

Ο ρόλος της κυτταρομετρίας ροής στη μελέτη των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων

Μαρίνα Καρακάντζα¹, Αικατερίνη Ψαρρά²

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: Ακρογωνιαίο λίθο της διάγνωσης των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων (ΜΔΣ) για περίπου 4 δεκαετίες αποτελεί η μορφολογία των κυττάρων του αίματος και του μυελού των οστών. Παρά τη συνεχή έρευνα της παθογένειας των νοσημάτων αυτών με σύγχρονες και προηγμένες τεχνολογίες και τη συσσώρευση πλήθους πληροφοριών για τις γενετικές και λειτουργικές βλάβες των κυττάρων τα ισχύοντα συστήματα κατάταξης και πρόγνωση των ΜΔΣ δεν αξιοποιούν τα δεδομένα αυτά. Πρόσφατα αναγνωρίστηκε ότι ασθενείς με ΜΔΣ εμφανίζουν διαταραχές στην έκφραση των κυτταρικών αντιγόνων που έχουν εντυπωσιακή επαναληψιμότητα και είναι διακριτές για κάθε στάδιο ωρίμανσης της αιμοποίησης. Η σχέση των αντιγονικών αυτών συνδυασμών με άλλες διαγνωστικές παραμέτρους ή με τους παθογενετικούς μηχανισμούς εμφάνισης της νόσου ή εξέλιξης της σε ΟΛ είναι ακόμα υπό διερεύνηση.

Haema 2011; 2(2): 193-204 Copyright EAE

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα αποτελούν κλωνικές διαταραχές του προγονικού αιμοποιητικού κυττάρου, που χαρακτηρίζονται από ποικίλου βαθμού αναστολή ωρίμανσης και διαφοροποίησης, και αυξημένο ρυθμό προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) σε όλες τις κυτταρικές βαθμίδες με αποτέλεσμα μη αποδοτική αιμοποίηση¹. Τα νοσήματα αυτά μολονότι έχουν αρκετούς κοινούς παθογενετικούς μηχανισμούς, εμφανίζουν σημαντική κλινική και αιματολογική ετερογένεια, η οποία εκδηλώνεται με ποικίλους συνδυασμούς κυτταροπενιών στο αίμα, ποικίλου βαθμού ανάγκες υποστήριξης παραγώγων αίματος και ποικίλο ποσοστό εξέλιξης σε περισσότερο επιθετικό κλινικό σύνδρομο ή οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ)^{2,3}. Η ετερογένεια αυτή πιθανώς είναι αποτέλεσμα του διαφορετικού βαθμού συμμετοχής κάθε παθογενετικού μηχανισμού στην ανάπτυξη του συνδρόμου, του διαφορετικού τρόπου 'αντίδρασης' του ανοσοποιητικού συστήματος στην εμφάνιση και ανάπτυξη ενός νεοπλασματικού νοσήματος και του διαφορετικού λοιπού

νοσολογικού υποστρώματος κάθε ασθενούς.

Ακρογωνιαίο λίθο της διάγνωσης των συνδρόμων αυτών για περίπου 4 δεκαετίες αποτελεί η μορφολογία των κυττάρων του αίματος και του μυελού των οστών.

Παρά τη συνεχή έρευνα της παθογένειας των νοσημάτων αυτών με σύγχρονες και προηγμένες τεχνολογίες και τη συσσώρευση πλήθους πληροφοριών για τις γενετικές και λειτουργικές βλάβες των κυττάρων τα ισχύοντα συστήματα κατάταξης και πρόγνωση των ΜΔΣ δεν αξιοποιούν τα δεδομένα αυτά⁴⁻⁷. Η διεθνής επιστημονική κοινότητα έχει από καιρό αναγνωρίσει ότι οι υπότυποι των ΜΔΣ, όπως αυτοί ορίζονται με μορφολογικά κριτήρια και οριοθετούν τις ομάδες συνδρόμων των εν ισχύει ταξινόμησεων, δεν συσχετίζονται ικανοποιητικά με τα κλινικά χαρακτηριστικά, την ανταπόκριση στη θεραπεία και την πρόγνωση των ασθενών. Γι' αυτό γίνονται συνεχείς προσπάθειες αναθεώρησης των κριτηρίων διάγνωσης και κατάταξης των συνδρόμων με σκοπό την ενσωμάτωση και άλλων δεικτών ώστε η αρχική κατάταξη να αντανακλά καλύτερα την παθογένεια των νοσημάτων.

Για πρώτη φορά στην ταξινόμηση κατά WHO⁹ του 2001 ενσωματώθηκαν στα διαγνωστικά κριτήρια, επιπλέον της μορφολογίας, κυτταρογενετικές διαταραχές που καθορίζουν συγκεκριμένες διαγνωστικές και προγνωστικές ομάδες ασθενών⁸.

Στην τελευταία ταξινόμηση κατά WHO αναγνωρίζεται ότι η έκφραση των αντιγόνων στα ώρα και ώριμα

¹Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Εργαστηριακής Αιματολογίας-Αιμοδοσίας, Ιατρικό Τμήμα, Πανεπιστήμιο Πατρών

²Χημικός, MSc, PhD, EurClinChem, Τμήμα Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας, Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός»

Διεύθυνση Αλληλογραφίας: Μαρίνα Καρακάντζα, Αιματολογικό Τμήμα, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Πατρών, Τηλ.: 2610 99255 & 99247, e-mail: makara@med.upatras.gr

κύτταρα των ασθενών με ΜΔΣ διαφέρει από την αντίστοιχη των φυσιολογικών κυττάρων του μυελού. Ωστόσο, οι διαταραχές της αντιγονικής έκφρασης δεν έχουν ενσωματωθεί στα διαγνωστικά κριτήρια της WHO, επειδή δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς σε δευτεροπαθή ΜΔΣ και δεν έχει αποδειχθεί η παθογνωμονική τους σημασία για τη διαφορική διάγνωση πρωτοπαθών και δευτεροπαθών ΜΔΣ από άλλες νοσολογικές οντότητες με ανάλογα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα⁹.

Οι διαταραχές έκφρασης των αντιγόνων στα ΜΔΣ είναι άγνωστο αν αποτελούν δείκτη των μορφολογικών διαταραχών, αν είναι δείκτες των κυτταρογενετικών και μοριακών διαταραχών ή αν είναι ανεξάρτητοι δείκτες των υποκείμενων παθοφυσιολογικών μηχανισμών των νοσημάτων αυτών. Είναι πιθανόν ότι τα παθολογικά σκεδαστικά των ουδετερόφιλων αποτελούν δείκτη των μορφολογικών διαταραχών που χαρακτηρίζουν τα ΜΔΣ ενώ οι ατυπίες στην έκφραση αντιγόνων σχετίζονται με την παθολογική ωρίμανση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων και πιθανώς αποτελούν δείκτες υποκείμενων παθογενετικών μηχανισμών.

Επιπλέον οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην κυτταρομετρία ροής είναι πολύπλοκες και υπόκεινται στη υποκειμενική ερμηνεία χρηστών καθιστώντας δύσκολη τη σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών Εργαστηρίων. Η διεθνής ομάδα των MDS όσο και η ομάδα National Comprehensive Cancer Network (NCCN), επισημαίνουν την ανάγκη εύρεσης και επικύρωσης μεθόδων που θα μπορούν να εφαρμοστούν σε κάθε εργαστήριο ρουτίνας. Άμεσος στόχος για το μέλλον είναι η προτύπωση των μεθόδων κυτταρομετρίας ροής ώστε τόσο τα αποτελέσματα κλινικών μελετών όσο και αυτά της βασικής έρευνας να είναι αναπαραγώγιμα μεταξύ των Εργαστηρίων με σκοπό το σχεδιασμό αξιόπιστων μελετών, που να μπορούν να αποσαφηνίσουν τόσο τη διαγνωστική όσο και την προγνωστική σημασία του ανοσοφαινοτύπου.

1. ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΣΤΑ ΜΔΣ

Σε ασθενείς με ΜΔΣ τα ευρήματα της κυτταρομετρίας ροής αναδεικνύουν διαταραχές στην έκφραση των αντιγόνων σε διάφορα στάδια ωρίμανσης όλων των αιμοποιητικών σειρών και κυρίως της μυελικής σειράς. Οι διαταραχές αυτές αφορούν ασυγχρονίες έκφρασης αντιγόνων για το στάδιο ωρίμανσης κυρίως των κυττάρων της μυελικής και ερυθράς σειράς, άτυπες (aberrant) εκφράσεις αντιγόνων άλλων σειρών και παθολογική υπερέκφραση ή υποέκφραση αντιγόνων. Συγκεντρωτική καταγραφή από το Leukemia EuroNet των παρατηρούμενων διαταραχών στην έκφραση αντιγόνων στα ΜΔΣ που δημοσιεύθηκε πρόσφατα φαίνεται στους πίνακες 1, 2, και 3¹⁰.

Οι συνδυασμοί αντιγόνων που θα αποδειχθούν παθο-

γνωμονικοί για τα ΜΔΣ πρέπει να έχουν μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία, να εμφανίζονται δηλαδή με μεγάλη συχνότητα σε ασθενείς με ΜΔΣ και με πολύ χαμηλή ή μηδενική συχνότητα σε ασθενείς με άλλα νοσήματα.

Από την υπάρχουσα καταγραφή (πίνακας 2) φαίνεται ότι ο πιο ευαίσθητος δείκτης για τα ουδετερόφιλα με συχνότητα εμφάνισης σχεδόν 100% είναι τα παθολογικά σκεδαστικά, ενώ οι ασυγχρονίες των αντιγόνων CD13/CD11b και CD16/CD13 καθώς και οι άτυπες εκφράσεις των αντιγόνων CD2 CD7, CD5, CD19 εμφανίζονται με συχνότητα >70%.

1.1. Άωρα προγονικά κύτταρα

Ένα συχνό ερώτημα που υποβάλλεται κατά την αποστολή δείγματος μυελού των οστών ασθενούς με ΜΔΣ ή με πιθανό ΜΔΣ με αίτημα τη διενέργεια ανοσοφαινοτύπου είναι ο αριθμός των βλαστών, ο οποίος φυσικά αποτελεί πολύ σημαντική παράμετρο στη μελέτη των νοσημάτων αυτών.

Πρέπει ωστόσο να διευκρινισθεί ότι οι βλάστες της μυελικής σειράς, όπως χαρακτηρίζονται μορφολογικά, δεν ταυτίζονται με τα άωρα κύτταρα, όπως αυτά προσδιορίζονται με κυτταρομετρία ροής μέσω της συνέκφρασης των δεικτών CD45weak CD34 CD117 HLADR.¹⁰ Αυτό οφείλεται αφ' ενός στην απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων κατά την κυτταρομετρική ανάλυση και αφ' ετέρου στο γεγονός ότι με τη μορφολογική εκτίμηση θεωρούνται βλάστες και κύτταρα ωριμότερα των μυελοβλαστών, δηλ. κύτταρα CD34-. Πολύ σημαντική παράμετρος είναι και η αιμοαραίωση.^{11,12} Η προσέγγιση μέσω της κυτταρομετρίας παρέχει επίσης τη δυνατότητα ανίχνευσης άωρων «βλαστικών» κυττάρων με παθολογική έκφραση δεικτών, όπως έλλειψη έκφρασης CD34 επί CD117+ αώρων κυττάρων ή και αντίστροφα, έλλειψη έκφρασης HLADR, αλλά και παθολογική έκφραση δεικτών λεμφικής σειράς, όπως CD2, CD7, CD19, CD56, CD5. Η παθολογική αυτή έκφραση από μόνη της αρκεί για να χαρακτηριστεί ένα περιστατικό ως ΜΔΣ, ανεξάρτητα αριθμού αώρων κυττάρων¹³.

Επιπρόσθετα, ο σημαντικός ελαττωμένος λόγος των αώρων κυττάρων λεμφικής σειράς, προς τα άωρα κύτταρα μυελικής σειράς αποτελεί πρωτεύον χαρακτηριστικό των ΜΔΣ μεταξύ των 4 που προτείνονται από την ομάδα των Ogata και συν.¹⁴.

1.2. Κύτταρα μυελικής και μονοκυτταρικής σειράς

Ο συνδυασμός πλάγιας σκέδασης SSC (side scatter) και CD45 αποτελεί τον κύριο τρόπο οριοθέτησης των πληθυσμών μυελικής και μονοκυτταρικής σειράς, που «πάσχουν» κατά κανόνα μαζί με την ερυθρά σειρά στα

Πίνακας 1. Παράμετροι με άτυπη έκφραση στα άωρα κύτταρα

Μυελοβλάστες	Ποσοστό %	Πρόδρομα Β κύτταρα	Ποσοστό %
Αύξηση ποσοστού	91	Αύξηση ποσοστού	42%
		Μείωση ποσοστού	82%
Ανωμάλη σκέδαση SSC	73		
Άτυπη έκφραση CD45	100		
Άτυπη έκφραση CD13	100		
Άτυπη έκφραση CD33	100		
Άτυπη έκφραση CD34	91		
Άτυπη έκφραση CD117	82		
Έκφραση CD11b	82		
Έκφραση CD15	64		
Άτυπη έκφραση HLA-DR	55		
Έκφραση CD36	45		
Άτυπη έκφραση TdT	36		
Έκφραση CD41/CD42b/CD61	36		
Έκφραση CD38	27		
Έκφραση CD4	18		
Έκφραση CD2	82		
Έκφραση CD5	82		
Έκφραση CD7	91		
Έκφραση CD19	91		
Έκφραση CD56	91		

ΜΔΣ. Σε ορισμένα περιστατικά, όπου παρατηρείται δυσκολία διάκρισης αυτών των κυτταρικών πληθυσμών, λόγω της δυσπλασίας τους, απαιτείται και η χρήση επικουρικών δεικτών, όπως οι CD64, CD33 για την ορθότερη οριοθέτησή τους.

Η ελαττωμένη SSC του πληθυσμού των ουδετεροφίλων κοκκιοκυττάρων, όπως ήδη αναφέρθηκε, αποτελεί επίσης ένα από τα πρωτεύοντα χαρακτηριστικά των ΜΔΣ, που προτείνονται από τους Ogata και συν.¹⁴ (Σχήμα 1, 2, 3). Προκειμένου μάλιστα να καταστεί πιο αντικειμενικός ο προσδιορισμός αυτός προτείνεται να προσδιορίζεται ο λόγος SSC κοκκιοκυττάρων προς SSC λεμφοκυττάρων. Αυτή η ελάττωση αντανάκλα τη δυσπλασία των κυττάρων και αποτελεί χαρακτηριστικό, που μπορεί εξαρχής να προσδιορισθεί σε κάθε απλό ανοσοφαινότυπο μυελοειδών οστών επί υποψίας ΜΔΣ, πριν υποβληθεί το δείγμα σε περαιτέρω διερεύνηση.

Όσον αφορά τα κοκκιοκύτταρα πολύ σημαντικές πληροφορίες παρέχουν οι συνδυασμοί CD13/CD11b και CD16/CD11b, όπου στην πλειονότητα των περιστατικών ΜΔΣ παρατηρείται διαταραχή σε σχέση με τη φυσιολογική ωρίμανση των κοκκιοκυττάρων, τα στάδια της οποίας μελετώνται με βάση την έκφραση των αντιγόνων αυτών^{15,16} (Σχήμα 1, 2, 3). Αντίστοιχα πληροφορίες λαμβάνονται με χρήση του συνδυασμού των κυτταροπλασματικών δεικτών

MPO (μυελοϋπεροξειδάση – χαρακτηριστική των πρωτογενών κοκκίων), LF (λακτοφερρίνη – χαρακτηριστική των δευτερογενών κοκκίων) και CD16 (χαρακτηριστικό των ωρίμων ουδετεροφίλων). Εντονότερες διαταραχές της έκφρασης των MPO/LF έδειξαν περιστατικά με ΜΔΣ χαμηλού κινδύνου, που τα διακρίνει από τα δείγματα ελέγχου. Είναι επίσης σημαντικός ο έλεγχος για άτυπη έκφραση αντιγόνων λεμφικής σειράς¹⁷.

Η μονοκυτταρική σειρά παρουσιάζει επίσης ποικιλία διαταραχών. Παρατηρούνται διαταραχές έκφρασης των χαρακτηριστικών δεικτών της μονοκυτταρικής σειράς CD64, CD36, CD14, HLADR, CD13, CD33, υπερέκφραση CD56 καθώς και αύξηση ή ελάττωση του πληθυσμού. Πρέπει να σημειωθεί ότι ιδιαίτερα στην περίπτωση της ΧΜΜΛ, οι διαταραχές είναι πιο έντονες στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος, παρά σε αυτά του μυελοειδών οστών^{15,18,19}.

1.2. Κύτταρα ερυθράς σειράς

Η ερυθρά σειρά (οριοθέτηση μέσω αρνητικού CD45 και χαμηλής SSC) μελετάται επίσης με κυτταρομετρία ροής. Είναι γνωστό ότι κατά την εκτέλεση του ανοσοφαινότυπου, προηγείται λύση των ερυθροκυττάρων, άρα η μελέτη της ερυθράς σειράς περιορίζεται στα εναπομεί-

Πίνακας 2. Παράμετροι με άτυπη έκφραση στα κύτταρα ενδιάμεσης και τελικής ωρίμανσης

Κύτταρα της μυελικής σειράς	Ποσοστό %	Μονοκύτταρα	Ποσοστό %
Μείωση λόγου μυελικής/λεμφική σειράς	36	Μείωση ή αύξηση λόγου μονοκυτταρικής/λεμφική σειράς	45
Άτυπη σκέδαση SSC	100	Άτυπη σκέδαση SSC	45
Άτυπη έκφραση CD45	64	Άτυπη έκφραση CD45	55
Στροφή προς τα αριστερά	82	Άτυπη έκφραση CD33	73
Άτυπη έκφραση CD13/CD16	82	Έκφραση HLA-DR	73
Άτυπη έκφραση CD16/CD11B	73	Άτυπη έκφραση CD11b/HLA-DR	73
Άτυπη έκφραση CD33	73	Έκφραση CD34	73
Έκφραση CD34	73	Άτυπη έκφραση CD14	73
Άτυπη έκφραση CD15	55	Άτυπη έκφραση CD13	73
Έκφραση HLA-DR	73	Άτυπη έκφραση CD36	45
Άτυπη έκφραση CD36	45	Άτυπη έκφραση CD64	36
Άτυπη έκφραση/ή έλλειψη έκφρασης CD10	45	Άτυπη έκφραση CD11c	18
Άτυπη έκφραση CD64	36	Άτυπη έκφραση CD15	9
Άτυπη έκφραση CD66	27		
Άτυπη έκφραση CD16	9		
Έκφραση CD2	73	Έκφραση CD2	73
Έκφραση CD5	73	Έκφραση CD5	73
Έκφραση CD7	82	Έκφραση CD7	73
Έκφραση CD19	82	Έκφραση CD19	73
Έκφραση CD56	45	Έκφραση CD56	91

Πίνακας 3. Παράμετροι με άτυπη έκφραση στα κύτταρα της ερυθράς σειράς

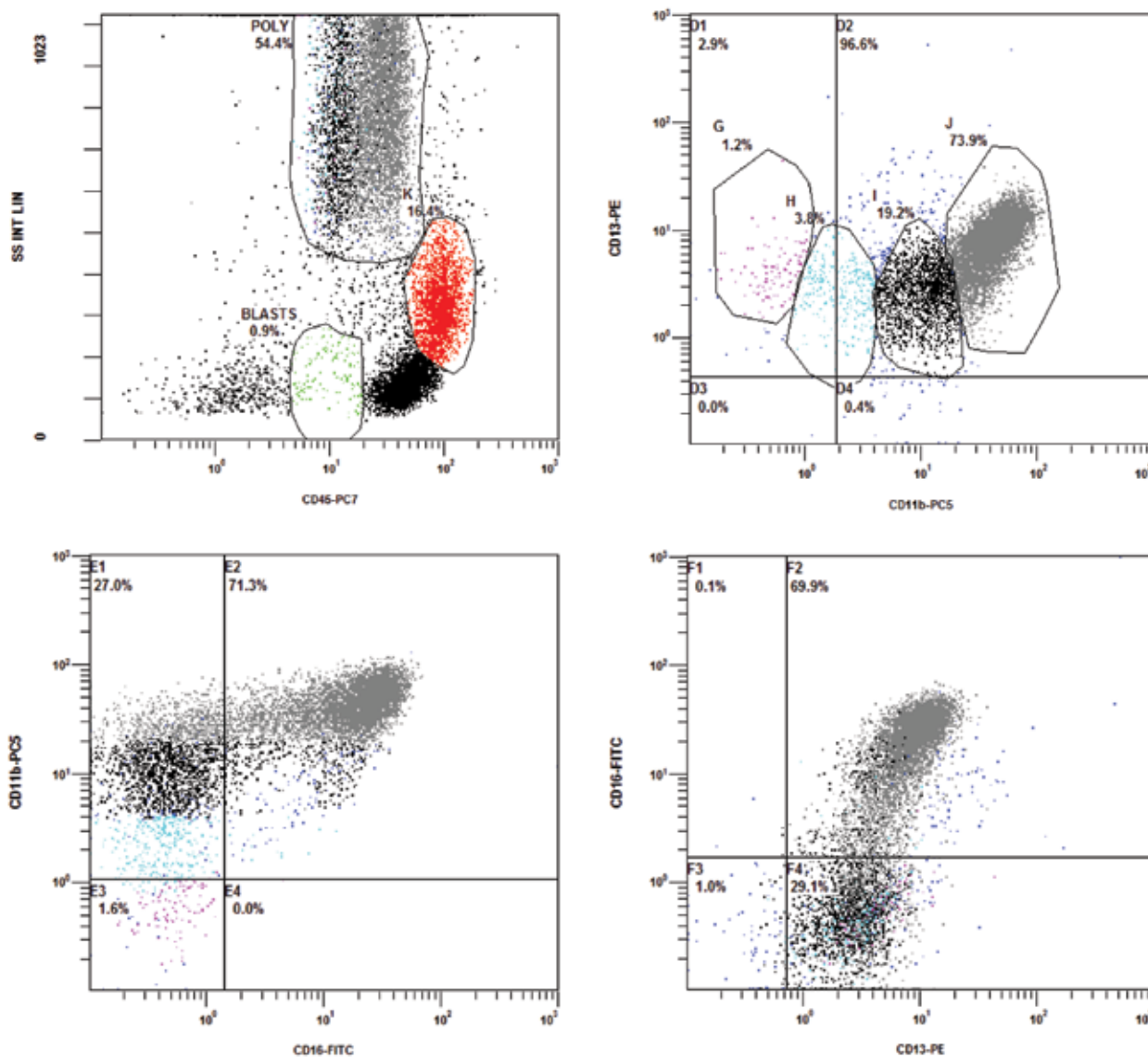
Κύτταρα ερυθράς σειράς	%
Αυξημένο ποσοστό ερυθροβλαστών μετά από λύση	45
Ανώμαλη κοκκίωση (SS)	45
Άτυπη έκφραση του CD235a	64
Άτυπη έκφραση CD71	71
Άτυπη συνέκφραση CD71/CD235a	64
Άτυπη έκφραση CD117	55
Άτυπη έκφραση CD36	36
Άτυπη έκφραση CD34	45
Άτυπη έκφραση CD105	36
Άτυπη έκφραση M φερριτίνη	18
Άτυπη έκφραση H φερριτίνη	18

ναντα ερυθροκύτταρα και ενδεχομένως δεν είναι αντιπροσωπευτική. Η ανεπαρκής λύση των ερυθροκυττάρων και η διαταραχή συνέκφρασης των CD235a (γλυκοφορίνης α), CD71 και CD36 προσφέρουν κάποιες πληροφορίες για τα χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ, χωρίς ωστόσο να υπάρχει επαρκής τεκμηρίωση της μελέτης αυτής της σειράς διεθνώς¹⁰. Στους πίνακες 4, 5 και 6 φαίνονται οι προτεινόμενοι από το European Leukemia Net συνδυασμοί αντιγόνων για τη μελέτη των ΜΔΣ.

2. ΠΑΘΟΓΝΩΜΟΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΣΤΑ ΜΔΣ

2.1 Ανθεκτικές Κυτταροπενίες με δυσπλασία μίας σειράς (Refractory cytopenia with unilineage dysplasia, RCUD)

Στην WHO κατάταξη του 2001⁸ αναγνωρίστηκε η διαφορά επιβίωσης και κινδύνου μετατροπής σε λευχαιμία



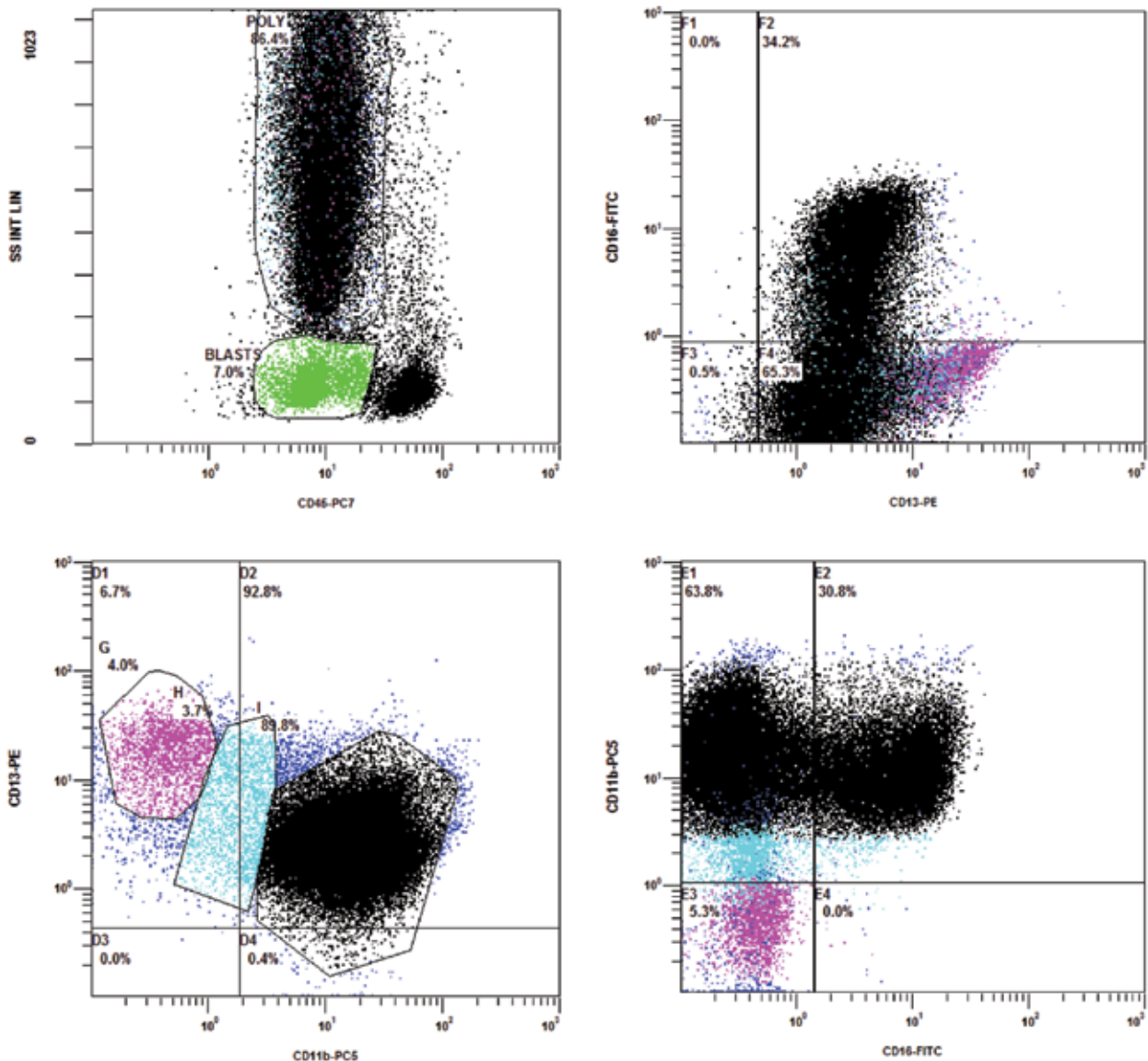
Στικτογράμματα (dotplots) σε ασθενή με ΧΜΜΛ, χωρίς διαταραχές των ουδετεροφίλων (POLY). Στικτόγραμμα α (CD45/SSC): ορίζονται το βλαστικό παράθυρο, η περιοχή των μονοπυρήνων και των πολυμορφοπυρήνων. Στικτόγραμμα β (CD11b/CD13): παρατηρείται το αυξανόμενο ποσοστό κυτάρων από το αωρότερο (περιοχή G) στα ωριμότερα H, I, J στάδια, γ) CD16/CD11b, δ) CD13/CD16. Στικτογράμματα γ και δ: Παρατηρείται η καλή έκφραση του CD16. Σημειώνεται ότι τα στικτογράμματα β, γ και δ είναι οριοθετημένα στην περιοχή των πολυμορφοπυρήνων (POLY), όπως ορίζεται στο στικτόγραμμα α.

των ασθενών που εμφανίζουν δυσπλασία μίας σειράς σε σχέση με αυτούς που εμφανίζουν δυσπλασία 2 ή περισσότερων σειρών. Η ανίχνευση παθολογικών αντιγονικών συνδυασμών με κυτταρομετρία ροής φαίνεται από μελέτες ότι δεν επιβεβαιώνει απλώς τη διάγνωση που τίθεται από τη μορφολογία και τα κυτταρογενετικά ευρήματα αλλά συμπληρώνει τη διάγνωση^{2,15,19,20}. Σε πρόσφατη μελέτη, ασθενείς οι οποίοι με μορφολογικά κριτήρια κατατάχθηκαν ως πάσχοντες από ανθεκτική αναιμία όταν μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής αποδείχθηκε ότι σε ποσοστό >50% είχαν διαταραχές και της μυελικής σειράς¹⁹. Αυ-

τή η διαφοροποίηση ήταν κλινικά σημαντική και σχετιζόταν με την εξέλιξη και την πρόγνωση των ασθενών.

2.2 Μεμονωμένες κυτταροπενίες αδιευκρίνητης σημασίας (Isolated cytopenias of undetermined significance, ICUS)

Σύμφωνα με την τελευταία κατάταξη της WHO^{9,21} οι μεμονωμένες κυτταροπενίες αδιευκρίνητης σημασίας

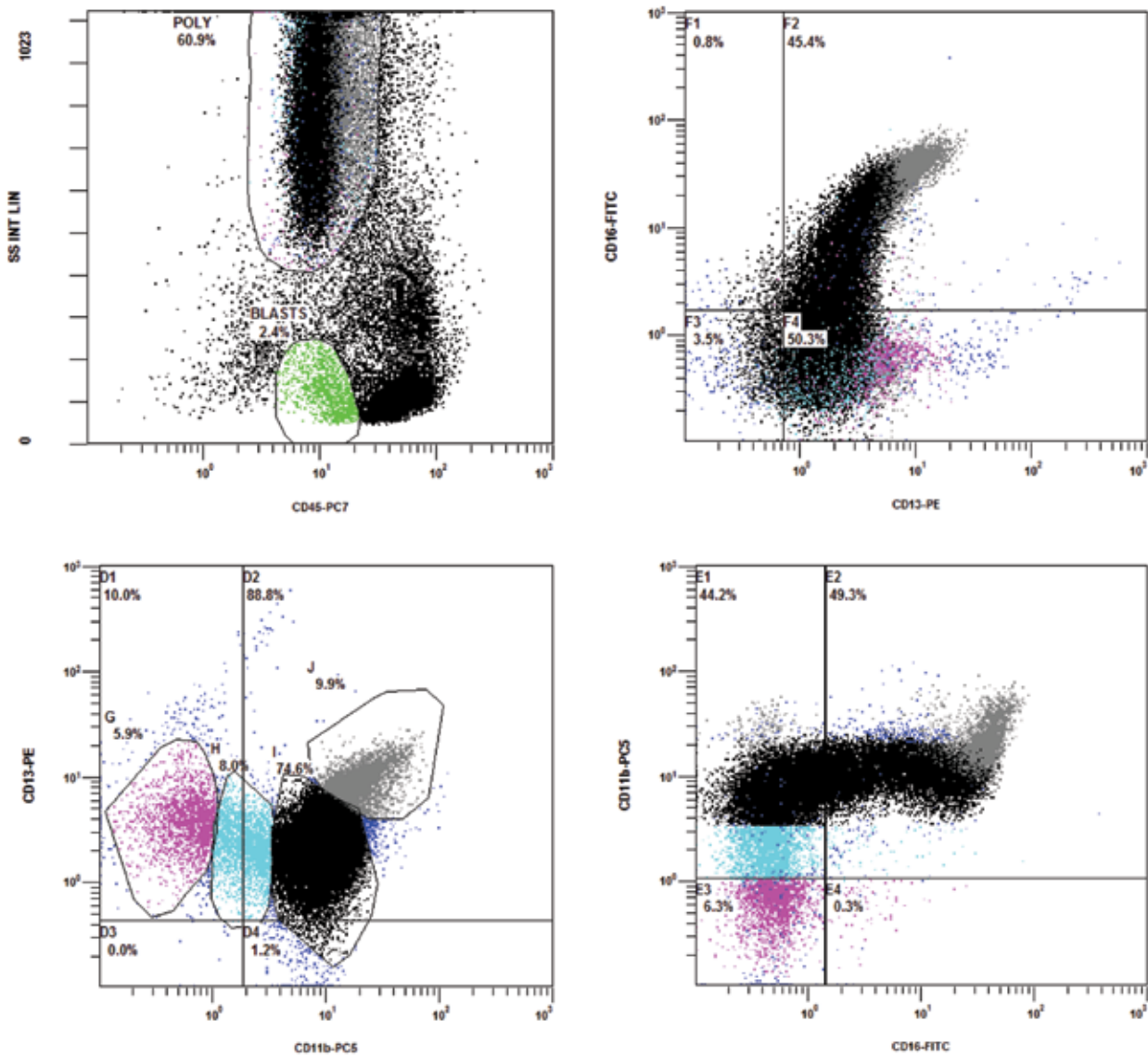


Στικτογράμματα (dotplots) σε ασθενή με ΜΔΣ, με διαταραχές έκφρασης δεικτών των ουδετεροφίλων και αυξημένο ποσοστό αώρων προγονικών κυττάρων (περιοχή blasts) συμβατές με MDS. Στικτόγραμμα α (CD45/SSC): Παρατηρείται η ελαττωμένη πλάγια σκέδαση SSC του πληθυσμού των κοκκιοκυττάρων (POLY) και το αυξημένο ποσοστό βλαστών. Στικτόγραμμα β (CD11b/CD13): Παρατηρείται το αυξημένο ποσοστό κυττάρων στο αωρότερο στάδιο (περιοχή G) και η συσσώρευση κυττάρων στην περιοχή I, ενώ απουσιάζει πλήρως η περιοχή των ωρίμων κυττάρων J γ) CD16/CD11b, δ) CD13/CD16. Στικτογράμματα γ και δ: Παρατηρείται η ελαττωμένη έκφραση του CD16. Σημειώνεται ότι τα στικτογράμματα β, γ και δ είναι οριοθετημένα στην περιοχή των πολυμορφοπυρήνων (POLY), όπως ορίζεται στο στικτόγραμμα α.

ορίζονται από την κυτταροπενία μίας σειράς χωρίς κυτταρογενετικά ευρήματα ενδεικτικά ΜΔΣ και με δυσπλαστικά χαρακτηριστικά <math><10\%</math>^{9,21}. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι σε ασθενείς με ICUS ανιχνεύονται διαταραχές στην αντιγονική έκφραση των κυττάρων της μυελικής σειράς ανάλογες με αυτές που παρατηρούνται σε ΜΔΣ διαχωρίζοντας έτσι υποομάδες που εντάσσονται παθογενετικά στο φάσμα των ΜΔΣ και διαφοροποιούνται από άλλες νοσολογικές οντότητες²²⁻²⁷.

2.3 Πιθανή παθογνωμονική σημασία του ανοσοφαινοτύπου στα ΜΔΣ

Αν και δεν υπάρχουν δεδομένα που τεκμηριώνουν τη διαγνωστική σημασία του ανοσοφαινοτύπου στις παρακάτω οντότητες είναι πιθανόν ότι η κυτταρομετρία θα συμβάλει στη διάγνωση αυξάνοντας την ευαισθησία των μορφολογικών κριτηρίων με την ανίχνευση παθολογικών σκεδαστικών. Επιπλέον είναι πιθανόν με την ανίχνευση



Στικτογράμματα (dotplots) σε ασθενή με ΜΔΣ, με διαταραχές έκφρασης δεικτών των ουδετεροφίλων πολυμορφοκυττάρων (POLY) συμβατές με ΜΔΣ. Στικτογράμμα α (CD45/SSC): Παρατηρείται η ελαττωμένη η πλάγια σκέδαση SSC του πληθυσμού των κοκκιοκυττάρων (POLY). Στικτογράμμα β (CD11b/CD13): Παρατηρείται το αυξημένο ποσοστό κυττάρων στο αωρότερο στάδιο (περιοχή G) και η συσσώρευση κυττάρων στην περιοχή I β) CD11b/CD13, γ) CD16/CD11b, δ) CD13/CD16. Στικτογράμματα γ και δ: Παρατηρείται η ελαττωμένη έκφραση του CD16. Σημειώνεται ότι τα στικτογράμματα β, γ και δ είναι οριοθετημένα στην περιοχή των πολυμορφοκυττάρων (POLY), όπως ορίζεται στο στικτογράμμα α.

ατυπιών στην αντιγονική έκφραση άωρων και διαφοροποιημένων κυττάρων να συμβάλει στην αποσαφήνιση των παθογενετικών μηχανισμών των νοσημάτων αυτών.

2.3.1 Ιδιοπαθής δυσπλασία αδιευκρίνιστης σημασίας (Idiopathic dysplasia of undetermined significance, IDUS)

Η ιδιοπαθής δυσπλασία αδιευκρίνιστης σημασίας είναι μία οντότητα που ενώ εμφανίζει μορφολογικές διαταρα-

χές χαρακτηριστικές ΜΔΣ δεν εμφανίζει κυτταροπενίες. Θεωρείται προ- ΜΔΣ με άγνωστη κλινική πρόγνωση.

2.3.2 Αταξινόμητα ΜΔΣ (MDS-U)

Στην WHO κατάταξη του 2008 χαρακτηρίζονται ως αταξινόμητα ΜΔΣ αυτά που εμφανίζουν δυσπλασία <10% μίας σειράς και κυτταρογενετικά ευρήματα ενδεικτικά ΜΔΣ⁹.

Ο Kern και συν έδειξαν ότι η κυτταρομετρία ροής

Πίνακας 4. Προτεινόμενοι συνδυασμοί δεικτών για τη μελέτη δυσπλασίας στα ΜΔΣ με κυτταρομετρία ροής

Δείκτες	Ερυθρά σειρά	Άωρα Μυελικής σειράς	Άωρα λεμφικής σειράς	Ωριμα Κοκκιοκύτταρα	Μονοκύτταρα	Ωριμα λεμφοκύτταρα
CD71, CD235a, CD117	X					
CD105	(X)					
CD34,CD117	(X)	X				
CD11b, CD117				X		
CD11b, HLA-DR		X		X	X	
CD117, HLA-DR		X				
CD123, HLA-DR		(x)†		(x)‡		
CD34, CD15		X		X		
CD34, CD5		X		X	X	
CD34, CD7, (CD13§)		X		X	X	
CD34, CD56		X		X	X	
CD34, CD19		X	X	X	X	
CD10, CD19			(X)	X		
CD10, CD38			(X)			
CD11b, CD13, CD16				X		
CD65				(x)		
CD64, CD14					X	
CD64, CD36					(X)	
CD33, CD14		X		X	X	
CD33, CD36	(x) CD36	X			X	
TdT		(X)	(X)			
CD79a			(X)			
CD19 k,l						(x)**
CD3, CD4, CD8						(x)**

* CD45 είναι παρόν σε κάθε συνδυασμό
X: απαραίτητος συνδυασμός
(x): Συμπληρωματικός συνδυασμός
† Ανάλυση πλασμοκυτταρικών DC (προγονικών κυττάρων)
‡ Ανάλυση βασεόφιλων
§ CD7 έκφραση στους μυελοβλάστες μπορεί να είναι φυσιολογική, πχ σε πρόδρομα κύτταρα μονοκυτταρικής/δενδριτικής διαφοροποίησης (CD13dim/CD7dim)
** για να ολοκληρωθεί η μελέτη των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών

ταυτοποιεί περιπτώσεις ΜΔΣ οι οποίες δεν ταυτοποιούνταν με μορφολογικά κριτήρια²⁸. Στις παραπάνω οντότητες είναι πιθανόν ότι η συμπλήρωση της μορφολογικής και κυτταρογενετικής μελέτης με ανοσοφαινότυπο θα προσθέσει πληροφορίες που θα τις εντάξει σε καλύτερα αναγνωρισμένες οντότητες.

2.3.3 Μεμονωμένη έλλειψη 5q- (del 5q-)

Η μεμονωμένη έλλειψη 5q- αποτελεί ξεχωριστή υποκατηγορία των ΜΔΣ που χαρακτηρίζεται από αναιμία,

φυσιολογικό ή αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων και χαμηλή πιθανότητα εκτροπής σε Οξεία Μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ). Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ασθενείς με del 5q- εμφανίζουν περισσότερες διαταραχές στην έκφραση των αντιγόνων από ομάδες ασθενών με άλλες κυτταρογενετικές βλάβες όπως τρισωμία 8, del(20q) και απώλεια χρωμοσώματος Y^{27,29}. Η ανοσοφαινοτυπική μελέτη των ασθενών αυτών μπορεί να βοηθήσει στη διάκριση υποκατηγορίας ασθενών με παθολογική αντιγονική έκφραση σε άωρους πληθυσμούς και αυξημένο κίνδυνο εκτροπής σε ΟΜΛ³⁰.

Πίνακας 5. Παράδειγμα συνδυασμών 4-χρωμάτων για μελέτη ΜΔΣ με κυτταρομετρία ροής

	FL-1	FL-2	FL-3	FL-4
1			CD45	
2	CD71	CD235a	CD45	CD117
3	CD36	CD64	CD45	CD14
4	CD10	CD33	CD45	CD14
5	CD16	CD13	CD45	CD11b
6	HLA-DR	CD117	CD45	CD11b
7	CD13+CD33	CD117	CD45	CD34
8	CD13	CD7	CD45	CD34
9	CD2	CD56	CD45	CD34
10	CD5	CD19	CD45	CD34
11	CD15	CD11b	CD45	CD34

Αυτό το panel βασίστηκε σε πρόταση της Ολλανδικής ομάδας μελέτης των ΜΔΣ με κυτταρομετρία ροής.

Ο σχεδιασμός εξαρτάται από τον εξοπλισμό του κάθε Εργαστηρίου, τα διαθέσιμα MoAb, φθοροχρώματα και την εμπειρία των χρηστών

3. ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΣΤΗΝ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΜΔΣ

Το διεθνώς ισχύον προγνωστικό σύστημα IPSS (International Prognostic Scoring System) για τον καθορισμό ομάδων που θα έχουν δυσμενή κλινική πορεία και θα εξελιχθούν σε οξεία λευχαιμία στηρίζεται σε κριτήρια κατά τη διάγνωση, που έχουν συμπεριληφθεί στις κατατάξεις της WHO και επιπλέον σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες, που δε συμπεριλαμβάνονται στα διαγνωστικά κριτήρια. Οι χρωμοσωμικές αυτές ανωμαλίες θεωρούνται δευτεροπαθείς, εμφανιζόμενες κατά την εξέλιξη του κλώνου, και προβλέπουν την εξέλιξη σε ΟΜΛ³¹. Μειονέκτημα του IPSS είναι ότι κατατάσσει τους ασθενείς κατά τη διάγνωση και δεν συμπεριλαμβάνει παραμέτρους που εμφανίζονται κατά την πορεία της νόσου. Πιο δυναμικό σύστημα είναι το WHO-adjusted prognostic scoring system (WPSS) που περιλαμβάνει την εξάρτηση από μεταγγίσεις κατά την πορεία της νόσου και έτσι εισάγει μία κλινική παράμετρο που αντικαθρεπίζει τη βιολογική εξέλιξη του νοσήματος³². Και τα δύο συστήματα, IPSS και WPSS, μειονεκτούν διότι δεν συμπεριλαμβάνουν νέες σημαντικές παραμέτρους που φαίνεται ότι σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου όπως συννοσηρότητα, επίπεδα LDH, κατάσταση μεθυλίωσης, ίνωση μυελού των οστών κ.α. Τα συστήματα αυτά είναι συνεχώς σε αναθεώρηση με σκοπό αφενός την ενσωμάτωση νέων βιολογικών παραμέτρων και αφετέρου τον εκσυγχρονισμό τους σε σχέση με νέες θεραπείες.

Πίνακας 6. Παράδειγμα συνδυασμών 5 χρωμάτων

	FITC	PE	ECD	PC5	PC7
1	CD10	CD19	CD34	CD20	CD45
2	HLADr	CD33	CD34	CD38	CD45
3	CD7	CD117	CD34	CD13	CD45
4	MPO	LF	CD34	CD16	CD45
5	CD36	CD64	CD34	CD14	CD45
6	CD16	CD13	CD5	CD11b	CD45
7	CD3	CD(16+56)	CD4	CD8	CD45

Η ανίχνευση παθολογικών αντιγονικών εκφράσεων σε άωρα και ώριμα κύτταρα με κυτταρομετρία ροής πιθανόν να βελτιώσει την προγνωστική δύναμη των ισχυρόντων συστημάτων ιδιαίτερα σε υποκατηγορίες ΜΔΣ χαμηλού κινδύνου.

Στις υποκατηγορίες RCUD, ICUS, MDS-U, IDUS, isolated del5q- η μελέτη των αντιγόνων μπορεί να συμπληρώσει τα ευρήματα της μορφολογίας και κυτταρογενετικής και να κατατάξει τους ασθενείς σε υποκατηγορίες μεγαλύτερο κινδύνου^{19,20,22-30}.

Επιπλέον οι παθολογικές αντιγονικές εκφράσεις σε διάφορα στάδια ωρίμανσης των κυττάρων μπορεί να έχουν ανεξάρτητη προγνωστική σημασία. Μελέτες έδειξαν ότι διαταραχές της αντιγονικής έκφρασης της μυελικής και μονοκυτταρικής σειράς συσχετίζονται με το International Prognostic Scoring System (IPSS), το WHO-adjusted prognostic scoring system (WPSS), την εξάρτηση από μεταγγίσεις, το χρόνο εξέλιξης σε ΟΜΛ και την έκβαση μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων^{19,33}. Άτυπες εκφράσεις αντιγόνων στα προγονικά κύτταρα της μυελικής σειράς υπερέκφραση ή μειωμένη έκφραση κοινών μυελικών αντιγόνων ή έκφραση αντιγόνων άλλης σειράς μπορεί να έχουν ανεξάρτητη προγνωστική σημασία ακόμα και αν ο αριθμός των βλαστών στον μυελό των οστών είναι <5%^{19,33-37}. Έχει δειχθεί ότι η άτυπη έκφραση κάποιων δεικτών όπως του CD7 και/ή TdT στα άωρα κύτταρα της μυελικής σειράς συσχετίζεται με χειρότερη κλινική έκβαση^{19,38,39}.

Η ανίχνευση διαταραχών έκφρασης αντιγόνων στα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα μπορεί να έχει διαγνωστική και προγνωστική σημασία και στις ομάδες ασθενών με περίσσεια βλαστών. Στην ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών, RAEB-1 και RAEB-2, όπως αυτή ορίζεται με μορφολογικά και κυτταρογενετικά κριτήρια οι διαταραχές έκφρασης αντιγόνων τόσο στα πρόδρομα όσο και στα ώριμα κύτταρα της μυελικής και μονοκυτταρικής σειράς μπορεί να μεταβάλουν τη διάγνωση και να έχουν προγνωστική σημασία για τους ασθενείς αυτούς.

4. ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΤΩΝ ΜΔΣ

Κανένα από τα ισχύοντα προγνωστικά συστήματα δεν μπορεί να προβλέψει την ανταπόκριση των ασθενών με ΜΔΣ στη θεραπεία. Σε πρόσφατη μελέτη φάνηκε ότι η ανίχνευση άτυπου φαινοτύπου σε πρόδρομα κύτταρα της μυελικής σειράς ασθενών με χαμηλού και ενδιάμεσου κινδύνου-1 ΜΔΣ προβλέπει την ανταπόκριση σε αυξητικούς παράγοντες. Έτσι ασθενείς με χαμηλά επίπεδα ερυθροποιητίνης (EPO) και φυσιολογική έκφραση αντιγόνων στα πρόδρομα κύτταρα της μυελικής σειράς ανταποκρίνονται στη χορήγηση EPO και G-CSF (94%) ενώ ασθενείς με υψηλά επίπεδα EPO και παθολογική έκφραση αντιγόνων δεν ανταποκρίνονται στη χορήγηση αυξητικών παραγόντων (11%)^{40,41}. Σε άλλη μελέτη φάνηκε ότι ο βαθμός φωσφορυλίωσης της pERK όπως αυτή ανιχνεύεται με κυτταρομετρία ροής σχετίζεται με την ανταπόκριση στην EPO και τη συνολική επιβίωση ασθενών με χαμηλού και ενδιάμεσου κινδύνου -1 ΜΔΣ.⁴² Παρακολούθηση ασθενών με κυτταρομετρία ροής μπορεί να είναι σημαντική αφενός για την αναγνώριση νέων παθολογικών αντιγονικών εκφράσεων κατά την εξέλιξη της νόσου ή την απώλεια των παθολογικών αντιγονικών εκφράσεων μετά από ανταπόκριση σε θεραπεία, ιδιαίτερα για ασθενείς που αντιμετωπίζονται με υπομεθυλιωτικούς παράγοντες όπως 5-αζακυτιδίνη.⁴³

5. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΜΕ ΤΟΥΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΩΝ ΜΔΣ

Οι διαταραχές της έκφρασης των αντιγόνων σε ασθε-

νείς με ΜΔΣ εμφανίζουν εντυπωσιακή επαναληψιμότητα και είναι διακριτές για κάθε στάδιο ωρίμανσης της αιμοποίησης. Η σχέση των αντιγονικών αυτών συνδυασμών με άλλες διαγνωστικές παραμέτρους ή με τους παθογενετικούς μηχανισμούς εμφάνισης της νόσου ή εξέλιξης της σε ΟΛ είναι άγνωστη. Τα παθολογικά σκεδαστικά των ουδετερόφιλων όπως προαναφέρθηκε πιθανώς αποτελούν δείκτη των μορφολογικών διαταραχών που χαρακτηρίζουν τα ΜΔΣ ενώ οι ατυπίες στην έκφραση αντιγόνων σχετίζονται με την παθολογική ωρίμανση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων και πιθανώς αποτελούν δείκτες υποκείμενων παθογενετικών μηχανισμών.

Συμπερασματικά, αν και η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μία τεχνική με ευρύτατες εφαρμογές στη διάγνωση ποικίλων αιματολογικών νοσημάτων η αξία στη διάγνωση των ΜΔΣ δεν έχει τεκμηριωθεί. Από τα υπάρχοντα δεδομένα φαίνεται ότι συμβάλλει στη διάγνωση και πρόγνωση ασθενών με ΜΔΣ σύνδρομα χαμηλού κινδύνου ανιχνεύοντας διαταραχές κυρίως της μυελικής σειράς που δεν ανιχνεύονται με μορφολογικά κριτήρια.

Επιπλέον η δυνατότητα της κυτταρομετρίας ροής να ανιχνεύει ατυπίες αντιγονικών εκφράσεων σε άωρους αλλά και διαφοροποιημένους πληθυσμούς μπορεί να συμβάλει καθοριστικά στην αποσαφήνιση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών των συνδρόμων αυτών.

Η προτύπωση των τεχνικών που αφορούν τη διάγνωση των ΜΔΣ αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την αξιόπιστη και αναπαραγωγίμη χρήση τους σε κλινικές μελέτες που θα αξιολογήσουν τη διαγνωστική και προγνωστική σημασία του ανοσοφαινοτύπου αλλά και σε μελέτες βασικής έρευνας που θα αποσαφηνίσουν τους παθογενετικούς μηχανισμούς των συνδρόμων αυτών.

The role of flow cytometry in the diagnosis of myelodysplastic syndromes

by Marina Karakantza¹, Aikaterini Psarra²

¹Haematology Department of University Hospital, Medical School, Patras,

²Department of Immunology – Histocompatibility, Evangelismos, Athens

ABSTRACT: The diagnosis of Myelodysplastic syndromes (MDS) relies mainly on the morphology of cells in peripheral blood and bone marrow smears. Despite the extensive research in the pathogenesis of the syndromes and the accumulation of data from various biomedical fields, most of them are not yet incorporated in the diagnostic and prognostic systems of MDS. Data from flow cytometry show that the expression of antigens in patients with MDS differs from that of normal individuals and that they express characteristic patterns in all stages of cellular differentiation. The correlation of these antigenic patterns to other diagnostic parameters or the pathogenetic mechanisms underlying the syndromes is still under investigation.

Βιβλιογραφία

1. Giagounidis AA, Germing U, Aul C. Biological and prognostic significance of chromosome 5q deletions in myeloid malignancies. *Clin Cancer Res.* 2006;12:5-10.
2. 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;23:7594-7603.
3. Valent P, Horny HP, Bennett JM et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res.* 2007;31:727-736.
4. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet.* 2009;41:838-842.
5. Hussein K, Theophile K, Büsche G et al. Aberrant microRNA expression pattern in myelodysplastic bone marrow cells. *Leuk Res.* 2010;34:1169-1174.
6. Dostalova MM, et al. Distinctive microRNA expression profiles in CD34+ bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome. *European Journal of Human Genetics.* 2010;19:313-319.
7. Flach J, Dicker F, Schnittger S et al. An accumulation of cytogenetic and molecular genetic events characterizes the progression from MDS to secondary AML: an analysis of 38 paired samples analyzed by cytogenetics, molecular mutation analysis and SNP microarray profiling. *Leukemia.* 2011;25:713-718.
8. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood.* 2002;100:2292-2302. *Leuk Res.* 2007;31:727-736.
9. Vardiman, JW, Thiele J, Arber DA et al. The 2008 revision criteria of the World Health Organization (WHO) of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes *Blood.* 2009;11:937-951.
10. van de Loosdrecht AA, Alhan C, Béné MC et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European Leukemia Net working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2009;94:1124-1134.
11. Loken MR, Chu SC, Fritschle W et al. Normalization of bone marrow aspirates for hemodilution in flow cytometric analyses. *Cytometry B Clin Cytom.* 2008;11:76B:27-36.
12. Brooimans RA, Kraan J, van Putten W et al. Flow cytometric differential of leukocyte populations in normal bone marrow: Influence of peripheral blood contamination. *Cytometry B Clin Cytom.* 2008 21;76B:18-26.
13. Matarraz S, López A, Barrena S et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia.* 2008;22:1175-1183.
14. Ogata K, Della Porta MG, Malcovati L et al. Diagnostic utility of flow cytometry in low grade myelodysplastic syndromes: A prospective validation study. *Hematologica.* 2009;94:1066-1074.
15. Stachurski D, Smith BR, Pozdnyakova O et al. Flow cytometric analysis of myelomonocytic cells by a pattern recognition approach is sensitive and specific in diagnosing myelodysplastic syndrome and related marrow diseases: emphasis on a global evaluation and recognition of diagnostic pitfalls. *Leuk Res.* 2008;32:215-224.
16. Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K et al. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from a working conference. *Leuk Res.* 2008;32:5-17.
17. Vikentiou M, Psarra K, Kapsimali V et al. Distinct neutrophil subpopulations phenotype by flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma.* 2009;50:401-409.
18. Βικεντίου Μ, Ψαρρά Κ, Καψιμάλη Β και συν. Η διαγνωστική σημασία μελέτης του ανοσοφαινότυπου μονοκυττάρων μυελού οστών και περιφερικού αίματος ασθενών με Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο. *Αίμα (Haema).* 2009;12(Suppl 1):119-120.
19. van de Loosdrecht AA, Westers TM, Westra AH et al. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood.* 2008;111:1067-1077.
20. Kussick SJ, Fromm JR, Rossini A, et al. Four-color flow cytometry shows strong concordance with bone marrow morphology and cytogenetics in the evaluation of myelodysplasia. *Am J Clin Pathol.* 2005;124:170-181.
21. Brunning R. Myelodysplastic syndromes/neoplasms. In: Swerdlow et al, editor. WHO classification of Tumours and Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008.
22. Bacher U, Haferlach T, Kern W et al. The impact of cytomorphology, cytogenetics, molecular genetics, and immunophenotyping in a comprehensive diagnostic workup of myelodysplastic syndromes. *Cancer.* 2009;115:4524-4532.
23. Papadaki, H, Koutala, H, Velegraki M et al. P039. The diagnostic utility of bone marrow flow-cytometric immunophenotyping for the differential diagnosis of chronic idiopathic neutropenia from myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research.* 2009;33:S80-S81.
24. Truong F, Smith BR, Stachurski D et al. The utility of flow cytometric immunophenotyping in cytopenic patients with a non-diagnostic bone marrow: a prospective study. *Leuk Res.* 2009;33:1039-1046.
25. Valent P, Horny HP. Minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes and separation from ICUS and IDUS: up- date and open questions. *Eur J Clin Invest.* 2009;39:548-553.
26. Stetler-Stevenson M. Flow cytometric immunophenotyping: emerging as an important diagnostic tool in the evaluation of cytopenic patients. *Leuk Res.* 2009;33:1020-1021.
27. Cutler JA, Wells DA, van de Loosdrecht AA, et al. Phenotypic abnormalities strongly reflect genotype in patients with unexplained cytopenias. *Cytometry B Clin Cytom* 2010 Dec 23.
28. Kern W, Haferlach T, Schnittger S et al. Flow Cytometric Findings Indicative of Myelodysplasia Differ Depending

- on the Karyotype. *Blood* 112[11], 1250. 2008. Abstract
29. Kern W, Haferlach C, Schnittger S, et al. 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.
 30. Alhan C, Westers TM, Cali C, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA. Validation of a Flow Cytometric Scoring 204 System for the Prognostication of the Myelodysplastic Syndromes: a Retrospective Cohort Study. *Blood* 116[21], 4012. 2010. Abstract
 31. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89:2079-2088.
 32. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A et al. Time depending prognostic scoring system for predicting survival and leukemia evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2007;25:3503-10
 33. Wells DA, Benesch M, Loken MR et al. 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.
 34. Ogata K, Kishikawa Y, Satoh C et al. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2006;108:1037-44.
 35. Scott BL, Wells DA, Loken MR et al. Validation of a flow cytometric scoring system as a prognostic indicator for post-transplantation outcome in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2008;112:2681-6.
 36. Ogata K, Nakamura K, Yokose N, et al. Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2002;100:3887-96.
 37. Knipp S, Strupp C, Gattermann N et al. Presence of peripheral blasts in refractory anemia and refractory cytopenia with multilineage dysplasia predicts an unfavourable outcome. *Leuk Res*. 2008;32:33-7.
 38. Cesana C, Klersy C, Brando B et al. Prognostic value of circulating CD34+ cells in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2008;32:1715-23.
 39. Font P, Subirá D, Mtnez-Chamorro C et al. Evaluation of CD7 and terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) expression in CD34+ myeloblasts from patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. 2006;30:957-63.
 40. Westers TM, Alhan C, Chamuleau ME et al. Aberrant immunophenotype of blasts in myelodysplastic syndromes is a clinically relevant biomarker in predicting response to growth factor treatment. *Blood* 2010;115:1779-84.
 41. Westers TM, Alhan C, Cali C et al. Quantitative Dynamics of Flow Cytometric Aberrancies during Treatment with Erythropoietin/G-CSF are predictive for Responses in Low/Int-1 Risk Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 2008;112, 586. Ref Type: Abstract
 42. Frisan E, Pawlikowska P, Pierre-Eugène C et al. p-ERK1/2 is a predictive factor of response to erythropoiesis-stimulating agents in low/int-1 myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2010;95:1964-1968.
 43. Silverman LR, Fenaux P, Mufti GJ, et al. Continued azacitidine therapy beyond time of first response improves quality of response in patients with higher-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer*. 2011 Jan 10.