

Современная диагностика миелодиспластических синдромов взрослых (классификация ВОЗ 2008 г.)

М.А. Френкель, А.Д. Ширин

РЕФЕРАТ

Modern diagnosis of myelodysplastic syndromes in adults (classification WHO 2008)

M. A. Frenkel, A. D. Shirin

SUMMARY

Myelodysplastic syndromes (MDS) constitute heterogeneous group of haematopoietic neoplasms. Different clinical and haematologic features cause significant difficulties in MDS subtypes diagnosis. Due to established new important clinical, haematologic, cytogenetic and immunologic data signs of MDS were changed during the last 30 years. The recent WHO classification was published in 2008. Comparison of two WHO classifications of 2001 and 2008 may help to clarify the significance of MDS diagnostic criteria and subtypes characteristics of this disease.

Keywords:

MDS, myelodysplastic syndromes, classification.

N. N. Blokhin Cancer Research Center RAMS, Moscow

Контакты: marinaf@rinet.ru

Принято в печать: 16 сентября 2010 г.

Миелодиспластические синдромы (МДС) объединяют гетерогенную группу опухолевых заболеваний системы кроветворения. Разнообразные клинические и гематологические признаки болезни определяют значительные трудности в диагностике вариантов МДС. За последние 30 лет в связи с накоплением новых клинических, гематологических, цитогенетических и иммунологических данных номенклатура заболевания и его вариантов существенно изменялась. Последняя классификация ВОЗ была принята в 2008 г. Проведенное сравнение классификации ВОЗ 2008 г. с прежней классификацией 2001 г. позволяет уточнить значимость используемых диагностических критериев и охарактеризовать ряд новых вариантов МДС.

Ключевые слова

миелодиспластические синдромы, МДС, классификация.

ВВЕДЕНИЕ

Миелодиспластические синдромы (МДС) объединяют гетерогенную группу опухолевых заболеваний системы кроветворения, при которых поражается полипотентная стволовая клетка. При этом определяется дисплазия и неэффективный гемопоэз одной, двух или трех миелоидных линий. Процесс характеризуется одно-, двух- или трехростковой цитопенией. Диагностический уровень цитопении составляет для гемоглобина менее 100 г/л, для абсолютного числа нейтрофилов менее $1,8 \times 10^9$ /л, для тромбоцитов менее 100×10^9 /л. Для костного мозга характерна нормальная или повышенная клеточность. Однако в редких случаях число миелокариоцитов в костном мозге бывает сниженным. Характерная, но необязательная черта заболевания — пролиферация бластных клеток, однако не превышающая 20 % в костном мозге и/или крови. При увеличении количества миелобластов до 20 % и более диагностируется острый миелоидный лейкоз (ОМЛ).

МДС может возникать *de novo* или так же, как и острые лейкозы, вторично, т. е. в результате лечения химиопрепаратами и/или лучевой терапии предшествующих заболеваний [1, 2]. Ежегодная заболеваемость МДС в среднем составляет 3–5 случаев на 100 000 населения (средний возраст составляет 70 лет) и увеличивается с возрастом. Однако истинная заболеваемость МДС остается неизвестной, поскольку в ряде случаев клинические симптомы отсутствуют или выражены слабо, а диагностика представляет значительные трудности. Нередко выявление заболевания бывает случайным или при профилактических осмотрах.

Клинические проявления МДС неспецифичны, в связи с чем диагноз устанавливается на основании лабораторных исследований. Анемия — самый частый симптом МДС, она обнаруживается у 85–90 % больных, и жалобы больных чаще всего обусловлены ею. Не менее чем у 50 % пациентов наблюдается лейкопения за счет нейтропении, которая иногда служит причиной склонности к развитию

инфекционных заболеваний. Тромбоцитопения встречается примерно у 50 % больных, и некоторые пациенты впервые обращаются к врачу в связи с геморрагическим синдромом.

Хотя трансформация в ОМЛ — естественный путь во многих случаях МДС, процент больных, у которых заболевание прогрессирует, существенно варьирует при различных вариантах. Течение МДС у пациентов с рефрактерной анемией и рефрактерной анемией с кольцевыми сидеробластами (с унилинейной дисплазией) — продолжительное и индолентное, с низкой возможностью перехода в ОМЛ, а наиболее высокий процент трансформации в ОМЛ отмечается в случаях с повышением числа миелобластов до 5 % и более. Органомегалия (увеличение лимфоузлов, селезенки и печени) встречается крайне редко [3].

Диагностика МДС всегда вызывала большие трудности вследствие нечеткости клинической картины и разнообразия морфологических проявлений. По мере накопления данных за последние 30 лет и постепенного внедрения в диагностику различных методов исследования (цитохимических, гистологических, иммунологических, цитогенетических и др.) картина заболевания и его вариантов постепенно становилась более четкой. В 2008 г. вышла в свет последняя классификация Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в которой использован ряд новых положений по сравнению с предыдущей классификацией ВОЗ 2001 г. В связи с этим мы сочли интересным проанализировать отличия новой классификации от прежней, 7-летней давности.

Термин «МДС» был принят в 1982 г. по предложению ФАБ (франко-американо-британской) группы исследователей. Ими же была предложена первая классификация МДС [4]. Авторы выделили пять вариантов заболевания: рефрактерная анемия (РА), рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами (РАКС), рефрактерная анемия с избытком бластов (РАИБ) при числе бластов 5–20 %, рефрактерная анемия с избытком бластов, трансформированную в острый лейкоз, с числом бластов 21–30 % (РАИБ-Т) и хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ).

В 1992 г. нозологическая форма МДС была включена в Международную классификацию болезней 10-го пересмотра (МКБ-10).

На основании классификации ФАБ в 2001 г. была разработана ВОЗ-классификация МДС [5]. При этом ХММЛ был вынесен из раздела МДС и обозначен в составе миелодиспластических/миелолипролиферативных заболеваний. Случаи с числом бластов 20–30 % стали рассматриваться как ОМЛ, поскольку анализ клинических данных свидетельствовал об их сходном клиническом течении.

В 2007 г. в Международных стандартах диагностики была выделена особая форма нарушения гемопоэза, при которой у больных определялась цитопения одного и более ростков миелопоэза в течение 6 мес. и более, не обусловленная другими гематологическими и негематологическими заболе-

ваниями. При этом снижение содержания гемоглобина было менее 110 г/л, абсолютного числа нейтрофилов — менее $1,5 \times 10^9$ /л, тромбоцитов — менее 100×10^9 /л, но другие минимальные критерии МДС отсутствовали. Это состояние кроветворения было обозначено термином «идиопатическая цитопения неясного (неопределенного) значения» (idiopathic cytopenia of uncertain (undetermined) significance — ICUS) [6]. Было рекомендовано внимательное наблюдение за этой категорией больных с проведением регулярных исследований для подтверждения или исключения МДС.

КЛАССИФИКАЦИЯ ВОЗ 2008 г.

К 2008 г. накопился ряд клинико-морфологических данных, которые позволили пересмотреть и уточнить прежние положения, разработана новая версия классификации ВОЗ [7]. В табл. 1 представлено сравнение обеих классификаций.

Особое внимание в новой классификации было уделено морфологической оценке дисмиелопоэза и количественной характеристике уни-, би- и трехлинейной дисплазии, поскольку мультилинейная имеет существенно худшее прогностическое значение по сравнению с унилинейной [8]. Рекомендовано оценивать в процентах число аномальных клеток в каждой миелоидной линии и диагностировать дисгрануло-, дизэритро- и дисмегакариоцитопоэз при условии, что их количество более 10 %. При пересмотре классификации был принят ряд важных положений.

1. Существенные изменения коснулись варианта РА. Установлен вариант — рефрактерная цитопения с унилинейной дисплазией (РЦУД), в который вошли наряду с РА рефрактерная нейтропения (РН) и рефрактерная тромбоцитопения (РТ). Ранее РН и РТ рассматривались как МДС неклассифицируемый (МДС-Н).

2. Подтверждена обоснованность включения в группу больных рефрактерной анемией с избытком бластов-2 (РАИБ-2) случаев с числом бластов менее 20 %, но при наличии палочек Ауэра в миелобластах, поскольку этот вариант заболевания более агрессивный [9]. В то же время у больных с числом бластов менее 20 %, но со специфическими хромосомными аномалиями диагностируется не МДС, а ОМЛ.

3. Среди больных РАИБ выделена особая группа с фиброзом костного мозга и плохим прогнозом — РАИБ-Ф.

4. Уточнены принципы выделения МДС-Н: включены пациенты с панцитопенией и унилинейной дисплазией.

5. МДС у детей впервые был выделен в самостоятельную нозологическую форму.

В классификации ВОЗ 2008 г. дана сводная уточняющая таблица изменений крови и костного мозга, специфичных для каждого варианта заболевания, а также отмечен ряд признаков, которые могут встречаться при разных вариантах МДС (табл. 2).

Таблица 1. Классификации ВОЗ 2001 и 2008 гг.

Вариант МДС (ВОЗ, 2001)	Вариант МДС (ВОЗ, 2008)
Рефрактерная анемия (РА)	Рефрактерная цитопения с унилинейной дисплазией (РЦУД): Рефрактерная анемия (РА) Рефрактерная нейтропения (РН) Рефрактерная тромбоцитопения (РТ)
Рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами (РАКС)	Рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами (РАКС)
Рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией (РЦМД)	Рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией (РЦМД)
Рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией и кольцевыми сидеробластами (РЦМД-КС)	
Рефрактерная анемия с избытком бластов-1 (РАИБ-1)	Рефрактерная анемия с избытком бластов-1 (РАИБ-1)
Рефрактерная анемия с избытком бластов-2 (РАИБ-2)	Рефрактерная анемия с избытком бластов-2 (РАИБ-2)
Миелодиспластический синдром неклассифицируемый (МДС-Н)	Миелодиспластический синдром неклассифицируемый (МДС-Н)
Миелодиспластический синдром, ассоциированный с изолированной del(5q)	Миелодиспластический синдром, ассоциированный с изолированной del(5q) МДС у детей

Таблица 2. Изменения периферической крови и костного мозга при миелодиспластическом синдроме

Вариант МДС	Изменения крови	Изменения костного мозга
РЦУД (РА, РН, РТ)	Уни- или бицитопения ¹ Нет или мало бластов (< 1 %)²	Унилинейная дисплазия: > 10 % клеток миелоидной линии < 5 % бластов < 15 % кольцевых сидеробластов
РАКС	Анемия Нет бластов	≥ 15 % эритроидных предшественников являются кольцевыми сидеробластами Только эритроидная дисплазия < 5 % бластов
РЦМД	Цитопения(и) Нет или мало бластов (< 1 %)² Нет палочек Ауэра < 1 × 10 ⁹ /л моноцитов	Дисплазия ≥ 10 % клеток ≥ 2 миелоидных линий (нейтрофилов, и/или эритроидных предшественников, и/или мегакариоцитов) < 5 % бластов в костном мозге Нет палочек Ауэра ± 15 % кольцевых сидеробластов
РАИБ-1	Цитопения(и) < 5 % бластов Нет палочек Ауэра < 1 × 10 ⁹ /л моноцитов	Унилинейная или мультилинейная дисплазия 5–9 % бластов Нет палочек Ауэра
РАИБ-2	Цитопения(и) 5–19 % бластов Палочки Ауэра ³ ± < 1 × 10 ⁹ /л моноцитов	Унилинейная или мультилинейная дисплазия 10–19 % бластов Палочки Ауэра
МДС-Н	Цитопения < 1 % бластов²	Четкая дисплазия < 10 % клеток в одной или более миелоидных линиях, сопровождающаяся цитогенетическими аномалиями, принятыми в качестве диагностических при МДС < 5 % бластов
МДС, ассоциированный с изолированной del(5q)	Анемия Нормальное или повышенное число тромбоцитов Нет или мало бластов (< 1 %)	Нормальное или повышенное число мегакариоцитов с гипобулярными ядрами < 5 % бластов Изолированная цитогенетическая аномалия del(5q) Нет палочек Ауэра

¹ Бицитопения может иногда наблюдаться. Случаи с панцитопенией должны классифицироваться как МДС-Н.

² Если число миелобластов в костном мозге менее 5 %, но в крови 2–4 % миелобластов, заболевание классифицируется как РАИБ-1. Случаи РЦУД или РЦМД с 1 % миелобластов в крови должны быть классифицированы как МДС-Н.

³ Случаи с палочками Ауэра при том, что миелобластов в крови менее 5 % и в костном мозге менее 10 %, должны быть классифицированы как РАИБ-2.

Больные РЦУД (РА, РН, РТ) характеризуются унилинейной дисплазией и уни- или бицитопенией (но не панцитопенией), содержанием бластов в крови менее 1 %, в костном мозге менее 5 %. Аналогичная картина кроветворения наблюдается при РАКС, но для нее специфично увеличенное число кольцевых сидеробластов. Следует отметить, что кольцевые сидеробласты могут определяться и при РЦМД, но это не имеет диагностического и прогностического значения. Вариант, ассоциированный с del(5q) может характеризоваться, так же как и РЦУД, унилинейной эритроидной дисплазией. Особое внимание в классификации уделено диагностическому значению повышения уровня бластов в периферической крови при нормальном содержании их в костном мозге. В частности, наличие 1 % бластов в крови служит основанием для диагноза МДС-Н, а увеличение их количества до 4–5 % — РАИБ-1. При обнаружении палочек Ауэра в миелобластах, независимо от числа бластов, констатируется РАИБ-2. Следует подчеркнуть, что случаи панцитопении при отсутствии или только с унилинейной дисплазией, но с характерными цитогенетическими маркерами включены в вариант МДС-Н.

Поскольку оценка морфологических параметров кроветворных клеток в аспиратах костного мозга и мазках периферической крови считается наиболее значимым диагностическим критерием, рекомендуется при подсчете миелограммы исследовать не менее 500 ядерных клеток на мазках или отпечатках трепанобиоптата костного мозга и не менее 200 клеток в гемограмме. При выраженной цитопении для облегчения подсчета могут быть использованы мазки центрифугата крови. Установление степени дисплазии может представлять определенные проблемы и существенно зависит от качества мазков и их окраски. Следствием плохого качества препаратов может быть неправильная оценка отсутствия или наличия дисплазии, особенно при определении нейтрофильной зернистости. Мазки для оценки дисплазии должны быть приготовлены из свежих образцов, срок хранения образцов, содержащих коагулянт, не должен превышать 2 ч.

Диагностически значимая доля клеток с дисплазией составляет 10 % и более эритроидных предшественников и нейтрофилов в соответствующем пуле клеток. Дисплазия мегакариоцитов определяется как 10 % диспластических мегакариоцитов и более из не менее 30 подсчитанных. При РА и РАКС дисплазия в основном поражает эритроидную линию. Унилинейная дисплазия может также наблюдаться в нейтрофилах (РН) или мегакариоцитах (РТ), однако, как правило, этот процесс менее частый, чем унилинейная дисплазия эритроидной линии. При рефрактерной цитопении с мультилинейной дисплазией с или без увеличения количества кольцевых сидеробластов диспластические изменения наблюдаются в двух миелоидных линиях и более. Микромегакариоциты и многоядерные мегакариоциты — наиболее частые диспластические изменения в мегакариоцитарной линии.

Хотя у большинства больных с унилинейной дисплазией выявляется цитопения одной линии, классификация ВОЗ 2008 г. признает возможность бицитопении при унилинейных вариантах РЦУД и РАКС. У пациентов с РЦМД чаще определяются две цитопенические линии.

Главное предостережение при постановке диагноза — нельзя оценивать больных без знания клиники и предшествующей лекарственной терапии, в т. ч. ростовыми факторами, включая эритропозтин. Кроме того, цитопения(и) в отсутствие дисплазии не должна быть интерпретирована как МДС. Предположительный диагноз МДС может быть установлен в отсутствие дисплазии, если выявляются специфические цитогенетические аномалии. В настоящее время персистирующая цитопения в отсутствие дисплазии и без специфических цитогенетических аномалий рассматривается как предположительное доказательство МДС, по типу описанной выше идиопатической цитопении неизвестного значения (ICUS). Гематологический и цитогенетический статус больных в неясных случаях должен быть тщательно мониторирован.

МОРФОЛОГИЯ. ХАРАКТЕРИСТИКА ДИСПЛАЗИИ КЛЕТОК МИЕЛОИДНЫХ ЛИНИЙ

Эритропоэз. В крови характерна картина нормохромной нормоцитарной или нормохромной макроцитарной анемии. Нарушение морфологических особенностей эритроцитов — одно из наиболее частых проявлений дизэритропоэза. Анизоцитоз и анизохромия клеток определяются у большинства пациентов. При этом выявляются разнообразны признаки нарушения формы эритроцитов: пойкилоцитоз, овалоцитоз, эллиптоцитоз, стоматоцитоз и акантоцитоз, а также тельца Жолли (остатки ядер), кольца Кебота (образования из митотических нитей или ядерной мембраны), базофильная пунктация (результат преципитации рибосом). Наличие нормоцитов в крови обнаруживается у $1/2-1/3$ пациентов.

В аспиратах костного мозга наиболее частым признаком диспоэза служит мегалобластоидный характер эритроидных предшественников (рис. 1).

При этом определяются макронормобласты как с базофильной, так и оксифильной окраской цитоплазмы. Встречаются клетки с многодольчатыми или фрагментированными ядрами. Цитоплазма нормобластов окрашена неравномерно. Клетки соединяются ядерными мостиками вследствие нарушенного митоза. Наблюдаются двух- и трехъядерные формы. В клетках эритрона нарушена утилизация железа, изменен углеводный и ферментный обмен. Эритроидные предшественники с аномальным накоплением железа в митохондриях, включая отложения митохондриального ферритина, обозначаются как кольцевые сидеробласты. Их диагностика базируется на наличии 5 и более сидерофильных гранул, расположенных венчиком вокруг $2/3$ окружности ядра (рис. 2).

Особенностью дизэритропоэза служит появление в нормобластах ферментов, в норме определяемых в клетках гранулоцитарного ряда, — пероксидазы и щелочной фосфатазы, а также увеличение содержания ШИК-положительного вещества.

Дисплазия эритропоэза сама по себе не означает наличие клонального заболевания. Причинами дисплазии могут быть нарушения питания, отравления или другие факторы, вызывающие морфологические изменения, например дефицит витамина B_{12} и фолиевой кислоты, некоторые используемые лекарства и биологические агенты. Кроме того, врожденные гематологические нарушения, в т. ч. врожденная дизэритропоэтическая анемия, также могут быть причиной дисэритропоэза. Вирусная инфекция, особенно вызванная парвовирусом В19, может быть связана с эритробластопенией с гигантскими мегалобластоидными эритробластами. Применение иммуносупрессивного препарата микофенолата мофетила также может ассоциироваться с эритробластопенией. Значительные нарушения эритроидного роста часто определяются в процессе цитостатической терапии у пациентов с онкологическими заболеваниями.

Число ретикулоцитов при МДС обычно нормальное или слегка пониженное. Ретикулоцитоз может быть обусловлен появлением патологической фракции длительно живущих клеток. В других случаях увеличение количества ретикулоцитов может быть обусловлено гемолизом дефектных эритроцитов.

Гранулопоэз. Диспластические изменения гранулоцитов определяются в клетках крови и костного мозга, однако в последнем случае они выражены более отчетливо. Дисгранулопоэз проявляется в основном в виде ядерной гипосегментации и гипогрануляции, наличия пельгероидных форм (рис. 3).

Отмечают нарушение соотношения зрелых и молодых форм гранулоцитов и, соответственно, колебания индекса созревания гранулоцитов.

Определенные трудности возникают при дифференциальной диагностике элементов гранулоцитарного и моноцитарного рядов. Иногда ядра моноцитов имеют гиперсегментированную форму, а цитоплазма резко базофильна. В других случаях клетки с округлыми ядрами и наличием включений трудно дифференцировать с моноцитами и миелоцитами. Они носят название миеломоноцитов. Только наличие активности неспецифической эстеразы, ингибируемой натрия фторидом, позволяет установить моноцитарную природу этих элементов.

Наряду с морфологическими в нейтрофилах выявляются также ферментные нарушения. У 25 % больных нами было констатировано дефицит щелочной фосфатазы, у 10 % — пероксидазы (рис. 4).

Функциональные исследования нейтрофилов и моноцитов свидетельствуют о значительном нарушении фагоцитарной и антибактериальной функций этих клеток. Следует отметить, что при продвинутых формах (РАИБ) они выражены сильнее, чем при РА и РН. Наличие пельгероидных форм нейтрофилов с гиполобулярными ядрами сочетается со специфической цитогенетической аномалией $del(17p)$.

Следует помнить, что диспластические изменения клеток нейтрофильного ряда могут в редких случаях встречаться у здоровых лиц. В частности, это бывает при истинной аномалии Пельгера. Кроме того, существует ряд причин, при которых возникают диспластические изменения нейтрофилов: вирусные инфекции, поражения печени, цитостатическая или иная терапия. Однако число патологических форм при этом, как правило, не превышает 10 % в нейтрофильной популяции. Лечение ко-тримоксазолом может быть причиной гиполобулярности ядер нейтрофилов, неотличимой от изменений, наблюдаемых при МДС.

Тромбоцитопоэз. В мазках крови наблюдается выраженный анизоцитоз тромбоцитов, определяются их гигантские формы, обломки, фрагменты ядер мегакариоцитов. Наряду с морфологическими нарушениями тромбоцитов у пациентов наблюдается удлинение времени кровотечения, связанное с нарушением агрегации тромбоцитов.

В аспиратах костного мозга число мегакариоцитов существенно варьирует и может быть повышено или снижено. Дисплазия мегакариоцитов — частая аномалия при МДС. Изменения касаются ядер и цитоплазмы клеток. В ряде случаев ядра в мегакариоцитах располагаются разобщенно — так называемые разъединенные мегакариоциты — или обнаруживаются одно- и двухъядерные клетки либо мелкие (< 12 мкм) одноядерные элементы (рис. 5).

Цитоплазма мегакариоцитов может быть гипогранулярной или, наоборот, содержать аномальные крупные гранулы, четко окрашенные в реакции на неспецифическую эстеразу (рис. 6).

Гиполобулярные, двух- или многоядерные мегакариоциты, а также микромегакариоциты служат наиболее надежными и четкими признаками мегакариоцитарной дисплазии. Дисплазированные мегакариоциты могут быть выявлены в трепанобиоптатах, диагностический порог их также составляет 10 %. Как правило, дисмегакариоцитопоэз коррелирует с аномалией хромосомы 3 ($3q21q26$) и с изолированной $del(5q)$. Цитогенетические данные могут играть важную роль при дифференциальном диагнозе МДС и хронической аутоиммунной тромбоцитопении.

Бластные клетки. Важное значение для разделения МДС на латентные и продвинутые формы имеет определение количества бластных клеток в крови и костном мозге. Характеристика бластных клеток включает оценку размера

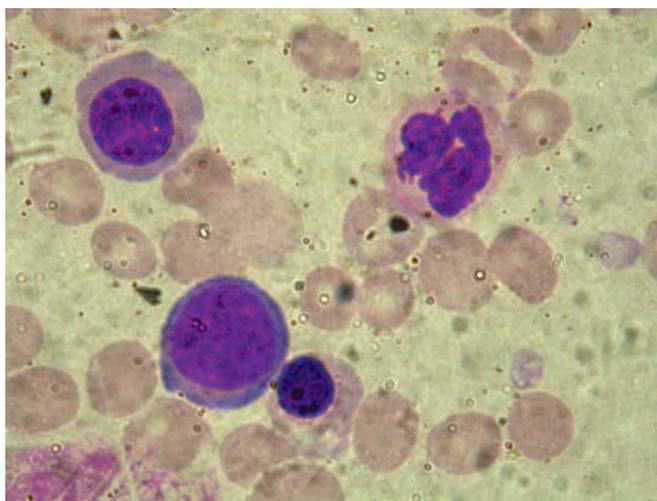


Рис. 1. Мегалобластоидные формы нормобластов

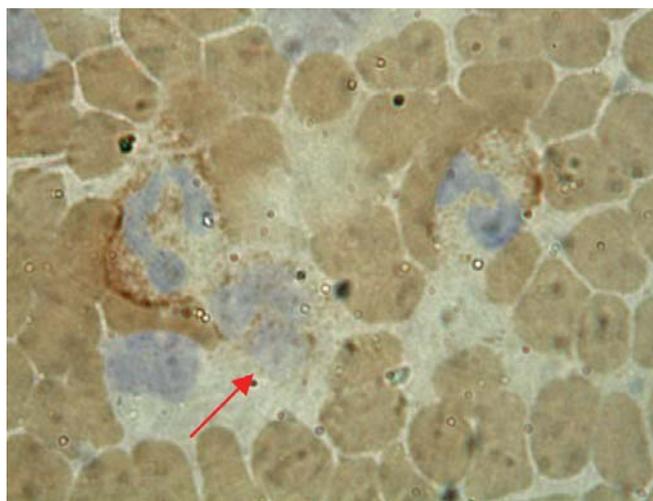


Рис. 4. Дефицит пероксидазы в нейтрофилах

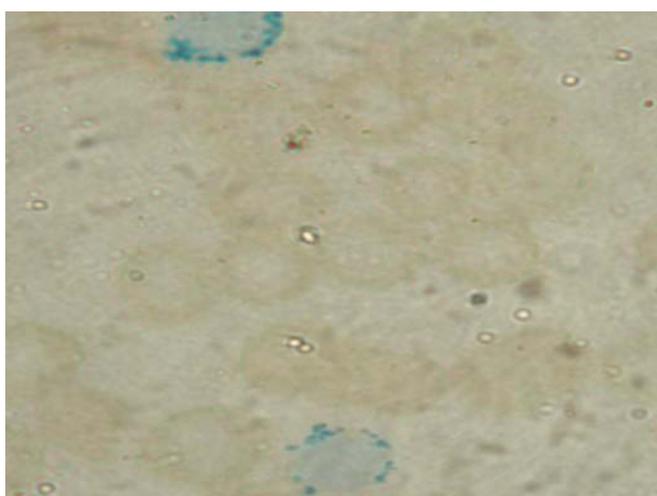


Рис. 2. Кольцевые сидеробласты

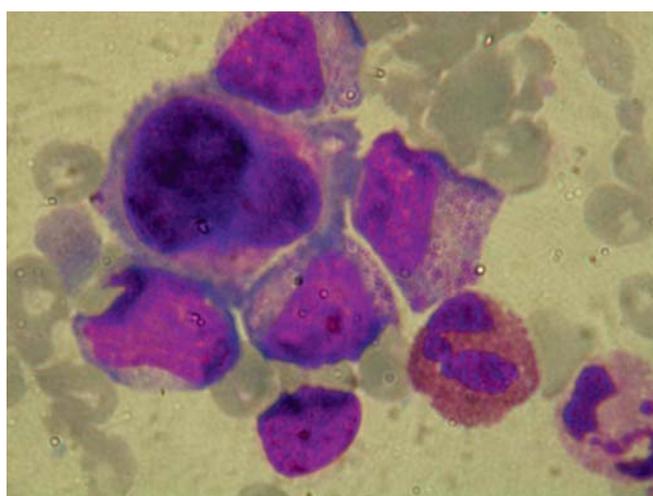


Рис. 5. Двухъядерный мегакариоцит

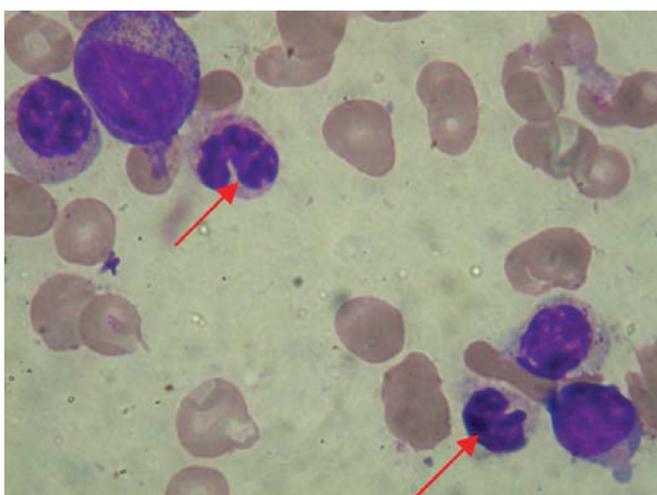


Рис. 3. Пельгероидные формы нейтрофилов

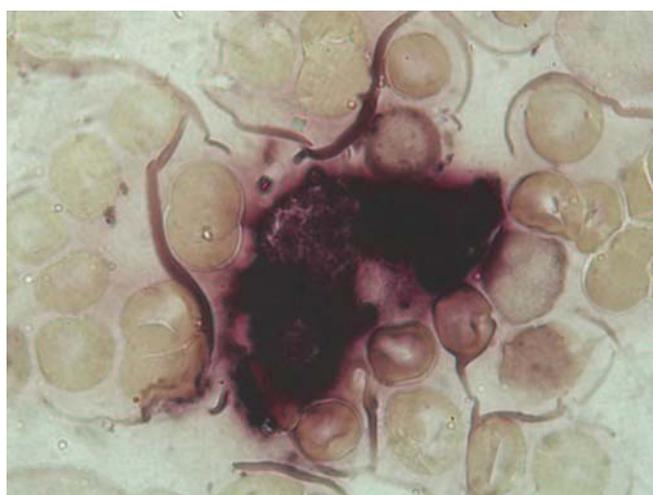


Рис. 6. Микромегакариоцит, окраска на неспецифическую эстеразу

клетки, формы и структуры ядер, окраску цитоплазмы и ее включений. Следует отметить, что бласты при МДС отличаются значительной гетерогенностью, поэтому среди них выделяют два типа клеток в зависимости от степени их морфологической дифференцировки: миелобласты без или со слабой гранулированностью и бласты с высоким содержанием зернистости.

Особые трудности в диагностике МДС представляют наблюдения с увеличением количества нормобластов до 50 % и более в миелограмме [10]. Дифференциальный диагноз колеблется между МДС и вариантами ОМЛ. Среди членов комитета ВОЗ была дискуссия по вопросу, следует ли классифицировать МДС в соответствии с процентом бластов среди всех ядерных клеток костного мозга или

Таблица 3. Дифференциальный диагноз миелодиспластического синдрома при числе эритроидных предшественников (нормобластов) в костном мозге 50 % и более

Эритроидные предшественники	Изменения крови/костного мозга	Другие изменения	Диагноз
≥ 50 %	≥ 20 % бластов в крови или среди всех ядерных клеток костного мозга	Случаи, имеющие признаки ОМЛ с миелодиспластическими изменениями	ОМЛ с миелодиспластическими изменениями
≥ 80 % незрелых эритроидных предшественников с минимальным созреванием	Мало или отсутствуют миелобласты	Минимальный или отсутствующий гранулоцитарный росток	Чистый (истинный) эритроидный лейкоз
≥ 50 %	< 20 % бластов в крови, < 20 % бластов среди всех ядерных клеток в костном мозге	≥ 20 % бластов среди всех незэритроидных клеток в костном мозге	Острый эритромиелоз
≥ 50 %	< 20 % бластов в крови, < 20 % бластов среди всех ядерных клеток костного мозга	< 20 % бластов среди всех незэритроидных клеток в костном мозге	МДС. Варианты МДС в соответствии с числом бластов в крови или процентом бластов среди всех незэритроидных клеток костного мозга

в соответствии с процентом бластов среди незэритроидных клеток костного мозга, а также по вопросу, надо ли учитывать наличие немиелоидных элементов (плазматических клеток и лимфоцитов) при подсчете незэритроидных клеток. Большинство экспертов рекомендовали классифицировать МДС у больных с высоким нормобластозом в костном мозге в соответствии с числом бластов среди всех незэритроидных клеток в миелограмме. Возможности дифференциального диагноза в случаях, когда количество эритроидных предшественников составляет 50 % ядерных клеток костного мозга и более, представлены в табл. 3.

Как видно из данных табл. 3, дифференциальный диагноз колеблется между МДС и различными вариантами ОМЛ. МДС устанавливают только в тех случаях, когда число бластов в крови менее 20 % и менее 20 % в костном мозге среди всех незэритроидных клеток.

ДРУГИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Иммунофенотипирование

Опубликованные исследования иммунофенотипирования методом проточной цитометрии были нацелены на определение размера и иммунофенотипа бластной популяции и оценку созревания клеток миелоидной линии. Наиболее диагностически важными в этих исследованиях были оценка клеток CD34+, применение балльных систем, использование многоцветного анализа со сравнением с нормальными реактивными клетками крови и костного мозга [11].

Была установлена корреляция между процентом бластов, определяемым рутинно морфологически на мазках костного мозга или на иммуногистохимических препаратах, и процентом клеток CD34+ при проточной цитометрии. Тем не менее в некоторых случаях, в т. ч. при выраженном миелофиброзе или при разведении образцов, констатировано существенное расхождение. Вследствие этого оценка клеток CD34+ не должна заменять подсчет миелограммы. Однако проточная цитометрия может быть информативной, если определяются клетки CD34+ с аномальным иммунофенотипом, что служит дополнительным подтверждением дисплазии. Появление патологической популяции клеток CD34+ или CD117+ свидетельствует об эволюции заболевания [12].

Созревание элементов эритропоэза, дифференцировка гранулоцитов и моноцитов в нормальном/реактивном костном мозге и в крови тщательно описаны с использованием 4-цветного цитофлуориметра. Эритроидные аномалии, определяемые Н-ферритином, CD71, CD105 в гликофорин-А-позитивных ядерных клетках, предсказывают морфологическую эритроидную дисплазию с 98%-й чувствительностью. Аберрантное созревание гранулоцитов связано с морфологической дисплазией и аномальной цитогенетической картиной в 90 % случаев [13].

При дисплазиях, пограничных по морфологическим признакам или цитогенетическим аномалиям, результаты проточной цитометрии значимы только в тех случаях, когда выявлены три и более аберрантных признака в созревании эритроидной, гранулоцитарной или моноцитарной линии. Один аберрантный признак не является диагностическим. Случаи с неубедительными морфологическими и цитогенетическими признаками при наличии трех и более аберрантных признаков при иммунофенотипировании должны быть пересмотрены через несколько месяцев для определения морфологических и цитогенетических критериев МДС.

Генетическая характеристика

Цитогенетические и молекулярные исследования играют большую роль в диагностике МДС для определения клональности, прогноза и установления цитогенетических, морфологических и клинических взаимосвязей. Клональные цитогенетические аномалии выделяются приблизительно в 50 % случаев МДС (табл. 4).

Таблица 4. Неслучайные хромосомные аномалии и их частота при первичных и вторичных миелодиспластических синдромах

Аномалии	Первичные МДС	Вторичные МДС
Несбалансированные		
+8*	10 %	
-7 или del(7q)	10 %	50 %
-5 или del(5q)	10 %	40 %
del(20q)*	5–8 %	
-Y*	5 %	
i(17q) или t(17p)	3–5 %	
-13 или del(13q)	3 %	
del(11q)	3 %	
del(12p) или t(12p)	3 %	
del(9q)	1–2 %	
idic(X)(q13)	1–2 %	
Сбалансированные		
t(11;16)(q23;p13.3)		3 %
t(3;21)(q26.2;q21.1)		2 %
t(1;3)(p36.3;q21.2)	1 %	
t(2;11)(p21;q23)	1 %	
inv(3)(q21;q26.2)	1 %	
t(6;9)(p23;q34)	1 %	

* Наличие этой аномалии в качестве единственной при отсутствии морфологических критериев не дает основания для постановки диагноза МДС. При наличии персистирующей цитопении неизвестного происхождения, а также других аномалий кариотипа и отсутствии убедительных морфологических признаков МДС диагностируется предположительно.

Случаи с изолированной del(5q), встречающиеся преимущественно у женщин, характеризующиеся гиполобулированными или нелобулированными ядрами мегакариоцитов, рефрактерной макроцитарной анемией, нормальным или повышенным числом тромбоцитов и благоприятным клиническим течением, рассматриваются как отдельный вариант в классификации МДС.

Утрата 17p ассоциируется с псевдопельгеровской аномалией, мелкой вакуолизацией нейтрофилов, мутацией *TP53* и неблагоприятным клиническим течением, сходным с вторичным МДС. Сложные нарушения кариотипа (≥ 3 аномалий), как правило, включают хромосому 5 и/или 7 [$-5/\text{del}(5q)$, $-7/\text{del}(7q)$] и связаны с неблагоприятным клиническим течением. Некоторые другие цитогенетические изменения ассоциируются с характерными морфологическими аномалиями: изолированная $\text{del}(20q)$ — с поражением эритроидных клеток и мегакариоцитов, аномалия хромосомы 3 [$\text{inv}(3)(q21q26.2)$ или $t(3;3)(q21;q26)$] — с увеличением аномальных мегакариоцитов.

Некоторые цитогенетические аномалии, выявленные при МДС в виде единственной аномалии, такие как $-Y$, $+8$ или $\text{del}(20q)$, не являются определяющими доказательствами этого заболевания в отсутствие морфологических критериев. Другие аномалии при наличии рефрактерной цитопении, но без признаков дисплазии считаются предположительными для диагноза МДС. В классификации ВОЗ 2008 г. рекомендовано тщательное наблюдение за этими больными для выявления морфологических проявлений МДС. Метод флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) увеличивает диагностические возможности мониторинга таких пациентов, у которых однократно была идентифицирована аномалия.

Классификацией ВОЗ 2008 г. выделен **гипопластический МДС**, по всей видимости учитывая незначительную частоту этого варианта заболевания, морфологические признаки и особенности терапии. Небольшое число больных МДС (10 %) имеют гипопластический костный мозг, эти случаи надо отличать от гипопластической анемии. При диагнозе гипопластического МДС важно исключить токсическую миелопатию, вирусные и аутоиммунные заболевания.

ВАРИАНТЫ МДС (КЛАССИФИКАЦИЯ ВОЗ 2008 г.)

Рефрактерная цитопения с унилинейной дисплазией: рефрактерная анемия, рефрактерная нейтропения, рефрактерная тромбоцитопения

РА. В периферической крови — нормохромная, макро- или нормоцитарная анемия. В эритроцитах определяются признаки дисплазии, выраженные в различной степени. В костном мозге число миелокариоцитов, как правило, в пределах нормы. Содержание эритроидных предшественников в миелограмме варьирует от сниженного до отчетливо повышенного, дизэритропоэз выражен слабо или умеренно. Число диспластических эритроидных предшественников 10 % и более. Могут встречаться кольцевые сидеробласты, но их число должно быть менее 15 %. Нейтрофилы и тромбоциты в норме по количеству и морфологии, изредка определяются слабовыраженная нейтропения и тромбоцитопения. Бласты в крови обнаруживаются редко, а если выявляются, то в количестве менее 1 %.

РН. Этот вариант МДС характеризуется наличием 10 % диспластических нейтрофилов и более в крови или костном мозге и диагностически незначимой дисплазией в других миелоидных линиях ($< 10\%$). Содержание гранулоцитов в костном мозге, так же как и элементов красного ряда, может значительно варьировать.

РТ. В мазках крови определяется тромбоцитопения. Дисплазия выражается в анизоцитозе тромбоцитов и дисмегакариоцитопоэзе. Число диспластических мегакариоцитов 10 % и более из не менее 30 подсчитанных. Бласты в крови отсутствуют, в костном мозге составляют менее 5 %. В эритроидном и гранулоцитарном ростках диспластические формы составляют менее 10 %.

Рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами

РАКС характеризуется нормохромной нормо- или макроцитарной анемией и дисплазией только одной эритроидной линии. В крови может быть диморфная популяция эритроцитов, большая часть — нормохромная, меньшая — гипохромная. Бласты в крови отсутствуют.

В аспирате костного мозга число бластов менее 5 %, увеличено количество эритроидных предшественников с дисплазией, включая дольчатость ядер и мегалобластидные изменения. Диспластические формы гранулоцитов и мегакариоцитов костного мозга составляют менее 10 % клеток. При окраске на сидерофилию выявляются кольцевые сидеробласты. Их количество варьирует от 15 до 90 %. Часто присутствуют макрофаги, нагруженные железом.

Нарушение метаболизма железа в митохондриях может быть результатом соматической мутации или делеции в ядерной либо митохондриальной ДНК. У некоторых больных РАКС идентифицирована точечная мутация митохондриальной ДНК, однако не установлено, является ли она причиной сидеробластного фенотипа. Потенциальным аналогом может служить врожденный синдром Пирсона, при котором наблюдается макроцитарная сидеробластная анемия, нейтропения, тромбоцитопения и поражение поджелудочной железы. Кольцевые сидеробласты часто отмечаются при других вариантах МДС, например при РАИБ. Когда присутствует 15 % сидеробластов и более, но есть дисплазия других линий ($\geq 10\%$ клеток) кроме эритроидной, число бластов менее 1 % в крови и менее 5 % в костном мозге без палочек Ауэра, то классифицируется РЦМД. У этих пациентов выживаемость ниже, чем при РАКС.

Кроме того, проводится дифференциальный диагноз РАКС с первичным дефектом синтеза гема (как например, сидеробластная анемия вследствие X-связанного наследственного дефекта дельта-аминолевулинатсинтетазы). При РАКС протопорфирин IX, конечный продукт синтеза порфирина, не снижен.

Неопухолевые причины сидеробластоза — алкоголь, токсины (свинец) и лекарственные средства (изониазид), увеличение содержания цинка с соответствующим дефицитом меди и врожденная сидеробластная анемия.

Рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией

При варианте РЦМД определяется две или более диспластических миелоидных линий при наличии одной цитопении или более. В крови бластов менее 1 %, в костном мозге менее 5 %, палочки Ауэра отсутствуют, моноцитов менее $1 \times 10^9/\text{л}$. Костный мозг гиперклеточный. Признаки дисплазии грануло-, эритро- и мегакариоцитопоэза аналогичны характеристикам, описанным выше. В некоторых случаях в миелограмме отмечается увеличение количества эритроидных предшественников с признаками диспоэза. Их вакуолизация обычно слабо выражена, вакуоли четко отличаются от вакуолей, определяемых при токсических поражениях, в т. ч. алкоголизме. Цитоплазма и вакуоли окрашиваются при ШИК-реакции. Число кольцевых сидеробластов вариабельно, в отдельных случаях превышает 15 %.

Рефрактерная анемия с избытком бластов

Диагностической особенностью этого варианта является увеличение количества бластов: 5–19 % в костном мозге и/или 2–19 % бластов в крови. Выделяют две категории этого варианта:

РАИБ-1 (5–9 % бластов в костном мозге или 2–4 % — в крови);

РАИБ-2 (10–19 % бластов в костном мозге или 5–19 % — в крови).

У больных РАИБ при наличии палочек Ауэра всегда диагностируется РАИБ-2, независимо от числа бластов. РАИБ-1 и РАИБ-2 различаются по общей выживаемости и частоте трансформации в острый лейкоз.

В мазках крови обнаруживаются аномалии всех трех миелоидных линий, включая анизопойкилоцитоз эритроцитов, крупные, гигантские и гипогранулярные тромбоциты, нарушение цитоплазматической зернистости и ядерной сегментации нейтрофилов. Костный мозг обычно гиперклеточный. Степень выраженности дисплазии клеток разных миелоидных линий варьирует. Эритроидный росток может быть расширен с макроцитарными/мегалобластоидными изменениями. Гранулоцитарный росток также иногда бывает увеличен и показывает разную степень дисплазии с наличием псевдопельгеровских форм, гиперсегментации ядер. Мегакарициты варьируют количественно, но, как правило, их число находится в пределах нормальных значений или повышено. Мегакарициты часто образуют скопления. Дисмегакарицитопоз выражается наличием аномальных форм преимущественно малого размера, включая микромегакарициты, также определяются формы с разьединенными ядрами.

Для трепанобиоптата костного мозга характерны отличия от нормальной гистотопографии: предшественники эритропоэза и мегакарициты расположены ближе к паратрабекулярной области, где в норме локализуются гранулоциты.

Трепанобиоптат может быть использован для установления количества бластов, особенно в случаях неоптимальных мазков аспирата при гипоклеточности и/или фиброзе костного мозга. Бласты при РАИБ имеют тенденцию образовывать кластеры или агрегаты вне костных трабекул и сосудистых структур. Иммуногистохимическое исследование на бласты CD34+ может помочь их идентификации.

РАИБ с фиброзом (РАИБ-Ф). Около 15% больных имеют значительную степень ретикулинового фиброза костного мозга. Эти случаи классифицируются как РАИБ-Ф. Поскольку отсутствует консенсус исследователей по определению необходимой степени фиброза при миелодиспластических синдромах с фиброзом (**МДС-Ф**), остается неясным, представляет ли фиброз независимый прогностический признак. В последних работах определяют МДС-Ф при наличии грубого диффузного ретикулинового фиброза с либо без сопутствующего коллагенового фиброза, связанного с дисплазией не менее двух миелоидных линий. Большинство случаев МДС-Ф — это РАИБ-Ф. Поскольку у этой категории больных аспираты часто неинформативны, наличие повышения числа бластов может быть подтверждено при иммуногистохимическом исследовании с моноклональными антителами к CD34. Характерным признаком РАИБ-Ф служит увеличение количества мегакарицитов с различным по размеру спектром клеток (включая микромегакарициты) и высокая степень дисплазии. Случаи РАИБ-Ф могут быть морфологически близки панмиелозу с миелофиброзом, ранее расцениваемому как острый (злокачественный) миелофиброз. Он отличается острым началом с лихорадкой и болью в костях. Поскольку фиброз костного мозга может выявляться при миелолиферативных новообразованиях (МЛН), при реактивных гемопозитических состояниях (так называемые ВИЧ-ассоциированные миелопатии), то должны быть исключены указанные причины.

МДС с изолированной del(5q)

Этот вариант МДС, ранее называемый «синдром 5q-», используется для обозначения случаев с макроцитарной анемией, нормальным или повышенным числом тромбоцитов и гипоплазией эритроидного роста в костном мозге. Он

встречается часто у женщин при медиане возраста 67 лет. Число бластов не превышает 5% в костном мозге и менее 1% в периферической крови. Большинство симптомов связано с анемией, которая обычно имеет макроцитарный характер. Тромбоцитоз выявляется у $1/3-1/2$ больных, тромбоцитопения не наблюдается.

Костный мозг гипер- или нормоклеточный, как правило, с эритроидной гипоплазией. Число мегакарицитов повышено или нормально, определяются диспластические одноядерные или гиполобулярные формы. В противоположность этому дисплазия эритроидной и гранулоцитарной линий не выражена.

Единственная цитогенетическая аномалия выражается в делеции хромосомы 5. Размер этой делеции и точки разрывов варьируют, однако регион q31-q33 всегда утрачен. В этом регионе предполагается потеря гена опухолевой супрессии. Кроме того, причину заболевания предположительно связывают с утратой гена *PRSI4* и дефектом функции рибосомного белка, который он кодирует. Пациенты с del(5q), у которых определяются другие хромосомные аномалии (за исключением утраты Y-хромосомы) или избыток бластов, должны быть исключены из этой категории. В небольших группах лиц с изолированной делецией (5q) обнаруживается одновременно мутация *JAK-2 V617F*. До тех пор пока данные по клиническому течению аналогичных случаев не будут собраны и не выяснен ответ на терапию, в частности леналидомидом, рекомендовано классифицировать их как МДС с изолированной del(5q), а не как МДС/МЛН, но отмечать наличие мутации *JAK-2* в диагнозе.

Миелодиспластический синдром неклассифицируемый

МДС-Н — вариант МДС, при котором отсутствуют признаки, свойственные для какого-либо варианта МДС. Установлено три морфологических критерия для включения пациентов в эту категорию.

1. Рефрактерная цитопения с уни- или мультилинейной дисплазией (РЦУД или РЦМД), но с 1% бластов в периферической крови.

2. Мультилинейная дисплазия с панцитопенией, в отличие от РЦМД, для которой специфичны только уни- или бицитопения.

3. Персистирующая цитопения(и) с 1% или менее бластов в крови и менее 5% в костном мозге, с нечеткой дисплазией (< 10% клеток одной или более миелоидных линий), а также с цитогенетическими аномалиями, считающимися предположительными доказательствами МДС.

Пациенты с МДС-Н должны быть тщательно отслежены для установления перехода в более конкретный вариант МДС. В этих случаях диагноз варианта соответственно реклассифицируется. Частота перехода в ОМЛ, так же как и выживаемость, при этом варианте пока неизвестна.

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, современная диагностика вариантов МДС и дифференциальная диагностика с другими нарушениями гемопоэза базируются на комплексе лабораторных исследований крови, аспиратов и трепанобиоптатов костного мозга. Следует подчеркнуть, что цитопения и большинство диспластических признаков непатогномоничны для МДС. Они могут встречаться при различных нозологических формах, в т. ч. при анемиях различной этиологии, интоксикации тяжелыми металлами, алкогольном поражении печени, различных вирусных инфекциях (инфекционный мононуклеоз, инфекционный лимфоцитоз, гепатиты, цитомегаловирусная инфекция), пароксизмальной ночной гемоглобинурии, на-

следственной форме болезни Пельгера, СПИДе, а также вследствие медикаментозной терапии. Диспоз обнаруживается также при различных других гемобластозах: ОМЛ, МДС/МПН, при терминальных стадиях МПН.

В алгоритм обследования пациентов с подозрением на МДС включены клинические, морфологические, цитохимические, биохимические, иммунофенотипические, цитогенетические, молекулярно-биологические, вирусологические и другие исследования крови и костного мозга, в т. ч.:

1) общий клинический анализ крови с подсчетом тромбоцитов, ретикулоцитов, оценкой количественных показателей элементов красной крови (МСV, МСН, МСНС) на гематологическом анализаторе, подсчетом гемограммы на 200 клеток с оценкой морфологических особенностей клеток крови;

2) исследование аспирата костного мозга с определением клеточности на гематологическом анализаторе, подсчетом миелограммы с не менее чем 500 клеток, числа сидеробластов, иммунофенотипического и цитогенетического исследований;

3) трепанобиопсия костного мозга;

4) определение содержания витамина В₁₂, фолатов, ферритина, железа, меди в сыворотке;

5) документация частоты переливаний крови, установление трансфузионной зависимости.

Представленные данные свидетельствуют о нерешенности многих диагностических проблем МДС. Недостаточно точны критерии морфологической оценки признаков дисплазии элементов кроветворения, что приводит к существенному разбросу данных о частоте вариантов заболевания в литературных источниках. Остаются дискуссионными параметры иммунофенотипирования и гистологического исследования трепанобиоптатов.

В связи с этим в последние годы после опубликования классификации ВОЗ 2008 г. продолжают исследования в ряде крупных клиник на больших группах больных с целью установить более точные диагностические критерии и оценить их значимость для прогноза. Так, детальный анализ морфологических критериев на большом числе наблюдений (2773 пациента) был проведен германской группой. Дизэритропоэз был констатирован в виде нарушения созревания клеток (57 % случаев), мегалобластности (56 %), ядерных нарушений (40 %), многоядерности (35 %). При дисгранулопоэзе левый сдвиг определялся у 54 % больных, псевдопельгеровские формы нейтрофилов — у 39 %, гипогранулярность — у 37 %. Наиболее частыми признаками дисмегакариоцитопоэза были дефект созревания (55 % наблюдений), одноядерные формы (35 %), гиперсегментация ядер (32 %), микромегакариоциты (29 %). Диагностически важными оказались следующие признаки: частота гипогранулярных форм, псевдопельгеровских форм, микромегакариоцитов и одноядерных мегакариоцитов. Эти 4 параметра в сочетании с числом бластов крови и костном мозге позволяют четко охарактеризовать варианты МДС в соответствии с классификацией ВОЗ 2008 г. у большинства больных [14].

На 1-й Европейской рабочей конференции LeukemiaNet в 2009 г., посвященной стандартизации параметров цитоф-

люориметрии при МДС, были установлены минимальные диагностические комбинации антител для определения aberrантного иммунофенотипа и дисплазии. Данные цитофлюориметрии образцов с aberrантным фенотипом коррелировали с морфологическими параметрами вариантов МДС и дополняли прогностические системы. Однако рабочая группа в заключение сделала вывод о необходимости в будущем валидации маркеров и стандартизации данных многоцентровых исследований. Особый интерес сегодня представляют перспективные работы по определению особенностей иммунофенотипа наиболее сложных в диагностическом отношении вариантов МДС (РЦУД и РЦМД) [15].

В заключение можно сказать, что классификация ВОЗ 2008 г. достаточно сложна для ее практического применения. Существуют некоторые разногласия в частоте цитопений при вариантах МДС при сопоставлении данных разных таблиц, приводимых в указанной классификации. Эти недостатки отражают нерешенность проблемы диагностики МДС. Вероятно, через какой-то промежуток времени в новом варианте эти недостатки будут устранены за счет уточнения критериев или использования новых методических подходов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rund D., Krichevsky S., Bar-Kohen S. et al. Therapy-related leukemia: clinical characteristics and analysis of new molecular risk factors in 96 adult patients. *Leukemia* 2005; 19: 1919–28.
2. Friedberg J.W. Secondary malignancies after therapy of indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2008; 93(3): 336–8.
3. Ширин А.Д., Френкель М.А. Миелодиспластические синдромы. В кн. Клиническая онкогематология. Под ред. М.А. Волковой. М.: Медицина, 2007: 502–52.
4. Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T. et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* 1982; 51: 189–99.
5. Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W. (eds.) World Health Organization Classification of tumor. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC-press, 2001; 351.
6. Valent P., Horny H-P., Bennett J.M. et al. Definition and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk. Res.* 2007; 31: 727–36.
7. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. (eds.) WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC-press, 2008; 439.
8. Malcovati L., Della Porta M.G., Pascutto C. et al. WPSS, a dynamic prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23(30): 7594–603.
9. Willis M.S., McKenna R.W., Peterson L.C. et al. Low blast count myeloid disorders with Auer rods: a clinicopathologic analysis of 9 cases. *Am. J. Clin. Pathol.* 2005; 124(2): 191–8.
10. Bennet J.M., Catovsky D., Daniel M.-T. et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia: a report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann. Intern. Med.* 1985; 103: 620–5.
11. Cazzola M. Flow cytometry immunophenotyping for diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 2009; 94: 1041–3.
12. Mattaraz S., Lopez A., Barrena S. et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia* 2008; 22: 1175–83.
13. Loken M.R., Loosdrecht A., Ogata K. et al. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from a working conference. *Leuk. Res.* 2008; 32: 5–17.
14. Germing U., Strupp C., Giagounidis A. et al. Detailed morphologic finding in 2773 patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* 2009; 33: S34.
15. Ogata K., Della Porta M.G., Malcovati L. et al. Diagnostic utility of flow cytometry in low grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. *Haematologica* 2009; 94(8): 1066–74.