



Rekomendacje ekspertów MDS PALG w zakresie diagnostyki zespołów mielodysplastycznych w Polsce na 2021 rok

Diagnosis of myelodysplastic syndromes in Poland: Polish Adult Leukemia Group (PALG) 2021 recommendations

Krzysztof Mądry¹, Joanna Drozd-Sokołowska¹, Karol Lis¹,
Bożena Katarzyna Budziszewska², Bartłomiej Pogłódek³, Rafał Machowicz¹,
Edyta Subocz⁴, Katarzyna Wiśniewska-Piąty⁵, Tomasz Wróbel⁶, Jan Maciej Zaucha⁷,
Ewa Zarzycka⁷, Olga Haus⁸, Ewa Karakulska-Prystupiuik¹, Lidia Gil⁹,
Aleksandra Butrym¹⁰, Agnieszka Tomaszewska¹, Grzegorz W. Basak¹,
Anna Waszczuk-Gajda¹, Agnieszka Pluta¹¹, Paweł Szwedyk¹²,
Małgorzata Jarmuż-Szymczak⁹, Jagoda Rytel¹, Jadwiga Dwilewicz-Trojaczek¹

¹Klinika Hematologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Warszawski Uniwersytet Medyczny

²Klinika Hematologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

³Katedra Hematologii, Uniwersytet Jagielloński, *Collegium Medicum*, Kraków

⁴Oddział Kliniczny Hematologii, Warmińsko-Mazurskie Centrum Onkologii MSWiA, Olsztyn

⁵Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁶Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku,
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

⁷Katedra i Klinika Hematologii i Transplantologii, Gdański Uniwersytet Medyczny

⁸Katedra i Zakład Genetyki Klinicznej, *Collegium Medicum* w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

⁹Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku,
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

¹⁰Zakład Profilaktyki i Terapii Nowotworów, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

¹¹Katedra i Klinika Hematologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

¹²Oddział Hematologii i Chorób Wewnętrznych z Pododdziałem Dziennym,
Szpital Specjalistyczny im. Ludwika Rydygiera w Krakowie

Przedrukowano za zgodą z:

Mądry K, Drozd-Sokołowska J, Lis K, et al. Diagnosis of myelodysplastic syndromes in Poland: the Polish Adult Leukemia Group (PALG) 2021 recommendations. *Acta Haematologica Polonica* 2022; 53 (1): 3–18. DOI: 10.5603/AHPa2022.0001.

Należy cytować wersję pierwotną

Streszczenie

Zespoły mielodysplastyczne (MDS) to heterogenna grupa chorób nowotworowych układu krwiotwórczego objawiająca się nieefektywną hematopoezą i tendencją do transformacji do ostrej białaczki szpikowej. Rozpoznanie MDS należy brać pod uwagę w diagnostyce różnicowej cytopenii, zwłaszcza u starszych osób. W artykule przedstawiono zalecenia ekspertów MDS Polskiej Grupy

Adres do korespondencji: Krzysztof Mądry, Klinika Hematologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1A, 02–097 Warszawa, e-mail: kmadry@wum.edu.pl

Leczenia Białaczek u Dorosłych (PALG) w zakresie diagnostyki MDS. Zaprezentowano współczesne klasyfikacje i wskaźniki prognostyczne, a także szczegółowo omówiono badania rekomendowane przy rozpoznaniu MDS — badanie cytologiczne, histopatologiczne, immunofenotypowe, cytogenetyczne i molekularne. Celem pracy jest implementacja współczesnej wiedzy o MDS do rutynowej, codziennej praktyki od diagnostyki cytopenii do ustalenia konkretnego rozpoznania i rokowania chorych na MDS.

Słowa kluczowe: zespoły mielodysplastyczne, diagnostyka, rekomendacje

Hematologia — Edukacja 2022; 2, 1: 1–18

Abstract

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of neoplastic diseases of the hematopoietic cells manifested by ineffective hematopoiesis and a tendency to transform into acute myeloid leukemia. MDS should be considered in the differential diagnosis of cytopenia, especially in the elderly. This article presents the recommendations of MDS experts of the Polish Adult Leukemia Group (PALG) for the diagnosis of myelodysplastic syndromes. We present current classifications and prognostic indices, as well as diagnostic examinations recommended for MDS: cytological, histopathological, immunophenotypic, cytogenetic and molecular tests. The aim of the study is to implement up-to-date knowledge about myelodysplastic syndromes into routine clinical practice, from the diagnosis of cytopenia to the specific diagnosis and prognosis in MDS patients.

Key words: myelodysplastic syndromes, diagnosis, recommendations

Hematologia — Edukacja 2022; 2, 1: 1–18

Wprowadzenie

Zespoły mielodysplastyczne (MDS, *myelodysplastic syndromes*) to nowotwory o zróżnicowanym przebiegu klinicznym wywodzące się z komórki macierzystej hematopoezy. Cechą charakterystyczną MDS jest nieefektywna hematopoeza objawiająca się zmianami dysplastycznymi komórek szpiku i krwi obwodowej, cytopenią we krwi obwodowej i zwiększonym ryzykiem transformacji do ostrej białaczki szpikowej (AML, *acute myeloid leukemia*).

Epidemiologia

Szacuje się, że liczba nowych zachorowań na MDS wynosi 4,5/100 000/rok. Zazwyczaj choroba dotyczy osób starszych. Mediana wieku zachorowania u dorosłych wynosi 70–75 lat, a według Polskiego Rejestru MDS — 70 lat [1, 2]. W wieku 70–74 lat zapadalność wynosi 16,6/100 000/rok, w wieku 75–79 — 25,7/100 000/rok i wzrasta do ponad 36/100 000/rok u osób 80-letnich i starszych lat [3]. Zespoły mielodysplastyczne u dzieci występują bardzo rzadko, z medianą wieku zachorowania wynoszącą 6,8 roku. W populacji osób do 30. roku życia częstość nowych zachorowań osiąga 0,1/100 000/rok. Chorzy poniżej 50. roku życia stanowią 9% wszystkich chorych na MDS. Częściej chorują mężczyźni; stosunek liczbowy

mężczyzn do kobiet wynosi 1,1–1,4:1 i zwiększa się z wiekiem.

Prawdopodobnie liczba zachorowań na MDS jest niedoszacowana z powodu braku odpowiedniej diagnostyki cytopenii u osób starszych.

Obraz kliniczny

Obraz kliniczny MDS nie jest charakterystyczny. Objawy wynikają najczęściej z cytopenii. Pojawiają się cechy niedokrwistości, skaza małopłytkowa, zakażenia wynikające z granulocytopenii i zaburzeń funkcji neutrofilów. Są to zwykle zakażenia bakteryjne i grzybicze. Powiększenie wątroby lub śledziona stwierdza się rzadko. Także objawy ogólne (zmniejszenie masy ciała, gorączka, poty) nie są częste i występują u chorych na MDS z grupy wyższego ryzyka lub w czasie transformacji w AML. U 19–28% chorych na MDS wykrywa się choroby z autoagresji [4]. Najczęstsze z nich to: niedoczynność tarczycy (12%), reumatoidalne zapalenie stawów (3%), małopłytkowość autoimmunizacyjna (3%), łuszczyca (2%), wrzodziejące zapalenie jelit (1%), zapalenia naczyń (1%). Nieco rzadziej występują polimialgia reumatyczna, owrzodzenia skóry, zapalenie tęczówki, zapalenie mięśni, neuropatia obwodowa, zespół Sweeta, zapalenie osierdzia. Częściej niż w populacji ogólnej z MDS współistnieją również takie choroby, jak: wybiórca

Tabela 1. Cechy dysplazji komórek szpiku

Linia erytroidalna	<p>Jądro komórkowe:</p> <ul style="list-style-type: none"> • poliploidalne kształty • mostki wewnątrzjądrowe • mostki między jądrami • wypustki • formy wielojądrowe • formy megaloblastyczne • wielopłatowość jąder • pyknoza <p>Cytoplazma:</p> <ul style="list-style-type: none"> • pierścieniowate syderoblasty • wakuolizacja • nierównomierne wybarwienie cytoplazmy • nakrapianie zasadochłonne • ciała Howella-Jolly'ego (fragmenty rozpadłego jądra) • ciała Pappenheimera <p>Asynchroniczne dojrzewanie jądra w stosunku do cytoplazmy</p>
Linia granulocytowa	<p>Zbyt małe lub zbyt duże formy prekursorów</p> <p>Jądro komórkowe:</p> <ul style="list-style-type: none"> • atypia kształtu jądra • dwupłatowe jądra komórkowe (pseudo-Pelger-Huët) • hipersegmentacja jąder <p>Cytoplazma:</p> <ul style="list-style-type: none"> • zmniejszenie ziarnistości cytoplazmy • nieregularne rozmieszczenie ziarnistości • ziarnistości pseudo-Chédiak-Higashi • pałeczki Auera • wodniczki w cytoplazmie <p>Asynchroniczne dojrzewanie jądra w stosunku do cytoplazmy</p>
Linia megakariocytowa	<p>Mikromegakariocyty (7–15 μm)</p> <p>Jedno- lub dwupłatowe jądra komórkowe</p> <p>Brak synchronizacji między dojrzewaniem jądra i cytoplazmy</p> <p>Formy wielojądrowe</p> <p>Płytki olbrzymie</p> <p>Płytki bezziałne lub z obniżoną liczbą ziarnistości</p>

aplazja czysto czerwonokomórkowa (PRCA, *pure red cell leukemia*), białaczka z dużych ziarnistych limfocytów (LGL, *large granular lymphocytic leukemia*) i nocna napadowa hemoglobinuria (PNH, *paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*).

Warto dodać, że chorzy na MDS, zwłaszcza po 65. roku życia, są bardziej narażeni na wystąpienie epizodów sercowo-naczyniowych (CVE, *cardiovascular events*), między innymi zawału serca, niewydolności serca czy zaburzeń rytmu. W ciągu 3 lat od rozpoznania MDS CVE wystąpiły u 73,2% chorych w porównaniu z 54,5% wśród 1,4 miliona

osób otrzymujących świadczenia z innych przyczyn (*Medicare*, Stany Zjednoczone) [5].

Rozpoznanie

Podstawowe badanie to morfologia krwi obwodowej z oceną rozmazu w mikroskopie świetlnym (cechy dyshematopoezy, odsetek blastów). Niedokrwistość zazwyczaj jest makrocytowa, rzadziej normocytowa lub mikrocytowa, a liczba retikulocytów zazwyczaj pozostaje niepodwyższona. Stwierdzenie cytopenii jest warunkiem niezbędnym do rozpoznania MDS. W diagnostyce różnicowej cytopenii wskazane jest wykonanie podstawowych badań, takich jak: oznaczenie parametrów gospodarki żelazowej, pomiar stężeń witaminy B₁₂ i kwasu foliowego, bezpośredni test antyglobulinowy (BTA), ocena funkcji nerek, wątroby oraz wykluczenie chorób wirusowych (wirusowe zapalenie wątroby typu B [HBV, *hepatitis B virus*] i C [HBC, *hepatitis C virus*], zakażenie ludzkim wirusem upośledzenia (niedoboru) odporności [HIV, *human immunodeficiency virus*]).

Kolejnym badaniem jest biopsja szpiku kostnego z oceną cytomorfologiczną, histopatologiczną, badaniem cytochemicznym (barwienie błękitem pruskim pozwala na wykrycie syderoblastów) i cytogenetycznym.

Badanie cytomorfologiczne szpiku ma charakter decydujący, jeśli chodzi o ocenę odsetka blastów i cech dysplazji — zarówno jakościowo, jak i ilościowo [6]. Najczęstsze zmiany dysplastyczne stwierdzane u chorych na MDS przedstawiono w tabeli 1. Współistnienie cytopenii ze zmianami morfologicznymi typowymi dla MDS lub podwyższonym odsetkiem blastów upoważniają do rozpoznania MDS. Badanie histopatologiczne powinno być rutynowo wykonywane u wszystkich pacjentów i jest szczególnie pomocne w ocenie komórkowości szpiku, włóknienia, cech dysplazji megakariocytów, obecności nieprawidłowego rozmieszczenia prekursorów hematopoezy (ALIP, *abnormal localized immature precursors*), a także odsetka blastów w przypadku, gdy badanie cytomorfologiczne nie jest w pełni miarodajne. U 80% chorych szpik kostny jest bogatokomórkowy, u pozostałych 20% normo- lub ubogokomórkowy.

Rozpoznanie MDS jest możliwe również u chorych, u których nie stwierdzono ewidentnych cech dysplazji ani podwyższonego odsetka blastów, jeśli są obecne określone zmiany cytogenetyczne, tj. –7 lub del(7q), del(5q), i(17q) lub del(17p), –13 lub del(13q), del(11q), del(12p) lub t(12p), del(9q), idic(X)(q13), t(11;16)(q23;p13.3),

Tabela 2. Minimalne kryteria diagnostyczne rozpoznania zespołu mielodysplastycznego (MDS, *myelodysplastic syndrome*)

MDS można rozpoznać, gdy są spełnione oba kryteria wstępne, tj. A, i co najmniej jedno kryterium B

A. Kryteria wstępne (muszą być spełnione oba)

1. Utrzymująca się (≥ 4 miesiące) cytopenia* krwi obwodowej dotycząca ≥ 1 linii komórkowej: erytroidalnej, neutrofilowej, płytkowej (w przypadku nadmiaru blastów lub zmian cytogenetycznych związanych z MDS rozpoznania można dokonać bezzwłocznie)
2. Wykluczenie innych przyczyn cytopenii/dysplazji**

B. Kryteria swoiste dla MDS (duże; ≥ 1 musi być spełnione)

3. Dysplazja w $\geq 10\%$ komórek danej linii komórkowej: erytroidalnej, neutrofilowej, megakariocytowej***
4. Co najmniej 15% pierścieniowatych syderoblastów lub $\geq 5\%$ pierścieniowatych syderoblastów przy współistnieniu mutacji *SF3B1*
5. Od 5% do 19% mieloblastów w badaniu cytologicznym szpiku (lub 2–19% mieloblastów we krwi obwodowej)
6. Typowe nieprawidłowości chromosomów potwierdzone w konwencjonalnym badaniu cytogenetycznym lub badaniu FISH****

C. Kryteria dodatkowe — dla pacjentów spełniających 2 kryteria A, ale niespełniających kryteriów B, w przypadku występowania typowego obrazu klinicznego, np. niedokrwistości makrocytowej zależnej od przetoczeń, ≥ 2 dodatkowe kryteria (C) muszą być spełnione, aby rozpoznać MDS. Powtarzane w czasie biopsje szpiku mogą pomóc w ostatecznym rozpoznaniu

7. Nieprawidłowości w badaniu histologicznym i/lub badaniu immunohistochemicznym trepanobiopsatów wspierające rozpoznanie MDS***
8. Nieprawidłowości w badaniu immunofenotypowym komórek szpiku, pod postacią licznych aberrantnych typowych dla MDS fenotypów wskazujących na monoklonalny charakter komórek linii czerwono krwinkowej i/lub mieloidalnej
9. Dowód klonalności komórek linii mieloidalnej potwierdzony w badaniu molekularnym poprzez stwierdzenie mutacji somatycznych typowych dla MDS****

*Cytopenia definiowana jako wartości poniżej norm danego laboratorium; **w rzadkich przypadkach MDS może współistnieć z innymi przyczynami cytopenii; ***przykłady: skupienia nieprawidłowo zlokalizowanych niedojrzałych prekursorów (ALIP, *abnormal localized immature precursors*), skupienia komórek blastycznych CD34+, dysplastyczne mikromegakariocyty potwierdzone w badaniu immunohistochemicznym ($\geq 10\%$ dysplastycznych megakariocytów); ****typowe dla MDS nieprawidłowości chromosomów, np. *del(5q)*, -7 wskazują na rozpoznanie MDS nawet w przypadku nieobecności zmian morfologicznych; *****obecność licznych mutacji typowych dla MDS (np. *SF3B1*) zwiększa prawdopodobieństwo rozpoznania MDS lub rozwoju MDS w przyszłości; FISH (*fluorescence in situ hybridization*) — fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

t(3;21)(q26.2;q22.1), t(1;3)(p36.3;q21.1), t(1;3)(p36.3;q21.1), t(2;11)(p21;q23), inv(3)(q21q26.2), t(3;3)(q21;q26.2), t(6;9)(p23;q34). Zmiany cytogenetyczne, takie jak +8, del(20q) i -Y, uznaje się za zbyt mało swoiste dla MDS. Badania molekularne i immunofenotypowe metodą cytometrii przepływową mają charakter uzupełniający i nie są obowiązkowe. Kryteria rozpoznania MDS przedstawiono w tabeli 2 [7].

Podstawowe badania w diagnostyce MDS przedstawiono w tabeli 3, natomiast na rycinie 1 przedstawiono algorytm rozpoznawania MDS.

Diagnostyka różnicowa

W diagnostyce różnicowej MDS w pierwszej kolejności należy wykluczyć pierwotnie pozaszpikowe przyczyny cytopenii, inne nowotwory układu krwiotwórczego, a także PRCA, PNH czy przerzuty guzów litych do szpiku kostnego. W przypadku charakterystycznego wywiadu rodzinnego czy osobniczego, zwłaszcza u młodszych osób, należy wykluczyć wrodzone nowotwory mieloidalne. Szczegółowe zestawienie przyczyn prowadzących do cytopenii/dysplazji przedstawiono w tabeli 4.

Stany poprzedzające MDS

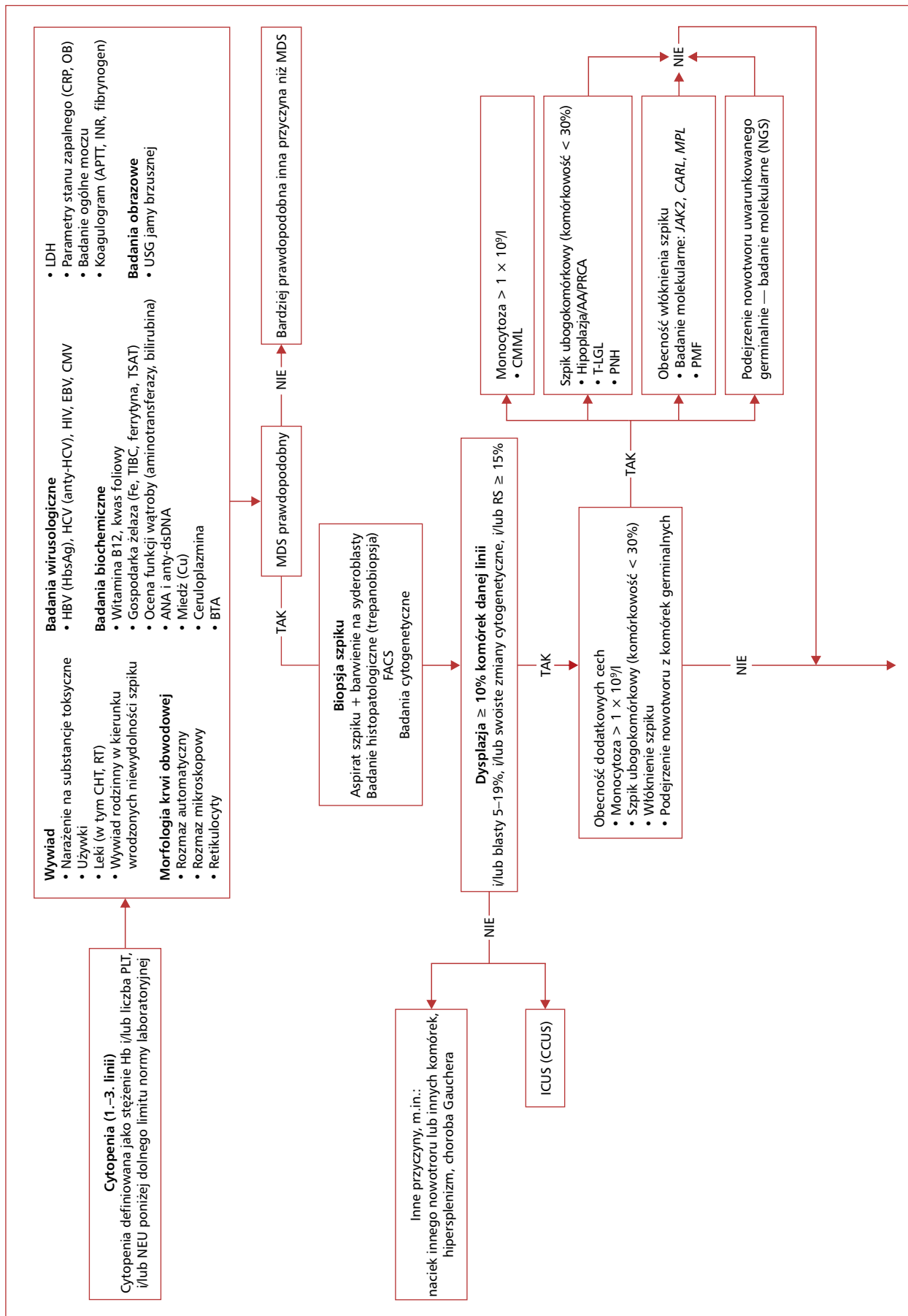
U części zdrowych osób stwierdza się występowanie mutacji somatycznych/zmian cytogenetycznych typowych dla nowotworów mieloidalnych. Brak cytopenii i innych cech MDS upoważnia do rozpoznania klonalnej hematopojezy o nieokreślonym znaczeniu (CHIP, *clonal hematopoiesis with indeterminate potential*). W przypadku cytopenii bez innych cech MDS lub dysplazji bez cytopenii i innych cech MDS rozpoznaje się, odpowiednio, idiopatyczną cytopenię o nieustalonym znaczeniu (ICUS, *idiopathic cytopenia of undetermined significance*) i idiopatyczną dysplazję o nieustalonym znaczeniu (IDUS, *idiopathic dysplasia of undetermined significance*). Z kolei w przypadku stwierdzenia cytopenii bez uchwytej przyczyny i zmian molekularnych lub cytogenetycznych, niewystarczająco swoistych dla MDS, należy rozpoznać klonalną cytopenię o nieustalonym znaczeniu (CCUS, *clonal cytopenia of undetermined significance*) [8].

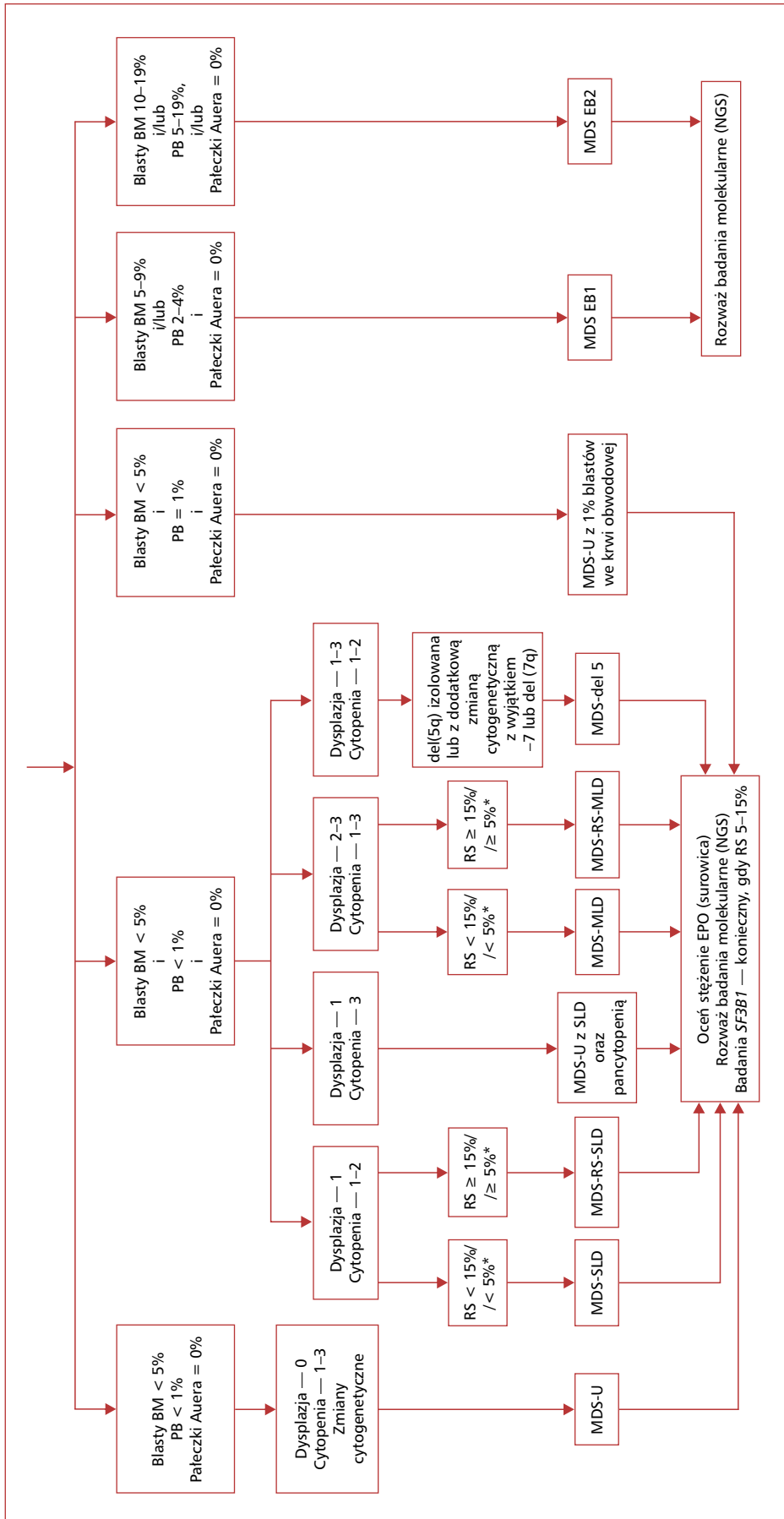
Nie rozstrzygnięto, czy występujące w CHIP nabyte mutacje są wynikiem procesów starzenia, czy jest to wczesne stadium nowotworu. U części osób może się w przyszłości rozwinąć MDS (0,5–1%/rok). U osób, u których stwierdzono CHIP,

Tabela 3. Badania diagnostyczne u chorych na zespoły mielodysplastyczne (MDS, *myelodysplastic syndromes*)

Rodzaj badania	Materiał/zalecenia dotyczące oceny	Cel	Konieczne
Morfologia krwi obwodowej (rozsmaz)	Krew obwodowa	Stwierdzenie cytopenii i dysplazji jednej lub większej liczby linii komórkowych Ocena odsetka blastów	Konieczne
Biopsja aspiracyjna szpiku kostnego	Szpik kostny Ocena ≥ 500 komórek	Ocena komórkowości szpiku i stosunku linii E:M Ocena odsetka blastów — odsetek komórek jądrzastych niezależnie od dominującej linii erytroidalnej Stwierdzenie dysplazji jednej lub większej liczby linii komórek hematopoetycznych	Konieczne
Biopsja szpiku kostnego (badanie histopatologiczne)	Pierścieniowate syderoblasty — barwienie błękitem pruskim Ocena 100 erytroblastów	Ocena odsetka syderoblastów pierścieniowatych	Konieczne w LR-MDS
Analiza cytogenetyczna	Biopiat ≥ 1 cm (formalina) • Panel minimalny IHC: CD34+, CD117/KIT, CD42b lub CD61, tryptaza • Panel dodatkowy: CD3, CD14, CD20	Ocena komórkowości szpiku, blastów i cech dysplazji	Konieczne
FISH	Szpik (heparyna) ≥ 5 ml Krew — warunkowo, w przypadku braku materiału ze szpiku	Wykrycie nabytych nieprawidłowości chromosomowych, które mogą pozwolić ustalić rozpoznanie ostateczne i rokowanie	Konieczne
Cytometria przepływowa — immunofenotypowanie	Szpik (EDTA) ≥ 2 ml	Wykrycie celowanych nieprawidłowości w przypadku niewydolności standardowej metody cytogenetycznej	Rekomendowane
Badania molekularne	Szpik (EDTA) $\geq 2-5$ ml Skóra, cebulki włosów	Wykrycie nieprawidłowości w linii erytroidalnej, niedojrzałych komórkach linii mieloidalnej, dojrzałych granulocytach, monocytach, niedojrzałych i dojrzałych komórkach linii limfoidalnej Wykrycie mutacji somatycznych Wykrycie mutacji germlinalnych	Rekomendowane Rekomendowane

LR-MDS (*low-risk MDS*) — MDS niskiego ryzyka; IHC (*immunohistochemistry*) — immunohistochemia; EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) — kwas wersenowy; FISH (*fluorescence in situ hybridization*) — fluorescencyjna hybridyzacja *in situ*





Rycina 1. Schemat diagnostyczny zespołów mielodysplastycznych (MDS, *myelodysplastic syndromes*); *jeżeli mutacja *SF3B1* (*splicing factor 3b subunit 1*) jest obecna; AA (*aplastic anemia*) — niedokrwistość aplastyczna; ANA (*anti-nuclear antibodies*) — przeciwciała przeciwdziałające; anty-dsDNA (*anti-double stranded DNA*) — przeciwciała przeciwno dwuniciowemu kwasowi dezoksyrybonukleinowemu; anty-HCV (*anti-hepatitis C virus test*) — oznaczenie przeciwciał przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu C; APTT (*activated partial thromboplastin time*) — czas częściowej trombolastyny po aktywacji; BM (*bone marrow*) — szpik kostny; BTA — bezpośredni test antyglobulinowy; CCUS (*clonal cytopenia of undetermined significance*) — cytopenia klonalna o nieustalonym znaczeniu; CHT — chemioterapia; CMML (*chronic myelomonocytic leukemia*) — przewlekła białaczka mielomonocytoza; CMV (*citomegalovirus*) — wirus cytomegalii; CRP (*C-reactive protein*) — białko C-reaktywne; EB (*excess blasts*) — nadmiar blastów; EBV (*Epstein-Barr virus*) — wirus Epsteina-Barra; EPO — erytropoetyna; FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) — badanie immunofenotypowe metodą cytometrii przepływowej; Hb — hemoglobina; HBsAg (*hepatitis B surface antigen*) — oznaczenie antygenu powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B; HBV (*hepatitis B virus*) — wirus zapalenia wątroby typu B; HCV (*hepatitis C virus*) — wirus zapalenia wątroby typu C; HIV (*human immunodeficiency virus*) — ludzki wirus upośledzenia (nieoboru) odporności; ICUS (*idiopathic cytopenia of undetermined significance*) — cytopenia idiopatyczna o nieustalonym znaczeniu; INR (*international normalized ratio*) — międzynarodowy współczynnik znormalizowany; LDH (*lactate dehydrogenase*) — dehydrogenaza mleczanowa; MDS-del 5 — MDS z delecją 5q MLD (*multilineage dysplasia*) — dysplazja wieloliniowa SLD (*single lineage dysplasia*) — dysplazja jednoliniowa; U (*unclassified*) — niesklasyfikowany; NEU — bezwzględna liczba neutrofilów; NGS (*next-generation sequencing*) — sekwencjonowanie nowej generacji; OB — odczyn Biernackiego; PB (*peripheral blood*) — krew obwodowa; PLT (*platelets*) — płytki krwi; PMF (*primary myelofibrosis*) — pierwotne włóknienie szpiku; PNH (*pure red cell leukemia*) — nocna napadowa hemoglobinuria; PRCA (*pure red cell leukemia*) — wybiórcza aplazja czysto czerwonokórkowa; RS (*ring sideroblasts*) — syderoblasty pierścieniowate; RT — radioterapia; T-LGL (*T-cell large granular lymphocytic leukemia*) — białaczka z dużych ziarnistych limfocytów T; TIBC (*total iron-binding capacity*) — całkowita zdolność wiązania żelaza; TSAT (*transferrin saturation*) — nasycenie tranferyny; USG — badanie ultrasonograficzne

Tabela 4. Diagnostyka różnicowa cytopenii/dysplazji

Diagnoza	Szpik/morfologia	Inne badania (surowica)
Niedobór witaminy B ₁₂	Megaloidalne formy linii erytroidalnej i granulocytowej, nieregularne kształty jąder erytroblastów, ciążka Howella-Jolly'ego, hipersegmentacja jąder neutrofilów, makrocytoza, pancytopenia, zmniejszona liczba retikulocytów, szpik bogatokomórkowy	↓ witaminy B ₁₂ ↓ holotranskobalaminy ↑ kwasu metylomalonowego (MMA, methylmalonic acid) ↑ homocysteiny ↑ LDH ↑ bilirubiny
Niedobór kwasu foliowego	Podobne jak przy niedoborze witaminy B ₁₂	↓ kwasu foliowego ↑ homocysteiny Stężenie MMA w normie
Zespoły złego odżywiania	Jadłowstręt psychiczny	↑ cholesterolu ↑ ALT ↓ Mg, Zn, P, K, Na ↓ estrogeny, testosteronu ↓ fT3, fT4
Niedobór miedzi	Pancytopenia, wakuolizacja cytoplazmy linii erytroidalnej i granulocytowej, pierścieniowate syderoblasty	↓ Cu
Ekspozycja na metale ciężkie (m.in. Pb, Hg, Cd, As)	Ubogokomórkowy szpik, obecne pierścieniowate syderoblasty, pancytopenia, nakrapianie zasadochłonne	↑ Pb, Hg, Cd, As
Nadużywanie alkoholu	Wakuolizacja cytoplazmy linii erytroidalnej i granulocytowej, pierścieniowate syderoblasty, hiperplazja linii erytroidalnej, ubogokomórkowy szpik, makrocytoza, pancytopenia; objawy ustępują po odstawieniu alkoholu W marskości wątroby obecne stomatocyty, akantocyty	↑ Fe w surowicy ↑ GGTP
Cytostatyki	Większość cytostatyków	
	Hydroksymocznik, cyklofosfamid, metotreksat, azatiopryna	
Leki przeciwdrgawkowe, przeciwtarczycowe, antybiotyki	Hipoplazja szpiku, dysplazja linii granulocytowej i megakariocytowej, mono-, duo-, pancytopenia	
Izoniazyd, linezolid	Niedokrwistość syderoblastyczna	
Trimetoprim/sulfametaksazol, takrolimus, mykofenolan mofetylu, azatiopryna	Hiposegmentacja jąder neutrofilów, dyserytropoeza	



Tabela 4. cd. Diagnostyka różnicowa cytopenii/dysplazji

Diagnoza	Szpik/morfologia	Inne badania (surowica)
Steroidy	Dysplazja linii granulocytowej w czasie stosowania dużych dawek kortykosteroidów (ustępuje 1.-4. tyg. po odstawieniu) ↑ neutrofilów, ↓ limfocytów	
G-CSF	Linia granulocytowa: toksyczne ziarnistości, „przesunięcie w lewo”, wakuolizacja cytoplazmy, nieprawidłowa lobulizacja jąder neutrofilów ↑ neutrofile	
Zakażenia		
HIV	Dysplazja (szczególnie nasilona w czasie leczenia antyretrowirusowego), odczyn megaloblastyczny, cytopenia, makrocytoza	Badania serologiczne, PCR
Parwovirus B19	Hipoplazja linii erytroidalnej, obecność pojedynczych, olbrzymich erytroblastów zasadochłonnych	PCR — parwovirus B19
HBV, HCV	Skupienia limfocytów, odczynowe plazmocyty, dyserytropoeza, cytopenie (częściej małopłytkowość i niedokrwistość)	↑ bilirubiny ↑ AST, ALT, ALP, INR Badania serologiczne, PCR
EBV, CMV	Możliwe cytopenie, komórki monocytoidalne, aktywowane limfocyty, możliwość rozwoju HLH, NHL	Badania serologiczne, PCR
Lejshmanioza	Pancytopenia, dysplazja, włóknienie, hemofagocytoza, złogi żelaza	
Bakterie	Neutrofile: ziarnistości toksyczne, ciałka Doehlego	↑ CRP, posiewy
Gruźlica	Cytopenie (głównie niedokrwistość), liczne makrofagi, ziarniste limfocyty, obecne ziarniaki w szpiku	Hodowla, PCR
Choroby autoimmunizacyjne		
SLE, RZS	Dysplazja linii erytroidalnej i megakariocytowej, cytopenia	Przeciwciała przeciwjądrowe, czynnik reumatoidalny, ↑ OB
Niedokrwistość autoimmunohemolityczna (NAIH, <i>autoimmune haemolytic anaemia</i>)	Niedokrwistość, nieznaczna dysplazja linii erytroidalnej	Dodatni BTA, ↑ bilirubiny, ↑ LDH, ↓ haptoglobiny
Pierwotna małopłytkowość immunologiczna (ITP, <i>immune thrombocytopenia</i>)	Możliwość dysplazji linii megakariocytowej (mikromegakariocyty), ↑ MPV	Przeciwciała przeciw płytkowe
Neutropenia autoimmunizacyjna (w tym zespół Felty/ego)	↑ PDW, płytki olbrzymie Neutropenia, możliwość dysplazji, możliwość obecności klonu limfocytów T	Przeciwciała przeciweutrofilowe, splenomegalia, czynnik reumatoidalny
Niedoczynność tarczycy (choroba Hashimoto)	Możliwość hipoplazji linii erytroidalnej, niedokrwistość, makrocytoza, ↓ retikulocytów	TSH, fT3, fT4, przeciwciała anty-TG, przeciwciała anty-TPO
Przewlekła neutropenia idiopatyczna	Szpik prawidłowy lub hipoplazja linii granulocytowej, możliwość limfopenii	

→

Tabela 4. cd. Diagnostyka różnicowa cytopenii/dysplazji

Diagnoza	Wątroby	Szpic/morfologia	Inne badania (surowica)
Po przeszczepieniu	Wątroby allo-HCT	Możliwa trójliniowa dysplazja, makrocytoza erytrocytów Hipoplastyczny szpic, dyserytropoeza, ryzyko t-MDS/t-AML	
Niedokrwistość aplastyczna		Ubogokomórkowy szpic, obecne głównie limfocyty, niedokrwistość, duo- lub pancytopenia, ↓ retikulocytów	
HLH		Cytopenia, hemofagocytoza, w mniejszym stopniu dysplazja	↑ ferrytyny, TG ↓ fibrynogenu ↑ sCD25 Splenomegalia w badaniach obrazowych
PNH		Cytopenia, ubogo-/normokomórkowy szpic	FACS: ↓ FLAER, CD55, CD59 na granulocytach, monocytach i erytrocytach, ↑ bilirubiny
LGL		Neutropenia, pancytopenia, możliwość hipoplazji szpiku, naciek klonalnych limfocytów T lub NK w szpiku, ziarniste limfocyty we krwi obwodowej	Możliwość dodatniego czynnika reumatoidalnego, splenomegalia w badaniach obrazowych
Wrodzone zespoły niewydolności szpiku (np. anemia Fanconiego)		Cytopenie	Charakterystyczne zmiany genetyczne
Inne nowotwory układu krwiotwórczego (aCML, PMF, CMML)		Dysplazja 1–3-liniowa, włóknienie, niedokrwistość, małopłytkowość, monocytoza > 1 × 10 ⁹ /l (CMML) lub niedojrzałe formy linii granulocytowej > 10% WBC we krwi obwodowej (aCML), lub erytroblasty (PMF)	Mutacja JAK2 V617F, MPL, CALR Spleno- i/lub hepatomegalia w badaniach obrazowych
Wrodzone niedokrwistości syderoblastyczne (np. XLSA)		Dysplazja linii erytroidalnej, pierscieniowate syderoblasty, ciątka Pappenheimera, ↓ MCV	Charakterystyczne zmiany genetyczne (np. mutacja ALAS2) ↑ ferrytyna, hepatosplenomegalia

↓ — obniżona wartość; ↑ — zwiększona wartość; aCML (atypic myelogenous myeloid leukemia) — atypowa przewlekła białaczka szpikowa; ALAS2 (5-aminolewulinic acid synthase 2) — syntetaza kwasu aminolewulinowego; allo-HCT (allogeneic hematopoietic cell transplantation) — allogeniczne przeszczepienie komórek krwiotwórczych; ALT (alanine aminotransferase) — aminotransferaza alaninowa; anty-TG — przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie; anty-IPO — przeciwciała przeciwko tyreoperoksydazie; As — arsen; CD (cadmium) — kadm; CMML (chronic myelomonocytic leukemia) — przewlekła białaczka mielomonocytna; Cu (cuprum) — miedź; FACS (fluorescence-activated cell sorting) — badanie immunofenotypowe metodą cytometryjną przepływową; Fe (ferrum) — cynk; FLAER — aleksa 488 proaeolysin variant; fT3 (free triiodothyronine) — wolna triiodotyronina; fT4 (free thyroxine) — wolna tyroksyna; G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) — czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów; gGTP (gamma-glutamyltranspeptidase) — gamma-glutamylotranspeptydaza; Hg — rteć; HIV (human immunodeficiency virus) — ludzki wirus opryszczki (nieodobu) odporności; PCR (polymerase chain reaction) — reakcja łańcuchowa polimerazy; HtH (hemophagocytic lymphohistiocytosis) — limfoblastyczna hemofagocytoza; K (potassium) — potas; LDH (lactate dehydrogenase) — dehydrogenaza mleczanowa; LGI (large granular lymphocytic leukemia) — białaczka limfocytowa z dużymi ziarnistymi limfocytami; linia E — linia czerwonych krwinek; linia M — linia megakaryocytowa; MCV (mean corpuscular volume) — średnia objętość krwinki; Mg — magnez; MPV (mean platelet volume) — średnia objętość płytki; Na — wapń; OB — odczyn Biernackiego; P (phosphorus) — fosfor; Pb (plumbum) — ołów; PDW (platelet distribution width) — wskaźnik rozpiętości rozkładu objętości płytek; PMF (primary myelofibrosis) — pierwotna mielofibroza; PNH (pure red cell leukemia) — nocna napadowa hemoglobinuria; RZS — reumatoidalne zapalenie stawów; sCD25 (soluble interleukin-2 receptor) — rozpuszczalny receptor dla interleukiny 2; SLE (systemic lupus erythematosus) — toczeń rumieniowaty układowy; TSH (thyroid-stimulating hormone) — hormon stymulujący tarczycę; TG — triglicerydy; t-MDS/t-AML (therapy related myelodysplastic syndromes/therapy related acute myeloid leukemia) — zespół mielodysplastyczny/ostra białaczka szpikowa wtórnie do wcześniejszego leczenia; XLSA (X-linked sideroblastic anaemia) — niedokrwistość syderoblastyczna sprzężona z chromosomem X; Zn (zinc) — cynk

Tabela 5. Stany poprzedzające zespół mielodysplastyczny (MDS, *myelodysplastic syndrome*)

Idiopatyczna cytopenia o nieustalonym znaczeniu (ICUS, <i>idiopathic cytopenia of undetermined significance</i>)	Idiopatyczna dysplazja o nieustalonym znaczeniu (IDUS, <i>idiopathic dysplasia of undetermined significance</i>)	
Cytopenia(e) w badaniu morfologii krwi* Brak uchwytnych przyczyn cytopenii Niespełnione kryteria rozpoznania MDS Brak typowych dla MDS nieprawidłowości genetycznych** Brak lub występowanie cech dysplazji w < 10% komórek danej linii krwiotwórczej Poniżej 5% blastów***	Brak cytopenii w badaniu morfologii krwi Niespełnione kryteria rozpoznania MDS Brak typowych dla MDS nieprawidłowości genetycznych** Obecność cech dysplazji w $\geq 10\%$ komórek danej linii krwiotwórczej Poniżej 5% blastów***	ICUS + IDUS — stany przed-MDS bez nieprawidłowości genetycznych typowych dla MDS
Klonalna cytopenia o nieustalonym znaczeniu (CCUS, <i>clonal cytopenia of undetermined significance</i>)	Klonalna hematopoeza o nieokreślonym znaczeniu (CHIP, <i>clonal hematopoiesis of indeterminate potential</i>)	
Cytopenia(e) w badaniu morfologii krwi* Brak uchwytnych przyczyn cytopenii Niespełnione kryteria rozpoznania MDS Obecność typowych dla MDS nieprawidłowości genetycznych (≥ 1)** Brak lub występowanie cech dysplazji w < 10% komórek danej linii Poniżej 5% komórek blastycznych*** ICUS + CCUS — stany przed-MDS z obecnościami cytopeniami	Brak cytopenii w morfologii krwi Niespełnione kryteria rozpoznania MDS Obecność typowych dla MDS nieprawidłowości genetycznych (≥ 1)** Brak lub występowanie cech dysplazji w < 10% komórek danej linii Poniżej 5% komórek blastycznych*** ICUS + CCUS — stany przed-MDS bez obecności cytopenii	CCUS + CHIP — stany przed-MDS z obecnymi nieprawidłowościami genetycznymi typowymi dla MDS

*Każdego stopnia cytopenia trwająca > 4 miesiące, po wykluczeniu innych przyczyn; **nieprawidłowości stwierdzone za pomocą badań cytogenetycznych metodą prążkową (GTG, *G-banding by trypsin with Giemsa*), fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, *fluorescence in situ hybridization*) lub metodami biologii molekularnej. W przypadku metod sekwencjonowania za diagnostyczną dla stanów poprzedzających MDS uznaje się częstość występowania wariantu danego allelu (VAF, *variant allele frequency*) w ilości $\geq 2\%$; do rozpoznania MDS VAF powinno wynosić $\geq 10\%$; ***blasty stwierdzone w rozmazie krwi obwodowej i/lub szpiku kostnego

właścza z mutacjami dotyczącymi czynników epigenetycznych, stwierdzono wzrost częstości współwystępowania chorób układu sercowo-naczyniowego. Diagnostykę różnicową stanów CHIP, CCUS, IDUS i ICUS przedstawiono w tabeli 5.

Zasady prowadzenia badań cytogenetycznych w MDS

Zgodnie z aktualnymi kryteriami rozpoznania MDS badanie cytogenetyczne jest nadal jednym z podstawowych badań diagnostycznych i prognostycznych w tych zespołach.

Spośród zmian cytogenetycznych jedynie delecja długiego ramienia chromosomu 5 określa odrębną jednostkę histokliniczną — MDS z izolowaną delecją 5q. W ostatniej klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) rozszerzono zakres znaczeniowy pojęcia „izolowana”; w skład tej kategorii wchodzi nadal del(5q) jako jedyna aberracja, ale również del(5q) z jedną dodatkową aberracją, inną niż rokujące niekorzystnie aberracje chromosomu 7 — del(7q) i monosomia 7 (-7) [9]. Klasyczne badanie cytogenetyczne w MDS powinno się wykonywać przed

rozpoczęciem jakiegokolwiek leczenia, ponieważ na przykład leczenie steroidami może spowodować zahamowanie podziału komórek i uniemożliwić wykonanie klasycznego badania cytogenetycznego. Materiałem badanym powinien być szpik, gdyż we krwi obwodowej może być niewystarczająca liczba komórek CD34+. Hodowla komórek szpiku chorego na MDS jest hodowlą krótkoterminową, 24- lub 48-godzinną, bez mitogenu (stymulatora proliferacji komórkowej). Chromosomy analizuje się po wybarwieniu techniką prążkową (GTG, *G-banding by trypsin with Giemsa*). W MDS z reguły analizuje się co najmniej 20 płytek metafazalnych. W przypadku trudności z uzyskaniem 20 płytek do ustalenia wyniku wystarczy kilka komórek z aberracją klonalną (aberracja klonalna jest definiowana jako występowanie danej trisomii lub aberracji strukturalnej w ≥ 2 komórkach albo danej monosomii występującej w ≥ 3 komórkach). Natomiast brak aberracji nie pozwala na zakończenie badania przed przeanalizowaniem 20 komórek. W około połowie kariotypów stwierdza się obecność aberracji chromosomowych, najczęściej: -5/del(5q), -7/del(7q), +8, del(20q), -Y. Najczęstsze nieprawidłowości przedstawiono w tabeli 6 [10].

Tabela 6. Najczęstsze zmiany cytogenetyczne u chorych na MDS (wg Schanz i wsp. [10])

Nieprawidłowości cytogenetyczne	Częstość występowania (%)
Pojedyncze zmiany:	
• del(5q)	6,4
• +8	4,7
• -Y	2,2
• del(20q)	1,7
• -7	1,6
• del(11q)	0,7
• del(12p)	0,6
• del(7q)	0,5
• i(17q)	0,4
• +19	0,4
• inv(3)/t(3q)/del(3q)	0,4
• +21	0,3
• der(1;7)	0,3
• -13/del(13q)	0,3
• -21	0,3
• -X	0,3
Inne pojedyncze	5,8
Podwójne zmiany:	
• wliczając del(5q)	1,6
• wliczając -7/del(7q)	1,2
• wliczając inne zmiany	3,4
Złożone zmiany:	
• 3 aberracje	2,1
• > 3 aberracje	7,0
Niezależne klony	0,9
Ewolucja klonalna	13,4

Delecja 5q obejmująca region 5q31(*EGRI*)-5q33.1 (*RPS14*) i występująca osobno lub w towarzystwie pojedynczej dodatkowej, wyżej określonej, aberracji, wiąże się z korzystnym rokowaniem.

U starszych mężczyzn może dochodzić do niezwiązanej z MDS utraty chromosomu Y. Dlatego w tej grupie -Y przypisuje się MDS, gdy występuje w ponad 70% metafaz, natomiast u młodszych mężczyzn próg ten wynosi 30%. Kariotyp złożony (≥ 3 niezależne aberracje chromosomów autosomalnych, czyli autosomów) rokuje zawsze niekorzystnie. Często towarzyszy mu utrata co najmniej jednej kopii genu *TP53* albo jego mutacja. Kariotyp monosomalny (≥ 2 monosomie autosomów albo ≥ 1 monosomia autosomu i ≥ 1 aberracja strukturalna autosomu) rokuje zawsze niekorzystnie, według niektórych autorów gorzej niż kariotyp złożony.

Jeżeli nie uda się uzyskać płytek metafazalnych albo liczba uzyskanych płytek metafazalnych, niezawierających ponadto klonalnych aberracji, jest suboptymalna (< 20) lub są one nieczytelne, to należy wykonać badanie metodą FISH z zastosowaniem panelu sond MDS (dla -5/del(5q), -7/del(7q), +8, del(17p)/*TP53*, del(20q), i ewentualnie -Y).

Niektóre z tych sond można stosować łącznie, co przyspiesza diagnostykę techniką FISH. Rutynowo analizuje się w mikroskopie fluorescencyjnym po 100–200 interfazalnych jąder komórkowych. Uważa się, że badanie FISH umożliwia wykrycie nieprawidłowości cytogenetycznej u 15% chorych z prawidłowym kariotypem badanym metodą klasyczną [11].

Badanie immunofenotypowe

Klasyfikacja WHO nowotworów krwiotwórczych wskazuje, że cytometria przepływowa (FC, *flow cytometry*) nie jest wystarczającą metodą diagnostyczną do rozpoznania MDS w przypadku braku definitywnych kryteriów cytomorfologicznych i/lub cytogenetycznych. Zwraca się w niej jednak uwagę, że aberrantne cechy immunofenotypowe wykazują silną korelację z tym rozpoznaniem [12].

W około 6,4% przypadków cytopenii bez wyraźnej dysplazji w badaniu cytologicznym stwierdza się zmiany w FC wskazujące na MDS, przy czym w około 1/3 tych przypadków stwierdza się zmiany cytogenetyczne typowe dla tego nowotworu.

Grupa do spraw cytometrii przepływowej (IMDSFlow) działająca przy *European LeukemiaNet* (ELN) zaproponowała wytyczne zastosowania tej metody w zintegrowanej diagnostyce MDS [14]. Do celów przesiewowych można zastosować minipanel (tzw. *Ogata score*) obejmujący cztery parametry (1 pkt za każdy) [12]:

- zwiększony odsetek progenitorów CD34+ wśród wszystkich komórek jądrzastych szpiku ($> 2\%$);
- zmniejszony odsetek prekursorów B-komórkowych CD34+/CD19+ i/lub CD34+CD10+ wśród wszystkich komórek CD34+ ($\leq 5\%$);
- zaburzona ekspresja CD45 na mieloblastach w stosunku do limfocytów (≤ 4 lub $\geq 7,8$);
- obniżona ziarnistość (SSC, *side scatter channel*) na granulocytach w stosunku do limfocytów (≤ 6).

Stwierdzenie co najmniej 2 punktów pozwala na rozpoznanie MDS niskiego ryzyka ze swoistością 92–98%. Wadą panelu jest niska czułość (44–71%), wynikająca między innymi z zaniżenia odsetka blastów przez domieszkę krwi obwodowej w próbce aspiratu szpiku. Obniżenie odsetka progenitorów B-komórkowych jest czasem stwierdzane u osób starszych, a blasty w MDS mogą aberrantnie nie wykazywać ekspresji CD34 [13].

Podsumowując, badanie FC w diagnostyce MDS jest przydatne:

- w przypadkach cytopenii bez wyraźnej dysplazji oraz zaburzeń cytogenetycznych lub molekularnych

larnych. Nieprawidłowości stwierdzone w FC mogą wskazywać wówczas na rozpoznanie MDS lub, w przypadku ich nieobecności, na inną przyczynę stwierdzanych zaburzeń;

- u pacjentów chorych na MDS z jednoliniową dysplazją w badaniu cytologicznym, u których w badaniu FC obecne są zaburzenia dotyczące innych linii. W tej sytuacji stwierdzenie tych zmian może mieć znaczenie prognostyczne albo wskazywać na nieprawidłową klasyfikację MDS (wskazana powtórna ocena dysplazji linii zaburzonej w FC).

Badania molekularne w MDS

Dzięki zastosowaniu technik opartych o sekwencjonowaniu genów nowej generacji (NGS (*next-generation sequencing*)) zaburzenia molekularne w przebiegu MDS stwierdzono u 80–90% chorych. Wykazano, że niektóre z nich występują w MDS z określonym fenotypem, jednak najważniejsze obserwacje dotyczą znaczenia mutacji dla rokowania co do przeżycia i transformacji do AML, a także odpowiedzi na stosowane leczenie. Do tej pory występowanie wariantów sekwencji wykazano nawet w 181 genach, jednak tylko w 79 z nich były powtarzalne [15]. W dwóch z największych badań obejmujących łącznie 1682 pacjentów badano 104–111 genów istotne mutacje dotyczyły 43–47 genów [16, 17].

Mutacje występujące w MDS dotyczą najczęściej genów odpowiedzialnych za następujące funkcje:

- **proces dojrzewania pre-mRNA — *splicing*.** Warianty sekwencji w genach *SF3B1* (*splicing factor 3b subunit 1*), *SRSF2* (*serine and arginine rich splicing factor 2*), *U2AF1* (*U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1*) i *ZRSR2* (*zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2*) należą do najczęściej stwierdzanych zaburzeń regulujących *splicing* w MDS. Stwierdza się je u prawie 70% chorych i są one najbardziej specyficzne dla MDS. *SF3B1* jest jedynym genem, którego warianty sekwencji są uwzględniane w nowej, uaktualnionej w 2016 roku, klasyfikacji WHO, a także w propozycji nowego podtypu MDS z mutacją *SF3B1* z roku 2020 [18]. Występowanie wariantów sekwencji w genie *SF3B1* jest ściśle związane z obecnością syderoblastów pierścieniowatych i jest pomocne w określeniu klasyfikacji do podtypu MDS z syderoblastami pierścieniowatymi (MDS-RS, *myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts*). Zmiany

w genie *SF3B1* występują proporcjonalnie częściej u chorych z grupy niższego ryzyka według zmodyfikowanego Międzynarodowego Wskaźnika Prognostycznego (IPSS-R, *Revised International Prognostic Scoring System*). Warianty sekwencji w genie *SRSF2* są czynnikiem wskazującym na niekorzystny przebieg MDS ze zwiększonym ryzykiem transformacji do ostrej białaczki;

- **epigenetyczna modyfikacja DNA.** Warianty sekwencji w genie *TET2* (*ten eleven translocation-2*) są dość często wykrywane, w 19–25% przypadków MDS, ale występują także w innych nowotworach mieloidalnych. Obecność mutacji pozwala przewidzieć dobrą odpowiedź na azacytydynę, co nie wiąże się jednak z wydłużeniem czasu przeżycia. Warianty sekwencji w genie *DNMT3A* (*DNA-methyltransferase 3 alpha*) występują głównie u pacjentów w starszym wieku z częstością 3–8% w MDS. Stwierdza się je we wszystkich komórkach szpiku, co świadczy o wczesnym charakterze zmiany. Obecność mutacji wiąże się z krótszym czasem przeżycia;
- **modyfikacja chromatyny.** Warianty sekwencji w genie *ASXL1* (*associated sex Combs-like 1*) należą do częstszych zmian molekularnych w MDS, występującą u 15–20% pacjentów. Ich obecność w MDS wpływa niekorzystnie na przeżycie całkowite i wiąże się z wyższym prawdopodobieństwem transformacji do AML. Warianty sekwencji w genie *EZH2* (*enhancer of zeste homolog 2*) występują w 5–10% przypadków MDA i są markerem złego rokowania;
- **naprawa DNA (*ATM, DLRE1C, FANCL, BRCC3*);**
- **kompleks kohezyjny (*CTCF, RAD21, STAG2, SMAC1A*);**
- **ścieżka sygnałowa RAS (*KRAS, NRAS, CBL, NF1, PTPN11*);**
- **czynniki regulujące transkrypcję (*RUNX1, GATA, TP53, CEBPA, BCOR, NCOR, PHF6, ETV6*).** Warianty sekwencji w genie *TP53* (*tumor protein 53*) występują w 5–14% MDS wyższego ryzyka według IPSS-R oraz w 27% przypadków MDS wtórnego do wcześniejszego leczenia (t-MDS, *therapy-related MDS*). Ich obecność wiąże się ze złym rokowaniem co do przeżycia. Stwierdzenie występowania wariantów sekwencji w genie *TP53* w MDS z del(5q) wpływa na niższą skuteczność leczenia lenalidomidem oraz szybką transformację do AML w tej grupie chorych. Bernard i wsp. [19] wykazali, że niekorzystne rokowanie obejmuje

Tabela 7. Klasyfikacja Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, World Health Organization) z 2016 roku dotycząca zespołów mielodysplastycznych (MDS, *myelodysplastic syndromes*) (źródło [9])

Nazwa		Liczba linii z dysplazją	Cytopenie*	Syderoblasty pierścieniowate (%)	Blasty w BM i PB (%)
MDS z jednoliniową dysplazją (MDS-SLD, <i>MDS with single lineage dysplasia</i>)		1	1 lub 2	< 15/< 5**	BM < 5, PB < 1, bez pałeczek Auera
MDS z wieloliniową dysplazją (MDS-MLD, <i>MDS with multilineage dysplasia</i>)		2 lub 3	1–3	< 15/< 5**	BM < 5, PB < 1, bez pałeczek Auera
MDS z syderoblastami pierścieniowatymi (MDS-RS, <i>MDS with ring sideroblasts</i>)	MDS-RS-SLD	1	1 lub 2	≥ 15/≥ 5**	BM < 5, PB < 1, bez pałeczek Auera
	MDS-RS-MLD	2 lub 3	1–3	≥ 15/≥ 5**	BM < 5, PB < 1, bez pałeczek Auera
MDS z izolowaną del(5q)***		1–3	1–2	Brak lub jakiekolwiek	BM < 5, PB < 1, bez pałeczek Auera
MDS z nadmiarem blastów (MDS-EB, <i>MDS with excess blasts</i>)	MDS-EB1	0–3	1–3	Brak lub jakiekolwiek	BM 5–9 lub PB 2–4, bez pałeczek Auera
	MDS-EB2	0–3	1–3	Brak lub jakiekolwiek	BM 10–19 lub PB 5–19, lub pałeczki Auera
MDS niesklasyfikowany (MDS-U, <i>MDS unclassified</i>)	Z 1% blastów we krwi obwodowej	1–3	1–3	Brak lub jakiekolwiek	BM < 5, PB = 1, bez pałeczek Auera
	Pancytopenia z jednoliniową dysplazją	1	3	Brak lub jakiekolwiek	BM < 5, PB < 1, bez pałeczek Auera
	Bez dysplazji ze zmianą cytogenetyczną definiującą MDS****	0	1–3	Brak lub jakiekolwiek	BM < 5, PB < 1, bez pałeczek Auera
	Del (5q) i pancytopenia	1–3	3	Brak lub jakiekolwiek	BM < 5, PB < 1, bez pałeczek Auera
Cytopenia oporna dzieci (<i>refractory cytopenia of childhood</i>)		1–3	1–3	Brak	BM < 5, PB < 2

*Cytopenie są zdefiniowane następująco: stężenie hemoglobiny (Hb) < 10,0 g/dl, liczba płytek krwi < 100 × 10⁹/l, bezwzględna liczba neutrofilów < 1,8 × 10⁹/l. Rzadko MDS może przebiegać z łagodną niedokrwistością lub trombocytopenią powyżej podanych wartości. Monocyty we krwi obwodowej < 1 × 10⁹/l; **obecna jest mutacja SF3B1; ***obecność cytogenetycznych nieprawidłowości del(5) ± dodatkowa aberracja bez zaburzeń chromosomu 7; ****obecność typowych zmian cytogenetycznych; BM (*bone marrow*) — szpik kostny; PB (*peripheral blood*) — krew obwodowa

pacjentów z bialleliczną mutacją *TP53*, która dotyczy zwykle dominującego klonu. Z kolei u pacjentów z monoalleliczną mutacją *TP53*, która występuje zazwyczaj w obrębie subklonu, rokowania nie jest istotnie gorsze niż u chorych bez mutacji *TP53* [19]. Warianty sekwencji w genie *RUNX1* (*runt-related transcription factor 1*) są stwierdzane w 10–15% przypadków MDS, zwykle w chorobie zaawansowanej, i są powiązane z niekorzystnym wpływem na przeżycie całkowite. Częściej występują we wtórnych MDS (22–50%). Często współistnieją z mutacjami w genie *RAS*;

- czynniki transdukcji sygnału (*JAK2*, *FLT3*, *KIT*, *MLP*, *GNAS*). Występowanie wariantów sekwencji u więcej niż 10% chorych stwierdzono w sześciu genach: *TET2*, *SF3B1*, *ASXL1*, *SRSF2*, *DNMT3A* oraz *RUNX1*, między 8% a 12% — w dwóch genach, tj. *U2AF1* i *TP53*,

a między 5% a 10% — w czterech genach: *EZH2*, *ZRSR2*, *STAG2*, *NRAS*.

Klasyfikacja WHO 2016, 2020

W obecnie obowiązującej modyfikacji klasyfikacji WHO z 2016 roku wszystkie typy zespołów są poprzedzone nazwą MDS [9] (*patrz* tab. 7). O przynależności do określonego podtypu bez nadmiaru blastów i del(5q) decyduje w pierwszej kolejności liczba dysplastycznych linii komórkowych, a nie cytopenii.

W 2020 roku dodatkowo grupa ekspertów *International Working Group for the Prognosis of MDS* (IWG PM) na podstawie danych 3479 pacjentów, z których u 795 stwierdzono mutację *SF3B1*, zaproponowała wyodrębnienie nowego podtypu MDS, tj. MDS z mutacją *SF3B1* (tab. 8). Autorzy wykazali, że to obecność mutacji *SF3B1*, a nie RS, ma decy-

Tabela 8. Zespoły mielodysplastyczne (MDS, *myelodysplastic syndromes*) z mutacją *SF3B1* — kryteria diagnostyczne *International Working Group* (IWG) z 2020 roku (źródło [18])

Cytopenia we krwi obwodowej definiowana jako obniżenie parametrów poniżej norm laboratorium w ≥ 1 linii komórkowej: czerwonekrwinkowej, neutrofilowej i płytek krwi
Obecność mutacji somatycznej <i>SF3B1</i>
Izolowana dysplazja w linii czerwonekrwinkowej lub wieloliniowa dysplazja*
Blasty w szpiku kostnym $< 5\%$ i we krwi obwodowej $< 1\%$
Niespełnione kryteria rozpoznania innych chorób: MDS z izolowaną <i>del(5q)</i> , MDS/MPN-RS-T i innych MDS/MPN oraz pierwotnej mielofibrozy i innych nowotworów mieloproliferacyjnych wg klasyfikacji WHO 2016
Prawidłowy kariotyp lub nieprawidłowości cytogenetyczne z wyłączeniem: <i>del(5q)</i> , monosomii chromosomu 7, <i>inv(3)</i> lub nieprawidłowości z 3q26, złożonego kariotypu (≥ 3 nieprawidłowości)
Współistnienie innych mutacji somatycznych z wyjątkiem <i>RUNX1</i> i/lub <i>EZH2</i> **

*Obecność pierścieniowatych syderoblastów nie jest wymagana; **obecność mutacji *JAK2 V617F*, *CALR* lub *MPL* silnie sugeruje nowotwór mielodysplastyczno-mieloproliferacyjny z nadmiarem pierścieniowatych syderoblastów i nadpłytkowością (MDS/MPN-RS-T, *myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm with ring sideroblasts and thrombocytosis*); WHO (*World Health Organization*) — Światowa Organizacja Zdrowia

dujące znaczenie rokownicze. Chorzy z podtypem niedokrwistości odpornej na leczenie z obecnością pierścieniowatych syderoblastów (RARS, *refractory anemia with ring sideroblasts*) lub cytopenii odpornej na leczenie z wieloliniową dysplazją (RCMD-RS, *refractory cytopenia with multilineage dysplasia*) z mutacją *SF3B1* żyją istotnie statystycznie dłużej niż chorzy z RARS lub RCMD bez mutacji *SF3B1*. Znamienny wpływ mutacji *SF3B1* na przeżycie jest istotny jedynie w grupie z odsetkiem blastów w szpiku mniej niż 5% i we krwi obwodowej poniżej 1%, bez *del(5q)*, monosomii 7 i zaburzeń chromosomu 3, a także u chorych bez mutacji *EZH2* i *RUNX1* [18].

Wrodzone nowotwory mieloidalne

Nowotwory mieloidalne, w których predysponujący defekt genetyczny jest dziedziczny lub powstaje *de novo* na wczesnym etapie embriogenezy i jest obecny we wszystkich (w tym terminalnych) komórkach organizmu, określa się mianem wrodzonych nowotworów mieloidalnych (MNGP, *myeloid neoplasms with germline predisposition*) lub dziedzicznych nowotworów mieloidalnych (HMMS, *hereditary myeloid malignancy syndromes*). Wspomniane defekty dotyczą najczęściej takich genów, jak: *CEBPA*, *DDX41*, *RUNX1*, *ANKRD26*, *ETV6*, *GATA2*, *SRP72*, *SAMD9*. Dokładna częstość występowania tych chorób nie jest znana; szacuje się, że dotyczą one

1–5% przypadków nowotworów mieloidalnych. Nowotwory z grup MNGP/HMMS mogą występować w sposób izolowany albo z towarzyszącymi chorobami (w tym z innymi nowotworami — limfoidalnymi lub guzami litymi) lub wchodzić w skład złożonych zespołów [20–22].

Możliwość MNGP/HMMS należy zawsze brać pod uwagę u pacjentów chorych na MDS, u których:

- występują cechy kliniczne lub inne choroby sugerujące jeden z zespołów wrodzonych [20];
 - w rodzinie stwierdzano co najmniej 2 przypadki MDS/AML;
 - w rodzinie stwierdzano co najmniej 2 przypadki niedokrwistości aplastycznej/niewyjaśnionych cytopenii;
 - u członka rodziny rozpoznano zespół wrodzony;
 - w toku diagnostyki MDS stwierdzono patogenną mutację w genie związanym z wrodzonymi nowotworami mieloidalnymi, w szczególności:
 - bialleliczną mutację *CEBPA* (w 10% przypadków występuje mutacja germinalna),
 - mutację *GATA2* i/lub monosomię chromosomu 7 u osoby bardzo młodej (większość przypadków dotyczy dzieci i nastolatków),
 - mutację *RUNX1*,
 - mutację *DDX41*;
 - w wywiadach stwierdza się wiele nowotworów u pacjenta i/lub w rodzinie (z wyjątkiem przewlekłej białaczki limfocytowej);
 - rodzinny dawca szpiku pacjenta z rozpoznaniem zespołem wrodzonym.
- Ponadto zawsze należy uwzględnić możliwość występowania MNGP/HMMS, jeżeli u dawcy:
- stwierdza się cytopenie(ę) o niewyjaśnionej przyczynie;
 - występują trudności z mobilizacją komórek krwiotwórczych.

Procedura badań przy podejrzeniu MNGP

Badanie germinalnego DNA pochodzącego z hodowli fibroblastów uzyskanych podczas biopsji skóry jest „złotym standardem” diagnostyki MNGP/HMMS. Innymi wykorzystywanymi źródłami DNA są:

- komórki skóry badane bezpośrednio po pobraniu wycinka skóry (bez hodowli);
- cebulki włosów, paznokcie (mała ilość materiału);
- wymaz z policzka/ślina (materiał łatwy i szybki do pobrania, możliwość zanieczyszczenia krwią i komórkami nowotworowymi).

Badanie germinalnego DNA należy wykonać również u krewnych oraz potencjalnych dawców

Tabela 9. Wskaźniki prognostyczne stosowane u chorych na zespoły mielodysplastyczne (źródła [23, 24])

Międzynarodowy Wskaźnik Prognostyczny (IPSS, International Prognostic Scoring System)							
Liczba punktów	0	0,5	1,0	1,5	2,0		
Blasty w szpiku (%)	< 5	5–10	–	11–20	21–30		
Kariotyp	Prawidłowy; –Y del (5q) del (20q)	Inne zmiany	Złożony (≥ 3 nieprawidłowości) zaburzenia chromosomu 7	–	–		
Cytopenie*	0–1	2–3	–	–	–		
Grupy ryzyka							
Niskiego	Pośredniego-1	Pośredniego-2		Wysokiego			
0 pkt.	0,5–1 pkt.	1,5–2 pkt.		$\geq 2,5$ pkt.			
Mediana przeżycia całkowitego							
Ryzyko niskie	Ryzyko pośrednie-1	Ryzyko pośrednie-2		Ryzyko wysokie			
5,7 roku	3,5 roku	1,2 roku		0,4 roku			
Średni czas do transformacji do AML (25% grupy)							
Ryzyko niskie	Ryzyko pośrednie-1	Ryzyko pośrednie-2		Ryzyko wysokie			
9,4 roku	3,3 roku	1,1 roku		0,2 roku			
Zmodyfikowany Międzynarodowy Indeks Prognostyczny (IPSS-R, Revised International Prognostic Scoring System)							
Liczba punktów	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Kariotyp	–Y del(11q)		Prawidłowy del(5q) del(12p) del(20q) 2 zmiany, w tym del(5q)		del(7q) +8 +19 i(17q) inne (1 zmiana) inne (2 zmiany)	–7 inv(3) t(3q) del(3q) 2 zmiany (w tym –7/ /del 7q) 3 zmiany	> 3 zmiany
Blasty w szpiku (%)	≤ 2		> 2–< 5		5–10	> 10	
Hemoglobina [g/dl]	≥ 10		8–< 10	< 8			
Płytki krwi ($\times 10^9/l$)	≥ 100	50–< 100	< 50				
Neutrofile ($\times 10^9/l$)	$\geq 0,8$	< 0,8					
Grupy ryzyka							
Bardzo Niskie $\leq 1,5$ pkt.	Niskie > 1,5–3,0 pkt.	Pośrednie > 3,0–4,5 pkt.	Wysokie > 4,5–6,0 pkt.		Bardzo wysokie > 6,0 pkt.		
Odsetek pacjentów obciążonych określonym ryzykiem							
Bardzo niski 19%	Niski 38%	Pośredni 20%	Wysoki 13%		Bardzo wysoki 10%		
Mediana przeżycia całkowitego							
Ryzyko bardzo niskie 8,8 roku	Ryzyko niskie 5,3 roku	Ryzyko pośrednie 3 lata	Ryzyko wysokie 1,6 roku		Ryzyko bardzo wysokie 0,8 roku		
Średni czas do transformacji do AML (25% grupy)							
Ryzyko bardzo niskie NR	Ryzyko niskie 10,8 roku	Ryzyko pośrednie 3,2 roku	Ryzyko wysokie 1,4 roku		Ryzyko bardzo wysokie 0,73 roku		

*Stężenie hemoglobiny (Hb) < 10 g/dl; liczba neutrofilów < $1,8 \times 10^9/l$; liczba płytek krwi < $100 \times 10^9/l$; AML (*acute myeloid leukemia*) — ostra białaczka szpikowa; NR (*not reached*) — nie osiągnięto

rodzinnych komórek krwiotwórczych. Również w tym przypadku hodowla fibroblastów jest „złotym standardem”.

Czynniki prognostyczne

W ostatnich kilkunastu latach opublikowano wiele wskaźników prognostycznych oraz czynników predykcyjnych dla chorych na MDS, między innymi odpowiedzi na leczenie immunosupresyjne, odpowiedzi na leczenie białkami stymulującymi erytropoezę czy intensywną chemioterapię. Najważniejsze znaczenie ma opublikowany w 1997 roku przez Greenberga i wsp. [23, 24]. Międzynarodowy Wskaźnik Prognostyczny (IPSS, *International Prognostic Scoring System*) oraz jego zmodyfikowana wersja z 2012 roku — IPSS-R (tab. 9). Narzędzie, jakim jest IPSS, służy do stratyfikacji chorych zależnie od odsetka blastów w szpiku, zmian cytogenetycznych oraz liczby cytopenii we krwi obwodowej. Podział na grupy ryzyka według IPSS koreluje z czasem całkowitego przeżycia i czasem transformacji do AML. Wartość IPSS u chorych ma istotne znaczenie kliniczne, gdyż pomaga ich zakwalifikować do danego rodzaju leczenia. W IPSS-R, opartym na analizie danych pochodzących od 7012 pacjentów, wprowadzono 5 grup cytogenetycznych (z wyodrębnieniem 18 podgrup odmian kariotypu) oraz nowe, bardziej szczegółowe przedziały dotyczące odsetka blastów w szpiku, stężenia hemoglobiny oraz liczby płytek krwi i liczby neutrofilów. Pewnym ograniczeniem omawianych wskaźników jest nieuwzględnienie czynników zależnych od pacjenta — wieku, stanu ogólnego i chorób współistniejących. Czynniki te są szczególnie ważne przy kwalifikacji do allogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych. Della Porta i wsp. [25] opracowali też wskaźnik chorób współistniejących swoisty dla chorych na MDS.

W 2005 roku Malcovati i wsp. [26] wykazali, że zależność od przetoczeń koncentratu krwinek czerwonych (kkcz) ocenianą w dowolnym momencie trwania choroby (definiowana jako konieczność przetoczenia ≥ 1 j. kkcz w ciągu 8 tyg.) jest istotnym czynnikiem związanym z krótszym przeżyciem. Do niekorzystnych czynników rokowniczych u chorych na MDS należą ponadto podwyższone stężenie ferrytyny, zwiększona aktywność dehydrogenazy mleczanowej i hipalbuminemia. W ostatnich latach szczególnie dużo uwagi poświęca się badaniom molekularnym u chorych na MDS, które szczegółowo omówiono powyżej. Bejar i wsp. [27] wykazali, że obecność mutacji co najmniej jednego z następujących genów: *TP53*, *EZH2*, *ETV6*,

RUNX1 lub *ASXL1*, powoduje, że chory przechodzi do kolejnej rokowniczo mniej korzystnej grupy ryzyka według IPSS. Ma to szczególne znaczenie u chorych pośrednio niskiego ryzyka według IPSS, gdyż pozwala zakwalifikować ich wcześniej do intensywniejszego leczenia [27]. Wydaje się, że implementacja wyników badań molekularnych we wskaźnikach prognostycznych MDS jest procesem nieuniknionym i trwają nad nią kolejne badania.

Piśmiennictwo

1. Mądry K, Machowicz R, Waszczuk-Gajda A, et al. Demographic, hematologic, and clinical features of myelodysplastic syndrome patients: results from the First Polish Myelodysplastic Syndrome Registry. *Acta Haematol.* 2015; 134(2): 125–134, doi: [10.1159/000375149](https://doi.org/10.1159/000375149), indexed in Pubmed: 25925777.
2. Drozd-Sokolowska JE, Mądry K, Waszczuk-Gajda A, et al. Are myelodysplastic syndromes underdiagnosed in Poland? A report by the Polish Adult Leukaemia Group. *Eur J Haematol.* 2017; 98(2): 154–159, doi: [10.1111/ejh.12814](https://doi.org/10.1111/ejh.12814), indexed in Pubmed: 27699872.
3. Ma X, Does M, Raza A, et al. Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. *Cancer.* 2007; 109(8): 1536–1542, doi: [10.1002/cncr.22570](https://doi.org/10.1002/cncr.22570), indexed in Pubmed: 17345612.
4. Komrokji RS, Kulasekararaj A, Al Ali NH, et al. Autoimmune diseases and myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol.* 2016; 91(5): E280–E283, doi: [10.1002/ajh.24333](https://doi.org/10.1002/ajh.24333), indexed in Pubmed: 26875020.
5. Goldberg SL, Chen Er, Corral M, et al. Incidence and clinical complications of myelodysplastic syndromes among United States Medicare beneficiaries. *J Clin Oncol.* 2010; 28(17): 2847–2852, doi: [10.1200/JCO.2009.25.2395](https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.2395), indexed in Pubmed: 20421543.
6. Della Porta MG, Travaglino E, Boveri E, et al. Rete Ematologica Lombarda (REL) Clinical Network. Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: a basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2015; 29(1): 66–75, doi: [10.1038/leu.2014.161](https://doi.org/10.1038/leu.2014.161), indexed in Pubmed: 24935723.
7. Valent P, Orazi A, Steensma DP, et al. Proposed minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes (MDS) and potential pre-MDS conditions. *Oncotarget.* 2017; 8(43): 73483–73500, doi: [10.18632/oncotarget.19008](https://doi.org/10.18632/oncotarget.19008), indexed in Pubmed: 29088721.
8. Valent P. ICUS, IDUS, CHIP and CCUS: diagnostic criteria, separation from MDS and clinical implications. *Pathobiology.* 2019; 86(1): 30–38, doi: [10.1159/000489042](https://doi.org/10.1159/000489042), indexed in Pubmed: 29860246.
9. Hasserjann R, Orazi A, Brunning R, et al. Myelodysplastic syndromes: overview. In: Swerdlow S, Campo E, Harris N, et al. ed. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, revised 4th ed. Vol. 2.* International Agency for Research on Cancer, Lyon 2017: 98–106.
10. Schanz J, Tüchler H, Solé F, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol.* 2012; 30(8): 820–829, doi: [10.1200/JCO.2011.35.6394](https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.6394), indexed in Pubmed: 22331955.

11. Cherry AM, Brockman SR, Paternoster SF, et al. Comparison of interphase FISH and metaphase cytogenetics to study myelodysplastic syndrome: an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) study. *Leuk Res.* 2003; 27(12): 1085–1090, doi: [10.1016/s0145-2126\(03\)00104-8](https://doi.org/10.1016/s0145-2126(03)00104-8), indexed in Pubmed: [12921944](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12921944/).
12. Ogata K, Della Porta MG, Malcovati L, et al. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. *Haematologica.* 2009; 94(8): 1066–1074, doi: [10.3324/haematol.2009.008532](https://doi.org/10.3324/haematol.2009.008532), indexed in Pubmed: [19546439](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19546439/).
13. van de Loosdrecht AA, Westers TM. Cutting edge: flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *J Natl Compr Canc Netw.* 2013; 11(7): 892–902, doi: [10.6004/jnccn.2013.0106](https://doi.org/10.6004/jnccn.2013.0106), indexed in Pubmed: [23847222](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23847222/).
14. Porwit A, van de Loosdrecht AA, Bettelheim P, et al. 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): 1793–1798, doi: [10.1038/leu.2014.191](https://doi.org/10.1038/leu.2014.191), indexed in Pubmed: [24919805](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24919805/).
15. Zheng G, Chen P, Pallavajjala A, et al. The diagnostic utility of targeted gene panel sequencing in discriminating etiologies of cytopenia. *Am J Hematol.* 2019; 94(10): 1141–1148, doi: [10.1002/ajh.25592](https://doi.org/10.1002/ajh.25592), indexed in Pubmed: [31350794](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31350794/).
16. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2013; 122(22): 3616–3627, doi: [10.1182/blood-2013-08-518886](https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-518886).
17. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2014; 28(2): 241–247, doi: [10.1038/leu.2013.336](https://doi.org/10.1038/leu.2013.336), indexed in Pubmed: [24220272](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24220272/).
18. Malcovati L, Stevenson K, Papaemmanuil E, et al. SF3B1-mutant MDS as a distinct disease subtype: a proposal from the International Working Group for the Prognosis of MDS. *Blood.* 2020; 136(2): 157–170, doi: [10.1182/blood.2020004850](https://doi.org/10.1182/blood.2020004850).
19. Bernard E, Nannya Y, Hasserjian RP, et al. Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Nat Med.* 2020; 26(10): 1549–1556, doi: [10.1038/s41591-020-1008-z](https://doi.org/10.1038/s41591-020-1008-z), indexed in Pubmed: [32747829](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32747829/).
20. University of Chicago Hematopoietic Malignancies Cancer Risk Team. How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. *Blood.* 2016; 128(14): 1800–1813, doi: [10.1182/blood-2016-05-670240](https://doi.org/10.1182/blood-2016-05-670240), indexed in Pubmed: [27471235](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27471235/).
21. Kraft IL, Godley LA, Kraft IL, et al. Identifying potential germline variants from sequencing hematopoietic malignancies. *Blood.* 2020; 136(22): 2498–2506, doi: [10.1182/blood.2020006910](https://doi.org/10.1182/blood.2020006910), indexed in Pubmed: [33236764](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33236764/).
22. Peterson L, Bloomfield C, Niemeyer C, Godley L, et al. Myeloid neoplasms with germline redispotion. In: Swerdlow S, Camo E, Harris N, et al. ed. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, revised 4th ed. Vol. 2. International Agency for Research on Cancer, Lyon 2017: 121–128.
23. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997; 89(6): 2079–2088, indexed in Pubmed: [9058730](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9058730/).
24. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2012; 120(12): 2454–2465, doi: [10.1182/blood-2012-03-420489](https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-420489), indexed in Pubmed: [22740453](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22740453/).
25. Della Porta MG, Malcovati L, Strupp C, et al. Risk stratification based on both disease status and extra-hematologic comorbidities in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica.* 2011; 96(3): 441–449, doi: [10.3324/haematol.2010.033506](https://doi.org/10.3324/haematol.2010.033506), indexed in Pubmed: [21134982](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21134982/).
26. Malcovati L, Porta MG, Pascutto C, et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol.* 2005; 23(30): 7594–7603, doi: [10.1200/JCO.2005.01.7038](https://doi.org/10.1200/JCO.2005.01.7038), indexed in Pubmed: [16186598](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16186598/).
27. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med.* 2011; 364(26): 2496–2506, doi: [10.1056/NEJMoa1013343](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1013343), indexed in Pubmed: [21714648](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21714648/).