



A csontvelői angiogenézis vizsgálata, mint egyik lehetséges prognosztikus tényező mielodiszpláziás szindrómában

Horváth Emőke¹, Chira Liliana¹, Turcu Mihai¹, Fancsali Réka²

¹Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Patológia Tanszék, ²egyetemi hallgató

Studiul angiogenezei în țesutul osteomedular, fiind un factor prognostic posibil al sindromului mielodisplazic

Densitatea microvasculară este recunoscută ca factor de prognostic independent în majoritatea tumorilor maligne, mai puțin studiat în tumorile hematopoietice. Studiul nostru se bazează pe o cazuistică reexaminată (48 biopsii osteomedulare diagnosticate sindrom mielodisplazic-SMD-) din punctul de vedere al angiogenezei și proliferării mastocitelor. Cazurile au fost împărțite în trei categorii de prognostic în conformitate cu recomandările OMS-ului. Cuantificând parametrii sus amintiți, am demonstrat creșterea semnificativă a microvascularizației, în categoria SMD cu prognostic nefavorabil comparativ cu densitatea vasculară normală a măduvei ($p < 0.005$), fără corelarea ei cu celularitatea țesutului osteomedular, numărul de leucocite și valorile hemoglobinei. Paralel cu creșterea numărului de blasti se intensifică și angiogeneza, dar fără o relație semnificativă ($p > 0.005$) între cei doi factori considerați cu valoare prognostică. Spre deosebire de datele din literatură de specialitate, nu am găsit o corelație semnificativă între numărul de MC și microvascularizația măduvei. Pe baza rezultatelor obținute este justificat raportarea densității microvasculare în buletinul histopatologic în SMD pentru a crește șansele bolnavilor printr-o terapie individualizată completată cu inhibitorii ai angiogenezei.

Cuvinte cheie: sindrom mielodisplazic, angieneză, prognostic

A mielodiszpláziás szindrómák (MDS) klonális hemopoetikus őssejt betegségek, változatos klinikai lefolyással: az esetek egy része progresszív csontvelő-elégelenséghez vezet, más része akut mieloid leukémiába transzformálódhat. Ez a változatosság azt sugallja, hogy a betegség kialakulását és lefolyását számos, egymástól független fiziopatológiai tényező befolyásolja.

Horváth Emőke

540394 Marosvásárhely-Târgu-Mureș

Bogatei utca 14.

E-mail: horvath_emoke@yahoo.com

The study of angiogenesis in bone marrow, as a possible prognostic factor in the myelodysplastic syndrome

The role of microvessel density, as an independent prognostic factor was demonstrated in solid tumors but little is known about angiogenesis in hematopoietic tumors. In our study we reevaluated 48 bone marrow biopsies originating from patients diagnosed with myelodysplastic syndromes. The purpose was to determine the extent of angiogenesis and mast cells number, cases being divided in three prognostic categories, according to standard WHO criteria. The quantification parameters mentioned above showed significant correlation in vessel scores in unfavorable MDS category compared to normal bone marrows microvessel density ($p < 0.05$). There was no correlation between increased microvessel density and bone marrow cellularity, WBC and hemoglobin level. Increased bone marrow blast counts were accompanied by intensified angiogenesis, but without significant correlation between the two prognostic factors. Despite of data with contrary results from the literature, there was no significant correlation in vessel scores and mast cell count in bone marrow. Based on the results we consider that indication of the microvessel density scores in the histopathological report in MDS is beneficially in order to elaborate an individual therapy supplemented with angiogenesis inhibitors.

Keywords: myelodysplastic syndromes, angiogenesis, prognosis

A mikorangiogenézis mértéke és terápiás jelentősége MDS-ben egyre több tanulmány témája, mivel a szolid daganatok esetében sikeresen alkalmazott angiogenézis ellen irányuló terápia az MDS-ek esetében is hatékonyan ígérkezik. Egyes tanulmányok összefüggést találtak a megnövekedett érsűrűség és masztocita szaporulat valamint a különböző altípusok progressziója között. Ezen irodalmi adatokra támaszkodva tanulmányunkban a masztocita szaporulat és a mikrovaskularizáció közötti összefüggésre fókuszáltunk, vizsgálva az MDS-ek különböző alcsoportjaiban e két paraméter együttes változását

arra keresve választ, hogy hogy ezek az információk felhasználhatók-e a prognózis megítélésében.

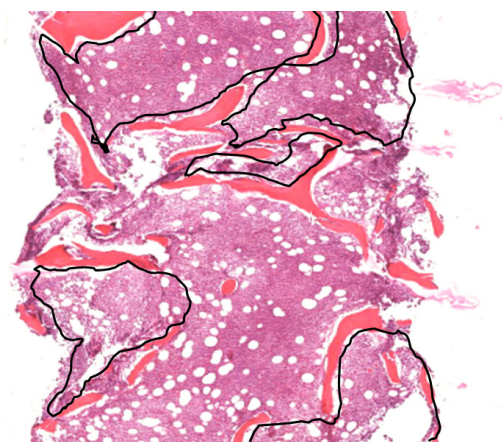
Anyag és módszer

Retrospektív vizsgálatunk a 2008- és 2011-ben a Marosvásárhelyi Megyei Sürgősségi Kórház Kórszövettani Laboratóriumában 48 MDS-nek minősített eseteket tartalmazza, amelyekben a diagnózis felállítása a morfológiai eltérések (HE, Giemsa, Gömöri-féle ezüstimpregnáció, Perls-féle vasfestés, cellularitás, ALIP jelenléte) és a blasztok/blaszt ekvivalensek jellegzetes immunfenotípusának (CD117/CD34 expresszió) és mennyiségének (<20%) vizsgálata alapján történt a WHO 2008-as osztályozási kritériumainak megfelelően. A komplex adatbázisa lehetővé tette a klinikai adatok integrálását a minden esetben immunhisztokémiai reakciókkal alátámasztott szövettani lelet újraértékelésébe.

Az eseteket a 2008-as WHO MDS osztályozásának 6 alcsoportjába soroltuk (19), kihagyva az izolált del(5q) eltéréssel járó MDS alcsoportot a karyotípusra vonatkozó adatok hiányában.

A módosított IPSS/ WHO rendszert tekintve alapnak, eseteinket 3 prognosztikai kategóriába soroltuk: kedvező- (RCUD, RARS, 5q-), köztes- (RCMD, RCMD-RS, MDS-U, MDS/ MPN-U, CMML-1, CMML-2, Hipopláziás MDS, MDS/ MPN), illetve kedvezőtlen (RAEB-1, RAEB-2) prognózissal rendelkező csoportokra bontva (2).

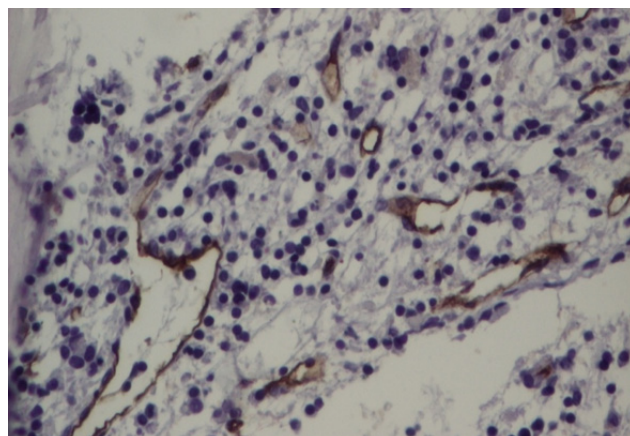
A 48, EDTA-ban méisztelenített, és standard feldolgozásnak alávetett biopsziás anyag újravizsgálata során a masztocita (MC) proliferáció mértékét (a CD117 és Giemsa festés alapján) és a CD34-el jelzett erek számának átlagát értékeltük 5 reprezentatív velőűrben (1. ábra).



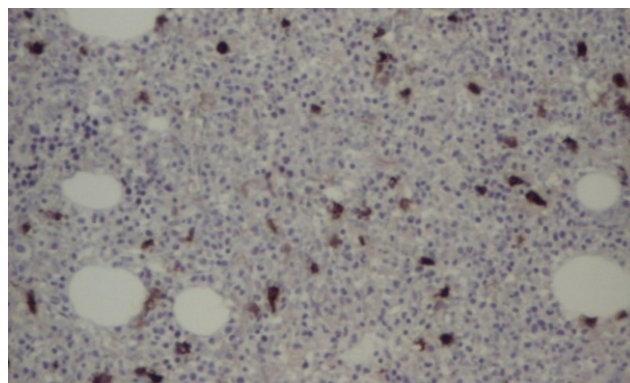
1. ábra. A biopsziás minta cellularitásának értékelése és a vizsgálandó velőűrök kiválasztása HE festett metszeteken (4 obj.).

Az erek és az MC számlálása 10-es objektív segítségével történt. A CD34/DAB+ endotél struktúrák (2. ábra), valamint a CD117/Giemsa+/ DAB+ sejtek számának a változását (3. ábra) a 3, prognosztikus jelentőséggel bíró csoportban Mann-Whitney U teszttel vizsgáltuk, a csoportokon belül pedig a különböző paraméterek összehasonlítását rang korrelációs eljárással végeztük, figyelembe véve a csontvelői blasztok számát, a csontvelői cellularitást, a perifériás vér Hgb tartalmát és a keringő leukociták számát (WBC). Kontrollként az MDS-ben szenvedő betegeink átlagéletkorával megegyező 5, egészséges személy (akiknél nem igazolódott a szövettani vizsgálat során az MDS klinikai diagnózisa) csontvelői biopsziás mintáját használtuk fel.

Az immunreakciók kvantifikálását (érsűrűség és MC szám) egymástól függetlenül két patológus végezte (HE/CL).



2. ábra. A csontvelői érsűrűség megnövekedése a kedvezőtlen prognosztikai csoportban (anti-CD34/DAB, 20 obj.).



3. ábra. MDS: A vérképző sejtek között felszaporodott masztociták (anti CD117/DAB, 4 obj.).

Eredmények

A diagnózist a WHO kritériumai alapján állítottuk fel [19]. Eseteink mennyiségi megoszlását a kor függvényében az 1. táblázat és az 4. ábra szemlélteti.

1. táblázat. Az MDS-nek diagnosztizált esetek megoszlása a szövettani diagnózis és az életkor függvényében

MDS alcsoportok (WHO, 2008)	Esetszám	Életkor		
		maximum	minimum	átlag
RCUD ¹	3	79	53	66,5
RARS ²	0	-	-	-
RCMD ³	13	85	28	60
RAEB-1 ⁴	6	80	41	63
RAEB-2 ⁵	4	78	55	64
MDS-U ⁶	10	78	46	64
MDS/MPN ⁷	8	77	59	67
Hipopláziás MDS	1	59	59	59
Összesetszám	48	Átlagéletkor 62,81		

1 Refrakter citopénia egy sejtvonal diszpláziájával

2 Refrakter anémia gyűrűs szideroblasztokkal

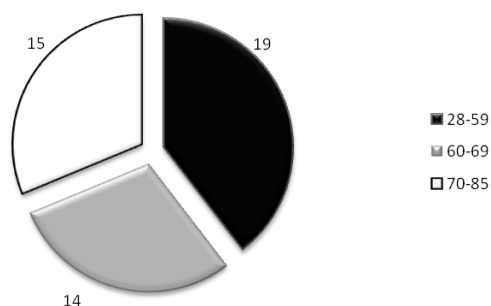
3 Refrakter citopénia több sejtvonal diszpláziájával

4 Refrakter anémia blasztszaporulattal-1

5 Refrakter anémia blasztszaporulattal-2

6 Nem csoportosítható mielodiszpláziás szindróma

7 Mielodiszpláziás/ Mieloproliferatív neoplázia overlap szindróma



4. ábra. A vizsgált MDS esetek korcsoportok szerinti megoszlása

Az esetek prognózis szerint történő csoportosítására az IPSS/WHO összevont kritériumrendszert használtuk, melynek értelmében az esteink 6, 25%-a a kedvező (3 eset), 72,91%-a az intermedier (35 eset), míg 28,83%-a a kedvezőtlen (10 eset) kórlefolást mutató csoportba. A csontvelő vaszkularizációjának mértékét, a blasztok és

masztociták számát a 3, prognosztikus jelentőséggel bíró csoporton belül a 2. táblázatba összegeztük. A vizsgált paramétereket a csontvelői cellularitással, a perifériás vér Hgb szintjével valamint a leukocita számmal összevetve a következő eredményeket találtuk:

Az angiogenezis mértéke összefügg az MDS prognosztikus csoportjaival. Az erek számának növekedése a kedvezőtlen prognózissal rendelkező csoportban a legkifejezettebb. Szignifikáns növekedést találtunk a mikrovaszkularizációra vonatkoztatva a kedvezőtlen prognózisú MDS-ben a normál csontvelő érsűrűségéhez viszonyítva ($p < 0,005$), ellenben a vaszkularizáció mértéke független a cellularitástól, a leukociták számától és a Hgb értékétől.

Annak ellenére, hogy a blasztok számbeli emelkedésével párhuzamosan az érsűrűség is nő, mégsem mutatható ki szignifikáns összefüggés a két vizsgált paraméter között ($p > 0,005$).

Az irodalmi adatokkal ellentétben nem találtunk szignifikáns összefüggést a MC száma és a mikrovaszkularizáció között.

Megbeszélés

Az MDS először 1986-ban különült el, mint önálló betegség, melynek a kimenetelét—az akkori tudományos álláspont alapján—a citopénia mértéke, a csontvelő morfológiája és a citogenetikai eltérések (kariotípus) határozza meg [20]. Az akkori epidemiológiai adatokat követve, világviszonylatban évente 1500 új eset fordult elő. A statisztikai adatok szerint 1999 óta évente megközelítőleg 13.000 új eset jelenik meg (ebből megközelítőleg 1000 eset gyermekekben alakul ki) [3]. Az MDS incidenciája növekvő tendenciát mutat, ez részben a rendelkezésünkre álló diagnosztikai eszközök fejlődésével magyarázható.

A Marosvásárhelyi Megyei Sürgősségi Kórházban a 2008-2011-es időszakban 48 MDS- es esetet diagnosztizáltunk. Ez a régió nagyságát figyelembe véve 1,42 új esetet jelent évente 100.000 lakosra számítva. Az Egészségügyi Világszervezet adatai alapján a betegség gyakorisága 3-5/100 000 lakos/év [20] azonban a HAEMACARE Working Group 2010-es tanulmánya szerint az MDS összeurópai incidenciája mindössze 1.24/100.000 lakos/év. A vizsgált kelet-európai országokban (Csehország, Lengyelország, Szlovákia) a betegség előfordulása még ennél is kisebb, csupán 0.27/100.000 lakos [17]. A SEER adatai azt mutatják, hogy a betegség előfordulása az élet-

2.táblázat. A mikrovaskularizáció és a masztocitaszaporulat mértéke az MDS prognózisa és a laboratóriumi mutatók függvényében

Vizsgált paraméterek	Kontroll csoport	MDS: Kedvező prognózis	MDS: Intermediér prognózis	MDS: Kedvezőtlen prognózis
Erek száma (5 velőűr átlaga)	2,8 (3±2)	7 (7±2)	13,8 (14±3)	23,8 (24±5)
Hgb g/dl	13,5	10,2	9,7	7,9
Perifériás vér: Fvs szám x 10 ⁹ /l	5,4	5,3	11,6	12,5
Csontvelő cellularitása (%)	30	50	60	80
Csontvelői blasztok százalékos aránya	0 %	3%	5 %	12%
Csontvelő MC szám (5 velőűr átlaga)	4,2 (4 ±2)	12,8 (13±2)	15,8 (16±3)	21 (21±1)
Esetszám	5	3 (6,25%)	35 (72,91%)	10 (28,83%)

kor előrehaladtával jelentősen emelkedik. Így míg 40 éves kor körül 0,7 eset fordul elő 100.000 lakosra nézve, addig ez az arány 20,8-36,3/100.000 lakos 70 év felett [16].

Beteganyagunkban nagyobb volt a középkorú betegek aránya (az esetek 47,9%-a 50-69 éves); mindössze a betegek 29%-a 70 év fölötti. Az átlagéletkor (61,81 év), is a középkorosztályhoz áll közelebb ami az irodalmi adatokkal egybehangzóan igazolja a betegség gyakoriságának növekedését a 70 éves kor alatt is [10].

MDS eseteink közül a WHO csopotosítása és főbb jellemző vonásai alapján a leggyakrabban előforduló formák az RCMD (27,08%), MDS-U (20,83%) és a RAEB-1(12,50%). A nemzetközi adatok szerint az alcsoportok között az RA (38,4%) áll az első helyen, őt követi a CMML (31,2%) és a RAEB (15%) [20].

Tekintve, hogy a saját eredményeink kizárólag a csontvelő biopszia értékeléséből származó diagnózisokra támaszkodnak a RA alacsony előfordulási aránya megmagyarázott: az MDS diagnózisa a perifériás vér sejtjeinek morfológiai elváltozásain (kenet), az immunfenotípus vizsgálatán (áramlós citometria), valamint a csontvelő-kenet vizsgálatán felállítható, de a korrekt diagnózishoz (ALIP) jelenléte, a fibrózis, angiogenezis, MC szaporulat) sokszor szükséges a csontvelő szövettani vizsgálata. A RA az esetek többségében e fent említett vizsgálatokkal könnyen kiszűrhető, ezért ezen eseteknél csak kis százalékában igényelt a diagnózis szövettani megerősítést.

A Nemzetközi Értékelőrendszer tanulmánya szerint [5] összesen 816 esetből 570 (70%) kedvező, 112 (14%) köztes, 134 (16%) kedvezőtlen. Ezzel az adattal ellentétben a mi beteganyagunkban az intermediér kategória dominál (72,91%). Ennek a háttérben az aspirációs diagnosztikai

lehetőségek állnak: a csontvelő biopsziát csak azon esetekben végezték el, amikor a citológiai eredmény nem volt teljes diagnosztikus értékű.

Gyakorlati szempontból az MDS diagnózisa a WHO diagnosztikai algoritmusát követi de prognosztikai és kezelési szempontból fontos szerep jut az egyéni kockázati tényezők feltérképezésének, amely az IPSS és a WHO által javasolt WPSS rendszer segítségével történik a személyre szabott terápia kialakítása érdekében [9].

Ismert jelenség az angiogenezis fokozódása nem csak a szolid tumorok esetében, hanem a hematológiai malignus betegségek esetében is [1], ezért az angiogenezis vizsgálata és mértékének összefüggése mint prognosztikus tényező az MDS-ek különböző alcsoportjaiban új terápiás lehetőségeket vet fel [19].

Vizsgálva az erek számát a különböző prognosztikai csoportokba sorolt biopsziás minták esetében és a proliferáció átlagát értékelve arra következtettünk, hogy az angiogenezis mértéke összefügg az MDS prognosztikus csoportjaival, az erek számának növekedése a kedvezőtlen prognózissal rendelkező csoportban a legkifejezettebb.

Giancarlo Pruneri és kutatócsoportja kimutatta, hogy MDS-ben a mikroszkopikus erek sűrűsége (microvessel density- MVD) magasabb volt, mint a kontroll csoport és a fertőző betegségek esetében, de kisebb, mint az AML-es és a mieloproliferatív kórképekben szenvedő esetekben. Az MDS-FAB alcsoportjai szerint szignifikánsan magasabb MVD volt jelen a RAEB-T, CMML és a fibrózissal rendelkező esetekben, mint az RA, RARS és RAEB esetekben. A tanulmány összefüggést mutat az angiogenezis és az AML-be való transzformáció között [12]. Továbbá az is

bizonyított tény, hogy MDS-ben a proliferáló erek száma kapcsolatban áll a csontvelői blaszt százalékos arányával [4, 15].

Ezt az összefüggést a két vizsgált paraméter között nem sikerült bizonyítanunk ($p > 0,005$), annak ellenére, hogy a blasztok számbeli emelkedésével párhuzamosan az angiogenezis is fokozódott. A közelmúltban egyre több tanulmány hangsúlyozza az angiogenezis szerepét a betegség patogenezisében, anélkül, hogy prediktív tényező szerepét töltené be a betegség kimenetelében [10].

Arra keresve a választ, hogy a csontvelői stróma sejteinek van-e pro-angiogenetikus hatása, több kutatócsoportnak sikerült összefüggést találni a csontvelői triptáz-szekretáló masztociták és az angiogenezis folyamata között, kvantifikálva az ereket, a teljes metokromáziás masztocitákat és a triptázt (bizonyítottan angiogenezist serkentő molekula) szekretáló masztocitákat. Az eredményeik alapján feltételezhető, hogy úgy a teljes metokromáziás masztociták száma, mint a triptáz-szekretáló masztociták száma összefüggésbe hozható az angiogenezis folyamatával és a daganat progressziójával párhuzamosan emelkedik [14]. A masztociták számos angiogenezist serkentő anyagot szekretálnak, többek között heparint, hisztamint [15], citokineket, mint a transzformáló β -növekedési faktort, α -tumor nekrozis faktort [11], interleukin 8-at [7], 2-es típusú fibroblaszt növekedési faktort (FGF-2) [13] és VEGF-et (vascular endothelial growth factor) [6, 8]. Ezek az anyagok egyaránt serkentik a normális és a tumoros angiogenezist. Blair és kutatócsoportja kimutatták, hogy a masztociták által termelt triptáz neovaszkuarizációs hatással rendelkezik [2].

A triptáz megbízható specifikus marker. Az MC értékelése Giemsa illetve CD117 alapján nehézkes, mert növeli az ál-pozitív értékelés esélyét.

Az irodalmi adatokkal ellentétben nem találunk szignifikáns összefüggést az MC száma és a mikrovaszkuarizáció között a 3 prognosztikus csoportra nézve. Ennek a jelenségnek a hátterében a triptáz festés (mint specifikus MC jelzés) hiánya áll. Az MC értékelése Giemsa illetve CD117 alapján nehézkes, mert növeli az ál-pozitív értékelés esélyét.

A sokrétű kutatás fókuszában álló MDS kezelése még mindig nehézségekbe ütközik. Az anti-angiogenetikus kezelés thalidomiddal és származékaival—ami gátolja a FGF-2 és VEGF által indukált angiogenezist-, ígére-

tes módszer, de bebizonyosodott, hogy csak a kedvező prognózissal rendelkező betegeknél hatásos, lassítva a progressziót [4]. A betegség kimenetelének előrevetítését továbbra is a csontvelői blasztok száma, illetve a citogenetikai eltérések tükrében kell végezni, és a kedvezőtlen prognózis esetén a transzplantáció a válsztandó kezelési eljárás [18].

Következtetések

A betegség incidenciája megegyezik az WHO Közép-Kelet Európára vonatkoztatott adataival, ellenben a mi földrajzi régiókban az intermediér prognózissal jellemzett altípus a domináns MDS, szemben az irodalmi adatokkal, amely az esetek nagy részét a kedvező prognózissal rendelkező kategóriába sorolja. Ezt az eltolódás azzal magyarázható, hogy a tanulmányunk kizárólag komplex szövettani vizsgálat eredményeire támaszkodik, a citogenetikai eltérések vizsgálatának hiányában. Az érsűrűség szignifikáns növekedése az MDS 3, prognózisfüggő csoportjában a normál csontvelő érsűrűségéhez viszonyítva indokolja ennek a paraméternek a kötelező feltüntetését a szövettani leletben, az esetleges angiogenezist gátló terápia bevezetése érdekében.

Annak ellenére, hogy a blasztok számbeli emelkedésével párhuzamosan az érsűrűség is nő, mégsem mutatható ki szignifikáns összefüggés a két paraméter között ami arra enged következtetni, hogy az angiogenezis mértéke önmagában nem prediktív értékű MDS-ben.

Irodalom

1. Aguayo A., Kantarjian H., Manshouri T. et al.-Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes, *Blood* 2000, 96 (6):2240-2246.
2. Blair R.J., Meng H., Marchese M.J. et al.-Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor, *J Clin Invest.*, 1997,99(11):2691-2700.
3. Emmanuel C. B., Woermann U. J.-Myelodysplastic Syndrome www.emedicine.medscape.com, 2010.
4. Fenedux P., Ades L.-How we treat lower-risk myelodysplastic syndromes, *Blood* 2013, 121 (21): 4280-4286.
5. Greenberg P., Cox C., LeBeau M. M. et al.-International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes, *Blood* 1997, 89:2079-2088.
6. Grützkau A., Krüger-Krasagakes S., Baumeister H. et al.-A. Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF206, *Mol Biol Cell*, 1998, 9 (4):875-884.

7. Grützkau A., Krüger-Krasagakes S, Kögel H. et al.-Detection of intracellular interleukin-8 in human mast cells: flow cytometry as a guide for immunoelectron microscopy, *J Histochem Cytochem.*, 1997, 45(7):935-945.
8. Klaus P, Anderson K.C.- The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implication, *Blood*, 2005, 105: 1383-1395.
9. Malcovati L., Germing U, Kuendgen A .et al.-Time dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes, *J Clin Oncol*, 2007, 25(23): 3503-3510.
10. Matolcsy A., Udvardy M.-Hematológiai betegségek atlasza, Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest, 2006, 157-172.
11. Möller A., Henz B. M., Grützkau A. et al.-Comparative cytokine gene expression: regulation and release by human mast cells, *Immunology*, 1998, 93(2):289-295.
12. Pruner G., Bertolini F, Soligo D. et al. Angiogenesis in myelodysplastic syndromes-*Br J Cancer.*,1999, 81(8):1398-1401.
13. Qu Z., Liebler J. M., Powers M. R. et al.-Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma, *Am J Pathol.* 1995, 147(3):564-573.
14. Ribatti D., Polimeno G., Vacca A. et al.-Correlatiton of bone marrow angiogenesis and mast cell with tryptase activity in myelodysplastic syndromes, *Leukemia*, 2002, 16:1680-1684.
15. Ribatti D., Roncali L., Nico B. et al.-Effects of exogenous heparin on the vasculogenesis of the chorioallantoic membrane, *Acta Anat (Basel)*, 1987;130 (3):257-263.
16. Rollison E. D., Howlader N., Smith M. T. et al.-Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs, *Blood*, 2008, 112(1):45-52.
17. Sant M., Allemani C., Tereanu C. et al. and the HAEMACARE Working Group, Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project, *Blood*, 2010, 116(19):3724-3734.
18. Savic A., Cemerikic-Martinovic V., Dovat S. et al.-Angiogenesis and survival in patients with myelodysplastic syndrome, *Pathol Oncol Res.* 2012, 18(3):681-690.
19. Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris N. L. et al.-WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th ed., IARC Press Lyon, 2008. 88-107
20. Tricot G., Vlietinck R., Boogaerts M. A. et al.-Prognostic factors in the myelodysplastic syndromes: importance of initial data on peripheral blood counts, bone marrow cytology, trephine biopsy and chromosomal analysis, *Br J Haematol*, 1985, 60:19-32.