

۱- حنا نه محور، کارشناس علوم آزمایشگاهی و فلوسایتومتریست
۲- دکتر امیر هوشنگ نژاده، دکترای علوم آزمایشگاهی
و عضو انجمن شیمی کلینیکال آمریکا



کاربرد فلوسایتومتری در تشخیص و طبقه‌بندی سندرم‌های میلودیسپلاستیک (MDS)

سلول‌های بنیادی مغز استخوان توانایی خود را برای تولید طبیعی سلول‌های خونی از دست می‌دهد که منجر به کم‌خونی، کاهش پلاکت یا کاهش گلبول‌های سفید می‌شود. تشخیص این بیماری معمولاً با بررسی مغز استخوان و بررسی سیتوژنتیک انجام می‌شود، اما گاهی یافته‌های مورفولوژیک قطعی نیست. در چنین شرایطی، فلوسایتومتری به عنوان روشی سریع و دقیق می‌تواند به شناسایی ناهنجاری‌های سلولی کمک کند.

با پیشرفت‌های اخیر در تکنولوژی فلوسایتومتری، استفاده از این روش برای تشخیص زودهنگام، طبقه‌بندی ریسک و حتی پایش پاسخ به درمان در MDS افزایش یافته است. با توجه به وجود فنوتیپ‌های متنوع و نبود مارکر پاتوگنومیک، ترکیب چندین پارامتر برای تحلیل داده‌ها اهمیت زیادی دارد.

مارکر پاتوگنومیک به ویژگی یا علامتی گفته می‌شود که وجود آن به تنهایی برای تشخیص یک بیماری خاص کافی است، یعنی آن مارکر فقط در آن بیماری دیده می‌شود و در هیچ بیماری دیگری ظاهر نمی‌شود. در زمینه فلوسایتومتری و پزشکی اگر یک مارکر پاتوگنومیک در یک نمونه دیده شود، پزشک می‌تواند با اطمینان بالا بگوید بیمار به آن بیماری خاص مبتلاست. اگر مارکر خاصی فقط در MDS دیده می‌شود، آن را پاتوگنومیک می‌نامیدیم ولی در واقع در MDS چنین مارکری وجود ندارد؛ به همین دلیل ترکیب چندین مارکر و الگوی ناهنجاری‌ها برای تشخیص آن استفاده می‌شود.

اپیدمیولوژی و عوامل خطر

MDS بیماری است که معمولاً در افراد مسن دیده می‌شود. میانگین سنی بیماران هنگام تشخیص حدود ۷۰ سال است و شیوع آن با افزایش سن به شدت بالا می‌رود.

سندرم‌های میلودیسپلاستیک (MDS) گروهی از نئوپلاسم‌های کلونال رده سلولی میلوئیدی است که با دیسپلازی، نارسایی مغز استخوان و خطر تبدیل به لوسمی میلوئید حاد (AML) مشخص می‌شود. دیسپلازی به معنای اختلال در تمایز و تکامل سلول‌های خونی است و یکی از معیارهای اصلی تشخیص سندرم‌های میلودیسپلاستیک محسوب می‌شود. براساس طبقه‌بندی سازمان جهانی بهداشت (WHO)، مشاهده تغییرات دیسپلاستیک در بیش از ۱۰٪ سلول‌های یک رده هماتوپوئیک (اریتروئید، میلوئید یا مگاکاریوسیتی) برای تأیید دیسپلازی اهمیت دارد. ویژگی‌های مورفولوژیک دیسپلازی به شرح زیر است:

- رده اریتروئید: آنیزو و پوکیکیتوز، ناهنجاری‌های هسته‌ای (چندلوبه یا باندی)، باقی‌مانده‌های هسته‌ای و در برخی زیرگروه‌ها وجود رینگ سیدروبلست.

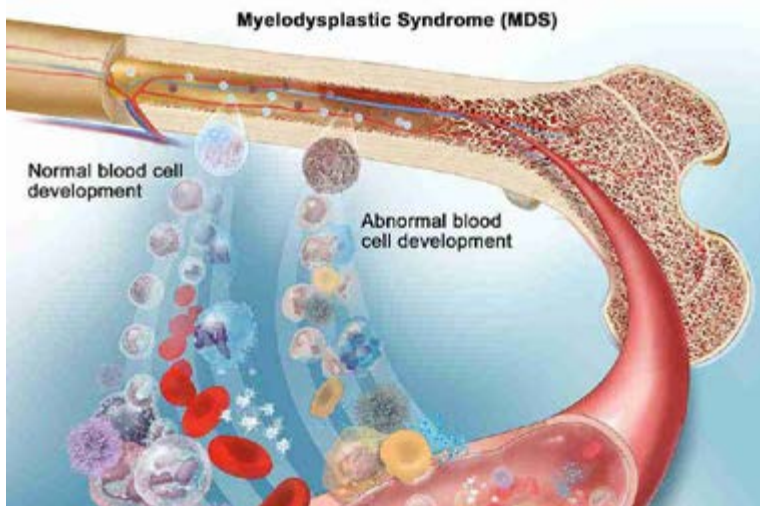
- رده میلوئید: کاهش یا فقدان گرانول‌های سیتوپلاسمی، هیپو- یا هایپر سگمانتاسیون هسته به‌ویژه Pelger-Huët anomaly.

- رده مگاکاریوسیت: حضور میکرومگاکاریوسیت‌ها، مگاکاریوسیت‌های با هسته تک‌لوبه یا هسته‌های چندلوبه نامتقارن.

وجود دیسپلازی بیانگر هماتوپوئز ناکارآمد و مبنای اصلی طبقه‌بندی WHO در MDS است. شدت و گستره دیسپلازی در تعیین زیرگروه‌های MDS، ارزیابی پیش‌آگهی و تخمین احتمال پیشرفت به لوسمی میلوئید حاد (AML) نقش دارد.

تشخیص MDS به دلیل تنوع فنوتیپی و نبود مارکر اختصاصی همواره چالش برانگیز بوده است. فلوسایتومتری به عنوان یک ابزار کمکی تشخیصی در سال‌های اخیر جایگاه ویژه‌ای در بررسی MDS پیدا کرده است. در این مقاله، به بررسی استفاده از فلوسایتومتری در بررسی و تشخیص MDS، آنالیز سلول‌های بلاست، بررسی رده‌های خونی، سیستم‌های امتیازدهی مانند نمره Osgata و نقش آن در افتراق MDS از نارسایی‌های خوش‌خیم می‌پردازیم.

سندرم‌های میلودیسپلاستیک نوعی از سرطان‌های خون هستند که معمولاً در افراد مسن تر دیده می‌شود. در اثر این بدخیمی‌ها



عوامل خطر اصلی

- سن بالا: مهم‌ترین عامل خطر است.
- جنسیت: مردان کمی بیشتر از زنان مبتلا می‌شوند.
- تماس شغلی و محیطی: مواجهه با بنزن، حلال‌ها و دود سیگار خطر ابتلا به بیماری را به شدت افزایش می‌دهد.
- درمان‌های پیشین سرطان: شیمی‌درمانی و رادیوتراپی می‌تواند منجر به MDS ثانویه شود.
- اختلالات ژنتیکی: برخی سندروم‌های ارثی مانند Fanconi Anemia یا Bloom Syndrome استعداد بیشتری برای ابتلا ایجاد می‌کنند.

- نارسایی پیش‌رونده مغز استخوان: پان‌سیتوپنی در سنین کودکی با نوجوانی دیده می‌شود.

- استعداد بالایی ابتلا به بدخیمی‌های خونی، MDS و AML و بدخیمی‌های غیرخونی مانند سرطان‌های سر و گردن، دستگاه تناسلی و دستگاه گوارش).

هر دو بیماری Bloom Syndrome و Fanconi Anemia از سندروم‌های ارثی نقص در ترمیم DNA هستند که باعث افزایش استعداد ابتلا به بدخیمی‌های خونی از جمله MDS و AML می‌شوند. به دلیل اهمیت این دو بیماری در افزایش خطر ابتلا به سندروم‌های میلودیسه‌لاستیک آنها را مختصراً شرح می‌دهیم:

ارتباط Fanconi Anemia و Bloom Syndrome با MDS

هر دو بیماری به دلیل بی‌ثباتی ژنومی و افزایش شکست کروموزومی، ریسک بالایی برای تبدیل به MDS دارند. در بیماران مبتلا به Fanconi Anemia، خطر MDS تا حدود ۳۰-۴۰٪ در طول عمر گزارش شده است. در Bloom Syndrome هم گرچه داده‌ها محدودترند، اما ریسک MDS و AML به طور معنی‌داری بالاتر از جمعیت عادی است.

Bloom Syndrome

یک اختلال نادر اتوزوم مغلوب است و علت آن جهش در ژن BLM که کدکننده پروتئین خانواده RecQ Helicase است. این پروتئین در ترمیم DNA و حفظ پایداری ژنومی نقش دارد. این بیماران استعداد بالایی برای ابتلا به سرطان دارند (بیش از ۱۰ برابر جمعیت عادی)، شایع‌ترین آن لوسمی‌های حاد، لنفوم‌ها و سایر بدخیمی‌های غیرخونی به ویژه روده و پوست و MDS است.

درمان‌های MDS

۱- درمان حمایتی (Supportive care)

- انتقال خون برای اصلاح کم‌خونی و ترومبوسیتوپنی
- آهن‌زدایی در بیمارانی که به طور مزمن خون دریافت می‌کنند.
- استفاده از آنتی‌بیوتیک و فاکتورهای رشد (G-CSF, EPO)
- که به منظور کاهش عفونت‌ها و بهبود هموگلوبین مورد استفاده قرار می‌گیرند.

۲- داروهای هیپومتیل‌اسیون (Hypomethylating agents)

آزاسیتیدین (Azacitidine)
دسیتابین (Decitabine)

این داروها در بیماران پرخطر باعث کند شدن روند بیماری می‌شود و می‌توانند پیشرفت به سمت AML را به تأخیر بیندازد.

۳- درمان‌های اختصاصی‌تر

- لینالیدوماید (Lenalidomide)، به ویژه در بیماران با حذف کروموزوم 5q بسیار مؤثر است.

- ایمونوساپرسیو تراپی (ATG، سیکلوسپورین)، در زیرگروه‌های خاص و بیماران جوان‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۴- پیوند سلول‌های بنیادی (HSCT)

تنها روش درمانی شفا بخش برای MDS محسوب می‌شود.

مشخصات بالینی

- قد کوتاه
- پوست حساس به نور همراه با تارنگتازی و لکه‌های هیپوپیگمانته و هلیپرپیگمانته
- صورت باریک و بارز به شکل پروانه‌ای
- افزایش شدید شکست کروموزومی در سلول‌ها (ویژگی تشخیصی آزمایشگاهی)

Fanconi Anemia

یک اختلال ژنتیکی نادر اتوزوم مغلوب یا وابسته به X است و علت آن جهش در یکی از بیش از ۲۰ ژن مرتبط با مسیر Fanconi که مسئول ترمیم Cross-link های DNA هستند.

مشخصات بالینی

- ناهنجاری‌های مادرزادی (کوتاهی قد، شست‌های غیرطبیعی، مشکلات کلیوی، ناهنجاری‌های رنگدانه‌ای پوست مثل café-au-lait spots)

مناسب بیماران جوان و پرخطر است، اما به دلیل سن بالای بیشتر بیماران، در رابطه با تمامی بیماران قابل انجام نیست.

۵- درمان های جدید در حال بررسی

- مهارکننده های BCL2 (مثل Venetoclax)
- داروهای هدفمند بر اساس جهش های خاص (IDH1/2 in-) (inhibitors, TP53-directed therapies)
- ایمونوتراپی (آنتی بادی های مونوکلونال، CAR-T cell therapy)

اصول فلوسایتومتری در آنالیز MDS

فلوسایتومتری روشی است که با استفاده از آنتی بادی های فلورسنت و لیزر، مارکرهای سطحی یا سیتوپلاسمی سلول ها را شناسایی می کند. این روش به ما امکان می دهد که بینیم هر سلول چه مارکری را بیان می کند و آیا روند بلوغ آن طبیعی است یا خیر. در MDS، سلول ها اغلب بلوغ ناقص یا الگوهای غیرعادی از بیان آنتی ژن ها دارند به همین دلیل، فلوسایتومتری می تواند این اختلالات را شناسایی کند حتی اگر در زیر میکروسکوپ واضح نباشند. پانل های آنتی بادی اختصاصی برای بررسی MDS شامل مارکریایی برای بررسی سلول های بلاست، گرانولوسیت ها، اریترئوئیدها، مونوسیت ها و لنفوسیت های B می باشند. انتخاب مناسب این مارکرها و تفسیر دقیق تغییرات آن ها نیاز به مهارت و تجربه دارد.

آنالیز رده گرانولوسیتی

در رده گرانولوسیتی، فلوسایتومتری می تواند به بررسی تکامل و بیان مارکرها کمک کند. در MDS ممکن است موارد زیر دیده شود:

- کاهش بیان CD10 در گرانولوسیت ها
- کاهش بیان CD13/CD16
- وجود سلول های نابالغ که با بیان CD34 و CD117 مشخص می شود.
- بیان نابجای مارکریایی مانند CD56 و CD7 که در شرایط طبیعی در این رده وجود ندارد.

- HLA-DR ممکن است بیان نابه جا داشته باشد به این معنا که در شرایط فیزیولوژیک، گرانولوسیت های بالغ فاقد بیان این آنتی ژن است و HLA-DR محدود به سلول های ارائه دهنده آنتی ژن مانند مونوسیت ها و لنفوسیت های B است. با این حال، در بیماران مبتلا به سندرم های میلودیسپلاستیک به دلیل اختلال در روند تمایز و بلوغ رده میلوئید، ممکن است بیان نابجای HLA-DR بر روی گرانولوسیت ها مشاهده شود. این پدیده که از طریق فلوسایتومتری شناسایی می شود، به عنوان یکی از نشانگرهای دیسپلازی ایمونوفنوتیپی در نظر گرفته می شود. اهمیت بالینی این یافته در آن است که بروز HLA-DR در گرانولوسیت های می تواند نشانه ای از هماتوپوئز کلونال و غیرطبیعی باشد و به افتراق MDS از سیتوپنی های واکنشی کمک کند.

این ناهنجاری ها نشان می دهند که روند تمایز سلول های گرانولوسیتی دچار اختلال شده است. همچنین، کاهش بیان CD15 نیز می تواند نشانه ای از اختلال در بلوغ گرانولوسیت ها باشد.

آنالیز سلول های بلاست

بررسی میزان بلاست ها در مغز استخوان اهمیت زیادی دارد اما مهم تر از آن، ویژگی های فنوتیپی آن ها است. در MDS بلاست ها ممکن است:

- مارکرهای نابجا مانند CD7 یا CD56 را بیان کنند.
- CD34 و CD117 را به صورت واضح بیان میکنند.
- CD45 کاهش یافته داشته باشد.

آنالیز سلول های B-progenitor

در مغز استخوان سالم، سلول های B-progenitor (CD10++) وجود دارند که نمایانگر فعالیت طبیعی مغز استخوان هستند. در MDS، این سلول ها معمولاً کاهش می یابند یا حذف می شود، که می تواند نشانه ای از درگیری نئوپلاستیک باشد. نبود این سلول های یکی از معیارهای اصلی در سیستم Ogata است.

سیستم امتیازدهی Ogata

سیستم امتیازدهی اوگاتا (Ogata Score) یکی از روش های کمی و استاندارد برای تحلیل فلوسایتومتری در تشخیص سندرم های میلودیسپلاستیک (MDS) است که به وسیله دکتر Ogata و همکارانش معرفی شده است. هدف سیستم اوگاتا کمک به تشخیص MDS با استفاده از چهار معیار فلوسایتومتری ساده و قابل اندازه گیری است که در مجموع یک نمره کلی به دست می آید. از مزایای سیستم اوگاتا می توان به سادگی، سرعت انجام، قابلیت تکرار بالا و کمک به افتراق MDS از نارسایی های خوش خیم مغز استخوان اشاره کرد. البته محدودیت هایی هم دارد؛ برای مثال نمی تواند تمام زیرگروه های MDS را به خوبی شناسایی کند و در موارد MDS خفیف حساسیت پایین تری دارد. زیرگروه های MDS بر اساس طبقه بندی سازمان بهداشت جهانی در سال 2022 به شرح زیر است:

- MDS با جهش های ژنتیکی مشخص مثل: del5q، ایزوله، جهش SF3B1، غیرفعال شدن TP53
- MDS با بلاست کم (MDS-LB)
- MDS با بلاست افزایش یافته (MDS-IB1 و MDS-IB2)
- MDS هیپوپلاستیک (MDS-H)
- MDS غیرقابل طبقه بندی (MDS-U)

همچنین لازم است این سیستم همراه با سایر روش های تشخیصی مانند مورفولوژی و سیتوژنتیک استفاده شود تا بهترین نتیجه حاصل شود.

این چهار معیار عبارتند از:

- درصد بالای بیان CD34
- نسبت غیرنرمال بین گرانولوسیت های CD45dim و مونوسیت ها
- حذف یا کاهش B-Progenitor ها
- کاهش شدت بیان CD45 در بلاست ها
- اگر بیمار نمره ۲ که به معنای دو مورد یا بیشتر از چهار مورد است را کسب کند، احتمال MDS بالاست.

افتراق MDS از بیماری های دیگر

فلوسایتومتری می تواند به افتراق MDS از آنمی آپلاستیک، کم خونی مگالوبلاستیک و نارسایی های خوش خیم کمک کند. برای مثال:

- در آنمی آپلاستیک، الگوهای بیان معمولاً نرمال هستند، گرچه تعداد سلول ها کم است.
- در کم خونی مگالوبلاستیک، بلوغ هسته ای سلول ها مشکل دارد، اما در فلوسایتومتری ممکن است الگوها طبیعی باشد.
- در MDS، چندین مارکر به صورت هم زمان دچار اختلال می شوند که الگوی خاصی ایجاد می کنند.

پانل مورد نیاز در بررسی و تشخیص MDS و بیان نقش کلیدی

هر مارکر در این پانل

- CD34:** شناسایی سلول های پیش ساز هماتوپوئیتیک (بلاست ها)
- CD117:** مارکر سلول های نابالغ، کمک به تمایز بلاست ها از سلول های بالغ
- HLA-DR:** بیان در بلاست ها و مونوسیت ها؛ افتراق جمعیت های نابالغ
- CD45:** مارکر عمومی لکوسیت ها؛ کمک به شناسایی و مقایسه شدت بیان بین رده ها
- CD13:** مارکر بلوغ گرانولوسیتی؛ بررسی توالی طبیعی تکامل
- CD16:** مارکر گرانولوسیتی؛ کاهش یا فقدان بیان در دیسپلازی
- CD10:** بیان در گرانولوسیت ها؛ کاهش آن در دیسپلازی شایع است.

CD15: مارکر بلوغ نهایی گرانولوسیت ها

CD33: مارکر عمومی رده میلوئید؛ در مراحل مختلف گرانولوسیتی

و مونوسیتی بیان می شود.

CD14: مارکر اختصاصی مونوسیت های بالغ که در MDS، کاهش

بیان در مونوسیت ها را داریم.

CD64: بیان بالا در مونوسیت ها؛ بررسی افتراق از نوتروفیل ها

مارکرهای نابجا (Abnormal Expression Markers)

- CD7:** مارکر T-cell؛ بیان نابجا در بلاست ها یا رده میلوئید دارد.
- CD56:** مارکر طبیعی NK-cell؛ بیان نابجا این مارکر در MDS نشانه نئوپلازی است.

در شرایط فیزیولوژیک، CD7 و CD56 به طور طبیعی بر روی سلول های T و NK بیان می شود و گرانولوسیت های بالغ و پیش سازهای میلوئید عادی فاقد این آنتی ژن ها است. با این حال، در بیماران مبتلا به سندرم های میلودیسپلاستیک، گرانولوسیت ها یا پیش سازهای میلوئید ممکن است بیان نابجای CD7 یا CD56 را نشان دهد. این پدیده، که از طریق فلوسایتومتری شناسایی می شود، یکی از شاخص های ایمونوفنوتیپی دیسپلازی به شمار می آید و در افتراق MDS از سیتوپنی های واکنشی یا اختلالات غیرکلونال مفید است.

CD56: گاهی در برخی رده های نابالغ بیان نابجا دارد این بیان غیر اختصاصی اما قابل توجه است.

* استفاده از این پانل فلوسایتومتری به پزشکان امکان می دهد تا با دقت بالا سلول های غیرطبیعی و نامتعارف را در مغز استخوان و خون شناسایی کرده و به تشخیص دقیق میلودیسپلازی کمک کنند. این تشخیص مهم است زیرا می تواند به تعیین استراتژی های درمانی مناسب و مدیریت بهتر بیماری کمک کند.

چالش ها و محدودیت ها

- هنوز استاندارد جهانی کاملی برای تفسیر نتایج وجود ندارد.
- تفسیر داده ها نیازمند تجربه و آموزش بالاست.
- هزینه های تجهیزات و آنتی بادی ها ممکن است محدودیت ایجاد کند.
- تفاوت میان آزمایشگاه ها در تفسیر نتایج.

نتیجه گیری

فلوسایتومتری به عنوان یک روش مکمل و قدرتمند، نقش فزاینده ای در تشخیص، طبقه بندی و حتی مانیتورینگ بیماران مبتلا به MDS ایفا می کند. با توجه به پیچیدگی های این بیماری، بهره گیری از تکنولوژی های پیشرفته و تجربه متخصصین می تواند دقت تشخیص را به طور چشمگیری افزایش دهد.

منابع:

- 1- Porwit, A., & Wiktor-Jedrzejczak, W. (2015). Diagnostic criteria of myelodysplastic syndromes (MDS): Flow cytometry and beyond. *Cancer Cytopathology*, 123(2), 69-74
- 2- Ogata, K., et al. (2009). Novel scoring system of flow cytometry to diagnose myelodysplastic syndromes. *Blood*, 114(26), 5362-5371
- 3- van Dongen, J. J. M., et al. (2012). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*, 26(9), 1908-1975
- 4- Westers, T. M., et al. (2017). Standardization of flow cytometry for the diagnosis of myelodysplastic syndromes: Report from the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia*, 31(6), 1338-1349
- 5- Kern, W., et al. (2010). Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and monitoring of MDS. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 78(4), 211-223
- 6- Wood, B. L. (2016). Myelodysplastic syndromes: Diagnostic challenges and role of flow cytometry. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 11(6), 499-507
- 7- Matarraz, S., et al. (2010). Immunophenotypic alterations of bone marrow hematopoietic cells in myelodysplastic syndromes. *International Journal of Laboratory Hematology*, 32(6), 584-596
- 8- Alhan, C., et al. (2021). Flow cytometric evaluation in MDS: Updated methodologies and the road to harmonization. *Hematology Reports*, 13(2), 220-233
- 9- van de Loosdrecht, A. A., et al. (2013). Application of flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 98(3), 385-393
- 10- www.nejadeh-lab.com