

## Durchflusszytometrische Diagnostik der Myelodysplastischen Syndrome

Bei den myelodysplastischen Syndromen (MDS) handelt es sich um eine Gruppe klonaler myeloischer Erkrankungen, die durch dysplastische Veränderungen einer oder mehrerer myeloischer Zelllinien bei ineffektiver Erythropoese gekennzeichnet sind. Im weiteren Krankheitsverlauf erhöht sich mit zunehmender hämatopoetischer Insuffizienz das Risiko der Transformation in eine AML. Betroffen sind überwiegend ältere Patienten mit einem medianen Alter von 65 Jahren bei Erstmanifestation. Die durchschnittliche Neuerkrankungsrate liegt bei circa 3 – 5 von 100.000 pro Jahr.

### **Neue Verfahren: Immunphänotypisierung und Verlaufsbeurteilung des MDS**

Neben etablierten Diagnoseverfahren wie Zytomorphologie, Histologie und Zytogenetik hat in den letzten Jahren die Immunphänotypisierung in der Diagnostik und Verlaufsbeurteilung des MDS zunehmend an Bedeutung gewonnen. 2009 wurden in der Konsensus-Veröffentlichung des Europäischen Leukämie-Netzwerkes (Leukemia.net) erstmals Kriterien zur Standardisierung der Multiparameter-Durchflusszytometrie im Rahmen der MDS-Diagnostik erarbeitet.<sup>1</sup> Die durchflusszytometrische Erfassung von Dysplasiezeichen beinhaltet neben der Quantifizierung des Blastenanteils insbesondere die Erfassung von Expressionsverlusten auf myeloischen Zellen, Monozyten und Erythrozytenvorläufern. Von Bedeutung sind auch aberrante Expressionmuster wie zum Beispiel die Koexpression eines linienfremden lymphatischen Antigens auf myeloischen Zellen. Häufig zu beobachten ist auch ein verändertes Streulichtverhalten, vor allem die Verminderung des Seitwärts-Streulichtes als Hinweis auf eine Hypogranulation. Bei der Analyse der immunologischen Ausreifung sind pathologische Differenzierungsmuster wegweisend für eine Reifungsstörung.<sup>2</sup>

Die durchflusszytometrischen Messungen zeigen insgesamt eine gute Korrelation mit der Zytomorphologie, der MDS-Subklassifikation gemäß WHO sowie mit prognostischen Scoring-Systemen. So konnte gezeigt werden, dass die durchflusszytometrisch nachweisbare Dysplasie myeloischer und monozytärer Zellen korreliert mit dem International Prognostic Scoring System (IPSS), dem WHO-adjusted Prognostic Scoring System (WPSS), mit der

Transfusionsabhängigkeit sowie mit dem Zeitintervall bis zur Transformation in eine AML. Zudem trägt die MFC zur Unterscheidung der klinisch und prognostisch relevanten Einlinien-Dysplasie (RCUD) von der Mehrlinien-Dysplasie (RCMD) bei.

Die Zu- oder Abnahme aberranter Expressionsmuster kann einerseits eine Krankheitsprogression, andererseits ein Therapieansprechen bzw. eine Remission anzeigen – insbesondere in Fällen mit unauffälligem Karyotyp und fehlenden molekularen Verlaufsmarkern. So ist zum Beispiel die aberrante Koexpression von CD7 und/oder TdT auf Myeloblasten auch bei noch geringem Blastenanteil von weniger als 5 % im Knochenmark-Aspirat als prognostisch ungünstig einzustufen.<sup>3</sup>

Durch eine Kombination von 20 verschiedenen Antikörpern in der 10-Farb-Durchflusszytometrie erfassen wir nahezu alle beschriebenen aberranten Expressionsmuster der erythrozytären Zellen sowie der Leukozytensubpopulationen. (siehe nachfolgende Tabelle).

### **Nachweisbare aberrante Expressionmuster bei MDS-Patienten (modifiziert nach (1) und eigenen Erfahrungen)**

Bestimmt wird die Antigendichte von CD45, CD13, CD33, CD10, CD16, CD11b, CD14, CD64 und CD36 auf myeloischen und monozytären Zellen sowie die Antigendichte von CD235a und CD71 auf erythrozytären Zellen. Die Ausreifung der myeloischen Zellen wird über die kombinierte Analyse der Antigene CD13, CD11b und CD16 geprüft. Zur Detektion und ggf. Quantifizierung der Progenitorzellen werden die Antigene CD34, CD117 und HLA-DR eingesetzt.

Abbildung siehe Rückseite.

## Laborinformation

Dysplasiezeichen	Erythroide Zellen	Myelozyten	Granulozyten	Monozyten
Hypogranularität			x	
Atypische Expression von CD45		x	x	x
Expressionsverlust von CD10			x	
Atypische Expression von CD13		x	x	x
Atypische Expression von CD33		x	x	x
Atypische Expression von CD15		x	x	
Atypisches CD16/CD13 Expr.-Muster			x	
Atypisches CD11b/CD13 Expr.-Muster			x	
Atypische Expression von CD14				x
Atypische Expression von CD64			x	x
Atypische Expression von CD36	x		x	x
Atypische Expression von CD235a	x			
Atypische Expression von CD71	x			
Koexpression von CD34	x	x		
Koexpression von CD117	x	x		
Atypische Expression von HLA-DR		x		x
Linienfremde Expression von CD2		x		
Linienfremde Expression von CD5		x		
Linienfremde Expression von CD7		x		
Linienfremde Expression von CD19		x		
Linienfremde Expression von CD56		x	x	x

### Literatur

- van de Loosdrecht et al.: Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from the first European Leukemia Net working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 94: 1124-1134 (2009)
- Locken et al.: Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from a working conference. *Leukemia Research* 32: 5-17 (2009)
- van de Loosdrecht et al.: Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood* 111: 1067-1077 (2008)

Die linienfremde Expression lymphatischer Antigene auf myeloischen Zellen wird über die T-Zellantigene CD2 und CD7 sowie über das B-Zell-antigen CD19 erfasst. Anhand eines Kollektivs von Gesunden wurde als Referenzbereich ein Fluoreszenzindex von 400-500 FI ermittelt. Verminderte FI-Werte deuten auf einen Expressionsverlust, erhöhte FI-Werte auf eine Überexpression hin.

### Untersuchungsmaterial

Als bevorzugtes Untersuchungsmaterial benötigen wir Heparin- oder EDTA-antikoaguliertes Knochenmark-Aspirat, das innerhalb von 24 Stunden nach Aspiration analysiert werden muss. Nach eigenen Erfahrungen kann bei ausgeprägter Panzytopenie auch peripheres Blut eingesetzt werden. Aufgrund der variablen peripheren Ausschwemmung dysplastischer Zellen hat die Analyse von peripherem Blut jedoch nur eingeschränkte Aussagekraft.

### Testverfahren

Multiparameter-Durchflusszytometrie (MFC)

### Material

3 ml KM-Aspirat (EDTA), eingeschränkt auch peripheres EDTA-Blut

### Abrechnung

EBM: 22x 32527 / GOÄ: 3x 3696 + 19x 3697

Für weitere Informationen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung.

### Dr. med. Johannes Owczarski

Facharzt für Laboratoriumsmedizin

Tel.: 0221 940 505 613

j.owczarski@wisplinghoff.de

### Dr. rer. nat. Dennis Hoffmann

Diplom-Biochemiker

Tel.: 0221 940 505 609

d.hoffmann@wisplinghoff.de