



Protočna citometrija u mijelodisplastičnom sindromu. Korak naprijed

Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndrome. Step forward.

Zoran Šiftar✉

Klinički zavod za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

Deskriptori

MIELODISPLASTIČNI SINDROMI – dijagnoza, imunologija; PROTOČNA CITOMETRIJA – metode, standardi; IMUNOFENOTIPIZACIJA – metode; STANICE KOŠTANE SRŽI – patologija; PROGNOZA

Descriptors

MYELODYSPLASTIC SYNDROMES – diagnosis, immunology; FLOW CYTOMETRY – methods, standards; IMMUNOPHENOTYPING – methods; BONE MARROW CELLS – pathology; PROGNOSIS

SAŽETAK. Mijelodisplastični sindrom (MDS) heterogena je skupina klonskih bolesti podrijetlom iz promijenjenih (malignih) hematopoetskih matičnih stanica. Klinički se prikazuje citopenijom u perifernoj krvi, displastičnim promjenama u jednoj ili više staničnih linija u koštanoj srži i povišenim rizikom od razvoja akutne mijeloidne leukemije. Stečeni kromosomski poremećaji nađeni su u 40 – 50% pacijenata s MDS-om. Prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije, dijagnoza MDS-a zasniva se na morfološkoj procjeni displastičnih promjena, nađenom broju blasta, nalazu prstenastih sideroblasta u koštanoj srži i utvrđenim kromosomskim promjenama. Multiparametrijska ili polikromatska analiza protočnom citometrijom (engl. *Multiparameter Flow Cytometric Analysis* – MFC), iako inicijalno uključena kao opcionalna tehnika, postignutim napretkom posljednjih godina u imunofenotipizaciji hematopoetskih progenitornih stanica i zrelih stanica displastične koštane srži dobiva ravnopravnu ulogu u dijagnostici i prognozi mijelodisplastičnog sindroma.

SUMMARY. Myelodysplastic syndrome (MDS) represents a heterogeneous group of clonal diseases originating from altered (malignant) hematopoietic stem cells. Clinically, it manifests as cytopenia in peripheral blood, dysplastic changes in one or more cell lines in bone marrow and increased risk of evolution to acute myeloid leukemia (AML). Acquired chromosomal aberrations are detected in 40–50% of MDS patients. According to WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Lion 2008), MDS diagnosis is based on the morphological interpretation of found dysplastic changes, the number of blasts, the presence of ring sideroblasts in bone marrow and the established cytogenetic abnormalities. The progress made in recent years in immunophenotyping of hematopoietic progenitor cells and mature cells of dysplastic bone marrow gives to multiparameter flow cytometric analysis (MFC), although initially included as an optional technique, an opportunity to become a standard part of the integrated MDS diagnosis and prognosis.

Mijelodisplastični sindrom (engl. *Myelodysplastic syndrome* – MDS) heterogena je skupina poremećaja hematopoeze obilježena različitim tipovima citopenije: anemijom, leukopenijom, trombocitopenijom. Riječ je o klonskoj bolesti matične stanice koja pokazuje smanjenu sposobnost diferencijacije i samoobnove.¹ U perifernoj se krvi posljedično pojavljuje citopenija. Klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije iz 2008. utemeljena je na morfološkim, kliničkim i genskim značajkama, a revidirana klasifikacija iz 2016. uzima kao dodatni dijagnostički kriterij nalaz imunofenotipskih karakteristika.^{2,3,4} Hrvatske smjernice za liječenje i dijagnozu bolesnika s mijelodisplastičnim sindromom iz 2017. i smjernice European Leukemia-Net-a iz 2013. uključuju imunofenotipizaciju i multiparametrijsku analizu protočnom citometrijom (engl. *Multiparameter Flow Cytometric Analysis* – MFC) kao integralni dijagnostički postupak pri postavljanju dijagnoze.^{5,6} Iako je citomorfološka analiza periferne krvi i koštane srži ključna u prepoznavanju displazije granulocita i trombocita, obvezatne za postavljanje dijagnoze MDS-a, u slučajevima neodređene citomorfologije (odsutnost znatnije displazije ili povećanog

broja blasta u koštanoj srži) i normalnoga citogenetičkog nalaza, analiza protočnom citometrijom uvelike pridonosi:

- razlikovanju klonskih i neklonskih citopenija
- otkrivanju aberantnog imunofenotipa u bolesnika kojima je citomorfološki utvrđena displazija barem jedne stanične linije (refraktorne citopenije s unilinijskom displazijom (engl. *Refractory cytopenia with unilineage dysplasia* – RUCD) i refraktorne anemije s prstenastim sideroblastima (engl. *Refractory anemia with ringed sideroblasts* – RARS))
- otkrivanju aberantnog fenotipa nezrelih stanica mijeloidne loze i monocita (čak i kad je broj blasta < 5%).⁷

Učinkovitu dijagnostičku primjenu MFC-a omogućili su tehnološki napredak u području razvoja, proiz-

✉ Adresa za dopisivanje:

Adresa za dopisivanje: Mr. sc. Zoran Šiftar, Klinički zavod za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, Klinička bolnica Merkur, I. Zajca 19, 10000 Zagreb; e-mail: zoran.siftar@gmail.com

Primljeno 6. svibnja 2019., prihvaćeno 1. srpnja 2019.

vodnje i validacije novih protutijela za detekciju staničnih biljega i novih vrsta fluorokroma, kao i razvoj i dostupnost naprednih protočnih citometara. Današnji vrhunac tehnologije jesu protočni citometri za rutinsku kliničku primjenu, opremljeni s 2 – 3 lasera, a omogućuju polikromatski pristup u dijagnostici MDS-a. Takvi instrumenti pružaju mogućnost istodobne analize 8 i više fluorescentnih parametara, odnosno uporabu protutijela obilježenih fluorokromima za površinske ili unutarstanične biljege. Uz povećanu brzinu protoka (do 10.000 stanica u sekundi) omogućeno je mjerenje 0,5 – 1 milijuna stanica u vrlo kratkom vremenu. Također, zajedno s razvojem citometara i potrebnih reagensa razvijaju se i novi analitički programi (npr., INFINICYT, FlowJo, CytoBank) za obradu podataka mjerenja velikog broja kliničkih uzoraka koji omogućuju dobivanje pouzdanog interpretativnog izvješća u kratkom vremenu. Pritom nam ti programi omogućuju ne samo izvještaj o izmjerenim postotcima pozitivnosti za pojedine CD-antigene nego i opis ključnih fenotipskih odstupanja od normalnog usporedivih s bolesti.⁸ Brojna istraživanja dokazala su fenotipske abnormalnosti ili odstupanja od normalnih stanica koštane srži povezane s MDS-om. Anomalije su dokazane u zrelim stanicama granulocitne i monocitne populacije, nezrelim (progenitornim) mijeloidnim stanicama ili B-limfocitima, kao i nukleiranim eritrocitima, no bez šire primjene u dijagnostici.^{9–12}

Preduvjet za široku primjenu u kliničkoj praksi jesu standardizirane i međunarodno prihvaćene smjernice koje uključuju validaciju postojećih analiza i dogovor oko primijenjenih tehnika. Standardizacija je započela osnutkom Radne skupine europskih laboratorija za dijagnostiku mijelodisplazije protočnom citometrijom (*European LeukemiaNet Working Group*) 2008. godine i izradom smjernica od 2009. do 2012.¹¹ Smjernice uključuju uzorkovanje, rukovanje i obradu uzoraka te minimalne zahtjeve za analitičku obradu displazije koštane srži protočnom citometrijom radi detekcije progenitornih (nezrelih) stanica i stanica mijelomonocitne loze u pacijenata s poznatom ili suspektnom dijagnozom MDS-a, kao i onih eritroidne loze (tablica 1.).¹³ Godine 2009. grupa je proširena pridruženim članicama-sudionicima s drugih kontinenata i mijenja ima u *International/European LeukemiaNet Working Group*. Europski konzorcij *EuroFlow* izdao je 2012. godine validirani standard kojim u tehničkom dijelu nadopunjuje protokol ELN-a definiranjem kombinacija protutijela na stanične biljege i fluorokroma kojima su obilježena protutijela.^{14,15} Najnovije smjernice objavila je 2016. godine proširena grupa ELN-a pod nazivom *International/European LeukemiaNet Working Group for Flow Cytometry in MDS*.¹⁶ Smjernice obuhvaćaju sve zanimljive stanične populacije s detaljnim opisom

TABLICA 1. PREPORUKE ELN-A (*EUROPEAN LEUKEMIANET*) ZA OBRADU UZORAKA KOŠTANE SRŽI PROTOČNOM CITOMETRIJOM RADI ANALIZE NA DISPLAZIJU¹³

TABLE 1. RECCOMENDATION ON PROCESSING OF BONE MARROW SAMPLES FOR FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF DYSPLASIA, ACCORDING TO EUROPEAN LEUKEMIANET (ELN), LEUKEMIA 2012; 26: 1730 – 1741

Antikoagulans u uzorcima koštane srži: /Anticoagulant in bone marrow sample	heparin (alternativa: EDTA) /heparin (alternative: EDTA)
Temperatura pohrane: /Storage temperature	sobna temperatura /room temperature
Vrijeme za obradu /Processing time	< 24 sata /< 24 hours
Pre tretman prije obilježavanja (opcionarno): /Pre-treatment before staining (optional)	liziranje eritrocita cijeloga ili dijela uzorka amonij klorid lizatorom (bez fiksativa) /bulk-lysis of erythrocytes by ammoniumchloride (without a fixative)
Pufer za pranje stanica (opcionarno): /Washing buffer (optional)	PBS s 0,5% govedeg ili humanog albumina /PBS with 0.5% bovine or human serum albumin
Prezervacija stabilnih antigena: /Preservation of stable antigen	paraformaldehid fiksativ (0,5%-tni) /paraformaldehyde fixation (0.5%)
Ograda nezrelih mijeloidnih stanica: /Gating for immature myeloid cells	naziv „progenitori“ bolji je nego „blasti“ /called progenitors rather than blasts
Slijepne stanice: /Doublets	moraju se isključiti iz analize na histogramu <i>fsc visina/fsc površina</i> /to be excluded by a <i>fsc height/fsc area</i> graph
Degranulirani granulociti: /Degranulated neutrophils	procjenjuju se usporedbom njihova SSC-a (lin. ili log. skala) prema SSC-u limfocita /assessed by comparing their SSC (in linear or logarithmic scale) to that of lymphocytes
Antigeni vezani na glikozil-fosfatidil-inozitol (npr., CD14, CD16, CD24): /Glycosyl-phosphatidyl-inositol-anchored antigens (i.e., CD14, CD16, CD24)	njihov izražaj može biti promijenjen u PNH, ali to ne isključuje dijagnozu MDS-a /expression will be altered if PNH is present, but this does not impair MDS diagnosis

relevantnih fenotipskih anomalija, način bodovanja i interpretaciju rezultata (tablica 2.).

Analiza imunofenotipa odjeljka nezrelih mijeloidnih stanica obvezatna je i uključuje:

a) *definiciju i iskazivanje brojnosti progenitornih mijeloidnih stanica (mijeloblasta)*

Broj mijeloblasta (CD34+CD19-) iskazuje se prema ukupnom broju nukleiranih stanica koji uključuje eri-

TABLICA 2. PREPORUKE ZA ANALIZU NA DISPLAZIJU (PREMA INTERNATIONAL/EUROPEAN LEUKEMIA NET WORKING GROUP FOR FLOW CYTOMETRY IN MDS)¹⁶

TABLE 2. RECOMMENDED MINIMAL REQUIREMENTS TO ASSESS DYSPLASIA BY FLOW CYTOMETRY ACCORDING TO INTERNATIONAL/EUROPEAN LEUKEMIA NET WORKING GROUP FOR FLOW CYTOMETRY IN MDS, LEUKEMIA (2014);28 (9):1753–8

Populacija stanica koštane srži /Bone marrow subset	Bitni CD-biljezi /Relevant CD markers	Preporučena analiza /Recommended analyses	Pronađena aberacija /Aberrancy
Nezreli mijeloidni i monocitni progenitori /Immature myeloid and monocytic progenitors	SSC, CD45, CD34, CD117, CD38, HLA DR, CD13, CD33, CD15, CD11b, CD5, CD7, CD19, CD56	Postotak stanica u frakciji nukleiranih stanica /Percentage of cells in nucleated cell fraction	Povećani postotak /Increased percentage
		Izražaj CD45 /Expression of CD45	Gubitak ili slabiji/povećan /Lack of/decreased/increased
		Izražaj CD34 /Expression of CD34	Gubitak ili slabiji/povećan /Lack of/decreased/increased
		Izražaj CD117 /Expression of CD117	Homogeno slab ili prekomjeran izražaj /Homogenous under/overexpression
		Izražaj CD13 i CD33 /Expression of CD13 and CD33	Gubitak ili slabiji/povećan /Lack of/decreased/increase
		Izražaj HLA D/DR /Expression of HLA-DR	Gubitak ili slabiji/povećan /Lack of/increased expression
		Asinkroni izražaj CD11b, CD15 /Asynchronous expression of CD11b, CD15	Pozitivnost biljega zrelih stanica /Presence of mature markers
		Izražaj biljega CD5, CD7, CD19, CD56 /Expression of CD5, CD7, CD19, CD56	Pozitivnost biljega drugih loza /Presence of lineage infidelity markers
Zreli neutrofilni /Maturing neutrophils	SSC, CD45, CD15, CD11b, CD16, CD10, CD13, CD33, CD36, CD64, CD34, CD117, HLA DR, CD5, CD7, CD56, CD19	Postotak stanica kao omjer prema limfocitima /Percentage of cells as ratio to lymphocytes	Smanjen /Decreased
		SSC kao omjer prema SSC-u limfocita /SSC as ratio vs SSC of lymphocytes	Smanjen /Decreased
		Odnos CD13 i CD11b /Relationship of CD13 and CD11b	Promijenjeni izgled /Altered pattern
		Odnos CD13 i CD16 /Relationship of CD13 and CD16	Promijenjeni izgled /Altered pattern
		Odnos CD15 i CD10 /Relationship of CD15 and CD10	Promijenjeni izgled /Altered pattern
Monociti /Monocytes	SSC, CD45, CD14, CD11b, CD13, CD33, CD64, CD16, CD36, CD34, HLA DR, CD5, CD7, CD56 (CD303)	Postotak stanica / Percentage of cells	Smanjen/povećan / Decreased/increased
		Distribucija stadija zrelosti /Distribution of maturation stage	Pomak prema nezrelim /Shift towards immature
		Odnos HLA D/DR i CD11b /Relationship of HLA-DR and CD11b	Promijenjeni izgled /Altered pattern
		Odnos CD36 i CD14 /Relationship of CD36 and CD14	Promijenjeni izgled /Altered pattern
		Izražaj CD13 i CD33 /Expression of CD13 and CD33	(Homogeno) slab ili prekomjeran izražaj / (Homogenous) under/overexpression
		Izražaj CD56 /Expression of CD56	Pozitivnost biljega drugih loza /Presence of lineage infidelity marker
Progenitori B-limfocita /Progenitor B cells	CD45, CD19, CD34, CD10	Broj kao frakcija ukupnog broja stanica CD34+ u ogradi CD45/CD34/SSC u kombinaciji s CD10 ili CD19 /Enumeration as fraction of total CD34+ based on CD45/CD34/SSC in combination with CD10 or CD19	Smanjen ili nepostojeći /Decreased or absent
Eritrocitni odjeljak /Erythroid compartment	CD117, CD235a, CD36, CD71 (CD105)	Postotak nukleiranih eritroidnih stanica /Percentage of nucleated erythroid cells	Povećan/Increased
		Odnos CD71 i CD235a /Relationship CD71 and CD235a	Promijenjeni izgled/Altered pattern
		Izražaj CD71/Expression of CD71	Slab/Decreased
		Izražaj CD36/Expression of CD36	Slab/Decreased
		Postotak prekursora pozitivnih na CD117 /Percentage of CD117-positive precursors	Povećan/Increased

trocitne progenitore, progenitorne stanice, limfocite, monocite, granulocite (normalno: $\leq 2\%$). Uočene aberacije jesu: povećan broj, povećan SSC koji se dokazuje omjerom SSC-a mijeloblasta / SSC-a limfocita

b) *identifikaciju fenotipskih aberantnosti progenitornih mijelodnih stanica* s pomoću kojih se mogu razlikovati normalni progenitori od progenitora MDS-a. Najčešće prepoznate aberacije povezane su s abnormalnim intenzitetom ili gubitkom biljega: smanjen broj CD45 (normalan omjer CD45-limfocita / CD45-mijeloblasta: 4,5 – 7,4), smanjen broj CD117, smanjen broj CD38 (povećan udjel populacije CD34+CD38-/slabo+), smanjen HLA D/DR (povećanje populacije CD34+HLA DR-/slabo+); promijenjen izražaj biljega CD13 i CD33 (povećana proporcija populacije CD33+CD13- i/ili CD13+CD33-), asinkrona prisutnost biljega zrelih oblika: CD11b ili CD15 (prisutnost populacije CD11b+CD34+, CD15+CD34+), izražaj biljega koji ne pripadaju mijeloičnoj lozi: CD5, CD7, CD19 ili CD56 na stanicama CD34+ ili CD117+.

Analiza imunofenotipa odjeljka zrelih neutrofila uključuje:

a) *definiciju i izražavanje brojnosti neutrofila*

Broj zrelih neutrofila iskazuje se kao omjer prema broju limfocita. Smanjen ili jednak postotak indikativan je za MDS. Dokazivanje hipogranulariteta provodi se s pomoću omjera SSC-a limfocita / SSC-a granulocita (normalno: $> 6,0$)

b) *identifikaciju fenotipskih aberantnosti zrelih neutrofila*

Displastični neutrofilni mogu se prepoznati prema jačem ili slabijem izražaju dvaju ili više antigena. Najčešće fenotipske aberacije jesu: slabiji izražaj CD45 (određuje se omjerom CD45-granulocita / CD45-limfocita), redukcija pozitiviteta biljega CD13, CD33, CD11b, CD64, CD16, abnormalni obrazac prikaza CD13/CD11b i/ili CD13/CD16 te CD16/CD11b, gubitak ili minimalna razina CD10 i promijenjeni prikaz CD15/CD10, pojačan izražaj biljega CD36, povećana frekvencija stanica pozitivnih na CD117 (CD15+CD117+), asinkroni izražaj CD34 (CD15+CD34+) te prisutnost izražaja limfocitnih biljega (CD5, CD7, CD19, CD56).

Analiza imunofenotipa monocitnog odjeljka uključuje:

a) *definiciju i izražavanje brojnosti monocita*

U kombinaciji s korisnim biljezima kao što su CD33, CD14, CD64 i CD36 mogu se lakše razlučiti od neutrofila i kvantificirati. Broj monocita iskazuje se kao postotak nukleiranih stanica. Smanjeni ili povećani postotak indikativan je za MDS. Uočeno je i smanjenje SSC-a monocita (dokazuje se omjerom SSC-a limfocita / SSC-a monocita)

b) *identifikaciju fenotipskih aberantnosti monocita*

Najčešće anomalije povezane su sa slabijim intenzitetom ili redukcijom pozitiviteta biljega CD45, CD13, CD33, CD14, CD64, HLA DR, CD11b, CD16, promjenom obrasca CD14/CD36, CD14/CD16, HLA DR/CD11b, abnormalnom distribucijom maturacijskog stadija (pomak prema nezrelim oblicima), abnormalnim prikazom HLA DR/CD11b, CD36/CD14, smanjenjem pozitiviteta biljega CD13 i CD33 (povećan je udjel populacija CD13+CD33- i/ili CD33+CD13-), prekomjernim izražajem nelinejskog biljega CD56 ($> 20\%$), abnormalno pozitivnim izražajem biljega CD7, kao i asinkronim izražajem biljega CD34 (CD14+CD34+).

Analiza imunofenotipa odjeljka progenitornih limfocita uključuje:

a) *definiciju i izražavanje brojnosti B-progenitornih stanica* koje se identificiraju kao stanice CD34+CD19+ ili CD34+CD10+. Preporučuje se iskazivanje broja B-progenitora kao frakcije progenitora CD34+. Smanjeni postotak ($< 5\%$) ili njihov potpuni izostanak često se nalazi u MDS-u.

Analiza imunofenotipa eritroidnog odjeljka uključuje:

a) *definiranje eritrocitnog odjeljka*

b) *identifikaciju fenotipskih aberantnosti*

Najčešće se uočavaju povećanje nukleiranih eritrocita u odnosu prema ukupnom broju nukleiranih stanica, povećanje broja eritrocitnih progenitora CD117+ (normalno do 3,5), heterogeni izražaj biljega CD36 i CD71 mjeren preko KV% distribucije (normalno za CD36 $< 8,5\%$, za CD71 $< 6,5\%$) ili njihov oslabljeni izražaj, abnormalni izgled populacije CD71/CD235a, CD36/CD235a.

Bodovni sustav analize fenotipa protočnom citometrijom (indeks FC-a; engl. Flowcytometry scoring system – FCSS)

Broj fenotipskih anomalija nađenih protočnom citometrijom u pojedinim staničnim odjeljcima, kategoriziran prema predlošku, naziva se indeks FC-a. Poput kliničkih prognostičkih sustava bodovanja, postoje i bodovni sustavi analize fenotipa protočnom citometrijom.

Do danas ih je poznato nekoliko.¹⁶ Prvi validirani bodovni sustav protočnom citometrijom (FCSS) koji se temelji na broju nađenih anomalija objavili su Denise Wells i suradnici 2003. godine, a Loosdrecht sa suradnicima revidirao ga je 2008.^{10,17} Sustav se temelji na analizi stanica mijelomonocitne loze (mijeloblasta, neutrofila i monocita). Prema nađenim anomalijama, nalazi se klasificiraju u 3 grupe: „normalan“ s 0 ili 1 abnormalnosti, „umjeren“ s 2 do 4 abnormalnosti nađene u jednoj od loza i „ozbiljan“ s 2 ili 3 abnormalno-

sti nađene u dvije ili više loza. Indeks od 3 ili više potpuno razlučuje MDS od citopenija uzrokovanih drugim poremećajima. Indeks viši od 2 indikativan je za MDS i znatno korelira s IPSS-om. Dobivena je osjetljivost testa 75%-tna, a specifičnost 93,2%-tna. Ogata i suradnici objavili su 2006. godine jednostavan, orijentacijski indeks, tzv. Ogatin indeks koji se zasniva na određivanju broja i anomalija mijeloblasta (izražaj i intenzitet biljega CD45, CD11b, CD16, CD56), B-progenitornih stanica i izmjerenom omjeru SSC-a granulocita / SSC-a limfocita. Indeks ≥ 2 validiran je u istraživanju koje je obuhvatilo japanske i talijanske bolesnike s MDS-om niskog rizika i dobivenim rezultatima osjetljivosti od 80 i 86% te specifičnosti od 98 i 90%.^{18,19} Godine 2014. Xu i suradnici validirali su svoj indeks FC-a koji se zasniva na analizi izražaja biljega CD34, CD19, CD38, CD117, CD7 CD15, CD11b, CD4 i CD56 na nezrelim stanicama koštane srži. Broj nadehnih anomalija ≥ 2 povezan je s MDS-om. U studiji provedenoj na 180 pacijenata s citopenijom tako postavljen model polučio je osjetljivost od 89,4% i specifičnost od 96,5%.^{20,21} Integrirani indeks FC-a (iFCS) ili tzv. ABC-zbroj koji su van de Loosdrecht i Theresia Westers preporučili 2013. godine, ujedinjuje fenotipski dokazanu displaziju na progenitornim mijeloidnim stanicama, na zrelih stanicama granulocitne i monocitne loze te onima eritrocitne loze. Odjeljci se zasebno verificiraju, s kriterijem od ≥ 2 anomalije kao pozitivnim nalazom. Skupni se nalaz klasificira kao A: rezultati ne upućuju na mijelodisplastične promjene; B: rezultati upozoravaju na ograničen broj promjena povezanih s MDS-om; C: rezultati su u skladu s MDS-om, pri čemu su dobivene 80%-tna osjetljivost i 95%-tna specifičnost.²²

Prognostička vrijednost analize imunofenotipa protočnom citometrijom u MDS-u

Dokazano je da imunofenotipska analiza displazija i indeks FC-a dobro koreliraju s Međunarodnim prognostičkim bodovnim sustavom (engl. *International Prognostic Scoring System* – IPSS) iz 1997. i/ili Revidiranim međunarodnim prognostičkim bodovnim sustavom (engl. *Revised International Prognostic Scoring System* – IPSS-R) iz 2012. koji pouzdano određuju preživljenje bolesnika s MDS-om i rizik od pretvorbe MDS-a u AML. Što je veći broj mijeloidnih progenitora s abnormalnostima, to je indeks FC-a viši. Visoki indeks povezan je s nepovoljnom dijagnozom, kao i s većom mogućnosti relapsa nakon alogene transplantacije.^{16,21,23} Pri IPSS-u niskog rizika i IPSS-u int-1 veći broj aberacija povezan je s progresijom bolesti.¹⁰ Nedavna studija Canan Alhan i suradnika pokazala je da bolesnici sa smanjenim SSC-om imaju relativno lošiju prognozu.²³ Druga abnormalnost povezana s lošijom prognozom jest pojačan izražaj CD117 u mijeloidnim

progenitorima, što omogućava preživljavanje zloćudnog kлона. S druge strane, bolesnici sa slabijim izražajem CD13 u zrelih monocitima pokazuju bolju prognozu. Niži indeks uglavnom je nađen u oboljelih od MDS-a s displazijom jedne loze (MDS-SLD) i MDS-a s prstenastim sideroblastima (MDS-RS) te u bolesnika s neklasificiranim MDS-om (MDS-U).²⁴

Zaključak

Imunofenotipizacija protočnom citometrijom u dijagnostici MDS-a može pružiti dodatne važne informacije koje nisu dobivene morfološkim nalazom, citogenetikom ili testovima molekularne dijagnostike. Jedan od njezinih glavnih nedostataka jest i dalje nedovoljno visoka pozitivna prediktivna vrijednost kao posljedica nepostojanja specifičnog biljega ili fenotipa, što smanjuje dijagnostički potencijal ako se primjenjuje kao zasebna tehnika. Nalaz MFC-a trebao bi biti integriran u cjelokupno dijagnostičko izvješće, zajedno s citomorfološkim nalazom venske krvi i koštane srži te histopatološkim, citogenetičkim i/ili molekularnim nalazima, pri čemu bi trebao sadržavati lako razumljiv komentar jesu li rezultati u skladu s MDS-om, pokazuju li samo ograničen broj promjena povezanih s MDS-om ili ne prikazuju njegove značajke.

LITERATURA

1. Cazzola M, Malcovati L. Myelodysplastic syndromes – coping with ineffective hematopoiesis. *N Engl J Med* 2005;352(6): 536–8.
2. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (ur.). World Health Organization Classification of Tumours: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Fourth Edition Lyon, France: IARC Press; 2008.
3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL i sur. (ur.). World Health Organization Classification of Tumours. Vol 2. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Rev. 4. izd. Lyon: IARC Press; 2016.
4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127(20):2391–405.
5. Gredelj Šimec Nj, Kaić G, Škrtić A i sur. Smjernice za dijagnozu i liječenje bolesnika s mijelodisplastičnim sindromom. *Liječ Vjesn* 2017;139:1–11.
6. Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D i sur. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood* 2013;122(17):2943–64.
7. Aanei CM, Picot T, Tavernier E, Guyotat D, Campos Catafal L. Diagnostic Utility of Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes. *Front Oncol* 2016;(6):161.
8. Kárai B, Szánthó E, Kappelmayer J, Hevessy Z. Flow Cytometry in the Diagnosis of Myelodysplastic Syndromes. *EJIFCC* 2013;23(4):109–16.
9. Della Porta MG, Malcovati L, Invernizzi R i sur. Flow cytometry evaluation of erythroid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2006;20:549–55.

10. *van de Loosdrecht AA, Westers TM, Westra AH, Dräger AM, van der Velden VH, Ossenkoppele GJ.* Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood* 2008;111:1067–77.
11. *van de Loosdrecht AA, Alhan C, Béné MC i sur.* Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2009;94:1124–34.
12. *Kern W, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T.* Clinical utility of multiparameter flow cytometry in the diagnosis of 1013 patients with suspected myelodysplastic syndrome: correlation to cytomorphology, cytogenetics, and clinical data. *Cancer* 2010;116:4549–63.
13. *Westers TM, Ireland R, Kern W i sur.* Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia* 2012;26(7):1730–41.
14. *van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S i sur.; EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708).* EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012;26(9):1908–75.
15. *Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH i sur.; EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708).* EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 2012;26(9):1986–2010.
16. *Porwit A, van de Loosdrecht AA, Bettelheim P i sur.* Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes-proposal from the International/European LeukemiaNet Working Group for Flow Cytometry in MDS. *Leukemia* 2014;28(9):1793–8.
17. *Wells DA, Benesch M, Loken MR i sur.* Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2003;102:394–403.
18. *Ogata K, Kishikawa Y, Satoh C, Tamura H, Dan K, Hayashi A.* Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34⁺ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood* 2006;108:1037–44.
19. *Ogata K, Della Porta MG, Malcovati L i sur.* Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. *Haematologica* 2009;94:1066–74.
20. *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;149:587–97.
21. *Xu F, Li X, Chang C-K i sur.* 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):e88706.
22. *van de Loosdrecht AA, Westers TM.* Cutting Edge: Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes. *J Natl Compr Canc Netw* 2013;11:892–902.
23. *Bento LC, Correia RP, Pitangueiras Manguieira CL i sur.* The Use of Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes: A Review. *Front Oncol* 7:270.
24. *Alhan C, Westers TM, Cremers EM i sur.* The myelodysplastic syndromes flow cytometric score: a three-parameter prognostic flow cytometric scoring system. *Leukemia* 2016;30(3):658–65.