

Received: 2008.03.04  
Accepted: 2008.06.13  
Published: 2008.07.23

## Przydatność badania immunofenotypu komórek szpiku metodą cytometrii przepływowej w diagnostyce zespołów mielodysplastycznych

The role of bone marrow cells immunophenotypic study by flow cytometry in diagnosing myelodysplastic syndrome

Anna Czyż<sup>1</sup>, Grzegorz Dworacki<sup>2</sup>, Mieczysław Komarnicki<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

<sup>2</sup> Katedra Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

### Streszczenie

Zespoły mielodysplastyczne to grupa heterogennych klonalnych zaburzeń komórek krwiotwórczych szpiku charakteryzująca się morfologicznie rozpoznawalnymi zmianami dysplastycznymi, postępującą niewydolnością szpiku i wysokim ryzykiem transformacji w ostrą białaczkę szpikową. Kryteria rozpoznania i klasyfikacji choroby są ściśle określone, jednak u części chorych diagnostyka oparta na standardowych badaniach cytomorfologicznych i cytogenetycznych jest trudna i nie prowadzi do jednoznacznego postawienia rozpoznania. Badanie immunofenotypu komórek krwi i szpiku z wykorzystaniem współczesnych możliwości cytometrii przepływowej pozwala wykazać zaburzenia jakościowe i ilościowe komórek krwiotwórczych z dużą swoistością i czułością. Celem tego badania jest wykrycie zaburzeń regulacji ekspresji antygenów w komórkach mieloidalnych, ocena odsetka mieloblastów, a także wykazanie ich patologicznego immunofenotypu. Stwierdzone metodą cytometrii przepływowej zaburzenia mogą stanowić uzupełnienie powszechnie przyjętego międzynarodowego systemu rokowniczego.

**Słowa kluczowe:**

**zespoły mielodysplastyczne • immunofenotyp • cytometria przepływowa**

### Summary

Myelodysplastic syndromes are a heterogeneous group of clonal bone marrow disorders characterized by dysplasia, progressive bone marrow failure, and increased risk of transformation to acute myeloid leukemia. Although diagnostic criteria are well established, a diagnosis based on morphologic and cytogenetic findings is often difficult in a significant number of patients. Multiparametric flow cytometric immunophenotyping is a highly sensitive and specific method for quantitative and qualitative evaluation of hematopoietic cells. Flow cytometry is used to identify dysregulated antigen expression of myeloid cells, estimate the proportion of bone marrow blasts cells, and reveal their abnormal immunophenotype. Recent data suggest that flow cytometry adds important prognostic information to the widely accepted International Prognostic Scoring System.

**Key words:**

**myelodysplastic syndromes • immunophenotype • flow cytometry**

<b>Full-text PDF:</b>	<a href="http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=865007">http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=865007</a>
<b>Word count:</b>	3130
<b>Tables:</b>	5
<b>Figures:</b>	3
<b>References:</b>	34

**Adres autorki:** dr n. med. Anna Czyż, Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, ul. A.Szamarzewskiego 84, 60-569 Poznań; e-mail: aczyz@onet.eu

## WSTĘP

Zespoły mielodysplastyczne (myelodysplastic syndrome – MDS) stanowią heterogenną grupę klonalnych zaburzeń komórki macierzystej układu krwiotwórczego, która charakteryzuje się morfologicznie rozpoznawalnymi zmianami dysplastycznymi w przynajmniej jednej linii komórkowej układu krwiotwórczego. Zaburzenia te objawiają się jedno-, dwu- lub trójkądową cytopenią wynikającą z nieefektywnej hematopoezy oraz skłonnością do transformacji w ostrą białaczkę szpikową. W badaniu morfologicznym i histologicznym cytopenii obwodowej przeważnie towarzyszy obraz bogatokomórkowego szpiku. Jednak u około 15–25% chorych stwierdza się szpik ubogokomórkowy. Ustalenie rozpoznania MDS oparte jest w głównej mierze na ocenie morfologicznej komórek krwi i szpiku, histologicznej analizie komórkowości i architektury trepano-biopsatu szpiku oraz na badaniu cytogenetycznym pozwalającym wykryć zaburzenia chromosomalne. Powszechnie przyjęta klasyfikacja zespołów mielodysplastycznych zaproponowana w 1982 r. przez francusko-amerykańsko-brytyjską grupę badaczy (French-American-British classification – FAB) wyróżniała 5 postaci MDS: niedokrwiłość oporną na leczenie (refractory anemia – RA), niedokrwiłość oporną na leczenie z obecnością pierścieniowatych syderoblastów (refractory anemia with ring sideroblasts – RARS), niedokrwiłość oporną na leczenie z nadmiarem blastów (refractory anemia with excess of blasts – RAEB), niedokrwiłość oporną na leczenie z nadmiarem blastów w transformacji (refractory anemia with excess of blasts in transformation – RAEB-t) oraz przewlekłą białaczkę mielomonocytową [2]. Poszukiwanie czynników prognostycznych u chorych na MDS, które umożliwiłyby oszacowanie ryzyka szybkiego postępu choroby zaowocowało w 1997 r. opracowaniem międzynarodowego systemu rokowniczego (International Prognostic Scoring System – IPSS) [6]. Wartość punktowa IPSS zależy od liczby linii komórkowych dotkniętych cytopenią, morfologicznie oznaczonego odsetka blastów w szpiku oraz wykrytych zaburzeń cytogenetycznych. W 2001 r. zaproponowano modyfikację klasyfikacji FAB wg WHO [31], w której poza stwierdzanymi morfologicznie zaburzeniami dysplastycznymi uwzględniono również aberracje chromosomalne (tabela 1).

Zaburzenia immunofenotypowe wykazywane z użyciem cytometrii przepływowej (flow cytometry – FC) nie zostały ujęte w żadnej z wymienionych powyżej klasyfikacji. Ostatnia dekada przyniosła jednak szybki rozwój tej metody badania, dzięki czemu immunofenotypowanie szpiku stało się cennym źródłem dodatkowych informacji dotyczących zaburzeń dojrzewania komórek krwiotwórczych w zespołach mielodysplastycznych. W opublikowanym raporcie z konferencji roboczej poświęconej opracowaniu

standardów diagnostyki i leczenia MDS, która odbyła się w 2006 r. w Wiedniu z udziałem przedstawicieli ważnych onkologicznych i hematologicznych grup eksperckich, takich jak NCCN (US National Comprehensive Cancer Network), IWG (the International Working Group) czy ELN (European Leukemia Net) określono minimalne kryteria rozpoznania MDS. Wyróżniono kryteria konieczne, rozstrzygające oraz uzupełniające (tabela 2) [29].

Zaburzenia immunofenotypowe stwierdzane metodą cytometrii przepływowej zostały wymienione w kategorii kryteriów uzupełniających, tzn. nieuznawanych za standardowe w rutynowej diagnostyce hematologicznej, jednak pomocnych w ustaleniu rozpoznania MDS. Według autorów raportu, dla potwierdzenia rozpoznania MDS wymagane jest spełnienie kryteriów koniecznych i przynajmniej jednego z kryteriów rozstrzygających. U chorych, u których kryteria rozstrzygające nie są spełnione, a występują charakterystyczne dla MDS objawy kliniczne wykazanie monoklonalnej populacji komórek układu czerwokrwinkowego lub komórek mieloidalnych w szpiku metodą FC pozwala na rozpoznanie klonalnego nowotworu pochodzenia mieloidalnego z niewydolnością szpiku i postawienie podejrzenia zespołu mielodysplastycznego. Cytometria przepływowa została uznana również za badanie umożliwiające różnicowanie między wczesnym stadium MDS, a idiopatyczną cytopenią o nieustalonym znaczeniu klinicznym, zdefiniowaną przez autorów jako cytopenia trwająca powyżej 6 miesięcy, w sytuacji gdy minimalne kryteria diagnostyczne MDS nie są spełnione i nie zostały znalezione inne hematologiczne lub niehematologiczne przyczyny cytopenii. Wykrycie nieprawidłowej populacji blastów i cech nieprawidłowego dojrzewania populacji komórek mieloidalnych za pomocą FC pozwala postawić podejrzenie MDS.

Kompleksowe badanie komórek szpiku metodą cytometrii przepływowej stanowi uzupełnienie standardowych badań i jest przydatne nie tylko w ustaleniu rozpoznania MDS, ale może służyć określeniu zaawansowania choroby oraz wnosić dodatkowe niezależne od IPSS informacje prognostyczne. Celem oceny cytometrycznej jest wykazanie zaburzeń immunofenotypowych związanych ze zmianami dysplastycznymi w poszczególnych liniach układu krwiotwórczego, ocena odsetka mieloblastów, a także wykazanie ich patologicznego immunofenotypu. Dotąd najdokładniej opisano nieprawidłowości immunofenotypowe związane z dysplazją komórek linii granulocytarnej i monocytarnej. Ocena zaburzeń immunofenotypowych wskazujących na dysplazję układu czerwokrwinkowego jest trudniejsza ze względów metodycznych, przy jednocześnie stosunkowo łatwo identyfikowanych morfologicznie zaburzeniach. Jednym z istotnych ograniczeń badania immunofenotypowe-

Tabela 1. Klasyfikacja zespołów mielodysplastycznych (wg WHO [31])

Typ MDS	Krew	Szpik
Niedokrwistość oporna na leczenie RA (refractory anemia)	niedokrwistość blasty nieobecne lub pojedyncze	izolowana dysplazja układu czerwokrwiąkowego blasty <5% pierścieniowate syderoblasty <15%
Niedokrwistość oporna na leczenie z pierścieniowatymi syderoblastami RARS (refractory anemia with ringed sideroblasts)	niedokrwistość blasty nieobecne	izolowana dysplazja układu czerwokrwiąkowego blasty <5% pierścieniowate syderoblasty ≥15%
Cytopenia z objawami wieloukładowej dysplazji RCMD (refractory cytopenia with multilineage dysplasia)	cytopenia dwu- lub trzyukładowa blasty nieobecne lub pojedyncze pałeczki Auera nieobecne monocyty <1,0 G/L	cechy dysplazji w ≥ 10% komórek w 2 lub 3 liniach komórkowych pochodzenia mieloidalnego blasty <5% pierścieniowate syderoblasty <15% pałeczki Auera nieobecne
Niedokrwistość oporna na leczenie z nadmiarem blastów podtyp 1 RAEB-1 (refractory anemia with excess of blasts-1)	cytopenia dwu- lub trzyukładowa blasty <5% pałeczki Auera nieobecne monocyty <1,0 G/L	jedno- lub wieloliniowa dysplazja blasty 5–9% pałeczki Auera nieobecne
Niedokrwistość oporna na leczenie z nadmiarem blastów podtyp 2 RAEB-2 (refractory anemia with excess of blasts- 2)	cytopenie blasty 5–19% pałeczki Auera ± monocyty <1,0 G/L	jedno- lub wieloliniowa dysplazja blasty 10–19% pałeczki Auera ±
Zespół mielodysplastyczny niesklasyfikowany MDS-U (MDS unclassified)	cytopenie blasty nieobecne lub pojedyncze, pałeczki Auera nieobecne	jednoliniowa dysplazja w linii granulocytarnej lub megakariocytarnej blasty <5% pałeczki Auera nieobecne
MDS skojarzony z izolowaną del 5q MDS (5q)	niedokrwistość blasty < 5% liczba płytek w normie lub zwiększona	prawidłowa lub zwiększona liczba megakariocytów z hipolobulowanymi jądrami blasty <5% pałeczki Auera nieobecne izolowana del(5q)

Tabela 2. Kryteria diagnostyczne MDS – raport z konferencji roboczej dot. diagnostyki i leczenia zespołów mielodysplastycznych, Wiedeń 2006 [29]

1. Kryteria konieczne	<p>1. Trwała cytopenia w zakresie przynajmniej jednej linii komórkowej:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• czerwokrwiąkowej (Hb &lt;11 g/dl)</li> <li>• granulocytarnej (granulocyty &lt;1,5G/L)</li> <li>• megakariocytarnej (płytki krwi &lt;100G/L)</li> </ul> <p>2. Wykluczenie innych hematopoetycznych i niehematopoetycznych przyczyn cytopenii/dysplazji</p>
2. Kryteria rozstrzygające	<p>1. Dysplazja w przynajmniej 10% komórek, w przynajmniej jednej linii komórkowej w szpiku: czerwokrwiąkowej, granulocytarnej lub megakariocytarnej lub &gt;15% pierścieniowatych syderoblastów w szpiku</p> <p>2. Odsetek blastów w rozmazie szpiku 5–19%</p> <p>3. Typowe zaburzenia chromosomalne (+8,-7, 5q-, 20q, inne) stwierdzone w klasycznym kariotypie lub badaniu FISH</p>
3. Kryteria uzupełniające	<p>1. Nieprawidłowy fenotyp komórek szpiku wskazujący na występowanie monoklonalnej populacji w układzie czerwokrwiąkowym lub w populacji komórek mieloidalnych stwierdzany metodą cytometrii przepływową</p> <p>2. Molekularnie wykazana monoklonaalna populacja komórek</p> <p>3. Znacznie i trwale zmniejszona zdolność tworzenia kolonii komórkowych szpiku i/lub stwierdzenie krążących komórek progenitorowych (CFU-assay)</p>

Tabela 3. Zestawienie zaburzeń immunofenotypowych wykazywanych w zespołach mielodysplastycznych

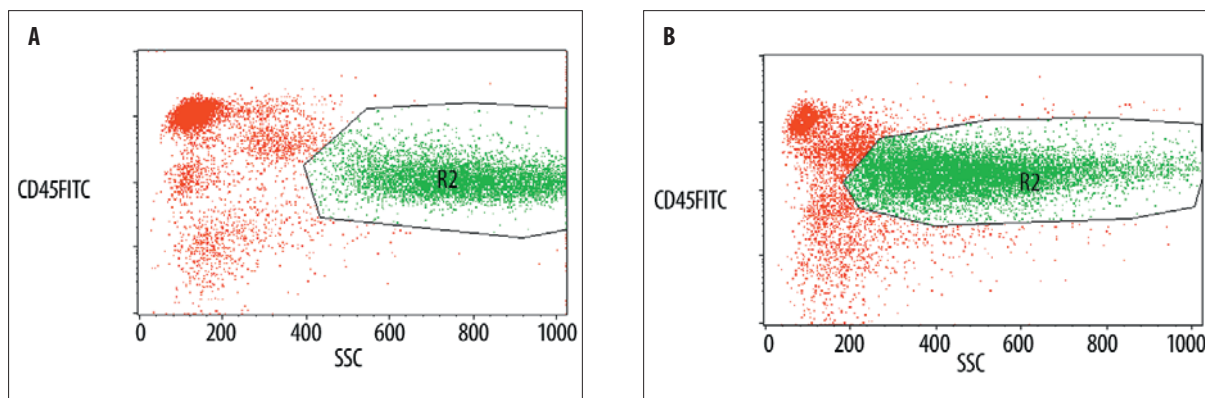
Autor	Zaburzenia fenotypowe linii granulocytarnej	Zaburzenia fenotypowe monocytów	Zaburzenia fenotypowe erytroblastów
Wells i wsp. [33] 115 chorych	<ol style="list-style-type: none"> <li>Zmniejszenie ziarnistości</li> <li>Ekspresja CD56</li> <li>Nieprawidłowy obraz ekspresji CD13 względem CD16</li> <li>Nieprawidłowy obraz ekspresji CD11b względem HLA-DR</li> <li>Brak CD33</li> <li>Obniżona ekspresja CD45</li> <li>Asynchroniczne „przesunięcie w lewo”: zaburzone dojrzewanie stwierdzone na podstawie asynchronicznej ekspresji antygenów CD34, CD15, CD11b, HLA-DR, CD13, CD16</li> <li>Ekspresja antygenów limfoidalnych</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Zmniejszenie ziarnistości</li> <li>Ekspresja CD56</li> <li>Brak ekspresji CD13 lub CD16</li> <li>Nieprawidłowa ekspresja CD11b lub HLA-DR</li> <li>Brak CD33</li> <li>Brak CD14</li> <li>Ekspresja antygenów limfoidalnych</li> </ol>	
Maynadie i wsp. [20] 207 chorych	<ol style="list-style-type: none"> <li>Podwyższona ekspresja HLA-DR, CD36, CD71</li> </ol>	Nie znaleziono istotnych statystycznie zaburzeń	Nie badano
Malcovati i wsp. [19] 103 chorych	<ol style="list-style-type: none"> <li>Zmniejszony odsetek granulocytów CD10+</li> <li>Zwiększony odsetek granulocytów CD56+</li> <li>Nieprawidłowy stosunek postaci niedojrzałych do dojrzałych, tj. zwiększony stosunek komórek CD33+CD16- do CD33+CD16++ CD45+CD16- do CD45+CD16++ CD13+CD16- do CD13+CD16++</li> </ol>	Nie badano	<ol style="list-style-type: none"> <li>Obniżona ekspresja CD71 w stosunku do ekspresji glikoforyny A (niska ekspresja CD71 na komórkach z ekspresją glikoforyny A)</li> </ol>
Canizo i wsp. [3] 101 chorych	<ol style="list-style-type: none"> <li>Podwyższona ekspresja CD33, HLA-DR</li> <li>Zmniejszony stosunek granulocytów do monocytów</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Obniżona ekspresja CD45</li> <li>Zahamowania dojrzewania stwierdzone na podstawie ekspresji CD34/CD15/HLA-DR</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Zwiększony odsetek erytroblastów</li> </ol>
Stetler-Stevenson i wsp. [28] 65 chorych	<ol style="list-style-type: none"> <li>Zmniejszenie ziarnistości</li> <li>Brak CD64</li> <li>Nieprawidłowy obraz ekspresji CD13 względem CD16</li> <li>Nieprawidłowa obraz ekspresji CD11b względem CD16</li> <li>Ekspresja CD56</li> <li>Brak CD10</li> <li>Ekspresja antygenów limfoidalnych</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Ekspresja CD56</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Obniżona ekspresja CD71 w stosunku do ekspresji glikoforyny A (niska ekspresja CD71 na komórkach z ekspresją glikoforyny A)</li> </ol>

go erytroblastów jest wąski panel antygenów swoistych dla tej linii, co sprawia, że cytometria przepływową jest mniej czuła od badania cytomorfologicznego [28,29]. Na podobne trudności napotyka się przy ocenie zaburzeń immunofenotypu megakariocytów, a analizę uzyskanych wyników dodatkowo komplikuje zjawisko agregacji płytkowo-leukocytarnej [28,29]. Dostępne w piśmiennictwie dane, dotyczące zaburzeń immunofenotypowych megakariocytów nie są wystarczające do oceny wartości ich wykrywania w diagnostyce zespołów mielodysplastycznych [29].

### 1. ZABURZENIA IMMUNOFENOTYPOWE WYKRYWANE W DYSPLAZJI KOMÓREK LINII GRANULOCYTARNEJ I MONOCYTARNEJ

Zaburzenia immunofenotypowe szeregu granulocytarnej i monocytarnej są wykazywane u około 80–98% cho-

rych na zespoły mielodysplastyczne [1,3,28,33], przy czym w 60–70% przypadków jest znajdowana więcej niż jedna aberracja [1,33]. Należy podkreślić, że nie stwierdzono dotychczas swoistego dla MDS zaburzenia immunofenotypowego, które pozwalałoby w sposób jednoznaczny rozpoznać mielodysplazję. W ustaleniu rozpoznania pomaga znalezienie wielu zaburzeń ilościowych i jakościowych w badanym szpiku. Rozwój metody wiąże się z zastosowaniem coraz szerszych paneli przeciwciał, ponadto nowoczesne cytometry przepływowe pozwalają na symultaniczną detekcję światła emisyjnego coraz większej liczby fluochromów przy jednoczesnej czulej detekcji parametrów morfologicznych badanych komórek, ocenianych na podstawie charakteru rozpraszania światła laserowego przez skanowane komórki. Zastosowanie wielokolorowego, obecnie rutynowego trzy- lub czterokolorowego bada-



Ryc. 1. Obraz ekspresji CD45 vs SSC komórek szpiku z zaznaczonym regionem (R2) populacji dojrzewających komórek szeregu granulocytarnego. **A** – obraz szpiku zdrowego dawcy, **B** – obraz szpiku chorego na MDS

nia cytometrycznego, tzn. badania z użyciem mieszaniny trzech lub więcej przeciwciał związanych z różnymi fluorochromami, przeprowadzonego na cytometrze przepływowym umożliwiającym jednoczesną detekcję różnych kolorów fluorescencji emitowanych przez związane z przeciwciałami fluorochromy, zwiększa istotnie czułość i swoistość metody. Mimo tego postępu, badanie szpiku w zespołach mielodysplastycznych za pomocą FC nie zostało poddane standaryzacji. Ustalenie wytycznych jest trudne ze względu na różnorodne założenia metodyczne publikowanych prac, dotyczące liczby badanych linii komórkowych, rodzaju wykrywanych antygenów, liczby stosowanych jednoczesowo fluorochromów, standardu detekcji i przetwarzania sygnału przez różne cytometry, sposobu analizy obrazu czy wreszcie metody opracowania statystycznego uzyskanych danych. Zestawienie stosowanych metod analizy komórek mieloidalnych i wykrywanych zaburzeń w wybranych pracach obejmujących stosunkowo liczne grupy chorych przedstawiono w tabeli 3.

Uznany sposób analizy poszczególnych populacji komórek szpiku w zespołach mielodysplastycznych stosowanym w większości publikowanych prac jest ocena ekspresji antygeny panleukocytarnego CD45 (leukocyte common antigen – LCA) i parametru SSC (side scattered light), który opiera się na detekcji rozproszenia światła pod kątem 90 stopni do padającej wiązki światła laserowego. Wartość parametru SSC zależna jest od stopnia ziarnistości cytoplazmy komórek. Cytogramy przedstawiające te dwa parametry pozwalają zidentyfikować populacje blastów, dojrzewających komórek szeregu granulocytarnego, limfocytów, monocytów oraz erytroblastów. Taki sposób analizy, inaczej nazywany brankowaniem poszczególnych populacji jest zalecany przez ekspertów w raporcie grupy cytometrycznej dotyczącym diagnostyki MDS [13]. Dodatkowo analiza przesunięcia populacji granulocytów na osi SSC w lewo pozwala rozpoznać zmniejszenie ziarnistości cytoplazmy komórek, co jest jednym z najczęściej wykazywanych cytometrycznie zaburzeń w MDS [11,12,13,28,33]. Na rycinie 1 przedstawiono cytogram CD45 FITC (oś Y) vs SSC (oś X) komórek pochodzących od zdrowego dawcy (ryc. 1A) i cytogram komórek szpiku chorego na MDS (ryc. 1B) z wyraźnie przesuniętą w lewo na osi X populacją granulocytów (badanie z Pracowni Cytometrii Przepływowej Katedry i Kliniki Hematologii UM w Poznaniu).

Najczęściej stwierdzane zaburzenia antygenowe linii granulocytarnej i monocytów w analizowanym piśmiennictwie to stwierdzenie braku ekspresji CD13, CD33, obecność CD34 na dojrzewających komórkach, koekspresja antygenów limfoidalnych, obniżona ekspresja CD45 oraz nieprawidłowy obraz wzajemnej zależności ekspresji różnych antygenów, których gęstość na powierzchni komórek zmienia się podczas dojrzewania (tabela 3). Do wykrycia tych zaburzeń jest rekomendowane wykonywanie badania minimum trzykolorowego. Zastosowanie czterokolorowej analizy podnosi dodatkowo wartość badania i pozwala wykazać zaburzenia fenotypowe komórek szeregu granulocytarnego i monocytów z czułością i swoistością przekraczającą 80%, co wykazano w pracach Kussicka i wsp. [11,12]. Autorzy retrospektywnie przeanalizowali wyniki badań immunofenotypowych komórek szpiku u 400 chorych, u których początkowo podejrzewano przewlekłą chorobę mieloproliferacyjną (z wykluczeniem przewlekłej białaczki szpikowej) lub MDS [12]. Zidentyfikowano prawidłowy, powtarzalny, złożony obraz zmian ekspresji antygenów podczas dojrzewania granulocytów i monocytów. Wykazano jak wpływają na ten obraz nienowotworowe zmiany reaktywne w przebiegu regeneracji szpiku lub działanie czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów (granulocyte-colony stimulating factor – G-CSF) oraz w jaki sposób zmiany te różnią się od zmian w przebiegu proliferacji nowotworowej komórek mieloidalnych. W późniejszej pracy autorzy poddali walidacji zastosowaną metodę do oceny przydatności w ustaleniu rozpoznania MDS [11]. Retrospektywnie porównano wyniki uzyskane metodą cytometrii przepływowej z wynikami badań morfologicznych i cytogenetycznych u 124 chorych diagnozowanych z powodu cytopenii lub monocytocyty. W oparciu o analizę obrazu CD45/SSC oraz analizę ekspresji dużej liczby antygenów mieloidalnych (CD11b, CD13, CD14, CD15, CD16, CD33, CD38, CD56, CD117) i niemieloidalnych (HLA-DR, CD5, CD7, CD10, CD34) rozpoznano pięć głównych typów zaburzeń antygenowych:

- (1) odchylenie w intensywności ekspresji antygenów mieloidalnych definiowane jako wzrost lub zmniejszenie o przynajmniej jedną trzecią dekady na skali logarytmicznej w porównaniu z prawidłową ekspresją, wykazywane na nie mniej niż 10% komórek badanej populacji,
- (2) nieprawidłowa homogenna ekspresja antygeny, bez zmian intensywności charakterystycznych dla populacji komórek z prawidłowym dojrzewaniem,



Tabela 4. Immunofenotypowe zaburzenia najczęściej wykrywane w MDS metodą cytometrii przepływowej - raport z konferencji roboczej dot. diagnostyki i leczenia zespołów mielodysplastycznych, Wiedeń 2006 [29]

Zaburzenia immunofenotypowe dojrzewających komórek linii granulocytarnej	Zaburzenia immunofenotypowe monocytów	Zaburzenia immunofenotypowe erytroblastów
1. Zmniejszona ziarnistość 2. Nieprawidłowy obraz wzajemnej zależności ekspresji antygenów mieloidalnych 3. Asynchroniczne dojrzewanie 4. Brak ekspresji CD13 lub CD33 5. Ekspresja CD34 6. Ekspresja antygenów limfoidalnych 7. Obniżona ekspresja CD45	1. Nieprawidłowy obraz wzajemnej zależności ekspresji HLA-DR, CD11b, CD13, CD14, CD33 2. Brak ekspresji CD13, CD14, CD16, CD33 3. Ekspresja CD34 4. Ekspresja antygenów limfoidalnych z wyjątkiem CD4	1. Nieprawidłowa ekspresja CD45 2. Ekspresja CD34 3. Nieprawidłowa ekspresja CD71, CD117 lub CD235a

- (3) asynchroniczna ekspresja 2 antygenów związanych z linią mieloidalną na większości komórek badanej populacji,
- (4) nieprawidłowa ekspresja niemieloidalnych antygenów na nie mniej niż 10% komórek badanej populacji,
- (5) nieproporcjonalne obniżenie parametru SSC populacji granulocytów (związane ze zmniejszoną ziarnistością) w porównaniu z parametrem SSC populacji limfocytów definiowane jako różnica między medianą SSC granulocytów a medianą SSC limfocytów mniejsza niż pół logarytmu.

Tak dokładna analiza cytometryczna pozwoliła na osiągnięcie 89% czułości i 88% swoistości badań wykonywanych w celu identyfikowania zaburzeń w zespołach mielodysplastycznych spełniających standardowe, morfologiczne lub cytogenetyczne kryteria rozpoznania.

Próbą uporządkowania dotychczas opublikowanych wyników badań jest cytowany wcześniej raport z konferencji roboczej [29]. Wymieniono w nim najczęściej opisywane w piśmiennictwie, powtarzalne zaburzenia fenotypowe w MDS. Ich wykrywanie metodą FC rekomendowano jako badanie uzupełniające w ustaleniu rozpoznania (tabela 4).

W raporcie szczegółowym dotyczącym cytometrii przepływowej omówiono dokładnie szczególną przydatność analizy zmian ekspresji CD13 względem CD16 oraz CD11b względem HLA-DR w czteroparametrowym obrazie (odpowiednio CD45/SSC/CD13/CD16 lub CD45/SSC/CD11b/HLA-DR) do różnicowania między reaktywnym przesunięciem w lewo populacji granulocytów, a zaburzeniami dojrzewania z asynchronicznym przesunięciem w lewo lub dysregulacją ekspresji antygenów w przebiegu MDS [13]. Na rycinach 2 i 3 przedstawiono przykłady prawidłowych obrazów zmian ekspresji CD13 względem CD16 oraz CD11b względem HLA-DR u osób zdrowych (ryc. 2A i ryc. 3A) oraz u chorych z ustalonym rozpoznaniem MDS (ryc. 2B i ryc. 3B) (badania z Pracowni Cytometrii Przepływowej Katedry i Kliniki Hematologii UM w Poznaniu).

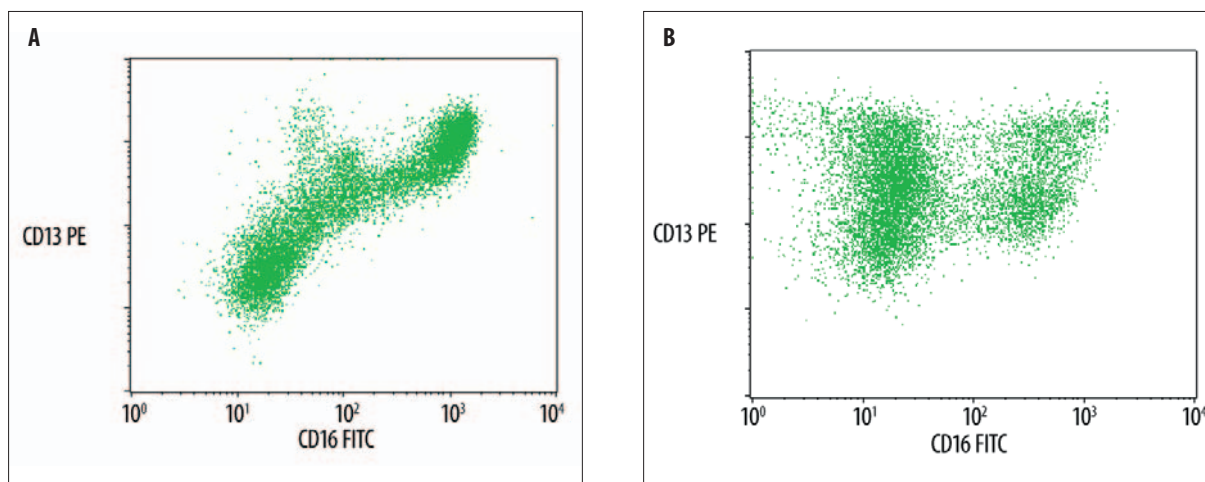
## 2. PRZYDATNOŚĆ OZNACZANIA KOMÓREK BLASTYCZNYCH METODĄ CYTOMETRII PRZEPLÝWOWEJ W ZESPOŁACH MIELODYSPLASTYCZNYCH

Ustalenie odsetka mieloblastów w szpiku jest niezbędne do rozpoznania podtypu zespołu mielodysplastycznego wg FAB i WHO oraz określenia rokowania, ponieważ

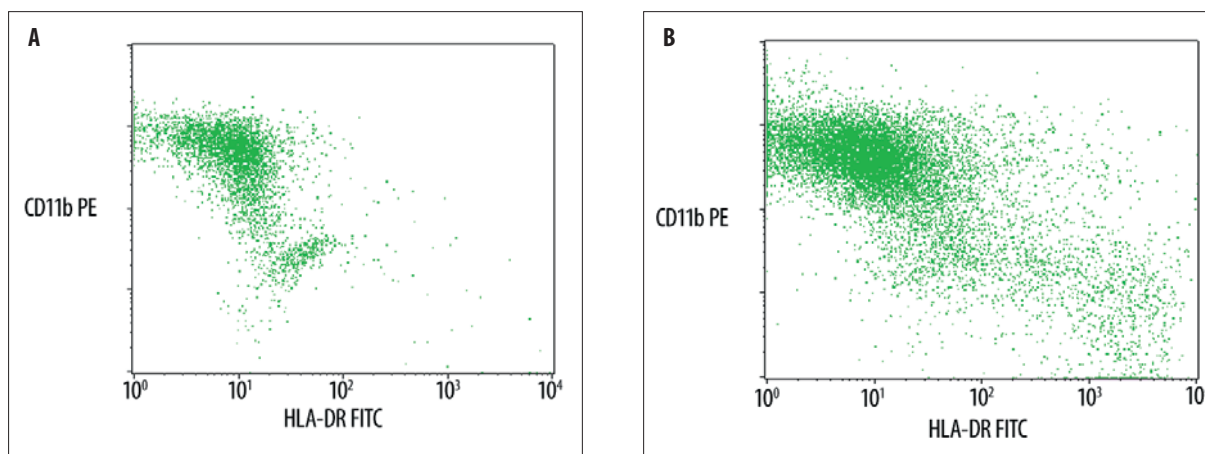
stanowi on jeden z parametrów skali IPSS. Badanie immunofenotypowe jest cennym uzupełnieniem badania cytomorfologicznego. Dostarcza informacje zarówno ilościowe jak i jakościowe dotyczące blastów w szpiku lub krwi chorego na MDS. Opublikowane wyniki wielu prac potwierdzają przydatność oceny immunofenotypu blastów metodą cytometrii przepływowej do ustalenia rozpoznania i stopnia zaawansowania MDS oraz wskazują na dodatkową jego wartość prognostyczną [3,18,19,22,24,30] niezależną od IPSS.

Badania Malcovatiego i wsp. [19] potwierdziły silną dodatnią korelację między odsetkiem blastów w szpiku określonym na podstawie badania cytomorfologicznego, a odsetkiem blastów ocenianym za pomocą cytometrii przepływowej z użyciem analizy cytogramu CD45/SSC. Stwierdzono ponadto dodatnią korelację pomiędzy tak ustalonym odsetkiem blastów, a odsetkiem komórek CD34+ i CD34+/CD33+ w szpiku. Wykazano również zaburzone proporcje w szpiku między niedojrzałymi komórkami CD34+/CD33- a ukierunkowanymi prekursorowymi komórkami mieloidalnymi CD34+/CD33+ z przewagą na korzyść tych ostatnich u chorych na MDS, w porównaniu z proporcjami stwierdzanymi u zdrowych osób. Stosunek komórek CD34+/CD33+ do CD34+/CD33- dodatnio korelował z nasileniem ocenianych cytomorfologicznie zmian dysplastycznych w układzie czerwokrwiąkowym i granulocytarnym. Podobnie zaburzone proporcje w obrębie populacji komórek CD34+ wykazali Canzini i wsp. [3] we wszystkich podtypach MDS, z wyjątkiem podtypów RARS i RCMD, w których stosunek komórek niedojrzałych CD34+ do ukierunkowanych był zbliżony do stwierdzonego w szpikach zdrowych osób. W pracy tej ponadto potwierdzono również istotną korelację między odsetkiem komórek CD34+ stwierdzanym w badaniu immunofenotypowym, a odsetkiem blastów ocenianym na podstawie badania morfologicznego szpiku.

Ogata i wsp. [24] badali kliniczne znaczenie immunofenotypu blastów u 116 chorych na MDS lub ostrą białaczką szpikową wtórną do MDS. Autorzy wykorzystali metodę wzbogacenia próbek krwi i szpiku w komórki blastyczne metodą wirowania na gradiencie stężeń z użyciem specyficznego odczynnika dla komórek blastycznych. Immunofenotyp komórek blastycznych badano metodą cytometrii przepływowej z użyciem trójkolorowego barwienia bramkując badaną populację na cytogramie CD45/SSC. U niemal wszystkich



Ryc. 2. Wzajemna zależność ekspresji CD13 i CD16 na dojrzewających komórkach szeregu granulocytarnego. **A** – obraz szpiku zdrowego dawcy, **B** – obraz szpiku chorego na MDS



Ryc. 3. Wzajemna zależność ekspresji CD11b i HLA-DR na dojrzewających komórkach szeregu granulocytarnego. **A** – obraz szpiku zdrowego dawcy, **B** – obraz szpiku chorego na MDS

chorych stwierdzono występowanie na blastach fenotypu charakterystycznego dla ukierunkowanych komórek mieloidalnych CD34+CD38+HLA-DR+CD13+CD33+. Częstość występowania innych antygenów na mieloblastach wykazana przez autorów pracy przedstawiono w tabeli 5.

Porównanie immunofenotypu blastów w poszczególnych podtypach MDS wg FAB wykazało istotne różnice ekspresji czterech antygenów, tj. CD7, CD10, CD15 i CD117. Ekspresja markerów niedojrzałych komórek mieloidalnych (CD7 i CD117) była częstsza w zaawansowanych MDS (CMML, RAEB, RAEB-t) i wtórnych białaczkach, natomiast markery dojrzewania komórek mieloidalnych (CD10 i CD15) częściej były wykrywane we wczesnych postaciach MDS (RA i RARS). Warto podkreślić, że w żadnym przypadku wczesnej postaci MDS nie stwierdzono ekspresji CD7 na blastach. W przeprowadzonej analizie ekspresja CD7 była niezależnym czynnikiem związanym z krótszym przeżyciem całkowitym chorych i przeżyciem wolnym od transformacji. Najdłuższe przeżycie całkowite wykazano w grupie o fenotypie CD7-CD15+. Stwierdzono istotną statystyczną zależność między wartością IPSS a występowaniem CD7 na blastach.

Tabela 5. Częstość występowania poszczególnych antygenów na blastach w MDS (wg [24])

Antygen	Częstość występowania na blastach w MDS [%]
CD117	64
CD15	64
CD11b	48
CD4	47
CD7	34
CD56	27
CD10	19

Prospektywne badanie grupy GEIL (Grupe d’Etude Immunologique des Leucemies) prowadzone przez Maynadiego i wsp. [20] obejmujące 207 chorych na zespoły mielodysplastyczne miało na celu ocenę przydatności badania immunofenotypowego w określeniu zarówno

zaawansowania MDS, jak i rokowania w przebiegu choroby. W tym celu immunofenotyp blastów porównywano z podtypem zespołu mielodysplastycznego wg FAB, wartością IPSS, odsetkiem blastów i cytogenetycznymi czynnikami ryzyka. Stwierdzono, że na podstawie oceny występowania antygenów CD16, CD34, CD36, CD38, CD71 i HLA-DR oraz nasilenia ich ekspresji na blastach wyróżnić można osiem podgrup MDS pozostających w związku z podtypem wg FAB i wartością IPSS. Wykazano, że wysoka ekspresja CD36 (CD36<sup>hi</sup>) charakterystyczna dla podgrupy z obecnością blastów CD36<sup>hi</sup>CD71+ pozwala wyodrębnić MDS o wysokiej wartości IPSS.

### 3. PRZYDATNOŚĆ PROGNOZYSTYCZNA BADANIA IMMUNOFENOTYPOWEGO KOMÓREK SZPIKU METODĄ CYTOMETRII PRZEPLYWOWEJ W ZESPOŁACH MIELODYSPLASTYCZNYCH

Najbardziej rozbudowany i kompleksowy cytometryczny punktowy system rokowniczy (flow cytometric scoring system – FCSS) oparty na kompleksowej analizie immunofenotypu komórek szpiku zaproponowali Wells i wsp. [33]. Autorzy analizowali obrazy u 115 chorych na MDS i porównali z obrazami szpiku osób zdrowych i chorych na inne choroby hematologiczne i nowotwory spoza układu krwiotwórczego. Zastosowano trzykolorowe badanie cytometryczne oparte na analizie bramki CD45/SSC. Zaburzenia oceniano w 3 punktowej skali, odpowiednio dla linii granulocytarnej i monocytarnej. Wśród wykazywanych zaburzeń w opracowanej skali rokowniczej znalazły się obniżona ziarnistość komórek linii granulocytarnej i/lub monocytarnej (obniżony parametr SSC), obniżona ekspresja CD45, brak antygenów występujących w warunkach prawidłowych na badanej linii, ekspresja antygenów nie występujących na danej linii w warunkach prawidłowych, asynchronia ekspresji antygenów oznaczająca koekspresję antygenów charakterystycznych dla komórek niedojrzałych z antygenami występującymi na komórkach dojrzałych danej linii, nieprawidłowa relacja między zmianami ekspresji różnych antygenów na badanej linii, zwiększony odsetek mieloblastów, obecność mieloblastów o nieprawidłowym immunofenotypie oraz stosunek układu limfoidalnego do mieloidalnego w szpiku. Uzyskaną wartość FCSS porównano z IPSS i cytogenetycznymi czynnikami ryzyka wykazując statystycznie znamiennej zależność pomiędzy porównywanymi parametrami. Przeanalizowano również wyniki transplantacji alogenicznych komórek krwiotwórczych u chorych podzielonych wg FCSS na podrupy o łagodnych (0–1 punkt), umiarkowanych (2–3 punkty) i ciężkich zaburzeniach cytometrycznych (powyżej 4 punktów). Stwierdzono statystycznie znamiennej, niezależną od IPSS wartość prognostyczną FCSS w przewidywaniu przeżycia i nawrotu choroby po transplantacji.

Poszukiwanie korelacji zaburzeń immunofenotypowych komórek mieloidalnych szpiku z IPSS było również celem badania Maynadiego i wsp. [20]. Wykazali oni, że ekspresja antygenów CD71 i CD36 wyższa na komórkach linii granulocytarnej i monocytarnej u chorych na MDS w porównaniu z osobami zdrowymi jest powiązana statystycznie z wartością IPSS. Ekspresja CD71 na komórkach dojrzewających szeregu granulocytarnego była związana z grupą dobrego rokowania wg IPSS, a ekspresja CD36 częściej stwierdzana w podtypach RAEB i RAEB-t wykazywała korelację z wysokim wskaźnikiem IPSS i złym roko-

waniem. W pracy Canizo i wsp. stwierdzono znamienne niższy stosunek granulocytów do monocytów w podtypie REAB w porównaniu z mniej zaawansowanymi postaciami MDS, a także częściej obserwowano obniżoną ekspresję CD45 i obecność trzech lub więcej aberracji fenotypowych w tym podtypie [3].

Ocena przydatności badania immunofenotypowego w uzupełnieniu powszechnie przyjętego systemu rokowniczego IPSS wymaga przeprowadzenia prospektywnych badań klinicznych [13].

### 4. PRÓBY WYJAŚNIENIA MECHANIZMÓW PATOFIZJOLOGICZNYCH ZWIĄZANYCH Z ROZWOJEM ZESPOŁÓW MIELODYSPLASTYCZNYCH ZA POMOCĄ BADAŃ WYKONYWANYCH METODĄ CYTOMETRII PRZEPLYWOWEJ

W patogenezie zespołów mielodysplastycznych istotną rolę przypisuje się z jednej strony nadmiernej apoptozie komórek progenitorowych układu krwiotwórczego, a z drugiej patologicznej proliferacji nowotworowego klonu. Cytometria przepływowa może służyć lepszemu poznaniu zjawisk towarzyszących rozwojowi mielodysplazji. Detekcja apoptozy za pomocą FC jest stosunkowo prosta i szybka. Jedną z metod jest barwienie komórek za pomocą aneksyny V, która wiąże się z fosfatydyloseryną pojawiającą się na powierzchni komórek w wczesnej fazie apoptozy. Proliferacja komórek może być oznaczana za pomocą przeciwciała przeciw antygenowi Ki67, ujawniającego komórki w trakcie podziału komórkowego. Parker i wsp. badali odsetek apoptotycznych komórek CD34+ u chorych na MDS wykorzystując wiązanie aneksyny V [25]. Jednocześnie badano nasilenie proliferacji komórek CD34+ oznaczając wśród nich komórki Ki67 dodatnie. Ponadto w populacji komórek CD34 oznaczano ekspresję białek antyapoptotycznych związanych z Bcl-2/Bcl-x i proapoptotycznych Bax/Bad. Stwierdzono, że w podtypach RA/RARS/RAEB apoptoza jest zwiększona w porównaniu z grupą kontrolną zdrowych osób. Wykazano również, że zjawisko apoptozy dominuje nad proliferacją w podtypach RA/RARS, w podtypie RAEB dochodzi do zrównoważenia obu procesów, a w RAEB-t do przewagi proliferacji. Podobnie stosunek białka Bax/Bad do Bcl-2/Bcl-x był zwiększony w podtypach RA/RARS, a ulegał odwróceniu wraz z progresją choroby. Wykazano również, że występowała ujemna korelacja pomiędzy stosunkiem Bax/Bad: Bcl-2/Bcl-x, a wartością IPSS i cytogenetycznymi grupami ryzyka.

Inne kierunki badań z wykorzystaniem FC dotyczą zjawiska skracania telomerów w populacji komórek progenitorowych układu krwiotwórczego [27], a także ekspresji białek związanych z opornością wielolekową [26].

Cytometria przepływowa jest przydatna zwłaszcza do lepszego poznania roli układu immunologicznego w patogenezie zespołów mielodysplastycznych. Wiele obserwacji wskazuje na aktywny udział w rozwoju choroby swoistej odpowiedzi immunologicznej. Sugeruje to stwierdzany u chorych oligoklonalny rozplam limfocytów T [5,9,17], zmiany fenotypowe w obrębie subpopulacji limfocytów wskazujące na ich aktywację [10], a także nierównowaga rozkładu antygenów HLA DR u chorych w porównaniu z populacją osób zdrowych [16]. Rola rozplam limfocytów i ich funkcja w patogenezie zespołów mielodysplastycz-



nych nie jest pewna. Wskazuje się jednak na potencjalnie cytotoksyczny, o podłożu autoimmunizacyjnym charakterze odpowiadzi limfocytów T. We krwi chorych z zespołami mielodysplastycznymi i anemią aplastyczną stwierdzano wyraźnie wyższy odsetek komórek wykazujących immunofenotyp terminalnie zróżnicowanych komórek o potencjalnie cytotoksycznym (CD8+CD28- i CD8+CD28-CD57+) [10]. Ponadto, zahamowanie hematopoezy i cytopenię łączy się także z odpowiedzią limfocytów T. Wśród białek rozpatrywanych jako potencjalne immunogeny i elemente swoistego rozpoznawania przez limfocyty T wymieniane są produkty ekspresji genu WT1 (wilde type Wilms tumor gene), który często ulega nadekspresji u chorych na ostre białaczki szpikowe i zespoły mielodysplastyczne. Podejmowane są także próby stosowania peptydów tego białka jako szczepionki [7,8]. U chorych na MDS obserwuje się także inne zaburzenia odpowiedzi immunologicznej. Stwierdzano obniżenie funkcji cytotoxicznej komórek NK [4] i spadek ich liczby w porównaniu z grupą kontrolną zdrowych osób [34]. Wśród zaburzeń odpowiedzi immunologicznej wymienia się także zmiany liczby

krążących komórek dendrytycznych, ich dojrzałości związanej ze zmianami ekspresji cząsteczek kostymulujących i co się z tym łączy potencjału do prezentacji antygenów przez antygeny HLA [15,32], a także zaburzenia wytwarzania cytokin [14,21]. Zmiany te mogą dotyczyć zarówno wzrostu, jak i spadku wymienianych parametrów, co wydaje się m.in. funkcją fazy choroby i może mieć wpływ na rokowanie u chorych, a także determinować odpowiedź na terapię.

Układ immunologiczny stanowi istotny, coraz lepiej rozumiany element patogenezy zespołów mielodysplastycznych. Parametry związane z oceną układu odporności mogą stanowić wkrótce nowe narzędzie diagnostyczne, wykorzystywane również w prognozowaniu i planowaniu terapii u chorych na zespoły mielodysplastyczne. Wykorzystanie nowoczesnych cyfrowych cytometrów przepływowych zaopatrzonych w rozbudowane oprogramowanie, umożliwiające jednoczesną detekcję 8–10 parametrów pozwoli zapewne na lepsze zrozumienie zjawisk decydujących o powstawaniu i progresji tej heterogennej grupy chorób [23].

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Arroyo J.L., Fernandez M.E., Hernandez J.M., Orfao A., San Miguel J.F., del Canizo M.C.: Impact of immunophenotype on prognosis of patients with myelodysplastic syndromes. Its value in patients without karyotypic abnormalities. *Hematol. J.*, 2004; 5: 227–233
- [2] Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A., Gralnick H.R., Sultan C.: Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.*, 1982; 51: 189–199
- [3] Del Canizo M.C., Fernandez M.E., Lopez A., Vidrales B., Villaron E., Arroyo J.L., Ortuno F., Orfao A., San Miguel J.F.: Immunophenotypic analysis of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 2003; 88: 402–407
- [4] Epling-Burnette P.K., Bai F., Painter J.S., Rollison D.E., Salih H.R., Krusch M., Zou J., Ku E., Zhong B., Boulware D., Moscinski L., Wei S., Djeu J.Y., List A.F.: Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. *Blood*, 2007; 109: 4816–4824
- [5] Epling-Burnette P.K., Painter J.S., Rollison D.E., Ku E., Vendron D., Widen R., Boulware D., Zou J.X., Bai F., List A.F.: Prevalence and clinical association of clonal T-cell expansions in Myelodysplastic Syndrome. *Leukemia*, 2007; 21: 659–667
- [6] Greenberg P., Cox C., LeBeau M.M., Fenau P., Morel P., Sanz G., Sanz M., Vallespi T., Hamblin T., Oscier D., Ohyashiki K., Toyama K., Aul C., Mufti G., Bennett J.: International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 1997; 89: 2079–2088
- [7] Iwasaki T., Sugisaki C., Nagata K., Takagi K., Takagi A., Kojima T., Ito M., Nakamura S., Naoe T., Murate T.: Wilms' tumor 1 message and protein expression in bone marrow failure syndrome and acute leukemia. *Pathol. Int.*, 2007; 57: 645–651
- [8] Kawakami M., Oka Y., Tsuboi A., Harada Y., Elisseeva O.A., Furukawa Y., Tsukaguchi M., Shirakata T., Nishida S., Nakajima H., Morita S., Sakamoto J., Kawase I., Oji Y., Sugiyama H.: Clinical and immunologic responses to very low-dose vaccination with WT1 peptide (5 microg/body) in a patient with chronic myelomonocytic leukemia. *Int. J. Hematol.*, 2007; 85: 426–429
- [9] Kochenderfer J.N., Kobayashi S., Wieder E.D., Su C., Mollidrem J.J.: Loss of T-lymphocyte clonal dominance in patients with myelodysplastic syndrome responsive to immunosuppression. *Blood*, 2002; 100: 3639–3645
- [10] Kook H., Zeng W., Guibin C., Kirby M., Young N.S., Maciejewski J.P.: Increased cytotoxic T cells with effector phenotype in aplastic anemia and myelodysplasia. *Exp. Hematol.*, 2001; 29: 1270–1277
- [11] Kussick S.J., Fromm J.R., Rossini A., Li Y., Chang A., Norwood T.H., Wood B.L.: Four-color flow cytometry shows strong concordance with bone marrow morphology and cytogenetics in the evaluation for myelodysplasia. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2005; 124: 170–181
- [12] Kussick S.J., Wood B.L.: Using 4-color flow cytometry to identify abnormal amyloid populations. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2003; 127: 1140–1147
- [13] Loken M.R., van de Loosdrecht A., Ogata K., Orfao A., Wells D.A.: Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from a working conference. *Leuk. Res.*, 2008; 32: 5–17
- [14] Ma L., Ceuppens J., Kasran A., Delforge M., Boogaerts M., Vandenberghe P.: Immature and mature monocyte-derived dendritic cells in myelodysplastic syndromes of subtypes refractory anemia or refractory anemia with ringed sideroblasts display an altered cytokine profile. *Leuk. Res.*, 2007; 31: 1373–1382
- [15] Ma L., Delforge M., van Duppen V., Verhoef G., Emanuel B., Boogaerts M., Hagemeijer A., Vandenberghe P.: Circulating myeloid and lymphoid precursor dendritic cells are clonally involved in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 2004; 18: 1451–1456
- [16] Maciejewski J.P., Follmann D., Nakamura R., Sauntharajah Y., Rivera C.E., Simonis T., Brown K.E., Barrett J.A., Young N.S.: Increased frequency of HLA-DR2 in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the PNH/aplastic anemia syndrome. *Blood*, 2001; 98: 3513–3519
- [17] Maciejewski J.P., O'Keefe C., Gondek L., Tiu R.: Immune-mediated bone marrow failure syndromes of progenitor and stem cells: molecular analysis of cytotoxic T cell clones. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2007; 45: 5–14
- [18] Maftoun-Banankhah S., Maleki A., Karandikar N.J., Arbini A.A., Fuda F.S., Wang H.Y., Chen W.: Multiparameter flow cytometric analysis reveals low percentage of bone marrow hematogones in myelodysplastic syndromes. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2008; 129: 300–308
- [19] Malcovati L., Della Porta M.G., Lunghi M., Pascutto C., Vanelli L., Travaglio E., Maffioli M., Bernasconi P., Lazzarino M., Invernizzi R., Cazzola M.: Flow cytometry evaluation of erythroid and myeloid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, 2005; 19: 776–783
- [20] Maynadie M., Picard F., Husson B., Chatelain B., Cornet Y., Le Roux G., Campos L., Dromelet A., Lepelletier P., Jouault H., Imbert M., Rosenwajd M., Verge V., Bissieres P., Raphael M., Bene M.C., Feuillard J.: Immunophenotypic clustering of myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2002; 100: 2349–2356
- [21] Micheva I., Thanopoulou E., Michalopoulou S., Karakantza M., Kouraklis-Symeonidis A., Mouzaki A., Zoumbos N.: Defective tumor necrosis factor alpha-induced maturation of monocyte-derived dendritic cells in patients with myelodysplastic syndromes. *Clin. Immunol.*, 2004; 113: 310–317
- [22] Monreal M.B., Pardo M.L., Pavlovsky M.A., Fernandez I., Corrado C.S., Giere I., Sapia S., Pavlovsky S.: Increased immature hematopoietic progenitor cells CD34+/CD38dim in myelodysplasia. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2006; 70: 63–70

- [23] Ogata K.: Myelodysplastic syndromes: recent progress in diagnosis and understanding of their pathophysiology. *J. Nippon Med. Sch.*, 2006; 73: 300–307
- [24] Ogata K., Nakamura K., Yokose N., Tamura H., Tachibana M., Taniguchi O., Iwakiri R., Hayashi T., Sakamaki H., Murai Y., Tohyama K., Tomoyasu S., Nonaka Y., Mori M., Dan K., Yoshida Y.: Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood*, 2002; 100: 3887–3896
- [25] Parker J.E., Mufti G.J., Rasool F., Mijovic A., Devereux S., Pagliuca A.: The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood*, 2000; 96: 3932–3938
- [26] Poulain S., Lepelley P., Preudhomme C., Cambier N., Cornillon J., Wattel E., Cosson A., Fenaux P.: Expression of the multidrug resistance-associated protein in myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.*, 2000; 110: 591–598
- [27] Rigolin G.M., Porta M.D., Bugli A.M., Castagnari B., Mauro E., Bragotti L.Z., Ciccone M., Cuneo A., Castoldi G.: Flow cytometric detection of accelerated telomere shortening in myelodysplastic syndromes: correlations with aetiological and clinical-biological findings. *Eur. J. Haematol.*, 2004; 73: 351–358
- [28] Stetler-Stevenson M., Arthur D.C., Jabbour N., Xie X.Y., Molldrem J., Barrett A.J., Venzon D., Rick M.E.: Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood*, 2001; 98: 979–987
- [29] Valent P., Horny H.P., Bennett J.M., Fonatsch C., Germing U., Greenberg P., Haferlach T., Haase D., Kolb H.J., Krieger O., Loken M., van de Loosdrecht A., Ogata K., Orfao A., Pfeilstocker M., Ruter B., Sperr W.R., Stauder R., Wells D.A.: Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk. Res.*, 2007; 31: 727–736
- [30] van de Loosdrecht A.A., Westers T.M., Westra A.H., Drager A.M., van der Velden V.H., Ossenkoppele G.J.: Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood*, 2008; 111: 1067–1077
- [31] Vardiman J.W., Harris N.L., Brunning R.D.: The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 2002; 100: 2292–2302
- [32] Wang H.Q., Shao Z.H., Xing L.M., Fu R., Tu M.F., Sun J., Jia H.R.: The quantity, subsets and expression of costimulatory molecules of circulating dendritic cells in the patients with myelodysplastic syndromes. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2007; 28: 474–477
- [33] Wells D.A., Benesch M., Loken M.R., Vallejo C., Myerson D., Leisenring W.M., Deeg H.J.: 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: 394–403
- [34] Yoneda K., Morii T., Nieda M., Tsukaguchi N., Amano I., Tanaka H., Yagi H., Narita N., Kimura H.: The peripheral blood V $\alpha$ 24+ NKT cell numbers decrease in patients with haematopoietic malignancy. *Leuk. Res.*, 2005; 29: 147–152