Сниженный ИГ гранулоцитов (≤ 6) обнаружили в 40 случаях (39,2%) из 102 МДС и 3 (3,6%) из 83 группы сравнения (1 – АА, 1 – ПНГ и 1 – лимфома из маргинальной зоны). Частота встречаемости сниженного ИГ гранулоцитов была достоверно выше у пациентов с МДС с 5q- (85,7%), МДС-КС (30,8%), МДС-ИБ-1 (53,8%) и МДС-ИБ-2 (45,5%) по сравнению с пациентами группы сравнения (3,6%). У пациентов с МДС-МД эта частота (16,7%) была ниже, чем у пациентов МДС с 5q- (85,7%) и МДС-ИБ-1 (53,8%) (Рисунок 1Д).

К другим признакам дисплазии гранулоцитарного ростка относят изменение так называемых паттернов созревания. Паттерн созревания – это соотношение экспрессии двух антигенов, которое меняется в зависимости от стадии созревания клетки. Впервые изменение паттерна «CD11b и CD16» в КМ у пациентов МДС по сравнению с группой здоровых доноров было описано в исследовании Б. Дэвис и соавт. в 1997 году. У пациентов с МДС отмечалось повышение доли гранулоцитов с низкой экспрессией CD16 и/или CD11b (Davis B. et al., 1997). Частота обнаружения аномального паттерна гранулоцитов «CD11b и CD16» была выше при МДС-ИБ-1 (61,5%) и МДС-ИБ-2 (72,7%), чем у пациентов группы сравнения (13,3%) (Рисунок 1Е).

Повышенная доля CD56⁺ моноцитов (> 46,5% от моноцитов) выявлена у 24 (23,5%) из 102 пациентов с МДС и у 7 (8,4%) из 83 пациентов группы сравнения (2 – ПНГ, 1 – ИТП, 2 – ЖДА, 1 – наследственная гемолитическая анемия). В исследовании Д. Вэллс (2003) доля обнаруживаемой высокой экспрессии CD56 на моноцитах составила 17% у пациентов с МДС и 3% среди пациентов контрольной

группы, а в исследовании В. Керн (2010) – 43,1% и 9,4%, соответственно (Wells D. et al. 2003; Kern W. et al., 2010). Аномальный паттерн «CD13 и CD11b» моноцитов с более высокой частотой выявлялся у пациентов с МДС-ИБ-1 (50,0%), чем у пациентов группы сравнения (16,9%). Частота выявления аномального паттерна «CD11b и HLA-DR» моноцитов была выше при МДС-ИБ-1 (70,8%), чем в группе сравнения (23,2%). Значимых отличий в частоте встречаемости повышенной доли моноцитов ($> 7,4\%$), аномального паттерна «CD36 и CD14» и аномальной экспрессии маркеров CD33 и CD64 на моноцитах в группах МДС и ГС выявлено не было.

Таким образом, не оставляет сомнений, что для более полного изучения признаков дисмиелопоэза необходимо исследовать экспрессию большого количества антигенов в основных клеточных компартментах, так как цитометрические аномалии встречаются с разной частотой при разных вариантах МДС, и кроме того, некоторые из них могут обнаруживаться и у пациентов без МДС.

Диагностическая значимость цитометрических оценочных шкал

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

Частота суммарного балла по шкале «Ogata score» ≥ 2 была выше при МДС с 5q-, МДС-КС, МДС-МД, МДС-ИБ-1 и МДС-ИБ-2, чем в ГС (85,7%, 53,8%, 63,3%, 92,3%, 95,5% vs 9,6%, соответственно, $p < 0,05$). Баллы «Ogata score» ≥ 2 получены только в 50,0% случаев МДС-ЛД. При МДС-ИБ-1 и МДС-ИБ-2 частота суммарного балла «Ogata score» ≥ 2 была выше, чем при МДС-КС и МДС-МД (Рисунок 2А). Балл «Ogata score» равный 2, был получен у 8 (9,6%) пациентов ГС: 2 – АА, 1 – В12-дефицитная анемия, 1 – ПНГ, 2 – лимфомы, 1 – наследственная анемия, 1 – ИТП. Суммарного балла «Ogata score» > 2 не было в ГС ни у одного из пациентов. В исследовании А. Такеучи и соавт. (2019), включавшем 66 пациентов с МДС, доля пациентов с баллом ≥ 2 по шкале «Ogata score» также была выше среди МДС с избытком бластов. В этой работе распределение пациентов с разными вариантами МДС с баллом ≥ 2 было следующим: МДС-ЛД (40,0%); МДС-МД (50,0%); МДС-КС (25,5%); МДС-ИБ-1 (77,8%); МДС-ИБ-2 (100,0%); МДС с 5q- (33,3%) (Takeuchi A. et al., 2019).

Наибольшие медианы баллов по шкале «Wells» были у пациентов с МДС-ИБ-2 (6,5 балла) по сравнению с МДС-ЛД (2,5 балла), МДС-КС (4 балла) и МДС-МД (5 баллов), но у пациентов с МДС-КС, МДС-МД и МДС-ИБ-1 баллы были выше, чем у пациентов группы сравнения (2 балла) (Рисунок 2В). Полученные данные сопоставимы с результатами других исследований. В работе А. ван де Лосдрехт с соавт. (2008) медианы баллов по шкале «Wells» для группы пациентов с РА и РАКС

составила 3 балла, для РЦМД – 4 балла, РАИБ-1 – 7 баллов, РАИБ-2 – 6 баллов, в контрольной группе – 0 баллов (van de Loosdrecht A. A. et al., 2008).

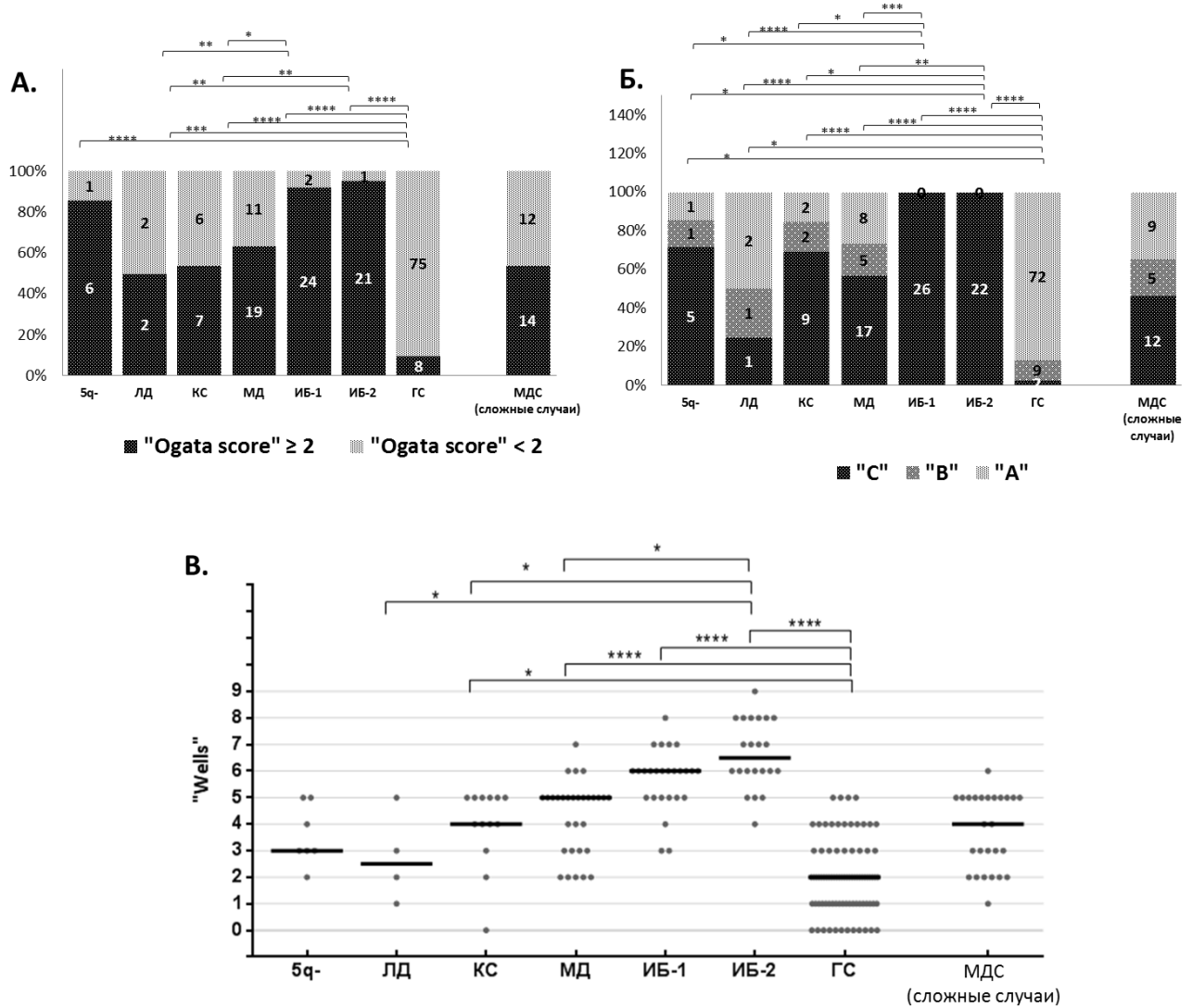


Рисунок 2 - Суммарные баллы по шкалам «Ogata score», «Wells» и «Ogata-Wells» при разных вариантах МДС и в группе сравнения (ГС). Горизонтальной чертой указана медиана балла «Wells»

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

В группе сравнения оценка «А» была у 86,7% пациентов, «В» – у 10,8% «С» – у 2,4%. (Рисунок 2Б). Оценка «В» была у 2 пациентов с АА, 4 пациентов с ПНГ, 1 – с В12-дефицитной анемией, 2 – лимфомами, а оценка «С» у 1 пациента с ПНГ и у 1 – с В12-дефицитной анемией. В исследовании Е.М.П. Кремерс и соавт. 2016 года,

включавшем 101 пациента с МДС оценка «А» по шкале «Ogata-Wells» была получена у 15% пациентов, «В» – 24%, «С» – 61%. В контрольной группе пациентов без МДС также были получены оценки «В» (29%) и «С» (6%) (Cremers E. M. P. et al., 2017).

Наибольшие трудности в диагностике вызывают случаи МДС без избытка бластных клеток, кольцевых сидеробластов и типичных для МДС цитогенетических аномалий. В нашей выборке пациентов с МДС было 26 таких случаев (3 МДС-ЛД, 23 МДС-МД). Суммарный балл по шкале «Ogata score» более 2 был у 14 (53,8%) этих пациентов, медиана балла «Wells» составила 4, оценка «А» по шкале «Ogata-Wells» получена у 9 (34,6%), оценка «В» - у 5 (19,2%), оценка «С» - у 12 (46,2%) пациентов (Рисунок 2).

Статистическими показателями эффективности диагностического теста являются клиническая чувствительность и специфичность. Чувствительность (истинно положительная пропорция) показывает вероятность того, что пациент с МДС будет классифицирован именно как пациент с МДС. Специфичность (истинно отрицательная пропорция) отражает вероятность того, что пациент группы сравнения будет классифицирован как пациент без МДС.

Для оценки диагностической значимости оценочных шкал МДС «Ogata score», «Wells» и «Ogata-Wells» и расчета оптимального порогового балла проводили ROC-анализ. Качество теста было охарактеризовано путем расчета показателя площади под ROC-кривой AUC (Area Under Curve). Наибольшим значением AUC обладала шкала «Ogata-Wells» и составила 0,911, у шкалы «Wells» AUC составила 0,904, а у шкалы «Ogata score» 0,864. Оптимальные пороговые уровни для разграничения МДС и не МДС, показатели чувствительности и специфичности представлены в Таблице 6. Наибольшими значениями AUC и чувствительностью обладает шкала «Ogata-Wells», а наибольшей специфичностью - «Ogata score».

С учетом вычисленных пороговых значений чувствительность шкал «Ogata score» и «Wells» составила 53,8%, а «Ogata-Wells» - 65,4% (Таблица 6) для пациентов с МДС, вызывающих наибольшие диагностические трудности (без избытка бластных клеток, кольцевых сидеробластов и типичных для МДС цитогенетических аномалий).

Таблица 6 – Показатели диагностической значимости цитометрических шкал МДС

шкалы	порог	специфичность, %	Вся когорта МДС		МДС – сложные случаи	
			AUC	чувствительность, %	AUC	чувствительность, %
«Ogata score»	2	90,4	0,864	77,5	0,693	53,8
«Wells score»	4	81,9	0,904	79,4	0,803	53,8
«Ogata-Wells»	«В»	87,6	0,911	87,3	0,783	65,4

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

Таким образом, специфичность шкал «Ogata score», «Wells» и «Ogata-Wells» составила 90,4%, 81,9% и 87,6%, соответственно. Во всей когорте пациентов МДС чувствительность шкал «Ogata score», «Wells» и «Ogata-Wells» высокая и составила 77,5%, 79,4% и 87,3%, соответственно. Однако в группе пациентов с МДС, вызывающей наибольшие диагностические трудности (без избытка бластных клеток, кольцевых сидеробластов и типичных цитогенетических аномалий) чувствительность шкал «Ogata score», «Wells» снижается до 53,8%. В этой группе МДС наибольшей чувствительностью (65,4%) обладала шкала «Ogata-Wells».

Сопоставление результатов цитометрического анализа дисмиелопоэза с результатами цитологического исследования

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

По результатам исследования значимых отличий в степени дисплазии гранулоцитарного, эритроидного и мегакариоцитарного ростков при разных формах МДС не было обнаружено (Рисунок 3А,Б,В).

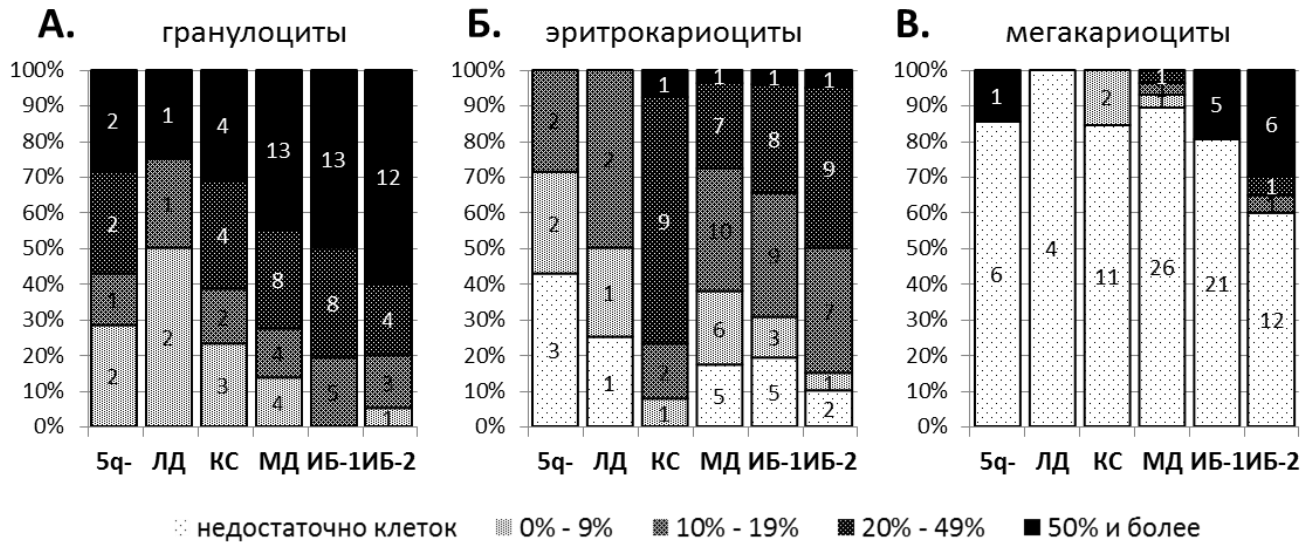


Рисунок 3 - Степень дисплазии, определенная цитологическим методом, при разных нозологических формах МДС в гранулоцитарном (А), эритроидном (Б) и мегакариоцитарном (В) рядах

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

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

Сопоставление результатов цитометрического анализа дисмиелопоэза с результатами гистологического исследования

При сопоставлении данных цитометрического и гистологического исследований было продемонстрировано совпадение результатов. У пациентов с МДС, у которых получена оценка «С» по шкале «Ogata-Wells», доля

гистологической оценки 4 была значимо выше, чем в группе пациентов с оценкой «Ogata-Wells» «А» ($p \leq 0,01$) (Рисунок 4А).

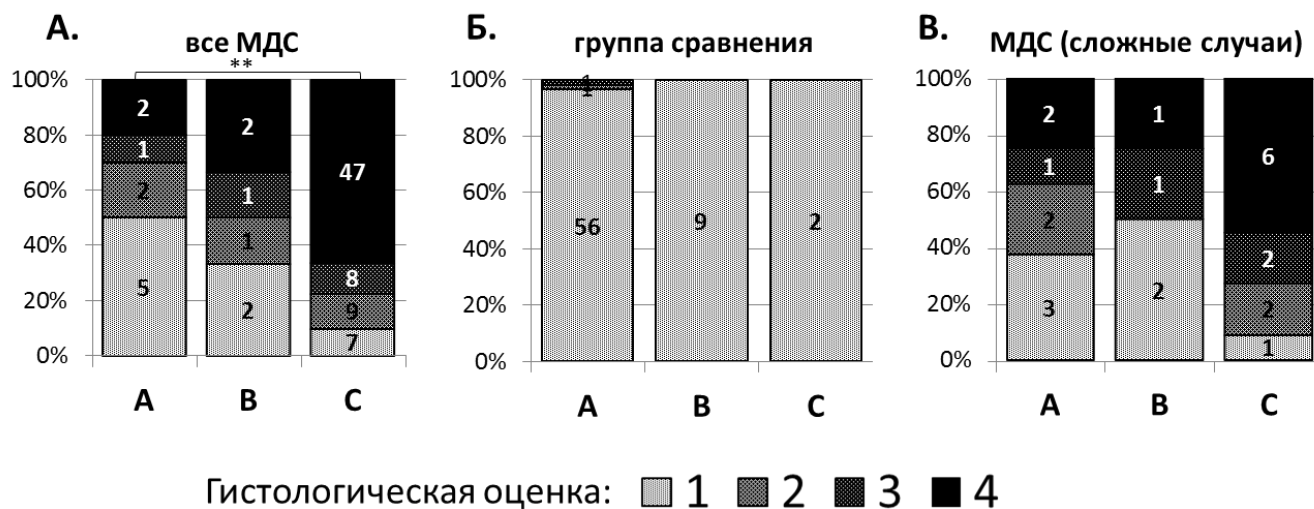


Рисунок 4 - Доли больных с различными гистологическими оценками (1, 2, 3 и 4), полученными при анализе трепанобиоптатов в зависимости от балла по шкале «Ogata-Wells» у пациентов: А. с МДС; Б. группы сравнения; В. МДС без избытка бластов, кольцевых сидеробластов и типичных для МДС цитогенетических аномалий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

У 5 пациентов с МДС (1 МДС-ЛД, 2 МДС-КС и 2 МДС-МД) отсутствовали как цитометрические (оценка «А»), так и гистологические признаки дисмиелопоэза (оценка 1) (Рисунок 4А). Гистологические признаки МДС чаще отсутствовали (балл 1) у пациентов из группы сравнения, имеющих оценку «А» по шкале «Ogata-Wells», чем у пациентов этой группы с оценкой «С» ($p \leq 0,001$) (Рисунок 4Б). У 2 пациентов группы сравнения обнаруживались признаки МДС по результатам гистологического исследования (баллы 2 и 3) (Рисунок 4Б). Это были 2 пациента с ЖДА, не имеющих цитометрических признаков дисмиелопоэза (Рисунок 4Б).

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

Таким образом, только у 8 из 94 (8,5%) пациентов из группы МДС материал трепанобиопсии был неинформативным, однако анализ пунктата костного мозга методом проточной цитофлуориметрии был возможен, и в 5 из этих 8 (62,5%) случаев в результате цитометрического исследования были обнаружены признаки

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

Сопоставление цитометрических шкал дисмиелопоэза с результатами цитогенетического исследования

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

Медианы баллов по шкале «Ogata score» были выше при МДС с избытком бластных клеток, чем без избытка у больных МДС с нормальным кариотипом (3 против 1,5, $p < 0,001$), с типичными aberrациями (3 против 1,5, $p < 0,05$) и МДС с неспецифичными aberrациями (3 против 2, $p < 0,001$). В случаях МДС без избытка бластов в группе нормального кариотипа медиана «Ogata score» была меньше, чем в группе $del(5q)$ (3 против 1,5, $p < 0,05$). По шкале «Wells» баллы были выше в группе с избытком бластов, чем без, при МДС с нормальным кариотипом (6 против 4,5, $p < 0,0001$), с $del(5q)$ (6 против 3, $p < 0,001$) и с неспецифичными aberrациями (6 против 4, $p < 0,001$). В группе МДС с типичными aberrациями без избытка бластных клеток медиана «Wells» была выше, чем при МДС с нормальным кариотипом (5 против 4,5; $p < 0,05$) (Рисунок 5А). Частоты оценок по шкале «Ogata-Wells» достоверно отличались только в группе МДС с нормальным кариотипом в зависимости от наличия избытка бластов (Рисунок 5Б).

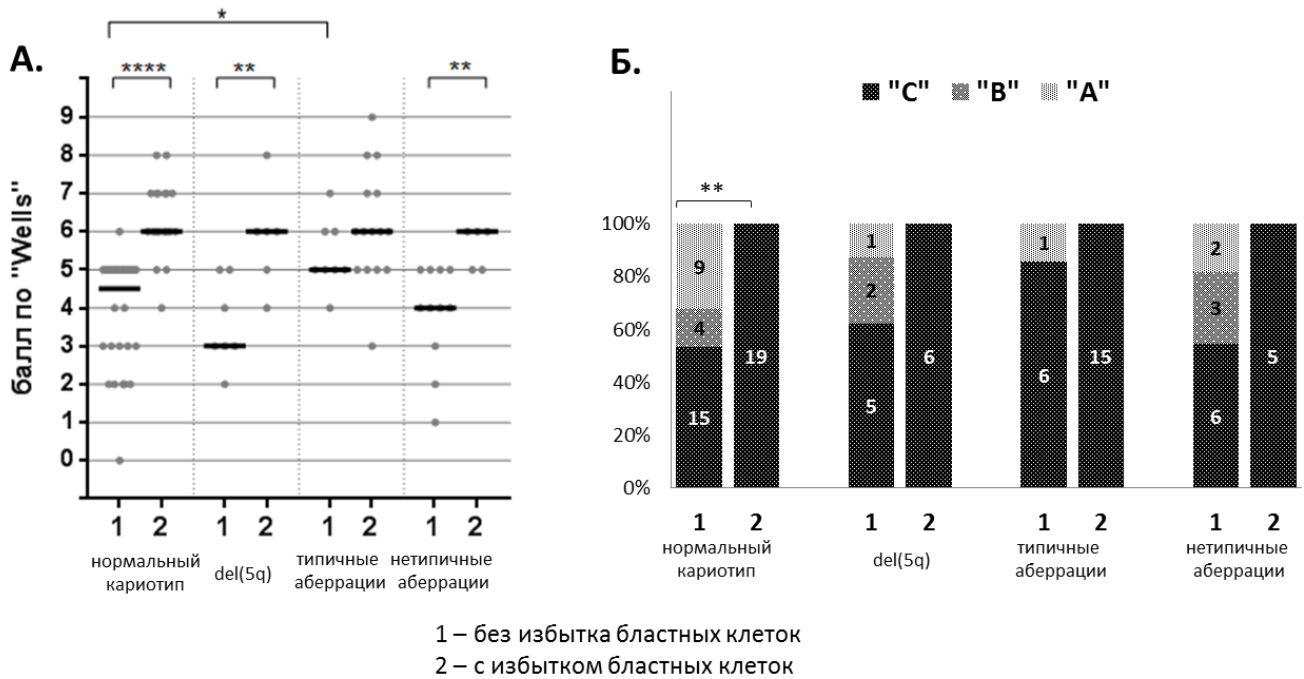


Рисунок 5 - Оценки по шкалам «Wells (А) и «Ogata-Wells» (Б) в зависимости от наличия или отсутствия цитогенетических aberrаций и избытка бластных клеток у пациентов с МДС

Таким образом, было доказано, что высокие баллы по цитометрическим шкалам дисмиелопоэза в большей степени зависят от наличия или отсутствия бластных клеток, чем от варианта кариотипа. Но была доказана взаимосвязь цитометрических шкал дисмиелопоэза с цитогенетическим прогнозом.

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

Суммарный балл по шкале «Ogata score» не отличался у пациентов с МДС разного цитогенетического риска; в группе очень высокого риска по шкале IPSS-R балл по шкале «Ogata score» был выше (медиана 3 балла), чем в группе очень низкого риска (медиана 1 балл, $p \leq 0,01$). Была выявлена взаимосвязь между баллами по шкале «Wells» с цитогенетическим прогнозом и риском по шкале IPSS-R. У пациентов с МДС с очень хорошим цитогенетическим прогнозом балл по шкале «Wells» был ниже (медиана – 2,5), чем в группе плохого (медиана - 6) и очень плохого прогнозов (медиана - 6). В группе пациентов с МДС с высоким и очень высоким рисками по шкале IPSS-R итоговый балл по шкале «Wells» был выше, чем в группах с очень низким, низким и средним рисками (медианы 6 и 6 против 3, 5 и 5, соответственно).

В исследованиях К. Алхан с соавт., А. ван де Лоосдрехт с соавт. и С. Чу с соавт. также обнаружена значимая корреляция между баллами по шкале «Wells» и группами цитогенетического прогноза и баллами IPSS-R (Alhan C. et al., 2014; van de Loosdrecht A. A. et al., 2008; Chu S.-C. et al., 2011). Вероятно, это указывает на то,

что при более сложных цитогенетических неблагоприятных абберациях обнаруживается больше цитометрических аномалий, чем при единичных благоприятных цитогенетических аномалиях или при нормальном кариотипе. Однако, несмотря на наличие такой корреляции, распределение баллов «Wells» в отдельных группах цитогенетического прогноза и риска IPSS-R было гетерогенным.

Частота оценки «С» по шкале «Ogata-Wells» была ниже у пациентов из группы очень хорошего цитогенетического прогноза, чем у пациентов из групп плохого и очень плохого прогнозов (Рисунок 6А).

Частота оценки «С» по шкале «Ogata-Wells» была выше в группах высокого и очень высокого рисков IPSS-R, чем в группах очень низкого и низкого рисков, также в группе очень высокого риска частота оценки «С» была выше, чем в группе среднего риска (Рисунок 6Б).

Далее мы разделили МДС на две группы: с избытком и без избытка бластов, и подсчитали оценки «Ogata-Wells» в каждой группе в зависимости от цитогенетического прогноза (Таблица 7).

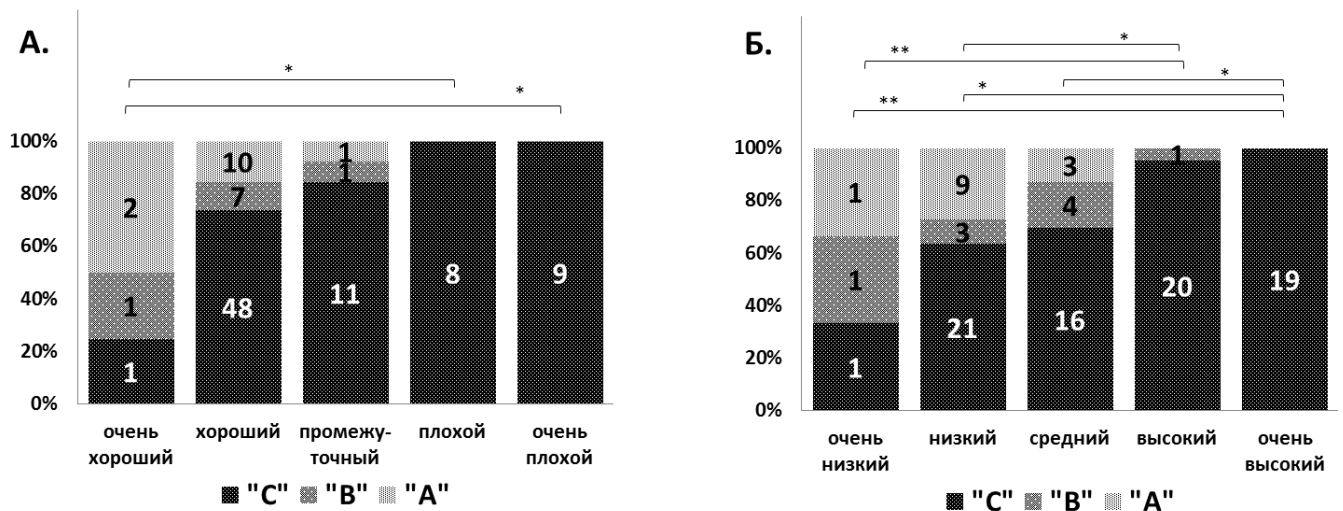


Рисунок 6 - Частота баллов по шкале «Ogata-Wells» в зависимости от цитогенетического прогноза (А) и риска IPSS-R (Б)

В группе очень хорошего цитогенетического прогноза случаев МДС с избытком бластов не было. При отсутствии избытка бластных клеток подтверждение наличия МДС методом МПЦ («В» и «С» по «Ogata-Wells») было получено у 50% (2 из 4) пациентов с очень хорошим цитогенетическим прогнозом, у 74,4% (29 из 39) пациентов с хорошим прогнозом, у 80% (4 из 5) пациентов с промежуточным прогнозом и у всех пациентов с плохим и очень плохим прогнозом (Таблица 7).

Таблица 7 – Оценки «Ogata-Wells» при разных цитогенетических прогнозах в зависимости от наличия избытка бластов

-	цитогенетический прогноз									
	очень хороший, n = 4		хороший, n = 65		промежуточный, n = 13		плохой, n = 8		очень плохой, n = 9	
«Ogata-Wells»	«А»	«В» и «С»	«А»	«В» и «С»	«А»	«В» и «С»	«А»	«В» и «С»	«А»	«В» и «С»
избыток бластов	0	0	0	26	0	8	0	5	0	6
нет избытка бластов	2	2	10	29	1	4	0	3	0	3

Таким образом, нами была показана взаимосвязь между цитометрическими шкалами дисмиелопоэза с цитогенетическим прогнозом и риском IPSS-R. У пациентов с МДС высокого и очень высокого рисков по шкале IPSS-R балл по шкале «Wells» был выше, чем при МДС очень низкого, низкого и среднего рисков. Только при МДС очень низкого, низкого и среднего рисков IPSS-R были получены оценки «А» по объединенной шкале «Ogata-Wells».

Заключение

Миелодиспластические синдромы вызывают трудности в диагностике вследствие гетерогенности клинико-лабораторных симптомов. При отсутствии очевидных цитологических признаков МДС и типичных цитогенетических аномалий рекомендуют провести дополнительные исследования. Метод МПЦ был рекомендован как дополнительный в диагностике МДС в 2008 году (Loken M. R. et al., 2008). Основным его недостатком является отсутствие стандартизации. Для подробного анализа необходимо исследовать экспрессию большого числа антигенов на разных клеточных субпопуляциях, что привело к появлению разного рода диагностических и прогностических цитометрических шкал.

В наше исследование было включено 102 пациента с МДС (разных нозологических форм по классификации ВОЗ 2017, разным цитогенетическим прогнозом и риском по шкале IPSS-R) и 83 пациента с цитопениями, но без диагноза МДС (группа сравнения).

По результатам анализа частот выявления цитометрических аномальных признаков показано, что не существует универсального признака, который бы встречался с высокой частотой при всех вариантах МДС и не встречался в группе сравнения. Однако нами были выявлены некоторые особенности экспрессии антигенов при разных вариантах МДС.

Самой первой диагностической цитометрической шкалой была «Ogata score», которая включала 4 параметра, а при отклонении от нормальных значений в 2-х из

них и более делался вывод о наличии МДС (Ogata K. et al., 2002; Ogata K. et al., 2009). Диагностическая чувствительность и специфичность этой шкалы составили 77,5% и 90,4%. Шкала «Wells», разработанная в 2003 году, имеет в большей степени прогностический характер (Wells D. et al., 2003). В проведенном нами исследовании медианы баллов «Wells» в группах высокого и очень высокого рисков по шкале IPSS-R были выше (6 и 6 баллов), чем в группах очень низкого, низкого и среднего рисков IPSS-R (3, 5 и 5 баллов, соответственно ($p < 0,05$)).

В 2013 году была опубликована объединенная шкала «Ogata-Wells», которая учитывала балл по шкале «Ogata score», количество и качество аберраций в компартментах гранулоцитов и моноцитов (van de Loosdrecht A.A. et al., 2013). В нашем исследовании чувствительность и специфичность этой шкалы составили 87,3% и 87,6%, соответственно.

Наибольшие диагностические трудности вызывают МДС без избытка бластных клеток, кольцевых сидеробластов и типичных для МДС цитогенетических аберраций. В наше исследование было включено 26 таких пациентов. В данной когорте пациентов чувствительности шкал снизились и составили для «Ogata score» и «Wells» 53,8%, а для объединенной шкалы «Ogata-Wells» – 65,4%. Эти данные свидетельствуют о том, что в первичной диагностике МДС целесообразно применять именно объединенную шкалу «Ogata-Wells».

Практические рекомендации

Интеграция метода иммунофенотипической оценки дисмиелопоэза с помощью объединенной шкалы «Ogata-Wells» в протокол обследования пациентов улучшает первичную диагностику миелодиспластических синдромов и может подтвердить наличие МДС в случаях, когда верификация диагноза затруднена - при отсутствии выраженных цитологических признаков дисмиелопоэза и типичных цитогенетических аберраций.

Выводы

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Давыдова Ю. О. Роль многоцветной проточной цитофлуориметрии в диагностике миелодиспластических синдромов / Ю. О. Давыдова, И. В. Гальцева, А. В. Кохно, Е. Н. Паровичникова // Онкогематология. – 2018. – Т. 13. – № 1. – С. 63-72.
2. Давыдова Ю. О. 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 // Онкогематология. – 2018. – Т. 13. – № 4. – С. 75-88.
3. Давыдова Ю. О. Диагностика МДС методом проточной цитометрии / Ю. О. Давыдова, Н. М. Капранов, А. Р. Кокорева, И. В. Гальцева, Е. Н. Паровичникова // Лаборатория. – 2017. – № 2. – С. 17.
4. Давыдова Ю. О. Оценка значения проточной цитометрии в диагностике миелодиспластического синдрома / Ю. О. Давыдова, Е. Н. Паровичникова, И. В. Гальцева, Н. Н. Капранов, А. Р. Кокорева, З. Т. Фидарова, А. В. Кохно, Е. А. Михайлова, В. В. Троицкая, Л. А. Кузьмина, Т. Н. Обухова, А. М. Ковригина, В. Г. Савченко // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2017. – Т. 10. – № 4. – С. 535-536.
5. Davydova Yu. O. The relationship of cytometric abnormalities and cytogenetic aberrancies in patients with myelodysplastic syndromes / Yu. O. Davydova, I. V. Galtseva, E. N. Parovichnikova, A. V. Kohno, N. M. Kapranov, K. A. Nikiforova, T. N. Obukhova, V. N. Dvirnykh, A. M. Kovrigina, V. V. Troitskaya, E. A. Mikhailova, T. N. Moiseeva, L. A. Kuzmina, E. A. Lukina, V. G. Savchenko // Cellular Therapy and Transplantation. – 2019. – vol. 8. – № 3. – pp. 47-49.
6. Davidova Y. Comparison of three flow cytometry scales in the primary diagnostics of myelodysplastic syndromes / Y. Davidova, I. Galtseva, E. Parovichnikova, A. Kohno, N. Kapranov, V. Troitskaya, E. Mikhailova, Z. Fidarova, T. Moiseeva, L. Kuzmina, E. Lukina, O. Nikulina, T. Obukhova, A. Kovrigina, V. Dvyrnik, H. Julhakyanyan, V. Savchenko // Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia. – 2019. – vol. 19. – № S1. – p. S344.
7. Davydova Y. Immunophenotypic dysplastic features in patients with aplastic anemia / Y. Davydova, E. Parovichnikova, I. Galtseva, E. Mikhaylova, N. Kapranov, A. Kohno, L. Kuzmina, V. Troitskaya, Z. Fidarova, T. Moiseeva, V. Savchenko // Haematologica. – 2017. – vol. 102. – № S2. – p. 403.