Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Ocena wybranych parametrów subpopulacji komórek szpiku metodą cytometrii przepływowej oraz analiza ich wartości predykcyjnej i rokowniczej u chorych na zespoły mielodysplastyczne.

Lek. Maciej Majcherek
Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Promotor: dr hab. Anna Czyż

Poznań, 2018

Szczególne podziękowania dla:

Pani dr hab. Anny Czyż za zaangażowanie, cierpliwość
i życzliwość okazaną podczas powstawania tej pracy

Pań mgr Jolanty Parulskiej i mgr Anny Mierzwy
za zaangażowanie i wielką pracę,
bez której to opracowanie nie byłoby możliwe

Pana prof. dr hab. Grzegorzowi Dworackiemu
oraz Pracowników Katedry i Zakładu Immunologii
za wieloletnią owocną współpracę

Poniższą pracę dedykuję kobietom mojego życia:
Babci Zosi w podziękowaniu za wszystkie lekcje życia, które od niej otrzymałem
Mamie Ewie za wsparcie w dobrych i trudnych chwilach
Żonie Paulinie za wielką pomoc, której doświadczam każdego dnia
Córeczce Marysi za bycie źródłem ciągłej inspiracji

SPIS TREŚCI

1. Wykaz skrótów użytych w tekście……..….5
2. Wstęp
    2.1 Definicja zespołów mielodysplastycznych……..……..8
    2.2 Epidemiologia i czynniki ryzyka……..…….8
    2.4 Klasyfikacja zespołów mielodysplastycznych……..……9
    2.4 Diagnostyka zespołów mielodysplastycznych……...…….…….……12
    2.5 Cytomeria przepływowa
        2.5.1 Rys historyczny i opis podstaw metody…….……14
        2.5.2 Cytometria przepływowa- zastosowanie kliniczne…….…..…15
        2.5.3 Cytometria przepływowa jako narzędzie diagnostyczne…….…..15
        2.5.4 Cytometria przepływowa- rola w diagnostyce
        „wczesnych” zespołów mielodysplastycznych…...……...16
    2.6 Skale prognostyczne w zespołach mielodysplastycznych……19
    2.7 Leczenie zespołów mielodysplastycznych……...21
3. Cele pracy……..24
4. Materiał i metody……...25
5. Wyniki
    5.1 Charakterystyka grupy badanej……31
    5.2 Zaburzenia fenotypowe i immunofenotypowe oceniane
    wg rekomendacji ELN ..……33
    5.3 Ocena zaburzeń immunofenotypowych szpiku wg cytometrycznej skali
    punktowej ELN……..……35
    5.4 Rozszerzenie cytometrycznej skali punktowej ELN o wybrane
    zaburzenia immunofenotypowe ……36
    5.5 Ocena skal cytometrycznych w grupie „wczesnych”
    zespołów mielodyplastycznych ….……38
    5.6 Korelacja oceny zaburzeń immunofenotypowych szpiku z wartością
    Zmodyfikowanego Międzynarodowego Indeksu Rokowniczego ……41
6. Omówienie wyników
    6.1 Analiza wartości diagnostycznej oceny szpiku metodą cytometrii
    przepływowej……..42
    6.2 Skala punktowa wg ELN…….42

6.3 Rozszerzenia skali punktowej wg ELN……43
6.4 Wartość prognostyczna skal cytometrycznych……43
6.5 Perspektywy kontynuacji badań……...44
7. Dyskusja
7.1 Zaburzenia immunofenotypowe charakteryzujące
zespoły mielodysplastyczne……..45
7.2 Skale cytometryczne w diagnostyce zespołów mielodysplastycznych……47
7.3 Znaczenie prognostyczne badania szpiku metodą cytometrii przepływowej
w zespołach mielodysplastycznych……48
8. Wnioski ……51
9. Streszczenie …..……52
10. Streszczenie w języku angielskim …...……...……54
11. Piśmiennictwo ……56

1. WYKAZ SKRÓTÓW UŻYTYCH W TEKŚCIE

ALL (ang. Acute lymphoblastic leukemia, ALL) - ostra białaczka limfoblastyczna

AML (ang. Acute myeloid leukemia) - ostra białaczka szpikowa

Allo-HSCT (ang. Allogenic hematopoetic stem cell transplantation) - allogeniczne przeszczepienie komórek krwiotwórczych

APC (ang. Allophycocyanin)- allofikocyjanina

APC-Cy7 (ang. 7-cyanine and allophycocyanin conjugate)- koniugat 7-cyjaniny i allofikocyjaniny

ASXL1 (ang. additional sex combs like 1)- dodatkowy grzebień płciowy podobny do 1

CD (ang. cluster of differentiation)- antygen różnicowania komórkowego

CR3 (ang. Complement receptor 3)- 3 receptor dla dopełniacza

CHIP (ang. clonal hematopoiesis of indeterminate potential) - klonalne zaburzenie hematopoezy o nieokreślonym potencjale

DNMT3A [ang. DNA (cytosine-5)- methyltransferase 3A]- metylotransferaza 5- Cytozynowa 3A DNA

ELN (ang. European Leukemia Net) - Europejska Sieć Białaczkowa

EZH2 (ang. Enhancer of zeste homolog 2)- wzmacniacz zeste homologu 2

FcRγIII (ang. Fragment constant receptor gamma III) - receptor III dla łańcucha ciężkiego gamma immunoglobulin

FITC (ang. Fluorescein isothiocyanate)- izotiocyjanek fluoresceiny

FISH (ang. fluorescent in situ hybridization)- fluorescencyjna hybrydyzacja in situ

FSC (ang. Forward-scattered) - rozproszenie światła wzdłuż wiązki lasera

HCT-SCI (ang. Hematopoietic cell transplantation- specific comorbidity index) - wskaźnik chorób współistniejących swoisty dla przeszczepienia komórek krwiotwórczych

HLA-DR (ang. Human Leukocyte Antigen DR) - ludzki antygen leukocytów DR

IPSS (ang. International Prognostic Scoring System) - Międzynarodowy Indeks Rokowniczy

IWG (ang. International Working Group) - Międzynarodowa Grupa Robocza

LPS (ang. Lipopolysaccharide) – lipopolisacharyd

MAC-1 (ang. Macrophage-1 receptor)- 1 receptor makrofagów

MDS (ang. Myelodysplastic sydrome) - zespół mielodysplastyczny

MDS-EB (ang. Myelodysplastic syndrome with excess of blasts)- zespół mielodysplastyczny z nadmiarem blastów

MDS- MLD (ang. Myelodysplastic syndrome with multilineage cytopenia) - zespół mielodysplastyczny z wieloliniową dysplazją

MDS-RS (ang. Myelodysplastic syndrome with ringed sideroblasts) - zespół mielodysplastyczny z syderoblastami pierścieniowatymi

MDS- SLD (ang. Myelodysplastic syndrome with single-lineage dysplasia) - zespół mielodysplastyczny z jednoliniową dysplazją

MDS-U (ang. Myelodysplastic syndrome unclassifiable) - zespół mielodysplastyczny nieklasyfikowalny

MFI (ang. Mean Fluorescent Index) - średni indeks fluorescencji

MRD (ang. minimal residual disease) - minimalna choroba resztkowa

NCCN (ang. National Comprehensive Cancer Network) - Narodowe Centrum Nowotworów

NK (ang. Natural Killers) - naturalni zabójcy

NPV (ang. Negative predictive value) - ujemna wartość predykcyjna

NRM (ang. non-relapse mortality) - śmiertelność nie związana z nawrotem choroby

PBS (ang. Phosphate-buffered saline) - roztwór chlorku sodu buforowanego fosforanami

PE (ang. Phycoerythrin)- Fikoerytryna

PE-Cy7 (ang. Streptavidin)- streptawidyna

PerCP (ang. peridinin-chlorophyll a-protein)- kompleks białek perydyny i chlorofilu

PPV (ang. Positive predictive value) - dodatnia wartość predykcyjna

ROC (ang. receiver operating characteristic curve) - krzywa charakterystyczno-operacyjna odbiornika

RUNX1(ang. Runt-related transcription factor 1)- czynik transkrypcyjny 1 zależny od Runt

R-IPSS- (ang. Revised International Prognostic Scoring System) - Zmodyfikowany Międzynarodowy Indeks Rokowniczy

SF3B1 (ang. Splicing Factor 3b Subunit 1)- podjednostka 1 czynnika splicingowego 3b

SRSF2 (ang. Serine/arginine-rich splicing factor)- czynnik splajsingowy bogaty w serynę i argininę

SSC (ang. Side-scattered) - rozproszenie światła pod kątem 90˚

TET2 (ang. Tet methylcytosine dioxygenase 2)- dioksygenaza metylocytozynowa 2 białka Tet

TP53 (ang. Tumor protein 53)- białko nowotworu 53

U2AF1 (ang. U2 Small nuclear RNA auxillary factor 1)- czynnik pomocniczy 1 małego jąderkowego RNA U2

WPSS (ang World Health Organisation Classification-Based Prognosis Scoring System) - Punktowy System Prognostyczny oparty na klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia

WHO (ang. World Health Organization) - Światowa Organizacja Zdrowia

2. WSTĘP

2.1 Definicja zespołów mielodysplastycznych

Zespoły mielodysplastyczne (ang. myelodysplastic syndrome, MDS) to heterogenna grupa klonalnych chorób nowotworowych układu krwiotwórczego, które charakteryzuje nieefektywna hematopoeza z morfologicznie rozpoznawalnymi zmianami dysplastycznymi. MDS charakteryzuje również wysokie ryzyko transformacji w ostrą białaczkę szpikową. Pomimo szybkiego rozwoju nowych metod diagnostycznych, podstawą rozpoznania pozostaje stwierdzenie obecności zmian dysplastycznych w bogatokomórkowym rozmazie szpiku[1,2]. Diagnostyka różnicowa musi obejmować cytopenię o podłożu niedoborowym, infekcyjnym czy immunologicznym, w których możliwe jest występowanie zmian dysplastycznych w szpiku[3,4]. Dodatkowo u około 10-15% chorych na MDS zmiany dysplastyczne stwierdza się w ubogokomórkowym szpiku. Postacie hipoplastyczne MDS wymagają zwykle różnicowania z niedokrwistością aplastyczną.[5,6] Współcześnie do kryteriów definiujących MDS wg WHO dodaje się występowanie zdefiniowanych zaburzeń histologicznych, cytogenetycznych i molekularnych, natomiast podstawą rozpoznania pozostaje ocena cytomorfologiczna rozmazu szpiku[1].

2.2 Epidemiologia i czynniki ryzyka

Częstość występowania zespołów mielodysplastycznych jest trudna do oszacowania. Według danych pochodzących z rejestrów USA zapadalność mieści się w przedziale 5,1-13,1 na 100 000 populacji i rośnie nawet do 75-162 nowych zachorowań na 100 000 osób rocznie w grupie osób po 65 roku życia. W tych samych statystykach liczba chorych jest oceniana na 60000 do 170000 w populacji amerykańskiej.[7] Podobne dane epidemiologiczne można znaleźć w innych światowych rejestrach.[8–10] Zapadalność wśród mężczyzn jest nieznacznie większa niż wśród kobiet (≈1,7:1). Ważnym zjawiskiem, podkreślanym we wszystkich publikacjach jest wzrost współczynnika zapadalności na MDS. Można to tłumaczyć wieloma przyczynami. Jedną z nich jest większa liczba raportowanych przypadków. Poza tym, dzięki dostępności badań cytogenetycznych, cytometrycznych i molekularnych, znacznie poprawiła się wczesna diagnostyka MDS. Wobec powyższego trudno dokładnie oszacować rzeczywisty wzrost zachorowań na MDS.[11]

W Polsce dane epidemiologiczne wydają się być najbardziej zbliżone do tych pochodzących z Niemiec czy Grecji.[7-12] Podkreśla się, że w Polsce, zapadalność w grupie osób

najstarszych (>80 roku życia) jest mniejsza niż w krajach Europy Zachodniej. Może to wynikać, przynajmniej częściowo z utrudnionego dostępu do diagnostyki oraz krótszego przewidywanego czasu przeżycia w tej grupie w naszym kraju.[12]

Do czynników środowiskowych predysponujących do rozwoju MDS zalicza się przede wszystkim: ekspozycję na benzen, chemioterapię (szczególnie leki alkilujące), radioterapię, dym tytoniowy i inne chemikalia.

Na rozwój zespołów mielodysplastycznych mogą mieć również wpływ dziedziczne aberracje genetyczne.[13,14] Poza tym, do wystąpienia MDS predysponują inne choroby hematologiczne, takie jak nocna napadowa hemoglobinuria, niedokrwistość aplastyczna czy wrodzona neutropenia.[15–17]

2.3 Klasyfikacja zespołów mielodysplastycznych

Aktualnie powszechnie stosuje się klasyfikację opracowaną przez WHO w 2016 roku. Jest ona modyfikacją poprzednich wersji klasyfikacji WHO z 2002 oraz 2008 roku. Omawiania klasyfikacja oraz kryteria diagnostyczne przedstawione zostały w tabeli 1.

Tabela 1. Klasyfikacja i kryteria rozpoznania zespołów mielodysplastycznych wg Światowej Organizacji Zdrowia 2016

Typ MDS	Kryteria rozpoznania
MDS z jednoliniową dysplazją (ang. with single line dysplasia)	≥10% komórek dysplastycznych w 1 linii komórkowej < 15% syderoblastów pierścieniowatych (lub < 5% jeśli obecna mutacja SF3B1) < 5% blastów szpiku i <1% blastów w krwi obwodowej 1-2 cytopenie obwodowe Nieobecne pałeczki Auera Wykluczenie del 5q
MDS z syderoblastami obrączkowatymi (ang. with ringed sideroblasts) - z jednoliniową dysplazją (ang. with single line dysplasia)	≥10% komórek dysplastycznych w 1 linii komórkowej ≥15% syderoblastów pierścieniowatych (lub ≥ 5% jeśli obecna mutacja SF3B1)

- z wieloliniową dysplazją (ang. with multilineage dysplasia)	< 5% blastów szpiku i <1% blastów w krwi obwodowej 1-2 cytopenie obwodowe Nieobecne pałeczki Auera Wykluczenie del 5q ≥10% komórek dysplastycznych w 2-3 liniach komórkowych ≥15% syderoblastów pierścieniowatych (lub ≥ 5% jeśli obecna mutacja SF3B1) < 5% blastów szpiku i <1% blastów we krwi obwodowej 1-3 cytopenie obwodowe Nieobecne pałeczki Auera Wykluczenie del 5q
MDS z wieloliniową dysplazją (ang. with multilineage dysplasia)	≥10% komórek dysplastycznych w 2-3 liniach < 5% blastów szpiku i <1% blastów we krwi obwodowej < 15% syderoblastów pierścieniowatych (lub < 5% jeśli obecna mutacja SF3B1) 1-3 cytopenie obwodowe Nieobecne pałeczki Auera Wykluczenie del 5q
MDS z nadmiarem blastów (ang. with excess of blasts) -MDS- EB1 -MDS- EB2	 Blasty w szpiku 5-9%, w krwi 2-4% bez pałeczek Auera ≥10% komórek dysplastycznych w 0-3 liniach Brak lub obecność syderoblastów pierścieniowatych 1-3 cytopenie obwodowe Blasty w szpiku 10-19%, w krwi 5-19%, lub pałeczki Auera

	≥10% komórek dysplastycznych w 0-3 liniach komórkowych Brak lub obecność syderoblastów pierścieniowatych 1-3 cytopenie obwodowe
MDS z izolowaną delecją 5q- (ang. with isolated del(5q))	≥10% komórek dysplastycznych w 1-3 liniach komórkowych < 5% blastów szpiku i <1% blastów we krwi obwodowej Brak lub obecność syderoblastów pierścieniowatych 1-2 cytopenie obwodowe Nieobecne pałeczki Auera Izolowana delecja 5q (ew. obecna 1 dodatkowa zmiana cytogenetyczna poza -7 lub delecja (7q))
MDS niesklasyfikowany (ang. unclassifiable) -z 1 % blastów w krwi (ang. with 1% blood blasts)	≥10% komórek dysplastycznych w 1-3 liniach Brak lub obecność syderoblastów pierścieniowatych < 5% blastów szpiku i 1% blastów we krwi obwodowej 1-3 cytopenie obwodowe Nieobecne pałeczki Auera
-z jednoliniową dysplazją i pancytopenią. (ang. with single lineage dysplasia and pancytopenia)	≥10% komórek dysplastycznych w 1 linii Brak lub obecność syderoblastów pierścieniowatych < 5% blastów szpiku i <1% blastów we krwi obwodowej 3 cytopenie obwodowe Nieobecne pałeczki Auera

- z występowaniem cytogenetycznych zaburzeń „definiujących” (ang. based on defining cytogenetic abnormality	< 10% komórek dysplastycznych w 1-3 liniach komórkowych < 15% syderoblastów pierścieniowatych < 5% blastów szpiku i <1% blastów we krwi obwodowej 1-3 cytopenie obwodowe Nieobecne pałeczki Auera Zaburzenia cytogenetyczne definiujące MDS (bez kryterium dysplazji)
Nawrotowa cytopenia dziecięca (ang. refractory cytopenia of childhood)	≥10% komórek dysplastycznych w 1-3 liniach komórkowych Brak syderoblastów pierścieniowatych < 5% blastów szpiku i <2% blastów we krwi obwodowej 1-3 cytopenie obwodowe Nieobecne pałeczki Auera

W porównaniu do poprzednich klasyfikacji, w wersji z 2016 roku, w nazwach jednostek termin „oporna niedokrwistość” zastąpiono „zespołem mielodysplastycznym”. Zmiana jest na tyle istotna, że w samej definicji rozważana jest raczej obecność cytopenii z dysplazją jednej lub więcej linii, niż obecność niedokrwistości. Dołączono również molekularne kryterium rozpoznania w postaci mutacji SF3B1 oraz dokładniej opisano kryteria diagnostyczne MDS-U. Wersja z 2008 roku zawiera wykaz zaburzeń cytogenetycznych „definiujących” MDS, które w późniejszych wersjach zostały utrzymane jako aktualne.

2.4 Diagnostyka zespołów mielodysplastycznych

Za rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego kryje się wiele jednostek chorobowych o różnej ciężkości przebiegu i rokowaniu, dlatego trudno jest przedstawić jeden uniwersalny algorytm diagnostyczny. Największym wyzwaniem przy rozpoznaniu MDS pozostaje różnicowanie między cytopenią wywołaną klonalnym zaburzeniem hematopoezy, a spowodowaną innymi przyczynami. Szczególne wyzwanie diagnostyczne stanowią podtypy bez nadmiaru blastów, które mają zwykle łagodny przebieg, często przez długi czas nie dają objawów, poza dyskretnymi zmianami w obrazie morfologii krwi obwodowej.

Ważnym etapem w diagnostyce MDS musi być wykluczenie niedoborowych, infekcyjnych, immunologicznych czy autoimmunologicznych przyczyn cytopenii. Należy jednak pamiętać, że stwierdzenie innych przyczyn cytopenii nie wyklucza współistnienia MDS, ale wymaga osobnego postępowania diagnostycznego i leczenia.

Podstawą rozpoznania zespołu mielodysplastycznego u chorego z cytopenią pozostaje stwierdzenie obecności morfologicznych cech dysplazji w nie mniej niż 10% komórek jednej lub wielu krwiotwórczych linii rozwojowych w rozmazie szpiku.[1] Badania cytomorfologiczne powinny zostać uzupełnione przez wykonanie barwień złogów żelaza w erytroblastach, gdyż stwierdzenie obecności patologicznych syderoblastów stanowi jedno z kryteriów rozpoznania podtypu MDS RS. Istotnym ograniczeniem badania cytomorfologicznego jest subiektywność oceny, co może prowadzić do istotnych rozbieżności diagnostycznych.[18]

Zgodnie z wytycznymi WHO 2016,[1] bardzo ważne, z punktu widzenia diagnostycznego, rokowniczego i terapeutycznego, jest wykonanie badań cytogenetycznych, zarówno metodą klasyczną, jak i metodą FISH. W tabeli 2. wymienione są aberracje chromosomalne, które należy uznać, za „definiujące" zespoły mielodysplastyczne. Oznacza to, że stwierdzenie ich daje podstawy do rozpoznania choroby nawet u pacjenta, który nie spełnia kryteriów morfologicznych. Określenie rodzaju zaburzeń cytogenetycznych jest niezbędne dla określenia ryzyka cytogenetycznego oraz ustalenia wartości Zmodyfikowanego Międzynarodowego Indeksu Rokowniczgo (ang. Revised International Prognostic Scoring System, R-IPSS).[19,20]

Tabela 2. Aberracje chromosomalne definiujące zespoły mielodysplastyczne

Aberracje niezrównoważone	Aberracje zrównoważone
-7 lub del(7q)	t(11;16)(q23;p13.3)
-5 lub del(5q)	t(3;21)(q26.2;q22.1)
i(17q) lub t(17p)	t(1;3)(q36.3;q21.1)
-13 lub del(13q)	t(2;11)(p21;q23)
del(11q)	inv(3)(q21;q26.2)
del(12q) lub t(12p)	t(6;9)(p23,q34)
del(9q)	
idic(X)(q13)	

Coraz istotniejszą rolę w diagnostyce MDS zyskuje biologia molekularna. Aktualnie jedynie mutacja w genie SF3B1 jest kryterium diagnostycznym wymienionym w klasyfikacji WHO 2016. Stwierdzenie jej obecności daje podstawę do rozpoznania podtypu MDS RS, u

pacjentów, u których w szpiku znajduje się 5-15% syderoblastów pierścieniowatych. Z drugiej strony, potwierdzono udział mutacji wielu innych genów w patogenezie MDS.[1] Wśród nich, należy wymienić mutacje w genach TET2, SRSF2, ASXL1, DNMT3A, RUNX1, U2AF1, TP53 i EZH2.[21] W populacji pacjentów z zespołem mielodysplastycznym nawet u 80-90% stwierdza się obecność mutacji mogących mieć związek z chorobą. Niestety, rozpoznanie MDS na podstawie obecności zaburzeń molekularnych utrudnia fakt występowania tych samych nieprawidłowości w populacji osób bez cytopenii, szczególnie u osób starszych. Zjawisko takie nazywa się „klonalnym zaburzeniem hematopoezy o nieznanym potencjale" (ang. clonal hematopoiesis of indeterminate potential; CHIP). W populacji osób między 70-79 rokiem życia, u 9,5%, stwierdzono obecność CHIP[22]. Ze względu na stosunkowo długi czas do otrzymania wyniku, wysoką cenę oraz mnogość możliwych oznaczeń, techniki biologii molekularnej pozostają obecnie jedynie dodatkową opcją diagnostyczną.

Jednym z ważniejszych narzędzi uzupełniających diagnostykę MDS jest badanie histopatologiczne trepanobioptatu. Badanie wykonane przez doświadczonego histopatologa, w oparciu o ściśle określone kryteria, może być bardzo czułą (82%) i swoistą (100%) metodą diagnostyczną.[23] Badanie daje możliwość kompleksowej oceny wszystkich populacji komórkowych, architektury szpiku, zmian dysplastycznych, włóknienia, komórek progenitorowych CD34+, czy obecności wewnątrzzatokowej hematopoezy. Dzięki ocenie tak dużej liczby różnych parametrów, wykonanie badania wydaje się aktualnie podstawą dobrej praktyki diagnostycznej. Wadą badania jest jednak subiektywność oceny powyższych parametrów oraz ograniczona liczba doświadczonych histopatologów.[23]

2.5 Cytomeria przepływowa.

2.5.1 Rys historyczny i opis podstaw metody

Pierwsze cytometry przepływowe zostały opatentowane już w latach 60. XX wieku.[24] Zawierały one jeden laser oraz 2 detektory światła, które pozwalały na wykrywanie rozproszenia wiązki laserowej zgodnie z jej kierunkiem (ang. Forward-scattered, FSC) oraz pod kątem 90˚(ang. Side-scattered light, SSC). Parametr FSC związany jest z wielkością komórki, natomiast SSC ze złożonością jej struktury (ziarnistość, pofałdowanie błony komórkowej, zawartość retikulum endoplazmatycznego).

Już w latach 70 zostały one wzbogacone w dodatkowe lasery oraz detektory fluorescencji wzbudzonej na fluorochromach. Dało to również możliwość sortowania komórek na różne populacje[25]. Rewolucyjne okazało się również zastosowanie przeciwciał

monoklonalnych, dzięki którym można oceniać obecność poszczególnych antygenów na powierzchni oraz wewnątrz komórki.

Nowoczesne cytometry przepływowe oprócz wykrywania parametrów fizycznych komórki są w stanie wykryć nawet do 18 różnych antygenów na powierzchni jednej komórki dzięki zastosowaniu 2 lub więcej laserów i wielu różnych fluorochromów, którymi znakowane są przeciwciała. W praktyce klinicznej jednak znacznie częściej stosuje się urządzenia wykrywające 6-8 parametrów. Przy zastosowaniu odpowiednich protokołów badawczych można w sposób bardzo dokładny opisać wiele subpopulacji komórek szpiku, krwi obwodowej czy innych tkanek.

2.5.2 Cytometria przepływowa- zastosowanie kliniczne

Wieloparametryczna cytometria przepływowa jest niezwykle szybko rozwijającą się techniką badania wykorzystywaną szeroko w hematologii. Daje ona możliwość szybkiej oceny bardzo licznych populacji komórkowych. Poza tym, dzięki wykorzystaniu przeciwciał monoklonalnych sprzężonych z barwnikami fluorescencyjnymi oraz użyciu wielu kanałów detekcji, pozwala na ocenę ekspresji dużej liczby antygenów, zarówno na powierzchni jak i wewnątrz jednej komórki. Prowadzi to do tworzenia bardzo dokładnych i szczegółowych opisów immunofenotypu prawidłowych tkanek oraz ich zaburzeń występujących w różnych stanach chorobowych. Wynikiem tego jest również wyróżnianie subpopulacji, które nie mogą być rozróżnione morfologicznie, w związku z czym tworzone są pojęcia, które odnoszą się tylko do cytometrii. Przykładem tego może być tak zwany klaster, czyli zestaw zdarzeń (ang. events) zajmujących podobne miejsce w wielowymiarowej przestrzeni charakteryzującej się podobnym sygnałem bocznego i przedniego rozproszenia światła wiązki laserowej oraz podobnej ekspresji antygenów. Nie odzwierciedla on konkretnej formy rozwojowej czy morfologicznej komórki. Tego typu populacje są opisywane i badane przy rozpoznaniu wielu stanów chorobowych w tym zespołów mielodysplastycznych.

2.5.3 Cytometria przepływowa jako narzędzie diagnostyczne

Dzięki opisanym powyżej właściwościom badanie metodą wieloparametrycznej cytometrii przepływowej stało się podstawowym narzędziem diagnostycznym w wielu chorobach hematologicznych. Typowym przykładem może być ostra białaczka limfoblastyczna (ang. Acute lymphoblastic leukemia, ALL). Klasyfikacja poszczególnych podtypów oparta jest o cytometryczną analizę immunofenotypu komórki nowotworowej[26]. Oznaczenie w okresie remisji hematologicznej tzw. minimalnej choroby resztkowej (ang. minimal residual disease,

MRD), czyli odsetka komórek wykazujących określony nowotworowy fenotyp wśród wszystkich komórek szpiku, jest podstawowym narzędziem wykorzystywanym do oceny odpowiedzi na leczenie, a także wyboru strategii postępowania terapeutycznego w ALL.[27]

Wieloparametryczna cytometria przepływowa jest również powszechnie stosowana w diagnostyce i monitorowaniu zespołów mielodysplastycznych z nadmiarem blastów. Oprócz stwierdzenia zaburzeń cytometrycznych typowych dla MDS, w wielu przypadkach można określić swoisty immunofenotyp mieloblastów wywodzących się z pierwotnej komórki progenitorowej nowotworu. Mogą one wykazać ekspresję antygenów charakterystycznych dla innych linii komórkowych, takich jak CD3, CD19, CD7 czy CD56[28]. Poza tym, mogą wykazywać cechy asynchronicznego dojrzewania i zaburzonego różnicowania, czyli na przykład jednoczesną ekspresję antygenów charakterystycznych dla form wczesnych (np. CD34 czy CD117) oraz markerów, które powinny pojawiać się na późniejszych etapach różnicowania i dojrzewania (np. CD15, CD11b)[29]. Śledzenie odsetka mieloblastów o charakterystycznym immunofenotypie jest również ważnym elementem monitorowania choroby. Ocena morfologiczna rozmazów szpiku po leczeniu, może być bardzo trudna, ze względu na możliwość występowania dysplazji po chemioterapii, obecność regenerujących komórek lub szybko dzielących się komórek linii dojrzewania granulocytów. Dlatego badanie cytometryczne powinno być elementem dobrej praktyki.

2.5.4 Cytometria przepływowa- rola w diagnostyce „wczesnych" zespołów mielodysplastycznych

Pomimo, że zalecenia, zarówno WHO[1], jak i NCCN (ang. National Comprehensive Cancer Network)[30], wymieniają ocenę morfologiczną rozmazu szpiku jako metodę referencyjną, to wykorzystanie cytometrii wydaje się być w codziennej praktyce klinicznej przydatnym narzędziem uzupełniającym proces diagnostyczny.

Obecnie, dużym wyzwaniem pozostaje opracowanie protokołu badania cytometrycznego, który pozwoliłby z wysoką czułością i swoistością na rozpoznanie tzw. „wczesnych" MDS, czyli podtypów MDS-SLD, MDS-MLD, MDS-RS, MDS-U, MDS z del 5q. Już w 2007 roku eksperci NCCN, ELN (European Leukemia Net) oraz IWG (International Working Group) podczas roboczego spotkania w czasie „Working Conference on MDS" przygotowali wytyczne dotyczące standaryzacji badania immunofenotypowego szpiku przy podejrzeniu MDS[31]. W kolejny latach zalecenia ulegały rozbudowie oraz aktualizacji. W 2012 roku ELN przedstawiło obowiązujący do dzisiaj protokół badania cytometrycznego szpiku[32].

Zakłada on ocenę zarówno populacji komórek linii dojrzewania granulocytów i monocytów, jak i limfocytów oraz erytrocytów. Szczegółowy opis parametrów, których ocena jest zalecana podczas takiego badania znajduje się w tabeli 3.

Tabela 3. Szczegółowy opis parametrów fenotypowych i immunofenotypowych ocenianych w szpiku przy podejrzeniu zespołu mielodysplastycznego wg zaleceń European Leukemia Net[32]

Podpopulacja komórek szpiku kostnego	Zalecane analizy	Odchylenie
Mieloidalne komórki progenitorowe	Odsetek wśród komórek jądrzastych szpiku	Zwiększony odsetek
	Ekspresja CD45	Brak/zmniejszona/zwiększona
	Ekspresja CD34	Brak/zmniejszona/zwiększona
	Ekspresja CD117	Brak/zmniejszona/zwiększona
	Ekspresja HLA-DR	Brak/zmniejszona/zwiększona
	Ekspresja CD13 i CD33	Brak/zmniejszona/zwiększona
	Asynchronia ekspresji CD11b i CD15	Obecność markerów dojrzałości
	Ekspresja CD5, CD7, CD19, CD56	Obecność markerów innej linii
Dojrzewające neutrofile	Odsetek komórek w odniesieniu do limfocytów	Zmniejszony
	SSC jako stosunek do SSC limfocytów	Zmniejszony
	Ekspresja CD13 wobec CD11b	Zmieniony wzór
	Ekspresja CD13 wobec CD16	Zmieniony wzór
	Ekspresja CD15 wobec CD10	Zmieniony wzór- np. brak ekspresji CD10
Monocyty	Odsetek komórek	Zwiększony/Zmniejszony
	Rozdział stadiów dojrzewania	Przesunięcie w kierunku niedojrzałych
	Ekspresja CD11b wobec HLA-DR	Zmieniony wzór

	Ekspresja CD14 wobec CD36	Zmieniony wzór
	Ekspresja CD13 i CD33	Homogennie zwiększona/zmniejszona ekspresja
	Ekspresja CD56	Obecność markerów innej linii
Progenitory limfocytów B	Liczone jako odsetek wśród wszystkich komórek CD34+ w oparciu o ocenę CD34/CD45/SSC w kombinacji z CD10 lub CD19	Zmniejszony/brak
Komórki erytropoezy	Odsetek komórek jądrzastych erytropoezy	Zwiększony
	Ekspresja CD71 wobec CD235a	Zmieniony wzór
	Ekspresja CD71	Zmniejszona
	Ekspresja CD36	Zmniejszona
	Odsetek komórek CD117 dodatnich prekursorów	Zwiększony

Pomimo, że dokładna ocena immunofenotypowa szpiku przy podejrzeniu MDS wg ELN 2012 jest cennym badaniem uzupełniającym, to wymaga ona wykonania bardzo wielu oznaczeń. W związku z tym badanie staje się czasochłonne i drogie. Dodatkowo może być przeprowadzone jedynie przez dobrze przygotowany i doświadczony zespół analityków. Z tego powodu trwają prace nad przygotowaniem uproszczonej skali cytometrycznej, która w sposób prosty i tani pozwoli na rozpoznanie MDS z dużą czułością i swoistością.

W 2009 roku opublikowano wyniki prac zespołu Ogaty i wsp. Autorzy przedstawili skalę punktową, która wymaga oceny jedynie 4 parametrów w badaniu metodą cytometrii przepływowej i charakteryzuje się 69% czułością oraz 92% specyficznością w rozpoznawaniu MDS.[33] Protokół badania, zakłada wykorzystanie jedynie trzech przeciwciał monoklonalnych oraz ocenę 4 prostych parametrów, które stanowią częste odchylenia występujące w MDS. W

roku 2012 zespół ekspertów ELN udowodnił, że zastosowanie podobnych parametrów oraz użycie tylko 2 przeciwciał monoklonalnych może dać podobne wyniki (czułość 70%, specyficzność 93%).[34] Dzięki obiektywizacji wszystkich parametrów, wynik liczbowy skali nie zależy od warunków badania, rodzaju i ustawień cytometru przepływowego oraz zastosowanych przeciwciał i sprzężonych fluorochromów. Ponadto jedynie w nieznacznym stopniu zależy od subiektywnej oceny osoby badającej.

W związku z tym, ocena cytometryczna preparatu szpiku przy użyciu skal parametrycznych, może stać się ważnym narzędziem diagnostycznym w rozpoznawaniu zespołów MDS, również tzw. „wczesnych" postaci.

2.6 Skale prognostyczne w zespołach mielodysplastycznych

W związku ze zróżnicowanym przebiegiem klinicznym MDS, ocena rokowania stanowi kluczowy etap postępowania po ustaleniu rozpoznania, niezbędny dla przygotowania optymalnej dla chorego strategii terapeutycznej. W związku z tym, powstało wiele narzędzi ułatwiających kwalifikację chorych do grup ryzyka. Już w 1997 roku został wprowadzony prosty i cenny klinicznie Międzynarodowy Indeks Rokowniczy (IPSS, International Scoring System)[20]. Pozwala on na oszacowanie czasu przeżycia oraz czasu do progresji do ostrej białaczki szpikowej (ang. acute myeloid leukemia, AML) na podstawie liczby cytopenii, obecności zaburzeń chromosomalnych oraz odsetka blastów w rozmazie szpiku. Na podstawie IPSS chory stratyfikowani są do 4 grup ryzyka: niskiego, pośredniego I, pośredniego II oraz wysokiego. W 2012 roku zmodyfikowano ten wskaźnik poprzez wprowadzenie do modelu nasilenia poszczególnych cytopenii. Utworzono Międzynarodowy Zmodyfikowany Indeks Rokowniczy (R-IPSS), na podstawie którego wyróżniono 5 grup ryzyka: bardzo niskiego, niskiego, pośredniego, wysokiego oraz bardzo wysokiego. Sposób przyznawania punktów wg R-IPSS przedstawiono w tabeli 4.[35]

Tabela 4. Wartości liczbowe przyznawane zaburzeniom ocenianym wg Zmodyfikowanego Międzynarodowego Indeksu Rokowniczego[35]

Wynik							
Wartość prognostyczna	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Ryzyko cytogenetyczne	Bardzo niskie	-	Niskie	-	Pośrednie	Wysokie	Bardzo wysokie
Odsetek mieloblastów w szpiku (w%)	<2	-	>2-≤5	-	>5-10	>10	-
Hemoglobina (g/dl)	≥10	-	≥8-<10	<8	-	-	-
Płytki (G/L)	≥100	50-100	<50	-	-	-	-
Neutrofile(G/l)	≥0,8	<0,8	-	-	-	-	-

Po zsumowaniu wyniku poszczególnych parametrów, ocenianych w klasyfikacji R-IPSS, otrzymujemy wynik, który kategoryzuje pacjenta do jednej z grup ryzyka. Sposób kategoryzacji znajduje się w tabeli 5.

Tabela 5. Klasyfikacja do grup ryzyka, wg Zmodyfikowanego Międzynarodowego Indeksu Rokowniczego

Kategoria rokowania	Wynik R-IPSS
Bardzo niskie	≤1,5
Niskie	>1,5-3
Pośrednie	>3-4,5
Wysokie	>4,5-6
Bardzo wysokie	>6

Jak łatwo zauważyć, czynnikiem najsilniej wpływającym na wartość R-IPSS, jest obecność określonych zaburzeń cytogenetycznych. Wykaz zaburzeń ocenianych przy rozpoznaniu MDS, wraz z kwalifikacją do grupy ryzyka, znajduje się w tabeli 6.

Tabela 6. Kategorie ryzyka cytogenetycznego w MDS, wraz z definicją zaburzeń oraz średnim czasem przeżycia w poszczególnych grupach.

Grupa ryzyka cytogenetycznego	Zaburzenia cytogenetyczne	Mediana czasu przeżycia (w latach)
Bardzo niskie	−Y, del(11q)	5,4
Niskie	Kariotyp prawidłowy, del(5q), del(12p), del(20q), podwójne zaburzenie zawierające del(5q)	4,8
Pośrednie	del(7q), +8, +19, i(17q), każde inne pojedyncze lub podwójne niezależne zaburzenie	2,7
Wysokie	−7, inv(3)/t(3q)/del(3q), podwójne zawierające−7/del(7q), Złożony z 3 zaburzeń	1,5
Bardzo wysokie	Złożony: > 3 zaburzenia	0,7

Charakterystyczną cechą zespołów mielodysplastycznych jest ryzyko transformacji do AML. Transformacja taka, w sposób bardzo istotny pogarsza rokowanie oraz przeżycie chorych na MDS[36]. R-IPSS pozwala oszacować, oprócz czasu przeżycia, również to ryzyko. Parametrem opisującym takie zagrożenie jest czas, w którym, u 25% pacjentów w danej grupie prognostycznej, rozwinie się AML.

2.7 Leczenie zespołów mielodysplastycznych

Leczenie chorych na zespoły mielodysplastyczne można podzielić na zachowawcze, którego głównym celem jest zniesienie lub zmniejszenie nasilenia objawów klinicznych choroby oraz intensywne, ukierunkowane na wyleczenie chorego. Wybór strategii postępowania zależy przede wszystkim od wieku chorego, chorób współistniejących oraz ryzyka progresji choroby szacowanym zwykle za pomocą R-IPSS. Leczenie intensywne opiera się na transplantacji allogenicznych krwiotwórczych komórek krwiotwórczych(ang. allogeneic hematopoietic stem cel transplantation, allo-HSCT).[37] U chorych z podtypem MDS EB2 kwalifikujących się do alloHSCT przed przeszczepieniem podejmuje się zwykle próbę redukcji odsetka nowotworowych mieloblastów za pomocą programów chemioterapii indukujących remisję, podobnych do stosowanych w AML. W wybranych grupach, takich jak starsi chorzy lub chorzy z poważnymi chorobami współistniejącymi w celu uzyskania normalizacji odsetka blastów w szpiku przed transplantacją można również rozważyć zastosowanie leków demetylujących.[38]

Allo-HSCT zgodnie z aktualną wiedzą jest jedyną opcją terapeutyczną pozwalającą na

wyleczenie chorego. Procedura ta wiąże się jednak z istotnym ryzykiem ciężkich powikłań, a także zgonu[39]. Do oceny ryzyka związanego ze stanem pacjenta stosuje się wskaźnik chorób współistniejących swoisty dla przeszczepienia komórek krwiotwórczych HCT-SCI (ang. Hematopoietic cell transplantation -specific comorbidity index). Wskaźnik ten obliczany jest na podstawie oceny wydolności i funkcji wielu narządów, a także współwystępowania innych chorób. Pozwala on na oszacowanie ryzyka śmiertelności niezwiązanej z nawrotem choroby (ang. non-relapse mortality, NRM). Ryzyko NRM w grupach ryzyka niskiego, pośredniego i wysokiego, wg HCT-SCI, wynosi odpowiednio 14%, 21% i 41% po 2 latach.[40] W przypadku pośredniego lub wysokiego ryzyka NRM, a także u chorych w starszym wieku, transplantację przeprowadza się zwykle z przygotowaniem (inaczej kondycjonowaniem) niemieloablacyjnym, które charakteryzuje mniejsza toksyczność od kondycjonowania mieloablacyjnego stosowanego zwykle u młodszych chorych, z wysokim R-IPSS i niskim HCT-SCI. [37,41]

Leczenie zachowawcze znajduje zastosowanie u starszych chorych lub chorych z wysokim HCT-SCI, którzy nie mogą być zakwalifikowani się do alloHSCT. Wybór metod leczenia zachowawczego wg NCCN i ELN zależy od rodzaju i nasilenia cytopenii, obecności określonych zaburzeń cytogenetycznych, stężenia erytropoetyny, odsetka blastów w rozmazie szpiku i innych czynników.[30,42] Podstawowymi objawami zespołów mielodysplastycznych są dolegliwości związane z występowaniem niedokrwistości, małopłytkowości lub leukopenii[43]. W związku z tym główną metodą leczenia zachowawczego pozostają przetoczenia koncentratów krwinkowych. Warto jednak pamiętać, że takie postępowanie wiąże się z ryzykiem między innymi przeniesienia infekcji, immunizacji, przeciążenia żelazem, dlatego przetoczenia należy ograniczyć do minimum, a w razie konieczności stosować preparaty ubogoleukocytarne[44]. W grupie pacjentów bardzo niskiego, niskiego lub pośredniego ryzyka z delecją 5q i niedokrwistością, bez istotnej neutropenii i małopłytkowości należy zastosować lenalidomid. W badaniu rejestracyjnym wykazano, że 67% pacjentów leczonych lenalidomidem uzyskało uniezależnienie od przetoczeń, a mediana czasu trwania odpowiedzi wynosiła 44 miesiące.[45] W razie braku lub utraty odpowiedzi na leczenie, u pacjentów z niskim stężeniem erytropoetyny (<500mU/ml), należy rozważyć zastosowanie związków stymulujących erytropoezę, które można kojarzyć z czynnikami wzrostu kolonii granulocytów. Taki schemat może być również skuteczny u pacjentów bez delecji 5q-.[46,47]

W grupie pacjentów z wysokim i bardzo wysokim ryzykiem wg R-IPSS niekwalifikujących się do alloHSCT oraz u pacjentów z niskim, bardzo niskim i pośrednim

ryzykiem, którzy nie odpowiedzieli lub utracili odpowiedź na poprzednie linie leczenia, należy rozważyć zastosowanie leków demetylujących. Wśród nich najczęściej stosowana jest azacytydyna. W badaniu rejestracyjnym odpowiedź całkowitą lub częściową uzyskano u 16,2% chorych leczonych azacytydyną. W grupie kontrolnej natomiast żaden pacjent nie uzyskał odpowiedzi. Mediana czasu trwania odpowiedzi na leczenie wynosił 330 dni.[48]

3. CELE PRACY

Celem pracy doktorskiej było:

a. Określenie przydatności wykrywania zaburzeń fenotypowych i immunofenotypowych komórek linii dojrzewania granulocytów i monocytów metodą wieloparametrowej cytometrii przepływowej w diagnostyce zespołów mielodysplastycznych.

b. Ocena wartości diagnostycznej punktowej skali cytometrycznej opracowanej przez European Leukemia Net (ELN)[34], opisującej ilościowo zaburzenia obrazu cytometrycznego szpiku występujące w zespołach MDS.

c. Porównanie wartości predykcyjnych, czułości oraz swoistości wybranych zaburzeń fenotypowych i immunofenotypowych w diagnostyce MDS wykrywanych zgodnie z rekomendacjami ELN[32].

d. Poszukiwanie zależności między wartością Międzynarodowego Zmodyfikowanego Indeksu Rokowniczego (R-IPSS, Revised International Prognostic Scoring System), a nasileniem zaburzeń fenotypowych i immunofenotypowych szpiku, wyrażanym ilościowo w punktowych skalach cytometrycznych.

4. MATERIAŁ I METODY

Badanie o charakterze retrospektywnym zostało pozytywnie zaopiniowane przez Komisję Bioetyczną, pracującą przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Do grupy badanej włączono chorych diagnozowanych w Katedrze i Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w latach 2008-2017 z powodu jedno- lub wieloliniowej cytopenii, u których w oparciu o przeprowadzone badanie cytomorfologiczne, histopatologiczne i cytogenetyczne szpiku ustalono ostatecznie rozpoznanie zespołu mielodysplastycznego zgodnie z klasyfikacją WHO z 2008 roku[49], zmodyfikowaną w 2016 roku.[1] Dodatkowym badaniem uzupełniającym, rutynowo wykonywanym w Katedrze i Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu u chorych z podejrzeniem MDS od 2008 roku, było badanie immunofenotypowe szpiku metodą wieloparametrowej cytometrii przepływowej. Grupę porównawczą stanowili chorzy diagnozowani w tym samym okresie z powodu jedno- lub wieloliniowej cytopenii, u których postawiono podejrzenie MDS i z tego powodu wykonano badanie cytomorfologiczne, histopatologiczne oraz cytometryczne szpiku, a ostatecznie, na podstawie przeprowadzonych badań, ustalono inne niż MDS rozpoznanie. Z badania wyłączono pacjentów diagnozowanych w okresie cytopenii indukowanej chemioterapią, która wystąpiła w czasie spodziewanej mielosupresji wywołanej lekami cytostatycznymi. W oparciu o analizę dokumentacji medycznej chorych włączonych do badania, pozyskano dane demograficzne, kliniczne i laboratoryjne, takie jak: wiek, płeć, ostateczne rozpoznanie, data ustalenia rozpoznania, choroby współistniejące, wyjściowe stężenie hemoglobiny, liczba erytrocytów, płytek krwi, leukocytów i retikulocytów w krwi obwodowej, stężenie żelaza, ferrytyny, witaminy B12 oraz odsetek mieloblastów i syderoblastów w preparatach cytomorfologicznych szpiku.

W obu grupach zastosowano te same kryteria dla stwierdzenia cytopenii:

(i) niedokrwistość, jeśli stężenie hemoglobiny wynosiło poniżej 8 mmol/l;
(ii) małopłytkowość, jeśli liczba płytek wynosiła poniżej 150 G/l;
(iii) leukopenia, jeśli liczba leukocytów wynosiła poniżej 4 G/l;

U chorych na MDS dodatkowo ustalono podtyp wg klasyfikacji WHO, wartość IPSS, R-IPSS, oraz zgromadzono dane dotyczące sposobów leczenia, przetoczeń preparatów krwiopochodnych, progresji choroby i zgonu chorego.

Badanie immunofenotypowe szpiku wykonywano w Pracowni Cytometrii Przepływowej Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej Katedry i Kliniki Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Wszystkie oznaczenia wykonywane były na cytometrze przepływowym BD Calibur lub Canto II, a obrazy analizowane z zastosowaniem oprogramowania Diva 2.0. Procedura preparatyki próbek oraz barwienia przeciwciałami monoklonalnymi była zgodna ze standardowymi procedurami obowiązującymi w Laboratorium. W skrócie, próbki szpiku były pobierane z kolca górnego tylnego talerza biodrowego oraz dostarczone do laboratorium w ciągu godziny od pobrania. Do 100 ul szpiku dodano mysie przeciwciała monoklonalne związane z barwinkami fluorescencyjnymi skierowane przeciw ludzkim antygenom w ilości zalecanej przez producenta, wg paneli zawartych w tabeli 7.

Tabela 7. Panele przeciwciał stosowanych w diagnostyce MDS

	FITC	PE	PerCP	APC	PE-Cy-7	APC-Cy7
Panel 1	CD45	CD13	CD16	CD5	CD19	CD14
Panel 2	CD7	CD 56	CD45	CD33	CD117	CD14
Panel 3	CD15	CD11b	CD45	HLA-DR	CD34	CD14
Panel 4	CD64	CD11b	CD16	CD45	CD13	CD14
Panel 5	CD65	CD2	CD45	CD36	CD10	CD14

Próbki szpiku inkubowano z przeciwciałami przez 15 minut w temperaturze pokojowej w zacienionym miejscu. Następnie dokonano lizy komórek linii dojrzewania erytrocytów roztworem do lizy IOTest3 firmy Becmann-Coulter. Kolejnym krokiem było dwukrotne płukanie roztworem chlorku sodu buforowanego fosforanami (ang. Phosphate-buffered saline, PBS) z wirowaniem 2000 obrotów/min przez 4 minuty. Próbki były poddawane analizie bezpośrednio po przygotowaniu.

Badanie wykonywano w oparciu o obowiązujące międzynarodowe rekomendacje, aktualizowane kilkakrotnie w latach 2007-2017:

- rekomendacje ustalone przez ekspertów US National Comprehensive Cancer Network, European LeukemiaNet oraz International Working Group w czasie Working Conference on MDS w 2007 roku[31];
- standaryzacja European LeukemiaNet 2009[50];
- standaryzacja European LeukemiaNet 2012[32].

W ramach standardowo wykonywanej diagnostyki cytometrycznej analizowano odsetek mieloidalnych komórek prekursorowych, a także parametry fenotypowe i ekspresję antygenów na komórkach linii dojrzewania granulocytarnego oraz monocytarnego.

Zgodnie z zaleceniami European LeukemiaNet z roku 2009[50], zmodyfikowanymi w roku 2012[32], oceniano obecność następujących zaburzeń:

(i) zaburzenia ziarnistości granulocytów;
(ii) zaburzenia ekspresji CD13 wobec CD16 na komórkach linii dojrzewania granulocytarnego;
(iii) zaburzenia ekspresji CD33 wobec CD117 na komórkach linii dojrzewania granulocytarnego;
(iv) ekspresję CD34 na komórkach linii dojrzewania granulocytarnego;
(v) zaburzenia ekspresji CD11b wobec HLA-DR linii dojrzewania granulocytarnego;
(vi) zaburzenia ekspresji CD11b wobec CD13 na komórkach linii dojrzewania granulocytarnego;
(vii) zaburzenia ekspresji CD15 wobec CD34 na komórkach linii dojrzewania granulocytarnego;
(viii) ekspresję CD56 na komórkach linii dojrzewania granulocytarnego;
(ix) ekspresję CD14 na komórkach linii dojrzewania granulocytarnego;
(x) ekspresję CD56 na komórkach linii dojrzewania monocytów;
(xi) ekspresję CD34 na komórkach linii dojrzewania monocytów;
(xii) brak ekspresji CD14 na komórkach linii dojrzewania monocytów;
(xiii) brak ekspresji CD16 na komórkach linii dojrzewania monocytów.

Na podstawie analizy dokumentacji medycznej i retrospektywnej weryfikacji stwierdzonych zaburzeń obrazu cytometrycznego szpiku, nadawano każdemu ze stwierdzonych zaburzeń wagę 1, a przy ich braku wagę 0. Sumaryczna wartość liczbowa zaburzeń immunofenotypowych stanowiła sumę wag poszczególnych parametrów.

Dodatkowo, przeprowadzono retrospektywną analizę obrazów cytometrycznych szpiku, w celu opisu zaburzeń szpiku wg skali punktowej ELN[34]. Ocena zaburzeń cytometrycznych szpiku wg tej skali zakłada analizę czterech parametrów:

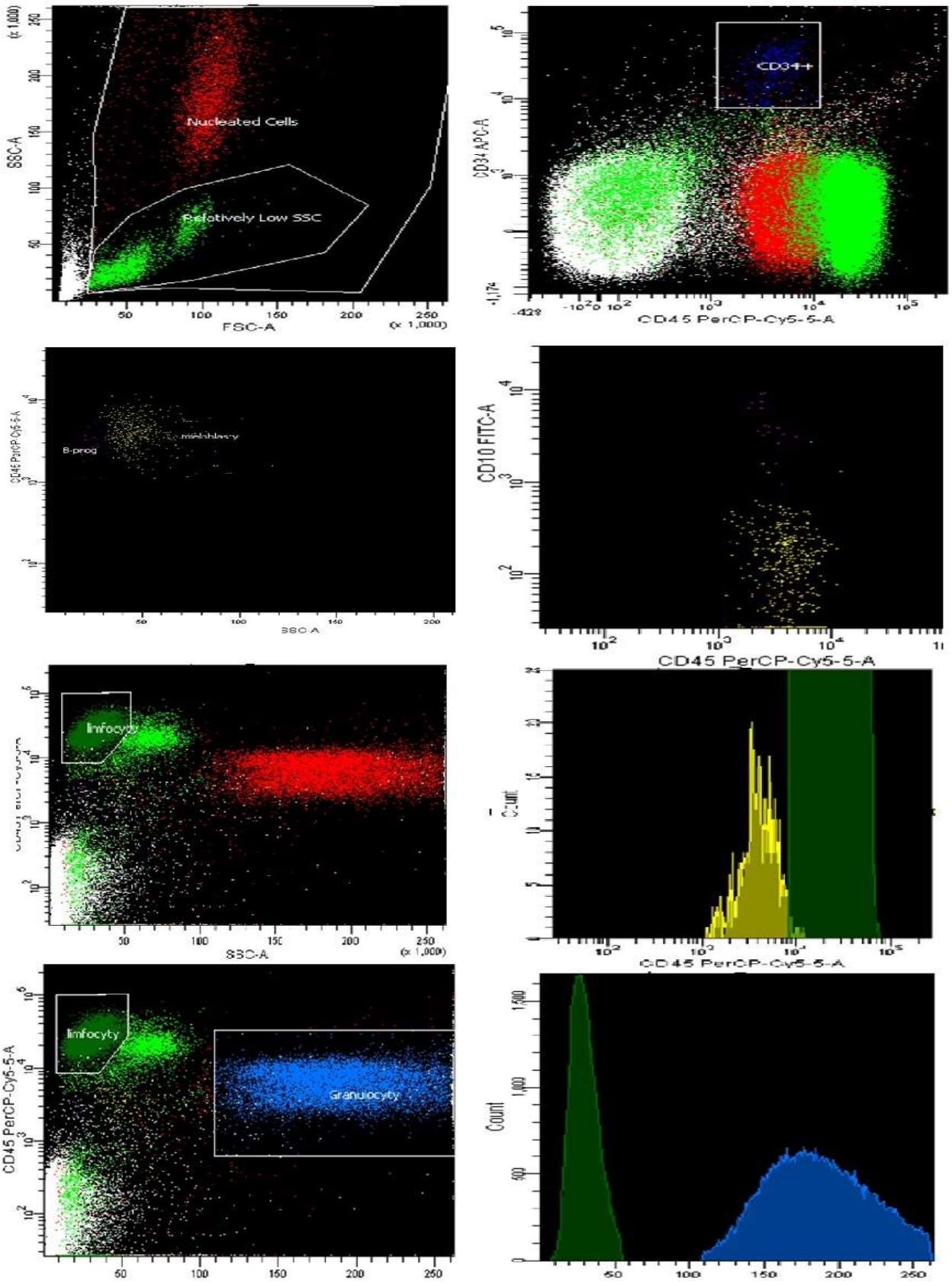
(i) odsetka komórek w „klasterze" mieloblastów wśród wszystkich komórek posiadających jądro;

(ii) odsetka komórek w „klasterze” dla komórek B-progenitorowych wśród komórek CD34+;

(iii) stosunku średniej intensywności fluorescencji CD45 limfocytów do mieloblastów;

(iv) stosunku najwyższego sygnału rozproszenia bocznego (SSC) granulocytów do najwyższego SSC limfocytów.

Jeśli wartość liczbowa przypisana odpowiedniemu parametrowi znajduje się poniżej lub powyżej wartości odcięcia przedstawionej w tabeli 8., przyznaje się jeden punkt w skali ELN. Sposób bramkowania parametrów wchodzących w skład skali ELN wskazano na rycinie 1. Wartości referencyjne dla wskazanych parametrów, znajdują się w tabeli 8.



Rycina 1. Sposób bramkowania populacji komórkowych w skali ELN

Tabela 8. Wartości odcięcia poszczególnych parametrów skali punktowej wg ELN

Parametr cytometryczy	Wartość odcięcia	Waga
Odsetek mieloblastów (i)	≥ 2%	1
Odsetek komórek B-progenitorowych (ii)	<5%	1
Stosunek średniego indeksu fluorescencji (ang. Mean Fluorescent Index, MFI) CD45 limfocytów do mieloblastów (iii)	≤4 lub ≥7,5	1
Stosunek najwyższego SSC granulocytów do limfocytów (iv)	≤ 6	1

Analizy statystyczne przeprowadzone były z użyciem pakietów statystycznych SPSS v 13.0 i STATISTICA v 12.0. Hipotezy statystyczne weryfikowano na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Zakładano, że różnice między badanymi grupami są istotne statystycznie, jeżeli wartości p, wyliczane z testów statystycznych były mniejsze od przyjętego poziomu istotności ($p< \alpha$):

- Dla porównania między dwoma grupami zmiennych wyrażonych w skalach porządkowych i interwałowych, używano testu nieparametrycznego U Manna-Whitneya; analizując różnice między większą liczbą grup stosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa.
- Do wykazania różnic między grupami w rozkładzie zmiennych jakościowych i porządkowych, wykorzystano test chi kwadrat Pearsona lub dokładny test Fishera.
- Analizę zależności między zmiennymi porządkowymi i interwałowymi przeprowadzono z użyciem testu korelacji rang Spearmana.

Wyznaczono czułość i swoistość poszczególnych skal oraz ich wartość predykcyjną dodatnią (ang. Positive Predictive Value, PPV) oraz ujemną (ang. Negative Predictive Value, NPV).

W celu ustalenia wartości odcięcia dla liczby zaburzeń cytometrycznych różnicujących porównywane grupy, stosowano analizę krzywej charakterystyczno-operacyjnej odbiornika (ang. receiver operating characteristic curve, ROC). Termin krzywa ROC wywodzi się z teorii detekcji sygnałów, a krzywa jest graficzną reprezentacją efektywności modelu predykcyjnego.

5. WYNIKI

5.1 Charakterystyka chorych

Do badania włączono 71 chorych z jedno- lub wieloliniową cytopenią diagnozowanych w Katedrze i Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w latach 2007-2017, u których w oparciu o przeprowadzone badanie cytomorfologiczne, histopatologiczne i cytogenetyczne szpiku ustalono rozpoznanie zespołu mielodysplastycznego. Kobiety stanowiły 39% (28/71), a mężczyźni 61% (43/71) grupy badanej. Wiek chorych w grupie badanej mieścił się w przedziale 24-86 lat (mediana 66 lat), natomiast liczba cytopenii w zakresie 1-3 (mediana 2). U 32% (23/71) pacjentów stwierdzono jednoliniową, u 27% (19/71) dwuliniową, a u 41% (29/71) trójliniową cytopenię. Szczegółowe rozpoznania podtypu MDS przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Szczegółowe rozpoznania podtypów zespołów mielodysplastycznych w grupie badanej wg zaleceń Światowej Organizacji Zdrowia 2016

Typ MDS	Liczba chorych
z jednoliniową dysplazją (MDS-SLD, MDS with single-line dysplasia)	25% (18/71)
z wieloliniową dysplazją (MDS-MLD, MDS with multilineage dysplasia),	21% (15/71)
z syderoblastami pierścieniowatymi (MDS-RS, MDS with ringed sideroblasts)	4% (3/71)
niesklasyfikowany (MDS-U, MDS unclassifiable)	4% (3/71)
z izolowaną delecją 5q (MDS with isolated 5q)	1% (1/71)
z nadmiarem blastów typ 1 (MDS EB1, MDS with excess blasts 1)	18% (13/71)
z nadmiarem blastów typ 2 (MDS EB2, MDS with excess blasts 2)	25% (18/71)

Po wyłączeniu z grupy badanej pacjentów z podtypami zespołów mielodysplastycznych z nadmiarem blastów (MDS-EB1, MDS-EB2), wyodrębniono podgrupę 40 chorych z tzw. „wczesnym" MDS (MDS-SLD, MDS-MLD, MDS-RS, MDS-U, MDS del5q) w wieku od 19 do 83 lat (mediana 62 lata), wśród których 50% (20/40) stanowiły kobiety. U 53% (21/40) chorych w tej grupie stwierdzano jednoliniową, u 23% (9/40) dwuliniową, a u 25% (10/40) trójliniową cytopenię (mediana liczby cytopenii 1).

Wartości R-IPSS określono na podstawie dokumentacji medycznej u 72% (51/71) chorych. Mediana R-IPSS wyniosła 4,8 (zakres: 0,3-9). U pozostałych 16/71 (23%) nie

określono R-IPSS z powodu braku wyniku badania cytogenetycznego. Stratyfikacja chorych wg grup ryzyka określonych na podstawie R-IPSS przedstawiona została w tabeli 10.

Tabela 10. Podział chorych z grupy badanej wg ryzyka określonego na podstawie Międzynarodowego Zmodyfikowanego Indeksu Prognostycznego[35]

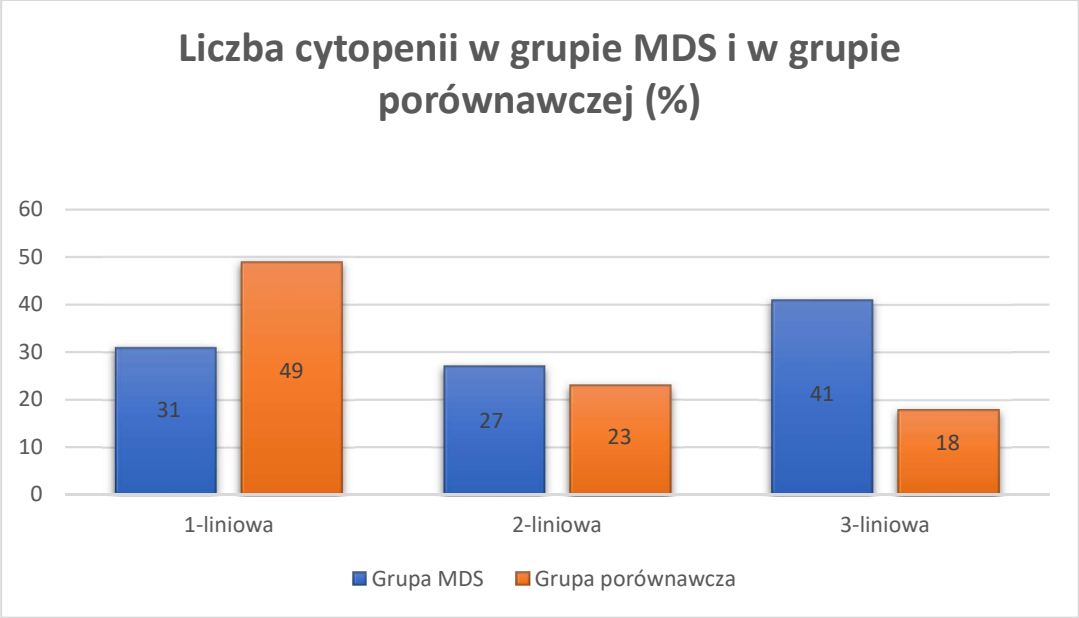
Grupa ryzyka	Wartość R-IPSS	Liczba chorych
Bardzo niskie	<1,5	7
Niskie	>1,5-3	11
Pośrednie	>3-4,5	5
Wysokie	>4,5-6	14
Bardzo wysokie	>6	14

Do grupy porównawczej zakwalifikowano 39 pacjentów diagnozowanych z powodu jedno- lub wieloliniowej cytopenii, u których wykonano cytologiczną, cytometryczną oraz histologiczną szpiku, a ostatecznie postawiono rozpoznanie inne niż MDS. Wiek pacjentów mieścił się w zakresie 21-84 lat (mediana 59 lat). W tej grupie kobiety stanowiły 51% (20/39), a mężczyźni 49% (19/39) chorych. Wskazaniem do wykonania badania cytometrycznego u 49% (19/39) chorych była cytopenia jednoliniowa, u 26% (10/39) dwuliniowa, a u 26% (10/39) trójliniowa (porównanie na wykresie 2). Ostateczne rozpoznania ustalone u chorych w grupie porównawczej, przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11. Rozpoznania ustalone u chorych w grupie porównawczej

Rozpoznanie	Liczba chorych
Cytopenia wywołana stosowaniem leków	12
Niedokrwistość chorób przewlekłych	8
Niedokrwistość z niedoboru wit. B12	7
Niedokrwistość aplastyczna	3
Niedokrwistość autoimmunohemolityczna	2
Niedokrwistość z niedoboru żelaza	2
Inne - **Nocna napadowa hemoglobinuria** - **Zespół antyfosfolipidowy** - **Pierwotna mielofibroza** - **Toczeń układowy** - **Niewyjaśniona przyczyna**	5

Na wykresie 1 przedstawiono porównanie liczby cytopenii w grupie badanej i porównawczej.

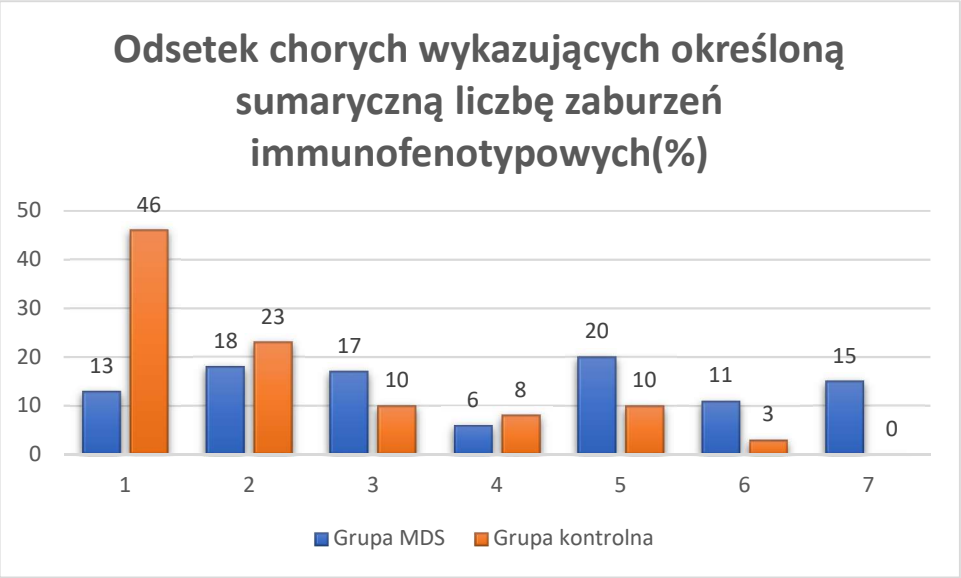


Wykres 1. Porównanie liczby cytopenii w grupie badanej i w grupie porównawczej

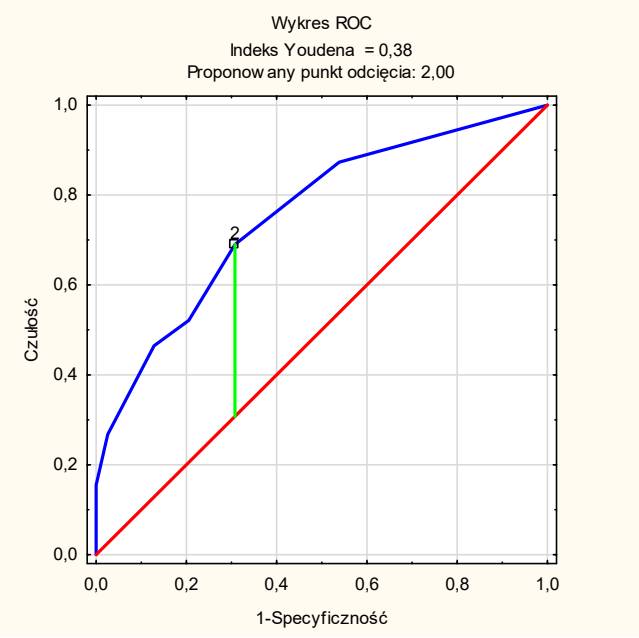
5.2 Zaburzenia fenotypowe i immunofenotypowe oceniane wg rekomendacji ELN

Wykazano znamiennie wyższą liczbę zaburzeń immunofenotypowych komórek linii dojrzewania granulocytów wykrywanych wg rekomendacji ELN w grupie chorych na MDS w porównaniu z grupą porównawczą ($p<0,0001$). Liczba zaburzeń komórek linii dojrzewania monocytów nie różniła się między grupami ($p=0,89$). Sumaryczna liczba zaburzeń immunofenotypowych na komórkach linii dojrzewania granulocytów oraz monocytów w grupie chorych na MDS mieściła się w przedziale od 0 do 7 (mediana 3), natomiast w grupie porównawczej od 0 do 5 (mediana 1). Wykazana różnica mediany sumarycznej liczby zaburzeń komórek linii dojrzewania granulocytów oraz monocytów nie osiągnęła znamienności statystycznej ($p=0,07$). Wartość czułości, swoistości oraz wartości predykcyjnej dodatniej i ujemnej sumarycznej liczby zaburzeń immunofenotypowych dla poszczególnych punktów odcięcia przedstawiono w tabeli 12. Wykres krzywej ROC dla sumarycznej liczby zaburzeń immunofenotypowych znajduje się na rysunku 2.

Wykres 2. Odsetek chorych z sumaryczną liczbą zaburzeń immunofenotypowych w grupie chorych na MDS (kolor niebieski) i w grupie porównawczej (kolor pomarańczowy)



Porównanie odsetka chorych w grupie badanej i grupie porównawczej scharakteryzowanych odpowiednią wartością sumarycznej liczby zaburzeń immunofenotypowych na komórkach linii dojrzewania granulocytarnego i monocytarnego znajduje się na wykresie 2.



Rysunek 2. Wykres krzywej ROC dla sumarycznej liczby zaburzeń immunofenotypowych

Tabela 12. Wyniki czułości, swoistości oraz wartości predykcyjnych sumarycznej liczby zaburzeń immunofenotypowych komórek linii dojrzewania granulocytów i monocytów w zależności od wartości punktu odcięcia

Wartość odcięcia	Czułość	Swoistość	PPV	NPV
>3	46%	87%	0,86	0,42
>2	52%	79%	0,82	0,47
>1	69%	69%	0,8	0,55

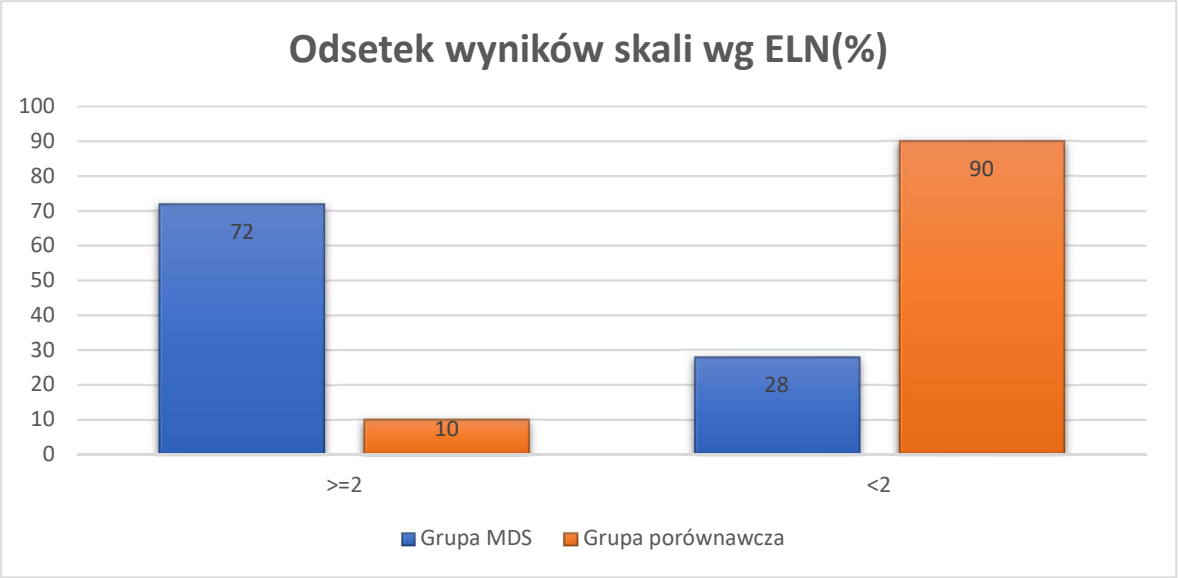
W grupie chorych na MDS znamiennie częściej, w porównaniu z grupą porównawczą, stwierdzono występowanie następujących zaburzeń immunofenotypowych:

(i) zaburzenia ekspresji CD11b wobec HLA-DR na komórkach linii dojrzewania granulocytarnego (p=0,036);
(ii) zaburzenia ekspresji CD11b wobec CD13 na komórkach linii dojrzewania granulocytarnego (p=0,01);
(iii) zaburzenia ekspresji CD15 wobec CD34 na komórkach linii dojrzewania granulocytarnego (p=0,032);
(iv) ekspresji CD56 na komórkach linii dojrzewania monocytów (p=0,02).

Dla pozostałych badanych zaburzeń immunofenotypowych, nie wykazano istotnych statycznie różnic między porównywanymi grupami.

5.3 Ocena zaburzeń immunofenotypowych szpiku wg cytometrycznej skali punktowej ELN

Wykazano znamienną różnicę w nasileniu zaburzeń obrazu cytometrycznego szpiku ocenianego, wg skali punktowej ELN, między grupą chorych na MDS, a grupą porównawczą (p<0,0001). Wyniki liczbowe w grupie badanej znajdowały się w przedziale 0-4 (mediana 3), a w grupie porównawczej 0-3 (mediana 1). Dla wyników w przedziale 2-4, czułość dla rozpoznania MDS wyniosła 73%, swoistość 90%, NPV=0,64, PPV=0,93. Na wykresie 3. przedstawiono odsetek chorych w grupie badanej i w grupie porównawczej z wynikami w przedziałach 0-1 oraz 2-4.



Wykres 3. Odsetek chorych w grupie badanej i w grupie porównawczej z wynikami w przedziałach 0-1 praz 2-4 wg skali punktowej ELN

5.4 Rozszerzenie cytometrycznej skali punktowej ELN o wybrane zaburzenia immunofenotypowe

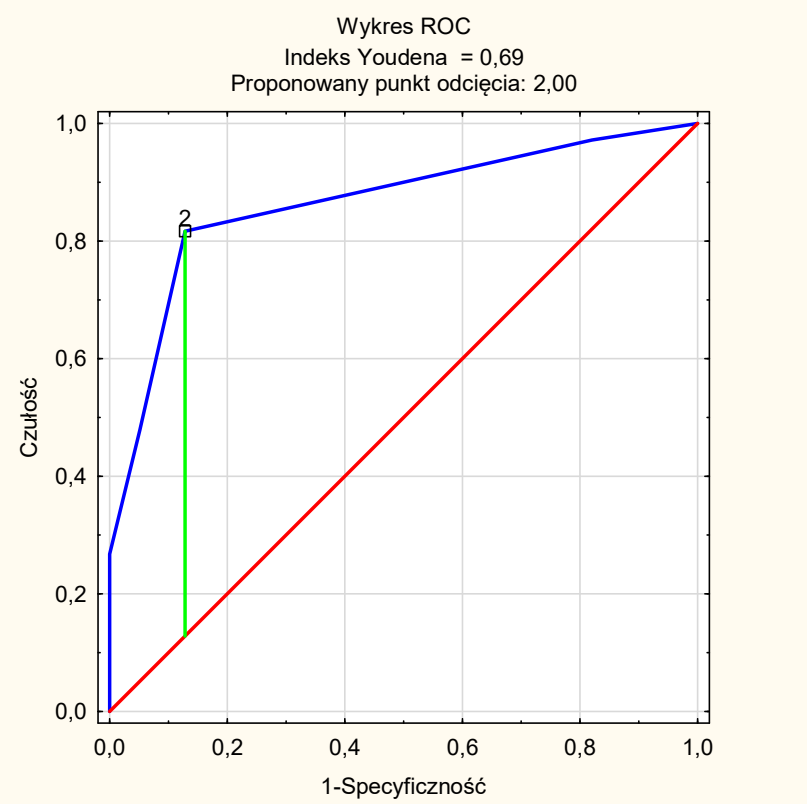
W tabeli 13 przedstawiono porównanie zakresów oraz mediany punktacji w skalach, będących rozszerzeniem skali punktowej wg ELN o zaburzenia immunofenotypowe. W tabeli 7 przedstawiono porównanie swoistości, czułości oraz wartości predykcyjnych wymienionych skal. Największą czułość (83%) w diagnostyce MDS osiągnęła skala wg ELN rozszerzona o wszystkie 4 parametry immunofenotypowe, które różnicują w sposób istotny statystycznie grupę chorych z MDS i grupę porównawczą. Skala ELN, rozszerzona o 2 parametry immunofenotypowe (zaburzenia ekspresji CD 13 wobec CD11b oraz zaburzenia ekspresji CD11b wobec HLA-DR), charakteryzuje się największą swoistością (87%) oraz w niewielkim stopniu ustępuje skali 8-parametrycznej, jeśli chodzi o czułość (82%). Skala ta charakteryzuje się również wysokimi wartościami predykcyjnymi, dlatego została wybrana do analiz korelacji z R-IPSS. Wykres krzywej ROC dla tej skali znajduje się na rysunku 3.

Tabela 13. Zakres oraz mediana wyników skali punktowej wg ELN, rozszerzonej o ocenę wybranych parametrów immunofenotypowych

Rozszerzone skale ELN	Zakres		Mediana	
	Grupa MDS	Grupa porównawcza	Grupa MDS	Grupa porównawcza
Skala ELN (0-4 punktów) plus zaburzenia immunofenotypowe na granulocytach CD11b/HLA-DR (1 pkt) CD11b/CD13 (1 pkt) CD15/CD34 (1 pkt) plus zmniejszenie ekspresji CD14 na monocytach (1 pkt)	0-7	0-3	3	1
Skala ELN (0-4 punktów) plus zaburzenia immunofenotypowe na granulocytach CD11b/HLA-DR (1 pkt) CD11b/CD13 (1 pkt)	0-6	0-3	2	1
Skala ELN (0-4 punktów) plus zaburzenia immunofenotypowe na granulocytach CD11b/HLA-DR (1 pkt) plus zmniejszenie ekspresji CD14 na monocytach (1 pkt)	0-6	0-3	2	1

Tabela 14. Porównanie wartości diagnostycznej skal otrzymanych poprzez rozszerzenie skali punktowej wg ELN o wybrane parametry immunofenotypowe

Rozszerzone skale ELN	Wartość odcięcia	Czułość	Swoistość	PPV	NPV
Skala ELN (0-4 punktów) plus zaburzenia immunofenotypowe na granulocytach CD11b/HLA-DR (1 pkt) CD11b/CD13 (1 pkt) CD15/CD34 (1 pkt) plus zmniejszenie ekspresji CD14 na monocytach (1 pkt)	> 1 pkt	83%	82%	0,89	0,73
Skala ELN (0-4 punktów) plus zaburzenia immunofenotypowe na granulocytach CD11b/HLA-DR (1 pkt) CD11b/CD13 (1 pkt)	> 1 pkt	82%	87%	0,92	0,72
Skala ELN (0-4 punktów) plus zaburzenia immunofenotypowe na granulocytach CD11b/HLA-DR (1 pkt) plus zmniejszenie ekspresji CD14 na monocytach (1 pkt)	> 1 pkt	78%	84%	0,9	0,67



Rysunek 3. Wykres krzywej ROC dla skali ELN rozszerzonej o zaburzenia ekspresji CD11b wobec CD13 oraz CD11 b wobec HLA-DR

5.5 Ocena skal cytometrycznych w grupie „wczesnych" zespołów mielodyplastyczncyh

W grupie chorych z rozpoznaniem „wczesnego" MDS w badaniu cytometrycznym stwierdzano sumarycznie 0-6 zaburzeń immunofenotypowych (mediana 2). Ich liczba była istotnie wyższa ($p<0,0001$) w grupie MDS, niż w grupie porównawczej

Podobnie jak w całej grupie badanej, liczba zaburzeń immunofenotypowych komórek linii dojrzewania granulocytów była wyższa niż w grupie porównawczej ($p<0,0001$). Takiej istotności nie stwierdzono dla zaburzeń immunofenotypowych komórek linii dojrzewania monocytów ($p=0,261$). Porównanie zakresów i median sumarycznej liczby zaburzeń immunofenotypowych oraz skal cytometrycznych dla grupy „wczesnych MDS" i grupy porównawczej przedstawiono w tabeli 15. Natomiast w tabeli 16. znajduje się porównanie ich czułości, swoistości i wartości predykcyjne dodatnie i ujemne w diagnostyce „wczesnych MDS".

Tabela 15. Zakres oraz mediana sumarycznej liczby zaburzeń immunofenotypowych dla "wczesnych" zespołów mielodysplastycznych oraz grupy porównawczej

Rozszerzone skale ELN	Zakres		Mediana	
	„wczesny" MDS	Grupa porównawcza	Wczesny MDS	Grupa porównawcza
Sumaryczna ocena zaburzeń immunofenotypowych zalecanych przez ELN	0-6	0-5	2	1
Skala ELN	0-3	0-3	2	1
Skala ELN (0-4 punktów) plus zaburzenia immunofenotypowe na granulocytach CD11b/HLA-DR (1 pkt) CD11b/CD13 (1 pkt) CD15/CD34 (1 pkt) plus zmniejszenie ekspresji CD14 na monocytach (1 pkt)	0-5	0-3	2	1
Skala ELN (0-4 punktów) plus zaburzenia immunofenotypowe na granulocytach CD11b/HLA-DR (1 pkt) CD11b/CD13 (1 pkt)	0-5	0-3	2	1
Skala ELN (0-4 punktów) plus zaburzenia immunofenotypowe na granulocytach CD11b/HLA-DR (1 pkt) plus zmniejszenie ekspresji CD14 na monocytach (1 pkt)	0-4	0-3	2	1

Tabela 16. Porównanie wartości odcięcia, czułości swoistości oraz wartości predykcyjnych skal cytometrycznych w diagnostyce „wczesnych" zespołów mielodysplastycznych

Rozszerzone skale ELN	Wartość odcięcia	Czułość	Swoistość	PPV	NPV
Sumaryczna liczba zaburzeń immunofenotypowych ocenianych wg zaleceń ELN	>1 pkt	58%	69%	0,66	0,61
Skala punktowa wg ELN	>1 pkt	63%	90%	0,86	0,7
Skala punktowa wg ELN (0-4 punktów) rozszerzona o zaburzenia immunofenotypowe komórek linii dojrzewania granulocytów CD11b/HLA-DR (1 pkt) CD11b/CD13 (1 pkt) CD15/CD34 (1 pkt) oraz zaburzenie ekspresji CD14 na komórkach linii dojrzewania monocytów (1 pkt)	> 1 pkt	73%	82%	0,73	0,82
Skala punktowa wg ELN (0-4 punktów) rozszerzona o zaburzenia immunofenotypowe na komórkach linii dojrzewania granulocytów CD11b/HLA-DR (1 pkt) CD11b/CD13 (1 pkt)	> 1 pkt	70%	87%	0,85	0,74
Skala punktowa wg ELN (0-4 punktów) rozszerzona o zaburzenia immunofenotypowe na komórkach linii dojrzewania granulocytów CD11b/HLA-DR (1 pkt) oraz zaburzenie ekspresji CD14 na komórkach linii dojrzewania monocytów (1 pkt)	> 1 pkt	68%	87%	0,84	0,72

5.6 Korelacja oceny zaburzeń immunofenotypowych szpiku z wartością Zmodyfikowanego Międzynarodowego Indeksu Rokowniczego

Stwierdzono istotną statystycznie dodatnią korelację między wartością R-IPSS a sumaryczną liczbą zaburzeń immunofenotypowych komórek linii dojrzewania granulocytów i monocytów ($p=0,017$).

Stwierdzono istotną statystycznie dodatnią korelację między wartością R-IPSS a nasileniem zaburzeń cytometrycznych określonych liczbowo w skali punktowej ELN ($p=0,027$).

Dodatkowo stwierdzono również istotną statystycznie dodatnią korelację między wartością R-IPSS a wynikiem w skali punktowej ELN rozszerzonej o wybrane zaburzenia immunofenotypowe komórek linii dojrzewania granulocytów, tj. zaburzeń ekspresji CD11b wobec HLA-DR oraz CD11b wobec CD13 ($p<0,001$).

6. OMÓWIENIE WYNIKÓW

6.1 Analiza wartości diagnostycznej oceny szpiku metodą cytometrii przepływowej.

Powszechnie uznane i stosowane zalecenia ELN 2012 zawierają opis zaburzeń fenotypowych i immunofenotypowych, które powinny być oceniane przy podejrzeniu MDS. Niestety, ocena większości tych parametrów pozostaje subiektywna, co powoduje trudności w ustanowieniu cytometrycznych kryteriów rozpoznania. W powyższej pracy podjęto próbę oceny wartości diagnostycznej wybranych zaburzeń komórek linii dojrzewania granulocytów i monocytów w diagnostyce MDS. Nie oceniano zaburzeń występujących na komórkach linii dojrzewania erytrocytów, ze względu na czasochłonność oznaczeń oraz dużą zależność od warunków wykonania badania.

Wykazano, że ocena zaburzeń na komórkach linii dojrzewania granulocytów istotnie różnicuje grupę chorych z MDS oraz grupę porównawczą. Nie wykazano takich różnic dla zaburzeń immunofenotypowych komórek linii dojrzewania monocytów. Przeanalizowano również czułość i swoistość diagnostyczną sumarycznej liczby zaburzeń immunofenotypowych przy różnych punktach odcięcia. Warto podkreślić, iż dla każdego z punktów odcięcia uzyskano wysokie wartości dodatniej wartości predykcyjnej (PPV).

Wyodrębniono 4 zaburzenia immunofenotypowe, które w sposób istotny statystycznie pozwalają na różnicowanie zarówno całej grupy badanej chorych na MDS, jak i chorych z „wczesnymi postaciami MDS" z grupą porównawczą.

6.2 Skala punktowa wg ELN

Jednym z celów pracy było potwierdzenie wartości diagnostycznej skali parametrycznej wg ELN. Wykazano, że grupie chorych z podejrzeniem MDS diagnozowanych w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, podobnie jak w pracy oryginalnej, skala ta charakteryzowała się wysoką swoistością (90%) oraz PPV (0,93). Uzyskana czułość (73%) i NPV (0,64) były nieco niższe, co również potwierdza wyniki uzyskane przez Della Porta i wsp.[34] Niezwykle ważnym jest fakt, iż parametry wchodzące w skład skali wyrażane są jako wartości względne, uniezależnione od subiektywnej oceny. Dzięki temu, narzędzie to staje się niezależne od warunków badania, użytego cytometru, zestawu przeciwciał monoklonalnych oraz osoby przeprowadzającej badanie i może być porównywane międzylaboratoryjnie, co pozwala na wykorzystanie tej skali w badaniach wieloośrodkowych.

Wynik skali otrzymuje się przy użyciu jedynie 2 przeciwciał monoklonalne (anty- CD34 oraz anty- CD45), przez co koszty badania nie są wysokie, a badanie może być wykonane w większości pracowni cytometrycznych. Podsumowując, skala parametryczna wg ELN jest szybkim, prostym i zobiektywizowanym narzędziem, które powinno być używane w diagnostyce zespołów MDS.

6.3 Rozszerzenia skali punktowej wg ELN

Ważnym elementem pracy była próba rozszerzenia skali parametrycznej wg ELN o zaburzenia immunofenotypowe w celu zwiększenia wartości diagnostycznej skali. Największą czułość (83%) osiągnięto poprzez dodanie do skali ELN oceny wszystkich 4 parametrów immunofenotypowych różnicujących istotnie statystycznie grupę tzw. „wczesnych" MDS od cytopenii o innej etiologii. Niestety, taka modyfikacja skali ELN prowadziła do istotnego zmniejszenia jej swoistości oraz dodatniej wartości prognostycznej.

Rozszerzenie skali ELN o 2 najlepiej różnicujące obie grupy parametry immunofenotypowe, pozwoliło na zwiększenie czułości (82%) oraz NPV (0,72), przy zachowaniu wysokiej swoistości (87%) oraz PPV (0,92). Powyższa analiza pokazała, że jest to skala o porównywalnej wartości diagnostycznej, jak ocena wszystkich zaburzeń immunofenotypowych wg zaleceń ELN 2012. Problemem pozostaje subiektywność w ocenie zaburzeń ekspresji CD 11b wobec CD13 oraz CD11b wobec HLA-DR. Natomiast zdecydowaną zaletą tej skali jest możliwość wykonania wszystkich oznaczeń w jednej próbówce, co skraca czas badania oraz zmniejsza jego koszty. Wszystko to powinno skłonić do wprowadzenia parametrycznych skal cytometrycznych do szerokiej praktyki klinicznej.

6.4 Wartość prognostyczna skal cytometrycznych

W pracy wykazano istotną statystycznie dodatnią korelację między wynikiem punktowym w skali ELN, rozszerzonej o wybrane zaburzenia immunofenotypowe a wynikiem R-IPSS. Najsilniejszą korelację wykazywała skala parametryczna wg ELN rozszerzona o ocenę zaburzeń CD11b wobec HLA-DR oraz CD11b wobec CD13 na komórkach linii dojrzewania granulocytów($p<0,001$). Uzyskane wyniki sugerują przydatność prognostyczną tak zmodyfikowanej skali ELN i uzasadniają kontynuację badań w celu poszukiwania zależności między zaburzeniami cytometrycznymi opisywanymi za pomocą badanych skal a przeżyciem całkowitym i przeżyciem wolnym od progresji chorych na MDS.

6.5 Perspektywy kontynuacji badań

Ze względu na niewielki koszt i dostępność badania metodą cytometrii przepływowej w codziennej praktyce wartość diagnostyczna skal cytometrycznych powinna zostać zwalidowana w oparciu o prospektywne badanie wieloośrodkowe. Istotnym elementem badania prospektywnego powinna być również ocena niezależnej od R-IPSS wartości prognostycznej skal cytometrycznych. Celowe byłoby również podjęcie próby oceny skal cytometrycznych, jako potencjalnych predyktorów odpowiedzi na nowe leki stosowane u chorych na MDS, w tym leki demetylujące.

7. DYSKUSJA

7.1 Zaburzenia immunofenotypowe charakteryzujące zespoły mielodysplastyczne

Dużym wyzwaniem jest określenie algorytmu badania cytometrycznego w diagnostyce tzw. „wczesnych" MDS (czyli podtypów MDS-SLD, MDS-MLD, MDS-U, MDS RS, MDS del 5q). W 2012 roku grupa robocza ELN opublikowała raport dotyczący standaryzacji badania zaburzeń fenotypowych i immunofenotypowych szpiku metodą wieloparametrowej cytometrii przepływowej u chorych z podejrzenie MDS.[32]

W powyższej pracy wykazano, że wśród zaburzeń wymienianych w rekomendacjach ELN, najwyższą wartość diagnostyczną ma nieprawidłowa ekspresja CD11b/HLA-DR, CD11b/CD13, CD15/CD34 na komórkach linii dojrzewania granulocytarnego oraz obecność CD14 na komórkach linii dojrzewania monocytów. Zmniejszona ekspresja CD11b wobec zwiększonej HLA-DR, jako zaburzenie obecne w MDS, zostało opisane już w 1993.[51] Białko CD11b, zwane również integryną αM tworzy wraz z integryną β2(CD18) kompleks, który jest receptorem dla dopełniacza 3 (CR3). Po związaniu ligandu w postaci składowych dopełniacza C3b oraz C4b , adhezyna ta pełni ważną rolę we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej.[52] Jej ekspresja jest obecna fizjologicznie na neutrofilach, eozynofilach, bazofilach, monocytach, komórkach NK oraz niektórych subpopulacjach limfocytów.[53] W układzie komórek linii dojrzewania granulocytów jej ekspresja pojawia się na mielocytach i pozostaje obecna w dalszych etapach dojrzewania. Udowodniono, że neutrofile charakteryzujące się obniżoną ekspresją tego białka wykazują cechy dysplazji oraz zmniejszoną zdolność do przylegania, migracji i diapedezy. Może to prowadzić między innymi do częstszych infekcji u chorych z MDS.[54] Co ciekawe, zwiększona ekspresja CD11b na nowotworowych mieloblastach w ostrej białaczce szpikowej, jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym.[55] Antygen HLA-DR jest obecny na mieloblastach i zanika w trakcie dojrzewania komórek w kierunku granulocytów na etapie promielocyta. Zwiększony odsetek komórek wykazujących ekspresję HLA-DR może być zatem obecny w podtypach MDS z nadmiarem blastów, jako marker obecny na komórkach nowotworowych. We „wczesnych" MDS, najważniejszą rolę diagnostyczną ma jednak jednoczesna ocena ekspresji CD11b wobec ekspresji HLA-DR na komórkach linii dojrzewania granulocytów.

W powyższej pracy udowodniono, że zaburzenie ekspresji CD11b wobec CD13 oraz CD11b wobec HLA-DR najlepiej różnicują grupę badaną i porównawczą. Nieprawidłowy obraz ekspresji, jednoczenie ocenianych obu antygenów na jednej komórce linii dojrzewania granulocytów, wskazuje na asynchronię ich dojrzewania.[50] CD13 jest markerem pojawiających

się na mieloblastach i zanikającym na etapie promielocyta. Ponownie może być obecny na aktywowanych granulocytach, gdyż aminopeptidaza N (CD13), jest obecna również w ziarnistościach. W czasie aktywacji i uwolnienia zawartości ziarnistości, pojawia się na powierzchni komórek.

W niniejszej pracy wykazano, że zaburzenie ekspresji CD13/CD16 jest najczęściej spotykanym zaburzeniem w MDS, nie różnicuje natomiast w sposób istotny nieefektywnej hematopoezy w przebiegu MDS od innych przyczyn cytopenii. CD16 jest receptorem dla łańcucha ciężkiego gamma immunoglobulin (FcRγIII), a jego ekspresja pojawia się bardzo późno w trakcie dojrzewania granulocytów, dopiero na etapie metamielocyta.[56] Zaburzenia ekspresji CD13 wobec CD16 jest często opisywane jako występujące w MDS. [57,58] Natomiast wiele publikacji wskazuje również, że zaburzenie może występować w innych stanach.[59,60]

Często wskazywaną zmianą immunofenotypową, charakteryzującą MDS, jest zaburzenie ekspresji CD33 wobec CD117.[61] W grupie badanej, ocenianej w niniejszej pracy, zaburzenie CD33/CD117 różnicowało grupę wszystkich chorych na MDS z grupą porównawczą. Tej zależności nie stwierdzano jednak, jeżeli wyłączono grupę MDS z nadmiarem blastów. Można przypuszczać, że zaburzenie to jest bardziej charakterystyczne dla zaawansowanych postaci MDS, w których ekspresja CD117 na proliferujących nowotworowych mieloblastach, nie zanika w czasie ich zaburzonego dojrzewania. Antygen CD117 jest receptorem dla czynnika wzrostu dla komórek pnia, który posiada wewnętrzną aktywność kinazy tyrozynowej. Jest obecny na mieloblastach i zanika na etapie przejścia od promielocyta do metamielocyta. Dodatkowo, warto również wspomnieć o ekspresji CD117 na mastocytach, co bywa używane do ich identyfikacji, także jako parametr oceniany w skalach cytometrycznych.[62] CD33 jest markerem obecnym na wszystkich etapach dojrzewania granulocytów, natomiast jego ekspresja zmniejsza się w trakcie dojrzewania.[63].

Zgodnie z uzyskanymi wynikami w przedstawianej pracy, zmniejszenie ekspresji CD14 na komórkach linii dojrzewania monocytów jest jedynym zaburzeniem w tym szeregu, które różnicuje grupy badane. Antygen CD14 jest obecny na dojrzałych monocytach i makrofagach; niewielka ekspresja może pojawić się również na granulocytach. CD14 należy do rodziny receptorów rozpoznających wzorce molekularne, a ligandem dla niego jest przede wszystkim lipopolisacharyd (ang. Lipopolysaccharide, LPS). Połączenie receptora CD14 z ligandem prowadzi do aktywacji i zwiększenia właściwości żernych makrofagów.[64,65] Może to być wynikiem akumulacji monocytów pośrednich i nieklasycznych, które wykazują słabsze właściwości żerne i mniejszą produkcję cytokin.[66]

7.2 Skale cytometryczne w diagnostyce zespołów mielodysplastycznych

Do tej pory powstało wiele różnych skal cytometrycznych, które w sposób ilościowy opisują zaburzenia fenotypowe i immunofenotypowe występujące w MDS. Większość z nich, zakłada ocenę dużej ilości parametrów, co zmniejsza ich powtarzalność i możliwość szerokiego stosowania w praktyce.[67,68] W 2008 roku zespół pod kierownictwem Ogaty zaproponował algorytm badania cytometrycznego szpiku opartego na ocenie 4 parametrów, które wcześniej były opisywane jako pojedyncze zaburzenia.[33] W roku 2012 eksperci ELN uprościli tę skalę, poprzez zmniejszenie ilości przeciwciał monoklonalnych niezbędnych do uzyskania wyniku.[34] Obie prace potwierdzały, na stosunkowo dużych grupach badawczych, wysoką wartość diagnostyczną wspomnianych skal cytometrycznych w wykrywaniu MDS. Parametry oceniane w tych skalach w niewielkim stopniu zależą od sprzętu, warunków wykonywania badania oraz badacza. Udało się to osiągnąć poprzez odniesie każdego ocenianego parametru do innego, uzyskanego podczas tego samego badania- zwiększony odsetek komórek CD34+ porównuje się do wszystkich komórek jądrzastych, obniżenie odsetka limfoblastów do wszystkich komórek CD34+, obniżenie ekspresji CD45 na mieloblastach odnosi się do ekspresji CD45 na limfocytach, podobnie jak obniżenie sygnału SSC komórek linii dojrzewania granulocytów do sygnału SSC limfocytów. Poza tym, całość badania opiera się na zastosowaniu 2-3 przeciwciał monoklonalnych, powszechnie stosowanych w diagnostyce MDS. Wszystko to pozwala również na retrospektywną ocenę materiału. W niniejszej pracy potwierdzono wartość diagnostyczną skali wg ELN, zarówno dla całej grupy badanej MDS, jak i „wczesnych" MDS.

Od czasu publikacji skali ELN powstało wiele pokrewnych skal służących diagnostyce MDS, spośród których wiele z nich zakłada ocenę podobnych parametrów. Karai i wsp rozszerzyli tę skalę o ocenę komórek linii dojrzewania erytrocytów poprzez dodanie oceny CD71 oraz odsetka mastocytów, osiągając większą czułość (84%) rozpoznania „wczesnych" MDS.[62] W pracy Xu i wsp., oprócz zaburzeń objętych w skali Ogaty, oceniano również zaburzenia ekspresji CD15, CD11b, CD4 i CD56, które istotnie różnicowały „wczesne" MDS. Szczególnie ciekawy wydaje się fakt, że w doniesieniu Xu i wsp. udowodniono istotną różnicę w ekspresji CD11b na komórkach CD34+ między „wczesnym" MDS a nieklonalną cytopenią[68]. Podobnie w powyższej pracy potwierdzono, że zaburzenia ekspresji CD11b mogą być istotnym parametrem odróżniającym „wczesne" MDS od innych chorób przebiegających z cytopenią.

Inną próbą zwiększenia wartości diagnostycznej cytometrii przepływowej w rozpoznaniu MDS jest tworzenie nowych skal immunofenotypowych. W pracy Chung i wsp. znajdujemy opis algorytmu badania zakładającego ocenę jedynie zaburzeń

immunofenotypowych. Oceniano ekspresję CD10 wobec CD15, CD13 wobec CD16 lub CD11b na komórkach linii dojrzewania granulocytów oraz CD33 wobec CD64 na komórkach linii dojrzewania monocytów. Wg autorów swoistość rozpoznania MDS sięgała 100% przy czułości 89,7%.[58] W powyższej pracy podjęto również próbę utworzenia skali cytometrycznej opartej o ocenę 4 zaburzeń immunofenotypowych, które występowały istotonie statystycznie częściej w grupie w MDS. Potwierdzono jej wysoką swoistość dla rozpoznania, natomiast czułość wyniosła jedynie 23% (dane nieujęte), co znacznie zmniejszyło jej wartość diagnostyczną.

Zalecenia ELN 2012 obejmują również ocenę zaburzeń immunofenotypowych na komórkach linii dojrzewania erytrocytów[32]. Poprzez wyodrębnienie z oceny układu czerwonokrwinkoego 4 parametrów, utworzono tzw. „RED-scale", charakteryzującą się wysoką czułością i specyficznością w wykrywaniu pacjentów ze „wczesnymi" MDS, u których w obrazie klinicznym dominuje niedokrwistość.[69] Ciekawym podejściem do diagnostyki wydaje się również użycie obu skal jednocześnie, co zdecydowanie zwiększa ich wartość diagnostyczną[70]. Należy jednak pamiętać, że ocena populacji krwinek czerwonych i ich progenitorów jest znacznie trudniejsza technicznie, bardziej zależna od warunków pobierania i dostarczenia materiałów oraz czasochłonna, przez co jej zastosowanie w codziennej praktyce jest ograniczone.

7.3 Znaczenie prognostyczne cytometrii w zespołach mielodysplastycznych

Aktualnie, najważniejszą rolę w prognozowaniu przebiegu choroby odgrywa badanie cytogenetyczne, którego wynik jest składową oceny ryzyka wg IPSS, WPSS (ang. World Health Organization (WHO) Classification-Based Prognosis Scoring System), czy R-IPSS[19,20]. Pomimo dobrze udokumentowanej roli w ocenie ryzyka MDS, wykonanie badania cytogenetycznego wymaga odpowiedniego czasu oraz sprzętu, stąd wynikają próby stratyfikacji do grup ryzyka za pomocą cytometrii przepływowej.

Niewątpliwie największą rolę cytometria przepływowa odgrywa w diagnostyce podtypów MDS z nadmiarem blastów[71]. Należy zauważyć również, że obecność 11-20% komórek progenitorowych w preparacie szpiku, jest już kryterium, które decyduje o zakwalifikowaniu chorego do grupy co najmniej pośredniego ryzyka wg R-IPSS, a przy współwystępowaniu cytopenii do kategorii wysokiego ryzyka, co niesie za sobą bardzo istotne implikacje terapeutyczne.[19]

Pierwsze próby wykorzystania badania szpiku metodą cytometrii przepływowej, jako narzędzia prognostycznego, dotyczyły głównie oceny pojedynczych antygenów lub ich kombinacji na komórkach linii dojrzewania granulocytów[51]. Ważnymi czynnikami wpływającymi na rokowanie, jest ekspresja antygenów swoistych dla innych linii komórkowych, zwiększony odsetek komórek CD34+, a także nieprawidłowa (zwiększona lub obniżona) ekspresja antygenów[72–74]. W ostatnich latach podjęto próbę tworzenia skal, które zakładają ocenę wielu różnych zaburzeń fenotypowych i immunofenotypowych, a mają być użyteczne do diagnostyki oraz oceny rokowania w zespołach mielodysplastycznych. Jednym z pierwszych opracowanych narzędzi tego typu jest skala stworzoną przez Ogatę i wsp., którzy w swojej pracy wykazali, że pacjenci z wynikiem liczbowym 2 i więcej mają wyższe wartości IPSS oraz WPSS, a więc gorsze rokowanie.[33] Natomiast w publikacji Xu i wsp. potwierdzono dodatnią korelację wyniku skali cytometrycznej z wynikiem R-IPSS ($p<0,001$)[75]. Sprzeczne dane dotyczą korelacji zaburzeń cytogenetycznych grup rokowniczych z wynikami liczbowymi skal cytometrycznych. Wynika to między innymi z mnogości skal oraz zaburzeń cytogenetycznych, ocenianych w diagnostyce MDS. W niniejszej pracy potwierdzono dodatnią korelację między wynikiem liczbowym skali ELN, wartością R-IPSS ($p=0,027$). Dodatkowo korelacja ta była istotniejsza($p<0,001$) gdy porównano skalę ELN rozszerzoną o ocenę CD11b/HLA-DR oraz CD11b/CD13. Dodatkowo wykazano również korelację między liczbą zaburzeń immunofenotypowych, a wartością R-IPSS. Wydaje się zatem uzasadnione dalsze poszukiwanie bezpośredniej korelacji między czasem przeżycia a zaburzeniami immunofenotypowymi. Kern i wsp. na dużej grupie pacjentów (N=804) z zespołem MDS potwierdzili, że obecność zaburzeń immunofenotypowych jest niezależnym czynnikiem rokowniczym. Chorzy u których stwierdzono większą liczbę zaburzeń immunofenotypowych uzyskali istotnie statystycznie gorsze dwuletnie przeżycie całkowite (OS 71,2% vs 89,4%, $p<0,001$) w porównaniu do pacjentów z MDS bez stwierdzonych zaburzeń immunofenotypowych.[76]

Badanie cytometryczne może również pomóc w doborze odpowiedniego leczenia zespołów mielodysplastycznych. Jak udowodniono, nieprawidłowy immunofenotyp komórek szpiku może być związany z odpowiedzią na czynniki wzrostu. Pacjenci, u których stwierdzono ekspresję markerów z innej linii takich jak CD5, CD7, CD56 lub utratę ekspresji CD45 czy CD33 na mieloblastach, gorzej odpowiadali na leczenie czynnikami wzrostu dla kolonii granulocytów oraz ich odpowiedź była mniej trwała.[77,78] Wykazano również, że skala

cytometryczna może być użytecznym narzędziem w prognozowaniu odpowiedzi na leki demetylujące[79].

8. WNIOSKI

a. Zaburzenia immunofenotypowe komórek szeregu dojrzewania granulocytów i monocytów oceniane metodą wieloparametrowej cytometrii przepływowej wg rekomendacji European LeukemiaNet znamiennie częściej stwierdza się u chorych na MDS niż u chorych z cytopeniami o innej etiologii.

b. Ocena ilościowa nasilenia zaburzeń fenotypowych i immunofenotypowych szpiku wg skali punktowej ELN, cechuje wysoka swoistość i dodatnia wartość predykcyjna w różnicowaniu cytopenii w przebiegu MDS z cytopeniami o innej etiologii.

c. Rozszerzenie oceny ilościowej zaburzeń fenotypowych szpiku wg skali punktowej ELN o wybrane zaburzenia immunofenotypowe komórek linii dojrzewania granulocytów pozwala zwiększyć czułość i negatywną wartość predykcyjną badania cytometrycznego w diagnostyce MDS

d. Nasilenie zaburzeń immufenotypowych szpiku oceniane za pomocą skali punktowej ELN dodatnio koreluje z wartością Zmodyfikowanego Indeksu Rokowniczego R-IPSS. Podobna korelacja występuje między wartością R-IPSS a zaburzeniami cytometrycznymi opisanymi ilościowo za pomocą skali punktowej ELN rozszerzonej o analizę wybranych zaburzeń immunofenotypowych komórek linii dojrzewania granulocytów.

9. STRESZCZENIE

Wstęp

Współcześnie, pomimo dostępności wielu nowych narzędzi diagnostycznych, zespoły mielodysplastyczne (MDS), zgodnie z rekomendacjami Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2016, roku rozpoznaje się nadal na podstawie oceny morfologicznej szpiku. Pozostałe badania stanowią ważne uzupełnienie prawidłowego procesu diagnostycznego. W niniejszej analizie podjęto próbę określenia wartości diagnostycznej i prognostycznej oceny szpiku metodą wieloparametrowej cytometrii przepływowej u chorych na MDS.

Materiał i metody

Grupę badaną stanowili chorzy diagnozowani w latach 2007-2017 w Katedrze i Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu z powodu jedno- lub wieloliniowej cytopenii, u których ostatecznie ustalono rozpoznanie zespołu mielodysplastycznego na podstawie standardowych kryteriów cytomorfologicznych, cytogenetycznych i histopatologicznych, zgodnie z klasyfikacją WHO z 2008 roku, zmodyfikowaną w 2016 roku. Do grupy porównawczej włączono chorych diagnozowanych w tym okresie z powodu jedno- lub wieloliniowej cytopenii, u których ustalono ostatecznie inne niż MDS rozpoznanie. U wszystkich włączonych do analizy chorych wykonano ocenę cytometryczną wg zaleceń European LeukemiaNet (ELN) oraz oszacowano nasilenie zaburzeń cytometrycznych w szpiku, zgodnie z punktową skalą parametryczną wg ELN (tzw. zmodyfikowana skala Ogaty). Rozszerzono następnie tę skalę o ocenę najczęściej stwierdzanych w MDS zaburzeń immunofenotypowych. Dodatkowo poszukiwano korelacji między wartością punktowych skal cytometrycznych a Zmodyfikowanym Międzynarodowym Indeksem Rokowniczym (R-IPSS).

Wyniki

Do grupy badanej włączono 71 chorych, 43 mężczyzn, 28 kobiet, w wieku 24-86 (mediana 66) lat z rozpoznaniem zespołu mielodysplastycznego. Grupa porównawcza składała się z 39 chorych, 19 mężczyzn, 20 kobiet, w wieku 21-84 (mediana 59 lat), z jedno- lub wieloliniową cytopenią, u których ostatecznie postawiono inne niż MDS rozpoznanie. Mediana sumarycznej liczby zaburzeń immunofenotypowych stwierdzonych na komórkach linii dojrzewania granulocytów oraz monocytów w grupie chorych na MDS, wyniosła 3 (zakres 0-7), a w grupie porównawczej 1 (zakres 0-5). Różnica ta nie osiągnęła znamienności statystycznej (p=0,07).

Wykazano natomiast istotnie wyższą liczbę zaburzeń immunofenotypowych komórek linii dojrzewania granulocytów w grupie chorych na MDS ($p<0,0001$). Liczba zaburzeń występujących na monocytach nie różniła się między grupami ($p=0,89$). Wykazano ponadto znamiennie częstsze występowanie zaburzeń ekspresji CD11b wobec HLA-DR ($p=0,01$), CD11b wobec CD13 ($p=0,032$) oraz CD15 wobec CD34 na komórkach linii dojrzewania granulocytów ($p=0,036$), a także częściej stwierdzano brak ekspresji CD14 na komórkach linii dojrzewania monocytów ($p=0,02$) w grupie MDS. Stwierdzono istotną różnicę w nasileniu zaburzeń cytometrycznych szpiku ocenianych wg skali punktowej ELN między grupą chorych na MDS, a grupą porównawczą ($p<0,0001$). Czułość tej skali w rozpoznaniu MDS wyniosła 73%, swoistość 90%, a ujemna wartość predykcyjna (NPV) i dodatnia wartość predykcyjna (PPV) odpowiednio 0,64 i 0,93. Skalę punktową wg ELN rozszerzono następnie o ocenę występowania zaburzeń CD11b/HLA-DR oraz CD11b/CD13, osiągając wyższą czułość (82%) oraz NPV (0,74), przy zachowanej wysokiej swoistości (87%) i PPV (0,85) skali.

Wykazano istotną statystycznie dodatnią korelację między wartością R-IPSS a sumaryczną liczbą zaburzeń immunofenotypowych komórek linii dojrzewania granulocytów i monocytów ($p=0,017$), skalą punktową wg ELN ($p=0,027$) oraz skalą ELN rozszerzoną o ocenę zaburzeń ekspresji CD11b/HLA-DR i CD11b /CD13 ($p<0,001$).

Wnioski

Uzyskane wyniki potwierdzają przydatność diagnostyczną punktowej skali cytometrycznej ELN w różnicowaniu cytopenii w przebiegu MDS z cytopeniami o innej etiologii. Rozszerzenie tej skali o wykazane w pracy najczęściej występujące zaburzenia immunofenotypowe komórek linii dojrzewania granulocytów pozwala na zwiększenie jej czułości i NPV. Dodatkowo, wykazany związek między stwierdzanymi zaburzeniami cytometrycznymi szpiku a R-IPSS, sugeruje ich wartość prognostyczną w MDS.

10. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

"Evaluation of the selected parameters of bone marrow cell subpopulations by flow cytometry and analysis of their diagnostic and prognostic value in patients with myelodysplastic syndromes"

Introduction

Despite availability of many new diagnostic tools myelodysplastic syndromes (MDS), are still recognized on the base of bone marrow morphological assessment according to the current World Health Organization (WHO) recommendations. Other tests are important complementary tools in the correct diagnostic process. This analysis attempts to determine the diagnostic and prognostic value of bone marrow evaluation by multiparameter flow cytometry in patients with MDS.

Material and methods

The study group consisted of patients, who underwent diagnostic process in the years 2007-2017 in the Department of Hematology and Bone Marrow Transplantation of Poznan University of Medical Sciences due to single or multilineage cytopenia. The patients included in the study were eventually diagnosed with myelodysplastic syndrome based on standard cytomorphological, cytogenetic and histopathological criteria according to the WHO classification published in 2008 and modified in 2016 year. The comparative group included patients diagnosed in the same period, also due to single or multilineage cytopenia, whose definitive diagnosis was other than MDS. In all of the patients included in the analysis, flow cytometric evaluation was performed following the recommendations of the European LeukemiaNet (ELN), all probes were also analyzed in accordance with the parametric scale by ELN (i.e. a modified version of the Ogata score). The scale was then extended by adding assessment of the most common immunophenotypic abnormalities found in MDS. In addition, a correlation between the value of cytometric scales and the Revised International Prognostic Scoring System (R-IPSS) was sought.

Results

The study included 71 patients, 43 male, 28 female, diagnosed with a myelodysplastic syndrome. The age on diagnosis was between 24 and 86 (median 66) years. The comparative group consisted of 39 patients, 19 male, 20 female, aged between 21 and 84 (median 59) years. The median total number of immunophenotypic abnormalities found in the maturing

granulocytes and monocytes in the patients with MDS was 3 (range 0-7), and in the comparative group 1 (range 0-5). This difference did not reach statistical significance ($p = 0.07$). However, a significantly higher number of immunophenotypic abnormalities were confirmed on maturing granulocytes in the MDS group ($p <0.0001$). The number of abnormalities found on monocytes did not differ between the groups ($p = 0.89$). It was further demonstrated that abnormalities in the expression of CD11b referring to HLA-DR ($p = 0.01$), CD13 to CD11b ($p = 0.032$), CD15 to CD34 on maturing granulocytes ($p = 0.036$) and deficient expression of CD14 on maturing monocytes ($p = 0.02$) were significantly more frequent in the MDS group. There was a significant difference between groups in the number of bone marrow cytometric abnormalities evaluated according to the ELN parametric score between the groups ($p <0.0001$). The sensitivity and specificity of this score in the diagnosis of MDS was 73% and 90%, respectively. Adequately, the negative predictive value (NPV) and the positive predictive value (PPV) were 0.64 and 0.93. The ELN parametric scale score was than extended to include the assessment of the disturbances in the expression of CD11b / HLA-DR and CD11b / CD13 on maturing granulocytes, resulting in higher sensitivity (82%) and NPV (0.74) with high specificity (87%) and PPV (0.85) preserved.

Moreover, statistically significant positive correlation was proved between the R-IPSS and the total number of immunophenotypic abnormalities of the maturing granulocytes and monocytes ($p = 0.017$), ELN parametric scale ($p = 0.027$) and ELN parametric score extended with the evaluation of CD11b / HLA-DR and CD11b / CD13 ($p <0.001$) expression.

Conclusions

The obtained results confirm the diagnostic usefulness of the ELN parametric scale in the differentiation of cytopenias in the course of MDS from cytopenias of a different etiology. Extending this scale to include the most frequently occurring immunophenotypic abnormalities of maturing granulocytes increases its sensitivity and NPV. In addition, the demonstrated relationship between the observed bone marrow cytometric abnormalities and R-IPSS suggests their prognostic value in patients with MDS.

11. PIŚMIENNICTWO

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.
2. Adès L, Itzykson R, Fenaux P. Myelodysplastic syndromes. *Lancet*. 2014;383(9936):2239-2252. doi:10.1016/S0140-6736(13)61901-7.
3. Kim M, Lee SE, Park J, et al. Vitamin B12-responsive pancytopenia mimicking myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol*. 2011;125(4):198-201. doi:10.1159/000322941.
4. Olcay L, Yetgin S, Okur H, Erekul S, Tuncer M. Dysplastic changes in idiopathic thrombocytopenic purpura and the effect of corticosteroids to increase dysplasia and cause hyperdiploid macropolycytes. *Am J Hematol*. 2000;65(2):99-104. doi:10.1002/1096-8652(200010)65:2<99::AID-AJH2>3.0.CO;2-K.
5. Kobayashi T, Nannya Y, Ichikawa M, et al. A nationwide survey of hypoplastic myelodysplastic syndrome (a multicenter retrospective study). *Am J Hematol*. 2017;92(12):1324-1332. doi:10.1002/ajh.24905.
6. Bennett JM, Orazi A. Diagnostic criteria to distinguish hypocellular acute myeloid leukemia from hypocellular myelodysplastic syndromes and aplastic anemia: Recommendations for a standardized approach. *Haematologica*. 2009;94(2):264-268. doi:10.3324/haematol.13755.
7. Cogle CR. Incidence and Burden of the Myelodysplastic Syndromes. *Curr Hematol Malig Rep*. 2015;10(3):272-281. doi:10.1007/s11899-015-0269-y.
8. Neukirchen J, Schoonen WM, Strupp C, et al. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: Data from the Düsseldorf MDS-registry. *Leuk Res*. 2011;35(12):1591-1596. doi:10.1016/j.leukres.2011.06.001.
9. Avgerinou C, Alamanos Y, Zikos P, et al. The incidence of myelodysplastic syndromes in Western Greece is increasing. *Ann Hematol*. 2013;92(7):877-887. doi:10.1007/s00277-013-1712-6.
10. Rodger EJ, Morison IM. Myelodysplastic syndrome in New Zealand and Australia. *Intern Med J*. 2012;42(11):1235-1242. doi:10.1111/j.1445-5994.2011.02619.x.
11. Cogle CR, Iannacone MR, Yu D, et al. High rate of uncaptured myelodysplastic syndrome cases and an improved method of case ascertainment. *Leuk Res*. 2014;38(1):71-75. doi:10.1016/j.leukres.2013.10.023.
12. Mądry K, Machowicz R, Waszczuk-Gajda A, et al. Demographic, Hematologic, and Clinical Features of Myelodysplastic Syndrome Patients: Results from the First Polish Myelodysplastic Syndrome Registry. *Acta Haematol*. 2015;134(2):125-134. doi:10.1159/000375149.
13. Churpek JE. Familial myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2017;30(4):287-289. doi:10.1016/j.beha.2017.10.002.
14. Bannon SA, Dinardo CD. Hereditary predispositions to myelodysplastic syndrome. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6). doi:10.3390/ijms17060838.
15. Young NS. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic sydromes:

Clonal expansion of PIG-A-mutant hematopoietic cells in bone marrow failure. *Haematologica*. 2009;94(1):3-7. doi:10.3324/haematol.2008.001297.

16. Savage SA, Dufour C. Classical inherited bone marrow failure syndromes with high risk for myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia. *Semin Hematol*. 2017;54(2):105-114. doi:10.1053/j.seminhematol.2017.04.004.

17. Kim SY, Le Rademacher J, Antin JH, et al. Myelodysplastic syndrome evolving from aplastic anemia treated with immunosuppressive therapy: Efficacy of hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2014;99(12):1868-1875. doi:10.3324/haematol.2014.108977.

18. Parmentier S, Schetelig J, Lorenz K, et al. Assessment of dysplastic hematopoiesis: Lessons from healthy bone marrow donors. *Haematologica*. 2012;97(5):723-730. doi:10.3324/haematol.2011.056879.

19. Greenberg P, Tuechler H. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454-2465. doi:10.1182/blood-2012-03-420489.The.

20. Schanz J, Tüchler H, Solé F, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*. 2012;30(8):820-829. doi:10.1200/JCO.2011.35.6394.

21. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122(22):3616-3627. doi:10.1182/blood-2013-08-518886.

22. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2488-2498. doi:10.1056/NEJMoa1408617.

23. Porta MG Della, Travaglino E, Boveri E, et al. Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia : a basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes. 2015;(March 2014):66-75. doi:10.1038/leu.2014.161.

24. Fulwyler MJ. Electronic Separation of Biological Cells by Volume. *Science (80-)*. 1965;150(3698):910 LP-911.

25. Cantor H, Simpson E, Sato VL, Fathman CG, Herzenberg LA. Characterization of subpopulations of T lymphocytes. I. Separation and functional studies of peripheral T-cells binding different amounts of fluorescent anti-Thy 1.2 (theta) antibody using a fluorescence-activated cell sorter (FACS). *Cell Immunol*. 1975;15(1):180-196.

26. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classi fi cation of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-2391. doi:10.1182/blood-2016-01-643569.The.

27. Holowiecki J, Krawczyk-Kulis M, Giebel S, et al. Status of minimal residual disease after induction predicts outcome in both standard and high-risk Ph-negative adult acute lymphoblastic leukaemia. The Polish Adult Leukemia Group ALL 4-2002 MRD study. *Br J Haematol*. 2008;142(2):227-237. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07185.x.

28. Malcovati L, Della Porta MG, Lunghi M, et al. Flow cytometry evaluation of erythroid

and myeloid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2005;19(5):776-783. doi:10.1038/sj.leu.2403680.

29. Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Wells DA. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from a working conference. *Leuk Res*. 2008;32(1):5-17. doi:10.1016/j.leukres.2007.04.020.

30. Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med*. 2009;361(19):1872-1885. doi:10.1056/NEJMra0902908.

31. Valent P, Horny HP, Bennett JM, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res*. 2007;31(6):727-736. doi:10.1016/j.leukres.2006.11.009.

32. Westers TM, Ireland R, Kern W, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia*. 2012;26(7):1730-1741. doi:10.1038/leu.2012.30.

33. Ogata K, Della Porta MG, Malcovati L, et al. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: A prospective validation study. *Haematologica*. 2009;94(8):1066-1074. doi:10.3324/haematol.2009.008532.

34. Porta MGD, Picone C, Pascutto C, et al. Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: Results of a European LeukemiaNET study. *Haematologica*. 2012;97(8):1209-1217. doi:10.3324/haematol.2011.048421.

35. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. 2017;120(12):2454-2466. doi:10.1182/blood-2012-03-420489.The.

36. Montalban-Bravo G, Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2018;93(1):129-147. doi:10.1002/ajh.24930.

37. Jurado M, Deeg HJ, Storer B, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for advanced myelodysplastic syndrome after conditioning with busulfan and fractionated total body irradiation is associated with low relapse rate but considerable nonrelapse mortality. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(3):161-169. doi:10.1053/bbmt.2002.v8.pm11939606.

38. Gerds AT, Gooley TA, Estey EH, Appelbaum FR, Deeg HJ, Scott BL. Pretransplantation therapy with azacitidine vs induction chemotherapy and posttransplantation outcome in patients with MDS. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(8):1211-1218. doi:10.1016/j.bbmt.2012.01.009.

39. Oliansky DM, Antin JH, Bennett JM, et al. The Role of Cytotoxic Therapy with Hematopoietic Stem Cell Transplantation in the Therapy of Myelodysplastic Syndromes: An Evidence-Based Review. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(2):137-172. doi:10.1016/j.bbmt.2008.12.003.

40. Sorror ML, Maris MB, Storb R, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: A new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood*. 2005;106(8):2912-2919. doi:10.1182/blood-2005-05-2004.

41. Sorror ML, Sandmaier BM, Storer BE, et al. Long-term Outcomes Among Older Patients Following Nonmyeloablative Conditioning and Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Advanced Hematologic Malignancies. *Jama*. 2011;306(17):1874. doi:10.1001/jama.2011.1558.

42. Malcovati L, Hellstr E, Bowen D, et al. Review Article Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults : recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*. 2013;122(17):2943-2964. doi:10.1182/blood-2013-03-492884.T.d.W.

43. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classi fi cation of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2406. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.The.

44. Hicks LK, Bering H, Carson KR, et al. Perspectives The ASH Choosing Wisely Ò campaign : fi ve hematologic tests and treatments to question. *Blood*. 2015;122(24):3879-3884. doi:10.1182/blood-2013-07-518423.This.

45. List A, Dewald G, Bennett J, et al. Lenalidomide in the Myelodysplastic Syndrome with Chromosome 5q Deletion. *N Engl J Med*. 2006;355(14):1456-1465. doi:10.1056/NEJMoa061292.

46. Toma A, Kosmider O, Chevret S, et al. Lenalidomide with or without erythropoietin in transfusion-dependent erythropoiesis-stimulating agent-refractory lower-risk MDS without 5q deletion. *Leukemia*. 2016;30(4):897-905. doi:10.1038/leu.2015.296.

47. Casadevall N, Durieux P, Dubois S, et al. Health, economic, and quality-of-life effects of erythropoietin and granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of myelodysplastic syndromes: a randomized, controlled trial.[see comment]. *Blood*. 2004;104(2):321-327. doi:10.1182/blood-2003-07-2252.Supported.

48. Stein H, Mason DY, Gerdes J, et al. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood*. 1985;66(4):848-858.

49. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-951. doi:10.1182/blood-2009-03-209262.

50. Van De Loosdrecht AA, Alhan C, Béné MC, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2009;94(8):1124-1134. doi:10.3324/haematol.2009.005801.

51. Mittelman M, Karcher DS, Kammerman LA, Lessin LS. High Ia (HLA-DR) and low CD11b (Mo1) expression may predict early conversion to leukemia in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol*. 1993;43(3):165-171.

52. Solovjov DA, Pluskota E, Plow EF. Distinct roles for the ?? and ?? subunits in the functions of integrin ??M??2. *J Biol Chem*. 2005;280(2):1336-1345. doi:10.1074/jbc.M406968200.

53. Tarek Elghetany M. Surface marker abnormalities in myelodysplastic syndromes.

Haematologica. 1998;83(12):1104-1115.

54. Mazzone A, Porta C, Fossati G, Gritti D, Mazzucchelli I, Ricevuti G. Granulocyte dysplasia and dysfunction, and CD11/CD18 defects in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*. 1996;23(3-4):267-275. doi:10.3109/10428199609054829.

55. Xu S, Li X, Zhang J, Chen J. Prognostic Value of CD11b Expression Level for Acute Myeloid Leukemia Patients: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135981. doi:10.1371/journal.pone.0135981.

56. Terstappen LW, Safford M, Loken MR. Flow cytometric analysis of human bone marrow. III. Neutrophil maturation. *Leukemia*. 1990;4(9):657-663.

57. Li L-J, Fu R, Wang H-Q, et al. Expression of differentiation antigens on bone marrow myeloid cells of the patients with myelodysplastic syndromes and it's clinical significances. *Natl Med J China*. 2010;90(10):672-677. doi:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2010.10.008.

58. Chung JW, Park CJ, Cha CH, et al. A combination of CD15/CD10, CD64/CD33, CD16/CD13 or CD11b flow cytometric granulocyte panels is sensitive and specific for diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Ann Clin Lab Sci*. 2012;42(3):271-280.

59. Monaghan SA, Surti U, Doty K, Craig FE. Altered neutrophil maturation patterns that limit identification of myelodysplastic syndromes. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2012;82 B(4):217-228. doi:10.1002/cyto.b.21016.

60. Kuijpers TW, Tool AT, van der Schoot CE, et al. Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation. *Blood*. 1991;78(4):1105-1111.

61. Nador G, Molteni A, Cesana C, et al. Prognostic Significance of CD33, CD34 and CD117 Expression on Bone Marrow Blasts of Patients with Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 2007;110(11):4604 LP-4604.

62. Kárai B, Bedekovics J, Miltényi Z, et al. A single-tube flow cytometric procedure for enhancing the diagnosis and prognostic classification of patients with myelodysplastic syndromes. *Int J Lab Hematol*. 2017;39(6):577-584. doi:10.1111/ijlh.12700.

63. Alhan C, Westers TM, Cremers EMP, et al. The myelodysplastic syndromes flow cytometric score: A three-parameter prognostic flow cytometric scoring system. *Leukemia*. 2016;30(3):658-665. doi:10.1038/leu.2015.295.

64. Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*. 1998;392:505.

65. Schlegel RA, Krahling S, Callahan MK, Williamson P. CD14 is a component of multiple recognition systems used by macrophages to phagocytose apoptotic lymphocytes. *Cell Death Differ*. 1999;6:583.

66. Talati C, Zhang L, Shaheen G, et al. Monocyte subset analysis accurately distinguishes CMML from MDS and is associated with a favorable MDS prognosis. *Blood*. 2017;129(13):1881 LP-1883.

67. Huang J, Lai P, Zhou M, Weng J, Lu Z, Du X. A multiparametric flow cytometry immunophenotypic scoring system for the diagnosis and prognosis of myelodysplastic syndromes. *Clin Lab*. 2012;58(11-12):1241-1251.

68. Xu F, Li X, Wu L, He Q, Zhang Z, Chang C. Flow cytometric scoring system (FCMSS) assisted diagnosis of myelodysplastic syndromes (MDS) and the biological significance of FCMSS-based immunophenotypes. *Br J Haematol*. 2010;149(4):587-597. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08146.x.

69. Mathis S, Chapuis N, Debord C, et al. Flow cytometric detection of dyserythropoiesis: A sensitive and powerful diagnostic tool for myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2013;27(10):1981-1987. doi:10.1038/leu.2013.178.

70. Aanei CM, Picot T, Tavernier E, Guyotat D, Campos Catafal L. Diagnostic Utility of Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes . *Front Oncol* . 2016;6:161. http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2016.00161.

71. Maynadié M, Picard F, Husson B, et al. Immunophenotypic clustering of myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2002;100(7):2349-2356. doi:10.1182/blood-2002-01-0230.

72. Jilani I, Estey E, Huh Y, et al. Differences in CD33 intensity between various myeloid neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 2002;118(4):560-566. doi:10.1309/1WMW-CMXX-4WN4-T55U.

73. Mann KP, DeCastro CM, Liu J, Moore JO, Bigner SH, Traweek ST. Neural cell adhesion molecule (CD56)-positive acute myelogenous leukemia and myelodysplastic and myeloproliferative syndromes. *Am J Clin Pathol*. 1997;107(6):653-660.

74. Monreal MB, Pardo ML, Pavlovsky MA, et al. Increased immature hematopoietic progenitor cells CD34+/CD38dim in myelodysplasia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2006;70(2):63-70. doi:10.1002/cyto.b.20088.

75. Xu F, Li X, Chang CK, et al. Establishment and validation of an updated diagnostic FCM scoring system based on pooled immunophenotyping in CD34+ blasts and its clinical significance for myelodysplastic syndromes. *PLoS One*. 2014;9(2):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0088706.

76. Kern W, Bacher U, Haferlach C, Alpermann T, Schnittger S, Haferlach T. Multiparameter flow cytometry provides independent prognostic information in patients with suspected myelodysplastic syndromes: A study on 804 patients. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2015;88(3):154-164. doi:10.1002/cyto.b.21224.

77. Westers TM, Alhan C, Chamuleau MED, et al. Aberrant immunophenotype of blasts in myelodysplastic syndromes is a clinically relevant biomarker in predicting response to growth factor treatment. *Blood*. 2010;115(9):1779-1784. doi:10.1182/blood-2009-08-239749.

78. Hellström-Lindberg E, Gulbrandsen N, Lindberg G, et al. A validated decision model for treating the anaemia of myelodysplastic syndromes with erythropoietin + granulocyte colony-stimulating factor: Significant effects on quality of life. *Br J Haematol*. 2003;120(6):1037-1046. doi:10.1046/j.1365-2141.2003.04153.x.

79. Alhan C, Westers TM, Eeltink C, Cali C, Ossenkoppele GJ, Van de Loosdrecht AA. Flow Cytometric Score Correlates with Clinical Response to Azacitidine In Intermediate-2 and High Risk Myelodysplastic Syndrome Patients. *Blood*. 2010;116(21):441 LP-441.