



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)»
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)**

**ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ ΚΑΙ
ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΚΟΗΘΕΙΩΝ**

ΜΠΟΥΚΟΥΒΑΛΑ ΑΝΔΡΟΜΑΧΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:

ΠΑΤΡΩΝΑ ΒΕΖΥΡΑΚΗ

ΟΜΟΤΙΜΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2026



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)»
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)**

**ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ ΚΑΙ
ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΚΟΗΘΕΙΩΝ**

ΜΠΟΥΚΟΥΒΑΛΑ ΑΝΔΡΟΜΑΧΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:

ΠΑΤΡΩΝΑ ΒΕΖΥΡΑΚΗ

ΟΜΟΤΙΜΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2026

« Η έγκριση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

ΟΝΟΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ: Ανδρομάχη Μπουκουβάλα

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης:

**ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΚΟΗΘΕΙΩΝ**

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ:

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Πατρόνα Βεζυράκη, Ομότιμη Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικό Τμήμα, Σχολή
Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Λάμπρος Λάκκας, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικό Τμήμα, Σχολή
Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ιωάννης Σίμος, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικό Τμήμα, Σχολή
Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Η Διευθύντρια του ΠΜΣ

ΝΑΚΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Καθηγήτρια Καρδιολογίας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, θεωρώ υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν καθοριστικά στην εκπόνησή της.

Πρώτα απ' όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια, κα. Πατρώνα Βεζυράκη, Ομότιμη Καθηγήτρια Φυσιολογίας, για την πολύτιμη καθοδήγηση και εμπιστοσύνη καθ' όλη τη διάρκεια συγγραφής της εργασίας. Καθώς επίσης και τους καθηγητές μου και μέλη της επιτροπής κ. Λάμπρο Λάκκα, Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας και τον κ. Ιωάννη Σίμο, Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας.

Ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Γεώργιο Βαρθολομάτο, Βιοχημικό, επιστημονικό υπεύθυνο του τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Μεταφραστικής Κυτταρομετρίας Ροής του Αιματολογικού Εργαστηρίου του Π.Γ.Ν.Ιωαννίνων και την Dr. Λευκοθέα Ντόβα, Βιοχημικό του ίδιου τμήματος, για την αμέριστη βοήθεια και γνώση που μου έχουν προσφέρει.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον καθηγητή μου, κ. Γεώργιο Μαρκόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας, για την πολύτιμη και θεμελιώδη βοήθειά του, που με τις γνώσεις του καθόρισε την έκβαση της διπλωματικής εργασίας μου.

Ευχαριστίες επίσης οφείλω στον κ. Νικόλαο Ράρρα και στην κα. Πανωραία Μάστορα, υπεύθυνους του Αιματολογικού Εργαστηρίου του Π.Γ.Ν.Ιωαννίνων, χωρίς των οποίων την στήριξη δεν θα τα είχα καταφέρει.

Τέλος, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου, στον συζυγό μου Πέτρο και στις κόρες μας Άννα και Ειρήνη, όπως και στους φίλους μας για την αγάπη και την ηθική υποστήριξη που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Στην οικογένειά μου

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	6
1. Εισαγωγή.....	10
1.1 Η εξέλιξη της κυτταρομετρίας ροής.....	13
1.2 Εφαρμογές της ΚΡ και η ανάγκη διάγνωσης αιματολογικών κακοηθειών	14
1.3 Σκοπός της μελέτης	16
2. Κυτταρομετρία Ροής: Θεωρία και Βασικές Αρχές.....	17
2.1 Θεμελιώδεις Αρχές της Κυτταρομετρίας Ροής.....	17
2.1.1 Συστήματα κυτταρομέτρου	18
2.1.2 Δείγματα	20
2.1.3 Αντιδραστήρια/Πάνελ αντισωμάτων	21
2.1.4 Απόκτηση Δεδομένων	25
2.1.5 Σήματα σκέδασης φωτός και φθορισμού	25
2.2 Ανάλυση Δεδομένων με Κυτταρομετρία Ροής	27
2.4 Κυτταρομετρία Νέας Γενιάς.....	31
2.4.1 Κυτταρομετρία Φάσματος (Spectral Flow Cytometry).....	31
2.4.2 Κυτταρομετρία Ροής Εικόνας (Imaging Flow Cytometry, IFC/ImFC).....	36
2.4.3 Κυτταρομετρία Μάζας (Mass Cytometry / CyTOF)	38
3. Αιματολογικές Κακοήθειες: Επισκόπηση και διαγνωστική προσέγγιση με κυτταρομετρία ροής ⁴¹	
3.1 Κατηγορίες Αιματολογικών Κακοηθειών.....	42
3.2 Ανοσοφαινότυπος και Ταξινόμηση.....	42
3.3 Κυτταρομετρική ανάλυση Λευχαιμιών	44
3.2.1 Ταυτοποίηση του Βλαστικού Πληθυσμού με κυτταρομετρία ροής.....	45
4. Διαγνωστικές Εφαρμογές της Κυτταρομετρίας Ροής Νέας Γενιάς στις Αιματολογικές Κακοήθειες	67
4.1 Φασματική/πλήρους φάσματος κυτταρομετρία ροής (Spectral / Full Spectrum Flow Cytometry): εφαρμογές σε MRD και στρατηγικές πολυπαραμετρικής ανάλυσης.....	68
(α) AML: MRD με υψηλής πολυπλοκότητας πάνελ	68
(β) B-ALL: κλινική διάγνωση/παρακολούθηση και πιθανή εφαρμογή σε κλινική ρουτίνα	70
4.2 Κυτταρομετρία ροής εικόνας (Imaging Flow Cytometry): συνδυασμός ανοσοφαινότυπου και μορφολογίας σε επίπεδο κυττάρου	71
4.3 Κυτταρομετρία μάζας (Mass Cytometry / CyTOF): λειτουργική χαρτογράφηση, βιοδείκτες απόκρισης και μικροπεριβάλλον.....	72
(α) AML – λειτουργική πρόγνωση και πρόιμη εκτίμηση απόκρισης	73
(β) Ανθεκτική AML – φαρμακοδυναμική ανάλυση και βιοδείκτες αντοχής.....	73

(γ) Δευτεροπαθής AML – αποκάλυψη λειτουργικής ετερογένειας	73
(δ) Λεμφώματα/CLL και πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες: μικροπεριβάλλον και ανοσοθεραπεία	74
4.4 Ρόλος στη Μελέτη του Μικροπεριβάλλοντος του Όγκου	74
4.5 Συνοπτική αποτίμηση κλινικής αξίας.....	76
4.6 Προκλήσεις στη Διαγνωστική Εφαρμογή	78
5. Εφαρμογές και Μέλλον της Κυτταρομετρίας Ροής Νέας Γενιάς στην Κλινική Πρακτική.	80
Περίληψη.....	83
Abstract	84
Βιβλιογραφία	85

1. Εισαγωγή

Η κυτταρομετρία ροής (KP, Flow Cytometry) αποτελεί μία σημαντική, υψηλής απόδοσης τεχνολογία για την ταχεία, πολυπαραμετρική ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων σε εναιώρημα και χρησιμοποιείται εκτεταμένα σε αιματολογικές κακοήθειες για διάγνωση, ταξινόμηση, σταδιοποίηση και παρακολούθηση θεραπευτικής ανταπόκρισης (Adan et al., 2017). Στον τομέα της βιοϊατρικής η KP έχει σημαντικές εφαρμογές που καλύπτουν ευρύ φάσμα, από τη βασική έρευνα έως τη διάγνωση και την παρακολούθηση ασθενειών.

Η διάγνωση αιματολογικών κακοηθειών, όπως οι λευχαιμίες, τα λεμφώματα και τα μυελώματα, αποτελεί μία από τις βασικές εφαρμογές της. Με την ικανότητά της να αναλύει γρήγορα και με ακρίβεια μεγάλα δείγματα κυττάρων, η κυτταρομετρία ροής έχει σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση, κατηγοριοποίηση και παρακολούθηση αιματολογικών κακοηθειών. Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνολογία ικανή να παρέχει γρήγορη πολυπαραμετρική ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων. Με την τεράστια βελτίωση στα όργανα και τα αντιδραστήρια των τελευταίων δεκαετιών, Η KP έχει γίνει πολύ ισχυρό εργαλείο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολλά ερευνητικά ή κλινικά πεδία για μεγάλη ποικιλία σκοπών (Adan et al . 2017; McKinnon 2018). Η KP διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διάγνωση και την παρακολούθηση μετά τη θεραπεία πολλών αιματολογικών κακοηθειών (Craig και Foon 2008; DiGiuseppe JA 2019). Καθώς η KP μετρά ταυτόχρονα φυσικούς χαρακτήρες (μέγεθος και πολυπλοκότητα) και πολλαπλούς επιφανειακούς/ενδοκυττάριους δείκτες μεμονωμένων κυττάρων, επιτρέπει τον γρήγορο και ακριβή φαινοτυπικό χαρακτηρισμό ενός κυτταρικού πληθυσμού. Μαζί με την ιστοπαθολογία και άλλες πληροφορίες, η πολυπαραμετρική KP μπορεί να ταξινομήσει με ακρίβεια ένα αιματολογικό νεοπλασμα σε υπότυπο με βάση την ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) για αιμοποιητικούς και λεμφικούς όγκους (Swerdlow et al. 2017). Η μελέτη KP μπορεί επίσης να αξιολογήσει την κλωνικότητα των ώριμων Β-κυττάρων αξιολογώντας την έκφραση της ελαφριάς αλυσίδας ανοσοσφαιρίνης (Ig) και την κλωνικότητα των ώριμων αβ Τ-κυττάρων αξιολογώντας το ρεπερτόριο του υποδοχέα Τ-κυττάρων (TCR) V β ή τη

σταθερά 1 της αλυσίδας β. BC CR1. Επιπλέον, η KP μπορεί εύκολα να μετρήσει το περιεχόμενο του DNA και να προσδιορίσει την πλοειδία DNA ενός κυτταρικού πληθυσμού, κάτι που βοηθά στη διάγνωση και/ή στην πρόβλεψη της πρόγνωσης. Ο γρήγορος χρόνος διεκπεραίωσης της δοκιμής KP επιτρέπει τη γρήγορη διάγνωση ή την έγκαιρη επιλογή των κατάλληλων βοηθητικών δοκιμών. Η κλασική πολυχρωματική KP βασίζεται στην ταυτόχρονη χρήση πολλών φθοριοχρωμάτων, αξιοποιώντας φίλτρα/καθρέπτες για την επιλεκτική ανίχνευση εκπομπών· η αύξηση όμως του αριθμού δεικτών επιβαρύνει την αντιστάθμιση (compensation) και τη διασπορά σφάλματος (spreading error), απαιτώντας αυστηρό σχεδιασμό πάνελ και ποιοτικό έλεγχο (Adan et al., 2017).

Η KP μπορεί να ανιχνεύσει με ευαισθησία τα κακοήθη κύτταρα των μη αιματολογικών καρκίνων εάν περιλαμβάνονται κατάλληλα αντισώματα στα πάνελ και η εφαρμογή της KP για το λόγο αυτό είναι πολύ χρήσιμη σε υγρά δείγματα όπως ο μυελός των οστών (BM), τα σωματικά υγρά, και FNA. Ακόμη και με πάνελ KP που συνήθως χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση αιματολογικών νεοπλασμάτων, ορισμένοι μη αιματολογικοί όγκοι, όπως νευροενδοκρινείς όγκοι, νευροβλάστωμα και σαρκώματα, μπορούν να ανιχνευθούν ή να υποβληθούν σε μελέτη με KP (Shapiro, 2003).

Σε σύγκριση με την ανοσοιστοχημεία (IHC), η KP δεν είναι μόνο ταχύτερη, αλλά μπορεί εύκολα και αποτελεσματικά να συσχετίσει πολλαπλές παραμέτρους σε ένα μόνο κύτταρο. Επιπλέον, η KP μπορεί να ανιχνεύσει την ένταση του αντιγόνου και τα ανώμαλα πρότυπα έκφρασης αντιγόνου. Το κύριο μειονέκτημα της KP είναι η έλλειψη συσχέτισης με τη μορφολογία. Επιπλέον, η KP απαιτεί βιώσιμα φρέσκα δείγματα και η μειωμένη βιωσιμότητα ορισμένων νεοπλασμάτων συχνά αποκλείει την ακριβή ανάλυση KP.

Η αποκάλυψη των λεπτομερειών των υποπληθυσμών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος απαιτεί μια ολοκληρωμένη γνώση και ικανότητα να εξετασθεί το σύστημα σε βάθος. Το έργο αυτό, σε σημαντικό βαθμό, έχει αντιμετωπιστεί με την επαναλαμβανόμενη επέκταση των μεθόδων της κυτταρομετρίας ροής, τόσο σε τεχνολογικό επίπεδο και σε ικανότητα, όσο και στις συνοδευτικές εξελίξεις στην πληροφορική. Ο τομέας της φθορισμομετρικής κυτταρομετρίας, έφτασε σε ένα τεχνολογικό φράγμα περίπου 30 παραμέτρων, το οποίο σταμάτησε μέχρι που η κυτταρομετρία φάσματος ροής δημιούργησε μια θεμελιώδη μεταμόρφωση που

πιθανότατα θα οδηγήσει στην δυνατότητα 100 ταυτόχρονων αναλύσεων μέσα σε λίγα χρόνια .

Η ταυτόχρονη πρόοδος στην πληροφορική, καθώς έχει γίνει τώρα μια στιγμή καμπής και στον τομέα της κυτταρομετρίας ροής, ανταγωνίζεται τις παρούσες συστηματικές προσεγγίσεις, όπως η γονιδιωματική και η πρωτεομική, επιτρέποντας στην κυτταρομική να λάβει θέση στην χρήση των τεχνολογιών της κατηγορίας “-omics”. Επιπλέον, οι πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις προσπαθούν να συνδυάσουν την ταχύτητα των συστημάτων ροής με άλλες μεθόδους ανίχνευσης, εκτός από τον φθορισμό, γεγονός που προβλέπεται ότι θα καταστήσει τα κυτταρόμετρα ροής απαραίτητα σε κάθε βιολογικό εργαστήριο.

Στο κλινικό πλαίσιο, η ΚΡ διασυνδέεται με τα σύγχρονα συστήματα ταξινόμησης αιματολογικών νεοπλασιών. Η WHO 5η έκδοση και η International Consensus Classification (ICC) ενοποιούν μορφολογικά, ανοσοφαινοτυπικά, κυτταρογενετικά και μοριακά δεδομένα, προσδιορίζοντας οντότητες και κριτήρια που επηρεάζουν τη διαγνωστική στρατηγική και την αναφορά αποτελεσμάτων (Khoury et al., 2022; Alaggio et al., 2022; Arber et al., 2022). Η ευθυγράμμιση της ανοσοφαινοτυπικής ανάλυσης με WHO/ICC (ορολογία δεικτών, κατώτατα όρια, ερμηνεία) βελτιώνει την τεκμηρίωση και επιτρέπει συγκρισιμότητα σε πολυκεντρικό επίπεδο.

Κομβική εφαρμογή της ΚΡ είναι η ανίχνευση Ελάχιστης Υπολειμματικής Νόσου (MRD), κρίσιμου προγνωστικού και προβλεπτικού δείκτη. Στην BCP-ALL, τα τυποποιημένα πρωτόκολλα EuroFlow (8 παράμετροι σήμερα και 12 παράμετροι για ειδικά κλινικά σενάρια) επιτυγχάνουν ευαισθησίες έως 10^{-4} – 10^{-5} , με σαφείς κανόνες για MRD, όρια ανίχνευσης/ποσοτικοποίησης και δομημένη αναφορά (Theunissen et al., 2017; Verbeek et al., 2025; Short et al., 2025). Στην AML, οι επικαιροποιήσεις ELN και τεχνικές εργασίες περιγράφουν συνδυασμό προσεγγίσεων, απαιτήσεις σε γεγονότα (events) ανά σωλήνα, και κοινά πρότυπα αναφοράς, εστιάζοντας στην ελαχιστοποίηση ψευδώς θετικών λόγω γεγονότων αναγεννητικής αιμοποίησης (Heuser et al., 2021; Tettero et al., 2022; Roshal & Gao, 2025). Παράλληλα, υπολογιστικές μέθοδοι (π.χ. mixture models, auto-gating/AGI) βελτιώνουν την αναπαραγωγιμότητα και τη διακρισιμότητα στην AML-MRD, λειτουργώντας συμπληρωματικά της οπτικής ερμηνείας από τον αιματολόγο (Mocking et al., 2024).

1.1 Η εξέλιξη της κυτταρομετρίας ροής

Η παραδοσιακή κυτταρομετρία ροής, που αναπτύχθηκε κατά τη δεκαετία του 1970, είχε ως κύριο στόχο την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση κυτταρικών πληθυσμών. Ωστόσο, οι πρόσφατες εξελίξεις έχουν οδηγήσει σε τεχνολογίες κυτταρομετρίας ροής νέας γενιάς, οι οποίες χαρακτηρίζονται από αυξημένη ευαισθησία, ακρίβεια και την ικανότητα να αναλύουν πολλαπλές παραμέτρους ταυτόχρονα. Με την εισαγωγή τεχνολογιών όπως κυτταρομετρίας φάσματος, πολυδιάστατης ανάλυσης δεδομένων και υποστήριξης από αλγορίθμους τεχνητής νοημοσύνης, η τεχνολογία έχει επεκτείνει τις δυνατότητές της πέρα από τις παραδοσιακές διαγνωστικές εφαρμογές.

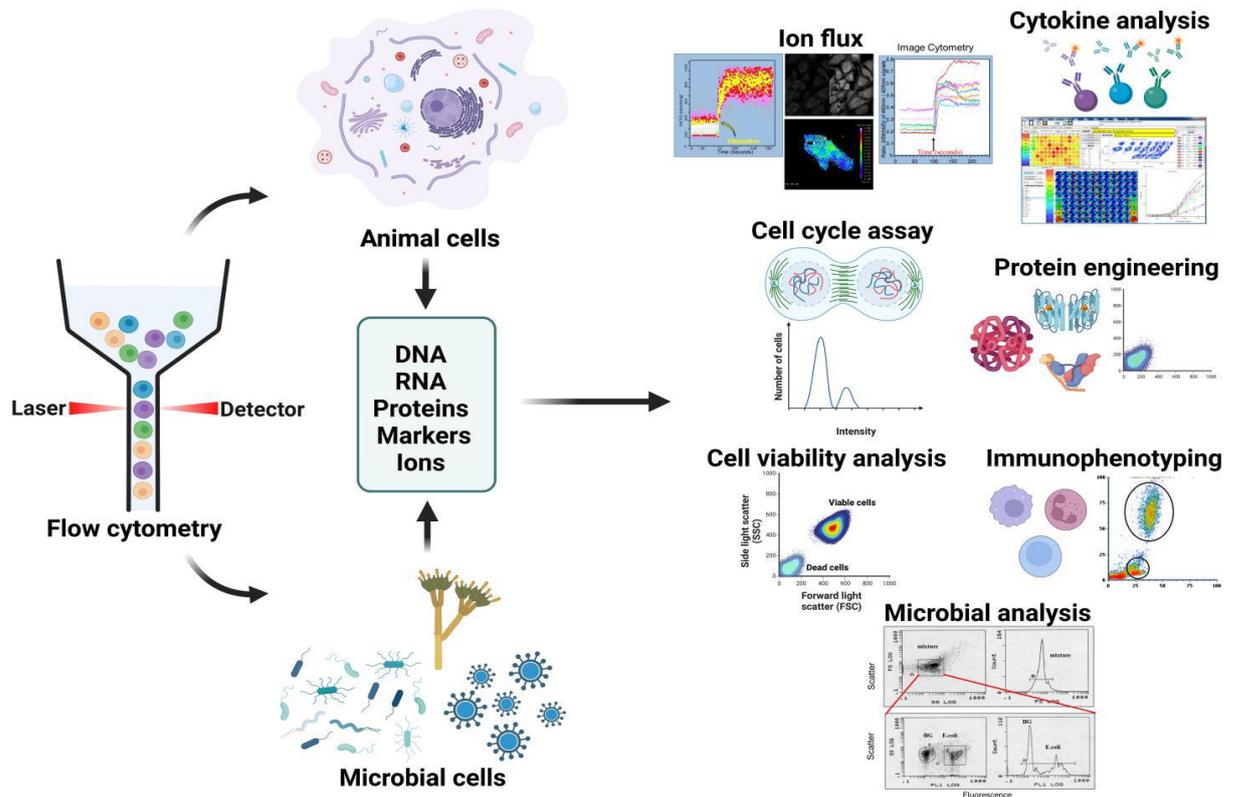
Η Φασματική ΚΡ (Spectral FC) ή κυτταρομετρία Φάσματος συνιστά σημαντική τεχνολογική εξέλιξη: αντί να μετρά στενές ζώνες εκπομπής, συλλέγει ολόκληρο το φάσμα κάθε χρωστικής σε πολλαπλά κανάλια και, μέσω υπολογιστικού διαχωρισμού/«unmixing», απομονώνει τις συνεισφορές τους, μειώνοντας συστηματικά τα προβλήματα επικάλυψης φθορισμού. Έτσι, επιτρέπει ανάλυση σε περισσότερους ταυτόχρονους δείκτες με καλύτερη αξιοποίηση ασθενών σημάτων και διαχείριση αυτοφθορισμού, ειδικά σε πολύτιμα δείγματα μυελού/ιστών (Nolan, 2022; Robinson & Rajwa, 2024). Πρόσφατες ανασκοπήσεις υπογραμμίζουν ότι η υιοθέτηση της Φασματικής ΚΡ απαιτεί τυποποίηση προ-αναλυτικών βημάτων (pre-analytical), βελτιστοποιημένο σχεδιασμό διαγνωστικών πάνελ (panel design), κατάλληλα δείγματα αναφοράς/μάρτυρες (reference controls) και τεκμηριωμένα SOPs ώστε να εξασφαλίζεται αναπαραγωγιμότητα και διαλειτουργικότητα μεταξύ εργαστηρίων (Holl, Kapinsky & Larbi, 2025).

1.2 Εφαρμογές της ΚΡ και η ανάγκη διάγνωσης αιματολογικών κακοηθειών

Πριν από την εμβάθυνση στις πολυάριθμες εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής, είναι απαραίτητο να τονιστεί η διάκριση μεταξύ των δυνατοτήτων ανάλυσης και διαλογής. Από την άποψη της ανάλυσης, η κυτταρομετρία ροής επιτρέπει την καταγραφή πολλών ενδείξεων για κάθε μεμονωμένο κύτταρο και σε πολλαπλά δείγματα. Από την άλλη πλευρά, η διαλογή κυττάρων περιλαμβάνει τη συγκεκριμένη απομόνωση και ανάκτηση του επιθυμητού κυτταρικού πληθυσμού από τους υπόλοιπους. Η κυτταρομετρία ροής είναι μια ευέλικτη τεχνολογία με ευρύ φάσμα εφαρμογών. Χρησιμοποιείται συνήθως για την ανοσοφαινοτύπιση, η οποία περιλαμβάνει την ταυτοποίηση κυττάρων με βάση τους επιφανειακούς ή ενδοκυτταρικούς δείκτες, καθώς και για δοκιμασίες βιωσιμότητας και ανάλυση του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο, η κυτταρομετρία ροής μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για πιο εξειδικευμένες εφαρμογές, όπως η μελέτη ροών ιόντων, η ανάλυση κυτταροκινών και η μηχανική πρωτεϊνών.

Οι τεράστιες δυνατότητες της ΚΡ προκύπτουν από την ικανότητά της να αναλύει μεμονωμένα κύτταρα, καθιστώντας την ένα ανεκτίμητο εργαλείο για την αποκάλυψη της κυτταρικής ετερογένειας και τον εντοπισμό σπάνιων υποομάδων κυττάρων. Αυτή η ικανότητα εξέτασης των κυττάρων σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου δίνει τη δυνατότητα σε ερευνητές να διακρίνουν και να χαρακτηρίζουν διακριτούς υποπληθυσμούς, ρίχνοντας φως στην κυτταρική ποικιλομορφία και διασαφηνίζοντας τη σημασία σπάνιων κυτταρικών συμβάντων στο πλαίσιο διεργασιών ασθενειών ή αναπτυξιακών μονοπατιών. Επιπλέον, το κυτταρόμετρο διαχωρισμού παρέχει την πρόσθετη λειτουργικότητα της φυσικής διαλογής κυττάρων από οποιαδήποτε υποομάδα, διευρύνοντας το πεδίο των δυνατοτήτων στην απομόνωση κυττάρων και στις μεταγενέστερες εφαρμογές.

Οι αιματολογικές κακοήθειες αποτελούν μία πολύπλοκη ομάδα ασθενειών, με ποικίλη παθογένεια, βιολογική συμπεριφορά και ανταπόκριση στις θεραπευτικές παρεμβάσεις. Η ακριβής διάγνωση είναι κρίσιμη για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας και την πρόβλεψη της πρόγνωσης.



Εικ. 1. Εφαρμογές της ΚΡ. Αναλύσεις με ΚΡ περιλαμβάνουν την ανάλυση DNA/RNA, την ανοσοφαινοτύπηση, την ιοντική ροή, δοκιμασίες βιωσιμότητας, ανάλυση μικροβίων, κυτταροκινών και άλλων αναλύσεων.

Οι παραδοσιακές μέθοδοι διάγνωσης, όπως η κυτταρογενετική και η ιστοπαθολογία, συχνά απαιτούν πρόσθετα κλινικά δεδομένα για την πλήρη κατανόηση της νόσου.

Σε αυτό το πλαίσιο, η κυτταρομετρία ροής και η κυτταρομετρία νέας γενιάς έχει αναδειχθεί ως ένα πανίσχυρο εργαλείο, παρέχοντας πληροφορίες για τον ανοσοφαινότυπο των κυττάρων, την κυτταρική δομή και τη λειτουργική κατάσταση.

1.3 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας ανασκοπικής μελέτης είναι να παρουσιάσει και να αξιολογήσει κριτικά τον ρόλο των τεχνολογιών κυτταρομετρίας «νέας γενιάς»—φασματικής/πλήρους φάσματος κυτταρομετρίας ροής, κυτταρομετρίας ροής εικόνας και κυτταρομετρίας μάζας—στη σύγχρονη αιματολογική ογκολογία. Ειδικότερα, η μελέτη αποσκοπεί στη συστηματική αποτύπωση των τεχνικών αρχών και των επιχειρησιακών απαιτήσεων κάθε πλατφόρμας, καθώς και στην τεκμηριωμένη σύνδεσή τους με κλινικά ερωτήματα υψηλής προτεραιότητας: ακριβέστερη ανοσοφαινοτυπική ταξινόμηση, ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μετρήσιμης υπολειπόμενης νόσου (MRD), ανάλυση ετερογένειας όγκου (συμπεριλαμβανομένων βλαστικών υποπληθυσμών) και χαρτογράφηση του ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος. Παράλληλα, αναδεικνύονται οι προϋποθέσεις κλινικής μετάφρασης (προτυποποίηση, έλεγχος ποιότητας, κανονικοποίηση και υπολογιστικά μέσα πληροφορίας) και συζητούνται οι περιοχές όπου οι εν λόγω τεχνολογίες αναμένεται να προσφέρουν τη μεγαλύτερη προστιθέμενη αξία στην ενσωματωμένη διάγνωση και στην εξατομικευμένη παρακολούθηση των αιματολογικών κακοηθειών.

2. Κυτταρομετρία Ροής: Θεωρία και Βασικές Αρχές

2.1 Θεμελιώδεις Αρχές της Κυτταρομετρίας Ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνολογία αιχμής που επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση και ανάλυση πολλαπλών φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών κυττάρων ή σωματιδίων που βρίσκονται σε ένα εναιώρημα. Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στην ανίχνευση φωτός που προκύπτει από τη διέλευση κυττάρων μέσω μιας δέσμης λέιζερ, καθώς και στην καταγραφή της φθορίζουσας εκπομπής από φθορίζουσες ουσίες που προσδένονται σε μοριακούς στόχους.

Η κυτταρομετρία ροής λειτουργεί με βάση τη βασική αρχή να αναλύονται μεμονωμένα κύτταρα σε εναιώρημα καθώς διέρχονται εν σειρά από φωτεινή δέσμη.

Κατά την παρασκευή δείγματος τα κύτταρα ή τα σωματίδια βρίσκονται σε εναιώρημα και διέρχονται διαδοχικά μέσα από μια στενή ροή υγρού (υδροδυναμική εστίαση) ενώ διεγείρονται από δέσμη λέιζερ.

Συνολικά η διέλευση του κυττάρου μέσω του λέιζερ προκαλεί σκέδαση φωτός, η οποία μετρίεται σε:

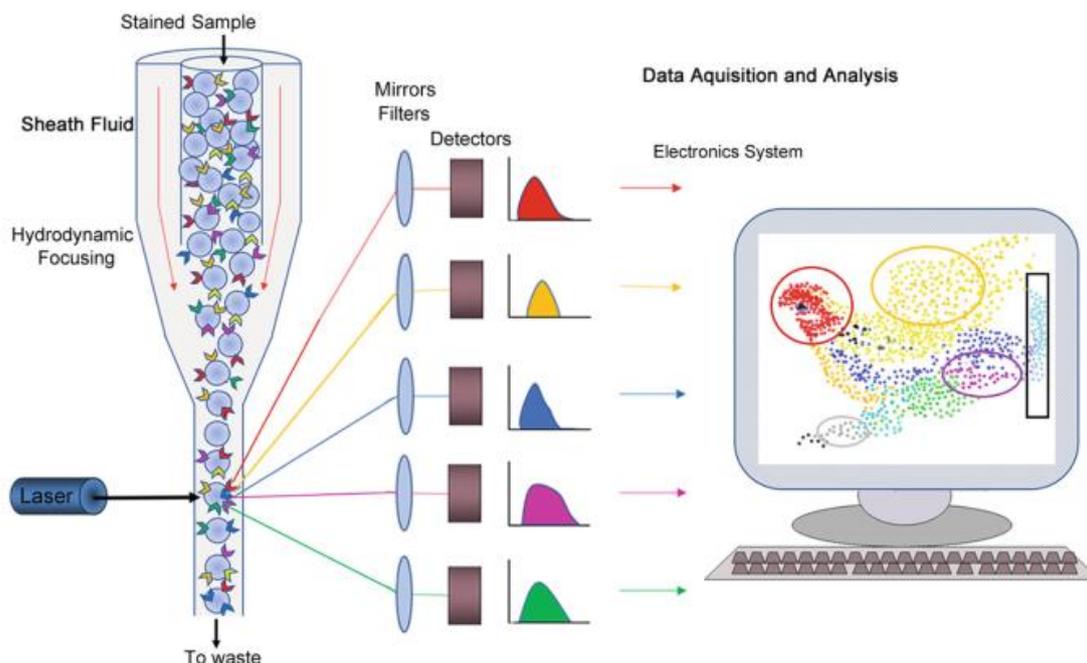
- Πρόσθια σκέδαση (Forward Scatter – FSC): Παρέχει πληροφορίες για το μέγεθος του κυττάρου.
- Πλευρική σκέδαση (Side Scatter – SSC): Σχετίζεται με την κοκκώδη υφή του κυτταροπλάσματος ή την περιεκτικότητα του κυττάρου σε εσωτερικές δομές.
- Φθορισμός: Οι φθοριοχρωματικές ετικέτες (π.χ., αντισώματα συνδεδεμένα με φθοριοχρώματα) δεσμεύονται σε συγκεκριμένα αντιγόνα ή μοριακούς δείκτες στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό των κυττάρων. Οι εκπομπές φθορισμού καταγράφονται από ανιχνευτές (photomultiplier tubes, PMTs), επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση της έκφρασης συγκεκριμένων μορίων.

Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία επιτρέπει συνολικά τη μέτρηση σκέδασης (μέγεθος/κοκκιάδης υφή) και φθορισμό επιφανειακών/ενδοκυττάρων δεικτών μέσω αντισωμάτων συζευγμένων με φθοριοχρώματα (Adan et al., 2017). Η τυπική ροή περιλαμβάνει: κατάλληλη προετοιμασία δείγματος (λύση ερυθρών ή Ficoll, φιλτράρισμα), χρώση πάνελ δεικτών, απόκτηση (acquisition) με ρυθμίσεις/ελέγχους,

και ανάλυση (gating/στατιστικά) με καταγραφή μεταδεδομένων και SOPs (Holl, Kapinsky & Larbi, 2025).

2.1.1 Συστήματα κυτταρομέτρου

Τα κυτταρόμετρα ροής περιέχουν τρία κύρια συστήματα: υδροδυναμικό, οπτικό και ηλεκτρονικό (Εικ. 2). Το σύστημα ρευστών μεταφέρει το δείγμα στην κυψέλη ροής όπου τα κύτταρα σχηματίζουν μονήρη ροή και διασχίζουν τη δέσμη λέιζερ. Περιλαμβάνει τις αντλίες που χρησιμοποιούνται για την αναρρόφηση του δείγματος που περιέχει κύτταρα/σωματίδια και τη σωλήνωση μέσω της οποίας τα κύτταρα/σωματίδια προωθούνται μέσω του κυτταρομέτρου. Μια ροή διαλύματος (ρευστό θήκης) που περιβάλλει το δείγμα έχει υψηλότερη πίεση, έτσι ώστε τα κύτταρα να σχηματίζουν ένα περίπου ενιαίο ρεύμα αρχείου λόγω του φαινομένου που ονομάζεται υδροδυναμική εστίαση. Τα κύτταρα ή τα σωματίδια σε ένα μόνη ροή μεταφέρονται μέσω του σημείου ανάκρισης όπου φωτίζονται από το φως από λέιζερ. Τελικά, το υγρό αποστραγγίζεται σε ένα δοχείο απορριμμάτων (Εικ. 2).



Εικ.2 Σχηματικό διάγραμμα του τρόπου λειτουργίας της κυτταρομετρίας ροής. Αφού ένα υγρό δείγμα με κύτταρα που έχουν σημανθεί με φθοριοχρώματα εγχυθεί σε ένα κυτταρόμετρο ροής, τα κύτταρα αναγκάζονται να σχηματίσουν μονήρη διάταξη μέσω υδροδυναμικής εστίασης. Τα κύτταρα σε μονήρη διάταξη στοχεύονται από δέσμη λέιζερ και τα οπτικά σήματα και τα σήματα φθορισμού κάθε κυττάρου παράγονται και ανιχνεύονται από κατάλληλους ανιχνευτές που μετατρέπουν τα φωτόνια σε ηλεκτρικούς παλμούς. Το ηλεκτρονικό σύστημα μετρά τους ηλεκτρικούς παλμούς και μετατρέπει αυτά τα σήματα σε ψηφιακές πληροφορίες που συλλέγονται και αναλύονται από συγκεκριμένο λογισμικό σε έναν υπολογιστή

Το οπτικό σύστημα αποτελείται από πηγές φωτός (λέιζερ), φακούς, φίλτρα και ανιχνευτές. Τα λέιζερ φωτίζουν τις κυσέλες ή τα σωματίδια και χρησιμοποιούνται διχρωμικοί καθρέφτες (DMs) και οπτικά φίλτρα (OFs) για να στείλουν τα προκύπτοντα φωτεινά σήματα στους κατάλληλους ανιχνευτές. Τα DM επιτρέπουν τη διέλευση φωτός καθορισμένων μηκών κύματος αλλά αντανακλούν το φως άλλων μηκών κύματος. Τα OF περιορίζουν περαιτέρω τα μήκη κύματος που φτάνουν σε έναν ανιχνευτή. Οι ανιχνευτές είναι είτε φωτοπολλαπλασιαστικοί σωλήνες (PMT) είτε συστοιχίες φωτοδιόδου (PDA), οι οποίες μετατρέπουν τα φωτόνια σε ηλεκτρικούς παλμούς. Στα πολυχρωματικά όργανα, κάθε φθοριόχρωμα ανιχνεύεται από ζεύγη φίλτρων/ανιχνευτών (PMTs/APDs) σε στενές ζώνες εκπομπής, ενώ στη Φασματική ΚΡ το όργανο συλλέγει ολόκληρα φάσματα σε σειρές καναλιών και χρησιμοποιεί αλγόριθμους αποσυμμείξης (unmixing) για τον διαχωρισμό συνεισφορών (Nolan, 2022; Robinson & Rajwa, 2024). Τα φασματικά όργανα διευκολύνουν τη χρήση περισσότερων δεικτών χωρίς υπέρμετρη αύξηση της αντιστάθμισης και προσφέρουν βελτιωμένο χειρισμό του αυτοφθορισμού σε μυελό/ιστούς (Robinson & Rajwa, 2024; Holl, Kapinsky & Larbi, 2025).

Το ηλεκτρονικό σύστημα εντοπίζει και αξιολογεί τους ηλεκτρικούς παλμούς που παράγονται από τους ανιχνευτές και μετατρέπει αυτά τα σήματα σε ψηφιακές πληροφορίες που συλλέγονται και αναλύονται από λογισμικό (Adan et al. 2017). Το σύστημα υπολογιστή διασυνδέεται με το κυτταρόμετρο ροής και ελέγχει τις λειτουργίες του. Η ανάλυση δεδομένων πραγματοποιείται είτε στον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος στο κυτταρόμετρο ροής είτε σε άλλους υπολογιστές που έχουν πρόσβαση στα δεδομένα.

Πρακτικά σημεία ρύθμισης περιλαμβάνουν:

- Βασικά κανάλια σκέδασης (FSC/SSC) ορίζουν το αρχικό gate κυττάρων/υποπληθυσμών (Adan et al., 2017).
- Επιλογή gain/PMT: στόχος «μεσαίας» έντασης για κυρίως θετικούς πληθυσμούς, ώστε να αποφεύγονται κορεσμοί και να διατηρείται δυναμικό εύρος (Holl, Kapinsky & Larbi, 2025).
- Ροή/ταχύτητα: υψηλές ταχύτητες αυξάνουν διπλά γεγονότα· προτιμάται σταθερό rate με events στόχο ανά σωλήνα ανάλογα με την ευαισθησία MRD (Heuser et al., 2021).

2.1.2 Δείγματα

Δείγματα κατάλληλα για ανάλυση ΚΡ περιλαμβάνουν περιφερικό αίμα (PB), μυελό των οστών ΒΜ, άλλα σωματικά υγρά, ορώδεις συλλογές, FNAs και φρέσκο μη σταθεροποιημένο ιστό. Εάν η παράδοση είναι μεγαλύτερη από 24 ώρες, τα δείγματα ιστού και ENY θα πρέπει να παραδοθούν με συσκευασίες υγρού πάγου. Τα δείγματα θα πρέπει να φυλάσσονται στους 4 °C σε ψυγείο εάν δεν δοκιμαστούν εντός 24 ωρών, αλλά δεν πρέπει ποτέ να καταψύχονται ή να παραδίδονται με ξηρό πάγο. Οι αναρροφήσεις PB και ΒΜ πρέπει να είναι αντιπηκτικές. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντιπηκτικά είναι το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) και η ηπαρίνη. Άλλα αντιπηκτικά όπως η κιτρική όξινη δεξτρόζη και το κιτρικό νάτριο δεν αποκλείουν τη μελέτη ΚΡ. Η προετοιμασία του δείγματος για ανάλυση ΚΡ ποικίλλει ανάλογα με τους τύπους δειγμάτων και τα αντιγόνα που πρόκειται να αναλυθούν. Το κυτταρικό εναιώρημα που δημιουργείται από ιστό θα πρέπει να διηθείται μέσω ενός φίλτρου κυττάρων 40- μ Μ ή 60- μ Μ για την απομάκρυνση μεγάλων σωματιδίων, τα οποία μπορεί να φράξουν τη σωλήνωση του κυτταρομέτρου ή/και να δεσμεύσουν τα αντισώματα μη ειδικά. Σε οποιοδήποτε δείγμα με μεγάλη ποσότητα PB, τα ερυθρά αιμοσφαίρια θα πρέπει να αφαιρεθούν μέσω μιας διαδικασίας λύσης με χρήση χλωριούχου αμμωνίου ή άλλου ρυθμιστικού διαλύματος λύσης πριν από την εκτέλεση του δείγματος σε ένα κυτταρόμετρο ροής.

2.1.3 Αντιδραστήρια/Πάνελ αντισωμάτων

Τα βασικά αντιδραστήρια για τις μελέτες ΚΡ είναι τα συζευγμένα με φθοριόχρωμα αντισώματα έναντι κυτταρικής επιφάνειας, κυτταροπλασματικών ή πυρηνικών αντιγόνων. Ο Πίνακας 1 παραθέτει τα αντιγόνα που αξιολογούνται συνήθως στην επεξεργασία αιματολογικών κακοήθων νεοπλασμάτων. Το πόσα αντισώματα και πόσα σωληνάρια θα τρέξουν για ένα δείγμα εξαρτώνται από την κλινική ένδειξη και τον τύπο του κυτταρομέτρου ροής που χρησιμοποιείται. Ένα κυτταρόμετρο ροής με περισσότερα λέιζερ μπορεί να αξιολογήσει περισσότερα αντιγόνα ταυτόχρονα. Διαγνωστικά πάνελ αντισωμάτων οκτώ έως δέκα χρωμάτων για αιματολογικά νεοπλάσματα χρησιμοποιούνται συνήθως σε πολλά κλινικά εργαστήρια επί του παρόντος στις Ηνωμένες Πολιτείες. Η ταυτόχρονη αξιολόγηση μεγάλου αριθμού αντιγόνων σε ένα σωληνάριο ελαχιστοποιεί την ποσότητα των χρησιμοποιούμενων δειγμάτων και αντιδραστηρίων και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανάλυση πενιχρών ή χαμηλών κυτταρικών δειγμάτων. Ο συνδυασμός αντισωμάτων σε ένα σωληνάριο θα πρέπει να είναι κατάλληλα σχεδιασμένος σύμφωνα με τα αντιγόνα στα κύτταρα που μας ενδιαφέρουν, τα χαρακτηριστικά φθοριοχρωμάτων και τον κλινικό σκοπό. Γενικά, το αντίσωμα έναντι ενός ασθενώς εκφραζόμενου αντιγόνου θα πρέπει να συζευχθεί με ένα φωτεινό φθορόχρωμα για να αυξηθεί η πιθανότητα αντίχνευσης αυτού του αντιγόνου. Η αντιστάθμιση χρώματος για την ελαχιστοποίηση της διαρροής μεταξύ διαφορετικών φθοριοχρωμάτων είναι εξαιρετικά σημαντική σε πολύχρωμους σωλήνες που περιέχουν πολλά αντισώματα επισημασμένα με φθορισμό. Για διαγνωστικούς σκοπούς, τα αντισώματα χρησιμοποιούνται συνήθως σε ορισμένους συνδυασμούς (πίνακες) για να απαντήσουν σε συγκεκριμένες ερωτήσεις σχετικά με έναν κυτταρικό πληθυσμό (Wood 2006). Τα πάνελ διαλογής θα πρέπει να αξιολογούν επαρκή αντιγόνα για να διακρίνουν έναν πληθυσμό νεοπλασματικών κυττάρων από φυσιολογικά/αντιδραστικά κύτταρα με υψηλό βαθμό ευαισθησίας. Τα αντισώματα που επισημαίνονται με ένα σύμβολο αστερίσκου (*) στον Πίνακα 1 συνιστώνται για την αρχική αξιολόγηση των αιματολογικών νεοπλασμάτων με βάση το Διεθνές Συνέδριο Συναίνεσης Bethesda του 2006 (Wood et al. 2007). Τα μονοκλωνικά αντισώματα των ανοσοθεραπειών συχνά εμποδίζουν τα διαγνωστικά συζευγμένα με φθοριόχρωμα αντισώματα να αναγνωρίσουν τα στοχευόμενα αντιγόνα. Ως εκ τούτου, είναι

σημαντικό να ληφθεί υπόψη η πιθανότητα ενός ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος που προκαλείται από πιθανή στοχευμένη θεραπεία και να σχεδιαστεί η ανάλυση ώστε να ελαχιστοποιηθεί αυτή η πιθανότητα προσθέτοντας έναν άλλο συγκεκριμένο δείκτη για τον ίδιο τύπο κυττάρου. Για παράδειγμα, αντισώματα έναντι του αντιγόνου των B-κυττάρων CD19 ή CD22 θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εκτός από το CD20 για την ταυτοποίηση B κυττάρων στον προσδιορισμό που πιθανότατα χρησιμοποιείται για ασθενείς με θεραπεία αντι-CD20.

Η επιλογή φθοριχρωμάτων βασίζεται σε φωταύγεια/σταθερότητα, αλληλεπικάλυψη φασμάτων και την έκφραση-στόχο. Στη Φασματική ΚΡ αξιοποιούνται μοναδικές φασματικές υπογραφές (π.χ. εκτεταμένες εκπομπές ή «μακριές ουρές»), αλλά παραμένει κρίσιμη η αποφυγή «συγκρουόμενων» συνδυασμών που προκαλούν spreading error (Nolan, 2022; Robinson & Rajwa, 2024). Η κλωνική συνέπεια αντισωμάτων και τα titrations ανά παρτίδα μειώνουν τη μεταβλητότητα (Holl, Kapinsky & Larbi, 2025).

Ακέραια προ-αναλυτικά βήματα (χρόνος από τη λήψη, θερμοκρασία, αντιπηκτικό, λύση ερυθρών, σταθεροποίηση, καθαρισμός debris/πλέγματα) καθορίζουν το background και την τελική ποιότητα. Ειδικά στην MRD, συνιστώνται επαρκή γεγονότα ($\geq 500k-1M$ /σωλήνα όπου εφικτό στην AML) και επιλογή σωστών δεικτών για LAIP/DfN στρατηγικές (Heuser et al., 2021; Tettero et al., 2022; Roshal & Gao, 2025).

Πίνακας 1: Αντιγόνα που αξιολογούνται συνήθως για τη διάγνωση αιματολογικών νεοπλασμάτων

From: Flow Cytometry in the Diagnosis of Hematological Neoplasms and Other Cancers

Antigens	Normal distribution	Clinical utility
CD1a	Immature T-cells, Langerhans cells	Diagnosing T-ALL/LBL and LCH
CD2* ^t	T-cells and NK cells	Diagnosing T/NK cell neoplasms and systemic mastocytosis; aberrantly expressed in AML
sCD3* ^t	T-cells (mostly mature)	Defining T-cell lineage, diagnosing T-cell neoplasms
cCD3	T-cells (mature and immature), NK cells (zeta and epsilon chains)	Defining T-cell lineage, diagnosing T-cell neoplasms
CD4* ^t	T-cell subset, monocytes, histiocytes/dendritic cells	Diagnosing T-cell neoplasms, BPCDN, AML with monocytic differentiation, histiocytic neoplasms
CD5 * ^b * ^t	T-cells and minor B-cell subset	Diagnosing T-cell neoplasms, and B-cell neoplasms; may be aberrantly expressed in AML
CD7* ^t	T-cells and NK cells	Diagnosing T/ NK-cell neoplasms; aberrantly expressed in AML, MDS, and MPN
CD8* ^t	T-cell subset and some NK cells	Diagnosing T/NK cell neoplasms
CD9	Precursor B-cells, activated T-cells, platelets	Abnormal expression in B-ALL/LBL, useful for B-ALL/LBL MRD detection
CD10* ^b	Immature and GC B-cells, immature T-cells, follicular helper T-cells and neutrophils	Diagnosing B-cell neoplasms (+ in B-ALL/LBL, GC B-cell lymphomas); Also + in FHT type mature T-cell lymphomas and some T-ALL/LBL cases; decreased on neutrophils in MDS
CD11b* ^m	Mature and maturing myelomonocytic cells, some lymphoid cells	Diagnosing myeloid neoplasms; may be aberrantly expressed in ALL
CD11c	Mature and maturing myelomonocytic cells, myeloid dendritic cells, some lymphoid cells	Diagnosing myeloid neoplasms, indicating monocytic lineage; diagnosing HCL (strongly+)
CD13* ^m	Myeloid and monocytic cells	Diagnosing myeloid neoplasms; may be aberrantly expressed in B-cell neoplasms (esp., B-ALL/LBL)
CD14* ^m	Monocytes	Diagnosing myeloid neoplasms, indicating monocytic lineage
CD15* ^m	Mature and maturing myelomonocytic cells	Diagnosing myeloid neoplasms; may be aberrantly expressed in B-ALL/LBL
CD16* ^m	Late-stage neutrophils, NK cells, some monocytes	Diagnosing myeloid neoplasms and T/NK cell neoplasms
CD19* ^b * ^p	All B-cells (including precursors and plasma cells)	Diagnosing B-cell neoplasms, indicating B-cell lineage
CD20* ^b	Mature and maturing B-cells (absent on early hematogones and most plasma cells)	Diagnosing B-cell neoplasms
CD22	Maturing and mature B-cells (absent on most plasma cells)	Diagnosing B-cell neoplasms, indicating B-cell lineage
CD23	Weakly expressed on resting B-cells and increased with activation	Diagnosing mature B-cell neoplasms (CLL/SLL: strongly +)
CD25	Activated B-cells and T-cells	Diagnosing B-cell neoplasms (HCL: +) and T-cell neoplasms (ATLL: uniformly strongly +; others: variably+), diagnosing systemic mastocytosis
CD26	Most CD4+ T-cells, immature T-cells, activated T-cells, NK cells	Diagnosing T-cell neoplasms (SS/MF commonly -)
CD30	Activated T-cells, B-cells, and monocytes	Diagnosing mature T/NK-cell neoplasms and B-cell neoplasms (e.g., strongly + in ALCL, + in CHL)
CD33* ^m	Myeloid and monocytic cells	Diagnosing myeloid neoplasms; may be aberrantly expressed in ALL
CD34* ^m	Myeloid and lymphoid precursors (blasts)	Diagnosing acute leukemia, enumeration of hematopoietic stem cells
CD36	Monocytes, erythroid cells, megakaryocytes, and platelets	Diagnosing acute leukemia
CD38* ^p	Plasma cells, blasts, normal GC B-cells, activated T- and B-cells, NK cells, monocytes	Diagnosing acute leukemia, and B-cell neoplasms; prognostic marker in CLL/SLL
CD41	Megakaryocytes and platelets	Indicating megakaryocytic differentiation, diagnosing acute megakaryoblastic leukemia
CD43	T-cells, myeloid precursors, monocytes, small B-cell subset	Diagnosing mature B-cell neoplasms
CD45* ^b * ^t * ^m * ^p	All leukocytes including most hematopoietic precursors	Gating (CD45 vs. SSC); diagnosis of leukemias and lymphomas
CD56* ^t * ^m * ^p	NK cells and NK-like T-cells	Indicating NK-cell differentiation; diagnosing acute leukemia, T/NK-cell neoplasms and BPCDN; aberrantly expressed in AML, MDS, and MPN
CD57	NK cells, subset of T-cells	Diagnosing mature T/NK-cell neoplasms
CD58	Hematopoietic and non-hematopoietic cells	Distinction of B-ALL from hematogones (increased in B-ALL), B-ALL MRD detection

CD61	Megakaryocytes and platelets	Indicating megakaryocytic differentiation, diagnosing acute megakaryoblastic leukemia
CD64	Monocytes, immature granulocytes, activated neutrophils	Diagnosing acute leukemia, indicating monocytic lineage
CD71	Erythroid precursors (bright), most proliferating cells of any type	Diagnosing acute leukemia, and myeloid neoplasms; identifying erythroid precursors
CD79a/b	B-cells (including precursors and plasma cells)	Diagnosing B-cell neoplasms, indicating B-cell lineage
CD103	Intramucosal T-cells, small B-cell subset	Diagnosing some mature B-cell or T-cell neoplasms (e.g., + in HCL and EATL)
CD117* ^m	Myeloid progenitors, mast cells	Identifying myeloblasts and mast cells; diagnosing AML, mastocytosis, and PCM
CD123	Basophils, plasmacytoid dendritic cells (bright), some blasts, monocytes	Diagnosing BPDCN, acute leukemia, and HCL
CD138	Plasma cells	Diagnosing plasma cell neoplasms
CD163	Monocyte, macrophage	Diagnosing monocytic/histiocytic neoplasms; indicating monocytic differentiation
CD200	Subsets of mature B-cells and T-cells	Diagnosing mature B-cell neoplasms (e.g., CLL/SLL: +, MCL: -)
CD235a	Erythroid precursors	Indicating erythroid lineage, diagnosing acute erythroid leukemia
BCL2	T-cells, most mature B-cells except GC B-cells	Diagnosing mature B-cell neoplasms (e.g., FL: +, BL: -)
FMC-7	B-cells	Diagnosing mature B-cell neoplasms (e.g., CLL/SLL: -, MCL: +)
HLA-DR* ^m	Myeloblasts, monocytes, all B-cells, activated T-cells, dendritic cells	Diagnosing acute leukemia and myeloid neoplasms
sK and sL* ^b	Mature B-cells	Diagnosing B-cell neoplasms, assessing clonality of mature B-cells
cK and cL	Plasma cells	Diagnosing plasma cell neoplasms, assessing clonality of plasma cells
cLysozyme	Monocytes	Diagnosing monocytic neoplasms, indicating monocytic lineage
cMPO	Mature and immature granulocytes, some myeloid blasts	Myeloid lineage defining marker, diagnosing acute myeloid leukemia
TdT	B-cell and T cell precursors	Diagnosing acute leukemia
TCR αβ	Mature T-cells in association with sCD3	Diagnosing T-cell neoplasms
TCR γδ	Mature T-cells in association with sCD3	Diagnosing T-cell neoplasms
TRBC1	Mature αβ T-cells in association with sCD3	Diagnosing mature T-cell neoplasms, assessing αβ T-cell clonality

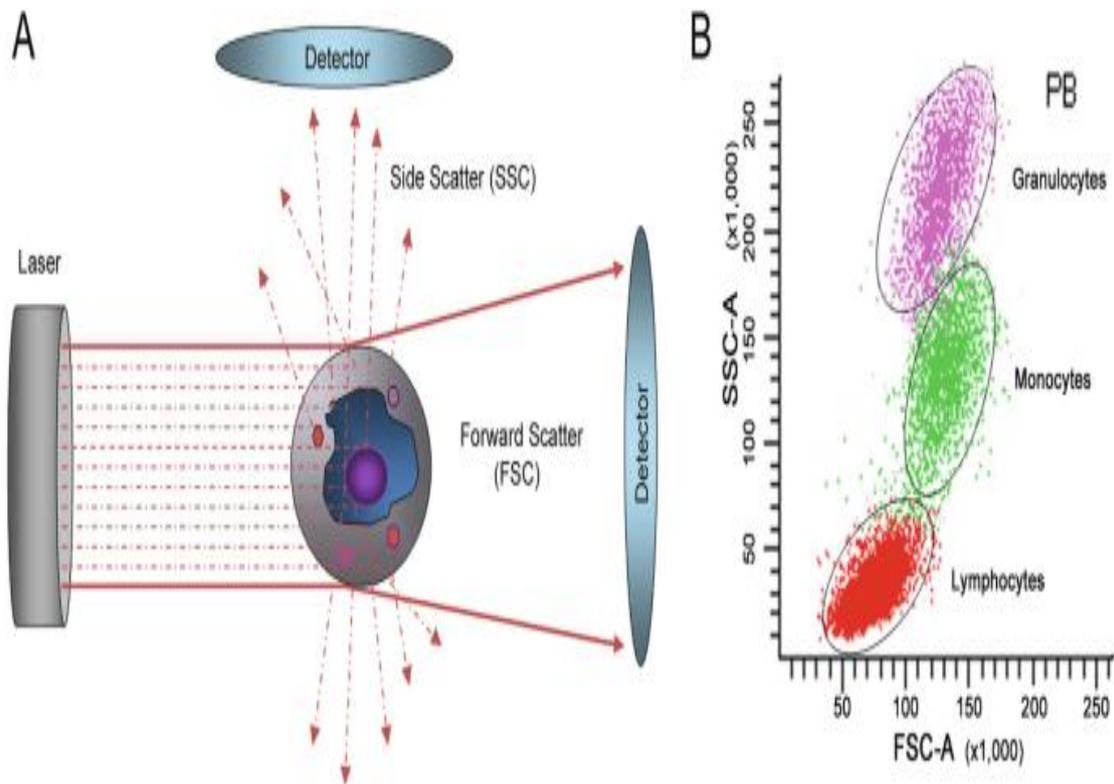
2.1.4 Απόκτηση Δεδομένων

Η απόκτηση δεδομένων είναι η διαδικασία συλλογής δεδομένων από τα χρωματισμένα κύτταρα καθώς αυτά διατρέχουν ένα κυτταρόμετρο ροής και φωτίζονται από το φως λέιζερ. Ο αριθμός των σωματιδίων/κυττάρων που απαιτούνται για την αξιολόγηση εξαρτάται από τον σκοπό της δοκιμής και τους χαρακτήρες του δείγματος. Για παράδειγμα, στην αξιολόγηση ενός δείγματος PB με κυρίως λευχαιμικά κύτταρα, ένας σχετικά χαμηλός αριθμός κυττάρων (π.χ. 20.000/σωληναρίου) που αποκτήθηκαν είναι αρκετός για να χαρακτηριστεί ο φαινότυπος της λευχαιμίας. Αντίθετα, η ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (MRD) απαιτεί συνήθως πολύ πιο βιώσιμα κύτταρα (π.χ. >500.000/σωλήνα) που αποκτώνται για να αυξηθεί η ευαισθησία για την ανίχνευση ενός πολύ μικρού πληθυσμού υπολειπόμενων νεοπλασματικών κυττάρων. Οι ποιοτικές μετρήσεις, όπως ο ανοσοφαινοτυπικός προσδιορισμός, συνήθως χρησιμοποιούν υψηλό ρυθμό ροής. Δεδομένου ότι τα κελιά είναι λιγότερο ευθυγραμμισμένα με υψηλότερο ρυθμό ροής, τα δεδομένα που συλλέγονται επιλύονται λιγότερο αλλά αποκτώνται ταχύτερα. Η ανάλυση DNA απαιτεί πολύ πιο αργό ρυθμό ροής για να αυξηθεί η ανάλυση.

2.1.5 Σήματα σκέδασης φωτός και φθορισμού

Η σκέδαση φωτός και ο φθορισμός είναι οι δύο τύποι σημάτων που παράγονται και συλλέγονται για ένα κύτταρο καθώς ταξιδεύει μέσω της δέσμης λέιζερ. Η σκέδαση φωτός χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των φυσικών ιδιοτήτων ενός κυττάρου. Η μπροστινή σκέδαση (FSC), το φως που σκεδάζεται σε χαμηλές γωνίες ως προς τη δέσμη λέιζερ, είναι ανάλογο με το μέγεθος της κυψέλης ή την επιφάνεια της κυψέλης (Εικ. 3α). Η πλευρική σκέδαση (SSC), το φως που διαθλάται και ανακλάται από τον πυρήνα του κυττάρου και/ή τα κυτταροπλασματικά οργανίδια, είναι ανάλογη με την κοκκοποίηση και την εσωτερική πολυπλοκότητα του κυττάρου (Εικ. 3α). Μαζί, τα σήματα FSC και SSC επιτρέπουν τον διαχωρισμό των κυττάρων σε ένα δείγμα που περιέχει ετερογενείς κυτταρικούς πληθυσμούς, π.χ. τρεις τύπους λευκοκυττάρων (κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα) σε PB που διαχωρίζονται εύκολα με βάση τους χαρακτήρες FSC και SSC (Εικ. 3b). Όταν ένα κύτταρο διασχίζει τη δέσμη λέιζερ, η φθορίζουσα χρωστική ουσία ή το φθορίζον χρώμα που συνδέεται με την

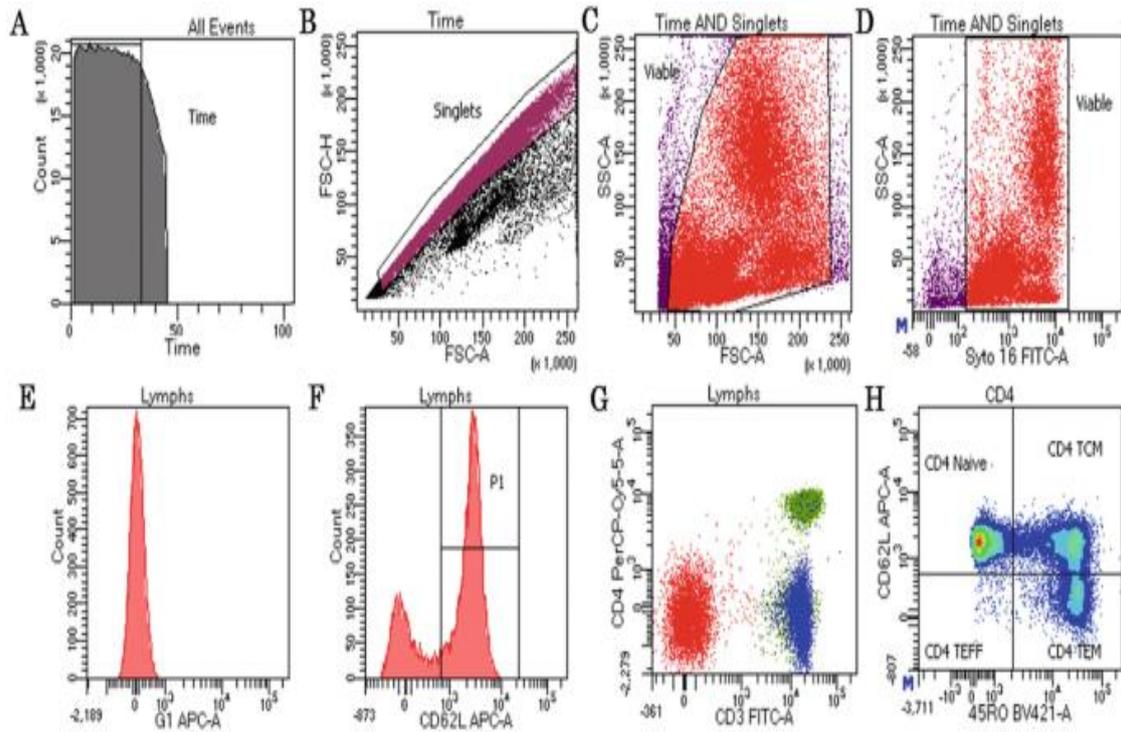
κυψέλη διεγείρεται από φως συγκεκριμένου μήκους κύματος (μήκος κύματος διέγερσης), στη συνέχεια απορροφά την ενέργεια, διεγείρεται και εκπέμπει φως (φθορισμό) σε μεγαλύτερο μήκος κύματος (μήκος κύματος εκπομπής). Σε ένα κυτταρόμετρο ροής, τα σήματα φθορισμού ανιχνεύονται από PMTs αφού φιλτραριστούν από DMs και OFs. Η ένταση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη με το επίπεδο έκφρασης του αντιγόνου, στο οποίο συνδέεται το αντίστοιχο σημασμένο με φθορισμό αντίσωμα.



Εικ.3 Φωτεινή σκέδαση κυττάρων. (α) Απεικόνιση της πρόσθιας σκέδασης φωτός (FSC) και της πλευρικής σκέδασης φωτός (SSC) μιας κυψέλης. (β) Διαφοροποίηση των λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος με βάση τις ιδιότητες πρόσθιας και πλευρικής σκέδασης.

2.2 Ανάλυση Δεδομένων με Κυτταρομετρία Ροής

Η ανάλυση δεδομένων με ΚΡ απαιτεί ειδικό λογισμικό σχεδιασμένο για αυτόν τον σκοπό. Κάθε κυτταρόμετρο ροής έχει συνήθως ένα σχετικό λογισμικό για την απόκτηση και ανάλυση δεδομένων. Ανεξάρτητο λογισμικό κυτταρομετρίας ροής, όπως το FCS Express και το FlowJo, με περισσότερες λειτουργίες, είναι επίσης διαθέσιμο στο εμπόριο. Τα δεδομένα κυτταρομετρίας ροής μπορούν να εμφανιστούν ως ιστογράμματα ή διαγράμματα κουκκίδων. Το ιστόγραμμα (Εικ. 4a , e , και f) χρησιμοποιείται για την εμφάνιση μιας μεμονωμένης παραμέτρου, ενώ η γραφική παράσταση με τελείες (Εικ. 4b – d , g και h) χρησιμοποιείται για την εμφάνιση δύο παραμέτρων και κάθε κουκκίδα συμβολίζει ένα κελί ή ένα σωματίδιο. Το FSC έναντι του SSC είναι μια γραφική παράσταση κουκκίδων που χρησιμοποιείται συχνά για τον διαχωρισμό των λευκών αιμοσφαιρίων στο PB σε λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και κοκκιοκύτταρα (Εικ. 4B). Άλλοι τύποι γραφημάτων για την εμφάνιση δεδομένων ΚΡ περιλαμβάνουν γραφήματα πυκνότητας (Εικ. 4h) και περιγράμματος, τα οποία εμφανίζουν δύο παραμέτρους συν μια τρίτη διάσταση ενός οπτικού χαρακτηρισμού του πληθυσμού των κυττάρων. Η εμφάνιση πολλαπλών (περισσότερων από δύο) παραμέτρων είναι επίσης διαθέσιμη με τη χρήση κάποιου λογισμικού. Ένα αντιγόνο ονομάζεται θετικό όταν το σχετικό φθορίζον σήμα του βρίσκεται πάνω από τον αρνητικό έλεγχο (σήμα φόντου). Δεδομένου ότι τα περισσότερα από τα δείγματα περιέχουν ετερογενείς κυτταρικούς πληθυσμούς, ο εσωτερικός αρνητικός έλεγχος βρίσκεται εύκολα και χρησιμοποιείται για τα περισσότερα αντιγόνα. Ωστόσο, λόγω της πιθανής διαφοράς στα επίπεδα μη ειδικής δέσμευσης και αυτοφθορισμού μεταξύ του κυτταρικού πληθυσμού ενδιαφέροντος και του εσωτερικού ελέγχου, ο εσωτερικός έλεγχος μπορεί να είναι παραπλανητικός. Η προσθήκη μη ειδικής Ig του ίδιου ισοτύπου μπορεί να λειτουργήσει ως καλύτερος αρνητικός έλεγχος και χρησιμοποιείται σε ορισμένες δοκιμές ΚΡ (Εικ. 4e και f). Άλλοι έλεγχοι περιλαμβάνουν έλεγχο αυτοφθορισμού (μη χρωματισμένο δείγμα) και φθορισμό μείον ένα (FMO). Ο έλεγχος FMO είναι ένας σωλήνας κυττάρων που έχουν χρωματιστεί με όλα τα συζευγμένα με φθοριοχρώμα αντισώματα εκτός από ένα και χρησιμοποιείται συνήθως για να ορίσει την έκφραση ενός αντιγόνου του οποίου η έκφραση αμφισβητείται ή είναι σημαντική για τη διάγνωση.



Εικ.4. Ανάλυση δεδομένων κυτταρομετρίας ροής. Τα δεδομένα κυτταρομετρίας ροής μπορούν να εμφανιστούν ως ιστογράμματα μιας παραμέτρου (a , e , f), διαγράμματα κουκκίδων δύο παραμέτρων (BD, G) ή γραφήματα πυκνότητας δύο παραμέτρων (h). Η συνοχή του συστήματος ρευστότητας μπορεί να ελεγχθεί με χρονικό ιστόγραμμα (a). Σημαντική πτώση του αριθμού συμβάντων υποδηλώνει φυσαλίδες αέρα ή άλλες παρεμβολές και τα δεδομένα αυτών των συμβάντων θα πρέπει να εξαιρεθούν. Τα συσσωματώματα κυττάρων μπορούν να εξαιρεθούν από το διάγραμμα κουκκίδων FSC-H έναντι FSC-A (b). Τα κυτταρικά υπολείμματα μπορούν να αποκλειστούν με διάγραμμα σημείων SSC-A έναντι FSC-A (c) ή χρησιμοποιώντας χρωστική δέσμευσης DNA Syto 16 (d). Η θετικότητα μιας έκφρασης αντιγόνου μπορεί να οριστεί χρησιμοποιώντας έλεγχο ισotyπου ανοσοσφαιρίνης, όπως μη ειδικό Ig-G1-APC (e) ως αρνητικό μάρτυρα για CD62L-APC (f) ή εσωτερικό μάρτυρα, όπως CD3-B-κύτταρα (κόκκινο) ως αρνητικό έλεγχο για CD4+ βοηθητικά T-κύτταρα (g). Η γραφική παράσταση πυκνότητας μπορεί να βοηθήσει στον διαχωρισμό των πληθυσμών κυττάρων προσθέτοντας μια τρίτη διάσταση ενός οπτικού χαρακτηρισμού των πληθυσμών κυττάρων (H: CD4 Naïve, πρωτογενή βοηθητικά T-κύτταρα, CD4 TCM, βοηθητικά T-κύτταρα κεντρικής μνήμης, CD4 TEM, T-κύτταρα τελεστικής μνήμης, CD4 TEFF, βοηθητικά T-κύτταρα τερματικού τελεστή).

Το ηλεκτρονικό παράθυρο – στρατηγική των οριοθετήσεων/Gating αναφέρεται στη διαδικασία απομόνωσης κυτταρικών πληθυσμών μέσα σε ένα ετερογενές δείγμα κυττάρων. Το πρώτο βήμα πύλης είναι η αξιολόγηση της ποιότητας των δειγμάτων και ο αποκλεισμός των κυτταρικών συσσωματωμάτων και των κυτταρικών υπολειμμάτων. Η συνοχή του συστήματος ρευστών μπορεί να αξιολογηθεί με ιστόγραμμα αριθμού κυττάρων σε σχέση με το χρόνο (Εικ. 4a). Η πτώση του αριθμού κυψελών σε ένα χρονικό σημείο μπορεί να υποδηλώνει την παρουσία φυσαλίδων αέρα ή άλλης παρεμβολής, η οποία μπορεί να επηρεάσει τα σήματα που συλλέγονται εκείνη τη στιγμή. Τα κυτταρικά συσσωματώματα μπορούν να προκαλέσουν ψευδώς μη φυσιολογικό κυτταρικό φαινότυπο από δύο ή περισσότερα κύτταρα κολλημένα μεταξύ τους και θα πρέπει να εξαιρεθούν με διάγραμμα κουκίδων FSC-A έναντι FSC-H (Εικ. 3β) ή άλλη στρατηγική. Τα κυτταρικά υπολείμματα μπορούν επίσης να δώσουν ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα λόγω της μη ειδικής δέσμευσης με αντισώματα ή της προσκόλλησης στην επιφάνεια του κυττάρου και θα πρέπει να αποκλειστούν χρησιμοποιώντας γραφική παράσταση κουκίδων SSC-A έναντι FSC-A (Εικ. 3c) ή προσθέτοντας χρωστική δέσμευσης DNA (Εικ. 3d). Τα επόμενα βήματα πύλης είναι ο διαχωρισμός των κυττάρων σύμφωνα με τα φυσικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους και η αναζήτηση του μη φυσιολογικού κυτταρικού πληθυσμού. Επειδή τα φυσιολογικά λευκοκύτταρα και οι αιμοποιητικές πρόδρομες ουσίες τυπικά παρουσιάζουν συνεπή και αναπαραγωγίμα μοτίβα στο διάγραμμα σημείων SSC έναντι CD45, η πύλη SSC έναντι CD45 είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αρχικό βήμα για τον διαχωρισμό διαφορετικών πληθυσμών κυττάρων αίματος ή μυελού των οστών. Ένας μη φυσιολογικός κυτταρικός πληθυσμός προσδιορίζεται με βάση τη διαφορά του φαινοτύπου του από τον φυσιολογικό. Για να εκτιμηθούν οι ανωμαλίες, οι κυτταρομετρητές ροής πρέπει να είναι εξοικειωμένοι με το φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης αντιγόνου όλων των πληθυσμών κυττάρων στο δείγμα (Li et al. 2021).

Είναι πολύ σημαντικό να εκτελείται μια πρακτική αυστηρής διασφάλισης ποιότητας (QA) και να διατηρείται η συνέπεια στα δεδομένα έντασης φθορισμού. Τα μέτρα ποιοτικού ελέγχου (QC) πρέπει να εκτελούνται και να τεκμηριώνονται τακτικά για να διασφαλίζεται η βέλτιστη απόδοση του οργάνου. Οποιαδήποτε αλλαγή στα αντιδραστήρια, τους πίνακες, τα όργανα ή τα πρωτόκολλα πρέπει να επικυρώνεται προσεκτικά. Τα κλινικά εργαστήρια ΚΡ θα πρέπει να εγγραφούν στα διαθέσιμα

προγράμματα δοκιμών επάρκειας για τις δοκιμές που εκτελούν για να βεβαιωθούν ότι τα αποτελέσματά τους είναι συγκρίσιμα με άλλα.

Στα πολυχρωματικά συστήματα, η αντιστάθμιση (compensation) διορθώνει «διαρροές» μεταξύ καναλιών βάσει matrix single-stain controls· ωστόσο αυξάνει την διασπορά και απαιτεί αυστηρή επαλήθευση (Adan et al., 2017). Στα φασματικά συστήματα, ο αλγόριθμος unmixing αποσυνθέτει το πλήρες φάσμα κάθε γεγονόςτος και μπορεί να μοντελοποιεί ξεχωριστά τον αυτοφθορισμό (Nolan, 2022; Robinson & Rajwa, 2024). Στην πράξη, σωστά reference controls ανά παρτίδα/ημέρα είναι καθοριστικά για αναπαραγωγιμότητα (Holl, Kapinsky & Larbi, 2025).

Συνεπής καθημερινός έλεγχος (beads ευθυγράμμισης/σταθερότητας, παρακολούθηση drift PMTs), γνώριμα SOPs για χρώση/πλύσεις/αποκτήσεις και τεκμηρίωση μεταδεδομένων (ημερομηνία, παρτίδες, ρυθμίσεις) αποτελούν τον κορμό της τυποποίησης (Davis et al., 2007; Wood et al., 2007; Holl, Kapinsky & Larbi, 2025). Για διαγνωστικές εφαρμογές, η έκθεση αποτελεσμάτων οφείλει να είναι δομημένη (δείγμα, πάνελ, gating strategy, thresholds, ευαισθησία/LoD, συμπέρασμα) και να ευθυγραμμίζεται με WHO/ICC ορολογία για οντότητες/υποτύπους (Khoury et al., 2022; Arber et al., 2022).

Τέλος, η χρήση υπολογιστικών εργαλείων (π.χ. mixture models, auto-gating/AGI, UMAP/FlowSOM ως υποστηρικτικά) μπορεί να βελτιώσει την αναπαραγωγιμότητα και να μειώσει τη μεροληψία παρατηρητή, υπό την προϋπόθεση επικύρωσης και κλινικής ερμηνείας από ειδικό (Mocking et al., 2024; Holl, Kapinsky & Larbi, 2025).

2.4 Κυτταρομετρία Νέας Γενιάς

Η παραδοσιακή κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιεί περιορισμένο αριθμό φθοριοχρωμάτων, λόγω της αλληλοεπικάλυψης των εκπομπών φωτός (spectral overlap). Παρόλο που η μέθοδος ήταν εξαιρετικά χρήσιμη για τη μελέτη του κυτταρικού ανοσοφαινότυπου και την ανίχνευση αιματολογικών κακοηθειών, η ανάλυση μεγάλου αριθμού παραμέτρων ήταν δύσκολη.

Οι εξελίξεις στην κυτταρομετρία ροής έχουν οδηγήσει σε νέες τεχνολογίες που ξεπερνούν αυτούς τους περιορισμούς. Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί σήμερα μια από τις πιο καινοτόμες και απαραίτητες μεθόδους στη διάγνωση και παρακολούθηση των αιματολογικών κακοηθειών, με την τεχνολογία νέας γενιάς να διευρύνει συνεχώς τους ορίζοντές της. Οι βασικές βελτιώσεις περιλαμβάνουν μια σειρά νέων τεχνολογιών που αναλύονται στις παρακάτω υποενότητες.

2.4.1 Κυτταρομετρία Φάσματος (Spectral Flow Cytometry)

Αντί για μεμονωμένους ανιχνευτές για κάθε φθοριοχρώμα, χρησιμοποιείται ένα σύστημα που καταγράφει ολόκληρο το φάσμα εκπομπής. Αυτό επιτρέπει την ταυτόχρονη χρήση δεκάδων φθοριοχρωμάτων, αυξάνοντας σημαντικά τον αριθμό των παραμέτρων που μπορούν να αναλυθούν. Η κυτταρομετρία φάσματος δεν αναιρεί τις αρχές της συμβατικής κυτταρομετρίας ροής, αλλά τις επεκτείνει επιχειρησιακά.

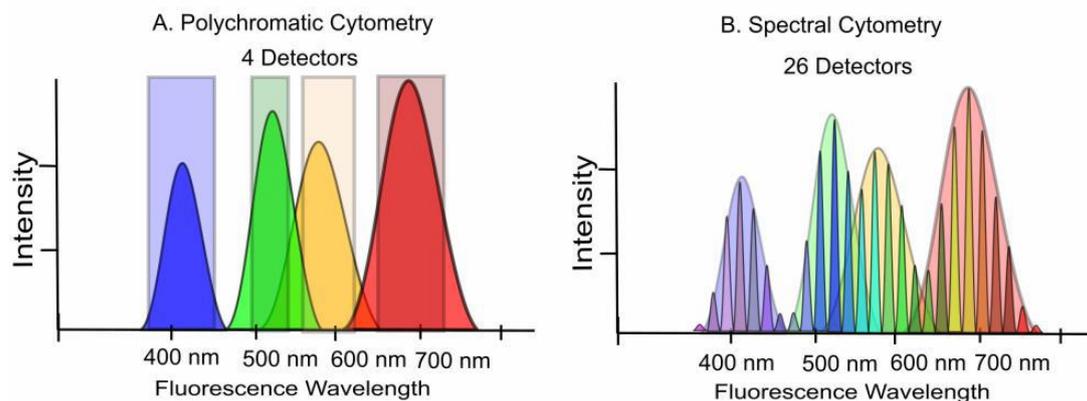
Η φασματική ανάλυση επιτρέπει την απομάκρυνση της αλληλοεπικάλυψης μέσω σύνθετων μαθηματικών αλγορίθμων. Ο σχεδιασμός πάνελ στοχεύει στη μέγιστη διακριτική ικανότητα με ελάχιστη αλληλοπαρεμβολή και ελεγχόμενη διασπορά σφάλματος (spreading) (Adan et al., 2017). Σε πολυχρωματική ΚΡ, η τοποθέτηση δεικτών σε κανάλια υψηλής/χαμηλής φωταύγειας γίνεται με βάση την ένταση έκφρασης και τις επικαλύψεις φασμάτων· κρίσιμο είναι οι ασθενείς στόχοι να «φοριούνται» σε λαμπρά χρώματα και οι ισχυροί σε πιο «στενά» ή ασθενή (Adan et al., 2017).

Στη Φασματική ΚΡ, το πάνελ επωφελείται από τις μοναδικές φασματικές υπογραφές και το unmixing, που επιτρέπει περισσότερους ταυτόχρονους δείκτες και καλύτερη διαχείριση αυτοφθορισμού—παρ' όλα αυτά, ο κανόνας «σωστός δείκτης στο σωστό κανάλι» παραμένει (Nolan, 2022; Robinson & Rajwa, 2024; Holl, Kapinsky & Larbi, 2025).

Σήμερα χρησιμοποιούνται δύο μορφές κυτταρομετρίας ροής με βάση τον φθορισμό. Η μία αποτελεί τον κύριο πυλώνα του πεδίου τα τελευταία 45 χρόνια και ονομάζεται γενικά πολυχρωματική κυτταρομετρία ροής. Βασίζεται στην αρχή της χρήσης ενός ειδικού αισθητήρα για κάθε χρωστική.

Η εναλλακτική λύση είναι η κυτταρομετρία φάσματος ροής, ή κυτταρομετρία φάσματος, η οποία εφαρμόστηκε για πρώτη φορά πρακτικά το 2004 (Robinson, 2004; Robinson et al., 2004; Robinson et al., 2005a; Robinson et al., 2005b; Grégori et al., 2012; Nolan, 2022), η οποία χρησιμοποιεί μια μεγάλη τράπεζα ανιχνευτών για τη συλλογή όλων των σημάτων φθορισμού σε ολόκληρη την έκταση του φάσματος (Εικ.5). Η κυτταρομετρία φάσματος προσφέρει διακριτά πλεονεκτήματα, καθώς χρησιμοποιεί πολλαπλούς αισθητήρες για τη σύλληψη του πλήρους σήματος φθορισμού από όλες τις χρωστικές, χωρίς την ανάγκη απομόνωσης της κυρίαρχης φασματικής ζώνης από έναν μεμονωμένο ανιχνευτή (Novo, 2022; Novo et al., 2013). Η προσέγγιση αυτή περιλαμβάνει τη χρήση μεγαλύτερου αριθμού ανιχνευτών σε σύγκριση με τον αριθμό των χρησιμοποιούμενων χρωστικών ουσιών, με αποτέλεσμα πολλαπλές αναπαραστάσεις εντός του συνόλου δεδομένων.

Η Φασματική ΚΡ καταγράφει ολόκληρα φάσματα εκπομπής ανά γεγονός σε πολλά κανάλια και, αντί να «κόβει» στενές ζώνες, εφαρμόζει αλγόριθμο unmixing για να αποσυνθέσει τις συνεισφορές κάθε χρωστικής. Αυτό επιτρέπει περισσότερους ταυτόχρονους δείκτες, καλύτερη διαχείριση επικαλύψεων και πιο ρεαλιστική μοντελοποίηση του αυτοφθορισμού (AF) (Nolan, 2022; Robinson & Rajwa, 2024). Μελέτες/ανασκοπήσεις επιβεβαιώνουν ότι τα φασματικά όργανα βελτιώνουν την εκμετάλλευση χαμηλών σημάτων και τη σταθερότητα σε πολυκεντρικά περιβάλλοντα, εφόσον τηρούνται SOPs και reference controls (Holl, Kapinsky & Larbi, 2025; Astakhova et al., 2025).



Εικ.5 Σύγκριση μεταξύ πολυχρωματικής κυτταρομετρίας (Α) και φασματικής κυτταρομετρίας (Β). Στο (Α), το φθορισμός από κάθε χρωστική συλλέγεται από έναν μόνο ανιχνευτή, ενώ στο (Β) χρησιμοποιούνται πολλοί ανιχνευτές για να συλλέγουν ολόκληρο το φάσμα όλων των χρωστικών ουσιών, επιτρέποντας μια διαδικασία που ονομάζεται φασματική ανάμειξη που μπορεί να αναγνωρίσει κάθε χρωστική.

Η τεχνική πρόκληση της πολυχρωματικής κυτταρομετρίας έγκειται στα επικαλυπτόμενα σήματα των χρωστικών με ευρύ φάσμα και τη δυσκολία διαχωρισμού των σημάτων αυτών (Roederer, 2001). Η έξοδος του αισθητήρα είναι ανακριβής ως προς την αναφορά του πραγματικού σήματος από ένα φθορισμό, με αποτέλεσμα την εσφαλμένη αναφορά της έντασης του επισημασμένου δείκτη. Η μόνη λύση είναι η αντιστάθμιση της φασματικής με μαθηματική εκτίμηση των πραγματικών τιμών. Διαδικασίες αντιστάθμισης πραγματοποιούνται συχνά χειροκίνητα αντί της χρήσης αυτοματοποιημένων αλγορίθμων, οδηγώντας σε ασυνέπειες. Αυτό δημιουργεί δυσκολίες κατά την προσπάθεια αναπαραγωγής της ίδιας ανάλυσης σε διαφορετικές περιπτώσεις με απόλυτη ακρίβεια. Ενώ η κυτταρομετρία φάσματος ροής εξακολουθεί να αντιμετωπίζει προβλήματα με τη φασματική επικάλυψη λόγω της πολυπλοκότητας της φασματικής ανάμειξης, εκτελείται πάντοτε με αυτοματοποιημένο και, κατά συνέπεια, αναπαραγωγίμο τρόπο. Παραδόξως, αυτό ενισχύει την ευρωστία της ανάλυσης δεδομένων και διασφαλίζει ότι οι αναλύσεις εκτελούνται με συνέπεια.

Το unmixing απαιτεί μονοχρωματικά reference για κάθε χρωστική, καταγεγραμμένα με ταυτόσημες ρυθμίσεις (laser power, gains, φίλτρα) και κατά προτίμηση με το ίδιο

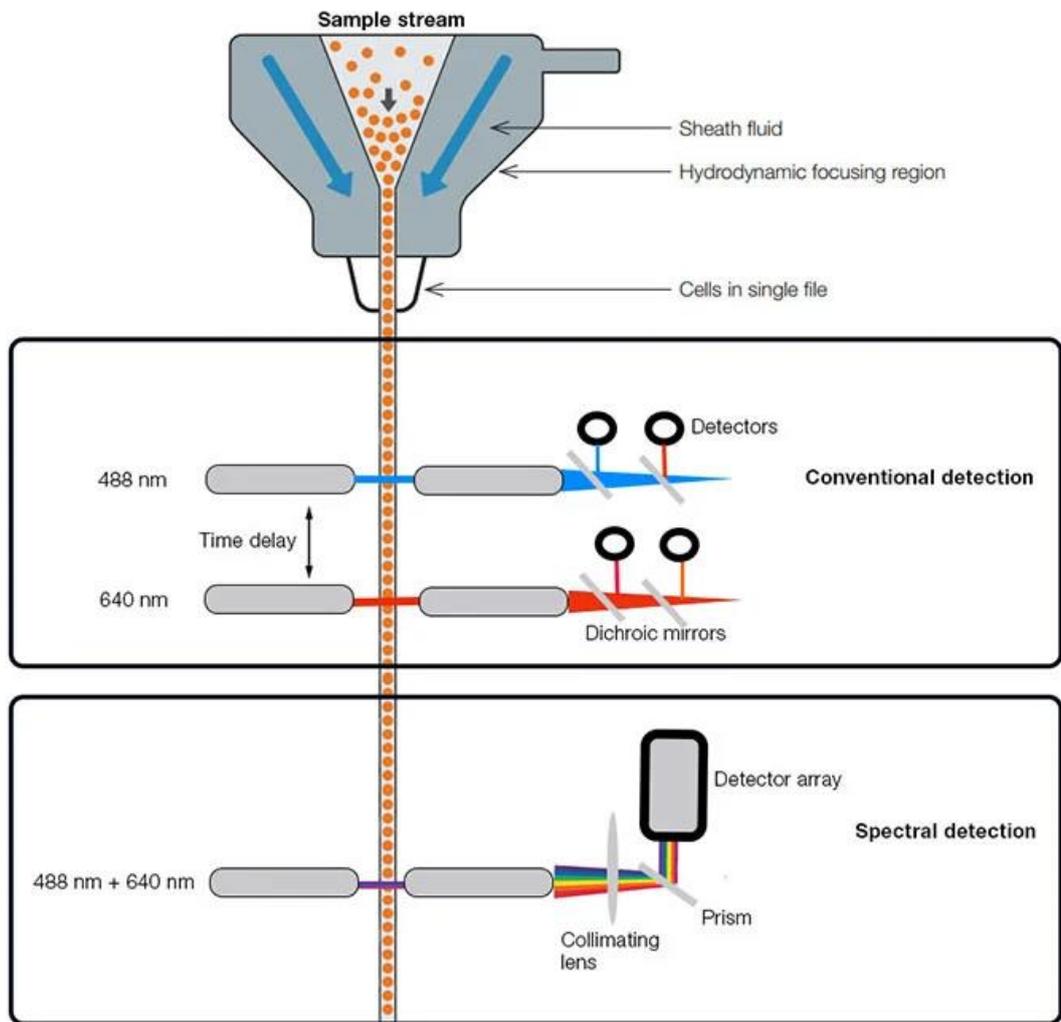
βιολογικό υπόβαθρο (π.χ. ίδιας προετοιμασίας/λύσης ερυθρών) ώστε το φάσμα να αντικατοπτρίζει το πραγματικό περιβάλλον (Robinson & Rajwa, 2024). Συνιστώνται:

- Reference ανά παρτίδα/ημέρα και μετά από κάθε σημαντική αλλαγή οργάνου.
- Έλεγχος residuals του μοντέλου unmixing· αυξημένα residuals υποδηλώνουν κακή αντιστοίχιση reference ή «διαρροές» (Nolan, 2022; Astakhova et al., 2025).
- Χρήση cross-stain checks (π.χ. γνωστός αρνητικός πληθυσμός) για να επιβεβαιώνεται ότι το «ξεμίξιμο» δεν εισάγει ψευδο-θετικά.

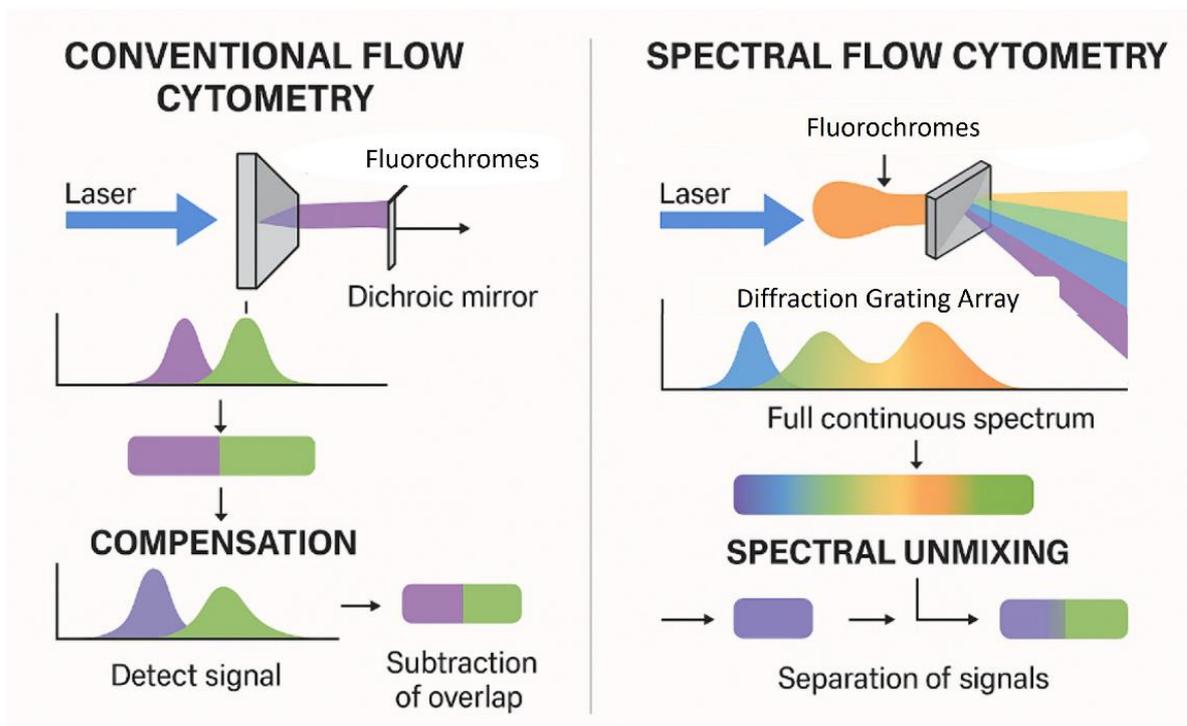
Συνήθως, η διαδικασία ανάμιξης υποβοηθείται από μια βάση δεδομένων που περιέχει τη μοναδική ονομασία κάθε χρωστικής, επιτρέποντας τον προσδιορισμό των συστατικών μερών του μεικτού σήματος. Γενικά η αρχή της μεθόδου παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.

Παρότι η Φασματική ΚΡ «αντέχει» περισσότερους δείκτες, ο κανόνας τοποθέτησης παραμένει: αμυδροί στόχοι → «καθαρά» φασματικά ίχνη/λαμπρές χρωστικές· ισχυροί στόχοι → «στενότερες» επιλογές. Αποφεύγουμε φασματικά παραπλήσιες χρωστικές στον ίδιο κρίσιμο άξονα gating και αξιοποιούμε μοναδικές υπογραφές (Nolan, 2022; Robinson & Rajwa, 2024). Για MRD πάνελ, ορίζονται LAIP/DfN κρίσιμοι δείκτες και εξασφαλίζονται επαρκή γεγονότα/σωλήνα (Heuser et al., 2021; Theunissen et al., 2017).

A.



B.

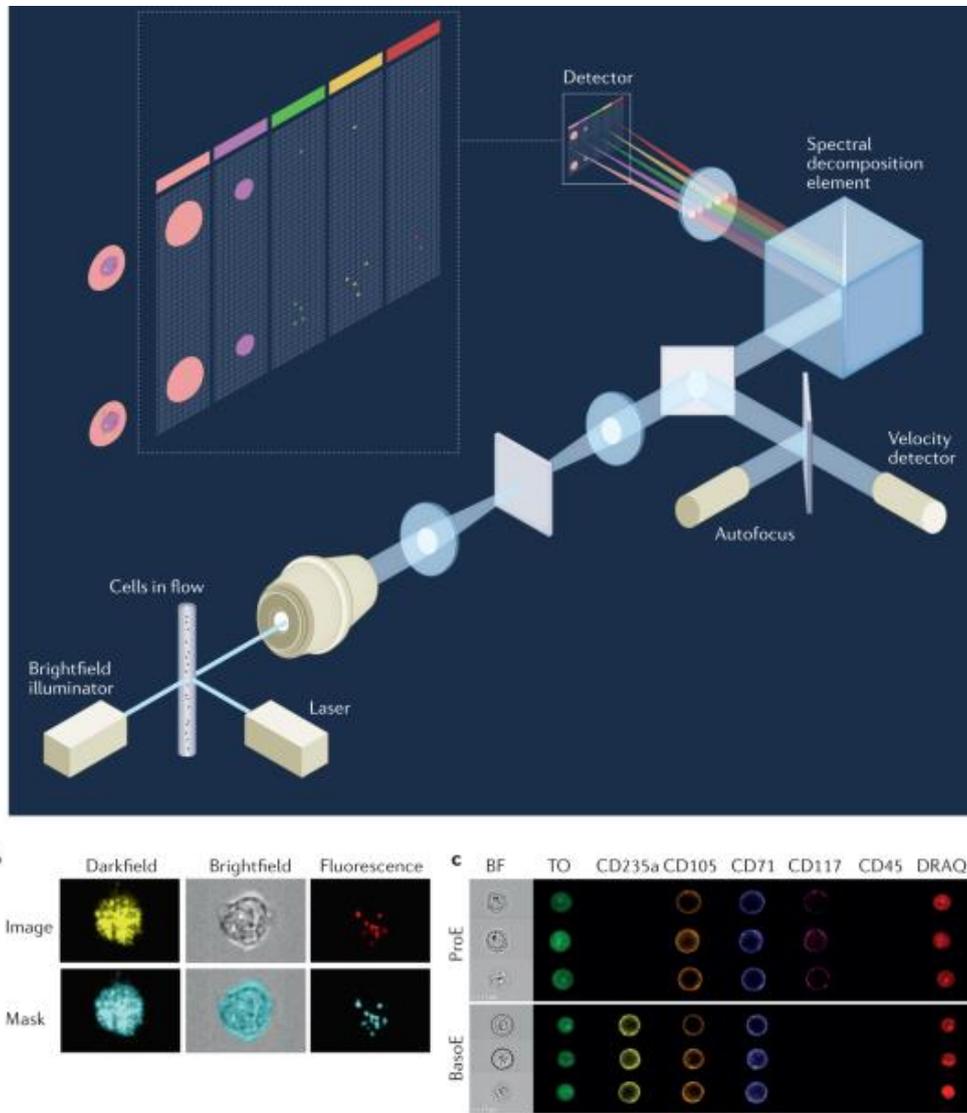


Εικ. 6. Αρχή λειτουργίας της φασματικής/πλήρους φάσματος κυτταρομετρίας ροής. Α. Σε αντίθεση με την κλασική κυτταρομετρία ροής, όπου κάθε φθοριόχρωμα ανιχνεύεται μέσω μεμονωμένων φίλτρων, η κυτταρομετρία φάσματος καταγράφει το πλήρες φάσμα εκπομπής κάθε φθοριοχρώματος σε πολλαπλούς ανιχνευτές. Β. Η υπολογιστική αποσύζευξη (spectral unmixing) επιτρέπει τη διάκριση φθοριοχρωμάτων με επικαλυπτόμενα φάσματα και τη χρήση πάνελ υψηλής πολυπλεξίας σε ενιαίο σωλήνα, βελτιώνοντας την ανάλυση ανοσοφαινότυπου και τη μέτρηση μετρήσιμης υπολειπόμενης νόσου (MRD) (Τροποποιημένη από Nolan et al.2013).

2.4.2 Κυτταρομετρία Ροής Εικόνας (Imaging Flow Cytometry, IFC/ImFC)

Η κυτταρομετρία ροής εικόνας (Imaging Flow Cytometry, IFC/ImFC) αποτελεί υβριδική τεχνολογία που συνδυάζει την υψηλή διαμεταγωγή της κλασικής κυτταρομετρίας ροής με την πληροφορία μορφολογίας που παρέχει η μικροσκοπία. Σε αντίθεση με την κλασική ροή, όπου η μέτρηση βασίζεται σε ολοκληρωμένες εντάσεις φθορισμού/σκέδασης, στην IFC κάθε κύτταρο καταγράφεται ως σύνολο εικόνων (π.χ. brightfield και πολλαπλά κανάλια φθορισμού), επιτρέποντας ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση τόσο της έκφρασης δεικτών όσο και χωρικών/μορφολογικών χαρακτηριστικών (μέγεθος, σχήμα, υφή, εντοπισμός σήματος, συν-εντοπισμός). Dimitriadis et al., 2024; Rees, 2022; Han et al., 2016. Μία σύνοψη της τεχνολογίας δίνεται στην εικόνα 7.

Κεντρικό πλεονέκτημα της IFC είναι ότι «μεταφράζει» μικροσκοπικές έννοιες (π.χ. πυρηνική μετατόπιση πρωτεϊνών, σχηματισμός σωμάτων/συμπλεγμάτων, μορφολογία πυρήνα) σε αντικειμενικές μετρήσεις μεγάλης κλίμακας. Η ανάλυση βασίζεται σε διαδικασίες τμηματοποίησης/ορισμού περιοχών ενδιαφέροντος (“masks”) και εξαγωγής χαρακτηριστικών από τις εικόνες (π.χ. δείκτες εντοπισμού, co-localization, texture), μειώνοντας την υποκειμενικότητα της κλασικής μικροσκοπικής εκτίμησης και αυξάνοντας τη στατιστική ισχύ (λόγω μεγάλου αριθμού κυττάρων). Dimitriadis et al., 2024; Rees, 2022.



Εικ.7 Αρχή λειτουργίας της κυτταρομετρίας ροής εικόνας (Imaging Flow Cytometry). Η κυτταρομετρία ροής εικόνας συνδυάζει την ανάλυση υψηλής διαμεταγωγής της κυτταρομετρίας ροής με απεικόνιση τύπου μικροσκοπίας, καταγράφοντας για κάθε κύτταρο εικόνες *brightfield* και πολλαπλών καναλιών φθορισμού. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση ανοσοφαινοτυπικών δεικτών και μορφολογικών ή χωρικών χαρακτηριστικών, όπως ο υποκυττάριος εντοπισμός πρωτεϊνών και οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις, που δεν μπορούν να αποτυπωθούν με τη συμβατική κυτταρομετρία ροής (Τροποποιημένη από Rees et al. 2022).

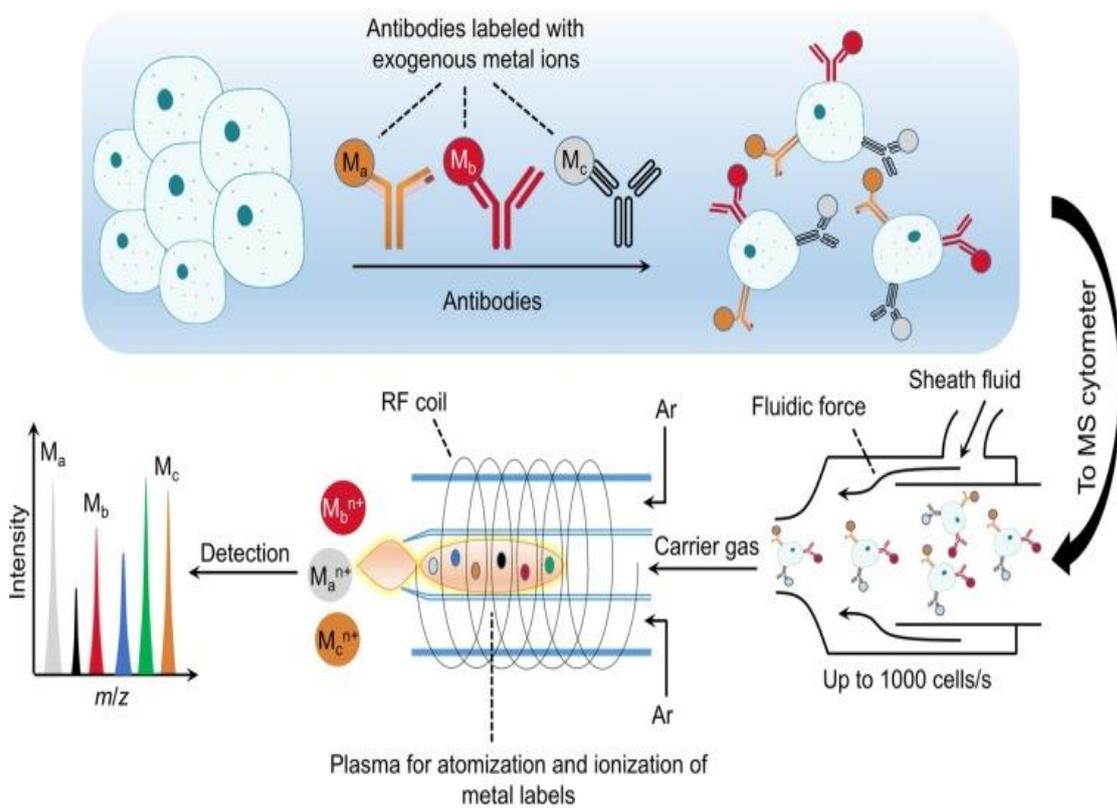
Στο πεδίο των αιματολογικών κακοηθειών, η IFC έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον όταν το διαγνωστικό/βιολογικό σήμα δεν είναι μόνο «πόσο» εκφράζεται ένας δείκτης, αλλά «πού» εντοπίζεται. Ενδεικτικά, έχουν περιγραφεί εφαρμογές που αξιοποιούν την IFC για ανάλυση υποκυτταρικής κατανομής πρωτεϊνών σχετικών με AML/APL, όπως (α) ανάλυση προτύπων PML σε οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία και (β) ανίχνευση κυτταροπλασματικής έκφρασης NPM1 ως ανοσοφαινοτυπικού-μορφολογικού δείκτη που σχετίζεται με μεταλλάξεις NPM1 σε AML. Grimwade et al., 2011; Grimwade et al., 2012.

Παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματα, η IFC συνοδεύεται από προκλήσεις που σχετίζονται με (i) τον αυξημένο όγκο δεδομένων/απαιτήσεις αποθήκευσης και υπολογιστικής ανάλυσης, (ii) την ανάγκη για σαφώς ορισμένα και αναπαραγώγιμα μέσα πληροφορίας τμηματοποίησης/feature extraction, και (iii) τη σχετική μείωση της διαμεταγωγής σε σχέση με την κλασική ροή, ιδίως όταν απαιτείται υψηλή ποιότητα εικόνας. Ως εκ τούτου, η κλινική της ενσωμάτωση προϋποθέτει τυποποίηση πρωτοκόλλων και σαφή κριτήρια ποιότητας, ώστε τα μορφολογικά/χωρικά metrics να είναι συγκρίσιμα μεταξύ εργαστηρίων. Dimitriadis et al., 2024; Rees, 2022.

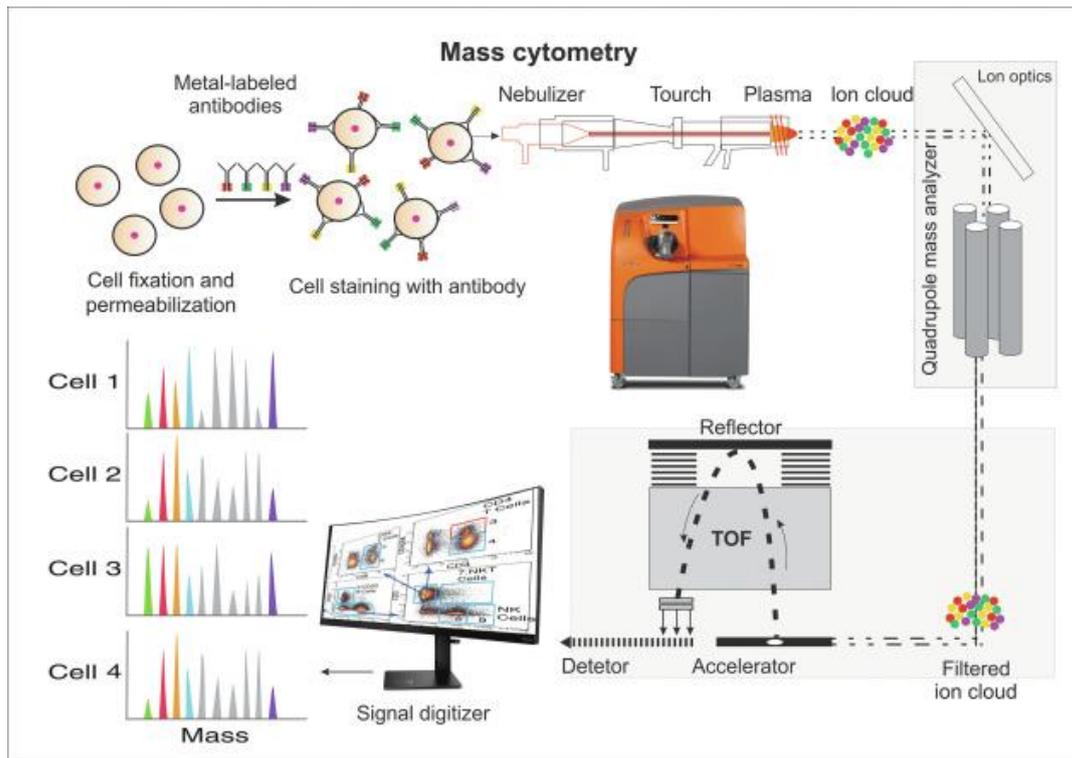
2.4.3 Κυτταρομετρία Μάζας (Mass Cytometry / CyTOF)

Η κυτταρομετρία μάζας (mass cytometry, συχνά ως CyTOF) επεκτείνει την έννοια της πολυπαραμετρικής κυτταρομετρίας, αντικαθιστώντας τα φθοριοχρώματα με ισοτοπικές “ετικέτες” βαρέων μετάλλων που συζεύγνυνται σε αντισώματα. Τα κύτταρα εισάγονται σε πλάσμα (ICP), ιονίζονται και οι ισοτοπικοί δείκτες ανιχνεύονται με φασματομετρία μάζας χρόνου πτήσης (TOF). Έτσι, επιτυγχάνεται ταυτόχρονη μέτρηση πολύ μεγάλου αριθμού παραμέτρων ανά κύτταρο με ελάχιστη φασματική επικάλυψη σε σχέση με τη φθορίζουσα ροή. Bandura et al., 2009; Spitzer & Nolan, 2016. Η αρχή της μεθόδου συνοψίζεται στην εικόνα 8.

Σε επίπεδο ροής εργασίας, η μέθοδος επιτρέπει (όπου εφαρμόζεται) barcoding δειγμάτων, κοινή επεξεργασία/χρώση και στη συνέχεια υπολογιστική αποσύζευξη των δειγμάτων, περιορίζοντας τεχνικές αποκλίσεις μεταξύ tubes/runs. Η mass cytometry είναι ιδιαίτερα ισχυρή σε εφαρμογές όπου απαιτείται ταυτόχρονη αποτύπωση: (i) λεπτομερούς ανοσοφαινοτύπου, (ii) λειτουργικής κατάστασης κυττάρων (π.χ. φωσφοπρωτεϊνικά μονοπάτια), και (iii) πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων όγκου-μικροπεριβάλλοντος σε κλινικά δείγματα. Spitzer & Nolan, 2016; Behbehani et al., 2017.



Trends in Biotechnology



Εικ. 8. Αρχή λειτουργίας της κυτταρομετρίας μάζας (CyTOF).

Στην κυτταρομετρία μάζας, τα αντισώματα επισημαίνονται με σταθερά ισότοπα βαρέων μετάλλων αντί για φθοριοχρώματα. Τα κύτταρα ιονίζονται σε πλάσμα και τα ισότοπα ανιχνεύονται με φασματομετρία μάζας χρόνου πτήσης (time-of-flight). Η μέθοδος επιτρέπει ταυτόχρονη μέτρηση δεκάδων δεικτών με ελάχιστη παρεμβολή σήματος, καθιστώντας δυνατή την υψηλής διάστασης ανοσοφαινοτυπική και λειτουργική ανάλυση σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου.

Στις αιματολογικές κακοήθειες, η mass cytometry έχει χρησιμοποιηθεί για: καλύτερη χαρτογράφηση πληθυσμών γραμμής/ωρίμανσης, εντοπισμό υποκλωνικής ετερογένειας, ανάλυση του ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος και παράλληλη αξιολόγηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών οδών που σχετίζονται με ανταπόκριση ή αντοχή στη θεραπεία. Αυτές οι προσεγγίσεις είναι ιδιαίτερα χρήσιμες σε νοσήματα όπου η βιολογική ετερογένεια και η επίδραση του μικροπεριβάλλοντος επηρεάζουν ουσιαστικά την πρόγνωση/θεραπεία (π.χ. AML, λεμφώματα, μυέλωμα). Astle et al., 2021; Behbehani et al., 2017.

Ως τεχνολογική οικογένεια, η mass cytometry έχει επίσης οδηγήσει σε χωρικές επεκτάσεις (π.χ. imaging mass cytometry), οι οποίες γεφυρώνουν την

πολυπαραμετρική ανάλυση με την ιστολογική αρχιτεκτονική ιστών. Παρότι αυτό υπερβαίνει την «κλασική» έννοια της ροής, αναδεικνύει τη γενικότερη τάση προς ολοκληρωμένη, υψηλής διάστασης ανοσο-ονκολογική χαρτογράφηση. Devine et al., 2021.

Περιορισμοί της mass cytometry περιλαμβάνουν ότι η μέτρηση είναι καταστροφική (τα κύτταρα δεν ανακτώνται για sorting/καλλιέργεια), ότι η διαμεταγωγή/ευαισθησία και η πρακτική ρουτίνα μπορεί να διαφέρουν από την κλασική ροή ανάλογα με την εφαρμογή, καθώς και ότι απαιτούνται εξειδικευμένες υποδομές, αντιδραστήρια και ώριμα υπολογιστικά εργαλεία για ανάλυση υψηλής διάστασης και εναρμόνιση. Παρά ταύτα, η τεχνολογία έχει σαφή θέση ως «αναλυτής βάθους» σε πολύπλοκα κλινικά ερωτήματα και ως πλατφόρμα ανακάλυψης βιοδεικτών/υπογραφών που δύνανται να μεταφραστούν σε πιο απλές κλινικές δοκιμασίες. Spitzer & Nolan, 2016; Behbehani et al., 2017.

3. Αιματολογικές Κακοήθειες: Επισκόπηση και διαγνωστική προσέγγιση με κυτταρομετρία ροής

Οι αιματολογικές κακοήθειες περιλαμβάνουν μια ετερογενή ομάδα νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από μη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία των αιμοποιητικών κυττάρων. Αυτές οι ασθένειες συχνά προκύπτουν από γενετικές μεταλλάξεις, επιγενετικές αλλαγές και αποκλίσεις στα φυσιολογικά πρότυπα κυτταρικού πολλαπλασιασμού, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση. Στη σύγχρονη ιατρική πρακτική, η ακριβής διάγνωση και ταξινόμηση των αιματολογικών κακοηθειών είναι κρίσιμη, καθώς επηρεάζει σημαντικά τη θεραπευτική στρατηγική και την πρόγνωση.

3.1 Κατηγορίες Αιματολογικών Κακοηθειών

Οι αιματολογικές κακοήθειες διακρίνονται σε τρεις βασικές κατηγορίες, με βάση την προέλευση των νοσούντων κυττάρων. Οι αιματολογικές κακοήθειες αποτελούν ετερογενή ομάδα νεοπλασιών του αιμοποιητικού και λεμφικού συστήματος και, στις σύγχρονες ταξινομήσεις, οργανώνονται ιεραρχικά με βάση τη σειρά διαφοροποίησης, στάδιο ωρίμανσης και γενετικούς/μοριακούς οδηγούς. Σε γενικές γραμμές διακρίνονται σε μυελοειδείς νεοπλασίες (π.χ. οξείες μυελογενείς λευχαιμίες, μυελοδυσπλαστικά νεοπλάσματα, μυελοϊπερπλαστικά νεοπλάσματα και οντότητες επικάλυψης MDS/MPN), σε λεμφοειδείς νεοπλασίες (πρόδρομες λεμφοβλαστικές λευχαιμίες/λεμφώματα και ώριμες νεοπλασίες B-, T- και NK-κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της νόσου Hodgkin και των πλασματοκυτταρικών νεοπλασιών), καθώς και σε ιστιοκυτταρικές/δενδριτικές νεοπλασίες. Παράλληλα, τόσο το WHO-HAEM5 όσο και η ICC δίνουν έμφαση στην έννοια της ενσωματωμένης διάγνωσης, όπου ο ανοσοφαινότυπος και η μορφολογία ερμηνεύονται σε συνδυασμό με κυτταρογενετικά/μοριακά δεδομένα, επειδή πολλές οντότητες ορίζονται πλέον από συγκεκριμένες γενετικές αλλοιώσεις ή «υπογραφές» που επηρεάζουν πρόγνωση και θεραπευτικές επιλογές (Alaggio et al., 2022; Khoury et al., 2022; Arber et al., 2022; Campo et al., 2022).

3.2 Ανοσοφαινότυπος και Ταξινόμηση

Η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση με κυτταρομετρία ροής υπηρετεί τρεις κύριους διαγνωστικούς στόχους: (i) στην τεκμηρίωση νεοπλασματικότητας/κλωνικότητας, (ii) στον καθορισμό γραμμής διαφοροποίησης και σταδίου ωρίμανσης και (iii) στην αναγνώριση ανώμαλων προτύπων έκφρασης που υποστηρίζουν τη διαφορική διάγνωση και την οντολογική ταξινόμηση.

Οξείες λευχαιμίες (AML/ALL και MPAL):

Στις οξείες λευχαιμίες, η ΚΡ είναι κρίσιμη για την ταχεία επιβεβαίωση βλαστικού πληθυσμού, τη διάκριση μυελογενούς έναντι λεμφοβλαστικής γραμμής, και την

ανάδειξη μικτών φαινοτύπων (MPAL), όταν υπάρχει έκφραση δεικτών από περισσότερες γραμμές. Αυτό είναι κλινικά ουσιώδες, διότι επηρεάζει άμεσα τον διαγνωστικό αλγόριθμο (π.χ. ποιες μοριακές/κυτταρογενετικές δοκιμασίες θα ακολουθήσουν) και την αρχική θεραπευτική στρατηγική (Dohner Et al. 2022).

Χρόνιες λεμφοϋπερπλαστικές διαταραχές (π.χ. CLL):

Στις χρόνιες B-λεμφοϋπερπλαστικές διαταραχές, η κυτταρομετρία ροής αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο για την τεκμηρίωση κλωνικού B-πληθυσμού και την τυποποίηση της διάγνωσης (π.χ. τυπικός CLL ανοσοφαινότυπος). Παράλληλα, οι σύγχρονες συστάσεις επισημαίνουν την ανάγκη εναρμονισμένων πάνελ με «απαιτούμενους» και «συνιστώμενους» δείκτες για αναπαραγώγιμη διάγνωση και διαφορική διάγνωση από άλλες CD5⁺ B-νεοπλασίες (Hallek et al. 2018).

Λεμφώματα/μυέλωμα και λοιπές κακοήθειες:

Αν και η τελική ταξινόμηση πολλών λεμφωμάτων απαιτεί συσχέτιση με ιστοπαθολογία και γενετικά ευρήματα, η ΚΡ συμβάλλει αποφασιστικά στην ταχεία ανίχνευση νεοπλασματικών πληθυσμών, στην εκτίμηση της σύστασης του δείγματος, καθώς και στην ανάδειξη θεραπευτικών στόχων (π.χ. αντιγόνα επιφάνειας που αξιοποιούνται σε στοχευμένες θεραπείες). Αυτή η «ολιστική» λογική είναι συνεπής με τον τρόπο που οι σύγχρονες ταξινομήσεις (WHO 5η έκδοση) προσεγγίζουν τα αιματολογικά νεοπλάσματα ως οντότητες που ορίζονται από συνδυασμό κλινικών–μορφολογικών–ανοσοφαινοτυπικών–μοριακών χαρακτηριστικών (Alaggio et al.2022).

Η MRD έχει αναδειχθεί σε κεντρικό βιοδείκτη για την εκτίμηση του «βάθους ανταπόκρισης» και την πρόγνωση σε πολλαπλές αιματολογικές κακοήθειες. Στο πολλαπλούν μυέλωμα, για παράδειγμα, η International Myeloma Working Group (IMWG) έχει ενσωματώσει την MRD-αρνητικότητα στα κριτήρια ανταπόκρισης και αναγνωρίζει τεχνικές όπως next-generation flow ή next-generation sequencing για την αξιολόγησή της (Kumar et al. 2016). Σε AML, αντίστοιχα, οι συστάσεις του ELN υπογραμμίζουν τη σημασία της MRD ως προγνωστικού εργαλείου και την ανάγκη τυποποίησης/εναρμόνισης των μεθόδων (Heuser et al. 2021).

3.3 Κυτταρομετρική ανάλυση Λευχαιμιών

Οι λευχαιμίες χαρακτηρίζονται από υπερβολικό πολλαπλασιασμό μη φυσιολογικών λευκών αιμοσφαιρίων στο αίμα, τον μυελό των οστών και τους λεμφικούς ιστούς. Διακρίνονται σε:

- **Οξείες Λευχαιμίες (Acute Leukemias):** Προκύπτουν από πρόδρομα κύτταρα που δεν έχουν ολοκληρώσει τη διαφοροποίησή τους. Παρουσιάζουν ταχεία εξέλιξη και σοβαρά κλινικά συμπτώματα.
 - Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (AML)
 - Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ALL)
- **Χρόνιες Λευχαιμίες (Chronic Leukemias):** Αναπτύσσονται από πιο ώριμα κύτταρα που διατηρούν εν μέρει τη λειτουργικότητά τους. Εξελίσσονται πιο αργά.
 - Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (CML)
 - Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (CLL)

Ο ορισμός της οξείας λευχαιμίας είναι η παρουσία σημαντικού αριθμού μη φυσιολογικών βλαστών στο μυελό των οστών. Σύμφωνα με τον ισχύουσα ταξινόμηση του ΠΟΥ (Swerdlow et al. 2017- Khouury et al. 2022), ποσοστό $\geq 20\%$ βλαστών μυελικής σειράς επί του συνόλου των λευκοκυττάρων απαιτείται για τη διάγνωση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (AML), εκτός εάν οι βλάστες φέρουν PML::RARA, RUNX1::RUNX1T1, CBFB::MYH11, DEK::NUP214, RBM15::MRTFA, αναδιάταξη KMT2A, MECOM αναδιάταξη, αναδιάταξη NUP98 ή μετάλλαξη NPM1 (Khouury et al. 2022). Παρουσία οποιασδήποτε από αυτές τις κυτταρογενετικές/μοριακές γενετικές ανωμαλίες, η AML διαγιγνώσκεται ανεξάρτητα από το ποσοστό βλαστών.

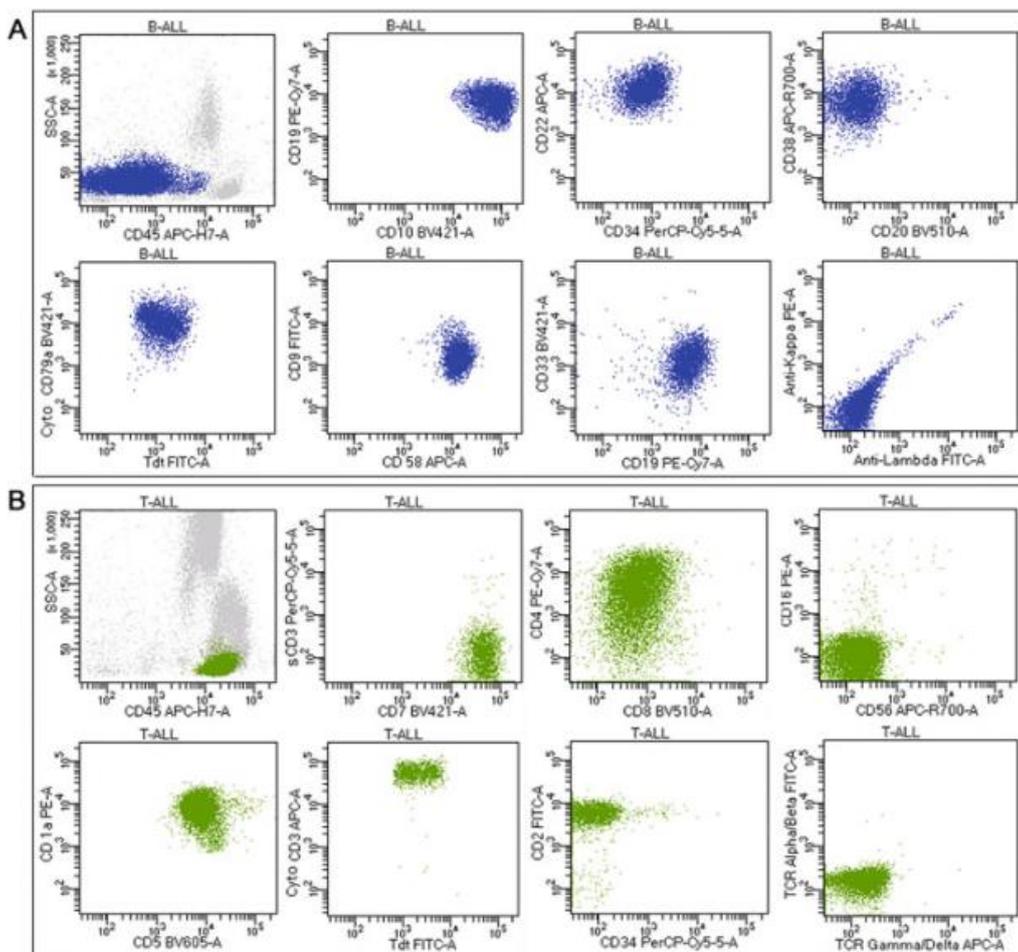
Σε πολλά θεραπευτικά πρωτόκολλα, ποσοστό $\geq 25\%$ λεμφοβλαστών απαιτείται για να τεθεί η διάγνωση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (ALL). Εάν τα παθολογικά βλαστικά κύτταρα εντοπίζονται κυρίως στον ιστό, σχηματίζοντας μια συμπαγή μάζα χωρίς σημαντική διήθηση στο μυελό των οστών τότε η διάγνωση θα πρέπει να είναι λεμφοβλαστικό λέμφωμα (LBL) ή μυελοειδές σάρκωμα ανάλογα με τον τύπο του βλαστικού κυττάρου.

Το LBL έχει αντίστοιχη μορφολογία, ανοσοφαινότυπο και βιολογία όπως μια ALL, έτσι τα LBL και η αντίστοιχη ALL συνδυάζονται ως μία ομάδα (ALL/LBL) από την τρέχουσα ταξινόμηση του ΠΟΥ. Τα νεοπλάσματα πλασματοκυτταρικών δενδριτικών κυττάρων (BPDCN), που προέρχεται από τα πρόδρομα πλασματοκυτταρικά δενδριτικά κύτταρα, συνήθως ενοτιπίζονται στο το δέρμα και στο μυελό των οστών και εμφανίζουν κλινική επιθετική πορεία (Julia et al. 2014).

Η κυτταρομετρία ροής μπορεί να προσδιορίσει αποτελεσματικά τον ανώμαλο πληθυσμό των βλαστών, να ταξινομήσει τους βλάστες και να παράσχει προγνωστικές πληροφορίες (DiGiuseppe and Wood 2019, Weir and Borowitz 2001).

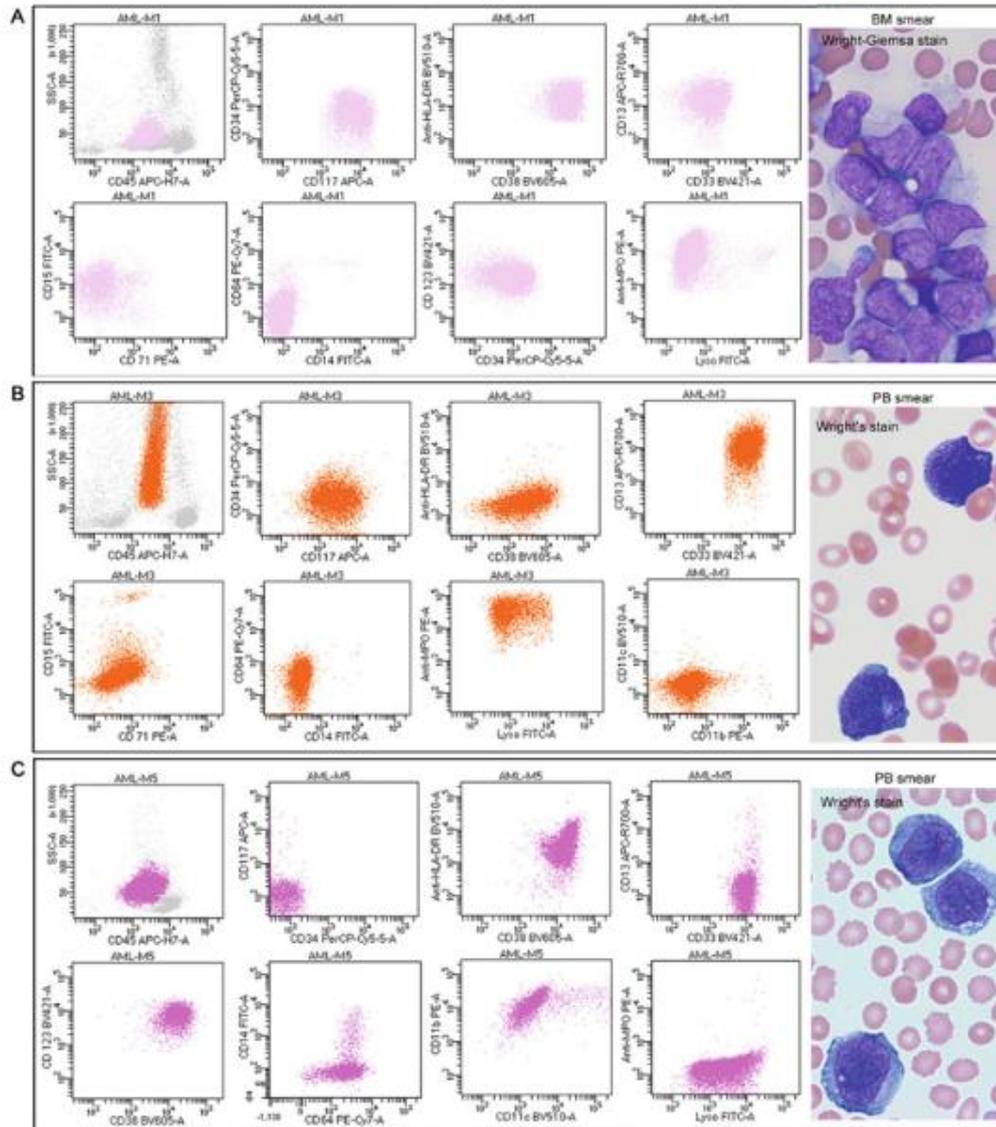
3.2.1 Ταυτοποίηση του Βλαστικού Πληθυσμού με κυτταρομετρία ροής

Ο προσδιορισμός ενός μεγάλου πληθυσμού βλαστών όπως σε περιπτώσεις ALL και AML που παρουσιάζονται στις εικόνες 9 και 10 αντίστοιχα, είναι συνήθως απλός. Οι βλάστες εμφανίζουν συνήθως χαμηλό SSC και αρνητική(CD45-) έως ενδιάμεση έκφραση (CD45dim+) του CD45, και επομένως εμπίπτουν στη λεγόμενο βλαστικό παράθυρο (χαμηλό SSC και dim CD45) στο στικτόγραμμα CD45 vs. SSC (Borowitz et al. 1993).



Εικ.9 Αντιπροσωπευτικά στικτογράμματα της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (ALL). α) Πρόδρομη B- ΟΛΛ (μπλε) με χαμηλή πλευρική διασπορά, αμυδρό έως αρνητικό CD45, έκφραση CD19, CD10, CD34, CD22, CD38, κυτταροπλασματικό (Cyto) CD79a, TdT, CD9, CD58, CD33 και καμία έκφραση των CD20, kappa, και lambda. Β) T-ΟΛΛ (πράσινο) με χαμηλή πλευρική διασπορά, ενδιάμεσο έως φωτεινό CD45, έκφραση των CD7, CD4, CD8, CD1a, CD5, κυτταροπλασματικό (κυτταρο) CD3, TdT, CD2, και καμία έκφραση επιφανειακού CD3 (sCD3), CD16, CD56, CD34, TCR α-β και TCR γ-δ. Ωστόσο, όλα τα κύτταρα που μπορεί να υπάρχουν στο βλαστικό παράθυρο δεν είναι βλάστες. Βασεόφιλα και πλασματοκυτταρικά δενδριτικά κύτταρα μπορούν επίσης να βρεθούν στο βλαστικό παράθυρο καθώς και φυσιολογικά πρόδρομα κύτταρα Β (αιματογόνια) καθώς και φυσιολογικά προγονικά κύτταρα της μυελικής σειράς. Τα λευχαιμικά κύτταρα ορισμένων οξείων λευχαιμιών μπορεί να παρατηρηθούν και εκτός της περιοχής του βλαστικού παραθύρου, π.χ. στην οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία (APL) που συνήθως οι βλάστες εμφανίζουν ενδιάμεσο έως υψηλό SSC. Ως εκ τούτου, η αξιολόγηση του προφίλ έκφρασης των αντιγόνων των βλαστών είναι πάντα απαραίτητη

για την ταυτοποίηση ή το διαχωρισμό των παθολογικών βλαστικών ειδικά σε δείγματα με χαμηλό αριθμό βλαστών. Οι βλάστες διαφέρουν από τα ώριμα κύτταρα από τα χαρακτηριστικά που εκφράζουν ανώριμους δείκτες και στερούνται ώριμων δεικτών. Για παράδειγμα, μερικοί μυελοβλάστες εκφράζουν τα CD34 και CD117 (ανώριμοι δείκτες) και στερούνται των CD11b, CD15 και CD16 (ώριμοι μυελογενείς δείκτες), οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκρισή τους από τα ώριμα μυελογενή κύτταρα. Οι παθολογικοί βλάστες έχουν συνήθως έναν ανώμαλο φαινότυπο που διαφέρει από αυτόν των φυσιολογικών αιμοποιητικών πρόδρομων κυττάρων.



Εικ. 11. Αντιπροσωπευτικά στικτογράμματα κυτταρομετρίας ροής και μορφολογίας της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (AML). α) AML-M1 (ανοιχτό ροζ) με χαμηλό SSC, χαμηλή έκφραση CD45 και CD34), CD117, HLA-DR, CD38, CD13, CD33, CD15, CD123 και μυελουπεροξειδάσης (MPO), και αρνητική έκφραση των CD71, CD64, CD14 και λυσοζύμης. Οι βλαστες είναι μεγάλοι με ακανόνιστους πυρήνες, λεπτή χρωματίνη, προεξέχοντα πυρήνια, άφθονο κυτταρόπλασμα με λεπτές μονές ράβδους Auer και καθόλου ή αραιά κοκκία. (β) AML-M3 (οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία) (πορτοκαλί) που παρουσιάζει ενδιάμεσο έως υψηλό SSC και μερικώς, μέτρια έκφραση CD7, MPO, λυσοζύμης και καμία έκφραση των CD34, HLA-DR, CD14, CD11b και CD11c. Τα λευχαιμικά κύτταρα είναι μεγάλα με στρογγυλούς ή ακανόνιστους πυρήνες, άφθονα μεγάλα αζουρόφιλα κοκκία και πολλαπλές ράβδους Auer (κατώτερο κύτταρο).

(γ) *AML-M5* (μωβ) που δείχνει χαμηλό έως ενδιάμεσο SSC, ενδιάμεση έως έντονη του CD45, έκφραση των *HLA-DR*, *CD38*, *CD33*, *CD123*, *CD64*, *CD11b*, *CD11c*, λυσοζύμη, *CD13* (μικρό υποσύνολο κυττάρων), *CD14* (μικρό υποσύνολο) και αρνητική έκφραση των *CD117*, *CD34* και *MPO*. Οι βλάστες είναι μεγάλοι με στρογγυλούς ή ωοειδείς πυρήνες, λεπτή χρωματίνη, δυσδιάκριτα πυρήνια και άφθονο βασεόφιλο κυτταρόπλασμα.

Οι φαινοτυπικές αποκλίσεις των βλαστών μπορεί να εμφανίζονται με αυξημένη έκφραση αντιγόνων ή ανώμαλη έκφραση δεικτών άλλων κυτταρικών σειρών και ασύγχρονη έκφραση αντιγόνων. Παραδείγμα σε σύγκριση με τα αιματογόνια, τα λευχαιμικά κύτταρα της B-ALL εμφανίζουν συνήθως αυξημένο CD10, μειωμένο CD38, ανώμαλη έκφραση του μυελικού δείκτη CD13 ή CD33, και συν-έκφραση των CD34 και CD20. Η γνώση των φυσιολογικών προτύπων έκφρασης πρόδρομων αντιγόνων είναι ιδιαίτερα σημαντική για την αξιολόγηση δειγμάτων μετά τη θεραπεία, τα οποία συνήθως περιέχουν φυσιολογικά πρόδρομα κύτταρα και πολύ χαμηλά μετρούμενη υπολειμματική λευχαιμία (Loken et al. 2008- McKenna et al. 2004).

Ταυτοποίηση της κυτταρικής σειράς των βλαστών: Η ακριβής και γρήγορη ταξινόμηση μιας οξείας λευχαιμίας ως AML, B-ALL ή T-ALL είναι ζωτικής σημασίας για την έγκαιρη επιλογή ενός κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος. Οι λευχαιμικοί βλάστες συχνά παρουσιάζουν προφίλ έκφρασης αντιγόνων που ανήκουν σε συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο και επομένως μπορούν να ταξινομηθούν σε αυτή την κυτταρική σειρά με ανάλυση FC. Όπως φαίνεται στην Εικ. 4, οι λεμφοβλάστες των ALL παρουσιάζουν συνήθως χαμηλό SSC και φαινότυπο πρόδρομων B-κυττάρων ή πρόδρομων T-κυττάρων. Οι λευχαιμικοί βλάστες από *de novo* B-ALL είναι σχεδόν πάντα θετικοί για το CD19, το κυτταροπλασματικό CD22 και κυτταροπλασματικό CD79a και αρνητικοί για την επιφανειακή Ig.

Οι περισσότερες περιπτώσεις B-ALL είναι θετικές για τα επιφανειακά CD22, CD10, CD38, TdT και CD24. Το CD34 εκφράζεται συνήθως, αλλά η έκφρασή του είναι αρκετά μεταβλητή και συχνά χαμηλή ή μερική. Το CD45 είναι συνήθως dim και μπορεί να είναι εντελώς αρνητικό. Το CD20 είναι συνήθως αρνητικό ή μερικώς θετικό. Οι περιπτώσεις B-ALL μπορούν να υποκατηγοριοποιηθούν με βάση τον φαινότυπο. Για παράδειγμα, η πλειονότητα των περιπτώσεων B-ALL εκφράζει CD10 και ονομάζεται

κοινή ALL (ενδιάμεσο αναπτυξιακό στάδιο)- οι περιπτώσεις B-ALL με αρνητικό CD10 ταξινομούνται ως pro-B ALL (πρώιμο στάδιο, Εικ. 10α)- οι περιπτώσεις B-ALL που εκφράζουν κυτταροπλαστική μ αλυσίδα ταξινομούνται ως Pre-B ALL (ώριμο στάδιο).

Οι λευχαιμικοί βλάστες της B-ALL μπορεί να εκφράζουν ανώμαλα μυελογενή αντιγόνα (συνήθως CD13 και CD33, περιστασιακά CD15) και συχνά παρουσιάζουν ανώμαλα πρότυπα έκφρασης ορισμένων μη ειδικών δεικτών, όπως CD58 και CD9 (Εικ. 10α), οι οποίοι συνήθως περιλαμβάνονται στο panel για την ανίχνευση MRD B-ALL. Οι λευχαιμικοί βλάστες της T-ALL είναι πάντοτε θετικοί για το κυτταροπλασματικό CD3, συνήθως θετικοί για TdT, CD7, CD38, CD45 (αμυδρά), και μεταβλητά θετικές για άλλα παν T-κυτταρικά αντιγόνα (επιφανειακά CD3, CD2, CD4, CD5, CD8), τον T-κυτταρικό υποδοχέα, το CD10 και άλλους ανώριμους δείκτες (CD1a, CD34 και CD99) (Εικ. 10β). Ορισμένες περιπτώσεις T-ALL μπορεί να εκφράζουν ανώμαλα τα CD56, CD79a, CD117 ή μυελογενής δείκτες όπως CD13 ή CD33. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ιδίως στα δείγματα που συλλέγονται μετά από θεραπεία, οι ανώριμοι δείκτες μπορεί να εμφανίζουν χαμηλή έκφραση ή να απουσιάζουν εντελώς και ο ανώριμος χαρακτήρας πρέπει να βασίζεται στην ανίχνευση της απουσίας του επιφανειακού CD3, του διπλού CD4/CD8+ ή του διπλού CD4/CD8- (DiGiuseppe and Wood 2019).

Η πρώιμη πρόδρομη T-κυτταρική T-ALL (ETP-ALL , Εικ. 10γ) ορίζεται από έναν χαρακτηριστικό φαινότυπο: CD8-, CD1a-, CD5- ή αμυδρά+ σε ποσοστό <75% των βλαστών και θετικός για τουλάχιστον έναν από τους δείκτες μυελοειδών ή βλαστικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των CD11b, CD13, CD33, CD34, CD65, CD117 και HLA-DR. Η ETP ALL θεωρείται υποτύπος T-ALL υψηλού κινδύνου, ιδίως σε ενήλικες ασθενείς (Jain et al. 2016), και περιλαμβάνεται ως νέα οντότητα στην τρέχουσα ταξινόμηση του ΠΟΥ (Swerdlow et al. 2017).

Η μορφολογία και ο φαινότυπος των περιπτώσεων AML ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με την κατεύθυνση διαφοροποίησης και το επίπεδο ωρίμανσης των βλαστών. Οι λευχαιμικοί βλάστες της AML με ελάχιστη διαφοροποίηση (FAB-M0) ή της AML χωρίς ωρίμανση (FAB-M1, Εικ. 11α) εμφανίζουν συνήθως χαμηλό SSC, εκφράζουν πρώιμα αιμοποιητικά πρόδρομα αντιγόνα, όπως CD34, CD38 και HLA-DR, και στερούνται αντιγόνων που σχετίζονται με ώριμα μυελογενή και μονοκυτταρικά κύτταρα, όπως CD11b, CD14, CD15 και CD65. Οι βλάστες εκφράζουν συνήθως τουλάχιστον δύο αντιγόνα της μυελικής σειράς όπως τα CD13, CD33 και CD117. Η

έκφραση του CD38 και/ή του HLA-DR μπορεί να είναι μειωμένη. Σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να παρουσιάζεται ασύγχρονη έκφραση του CD11b ή του CD15. Η μυελοϋπεροξειδάση (MPO) είναι συνήθως θετική στην AML-M1, αρνητική ή ελάχιστα θετική στην AML-M0. Οι βλάστες μπορεί να εκφράζουν ανώμαλα το CD7 ή σπάνια άλλους λεμφοειδείς δείκτες. Οι λευχαιμικοί βλάστες της AML με ωρίμανση (FAB M2) εκφράζουν συνήθως πολλαπλά μυελοεγενή αντιγόνα που σχετίζονται με την κοκκιοκυτταρική διαφοροποίηση, τα οποία περιλαμβάνουν MPO, CD11b, CD13, CD15, CD33 και CD65. Τα HLA-DR, CD34, CD38 και CD117 είναι συνήθως θετικά, αλλά μπορεί να είναι μερικώς αρνητικά. Η υπερκοκκώδης παραλλαγή της APL (FAB-M3) (Εικ. 11β) παρουσιάζει συνήθως ενδιάμεση έως υψηλή SSC, απουσία ή ελάχιστη έκφραση των HLA-DR και CD34 και έλλειψη των λευκοκυτταρικών ιντεγκρινών CD11a, CD11b και CD18. Τα CD13, CD33, CD64, CD117 και MPO είναι συνήθως θετικά, ενώ οι δείκτες κοκκιοκυτταρικής ωρίμανσης CD15 και CD65 είναι συνήθως αρνητικοί ή μόνο ασθενώς θετικοί.

Σε περιπτώσεις με μικροκοκκώδη μορφολογία, τα CD34 και CD2 εκφράζονται συχνά σε ένα μέρος τουλάχιστον των λευχαιμικών κυττάρων. Οι λευχαιμικοί βλάστες από AML με μονοκυτταρική διαφοροποίηση εκφράζουν ποικιλοτρόπως τα μυελοεγενή αντιγόνα CD13, CD15, CD33 (συντά bright) και CD65- εκφράζουν πάντα ορισμένους μονοκυτταρικούς δείκτες όπως CD4, CD11b, CD11c, CD14, CD36, CD64, CD163 και λυσοζύμη. Οι περισσότερες περιπτώσεις είναι θετικές για HLA-DR, CD38 και CD123. Τα CD34 και CD117 είναι θετικά σε ένα υποσύνολο περιπτώσεων. Η MPO είναι συχνά αρνητική στην οξεία μονοβλαστική λευχαιμία (FAB-M5a, Εικ. 5γ), αλλά μπορεί να είναι μερικώς θετική στην οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία και στην οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία. Η γλυκοφορίνη Α είναι ο ειδικός δείκτης κυτταρικής σειράς για την οξεία ερυθροειδή λευχαιμία (FAB-M6), η οποία είναι συνήθως επίσης θετική για τα CD71, CD36 και CD117 και αρνητική για τα CD34 και HLA-DR. Τα CD41, CD61 και CD42b είναι ειδικοί δείκτες για την οξεία μεγακαρυοβλαστική λευχαιμία (FAB M7), η οποία είναι συχνά αρνητική για HLA-DR και CD34. Οι παθολογικοί μεγακαρυοβλάστες είναι συνήθως θετικοί για το CD36 και συχνά εκφράζουν τα CD13, CD33 και CD117, ενώ μπορεί να εκφράζουν κατά παρέκκλιση τα CD7, CD4 ή CD56. Η επιφανειακή χρώση του CD41 και του CD61 είναι λιγότερο ειδική από την κυτταροπλασματική τους χρώση λόγω της πιθανής προσκόλλησης των

αιμοπεταλίων στους βλάστες που οδηγεί σε ψευδώς θετική ερμηνεία (Craig and Foon 2008).

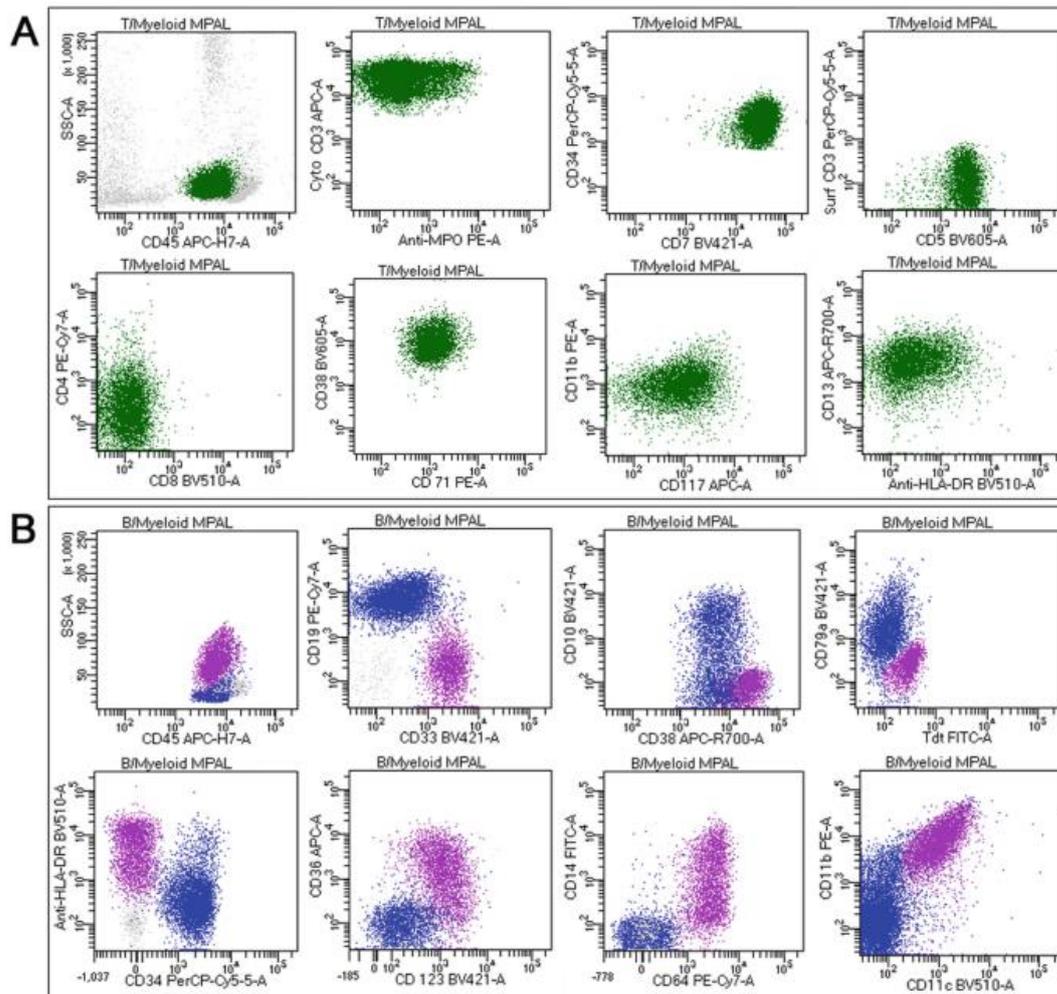
Τα νεοπλάσματα πλασματοκυτταροειδών δενδριτικών κυττάρων (BPDCN) εκφράζουν CD4, CD56 (bright), CD36, CD38, CD43, CD45, CD71, HLA-DR και δείκτες που σχετίζονται με τα πλασματοκυτταρικά δενδριτικά κύτταρα (PDC) (CD123, CD303, CD304, TCF4, TCL1) (Julia et al. 2014, Swerdlow et al. 2017). Η έκφραση του CD45 μπορεί να κυμαίνεται από χαμηλή έως μέτρια. Το SSC των καρκινικών κυττάρων είναι συνήθως χαμηλό. Ορισμένες περιπτώσεις μπορεί επίσης να εκφράζουν CD2, CD5, CD7, cD33 και CD79a, αλλά τα CD3, CD13, CD16, CD19, CD20, λυσοζύμη και MPO είναι σχεδόν πάντα αρνητικά. Η TdT είναι θετική στο ένα τρίτο περίπου των περιπτώσεων και περιστασιακά οι περιπτώσεις μπορεί να εκφράζουν το CD117. Με βάση τα διαγνωστικά κριτήρια του ΠΟΥ (Khoury et al. 2022), η BPDCN μπορεί να διαγνωστεί με την παρουσία του CD123 και ενός άλλου δείκτη σχετιζόμενου με PDC εκτός από το CD4 και/ή το CD56, ή με την παρουσία τριών δεικτών σχετιζόμενων με PDC και την απουσία του CD34 και άλλων ειδικών για τον κυτταρικό τύπο δεικτών, συμπεριλαμβανομένων των CD3, CD14, CD19, λυσοζύμης και MPO. Δεδομένης της παρουσίας άλλων αιματολογικών κακοηθειών με παρόμοιο φαινότυπο, η συσχέτιση με την ιστομορφολογία, τις κλινικές πληροφορίες και τις μελέτες IHC είναι πάντοτε απαραίτητη για την οριστική διάγνωση της BPDCN.

Η διάγνωση της NK-ALL είναι πολύ δύσκολη λόγω της έλλειψης ειδικών δεικτών για τα κύτταρα NK. Τα πρώιμα προγονικά κύτταρα NK δεν εκφράζουν ειδικούς δείκτες εκτός από εκείνους που μοιράζονται με τα T-κύτταρα, όπως το CD7 και το CD2. Επιπλέον, ο δείκτης CD56 των NK κυττάρων μπορεί να παρατηρηθεί σε ορισμένα φυσιολογικά αντιδραστικά T-κύτταρα (NKT κύτταρα) και λεμφοβλάστες ορισμένων περιπτώσεων T-ALL. Η διάκριση μεταξύ T-ALL και NK-ALL μπορεί να είναι πολύ δύσκολη. Ως εκ τούτου, η προσωρινή οντότητα NK-ALL που προτάθηκε στην αναθεωρημένη τέταρτη έκδοση της ταξινόμησης των αιματολεμφοειδών όγκων του ΠΟΥ έχει αφαιρεθεί από την επερχόμενη πέμπτη έκδοση (Alaggio et al. 2022).

Η ταξινόμηση της κυτταρικής σειράς των βλαστών σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι δύσκολη. Υπάρχει ~4% των περιπτώσεων οξείας λευχαιμίας χωρίς σαφή στοιχεία διαφοροποίησης κατά μήκος μιας κυτταρικής σειράς. Οι περιπτώσεις αυτές μπορούν να διαχωριστούν σε δύο ομάδες: οξείες αδιαφοροποίητες λευχαιμίες και

οξείες λευχαιμίες με μικτό φαινότυπο (MPALs , Εικ. 12). Οι MPAL μπορεί να έχουν έναν πληθυσμό βλαστών που εκφράζουν αντιγόνα που ανήκουν σε δύο κυτταρικές σειρές (διφαινοτυπικές, Εικ. 12α) ή να έχουν δύο διακριτούς πληθυσμούς βλαστών (δικλωνικές Εικ. 12β). Υπάρχουν κριτήρια που καθορίζουν την κυτταρική σειρά της MPAL για την ταξινόμηση κατά WHO (Πίνακας 2). Για να χαρακτηριστούν ως B-κυτταρικής σειράς, οι λευχαιμικοί βλάστες με ισχυρή έκφραση CD19 θα πρέπει να έχουν ισχυρή έκφραση τουλάχιστον ενός από τα ακόλουθα: CD10, CD79a και κυτταροπλασματικό CD22, ή οι λευχαιμικοί βλάστες με ασθενή έκφραση CD19 θα πρέπει να έχουν τουλάχιστον δύο από αυτούς τους τρεις άλλους δείκτες B-κυττάρων. Το CD3 (κυτταροπλασματικό ή επιφανειακό) είναι ο μόνος δείκτης που καθορίζει τη γενεαλογική γραμμή για τα T-κύτταρα και η παρουσία του σε υψηλή ένταση είναι αρκετή για να ταξινομηθούν οι βλαστές ως T-κυτταρικής σειράς. Η μυελογενής κυτταρική σειρά καθορίζεται από την έκφραση της κυτταροπλασματικής MPO, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί με KP, χρώση IHC ή κυτταροχημική χρώση. Η μονοκυτταρική προέλευση προσδιορίζεται από τη διάχυτη έκφραση τουλάχιστον δύο από τα ακόλουθα: μη ειδική εστεράση, CD14, CD11c, CD64 και λυσοζύμη. Ο πιο συνηθισμένος συνδυασμός είναι μυελογενής σειρά με γραμμή T-κυττάρων ή B-κυττάρων.

Άλλοι συνδυασμοί είναι επίσης δυνατοί. Δεν υπάρχει σαφής τιμή cutoff για το ποσοστό των θετικών βλαστικών κυττάρων για αυτούς τους δείκτες που καθορίζουν την κυτταρική σειρά. Η MPO μπορεί να είναι θετική με χαμηλή έκφραση σε ένα μικρό μέρος των λευχαιμικών λεμφοβλαστών. Χωρίς άλλους μυελογενής δείκτες, αυτό το είδος έκφρασης MPO δεν θα πρέπει να ερμηνεύεται ως μυελογενής και λεμφοειδής MPAL (Guy et al. 2013- Swerdlow et al. 2017). Οι οξείες αδιαφοροποίητες λευχαιμίες δεν διαθέτουν αντιγόνα ειδικά για οποιαδήποτε κυτταρική σειρά, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αλλά συχνά διαθέτουν CD34, CD38 και HLA-DR και μπορεί να εκφράζουν TdT.



Εικ. 12. Αντιπροσωπευτικά στικτογράμματα για την οξεία λευχαιμία μικτού φαινότυπου (MPAL). (α) Διφαινοτυπική T-κυτταρική/μυελογενής MPAL που δείχνει έναν βλαστικό πληθυσμό (πράσινο) θετικό για κυτταροπλασματικό (Cyto) CD3, μυελοπεροξειδάση (μερικώς), CD7, CD34, CD5, CD4 (μερικώς), CD38, CD71, CD11b, CD117, CD13, HLA-DR (μερικώς) και αρνητικό για επιφανειακό (Surf) CD3 και CD8. (β) Δικλωνική B-κυτταρική/μονοκυτταρική MPAL με κύτταρο που δείχνει δύο διακριτούς πληθυσμούς βλαστών: ο ένας (μωβ) με χαμηλό έως ενδιάμεσο SSC, θετικός για CD33, CD38, HLA-DR, CD36 (μερικώς), CD123, CD64, CD14 (μερικώς), CD11b και CD11c, και αρνητικός για τους άλλους δείκτες - ο άλλος (μπλε) με χαμηλό SSC θετικός για CD19, CD38, CD10 (μερικώς), CD79a, CD34, CD11b (μερικώς), και αρνητικός για τους άλλους δείκτες.

Πίνακας 2: Κριτήρια ΠΟΥ για την ταυτοποίηση κυτταρικών σειρών σε έναν ενιαίο βλαστικό πληθυσμό

Lineage	Criteria
B-cell lineage	^a Strong CD19 with strong expression of $\geq 1/3$ (CD10, cytoplasmic CD22, CD79a) or weak CD19 with strong expression of $\geq 2/3$ (CD10, cytoplasmic CD22, CD79a)
T-cell lineage	#Cytoplasmic CD3+ or surface CD3+
Myeloid	^b MPO+ (by flow cytometry, immunohistochemistry or cytochemistry) or monocytic differentiation: diffuse expression of $\geq 2/5$ (nonspecific esterase, CD11c, CD14, CD64, lysozyme)

^aStrong CD19, the intensity of CD19 reaching 50% of hematogone level at least in part; otherwise interpreting as weak. # The intensity of CD3 should reach 50% of the mature T-cell level

^bThe intensity of myeloperoxidase (MPO) should reach 50% of the neutrophil level at least in part

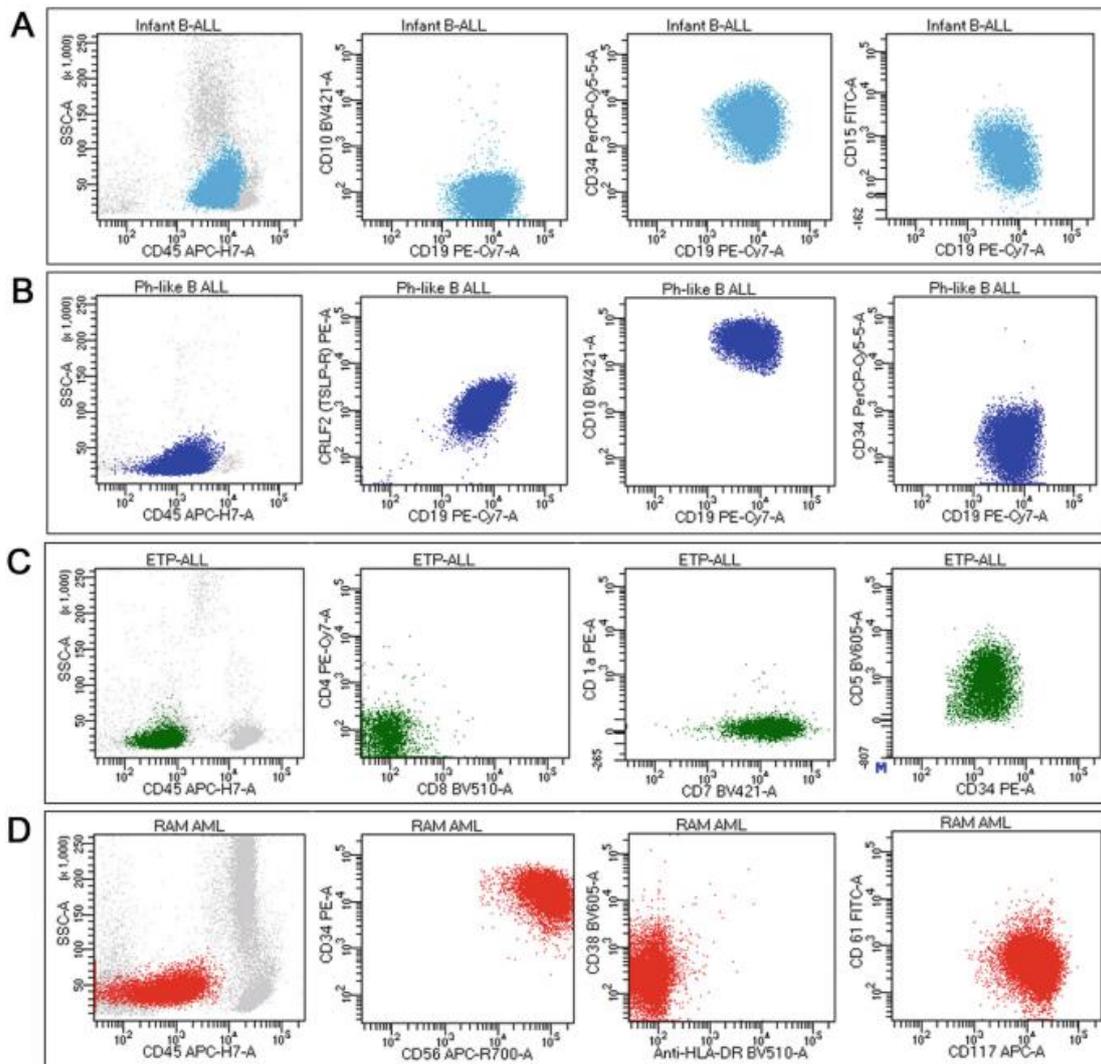
Ποσοτικοποίηση βλαστών:

Η κυτταρομετρία ροής μπορεί να προσδιορίσει το ακριβές ποσοστό των βλαστών στα δείγματα. Ωστόσο, το ποσοστό των βλαστών με την κυτταρομετρία ροής συχνά διαφέρει από εκείνο του golden standard - διαφορική καταμέτρηση επιχρισμάτων αναρροφηθέντων δειγμάτων μυελού των οστών (BM). Υπάρχουν διάφορες πιθανές εξηγήσεις για αυτή την απόκλιση. Τα δείγματα αναρρόφησης BM που υποβάλλονται για ανάλυση KP δεν είναι συχνά η πρώτη λήψη και περιέχουν λιγότερα κύτταρα μυελού των οστών με μεγαλύτερη αραιώση με περιφερικό αίμα. Επίσης, ορισμένες βλαστικές κυψελίδες μπορεί να είναι φαινοτυπικά δύσκολο να συλληφθούν και να μην περιλαμβάνονται στον πληθυσμό των βλαστικών κυψελίδων. Αυτοί είναι πιθανοί λόγοι για τους οποίους το ποσοστό βλαστών με KP είναι χαμηλότερο από εκείνο με μορφολογική καταμέτρηση του επιχρήσματος. Επιπλέον, η ανάλυση KP μπορεί να

εντοπίσει νεοπλασματικά κύτταρα τα οποία μπορεί να διαφύγουν από τη μορφολογική εκτίμηση λόγω άτυπης μορφολογίας ή μη βέλτιστων επιχρισμάτων. Επιπλέον, η μορφολογική εκτίμηση μπορεί να συμπεριλάβει ορισμένες φυσιολογικές πρόδρομες αιμοποιητικές ουσίες, όπως τα αιματογόνια ως λευχαιμικούς βλάστες. Επομένως, είναι απαραίτητο να εκτελούνται τόσο η ΚΡ όσο και η μορφολογική εξέταση του επιχρίσματος για την απαρίθμηση των βλαστών και να διερευνάται η αιτία των σημαντικών αποκλίσεων.

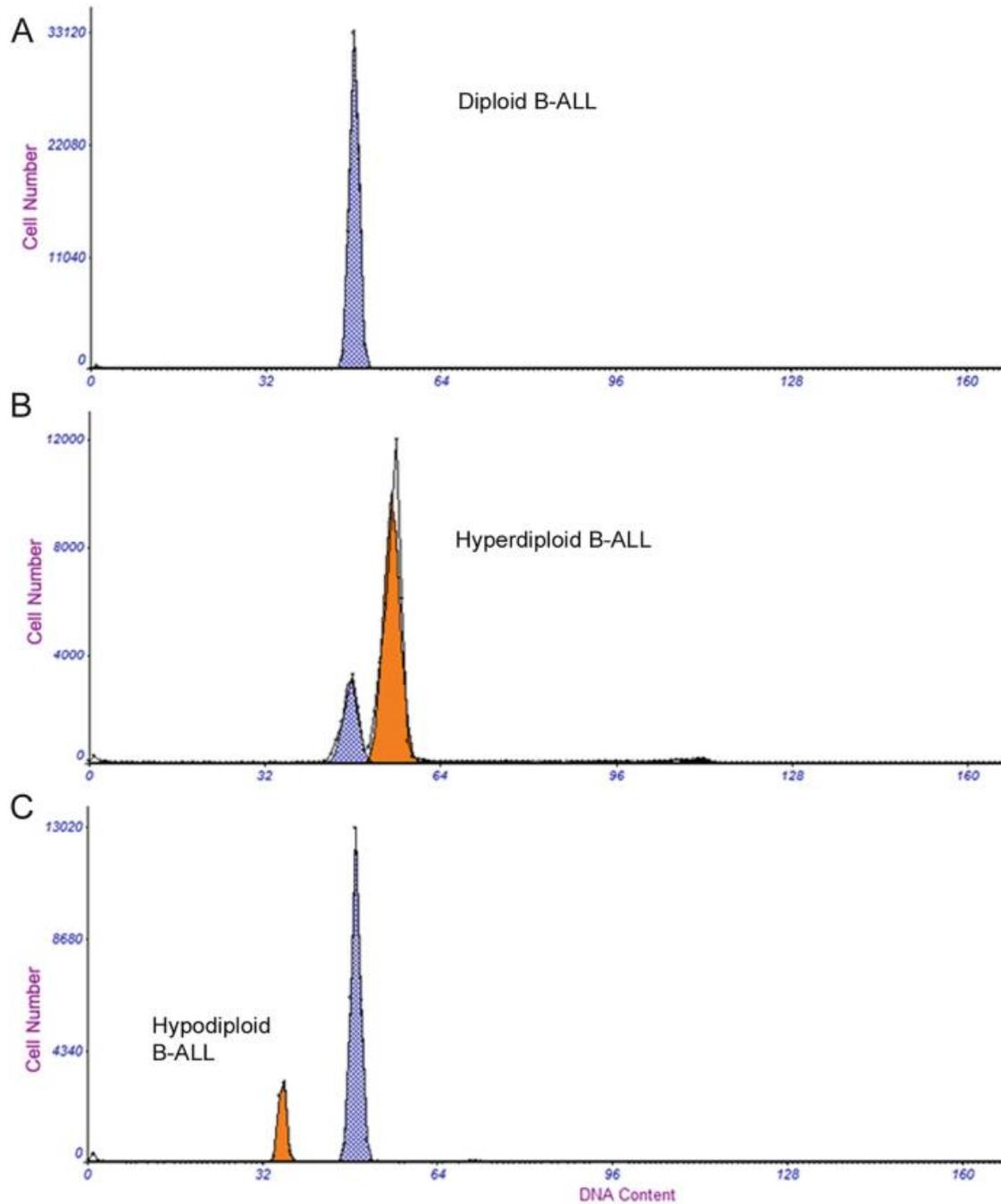
Πρόβλεψη κυτταρογενετικής ανωμαλίας και πρόγνωσης

Οι κυτταρογενετικές/μοριακές εξετάσεις είναι ζωτικής σημασίας για την περαιτέρω ταξινόμηση κατά ΠΟΥ και τη διαστρωμάτωση κινδύνου των οξέων λευχαιμιών. Η προγνωστική αξία που παρέχει ο ανοσοφαινότυπος ΚΡ αποδίδεται πιθανότατα στην πρόβλεψη ορισμένων κυτταρογενετικών/μοριακών υποτύπων. Για παράδειγμα, CD10-B-ALL παρατηρείται συνήθως σε B-ALL με αναδιάταξη KMT2A (Εικ. 13α), η οποία είναι επίσης συνήθως θετική για CD15 και έχει πολύ κακή πρόγνωση. Η ανίχνευση της έκφρασης CRLF2 (Εικ. 13β) σχετίζεται με την αλλοίωση του γονιδίου CRLF2 που παρατηρείται συνήθως σε Philadelphia-like ALL που σχετίζεται με κακή πρόγνωση (Roberts et al. 2014). Η OMA με t(8; 21)(q22;q22) εκφράζει συνήθως δείκτες B-κυττάρων όπως το CD19 και σχετίζεται με ευνοϊκή πρόγνωση (Chen and Cherian 2017). Η ανώμαλη έκφραση του CD2 στην APL σχετίζεται με FLT3-ITD (Takenokuchi et al. 2012). Επιπλέον η ETP-ALL (Εικ. 13γ) ορίζεται από τον τυπικό ανοσοφαινότυπο πρώιμου T-προδρόμου και σχετίζεται με κακή κλινική έκβαση σε ενήλικες ασθενείς (Jain et al. 2016). Η AML με φαινότυπο RAM (Εικ. 13δ) ορίζεται από τον χαρακτηριστικό φαινότυπο (έντονη έκφραση CD56, χαμηλό έως αρνητικό CD38, χαμηλό έως αρνητικό CD45 και αρνητικό HLA-DR) και σχετίζεται με πολύ κακή πρόγνωση (Eidenschink Brodersen et al. 2016).



Εικ. 13. Αντιπροσωπευτικά σκτιογράμματα διαφόρων υποτύπων οξείας λευχαιμίας. (α) Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία Β-κυττάρων (B-ALL, γαλάζιο χρώμα) με αναδιάταξη *KMT2A* που εμφανίζει φαινότυπο CD10- CD15+. (β) B-ALL τύπου Φιλαδέλφειας (Ph-like) (σκούρο μπλε) που παρουσιάζει έκφραση του *CRLF2*. (γ) Early-T-precursor (ETP) ALL (πράσινη) που είναι θετική για CD7, CD34, CD5 (χαμηλό έως και μερικώς), CD45 (χαμηλό έως αρνητικά) και αρνητική για CD4, CD8 και CD1a. (δ) Οξεία μυελογενής λευχαιμία με φαινότυπο RAM (RAM-AML, κόκκινο) που είναι θετική για CD34, CD56 (φωτεινό), CD117, CD61 (χαμηλό), CD38 (χαμηλό έως αρνητικό), CD45 (χαμηλό έως αρνητικό) και αρνητική για HLA-DR.

Η κυτταρομετρία ροής μπορεί να μετρήσει την περιεκτικότητα σε DNA και να εκτιμήσει την πλοειδία του DNA για έναν κυτταρικό πληθυσμό. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τη χρώση των κυττάρων με φθορίζουσα χρωστική που δεσμεύει το DNA και στη συνέχεια την ανάλυση των φθορίζοντων σημάτων των κυττάρων που ενδιαφέρουν. Εμφανίζεται ένα ιστόγραμμα με διαφορετικά μοτίβα πλοειδίας με βάση την περιεκτικότητα σε DNA των κυττάρων του δείγματος (Εικ. 14). Η πλοειδία του DNA χρησιμοποιείται για την περαιτέρω ταξινόμηση της B-ALL και παρέχει σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες. Η υπερδιπλοειδία στην B-ALL (δείκτης DNA >1 , ιδίως $>1,16$, Εικ. 14β) σχετίζεται με πολύ ευνοϊκή πρόγνωση, ενώ η υποπλοειδία (δείκτης DNA <1 , Εικ. 14γ) σχετίζεται με κακή πρόγνωση (Swerdlow et al. 2017).



Εικ. 14. Ιστόγραμμα πλοειδίας DNA της πρόδρομης οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας B-κυττάρων (B-ALL). α) Διπλοειδικό DNA των B-ALL κυττάρων (λευχαιμικά κύτταρα που δεν διαχωρίζονται από τα φυσιολογικά κύτταρα του αίματος). (β) Υπερπλοειδικό DNA των B-ALL κυττάρων (κορυφή πορτοκαλί χρώματος, $DI = 1,16$). (γ) Υποπλοειδικό DNA των B-ALL κυττάρων (κορυφή πορτοκαλί χρώματος, $DI = 0,73$).

Ωριμα λεμφικά νεοπλάσματα

Τα ώριμα λεμφικά νεοπλάσματα αποτελούν μια ετερογενή ομάδα λεμφικών νεοπλασματικών ασθενειών, οι οποίες προέρχονται από B-, T- ή NK κύτταρα και μπορούν να ταξινομηθούν συνοπτικά σε δύο ομάδες: λέμφωμα Hodgkin (HL) (Hodgkin's Lymphoma): Χαρακτηρίζεται από την παρουσία των χαρακτηριστικών κυττάρων Reed-Sternberg και μη-Hodgkin λέμφωμα (μη-HL) / λεμφοϋπερπλαστικές διαταραχές: Ετερογενής ομάδα νεοπλασμάτων, με ποικιλία στη βιολογική συμπεριφορά και την πρόγνωση.

Η ΚΡ είναι ένα πολύ ισχυρό εργαλείο για τη διάγνωση των μη-HL/λεμφοϋπερπλαστικών διαταραχών. Η ανάλυση ΚΡ μπορεί να εντοπίσει αποτελεσματικά έναν άτυπο λεμφικό πληθυσμό, να διαφοροποιήσει μεταξύ νεοπλασματικού πολλαπλασιασμού και αντιδραστικού λεμφικού πολλαπλασιασμού, να χαρακτηρίσει τον φαινότυπο του εντοπισμένου παθολογικού κυτταρικού πληθυσμού και να βοηθήσει στην ταξινόμηση του νεοπλάσματος. Ορισμένα κέντρα έχουν σχεδιάσει ειδικά πάνελ που ανίχνευσαν με επιτυχία τα καρκινικά κύτταρα του HL (Grewal et al. 2019). Ωστόσο, λόγω της τεχνικής δυσκολίας της και της ευρείας διαθεσιμότητας χρήσιμων και εύκολα εκτελούμενων χρώσεων IHC, δεν είναι ούτε πρακτικό ούτε απαραίτητο να χρησιμοποιείται η ΚΡ ρουτίνας στη διάγνωση του HL.

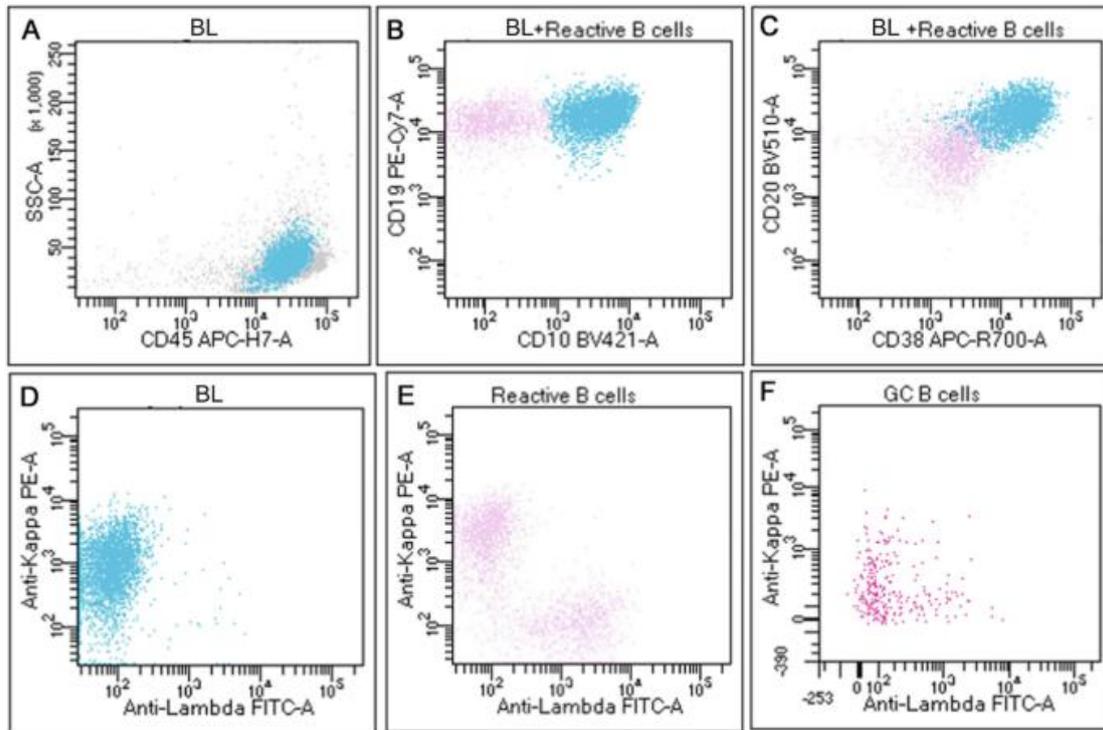
Προσδιορισμός παθολογικού πληθυσμού ώριμων Β-κυττάρων

Οι ώριμοι πληθυσμοί νεοπλασματικών Β-κυττάρων μπορούν να διακριθούν από τα φυσιολογικά/αντιδραστικά Β-κύτταρα με τον εντοπισμό δύο κύριων τύπων ανοσοφαινοτυπικών ανωμαλιών: περιορισμός της ελαφριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης και μη φυσιολογική έκφραση αντιγόνου. Αυτοί οι δύο τύποι ανωμαλιών είναι παρόντες στα περισσότερα από τα ώριμα νεοπλάσματα Β-κυττάρων και μπορούν να εντοπιστούν αποτελεσματικά με κυτταρομετρία ροής. Σπάνια, η ανάλυση ΚΡ αποτυγχάνει να ανιχνεύσει έναν ανώμαλο πληθυσμό Β-κυττάρων σε ένα εμπλεκόμενο δείγμα. Οι πιθανές αιτίες περιλαμβάνουν απώλεια νεοπλασματικών κυττάρων κατά την επεξεργασία του δείγματος για ανάλυση, χαμηλή κυτταρική βιωσιμότητα, ανεπάρκεια νεοπλασματικών κυττάρων, ακατάλληλη ομάδα που χρησιμοποιήθηκε και μη αντιπροσωπευτικό δείγμα ιστού που μελετήθηκε.

Αξιολόγηση κλωνικότητας Β-κυττάρου / περιορισμού της ελαφριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης: Σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς ή αντιδραστικούς πληθυσμούς

B-κυττάρων, οι οποίοι αποτελούνται από ένα μείγμα B-κυττάρων που εκφράζουν κάππα και B-κυττάρων που εκφράζουν λάμδα (Εικ. 15ε), τα νεοπλασματικά B-κύτταρα εμφανίζουν την έκφραση μόνο μιας κατηγορίας ελαφριάς αλυσίδας (δηλ. κάππα ή λάμδα) (Εικ. 15α-δ). Η ανεύρεση μόνο μιας κατηγορίας ελαφριάς αλυσίδας (περιορισμός της ελαφριάς αλυσίδας) υποδηλώνει μονοκλωνικό πολλαπλασιασμό των B-κυττάρων. Ο περιορισμός της ελαφριάς αλυσίδας μπορεί περιστασιακά να παρατηρηθεί σε μη νεοπλασματικούς αντιδραστικούς πληθυσμούς B-κυττάρων (Kroft 2004)- επομένως, δεν θα πρέπει να θεωρείται ισοδύναμος με τη μονοκλωνικότητα ή από μόνος του διαγνωστικός παράγοντας νεοπλασίας. Θα πρέπει πάντα να ερμηνεύεται μαζί με τις κλινικές πληροφορίες, τη μορφολογία και μερικές φορές τα γενετικά ευρήματα. Συνήθως είναι εύκολο να εντοπιστεί ένας μεγάλος πληθυσμός B-κυττάρων περιορισμένων στην ελαφριά αλυσίδα, ο οποίος αντανακλάται σε έναν σημαντικά ανώμαλο λόγο kappa προς lambda (Εικ. 15α-δ). Ωστόσο, στα δείγματα με πολλά αναμειγμένα αντιδραστικά B-κύτταρα, η αξιολόγηση του συνολικού λόγου kappa προς lambda μπορεί να αποτύχει να εντοπίσει έναν μικρό κλωνικό πληθυσμό. Για να αυξηθεί η ευαισθησία, θα πρέπει να διενεργείται χωριστή αξιολόγηση υποομάδων B-κυττάρων με διακριτούς φαινότυπους.

Ορισμένα κύτταρα του B βλαστικής σειράς (GCB) μπορεί να παρουσιάζουν απουσία και των δύο κατηγοριών ελαφριάς αλυσίδας ή να παρουσιάζουν περίσσεια μιας κατηγορίας ελαφριάς αλυσίδας και δεν πρέπει να ερμηνεύονται ως ανώμαλος πληθυσμός CD10+ B-κυττάρων (Εικ. 15στ). Είναι σημαντικό να περιλαμβάνεται ένα βήμα πρόπλυσης για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων που οφείλονται σε διαλυτά αντισώματα στα δείγματα που παρεμβαίνουν στη δέσμευση αντισωμάτων συνδεδεμένων με φθοριόχρωμα. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι B-λεμφοβλάστες, τα πλασματοκύτταρα και τα θυμικά B-κύτταρα είναι αρνητικά για επιφανειακή Ig, της και τα νεοπλασματικά της αντίστοιχα: B-ALL, νεοπλάσματα πλασματοκυττάρων και πρωτοπαθές μεσοθωρακικό λέμφωμα από μεγάλα B-κύτταρα.



Εικ. 15. Αξιολόγηση της κλωνικότητας των Β-κυττάρων με κυτταρομετρία ροής. Λέμφωμα Burkitt (BL, μπλε) που εκφράζει CD45 (α), CD19 και CD10 (β), CD20 και CD38 (γ) και παρουσιάζει περιορισμό kappa (δ). Αντιδραστικά Β-κύτταρα (ανοιχτό ροζ) που είναι πολυτυπικά (ε). Β-κύτταρα του βλαστικού κέντρου (GC) (μωβ) που είναι μερικώς αρνητικά τόσο για το kappa όσο και για το lambda (στ).

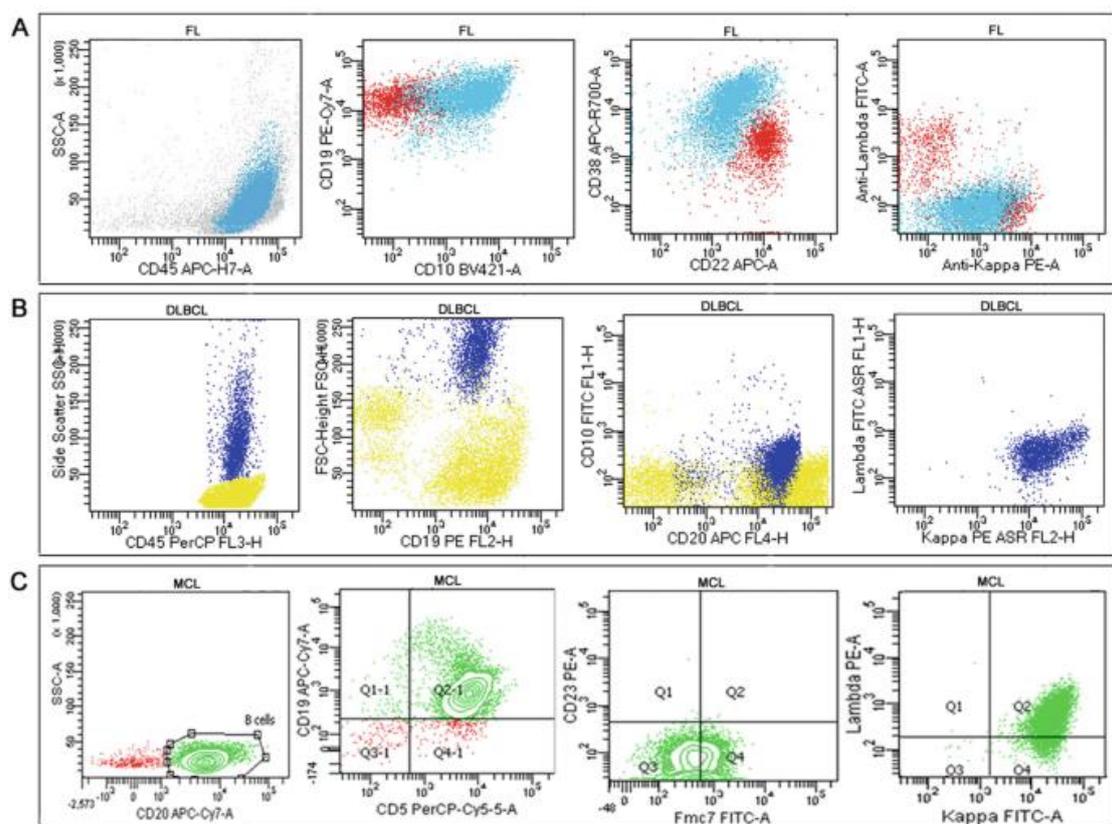
Ταξινόμηση των ώριμων Β-κυτταρικών νεοπλασμάτων: Η ταυτοποίηση του ανοσοφαινότυπου με κυτταρομετρία ροής διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ταξινόμηση κατά ΠΟΥ των ώριμων νεοπλασιών των Β-κυττάρων. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3, κάθε τύπος αυτών των νόσων έχει ορισμένα μοναδικά ή σχετικά ειδικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Τα ευρήματα της ΚΡ σε συνδυασμό με τα ιστομορφολογικά χαρακτηριστικά μπορούν να θέσουν την τελική διάγνωση ή να καθορίσουν τις καταλληλότερες επόμενες μελέτες. Τα περισσότερα ώριμα μη πλασματοκυτταρικά νεοπλάσματα Β-κυττάρων είναι θετικά για τους δείκτες Β-κυττάρων CD19, CD20, CD22, CD79a και Ig επιφανείας (sIg), αλλά τα επίπεδα έκφρασης αυτών των δεικτών ποικίλλουν μεταξύ των νεοπλασιών. Τα CD5+

μικροκυτταρικά ώριμα νεοπλάσματα Β-κυττάρων αποτελούνται κυρίως από CLL/SLL και λέμφωμα από κύτταρα του μανδύα (MCL). Η ΧΛΛ/ΧΛΛ εμφανίζει συνήθως έναν χαρακτηριστικό φαινότυπο: CD20+ (ασθενές), CD22+ (ασθενές), CD23+ (συχνά μέτριο έως ισχυρό), FMC-7- και sIg + (ασθενές με περιορισμό της ελαφριάς αλυσίδας). Αυτός ο φαινότυπος είναι αρκετός για να τεθεί η διάγνωση σε συνδυασμό με την τυπική μορφολογία στις περισσότερες περιπτώσεις. Το CD200 εκφράζεται σταθερά στην ΧΛΛ/ΧΛΛ, αλλά όχι στην MCL. Η προσθήκη του CD200 στον πίνακα έχει αυξήσει την ευαισθησία για την ταυτοποίηση της ΧΛΛ/ΧΛΛ, ακόμη και για τις άτυπες περιπτώσεις (Sandes et al. 2014). Ο παράγοντας 1 που δεσμεύει τον λεμφοειδή ενισχυτή (LEF1) εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στην ΧΛΛ/ΧΛΛ, αλλά δεν ανιχνεύεται στα περισσότερα άλλα νεοπλάσματα Β-κυττάρων, οπότε θεωρείται εξαιρετικά ειδικός δείκτης για την ΧΛΛ/ΧΛΛ (Amador-Ortiz et al. 2015- Menter et al. 2015). Η συμπερίληψη του LEF1 στην ομάδα KP θα αυξήσει την ευαισθησία και την ειδικότητα για τη διάγνωση της ΧΛΛ/ΧΛΛ. Το MCL (Εικ. 16c) δείχνει τυπικά έναν CD5+ φαινότυπο CD20+ (μέτρια έως υψηλό), sIg + (μέτρια έως φωτεινή), CD23- ή μόνο ασθενώς+, FMC-7+, CD200-, FEF1-, ο οποίος είναι διαφορετικός από αυτόν του CLL/SLL. Συνήθως απαιτούνται πρόσθετες μελέτες για να επιβεβαιωθεί η διάγνωση του MCL. Αυτές οι μελέτες περιλαμβάνουν χρώση IHC για κυκλίνη-D1 σε τομή παραφίνης, ανάλυση φθορισμού in situ υβριδισμού (FISH) για αναδιάταξη γονιδίου CCND1 ή κυτταρογενετική μελέτη για τον εντοπισμό της μετατόπισης t(11; 14) (q13;q32).

Πίνακας 3 Ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά κοινών ώριμων νεοπλασμάτων Β-κυττάρων

From: Flow Cytometry in the Diagnosis of Hematological Neoplasms and Other Cancers

Antigens	CLL/SLL	MCL	FL	BL	DLBCL	HCL	LPL	MALToma	PCM
sIg; cIg	+; -	+; -	+; -	+; -	+/-; -/+	+; -	+/-; +	+; +/-	-; +
CD5	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CD10	-	-	+	+	-/+	-	-	-	-/+
CD23	+	-	-	-		-	-	-/+	-
CD43	+	+	-	-/+	-/+	-	-/+	-/+	-/+
CD20	+	+	+	+	+	+	+	+	-/+
FMC7	-	+	+	+	+	+	+	+	
CD200	+	-	+	-	+	+	+	+	+/-
CD103	-	-	-			+	-	-	-
BCL6	-	-	+	+	+/-	-	-	-	-
CyclinD1	-	+	-	-	-	-/+	-	-	-/+
LEF1	+	-	-	+/-	-/+	-	-	-	



Εικ. 16. Αντιπροσωπευτικά στικτογράμματα (dot plots) ώριμων λεμφωμάτων Β-κυττάρων. (α) Θυλακιώδες λέμφωμα (FL, ανοιχτό μπλε) που παρουσιάζει χαμηλή έως ενδιάμεση πλευρική σκέδαση, έκφραση CD45, CD19, CD10, CD38, CD22 και κάππα, και καμία έκφραση λάμδα. Μη νεοπλασματικά Β-κύτταρα επισημασμένα με κόκκινο χρώμα. (β) Διάχυτο λέμφωμα μεγάλων Β-κυττάρων (DLBCL, σκούρο μπλε) που εμφανίζει μεταβλητή πλευρική σκέδαση, υψηλή προς τα εμπρός διασπορά (FSC), έκφραση CD19, CD20, κάππα και καμία έκφραση CD10 και λάμδα. Αντιδραστικά λεμφοκύτταρα με κίτρινο χρώμα. (γ) Λέμφωμα κυττάρων μανδύα (MCL, πράσινο) που εμφανίζει χαμηλή διασπορά θέσης, έκφραση CD20, CD19, CD5, FMC7 (αμυδρό) και κάππα και αρνητική έκφραση CD23 και λάμδα.

Το FL, το διάχυτο λέμφωμα μεγάλων Β-κυττάρων τύπου GCB (DLBCL) και το λέμφωμα Burkitt (BL) είναι τα τρία πιο κοινά νεοπλάσματα ώριμων Β-κυττάρων CD10+. Τα κύτταρα όγκου του FL (Εικ. 16a) είναι θετικά για δείκτες Β-κυττάρων CD19, CD20, CD22 και CD79a, συνήθως εκφράζουν CD10, BCL2, BCL6 και sIg με περιορισμό ελαφριάς αλυσίδας και αρνητικά για CD5 και CD43. Το CD10+ DLBCL μπορεί να είναι δύσκολο να διακριθεί από τα BL και FL που αποτελούνται από πολλά μεγάλα κύτταρα όγκου. Όταν ένας ώριμος φαινότυπος των Β-κυττάρων CD10+ ταυτοποιείται με KP, απαιτείται περαιτέρω αξιολόγηση με μορφολογία και μερικές φορές κυτταρογενετικές/FISH μελέτες για να γίνει η διάκριση μεταξύ αυτών των ασθενειών. Το DLBCL μπορεί εύκολα να διακριθεί από το FL από το διάχυτο μοτίβο ανάπτυξής του. Η διάκριση μεταξύ DLBCL και BL συνήθως χρειάζεται τη συσχέτιση με τη μορφολογία, τον πολλαπλασιαστικό δείκτη και τον γονότυπο. Το BL συνήθως δείχνει έναν ομοιογενή κυτταρικό πληθυσμό με ενδιάμεσο κυτταρικό μέγεθος, βασεόφιλο κυτταρόπλασμα, κυτταροπλασματικά κενोटόπια, δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67 σχεδόν 100% και αναδιάταξη MYC. Το DLBCL συνήθως εμφανίζει πλειομορφικά μεγάλα καρκινικά κύτταρα, χαμηλότερο πολλαπλασιαστικό δείκτη Ki-67 και διαφορετικό γονότυπο.

Τα ώριμα νεοπλάσματα Β-κυττάρων χωρίς έκφραση CD5 και CD10 περιλαμβάνουν τα DLBCL, το λέμφωμα οριακής ζώνης (MZL), τη λευχαιμία τριχωτών κυττάρων (HCL), το λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα (LPL), ένα μικρό υποσύνολο του FL, ένα μικρό υποσύνολο του MCL, κ.λπ. Το HCL έχει έναν χαρακτηριστικό φαινότυπο: CD5-, CD10-, CD11c + (ισχυρό), CD20+ (ισχυρό), CD22+ (ισχυρό), CD23-, CD25+, CD103+, sIg+ (ενδιάμεσο έως ισχυρό με περιορισμό ελαφριάς αλυσίδας) και FMC-7+. Αυτός ο φαινότυπος μαζί με τη χαρακτηριστική μορφολογία είναι αρκετός για τη διάγνωση του HCL. Περιστασιακά, το κλασικό HCL μπορεί να εμφανίζει κάποιες αποκλίσεις από αυτόν τον χαρακτηριστικό φαινότυπο, π.χ. CD10+, CD23+, CD103- ή CD25-. Η παρουσία φαινοτυπικών παραλλαγών δεν χαρακτηρίζει απαραίτητα την περίπτωση ως παραλλαγή HCL (vHCL) (Cessna et al. 2005). Ο όρος vHC έχει χρησιμοποιηθεί από τον ΠΟΥ για να περιγράψει περιπτώσεις με ασυνήθιστο συνδυασμό μορφολογικών, κλινικών και φαινοτυπικών ευρημάτων. Το vHCL συνήθως εμφανίζεται με λευκοκυττάρωση χωρίς μονοκυτταροπενία και εμφανίζει καρκινικά κύτταρα με πιο μεταβλητή μορφολογία, που συχνά δεν έχουν χρώση για TRAP και

αρνητικά για CD25, αννεξίγη A1 και CD200. Η MZL συχνά διαγιγνώσκεται με την αναγνώριση χαρακτηριστικών μορφολογικών χαρακτηριστικών και τον αποκλεισμό άλλων μικρών νεοπλασμάτων Β-κυττάρων. Το MZL συνήθως διακρίνεται από το HCL από την έλλειψη συνδυασμένης θετικότητας για τα CD11c, CD25 και CD103 και την έλλειψη ισχυρής θετικότητας για τα CD20 και CD22. Η διάκριση μεταξύ MZL και LPL συνήθως δεν είναι τόσο εύκολη. Η πλασμακυτταρική διαφοροποίηση της LPL μπορεί να αποδειχθεί σε τουλάχιστον ένα υποσύνολο καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, η πλασματοκυτταρική διαφοροποίηση δεν είναι ειδική για την LPL και μπορεί να παρατηρηθεί σε άλλα ώριμα νεοπλάσματα Β-κυττάρων όπως το MZL. Το DLBCL τύπου μη GCB είναι συνήθως θετικό για δείκτες Β-κυττάρων και sIg με περιορισμό ελαφριάς αλυσίδας και αρνητικό για CD10 (Εικ. 16b). Υψηλό FSC είναι συνήθως παρόν στο DLBCL (Εικ. 12b) και αντανακλά το μεγάλο μέγεθος των καρκινικών κυττάρων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως χαρακτηριστικό για τη διάκριση του DLBCL από τα μικρά ώριμα νεοπλάσματα Β-κυττάρων. Αξίζει να θυμόμαστε ότι περιστασιακά οποιοσδήποτε υποτύπος αυτών των νεοπλασμάτων Β-κυττάρων μπορεί να έχει περιπτώσεις με άτυπους φαινότυπους. Για την ακριβή ερμηνεία των αποτελεσμάτων KP απαιτείται πάντα συσχέτιση με μορφολογικά χαρακτηριστικά, κλινικές πληροφορίες και μερικές φορές κυτταρογενετικά/μοριακά ευρήματα.

4. Διαγνωστικές Εφαρμογές της Κυτταρομετρίας Ροής Νέας Γενιάς στις Αιματολογικές Κακοήθειες

Η ΚΡ είναι ένα ισχυρό εργαλείο ικανό να παρέχει γρήγορη πολυπαραμετρική ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων. Η ανάλυση με ΚΡ μπορεί να εντοπίσει αποτελεσματικά μη φυσιολογικούς λεμφικούς ή αιμοποιητικούς κυτταρικούς πληθυσμούς με ανώμαλους ανοσοφαινότυπους και παίζει κρίσιμο ρόλο στη διάγνωση των περισσότερων αιματολογικών νεοπλασμάτων. Η ΚΡ είναι επίσης χρήσιμη στην ανίχνευση κακοήθων κυττάρων ορισμένων μη αιματολογικών νεοπλασμάτων, ειδικά σε υγρά δείγματα όπως ο μυελός των οστών, η πλευριτική συλλογή και το FNA. Η ακριβής ερμηνεία των αποτελεσμάτων ΚΡ και η ταξινόμηση των αιματολογικών νεοπλασμάτων απαιτούν συσχέτιση με την ιστομορφολογία, τις κλινικές πληροφορίες και μερικές φορές κυτταρογενετικά/μοριακά ευρήματα.

Η Κυτταρομετρία Ροής Νέας Γενιάς (Next-Generation Flow Cytometry, NGFC) επεκτείνει τις δυνατότητες της συμβατικής κυτταρομετρίας ροής. Η NGFC ενσωματώνει: (α) μεγαλύτερο αριθμό δεικτών ανά πάνελ, (β) ισχυρότερη τυποποίηση (standardization) προ-αναλυτικών και αναλυτικών βημάτων, (γ) απόκτηση πολύ μεγάλου αριθμού γεγονότων (events) για υψηλή ευαισθησία, και (δ) υποστήριξη από υπολογιστικά εργαλεία/αυτοματισμούς που μειώνουν τη δια-παρατηρητή μεταβλητότητα. Ειδικά σε εφαρμογές όπως η MRD, έχουν περιγραφεί πρωτόκολλα που στοχεύουν σε απόκτηση $\geq 10^7$ κυττάρων/δείγμα, επιτρέποντας ουσιαστική αύξηση της ευαισθησίας σε σχέση με την «κλασική» κυτταρομετρία (Alaggio et al. 2022).

Συνολικά, η μετάβαση από την «κλασική» πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής σε πλατφόρμες υψηλής διαστατικότητας (φασματική/πλήρους φάσματος κυτταρομετρία ροής, κυτταρομετρία ροής εικόνας και κυτταρομετρία μάζας) έχει ενισχύσει μετρήσιμα την ικανότητα ταυτόχρονης ανάλυσης ανοσοφαινοτύπου, λειτουργικής κατάστασης και (σε ορισμένες περιπτώσεις) μορφολογικών/χωρικών χαρακτηριστικών σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου. Η ενσωμάτωση αυτών των τεχνολογιών στην αιματολογική ογκολογία αποτυπώνεται κυρίως σε τρεις άξονες: (i) βελτιστοποίηση ανίχνευσης/παρακολούθησης μετρήσιμης υπολειπόμενης νόσου (MRD), (ii) καλύτερη αποτύπωση ετερογένειας καρκίνου (π.χ. σπάνιοι υποκλώνοι, βλαστικοί

υποπληθυσμοί), και (iii) χαρτογράφηση μικροπεριβάλλοντος και λειτουργικών δικτύων σηματοδότησης ως βιοδείκτες πρόγνωσης/απάντησης (Zhang et al. 2025, Bandyopadhyay et al. 2019).

4.1 Φασματική/πλήρους φάσματος κυτταρομετρία ροής (Spectral / Full Spectrum Flow Cytometry): εφαρμογές σε MRD και στρατηγικές πολυπαραμετρικής ανάλυσης

Η κυτταρομετρία φάσματος ροής (SFC) βασίζεται στην καταγραφή του πλήρους φάσματος εκπομπής των φθοριοχρωμάτων και στον υπολογιστικό διαχωρισμό (unmixing), επιτρέποντας υψηλότερη πολυπλεξία και συχνά καλύτερο χειρισμό του spreading error σε σχέση με τα κλασικά φίλτρα/κανάλια. Η πρακτική συνέπεια είναι η δυνατότητα σχεδιασμού ευρύτερων πάνελ, συχνά με λιγότερους σωλήνες, και— κρίσιμα για κλινική ροή εργασίας—με μικρότερη απαίτηση σε αριθμό κυττάρων και χρόνο. Nolan & Condello 2013 και Brestoff 2023.

(α) AML: MRD με υψηλής πολυπλοκότητας πάνελ

Στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML), η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μετρήσιμης υπολειπόμενης νόσου (MRD) μέσω κυτταρομετρίας ροής αποτελεί καθιερωμένο προγνωστικό εργαλείο, ωστόσο περιορίζεται συχνά από την ανοσοφαινοτυπική ετερογένεια της νόσου και από τη δυσκολία σαφούς διάκρισης μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών προγονικών πληθυσμών. Στο πλαίσιο αυτό, η φασματική/πλήρους φάσματος κυτταρομετρία ροής (SFC/FSFC) επιτρέπει τον σχεδιασμό πάνελ υψηλής πολυπλεξίας που ενισχύουν την πληροφοριακή πυκνότητα ανά κύτταρο και υποστηρίζουν πιο αξιόπιστες στρατηγικές MRD.

Η ομάδα των Chen et al. (2023) ανέπτυξαν και αξιολόγησαν ένα 24-χρωμο full spectrum flow cytometry πάνελ με κύριο στόχο τη βελτίωση της ανίχνευσης MRD στην AML μέσω πληρέστερης ανοσοφαινοτυπικής κάλυψης τόσο των ανώμαλων βλαστικών πληθυσμών όσο και των φυσιολογικών μυελικών διαμερισμάτων. Το πάνελ σχεδιάστηκε ώστε να περιλαμβάνει δείκτες διαφοροποίησης, ωρίμανσης και γραμμής,

επιτρέποντας την ταυτόχρονη απεικόνιση πολλαπλών LAIP (leukemia-associated immunophenotypes) σε ένα ενιαίο tube. Κεντρικό εύρημα της μελέτης ήταν ότι η εκτεταμένη απεικόνιση φυσιολογικών μυελοειδών πληθυσμών (π.χ. πρόδρομοι κοκκιοκυττάρων, μονοκυτταρικές υποομάδες, μαστοκύτταρα) ενίσχυσε τη στρατηγική “different-from-normal”, μειώνοντας την πιθανότητα ψευδώς θετικών ή αμφίβολων ευρημάτων MRD σε επίπεδα χαμηλής νόσου. Επιπλέον, οι συγγραφείς έδειξαν ότι η χρήση full spectrum προσέγγισης διευκόλυνε τον σχεδιασμό του πάνελ χωρίς κρίσιμους περιορισμούς από φασματική επικάλυψη, διατηρώντας επαρκή διαχωρισμό σημάτων και σταθερότητα ανάλυσης.

Προχωρώντας πέρα από την ανίχνευση MRD, ο Zhang et al. (2025) παρουσίασαν ένα 29-χρωμο single-tube SFC assay που στοχεύει στη συνολική λειτουργική αναβάθμιση της εργαστηριακής εκτίμησης της AML σε δείγματα μυελού. Το πάνελ αυτό ενσωματώνει τρεις διακριτούς αλλά αλληλένδετους άξονες ανάλυσης: (i) ανίχνευση MRD με βάση LAIP και different-from-normal προσεγγίσεις, (ii) ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση λευχαιμικών βλαστικών κυττάρων (LSC) μέσω συνδυασμών δεικτών ωρίμανσης και αυτοανανέωσης, και (iii) αντικειμενική εκτίμηση αιμοαραίωσης (hemodilution) μέσω της κατανομής ώριμων και ανώριμων φυσιολογικών μυελικών πληθυσμών. Ιδιαίτερης σημασίας είναι το γεγονός ότι οι συγγραφείς εφάρμοσαν σαφώς ορισμένα αναλυτικά όρια (LOD/LOQ) και απέδειξαν υψηλή συμφωνία του single-tube SFC assay με καθιερωμένες πολυσωληνιακές προσεγγίσεις, τόσο ως προς την ευαισθησία MRD όσο και ως προς την αναπαραγωγιμότητα.

Συνολικά, τα δύο αυτά έργα αναδεικνύουν μια σαφή εννοιολογική μετατόπιση στη χρήση της κυτταρομετρίας ροής στην AML: από την αποσπασματική ανίχνευση ανώμαλων πληθυσμών προς την ολιστική, πολυπαραμετρική απεικόνιση του μυελού σε ένα ενιαίο αναλυτικό πλαίσιο. Η φασματική/πλήρους φάσματος κυτταρομετρία δεν λειτουργεί απλώς ως τεχνικό μέσο αύξησης του αριθμού δεικτών, αλλά ως πλατφόρμα που επιτρέπει την ταυτόχρονη ερμηνεία MRD, βιολογικής ετερογένειας και ποιότητας δείγματος. Τα δεδομένα των Chen et al. και Zhang et al. υποστηρίζουν ότι τέτοιες single-tube προσεγγίσεις μπορούν να μειώσουν την εργαστηριακή πολυπλοκότητα, να ενισχύσουν τη συγκρισιμότητα μεταξύ εργαστηρίων και να προσφέρουν πιο αξιόπιστη και κλινικά ουσιαστική εκτίμηση της υπολειπόμενης νόσου στην AML.

(β) B-ALL: κλινική διάγνωση/παρακολούθηση και πιθανή εφαρμογή σε κλινική ρουτίνα

Στην παιδιατρική και εφηβική B-κυτταρική οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (B-ALL), η κυτταρομετρία ροής αποτελεί βασικό εργαλείο τόσο για την αρχική διάγνωση όσο και για την παρακολούθηση της νόσου, ιδίως μέσω της ποσοτικοποίησης της μετρήσιμης υπολειπόμενης νόσου (MRD). Στο πλαίσιο αυτό, ο García-Aguilera et al. (2024) παρουσίασαν την επικύρωση ενός single-tube φασματικού (spectral) πάνελ σχεδιασμένου για κλινική χρήση σε εργαστήριο αναφοράς, το οποίο καλύπτει κρίσιμους δείκτες γραμμής, ωρίμανσης και ανωριμότητας των B-λεμφοβλαστών. Το πάνελ επέτρεψε την αξιόπιστη ταυτοποίηση ανώμαλων B-ALL πληθυσμών τόσο κατά τη διάγνωση όσο και κατά το follow-up, με ικανοποιητική ευαισθησία MRD και συμβατότητα με καθιερωμένες στρατηγικές ανάλυσης.

Ιδιαίτερη σημασία της μελέτης αποτελεί η τεκμηρίωση της επιχειρησιακής εφικτότητας της φασματικής κυτταρομετρίας σε περιβάλλον ρουτίνας. Οι συγγραφείς έδειξαν ότι η χρήση ενιαίου σωλήνα μειώνει τον απαιτούμενο αριθμό κυτάρων και την πολυπλοκότητα της προ-αναλυτικής διαδικασίας, χωρίς απώλεια διαγνωστικής πληροφορίας ή ανάγκη σημαντικών τροποποιήσεων στη ροή εργασίας του εργαστηρίου. Επιπλέον, η full spectrum προσέγγιση διευκόλυνε τον ισορροπημένο σχεδιασμό του πάνελ, επιτρέποντας την ταυτόχρονη αξιοποίηση δεικτών με επικαλυπτόμενα φάσματα και διατηρώντας σαφή διαχωρισμό μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών B-κυτταρικών προγονικών πληθυσμών.

Σε ευρύτερο πλαίσιο, τα δεδομένα αυτά συνάδουν με την άποψη ότι η φασματική/πλήρους φάσματος κυτταρομετρία μπορεί να λειτουργήσει ως πλατφόρμα εξορθολογισμού της κλινικής κυτταρομετρίας, μειώνοντας την ανάγκη για πολλαπλά tubes και επαναλαμβανόμενες μετρήσεις, ενώ ταυτόχρονα διατηρεί ή και ενισχύει την κλινική ερμηνευσιμότητα των αποτελεσμάτων. Όπως επισημαίνεται σε ανασκοπικές προσεγγίσεις και επιβεβαιώνεται από πρόσφατα single-tube assays, η επιτυχής εφαρμογή της SFC εξαρτάται από σχεδιασμό πάνελ εναρμονισμένο με καθιερωμένες συστάσεις MRD και από σαφή αναλυτικά όρια, στοιχεία που καθιστούν τη μέθοδο κατάλληλη για ευρύτερη υιοθέτηση σε εργαστήρια αναφοράς και, δυνητικά, σε κλινικά δίκτυα. Brestoff 2023; Zhang et al. 2025.

4.2 Κυτταρομετρία ροής εικόνας (Imaging Flow Cytometry): συνδυασμός ανοσοφαινότυπου και μορφολογίας σε επίπεδο κυττάρου

Η κυτταρομετρία ροής εικόνας (Imaging Flow Cytometry, IFC) αποτελεί υβριδική τεχνολογία που συνδυάζει τη στατιστική ισχύ και τη διαμεταγωγή της κυτταρομετρίας ροής (χιλιάδες έως εκατομμύρια γεγονότα ανά δείγμα) με την απεικόνιση σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου μέσω καναλιών brightfield και φθορισμού. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών (επιφανειακών και ενδοκυττάρων δεικτών) και μορφολογικών ή χωρικών παραμέτρων, όπως το μέγεθος, το σχήμα, η υφή, καθώς και η ενδοκυττάρια κατανομή του σήματος. Σε αντίθεση με τη συμβατική κυτταρομετρία ροής, όπου η πληροφορία περιορίζεται στην ένταση φθορισμού, η IFC εισάγει μετρήσιμες «χωρικές μεταβλητές» που μπορούν να αναλυθούν με αντικειμενικά, αλγοριθμικά κριτήρια. Dimitriadis et al. 2024.

Ένα κλασικό και κλινικά τεκμηριωμένο παράδειγμα εφαρμογής της IFC αποτελεί η ανίχνευση της κυτταροπλασματικής εντόπισης της nucleophosmin (NPM1) στην οξεία μυελογενή λευχαιμία. Η μελέτη των Grimwade et al. (2012) έδειξε ότι η IFC μπορεί να διακρίνει με αξιοπιστία το πρότυπο πυρηνικής έναντι κυτταροπλασματικής κατανομής της NPM, αξιοποιώντας τη χωρική πληροφορία της εικόνας και όχι αποκλειστικά την ένταση φθορισμού. Η προσέγγιση αυτή είναι εννοιολογικά κρίσιμη, καθώς η παθολογική ανακατανομή της NPM στο κυτταρόπλασμα αποτελεί βιολογικό γνώρισμα της νόσου που δεν μπορεί να αποτυπωθεί επαρκώς με κλασική κυτταρομετρία ροής χωρίς απεικόνιση. Με τον τρόπο αυτό, η IFC λειτουργεί ως γέφυρα μεταξύ μορφολογικής αξιολόγησης και ανοσοφαινοτυπικής ανάλυσης σε υψηλή κλίμακα.

Πέραν του συγκεκριμένου παραδείγματος, η IFC αναδεικνύεται ως κατάλληλη πλατφόρμα σε σενάρια όπου απαιτείται ταυτόχρονα: (i) αξιόπιστη ανοσοφαινοτυπική ταυτοποίηση σπάνιων κυτταρικών πληθυσμών μέσω πολυπαραμετρικής σήμανσης και (ii) μορφολογική ή υποκυττάρια τεκμηρίωση που σχετίζεται με τη λειτουργική κατάσταση ή τη βιολογία των κυττάρων, όπως η μετατόπιση πρωτεϊνών, η πολικότητα,

ή χαρακτηριστικά πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Η δυνατότητα αυτή καθιστά την IFC ιδιαίτερα χρήσιμη σε στοχευμένα διαγνωστικά ή μεταφραστικά ερωτήματα υψηλής ειδικότητας, όπου η απλή ποσοτικοποίηση έντασης φθορισμού δεν επαρκεί για ασφαλή ερμηνεία.

Ωστόσο, παρά τα σαφή εννοιολογικά και τεχνικά της πλεονεκτήματα, η ενσωμάτωση της IFC στην κλινική ρουτίνα παραμένει περιορισμένη σε σύγκριση με τη φασματική/πλήρους φάσματος κυτταρομετρία ροής. Οι λόγοι περιλαμβάνουν αυξημένες απαιτήσεις σε ανάλυση δεδομένων, μεγαλύτερο υπολογιστικό και αναλυτικό φόρτο, καθώς και την ανάγκη εξειδικευμένης ερμηνείας των απεικονιστικών παραμέτρων. Παρ' όλα αυτά, όπως επισημαίνεται στη σύγχρονη βιβλιογραφία, η εφαρμογή της IFC σε καλά ορισμένα κλινικά ερωτήματα—όπου η χωρική πληροφορία αποτελεί καθοριστικό διαγνωστικό ή βιολογικό κριτήριο—είναι σαφώς τεκμηριωμένη και συμπληρωματική των συμβατικών κυτταρομετρικών προσεγγίσεων. Dimitriadis et al. 2024; Grimwade et al. 2012.

4.3 Κυτταρομετρία μάζας (Mass Cytometry / CyTOF): λειτουργική χαρτογράφηση, βιοδείκτες απόκρισης και μικροπεριβάλλον

Η κυτταρομετρία μάζας (CyTOF) αποτελεί πλατφόρμα εξαιρετικά υψηλής πολυπλεξίας, η οποία αξιοποιεί αντισώματα επισημασμένα με σταθερά ισότοπα βαρέων μετάλλων και φασματομετρία μάζας χρόνου πτήσης για την ταυτόχρονη μέτρηση δεκάδων φαινοτυπικών και φωσφο-πρωτεϊνικών δεικτών σε επίπεδο μονήρους κυττάρου. Το κύριο πλεονέκτημα της προσέγγισης αυτής στην αιματολογία είναι η δυνατότητα συνδυασμού στατικού ανοσοφαινότυπου με λειτουργικές αναγνώσεις σηματοδότησης, προσφέροντας πληροφορία που υπερβαίνει την απλή ποσοτική καταγραφή κυτταρικών πληθυσμών.

(α) AML – λειτουργική πρόγνωση και πρόιμη εκτίμηση απόκρισης

Σε AML, η εφαρμογή single-cell phospho-signaling profiling με CyTOF έχει καταδείξει ότι πρότυπα ενεργοποίησης σε κρίσιμες οδούς επιβίωσης, μετάφρασης και κυτταρικού στρες μπορούν να διαφοροποιούν ασθενείς με πρόιμη ανταπόκριση από εκείνους με αντοχή στη θεραπεία. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την εκτίμηση λειτουργικής ευαισθησίας των λευχαιμικών κυττάρων σε πρώιμα χρονικά σημεία, πριν καταστούν εμφανείς μεταβολές στη μορφολογία ή στη μάζα νόσου, υποστηρίζοντας τον ρόλο της CyTOF ως συμπληρωματικού εργαλείου πρόγνωσης. Tislevoll et al. 2023.

(β) Ανθεκτική AML – φαρμακοδυναμική ανάλυση και βιοδείκτες αντοχής

Σε πλαίσιο κλινικής μελέτης συνδυαστικής θεραπείας με ficlatuzumab και cytarabine σε refractory AML, η phospho-proteomic mass cytometry κατέδειξε σαφή on-target αναστολή της MET σηματοδότησης μετά τη χορήγηση του μονοκλωνικού αντισώματος. Παράλληλα, η ανάλυση σε επίπεδο μονήρους κυττάρου ανέδειξε συγκεκριμένα μοτίβα downstream σηματοδότησης, όπως η μείωση του p-S6, τα οποία συσχετίστηκαν με κλινική ανταπόκριση. Τα ευρήματα αυτά τεκμηριώνουν τη δυνατότητα της CyTOF να λειτουργεί ως εργαλείο φαρμακοδυναμικής τεκμηρίωσης και να συνεισφέρει στον εντοπισμό μηχανισμών πρωτογενούς ή επίκτητης αντοχής. Wang et al. 2021.

(γ) Δευτεροπαθής AML – αποκάλυψη λειτουργικής ετερογένειας

Σε δευτεροπαθή AML, η χρήση mass cytometry σε συνδυασμό με μη επιβλεπόμενες αναλυτικές προσεγγίσεις έχει αποκαλύψει την ύπαρξη λειτουργικά «πρωτογενών» και ανοσοφαινοτυπικά διακριτών υποπληθυσμών, οι οποίοι δεν ανιχνεύονται εύκολα με συμβατικές στρατηγικές manual gating. Η αναγνώριση αυτών των πληθυσμών υποστηρίζει την έννοια ότι η βιολογική ετερογένεια της νόσου δεν αποτυπώνεται πλήρως με χαμηλής διάστασης μεθόδους και ενδέχεται να έχει επιπτώσεις στην πρόγνωση και στη θεραπευτική στόχευση. Bandyopadhyay et al. 2019.

(δ) Λεμφώματα/CLL και πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες: μικροπεριβάλλον και ανοσοθεραπεία

Σε Hodgkin lymphoma, CyTOF-βασισμένες προσεγγίσεις ανέδειξαν ανοσολογικά προφίλ του μικροπεριβάλλοντος που συσχετίζονται με ανταπόκριση σε PD-1 blockade, υποστηρίζοντας τη χρήση του immune profiling ως συμπληρωματικού εργαλείου κλινικής στρωματοποίησης. Αντίστοιχα, σε CLL και σε πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες, η υψηλής διάστασης ανάλυση του μυελικού ή σπληνικού μικροπεριβάλλοντος αποκάλυψε άξονες ανοσοκαταστολής και σημαντική κυτταρική ετερογένεια, με δυνητικές επιπτώσεις στον σχεδιασμό και τον χρονισμό ανοσοτροποποιητικών παρεμβάσεων. Cader et al. 2018; Wierz et al. 2018; Kourelis et al. 2019.

Συνολικά, τα παραπάνω παραδείγματα υποδεικνύουν ότι η κύρια κλινική συνεισφορά της κυτταρομετρίας μάζας έγκειται στη δυνατότητά της να παρέχει λειτουργικά και μικροπεριβαλλοντικά «readouts» υψηλής διάστασης, τα οποία συμπληρώνουν τις συμβατικές κυτταρομετρικές μετρήσεις. Αν και η εφαρμογή της παραμένει κυρίως μεταφραστική, τα δεδομένα υποστηρίζουν τη χρησιμότητά της ως πλατφόρμα ανακάλυψης βιοδεικτών και μηχανισμών, με στόχο τη μελλοντική ενσωμάτωση επιλεγμένων δεικτών σε απλούστερα, κλινικά εφαρμόσιμα assays.

4.4 Ρόλος στη Μελέτη του Μικροπεριβάλλοντος του Όγκου

Η έννοια του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (tumor microenvironment, TME) στις αιματολογικές κακοήθειες αναφέρεται στο σύνολο των μη νεοπλασματικών κυττάρων και δομών που συνυπάρχουν με τον κακοήγη κλώνο στον μυελό των οστών, στους λεμφαδένες ή στον σπλήνα, συμπεριλαμβανομένων των έμφυτων και επίκτητων ανοσοκυττάρων, των στρωματικών στοιχείων, των αγγειακών δομών και της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ νεοπλασματικών και μη νεοπλασματικών κυττάρων δεν αποτελούν παθητικό συνοδό φαινόμενο, αλλά ενεργό μηχανισμό που ρυθμίζει την επιβίωση του κακοήθους κλώνου, την ανοσοδιαφυγή, την αντοχή στη θεραπεία και τελικά την πιθανότητα υποτροπής και κλινικής εξέλιξης της νόσου (Unger et al. 2025).

Σε αυτό το πλαίσιο, η κυτταρομετρία ροής νέας γενιάς (NGFC) αναδεικνύεται ως καίριο εργαλείο για τη συστηματική και υψηλής ανάλυσης μελέτη του TME, καθώς επιτρέπει την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση και φαινοτυπική χαρτογράφηση πολλαπλών ανοσοκυτταρικών υποπληθυσμών στο ίδιο δείγμα. Η χρήση υψηλής παραμετρικότητας, σε συνδυασμό με τυποποιημένες αναλυτικές διαδικασίες, καθιστά δυνατή την ανάδειξη σύνθετων «ανοσολογικών υπογραφών», οι οποίες δεν είναι προσβάσιμες με χαμηλής διάστασης προσεγγίσεις και δύνανται να λειτουργήσουν ως βιοδείκτες πρόγνωσης, επιλογής θεραπείας ή παρακολούθησης της ανοσολογικής αποκατάστασης (Ravi et al. 2025; Czechowska et al. 2025).

Στο πολλαπλούν μυέλωμα, το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών (bone marrow microenvironment, BMME) δρα ως «υποστηρικτική θέση» για τα κλωνικά πλασματοκύτταρα μέσω κυτταροκινών, μορίων προσκόλλησης και ανοσοκατασταλτικών κυκλωμάτων. Μελέτες υψηλής διάστασης έχουν καταδείξει ότι στρωματικά κύτταρα, μυελοειδείς πληθυσμοί (όπως MDSCs και μακροφάγα τύπου M2) και ρυθμιστικά T-κύτταρα (Tregs) συμβάλλουν ενεργά στη διαμόρφωση ενός περιβάλλοντος που προάγει την εξέλιξη της νόσου και τη φαρμακοαντοχή, ενώ πρότυπα έκφρασης ανοσολογικών αξόνων, όπως PD-1/PD-L1, υπογραμμίζουν τη σημασία του ανοσολογικού προφίλ του BMME για την κλινική πορεία (Lopes et al. 2021; Costa et al. 2021; Fotiou & Katodritou 2025).

Η κυτταρομετρία μάζας (CyTOF) έχει διαδραματίσει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη συστηματική χαρτογράφηση του TME σε πραγματικούς ασθενείς, αποκαλύπτοντας ότι η ανοσολογική αναδιαμόρφωση αρχίζει ήδη σε προ-κακοήθεις καταστάσεις όπως MGUS και SMM και επιτείνεται κατά την εξέλιξη προς ενεργό ή ανθεκτικό μυέλωμα. Η αναγνώριση διακριτών «καταστάσεων» ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος, που σχετίζονται με στάδιο νόσου, προηγούμενη έκθεση σε θεραπείες και ανταπόκριση, υποστηρίζει την έννοια του TME ως δυναμικού βιολογικού άξονα με άμεση κλινική συνάφεια (Bailur et al. 2019; Visram et al. 2021; Van Oekelen et al. 2024).

Αντίστοιχα, σε οξείες λευχαιμίες και λεμφώματα, η υψηλής διάστασης κυτταρομετρία έχει συμβάλει στην ανάδειξη ανοσολογικών αξόνων κινδύνου και καταστολής, τόσο στον μυελό όσο και σε όργανα-στόχους όπως οι λεμφαδένες και ο σπλήνας. Μελέτες σε παιδιατρικές λευχαιμίες, AML και ορισμένα λεμφώματα έχουν δείξει ότι η σύσταση και η λειτουργική κατάσταση των T και NK κυττάρων, καθώς και η παρουσία

υποστηρικτικών μυελοειδών πληθυσμών, σχετίζονται με κλινικά χαρακτηριστικά κινδύνου, ανοσοδιαφυγή και αντοχή στη θεραπεία (Bailur et al. 2020; Edwards et al. 2019; Anagnostou et al. 2023).

Η spectral/full spectrum flow cytometry, λόγω της ευρύτερης διαθεσιμότητάς της σε κλινικά εργαστήρια και της δυνατότητας υψηλής παραμετρικότητας με χαμηλότερες απαιτήσεις σε κυτταρικό υλικό, αποτελεί ρεαλιστική πλατφόρμα για την αποτύπωση του ανοσολογικού τοπίου σε ιστούς-στόχους και για τη δυναμική παρακολούθηση ανοσοθεραπειών, συμπεριλαμβανομένων των κυτταρικών θεραπειών. Παράλληλα, η imaging flow cytometry λειτουργεί συμπληρωματικά, εισάγοντας χωρική και λειτουργική πληροφορία υψηλής αξίας σε ερωτήματα που αφορούν κυτταρικές αλληλεπιδράσεις, όπως η ανοσολογική σύναψη, η πολικότητα και η κυτταροτοξικότητα, τα οποία δεν μπορούν να αποτυπωθούν επαρκώς με συμβατική ροή (Ahmed et al. 2009; Viswanath et al. 2017).

Συνολικά, η μελέτη του μικροπεριβάλλοντος του όγκου στις αιματολογικές κακοήθειες καθιστά αναγκαία τη χρήση πλατφορμών NGFC, καθώς μόνο μέσω υψηλής παραμετρικότητας και ανάλυσης σε επίπεδο μονήρους κυττάρου είναι δυνατή η κατανόηση των πολύπλοκων ανοσολογικών και στρωματικών αλληλεπιδράσεων που καθορίζουν την κλινική πορεία και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Η NGFC δεν προσθέτει απλώς περισσότερους δείκτες, αλλά επιτρέπει μια λειτουργική και δυναμική προσέγγιση του TME, η οποία αποτελεί προϋπόθεση για την ανάπτυξη αξιόπιστων βιοδεικτών και στρατηγικών εξατομικευμένης θεραπείας.

4.5 Συνοπτική αποτίμηση κλινικής αξίας

Συνολικά, η φασματική/πλήρους φάσματος κυτταρομετρία ροής (SFC) παρουσιάζει το πλέον άμεσο και ρεαλιστικό «μονοπάτι» προς ευρεία κλινική εφαρμογή, κυρίως λόγω σαφών επιχειρησιακών πλεονεκτημάτων, όπως ο σχεδιασμός single-tube πάνελ, οι μειωμένες απαιτήσεις σε κυτταρικό υλικό και η αυξημένη πληροφοριακή πυκνότητα ανά δείγμα. Τα πλεονεκτήματα αυτά έχουν ήδη μεταφραστεί σε τεκμηριωμένες εφαρμογές στη μέτρηση μετρήσιμης υπολειπόμενης νόσου (MRD) σε AML και B-

ALL, με δεδομένα που υποστηρίζουν συγκρισιμότητα ή και υπεροχή έναντι πολυσωληναριακών προσεγγίσεων. Ωστόσο, η ευρύτερη υιοθέτηση της SFC προϋποθέτει αυστηρό σχεδιασμό πάνελ, τυποποίηση αναλυτικών ορίων και επαρκή εκπαίδευση στην ερμηνεία δεδομένων υψηλής διάστασης, ώστε η αυξημένη πολυπλεξία να μη μεταφραστεί σε αυξημένη δια-εργαστηριακή μεταβλητότητα. Zhang et al. 2025; Chen et al. 2023; García-Aguilera et al. 2024.

Η κυτταρομετρία ροής εικόνας (IFC) καταλαμβάνει πιο εξειδικευμένη θέση στο κλινικό φάσμα εφαρμογών, καθώς η αξία της αναδεικνύεται κυρίως σε στοχευμένα ερωτήματα όπου η χωρική ή μορφολογική πληροφορία αποτελεί κρίσιμο διαγνωστικό ή βιολογικό κριτήριο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αξιολόγηση υποκυττάριας εντόπισης της NPM1 στην AML, όπου η IFC προσφέρει πληροφορία που δεν μπορεί να εξαχθεί αξιόπιστα από τη συμβατική κυτταρομετρία ροής. Παρά τα πλεονεκτήματα αυτά, οι αυξημένες απαιτήσεις σε ανάλυση δεδομένων, η ανάγκη εξειδικευμένης ερμηνείας και η περιορισμένη τυποποίηση περιορίζουν προς το παρόν τη χρήση της IFC σε εξειδικευμένα κέντρα και σε κλινικά ερωτήματα υψηλής ειδικότητας. Grimwade et al. 2012.

Η κυτταρομετρία μάζας (CyTOF), τέλος, παραμένει κατά κύριο λόγο εργαλείο ερευνητικής και μεταφραστικής αιματολογίας, με περιορισμένη άμεση εφαρμογή σε κλινική ρουτίνα. Παρ' όλα αυτά, η δυνατότητα ταυτόχρονης μέτρησης δεκάδων φαινοτυπικών και λειτουργικών δεικτών σε επίπεδο μονήρους κυττάρου έχει ήδη αποδώσει υψηλής αξίας δεδομένα σχετικά με μηχανισμούς απόκρισης και αντοχής στη θεραπεία, καθώς και με τη σύνθεση και λειτουργία του ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος σε λευχαιμίες, λεμφώματα και πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες. Η κύρια κλινική συνεισφορά της CyTOF εντοπίζεται σήμερα στη φαρμακοδυναμική τεκμηρίωση και στην ανακάλυψη βιοδεικτών, με στόχο τη μελλοντική μεταφορά επιλεγμένων δεικτών σε απλούστερες και περισσότερο τυποποιημένες πλατφόρμες. Tislevoll et al. 2023; Wang et al. 2021; Wierz et al. 2018.

Συμπερασματικά, η κυτταρομετρία ροής παραμένει αναπόσπαστο εργαλείο στη διάγνωση, ταξινόμηση και παρακολούθηση των αιματολογικών κακοηθειών, ενώ οι τεχνολογίες νέας γενιάς επεκτείνουν ουσιαστικά τις δυνατότητές της. Η πραγματική προστιθέμενη αξία των νέων πλατφορμών δεν έγκειται αποκλειστικά στην αύξηση της πολυπλεξίας, αλλά στην ικανότητά τους να παράγουν κλινικά ερμηνεύσιμη και

αναπαραγώγιμη πληροφορία, υπό την προϋπόθεση κατάλληλης τυποποίησης, ποιοτικού ελέγχου και ενσωμάτωσης σε ρεαλιστικές ροές εργασίας.

4.6 Προκλήσεις στη Διαγνωστική Εφαρμογή

Παρά τις σαφείς τεχνικές και κλινικές δυνατότητες της κυτταρομετρίας ροής νέας γενιάς (NGFC), η εφαρμογή της στη διαγνωστική πράξη—και ιδίως στη μέτρηση της μετρήσιμης υπολειπόμενης νόσου (MRD)—συνοδεύεται από προκλήσεις που αφορούν τόσο το προ-αναλυτικό και αναλυτικό στάδιο όσο και την ερμηνεία και κλινική αξιοποίηση των αποτελεσμάτων. Οι προκλήσεις αυτές διαφοροποιούνται εν μέρει ανάλογα με την τεχνολογική πλατφόρμα (κυτταρομετρία φάσματος ροής, κυτταρομετρία ροής εικόνας και κυτταρομετρία μάζας), γεγονός που καθιστά αναγκαία μια διαφοροποιημένη αλλά εναρμονισμένη προσέγγιση.

Ένα βασικό ζήτημα αφορά τους προ-αναλυτικούς παράγοντες και την ποιότητα του δείγματος, οι οποίοι επηρεάζουν καθοριστικά την αξιοπιστία της MRD. Η αιμοαραίωση του μυελικού δείγματος, ο χρόνος μέχρι την επεξεργασία και η βιωσιμότητα των κυττάρων μπορούν να αλλοιώσουν την αναλογία φυσιολογικών και παθολογικών πληθυσμών, οδηγώντας σε υποεκτίμηση της νόσου. Το ζήτημα αυτό είναι ιδιαίτερα κρίσιμο για τη κυτταρομετρία φάσματος ροής, όπου η στρατηγική “different-from-normal” βασίζεται στην επαρκή αναπαράσταση φυσιολογικών μυελικών πληθυσμών. Για τον λόγο αυτό, διεθνείς ομάδες υπογραμμίζουν την ανάγκη συστηματικής τεκμηρίωσης του δείγματος, του αριθμού των αποκτηθέντων γεγονότων και των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης στο τελικό report. Flores-Montero et al. 2017; van Dongen et al. 2018.

Η τυποποίηση και η δια-εργαστηριακή εναρμόνιση αποτελούν δεύτερο κρίσιμο άξονα. Η NGFC αποδίδει αξιόπιστα μόνο όταν εφαρμόζεται με σαφώς ορισμένα πρωτόκολλα (SOPs), τακτικούς ελέγχους απόδοσης των οργάνων και συμμετοχή σε σχήματα εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου. Η ανάγκη αυτή είναι ιδιαίτερα εμφανής στη κυτταρομετρία φάσματος, όπου μικρές αποκλίσεις σε ρυθμίσεις, αντιδραστήρια ή υπολογιστική αποσύζευξη μπορούν να επηρεάσουν την αναπαραγωγιμότητα. Αντίστοιχα, στην κυτταρομετρία ροής εικόνας, η έλλειψη ευρέως αποδεκτών προτύπων ανάλυσης εικόνας περιορίζει τη συγκρισιμότητα μεταξύ εργαστηρίων, ενώ στην κυτταρομετρία μάζας η πολυπλοκότητα των πάνελ και των μέσα πληροφορίας

ανάλυσης καθιστά την τυποποίηση ακόμη πιο απαιτητική. Kalina et al. 2012; van Dongen et al. 2012.

Ένα επιπλέον επίπεδο δυσκολίας σχετίζεται με την πολυπλοκότητα των δεδομένων και την ανάγκη εξειδικευμένης ερμηνείας. Η αυξημένη παραμετρικότητα των NGFC πάνελ απαιτεί εμπειρία στον σχεδιασμό αντισωμάτων, στη χρήση κατάλληλων εσωτερικών ελέγχων και στην ανάλυση πολυδιάστατων προτύπων. Στη κυτταρομετρία φάσματος, ανοσοφαινοτυπικές μετατοπίσεις μετά από στοχευμένες θεραπείες μπορεί να περιορίσουν τη χρησιμότητα σταθερών LAIP, επιβάλλοντας προσαρμογή των στρατηγικών ανάλυσης. Στην IFC, η ερμηνεία μορφολογικών και χωρικών παραμέτρων απαιτεί πρόσθετη αναλυτική εξειδίκευση, ενώ στην CyTOF η μη επιβλεπόμενη ανάλυση μεγάλων δεδομένων συνδέεται με αυξημένες απαιτήσεις βιοπληροφορικής και προσεκτικής βιολογικής επικύρωσης. van Dongen et al. 2012; Wood et al. 2018.

Τέλος, σημαντικό εμπόδιο για την ευρύτερη εφαρμογή της NGFC αποτελεί το κόστος, οι απαιτήσεις σε υποδομές και οι κανονιστικές διαδικασίες επικύρωσης. Η εισαγωγή φασματικών πλατφορμών, συστημάτων IFC ή CyTOF προϋποθέτει επένδυση σε εξοπλισμό, λογισμικό και αναλώσιμα, καθώς και την ανάπτυξη τεκμηριωμένων διαδικασιών επικύρωσης που να καλύπτουν ακρίβεια, ευαισθησία, επαναληψιμότητα και ιχνηλασιμότητα. Μελέτες επικύρωσης πολυχρωματικών MRD assays καταδεικνύουν ότι η μετάβαση από ερευνητική σε ευρεία κλινική εφαρμογή απαιτεί προσέγγιση «ρυθμιστικού τύπου», ανεξαρτήτως της επιμέρους τεχνολογικής πλατφόρμας. Jennings et al. 2014; Wood et al. 2018.

Συνολικά, η NGFC έχει μετασχηματίσει ουσιαστικά την ανοσοφαινοτυπική διάγνωση και τη μέτρηση MRD στις αιματολογικές κακοήθειες. Η επιτυχής κλινική αξιοποίησή της, ωστόσο, εξαρτάται από την προσεκτική αντιμετώπιση τεχνικών και οργανωτικών προκλήσεων, καθώς και από την ενσωμάτωση των αποτελεσμάτων στο ευρύτερο διαγνωστικό πλαίσιο (WHO, ELN, IMWG), ώστε τα υψηλής διάστασης δεδομένα να μεταφράζονται σε αξιόπιστες και κλινικά ουσιαστικές αποφάσεις.

5. Εφαρμογές και Μέλλον της Κυτταρομετρίας Ροής Νέας Γενιάς στην Κλινική Πρακτική

Η κυτταρομετρία ροής νέας γενιάς (NGFC) αποτελεί πλέον κεντρικό εργαλείο της σύγχρονης εργαστηριακής αιματολογίας, καθώς συνδυάζει υψηλή παραμετρικότητα, αυξημένη αναλυτική ευαισθησία και προοδευτική τυποποίηση της μεθοδολογίας. Στην κλινική πράξη, η NGFC αξιοποιείται τόσο για την αρχική ανοσοφαινοτυπική τεκμηρίωση και ταξινόμηση των αιματολογικών κακοηθειών όσο και για την παρακολούθηση της θεραπευτικής ανταπόκρισης, κυρίως μέσω της μέτρησης της μετρήσιμης υπολειμματικής νόσου (MRD). Η χρήση της εντάσσεται στο πλαίσιο της «ενσωματωμένης διάγνωσης», όπου ο ανοσοφαινότυπος συσχετίζεται με μορφολογικά, κυτταρογενετικά και μοριακά δεδομένα, όπως αποτυπώνεται και στις πρόσφατες ταξινομήσεις WHO-HAEM5 (Alaggio et al. 2022).

Στην καθημερινή κλινική πρακτική, η NGFC υποστηρίζει τρεις βασικούς άξονες: τη διάγνωση και τυποποίηση του νοσήματος, την εκτίμηση του βάθους της ανταπόκρισης μέσω MRD και την ανοσοπαρακολούθηση ασθενών υπό σύγχρονες ανοσοθεραπείες ή κυτταρικές θεραπείες. Η MRD αποτυπώνει υποκλινική νόσο και έχει καθιερωθεί ως ισχυρός προγνωστικός δείκτης, αλλά και ως συγκρίσιμο τελικό σημείο σε κλινικές μελέτες, με αυξανόμενη σημασία σε νοσήματα όπως το πολλαπλούν μυέλωμα και η οξεία μυελογενής λευχαιμία. Παράλληλα, η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο για την παρακολούθηση CAR-T θεραπειών, επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση και φαινοτυπική ανάλυση της επέκτασης και επιμονής των CAR-T κυττάρων, ιδίως όταν είναι διαθέσιμα εξειδικευμένα αντιδραστήρια, σε συνδυασμό με μοριακές τεχνικές.

Η ταχεία αύξηση της πολυπλοκότητας των πάνελ, η ωρίμανση των υπολογιστικών εργαλείων και η σταδιακή εναρμόνιση αναλυτικών διαδικασιών μετασχηματίζουν την κυτταρομετρία από τεχνική απλής «πολυχρωμίας» σε ολοκληρωμένη πλατφόρμα υψηλής διάστασης για τη μέτρηση της κυτταρικής ταυτότητας και λειτουργικής κατάστασης. Στις αιματολογικές κακοήθειες, η κλινική αξιοποίηση τεχνολογιών όπως

η spectral/full spectrum flow cytometry, η imaging flow cytometry και η mass cytometry αναμένεται να επηρεάσει κυρίως την κλιμάκωση της MRD με μεγαλύτερη πληροφοριακή πυκνότητα ανά δείγμα, την ανοσοπαρακολούθηση υπό ανοσοθεραπευτικές παρεμβάσεις και την ανάπτυξη λειτουργικών ή μικροπεριβαλλοντικών βιοδεικτών που θα μεταφραστούν σε απλούστερα κλινικά assays (Saeys et al. 2016).

Η μετάβαση προς φασματικές και πλήρους φάσματος πλατφόρμες επιτρέπει τον σχεδιασμό ενιαίων, υψηλής παραμετρικότητας πάνελ που ενσωματώνουν ταυτόχρονα την ανίχνευση ανώμαλων πληθυσμών, πληθυσμούς αναφοράς για προσέγγιση “different-from-normal” και έμμεσους ελέγχους ποιότητας δείγματος, όπως η εκτίμηση αιμοαραιώσης. Η κατεύθυνση αυτή ευθυγραμμίζεται με την ανάγκη η MRD να αναφέρεται με σαφώς ορισμένα αναλυτικά χαρακτηριστικά και εναρμονισμένα πρωτόκολλα, ώστε να είναι συγκρίσιμη μεταξύ εργαστηρίων και κλινικών δοκιμών. Η κλινική πρόκληση για τα επόμενα χρόνια είναι η τεκμηρίωση, σε πολυκεντρικό επίπεδο, ότι η επιπλέον πληροφορία της υψηλής διάστασης οδηγεί σε ουσιαστική βελτίωση της κλινικής απόδοσης χωρίς απώλεια αναπαραγωγιμότητας (Cossarizza et al. 2021).

Η αύξηση της διάστασης καθιστά αναπόφευκτη τη συστηματική ενσωμάτωση υπολογιστικών προσεγγίσεων στην ανάλυση κυτταρομετρικών δεδομένων. Η υπολογιστική κυτταρομετρία έχει ήδη αναγνωριστεί ως κρίσιμη γέφυρα μεταξύ βιολογικών ερωτημάτων και δεδομένων υψηλής διάστασης, ενώ η επόμενη φάση αφορά την ελεγχόμενη κλινική της μετάφραση. Μελέτες έχουν δείξει ότι αυτοματοποιημένοι αλγόριθμοι μπορούν να αναπαράγουν με ικανοποιητική ακρίβεια ειδικούς χειρισμούς manual gating και να λειτουργήσουν ως υποβοηθητικά συστήματα κλινικής απόφασης, υπό την προϋπόθεση αυστηρής επικύρωσης και ανθρώπινης επίβλεψης (Aghaeepour et al. 2013; Ng et al. 2021). Ιδιαίτερη σημασία αποκτά η έννοια της εξηγήσιμης τεχνητής νοημοσύνης, καθώς η ερμηνευσιμότητα των προβλέψεων αποτελεί βασική προϋπόθεση για κλινική αποδοχή (Simonson et al. 2021).

Παράλληλα, η αξιόπιστη κλινική εφαρμογή υψηλής διάστασης κυτταρομετρίας προϋποθέτει ισχυρές «υποδομές ποιότητας» σε όλα τα στάδια της διαδικασίας. Τα πρότυπα ελάχιστης πληροφορίας (MIFlowCyt), η συστηματική τεκμηρίωση μεταδεδομένων και η αντιμετώπιση των batch effects μέσω αλγορίθμων

κανονικοποίησης αποτελούν βασικούς πυλώνες για την αναπαραγωγικότητα και τη συγκρισιμότητα των αποτελεσμάτων, ιδίως σε πολυκεντρικά ή διαχρονικά δεδομένα (Lee et al. 2008; Van Gassen et al. 2020).

Οι σύγχρονες ταξινομήσεις και θεραπευτικές οδηγίες προωθούν ολοένα και περισσότερο την έννοια της ενσωματωμένης διάγνωσης, όπου ο ανοσοφαινότυπος συνδυάζεται με κυτταρογενετικά και μοριακά ευρήματα για ακριβέστερο καθορισμό οντότητας, πρόγνωσης και θεραπευτικής στρατηγικής. Σε αυτό το πλαίσιο, η NGFC λειτουργεί ως κρίσιμη γέφυρα μεταξύ φαινοτύπου και γονότυπου, ιδίως σε νοσήματα με έντονη βιολογική ετερογένεια. Σε ερευνητικό επίπεδο, η σύζευξη υψηλής παραμετρικότητας κυτταρομετρίας με single-cell μεταγραφωμικές και πολυτροπικές προσεγγίσεις έχει αναδείξει κρυμμένους υποκλώνους και πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις όγκου-μικροπεριβάλλοντος, δημιουργώντας προϋποθέσεις για την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών που δυνητικά μπορούν να μεταφραστούν σε κλινικά εφαρμόσιμα εργαλεία (Stoeckius et al. 2017; Hao et al. 2021).

Η μελλοντική κατεύθυνση της κλινικής ενσωμάτωσης δεν εξαρτάται αποκλειστικά από την τεχνολογία μέτρησης, αλλά από την ικανότητα εναρμόνισης, αξιόπιστης κανονικοποίησης, ερμηνεύσιμης αυτοματοποίησης και πολυτροπικής ολοκλήρωσης, ώστε το υψηλής διάστασης σήμα να μετατρέπεται σε κλινικά αξιοποιήσιμη πληροφορία.

Περίληψη

Η παρούσα ανασκοπική μελέτη εξετάζει τον ρόλο της κυτταρομετρίας ροής νέας γενιάς στην ακριβέστερη διάγνωση, ταξινόμηση, προγνωστική στρωματοποίηση και παρακολούθηση των αιματολογικών κακοηθειών, με ιδιαίτερη έμφαση στη μέτρηση της μετρήσιμης υπολειμματικής νόσου (MRD). Εστιάζει σε τρεις συμπληρωματικές τεχνολογικές πλατφόρμες: τη φασματική/πλήρους φάσματος κυτταρομετρία ροής, την κυτταρομετρία ροής εικόνας και την κυτταρομετρία μάζας. Η κυτταρομετρία φάσματος επιτρέπει τον σχεδιασμό μονοσωληνικών πάνελ υψηλής πολυπλεξίας, υποστηρίζοντας ευαίσθητη ανίχνευση MRD και πληρέστερη αποτύπωση της ανοσοφαινοτυπικής ετερογένειας σε λευχαιμίες. Η κυτταρομετρία ροής εικόνας προσθέτει ποσοτικοποιήσιμη μορφολογική και χωρική πληροφορία σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου, ενισχύοντας εφαρμογές όπου η υποκυττάρια εντόπιση και οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις έχουν διαγνωστική ή λειτουργική σημασία. Η κυτταρομετρία μάζας προσφέρει εξαιρετικά υψηλή πολυπλεξία και λειτουργικές αναγνώσεις σηματοδότησης, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη βιοδεικτών απόκρισης, στη διερεύνηση μηχανισμών αντοχής και στη σε βάθος χαρτογράφηση του ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος. Συνολικά, αναδεικνύεται ότι η επιτυχής κλινική μετάφραση των υψηλοδιάστατων προσεγγίσεων προϋποθέτει αυστηρή προτυποποίηση, κανονικοποίηση και αξιόπιστα υπολογιστικά μέσα πληροφορίας, ώστε τα παραγόμενα δεδομένα να οδηγούν σε αναπαραγώγιμα και κλινικά αξιοποιήσιμα συμπεράσματα.

Abstract

This narrative review examines the role of next-generation, high-dimensional cytometry in improving diagnostic accuracy, disease classification, prognostic stratification, and monitoring of hematologic malignancies, with particular emphasis on measurable residual disease (MRD). The review focuses on three complementary technological platforms: spectral/full spectrum flow cytometry, imaging flow cytometry, and mass cytometry. Spectral flow cytometry enables the design of high-multiplex single-tube panels, supporting sensitive MRD detection and a more comprehensive assessment of immunophenotypic heterogeneity in leukemias. Imaging flow cytometry adds quantifiable morphological and spatial information at the single-cell level, strengthening applications in which subcellular localization and cell–cell interactions are of diagnostic or functional relevance. Mass cytometry provides exceptionally high multiplexing capacity and functional signaling readouts, facilitating response biomarker development, investigation of resistance mechanisms, and in-depth mapping of the immune tumor microenvironment. Overall, the review highlights that successful clinical translation of high-dimensional cytometry requires rigorous standardization, normalization, and robust computational μέσα πληροφορίας to ensure reproducible and clinically actionable results.

Βιβλιογραφία

1. Acosta M, Pereira J, Arroz M (2016) Screening of carcinoma metastasis by flow cytometry: a study of 238 cases. *Cytometry B Clin Cytom* 90(3):289–294. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21258>.
2. Adan A., Alizada G., Kiraz Y., Baran Y., Nalbant A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163–176. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
3. Aghaeepour N, Finak G, Hoos H, et al. (2013) Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques. *Nat Methods* 10(3):228–238. PMID: 23396282.
4. Ahmed F, et al. (2009) Numbers matter: quantitative and dynamic analysis of immunological synapse formation using imaging flow cytometry. *J Immunol Methods*. PMID: 19524586.
5. Alaggio R., Amador C., Anagnostopoulos I., et al. (2022). The 5th edition of the WHO Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*, 36(7), 1720–1748. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01620-2>
6. Amador-Ortiz C, Goolsby CL, Peterson LC et al (2015) Flow cytometric analysis of lymphoid enhancer-binding factor 1 in diagnosis of chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Am J Clin Pathol* 143(2):214–222. <https://doi.org/10.1309/AJCPT32JDFIGHFHJ>. PMID: 25596247
7. Anagnostou T, et al. (2023) Characterization of immune exhaustion and suppression in splenic marginal zone lymphoma by mass cytometry. *Blood Adv*. PMID: 37117318.
8. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R.P., et al. (2022). International Consensus Classification (ICC) of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias. *Blood*, 140(11), 1200–1228. <https://doi.org/10.1182/blood.2022015850>
9. Astakhova E.A., Gubaeva A.S., Naumova D.A., et al. (2025). Spectral Flow Cytometry: The Current State and Future of the Technology. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(12), 5911. <https://doi.org/10.3390/ijms26125911>
10. Bailur JK, et al. (2019) Early alterations in stem-like/resident T cells, innate and myeloid compartments in myeloma premalignancy revealed by single-cell mass cytometry. *Nat Med*. PMID: 31013254.

11. Bailur JK, et al. (2020) Risk-associated alterations in marrow T cells in pediatric leukemia. *JCI Insight* 5(16):e140179. doi:10.1172/jci.insight.140179. PMID: 32692727.
12. Bandura DR, Baranov VI, Ornatsky OI, et al. (2009) Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 81(16):6813–6822. doi:10.1021/ac901049w. PMID: 19601617.
13. Bandyopadhyay S, et al. (2019) Identification of functionally primitive and immunophenotypically distinct subpopulations in secondary AML by mass cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 96(1):46–56. PMID: 30426661.
14. Becht E, McInnes L, Healy J, et al. (2019) Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nat Biotechnol* 37(1):38–44. PMID: 30531897.
15. Behbehani GK. (2017) Applications of Mass Cytometry in Clinical Medicine: The Promise and Perils of Clinical CyTOF. *Clin Lab Med* 37(4):945–964. doi:10.1016/j.cll.2017.07.010. PMID: 29128078.
16. Bento LC, Correia RP, Pitangueiras Mangureira CL et al (2017) The use of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a review. *Front Oncol* 7:270. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00270>. PMID: 29188193; PMCID: PMC5694750
17. Berg H, Otteson GE, Corley H et al (2021) Flow cytometric evaluation of TRBC1 expression in tissue specimens and body fluids is a novel and specific method for assessment of T-cell clonality and diagnosis of T-cell neoplasms. *Cytometry B Clin Cytom* 100(3):361–369. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21881>. Epub 2020 Apr 25. PMID: 32333725
18. Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE et al (1993) Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *Am J Clin Pathol* 100(5):534–540. <https://doi.org/10.1093/ajcp/100.5.534>. PMID: 8249893
19. Böttcher S, et al. (2022) Expert-independent classification of mature B-cell neoplasms by standardized flow cytometry and diagnostic reference libraries. *Blood Adv*. PMID: 34814179.
20. Brestoff JR. (2023) Full spectrum flow cytometry in the clinical laboratory. *Int J Lab Hematol* 45(Suppl 1):15–21. doi:10.1111/ijlh.14066. PMID: 37211417.

21. Cader FZ, et al. (2018) Mass cytometry of Hodgkin lymphoma reveals a CD4+ regulatory T-cell-rich and exhausted T-effector microenvironment. *Blood* 132(8):825–836. doi:10.1182/blood-2018-04-843714. PMID: 29880615.
22. Campbell JJ, Clark RA, Watanabe R et al (2010) Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood* 116:767–771. PMID: 20484084
23. Cessna MH, Hartung L, Tripp S et al (2005) Hairy cell leukemia variant: fact or fiction. *Am J Clin Pathol* 123(1):132–138. <https://doi.org/10.1309/8qytyq1clqmhq9cl>. PMID: 15762289
24. Chen M, Fu M, Gong M, et al. (2023) Twenty-four-color full spectrum flow cytometry panel for minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Open Med (Wars)* 18(1):20230745. doi:10.1515/med-2023-0745. PMID: 37533738.
25. Chen X, Cherian S (2017) Acute myeloid leukemia immunophenotyping by flow cytometric analysis. *Clin Lab Med* 37(4):753–769. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.07.003>. Epub 2017 Aug 31. PMID: 29128067
26. Cholujoval D, et al. (2025) CyTOF profiling of bone marrow immune dynamics across MGUS, SMM and multiple myeloma stages. *Oncoimmunology*. doi:10.1080/2162402X.2025.2542333. PMID: 40820826.
27. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, et al. (2021) Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (third edition). *Eur J Immunol* 51(12):2708–3145. PMID: 34910301.
28. Craig FE, Foon KA (2008) Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 111(8):3941–3967. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-120535>. Epub 2008 Jan 15. PMID: 18198345
29. Craig JW, Dorfman DM (2017) Flow cytometry of T cells and T-cell neoplasms. *Clin Lab Med* 37(4):725–751. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.07.002>. Epub 2017 Oct 3. PMID: 29128066
30. Danielsen HE, Pradhan M, Novelli M (2016) Revisiting tumour aneuploidy – the place of ploidy assessment in the molecular era. *Nat Rev Clin Oncol* 13(5):291–304. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.208>. Epub 2015 Nov 24. PMID: 26598944
31. Davidson-Moncada J, et al. (2018) Dissecting the Immune Landscape of Acute Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel)*. PMID: 30477280.

32. Davis B.H., Holden J.T., Béne M.C., et al. (2007). 2006 Bethesda International Consensus: Medical indications for flow cytometric immunophenotyping of hematolymphoid neoplasia. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 72(Suppl 1), S5–S13. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20365>
33. Della Porta MG, Picone C, Pascutto C et al (2012) Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNET study. *Haematologica* 97(8):1209–1217. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.048421>. Epub 2012 Feb 7. PMID: 22315489; PMCID: PMC3409819
34. Devine RD, Behbehani GK. (2021) Mass Cytometry, Imaging Mass Cytometry, and Multiplexed Ion Beam Imaging Use in a Clinical Setting. *Clin Lab Med* 41(2):297–308. doi:10.1016/j.cll.2021.03.008. PMID: 34020765.
35. DiGiuseppe JA, Wood BL (2019) Applications of flow cytometric immunophenotyping in the diagnosis and posttreatment monitoring of B and T lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom* 96(4):256–265. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21833>. Epub 2019 Jun 24. PMID: 31231940
36. Dimitriadis A, et al. (2024) Imaging Flow Cytometry: Development, Present Applications, and Future Challenges. *Methods Protoc* 7(2):28. doi:10.3390/mps7020028. PMID: 38668136.
37. Döhner H., Wei A.H., Appelbaum F.R., et al. (2022). Diagnosis and management of AML in adults: 2022 ELN recommendations. *Blood*, 140(12), 1345–1377. <https://doi.org/10.1182/blood.2022016867>
38. Duetz C, Westers TM, van de Loosdrecht AA (2019) Clinical implication of multi-parameter flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Pathobiology* 86(1):14–23. <https://doi.org/10.1159/000490727>. Epub 2018 Sep 18. PMID: 30227408; PMCID: PMC6482988
39. Edwards DK 5th, et al. (2019) CSF1R inhibitors exhibit antitumor activity in acute myeloid leukemia by blocking paracrine signals from support cells. *Blood* 133(6):588–599. doi:10.1182/blood-2018-03-838946. PMID: 30425048.
40. Eidschink Brodersen L, Alonzo TA, Menssen AJ et al (2016) A recurrent immunophenotype at diagnosis independently identifies high-risk pediatric acute myeloid leukemia: a report from Children’s Oncology Group. *Leukemia* 30(10):2077–2080. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.119>. Epub 2016 May 2. PMID: 27133823; PMCID: PMC5136463

41. Escribano L, Garcia Montero AC, Núñez R et al (2006) Flow cytometric analysis of normal and neoplastic mast cells: role in diagnosis and follow-up of mast cell disease. *Immunol Allergy Clin N Am* 26(3):535–547. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2006.05.008>. PMID: 16931292
42. Fernandez N, et al. (2022) High Dimensional Immune Profiling of Smoldering Multiple Myeloma by Mass Cytometry and TCR Sequencing. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. doi:10.1016/j.clml.2022.07.001. PMID: 35945129.
43. Flores-Montero J, et al. (2017) Next Generation Flow for highly sensitive and standardized MRD detection in multiple myeloma. *Leukemia*. PMID: 28104919.
44. García-Aguilera G, et al. (2024) Validation of a Spectral Flow Cytometry Single-Tube Panel for the Clinical Diagnosis and Follow-Up of Children and Adolescents with B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cells* 13(22):1891. doi:10.3390/cells13221891. PMID: 39594639.
45. Giesen C, Wang HAO, Schapiro D, et al. (2014) Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat Methods* 11(4):417–422. PMID: 24584193.
46. Gonder S, et al. (2020) Method for the Analysis of the Tumor Microenvironment by Mass Cytometry: panel design, QC and analysis μέσω πληροφορίας (CLL model). *Front Immunol*. PMID: 33193376.
47. Grewal RK, Chetty M, Abayomi EA et al (2019) Use of flow cytometry in the phenotypic diagnosis of Hodgkin’s lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom* 96(2):116–127. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21724>. Epub 2018 Oct 22. PMID: 30350336
48. Grimwade L, et al. (2012) Detection of cytoplasmic nucleophosmin expression by imaging flow cytometry. *Cytometry A*. doi:10.1002/cyto.a.22116. PMID: 22968966.
49. Grimwade LF, Fuller KA, Erber WN. (2017) Applications of imaging flow cytometry in the diagnostic assessment of acute leukaemia. *Methods* 112:39–45. PMID: 27394668.
50. Gupta S, Karandikar NJ, Ginader T, Bellizzi AM, Holman CJ (2018) Flow cytometric aberrancies in plasma cell myeloma and MGUS - correlation with laboratory parameters. *Cytometry B Clin Cytom* 94(3):500–508. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21624>. Epub 2018 Jan 23. PMID: 29316245; PMCID: PMC6342462

51. Guy J, Antony-Debré I, Benayoun E et al (2013) Flow cytometry thresholds of myeloperoxidase detection to discriminate between acute lymphoblastic or myeloblastic leukaemia. *Br J Haematol* 161(4):551–555. <https://doi.org/10.1111/bjh.12277>. Epub 2013 Feb 25. PMID: 23432206
52. Han Y, Gu Y, Zhang AC, Lo YH. (2016) Review: imaging technologies for flow cytometry. *Lab Chip* 16(24):4639–4647. doi:10.1039/c6lc01063f. PMID: 27830849.
53. Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, et al. (2021) Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* 184(13):3573–3587.e29. PMID: 34062119.
54. Heuser M., Freeman S.D., Ossenkoppele G.J., et al. (2021). 2021 update on MRD in AML: ELN MRD Working Party consensus document. *Blood*, 138(26), 2753–2767. <https://doi.org/10.1182/blood.2021013626>
55. Holl E., Kapinsky M., Larbi A. (2025). An Update on Flow Cytometry Analysis of Hematological Malignancies: Focus on Standardization. *Cancers*, 17(12), 2045. <https://doi.org/10.3390/cancers17122045>
56. Horna P, Shi M, Olteanu H, Johansson U (2021) Emerging role of T-cell receptor constant β chain-1 (TRBC1) expression in the flow cytometric diagnosis of T-cell malignancies. *Int J Mol Sci* 22(4):1817. <https://doi.org/10.3390/ijms22041817>. PMID: 33673033; PMCID: PMC7918842
57. Jain N, Lamb AV, O'Brien S et al (2016) Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (ETP-ALL/LBL) in adolescents and adults: a high-risk subtype. *Blood* 127(15):1863–1869. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-661702>. Epub 2016 Jan 8. PMID: 26747249; PMCID: PMC4915808
58. Julia F, Dalle S, Duru G et al (2014) Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms: clinico-immunohistochemical correlations in a series of 91 patients. *Am J Surg Pathol* 38(5):673–680. <https://doi.org/10.1097/PAS.000000000000156>. PMID: 24441662
59. Kern W, Bacher U, Schnittger S et al (2013) Multiparameter flow cytometry reveals myelodysplasia-related aberrant antigen expression in myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Cytometry B Clin Cytom* 84(3):194–197. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21068>. Epub 2013 Jan 2. PMID: 23283847
60. Khoury J.D., Solary E., Abla O., et al. (2022). The 5th edition of the WHO Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic

- Neoplasms. *Leukemia*, 36(7), 1703–1719. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>
61. Kourelis TV, Villasboas JC, Jessen E, et al. (2019) Mass cytometry dissects T cell heterogeneity in the immune tumor microenvironment of common dysproteinemias at diagnosis and after first line therapies. *Blood Cancer J* 9(9):72. doi:10.1038/s41408-019-0234-4. PMID: 31462637.
62. Kroft SH (2004) Monoclonones, monotypes, and neoplasia pitfalls in lymphoma diagnosis. *Am J Clin Pathol* 121(4):457–459. <https://doi.org/10.1309/RR8A-XUWM-9FYX-178A>. PMID: 15080295
63. Lee JA, Spidlen J, Boyce K, et al. (2008) MIFlowCyt: the minimum information about a flow cytometry experiment. *Cytometry A* 73(10):926–930. PMID: 18752282.
64. Li W, Morgan R, Nieder R et al (2021) Normal or reactive minor cell populations in bone marrow and peripheral blood mimic minimal residual leukemia by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 100(5):590–601. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21968>. Epub 2020 Nov 16. PMID: 33197125
65. Lin P, Owens R, Tricot G, Wilson CS (2004) Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol* 121(4):482–488. <https://doi.org/10.1309/74R4-TB90-BUWH-27JX>. PMID: 15080299
66. Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K et al (2008) Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from a working conference. *Leuk Res* 32(1):5–17. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.04.020>. Epub 2007 Jun 18. PMID: 17576013
67. Markey KA, et al. (2015) Imaging the immunological synapse between dendritic cells and T cells by imaging flow cytometry. *J Immunol Methods*. PMID: 25967948.
68. Mathis S, Chapuis N, Debord C et al (2013) Flow cytometric detection of dyserythropoiesis: a sensitive and powerful diagnostic tool for myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 27(10):1981–1987. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.178>. Epub 2013 Jun 14. PMID: 23765225
69. McKenna RW, Asplund SL, Kroft SH (2004) Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) and neoplastic lymphoblasts by 4-color flow cytometry. *Leuk Lymphoma* 45(2):277–285. <https://doi.org/10.1080/1042819031000151950>. PMID: 15101712

70. McKinnon KM (2018) Flow cytometry: an overview. *Curr Protoc Immunol* 120:5.1.1–5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>. PMID: 29512141; PMCID: PMC5939936
71. Menter T, Dirnhofer S, Tzankov A (2015) LEF1: a highly specific marker for the diagnosis of chronic lymphocytic B cell leukaemia/small lymphocytic B cell lymphoma. *J Clin Pathol* 68(6):473–478. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-202862>. Epub 2015 Feb 24. PMID: 25713417
72. Mimitou EP, Cheng A, Montalbano A, et al. (2019) Multiplexed detection of proteins, transcriptomes, clonotypes and CRISPR perturbations in single cells (ECCITE-seq). *Nat Methods* 16(5):409–412. PMID: 31011186.
73. Mocking T.R., van Ginkel R.J., Dijkstra E., et al. (2024). Computational assessment of measurable residual disease in AML improves reproducibility of flow cytometry-based MRD. *Communications Medicine*, 4, 70. <https://doi.org/10.1038/s43856-024-00700-x>
74. Morice WG, Kurtin PJ, Leibson PJ, Tefferi A, Hanson CA (2003) Demonstration of aberrant T-cell and natural killer-cell antigen expression in all cases of granular lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 120(6):1026–1036. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04201.x>. PMID: 12648073
75. Ng DP, Mousey A, Loughrey C, et al. (2021) Augmented Human Intelligence and Automated Diagnosis of B-Cell Malignancies by Flow Cytometry. *Am J Clin Pathol* 155(3):370–381. PMID: 33210119.
76. Nolan J.P. (2022). The evolution of spectral flow cytometry. *Cytometry Part A*, 101(10), 812–817. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24566>
77. Nolan JP, Condello D, Duggan E, Naivar M, Novo D. (2013) Visible and near infrared fluorescence spectral flow cytometry. *Cytometry A* 83(3):253–264. doi:10.1002/cyto.a.22241. PMID: 23225549.
78. Nolan JP, Condello D. (2013) Spectral flow cytometry. *Curr Protoc Cytom.* 2013 Jan;Chapter 1:1.27.1-1.27.13. doi:10.1002/0471142956.cy0127s63. PMID: 23292705.
79. O'Neill K, Aghaeepour N, Špidlen J, Brinkman RR. (2013) Flow cytometry bioinformatics. *PLoS Comput Biol* 9(12):e1003365. PMID: 24363631.
80. Odak I, Bayir LM, Riemann L, et al. (2024) Brief research report: in-depth immunophenotyping reveals stability of CD19 CAR T-cells over time. *Front Immunol* 15:1298598. doi:10.3389/fimmu.2024.1298598. PMID: 38318174.

81. Ouyang J, Zheng W, Shen Q et al (2015) Flow cytometry immunophenotypic analysis of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms: correlation with histopathologic features. *Cytometry B Clin Cytom* 88(4):236–243. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21215>. Epub 2014 Dec 30. PMID: 25557358
82. Park LM, Lannigan J, Jaimes MC. (2020) OMIP-069: Forty-color full spectrum flow cytometry panel for deep immunophenotyping of major cell subsets in human peripheral blood. *Cytometry A*. PMID: 32830910.
83. Pillai V, Dorfman DM (2016) Flow cytometry of nonhematopoietic neoplasms. *Acta Cytol* 60(4):336–343. <https://doi.org/10.1159/000448371>. Epub 2016 Aug 27. PMID: 27578265
84. Porwit A, van de Loosdrecht AA, Bettelheim P et al (2014) 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* 28(9):1793–1798. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.191>. Epub 2014 Jun 12. PMID: 24919805
85. Quintelier KLA, Couckuyt A, Emmaneel A, et al. (2021) Analyzing high-dimensional cytometry data using FlowSOM. *Nat Protoc* 16(8):3775–3801. PMID: 34172973.
86. Quintelier KLA, Van Gassen S, Saeys Y. (2025) CytoNorm 2.0: A flexible normalization framework for cytometry data. *Cytometry A*. PMID: 39871681.
87. Raja KR, Kovarova L, Hajek R (2010) Review of phenotypic markers used in flow cytometric analysis of MGUS and MM, and applicability of flow cytometry in other plasma cell disorders. *Br J Haematol* 149(3):334–351. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08121.x>. Epub 2010 Mar 1. PMID: 20201947
88. Rees P, Summers HD, Filby A, Carpenter AE, Doan M. (2022) Imaging flow cytometry: a primer. *Nat Rev Methods Primers* 2:86. doi:10.1038/s43586-022-00167-x. PMID: 37655209.
89. Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D et al (2014) Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 371(11):1005–1015. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1403088>. PMID: 25207766; PMCID: PMC4191900

90. Robinson J.P., Rajwa B. (2024). Spectral flow cytometry: Fundamentals and future impact. *Methods in Cell Biology*, 186, 311–332. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2024.02.022>
91. Roshal M., Gao Q. (2025). Flow cytometry evaluation of AML MRD based on normal maturation patterns. *American Journal of Clinical Pathology*, 163(5), 775–793. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqae187>
92. Ryan ME, Baldauf MC (1994) Comparison of flow cytometry for DNA content and brush cytology for detection of malignancy in pancreaticobiliary strictures. *Gastrointest Endosc* 40(2 Pt 1):133–139. [https://doi.org/10.1016/s0016-5107\(94\)70154-7](https://doi.org/10.1016/s0016-5107(94)70154-7). PMID: 8013809
93. Saeys Y, Van Gassen S, Lambrecht BN. (2016) Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data. *Nat Rev Immunol* 16(7):449–462. PMID: 27320317.
94. Sánchez-Muñoz L, Teodósio C, Morgado JM et al (2011) Immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells in mastocytosis and other mast cell disorders. *Methods Cell Biol* 103:333–359. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385493-3.00014-0>. PMID: 21722810
95. Sandes AF, de Lourdes Chauffaille M, Oliveira CR et al (2014) CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms by multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 86(2):98–105. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21128>. Epub 2013 Oct 8. PMID: 24243815
96. Shirai T, Hirose S, Okada T et al (1991) CD5+ B cells in autoimmune disease and lymphoid malignancy. *Clin Immunol Immunopathol* 59(2):173–186. [https://doi.org/10.1016/0090-1229\(91\)90016-4](https://doi.org/10.1016/0090-1229(91)90016-4). PMID: 1706969
97. Short N.J., Aldoss I., DeAngelo D.J., et al. (2025). Clinical use of measurable residual disease in adult ALL. *Blood Advances*, 9(6), 1442–1451. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2024015441>
98. Simonson PD, et al. (2021) De novo identification and visualization of important cell populations for Hodgkin lymphoma detection using explainable AI. *Am J Clin Pathol*. PMID: 34175918.
99. Spidlen J, Breuer K, Rosenberg C, Kotecha N, Brinkman RR. (2012) FlowRepository: a resource of annotated flow cytometry datasets associated with peer-reviewed publications. *Cytometry A* 81(9):727–731. PMID: 22887982.

100. Spitzer MH, Nolan GP. (2016) Mass Cytometry: Single Cells, Many Features. *Cell* 165(4):780–791. doi:10.1016/j.cell.2016.04.019. PMID: 27153492.
101. Stacchini A, Aliberti S, Demurtas A et al (2019) Flow cytometry identification of nonhemopoietic neoplasms during routine immunophenotyping. *Int J Lab Hematol* 41(2):208–217. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12946>. Epub 2018 Nov 27. PMID: 30480372
102. Stephan P, et al. (2025) Deep phenotyping of nodal T-cell lymphomas reveals immune alterations and therapeutic targets. *Haematologica* 110(1):129–141. doi:10.3324/haematol.2023.284448. PMID: 38813724.
103. Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N et al (2001) Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood* 98(4):979–987. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.4.979>. PMID: 11493442
104. Stoeckius M, Hafemeister C, Stephenson W, et al. (2017) Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells (CITE-seq). *Nat Methods* 14(9):865–868. PMID: 28759029.
105. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al (eds) (2017) World Health Organization Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th ed. International Agency for Research on Cancer, Lyon
106. Takenokuchi M, Kawano S, Nakamachi Y et al (2012) FLT3/ITD associated with an immature immunophenotype in PML-RAR α leukemia. *Hematol Rep* 4(4):e22. <https://doi.org/10.4081/hr.2012.e22>. Epub 2012 Oct 16. PMID: 23355940; PMCID: PMC3555210
107. Tettero J.M., Freeman S., Bückelein V., et al. (2022). Technical aspects of flow cytometry-based MRD quantification in AML (ELN experience). *HemaSphere*, 6(1), e676. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000676>
108. Theunissen P., Mejstříková E., Sedek L., et al. (2017). Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell precursor ALL. *Blood*, 129(3), 347–357. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-726307>
109. Tislevoll BS, et al. (2023) Early response evaluation by single cell signaling profiling in acute myeloid leukemia. *Nat Commun* 14(1):115. doi:10.1038/s41467-022-35624-4. PMID: 36611026.
110. van de Loosdrecht AA, Alhan C, Béné MC et al (2009) Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic

- syndromes. *Haematologica* 94(8):1124–1134.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2009.005801>. Epub 2009 Jun 22. PMID: 19546437; PMCID: PMC2719035
111. van der Velden V.H.J., Dombrink I., Alten J., et al. (2024). Analysis of MRD by IG/TR gene rearrangements: quality assurance and updated EuroMRD guidelines. *Leukemia*, 38(6), 1315–1322. <https://doi.org/10.1038/s41375-024-02272-0>
112. Van Gassen S, Callebaut B, Van Helden MJ, et al. (2015) FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry A* 87(7):636–645. PMID: 25573116.
113. Van Gassen S, Gaudilliere B, Angst MS, Saeys Y, Aghaepour N. (2020) CytoNorm: A Normalization Algorithm for Cytometry Data. *Cytometry A* 97(3):268–278. PMID: 31633883.
114. Van Oekelen O, et al. (2024) Iberdomide increases innate and adaptive immune cell subsets in the bone marrow of patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Cell Rep Med*. doi:10.1016/j.xcrm.2024.101584. PMID: 38776911.
115. Verbeek M.W.C., Alkema W., Bruggeman C.W., et al. (2025). MRD assessment following CD19-targeted therapies in BCP-ALL: expansion of the EuroFlow protocol to a 12-color panel. *eJHaem*, 6, e70125. <https://doi.org/10.1002/hem3.70125>
116. Visram A, Dasari S, Anderson E, et al. (2021) Relapsed multiple myeloma demonstrates distinct patterns of immune microenvironment and malignant cell-mediated immunosuppression. *Blood Cancer J* 11(3):45. doi:10.1038/s41408-021-00440-4. PMID: 33649314.
117. Viswanath DI, et al. (2017) Quantification of natural killer cell polarization and secretion at the immunological synapse using imaging flow cytometry. *Cytometry A*. PMID: 26948929.
118. Wabnitz GH, et al. (2017) Imaging Flow Cytometry for multiparametric analysis of T-cell-mediated cytotoxicity. *Cytometry A*. PMID: 28252214.
119. Wang J, et al. (2020) Identification of the immune checkpoint signature in multiple myeloma bone marrow microenvironment using mass cytometry. *Clin Transl Immunology*. doi:10.1002/cti2.1132. PMID: 32355560.
120. Wang VE, et al. (2021) Inhibition of MET Signaling with Ficlatuzumab in Combination with Cytarabine in High-Risk AML and Correlative Single-Cell

- Analyses. *Blood Cancer Discov* 2(5):474–487. doi:10.1158/2643-3230.BCD-21-0055. PMID: 34514432.
121. Weir EG, Borowitz MJ (2001) Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemia. *Semin Hematol* 38(2):124–138. [https://doi.org/10.1016/s0037-1963\(01\)90046-0](https://doi.org/10.1016/s0037-1963(01)90046-0). PMID: 11309694
 122. Westers TM, Ireland R, Kern W et al (2012) Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia* 26(7):1730–1741. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.30>. Epub 2012 Feb 6. PMID: 22307178
 123. Wierz M, et al. (2018) High-dimensional mass cytometry analysis revealed phenotypic complexity of the splenic tumor microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Oncoimmunology* 7(8):e1465167. PMID: 30221064.
 124. Wood B (2006) 9-color and 10-color flow cytometry in the clinical laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 130(5):680–690. <https://doi.org/10.5858/2006-130-680-CACFCI>. PMID: 16683886
 125. Wood B.L., Arroz M., Barnett D., et al. (2007). 2006 Bethesda International Consensus: Optimal reagents and reporting for flow cytometric immunophenotyping. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 72(Suppl 1), S14–S22. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20366>
 126. Yao L, et al. (2022) Comprehensive Characterization of the Multiple Myeloma Immune Microenvironment Using Integrated scRNA-seq, CyTOF, and CITE-seq Analysis. *Cancer Res Commun* 2(10):1255–1265. doi:10.1158/2767-9764.CRC-22-0022. PMID: 36969740.
 127. Zhang Z, et al. (2025) Development of a 29-Color Single-Tube Full Spectrum Flow Cytometry Assay for the Detection of Measurable Residual Disease and Leukemic Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Cytometry A* 107(9):597–613. doi:10.1002/cyto.a.24958. PMID: 40937645.