



ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ Β-ΧΡΟΝΙΩΝ ΛΕΜΦΟΪΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΝΟΣΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΛΕΥΡΑ ΤΟΥ ΚΛΙΝΙΚΟΥ

Γ.Α. Πάγκαλης,^{1,2} Χ. Κυρτσώνη,² Θ.Π. Βασιλακόπουλος,² Σ. Σαχανάς,¹ Ξ. Γιακουμή,¹ Χ. Καλπαδάκη,³ Μ. Μοσχογιάννη,¹

Α. Δημητράκοπούλου,⁴ Μ.Κ. Αγγελούδου,² Φ.Ν. Κοντοπίδου⁵

¹Αιματολογική Κλινική Ιατρικού Αθηνών-Ψυχικού, ²Αιματολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, ³Αιματολογική Κλινική Πανεπιστημίου Κρήτη, ⁴Ανοσολογικό Εργαστήριο, Νοσοκομείο Λαϊκό, Αθήνα, ⁵Β' Παθολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών

Εισαγωγή

Οι Β-χρόνιες λεμφοϋπερπλαστικές νόσοι (ΧΛΝ) καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα οντοτήτων όπως αυτό περιγράφεται στην Ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Πίνακας 1). Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται, με εξαίρεση το πλασματοκύττωμα και το πλασματοκυτταρικό μύελωμα, νοσολογικές οντότητες οι οποίες εμφανίζουν κλινική ή/και εργαστηριακή αλληλοκάλυψη έτσι ώστε, αρκετές φορές να υπάρχει δυσκολία ως προς την επακριβή τους κατάταξη. Σημαντικές διαγνωστικές πληροφορίες προς την κατεύθυνση αυτή προσφέρει η μελέτη των κυττάρων του αίματος, του μυελού των οστών και άλλων δειγμάτων με την Κυτταρομετρία Ροής (ΚΡ) έτσι ώστε η εξέταση αυτή να είναι απαραίτητη για τη διάγνωση, κατάταξη και παρακολούθηση των ασθενών με Β-ΧΛΝ.

Πίνακας 1. Χρόνια Λεμφοϋπερπλαστικά Νεοπλασμάτα από Β-κύτταρα

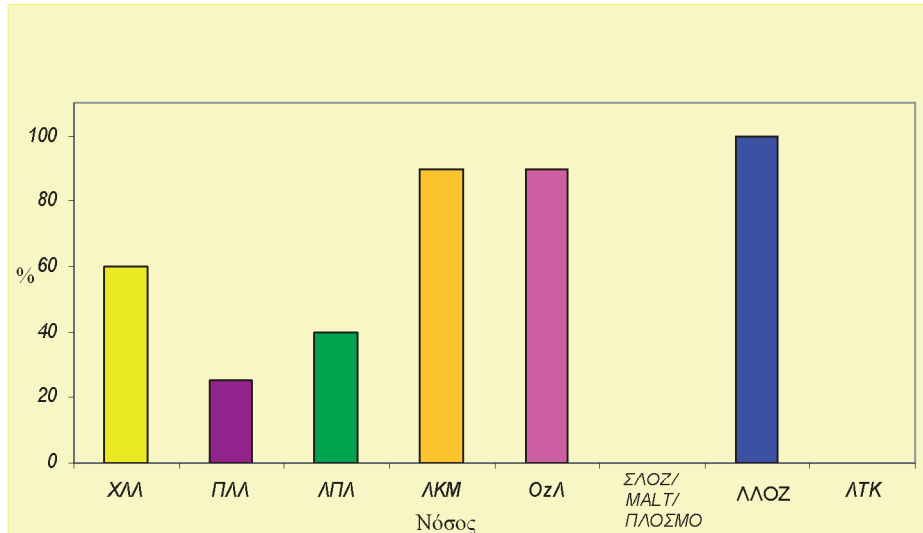
Ταξινόμηση Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας
Β-Χρόνια λεμφογενής λευχαιμία/Λέμφωμα από μικρά λεμφοκύτταρα
Λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα (Ανοσοκύττωμα) ± Μακροσφαιριναιμία Waldenstrom
Β-Προλεμφοκυτταρική λευχαιμία
Λέμφωμα από κύτταρα του μανδύα
Οζώδες Λέμφωμα
Πρωτοπαθές δερματικό λέμφωμα από τα βλαστικά κέντρα
Λέμφωμα από κύτταρα της οριακής ζώνης MALT
Λεμφαδενικό λέμφωμα από κύτταρα της οριακής ζώνης
Σπληνικό λέμφωμα από κύτταρα της οριακής ζώνης
Λευχαιμία εκ τριχωτών κυττάρων
Σπληνικό Β-λέμφωμα/λευχαιμία, αταξινόμητη
Διάχυτο από μικρά λεμφοκύτταρα από τον ερυθρό πολφό του σπληνός
Παραλλαγή λευχαιμίας εκ τριχωτών κυττάρων

Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με Β-ΧΛΝ

Οι ασθενείς με Β-ΧΛΝ είναι συνήθως ασυμπτωματικοί. Τα κλινικά τους ευρήματα αφορούν την παρουσία λεμφαδενοπάθειας και σπληνομεγαλίας ενώ συχνή είναι η εντόπισή τους σε εξωλεμφαδενικές θέσεις (λεμφώματα MALT).

Η συχνότητα εμφάνισης λεμφαδενοπάθειας και σπληνομεγαλίας στο σύνολο 1550 ασθενών, οι οποίοι διαγνώστηκαν και παρακολούθηθηκαν από την ερευνητική μας ομάδα την δεκαετία 1995-2005 δίδεται στα Διαγράμματα 1 και 2. Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει ότι, ως προς τα κλινικά ευρήματα των ασθενών με Β-ΧΛΝ υπάρχει σημαντική αλληλοκάλυψη με εξαίρεση την απουσία λεμφαδενοπάθειας στα λεμφώματα MALT, στο σπληνικό λέμφωμα της οριακής ζώνης και στην λευχαιμία εκ τριχωτών κυττάρων, καθώς και την απουσία σπληνομεγαλίας στα λεμφώματα MALT και στο λεμφαδενικό λέμφωμα οριακής ζώνης, ενώ επίσης υπάρχει απουσία λεμφαδενοπάθειας και σπληνομεγαλίας στο λέμφωμα της οριακής ζώνης με πρωτοπαθή εντόπιση στο μυελό των οστών (ΠΛΟΖΜΟ).

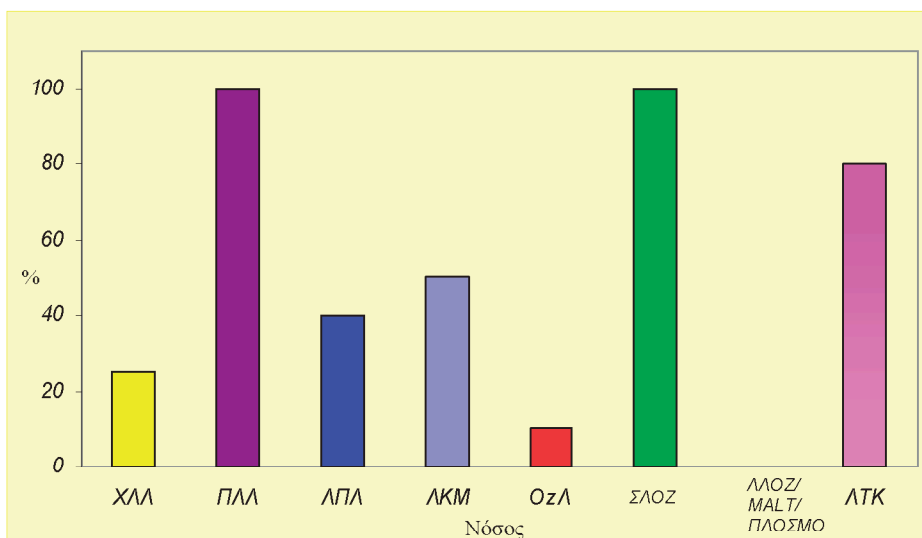
Διάγραμμα 1. Συχνότητα Λεμφαδενοπάθειας σε Β-ΧΛΝ



ΧΛΛ= Χρονία λεμφογενής λευχαιμία
ΠΛΛ= Προλεμφοκυτταρική λευχαιμία
ΛΠΛ= Λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα
ΛΚΜ= Λέμφωμα από κύτταρα του μανδύα
ΣΛΟΖ= Σπληνικό λέμφωμα οριακής ζώνης

ΜΑΛΤ= Λέμφωμα ΜΑΛΤ
ΛΛΟΖ=Λεμφαδενικό λέμφωμα οριακής ζώνης
ΛΤΚ= Λευχαιμία εκ τριχωτών κυττάρων
ΟζΛ= Οζώδες λέμφωμα
ΠΛΟΣΜΟ= Πρωτοπαθές λέμφωμα οριακής ζώνης μυελού των οστών

Διάγραμμα 2. Συχνότητα Σπληνομεγαλίας σε Β-ΧΛΝ*.



* Για τις επεξηγήσεις των συντμήσεων ιδέ Διάγραμμα 1



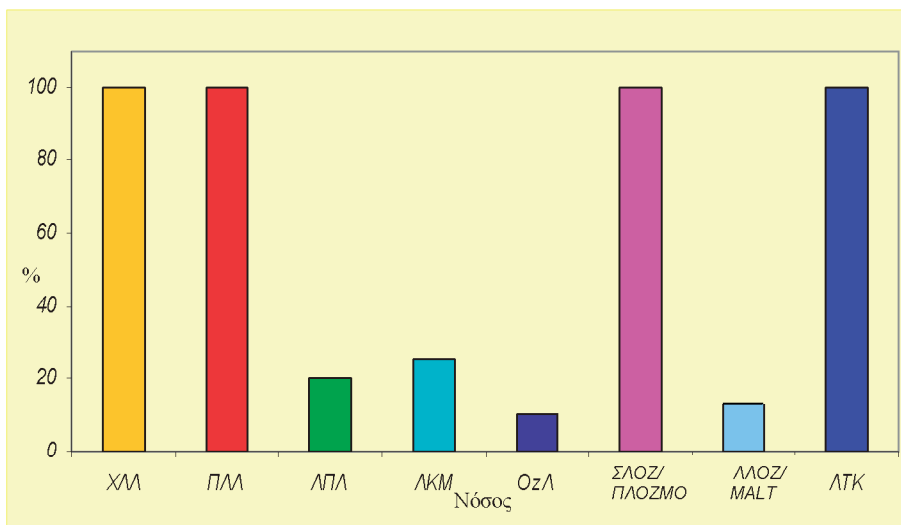
Εργαστηριακά χαρακτηριστικά ασθενών με Β-ΧΛΝ

Πέραν της ιστολογικής διάγνωσης και κατάταξης των νόσων αυτών, μετά από βιοψία του πάσχοντος ιστού ή οργάνου, σημαντικό ρόλο στη διάγνωση και διαφορική τους διάγνωση παίζει και η μορφολογία των κυττάρων όπως αυτά αναγνωρίζονται από τον Αιματολόγο στο επίχρισμα αίματος, μυελού των οστών, παρακεντήματος λεμφαδένων κ.λπ.

Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των Β-ΧΛΝ είναι η παρουσία νόσου στο αίμα με διαφορετική για κάθε νόσημα συχνότητα (Διάγραμμα 3) και με ποικίλοντα αριθμό παθολογικών κυττάρων. Η μορφολογία των κυττάρων αυτών είναι συνήθως χαρακτηριστική της νόσου, χωρίς όμως ή ταυτοποίησή τους να είναι δυνατή άνευ της συμβολής της κυτταρομετρίας ροής και ενδεχομένως και άλλων μεθόδων.

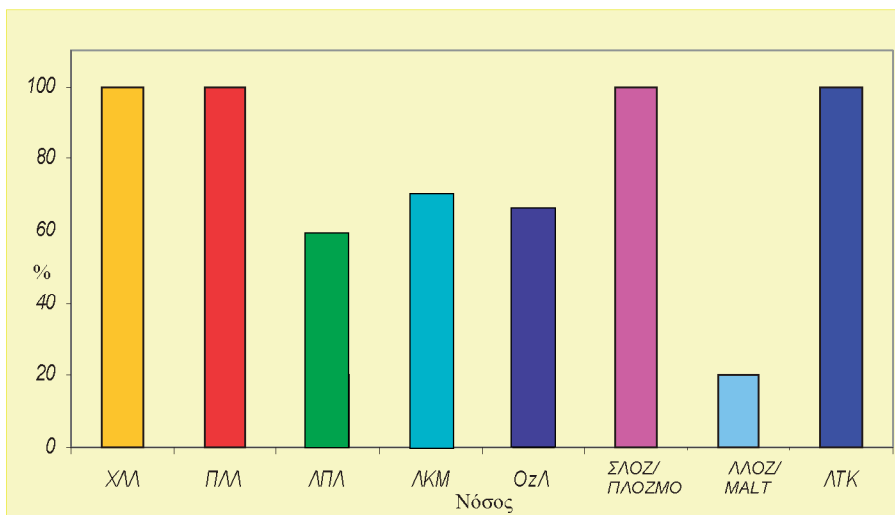
Στα Β-ΧΛΝ σημαντική είναι επίσης η γνώση της συχνότητας προσβολής του μυελού των οστών (Διάγραμμα 4) καθώς και ο τύπος κατανομής της διήθησης (εστιακή, διάχυτη, ενδοκολλοειδική κ.λπ.).

Διάγραμμα 3. Συχνότητα Λευχαιμικής Προσβολής ασθενών με Β-ΧΛΝ*.



* Για τις επεξηγήσεις των συντμήσεων ιδέ Διάγραμμα 1.

Διάγραμμα 4. Συχνότητα Προσβολής Μυελού των Οστών στις Β-ΧΛΝ*.



* Για τις επεξηγήσεις των συντμήσεων ιδέ Διάγραμμα 1.

Κλινικές εφαρμογές Κυτταρομετρίας Ροής στα Β-ΧΛΝ

Η εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής (ΚΡ) στη μελέτη των ασθενών με Β-ΧΛΝ έχει τους ακόλουθους στόχους: Συμβολή στη διάγνωση, διαφορική διάγνωση και κατάταξη τους, παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία, τεκμηρίωση της πλήρους υφέσεως με ανίχνευση της ελαχίστης υπολειμματικής νόσου, και πιστοποίηση πρώιμης υποτροπής της νόσου. Τα δείγματα τα οποία μελετώνται αφορούν αίμα, μυελό των οστών, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, πλευριτικό και ασκίτικό υγρό, εναιώρημα παρακεντήματος λεμφαδένων κ.λπ.

Όπως είναι γνωστό με την ΚΡ είναι ευχερής η μελέτη μεγάλου αριθμού κυττάρων, η ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων και κυρίως η ταυτόχρονη αναζήτηση της έκφρασης περισσότερων του ενός αντιγόνων στα ίδια κύτταρα και άρα ακριβέστερη ταυτοποίηση της νόσου. Από την άλλη πλευρά, υπάρχει δυσχέρεια άμεσης συσχέτισης του ανοσοφαινοτύπου των κυττάρων με τη μορφολογία τους.

Έκφραση Αντιγόνων Επιφανείας στα Β-ΧΛΝ με ΚΡ

Τα κύτταρα των Β-ΧΛΝ εκφράζουν παν-Β κυτταρικούς δείκτες ήτοι μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη επιφανείας (slg), CD19, CD20 κ.λπ., η ένταση των οποίων διαφέρει από νόσο σε νόσο, όπως θα αναφερθεί εν συνεχεία στις επιμέρους οντότητες.

Χρονία Λεμφογενής Λευχαιμία (ΧΛΛ)

Τα κύτταρα της ΧΛΛ πλην των παν-Β δεικτών εκφράζουν και τους δείκτες CD5 (100%), CD23 (85%, διακύμανση 75-90), CD22 (40%, διακύμανση 5-85). Τα αντιγόνα FMC-7 και CD79b εκφράζονται σε μικρή συχνότητα (<20% και <5% αντιστοίχως), εύρημα που συμβάλλει στη διαφορική διάγνωση της ΧΛΛ από άλλα Β-ΧΛΝ. Η έκφραση της ανοσοσφαιρίνης επιφανείας είναι ασθενής (στο 10-15% μη ανιχνεύσιμη, με συχνότητα κ/λ ~2/1), ενώ ασθενής είναι επίσης η έκφραση του CD20. Δείκτης με αρνητική προγνωστική αξία για τη Β-ΧΛΛ αποτελεί το αυξημένο ποσοστό έκφρασης του αντιγόνου ενεργοποίησης CD38 στα κύτταρα της νόσου.

Προλεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΠΛΛ)

Εκτός από τους παν-Β δείκτες, τα κύτταρα της ΠΛΛ εκφράζουν το αντιγόνο CD5 στο 20% των ασθενών (16-47), το CD22 στο 50%, το CD11c στο 20%, ενώ απουσιάζει η έκφραση του αντιγόνου CD23. Τα κύτταρα στο σύνολο των περιπτώσεων εκφράζουν ενδιάμεση προς έντονη ανοσοσφαιρίνη επιφανείας με συχνότητα κ/λ 1.7/1. Η ένταση της έκφρασης του δείκτη CD20 είναι ενδιάμεση προς έντονη.

Λεμφοπλασματοκυτταρικό Λέμφωμα (ΛΠΛ)

Πλην των παν-Β δεικτών, τα κύτταρα του ΛΠΛ είναι αρνητικά στο αντιγόνο CD5 (σε ομάδα δικών μας ασθενών βρέθηκε θετικότητα στο CD5 στο 20% ~ με ασθενή έκφραση) ενώ φέρουν κατά κανόνα τα αντιγόνα CD38, CD22 και FMC-7 (>70%, 70 και >70%, αντιστοίχως), κυτταροπλασματική ανοσοσφαιρίνη και μέτρια ένταση ανοσοσφαιρίνης επιφανείας καθώς και ενδιάμεση προς έντονη έκφραση του CD20.

Λέμφωμα από Κύτταρα του Μανδύα

Στα κύτταρα του μανδύα η έκφραση της slg και του CD20 είναι ενδιάμεση προς έντονη. Περισσότεροι από 90% των ασθενών εκφράζουν έντονα το αντιγόνο CD5 ενώ τα αντιγόνα CD22, CD23 και FMC-7, ανευρίσκονται σε συχνότητα 70%, 15% και >50% αντιστοίχως. Σημαντικό ποσοστό των ασθενών εκφράζει και τα αντιγόνα CD38 και CD11c. Τα κύτταρα της βλαστικής μορφής της νόσου είναι κατά κανόνα CD5 αρνητικά.

Οζώδες Λέμφωμα

Η έκφραση του CD20 και της slg είναι συνήθως ενδιάμεση προς έντονη με κ/λ κλωνικότητα 1/1. Τα κύτταρα της νόσου εκφράζουν το αντιγόνο CD10 σε αναλογία ~60% (40-75) και τα αντιγόνα CD22 και FMC-7 σε αναλογία 80% και >50% περίπου.

Λεμφώματα Οριακής Ζώνης

Στα κύτταρα των λεμφωμάτων οριακής ζώνης (σπληνικό, λεμφαδενικό, MALT, ΠΛΟΖΜΟ) ανευρίσκεται ενδιάμεση προς έντονη έκφραση slg και CD20 με σχέση κ/λ κλωνικότητας 1.7/1. Σε μικρό ποσοστό (<20%) ανευρίσκεται ασθενής έκφραση του CD5 ενώ συχνή (>80%) και έντονη είναι η έκφραση του FMC-7.

Λευχαιμία εκ τριχωτών κυττάρων (ΛΤΚ)

Τα κύτταρα της ΛΤΚ εκφράζουν επίσης συνήθως έντονα το CD20 και την slg και σχεδόν πάντοτε τα αντιγόνα CD22, CD25, CD11c, HC-2 και CD103. Η έκφραση του CD123 θεωρείται πλέον ειδική για το νόσημα αυτό, ενώ ο δείκτης εκείνος που έχει



την υψηλότερη ειδικότητα για την ΛΤΚ είναι η annexin A1, η οποία πρέπει να μελετάται πάντα σε συνδυασμό με κάποιο παν-B αντιγόνο, όπως το CD20, καθώς η annexin A1 εκφράζεται τόσο από κύτταρα της μυελικής, όσο και της T-λεμφικής σειράς.

Ανοσοφαινότυπος και Διάγνωση

Ο ανοσοφαινότυπος (ΑΦ) των παθολογικών κυττάρων δεν αποτελεί αφ' εαυτού απόλυτο κριτήριο του προσδιορισμού της επακριβούς διάγνωσης μίας λεμφοϋπερπλαστικής νόσου. Κι αυτό γιατί ενδέχεται τα κύτταρα της νόσου δύο διαφορετικών λεμφωμάτων να εκφράζουν τους ίδιους βασικούς ανοσοφαινοτυπικούς δείκτες (Πίνακας 2). Ως εκ τούτου, είναι απολύτως απαραίτητο το μεν Εργαστήριο να έχει ενημερωθεί με κλινικοεργαστηριακές πληροφορίες οι οποίες αφορούν τον ασθενή, ο δε Αιματολόγος κατά την αξιολόγηση της απάντησης του φαινοτύπου, να «δει» την απάντηση προσεκτικά και σε σύγκριση με τα λοιπά δεδομένα του ασθενούς.

Πίνακας 2. Παραδείγματα Β-Λεμφοϋπερπλαστικών Νόσων με έκφραση ομοίων φαινοτύπων

Νόσοι	Αντιγόνα
Λέμφωμα Burkitt Οζώδες Λέμφωμα	B-δείκτες και CD10+
Λεμφώματα οριακής ζώνης B-ΠΛΛ ΛΠΛ	B-δείκτες χωρίς άλλους δείκτες διαφοροποίησης

Διαφορική Διάγνωση Β-ΧΛΝ

Η διαφορική διάγνωση των Β-ΧΛΝ σύμφωνα με την έκφραση των ΑΦ δεικτών δίδεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Διαφορική διάγνωση Β-ΧΛΝ βάσει του Ανοσοφαινοτύπου.

Νόσος*	Αντιγόνο									
	CD5	sIg	CD23	CD10	FMC7	CD79b	CD22	CD38	CD25	CD11c
ΧΛΛ	+	ασθενής	+	-	-	-	±	±	±	±
ΠΛΛ	±	μέτρια	-	-	-	+	+	-	-	-
ΛΠΛ	±	μέτρια	±	-	+	±	+	+	±	±
ΛΚΜ	+	μέτρια	-	-	+	+	+	+	-	-
ΟζΛ	-	έντονη	-	+	+	+	+	±	-	-
ΛΛΟΖ	-	έντονη	-	-	+	ΔΥΔ	+	-	-	+
ΣΛΟΖ	±	έντονη	-	-	+	+	+	-	±	+
ΛΤΚ	-	έντονη	-	-	+	±	+	-	+	+
MALT		έντονη	-	-	+	ΔΥΔ	+	-	-	+
ΠΛΟΖΜΟ		έντονη	-	-	+	ΔΥΔ	+	-	-	ΔΥΔ

* Για την επεξήγηση των ακρωνύμων ιδέ Διάγραμμα 1

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3 και έχει ήδη αναφερθεί, κλειδιά στην διάγνωση και διαφορική διάγνωση των Β-ΧΛΝ αποτελούν τα αντιγόνα CD5 (ΧΛΛ και ΛΚΜ), CD10 (ΟΖΛ), CD23 (ΧΛΛ), HC-2 και CD103 (ΛΤΚ) και το FMC-7 (Λευχαιμικά λεμφώματα)

Σύστημα βαθμολόγησης Β-ΧΛΝ

Αναφορικά με τον τρόπο κατάταξης-ταξινόμησης των Β-ΧΛΝ, η ομάδα των Matutes και συνεργατών δημιούργησαν σύστημα βαθμολόγησης αξιοποιώντας τις ακόλουθες παραμέτρους: Ένταση έκφρασης slg, έκφραση CD5, CD23, FMC-7 και CD79b (Πίνακας 4) βάσει του οποίου επιτυγχάνεται η αντικειμενική ταυτοποίηση της ΧΛΛ έναντι των λοιπών νόσων τόσο για διαγνωστικούς όσο και για ερευνητικούς σκοπούς.

Πίνακας 4. Σύστημα βαθμολόγησης προς διαφορική διάγνωση Β-ΧΛΝ κατά Matutes.

Ανοσολογικός Δείκτης	Βαθμολογία		
	1	0	
slg	ασθενής	ενδιάμεση / έντονη	
CD5	θετικό	αρνητικό	
CD23	θετικό	αρνητικό	
FMC7	αρνητικό	θετικό	
CD79b	ασθενές / αρνητικό	ενδιάμεση / έντονη	
Σύνολο βαθμολογίας: 5 (τυπική ΧΛΛ) 0-1 (άτυπη ΧΛΛ ή λευχαιμικό μη -Hodgkin λέμφωμα)			
Βαθμολογία	Τυπική Β - ΧΛΛ	Άτυπη Β - ΧΛΛ	Άλλα Β - ΧΛΥΝ
4-5	90%	71%	0.3%
3	8%	18%	3%
2	2%	9%	19%
0-1	0.3%	2%	77%

Διπλοί ανοσοφαινοτυπικοί πληθυσμοί (διπλή νόσος) σε ασθενείς με Β-ΧΛΝ

Σε περιορισμένο αριθμό ασθενών υπάρχει το ενδεχόμενο να ανευρεθεί διπλός φαινότυπος δηλαδή ένας πληθυσμός Β-κυττάρων να είναι CD5+ και ένας CD5-. Στην περίπτωση αυτή απαιτείται περαιτέρω ανάλυση με διαχωρισμό των Β+, CD5+ και CD5- κυττάρων και έλεγχος της αλληλουχίας βάσεων προκειμένου να διαπιστωθεί αν πρόκειται για διαφορετικό κλώνο Β-κυττάρων ή για τον ίδιο, ο οποίος εκφράζει τους υποπληθυσμούς του με διαφορετική θετικότητα στο CD5.

Μελέτη Συνέκφρασης Αντιγόνων

Στην ΚΡ η μελέτη της συνέκφρασης είναι απολύτως απαραίτητη προκειμένου η ταυτοποίησή τους να είναι όσο το δυνατόν ακριβέστερη. Με τη χρήση των νεότερων κυτταρομετρητών ροής, οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα εξαπλού ανοσοφθορισμού, μπορούν να μελετηθούν μέχρι και 6 αντιγόνα ταυτοχρόνως. Οι προτεινόμενοι συνδυασμοί είναι: α. CD19/CD5/CD23, β. FMC-7/CD20/CD22, γ. CD79b/CD19/CD23, δ. CD25/CD22/CD11c, ε. CD103/CD123/CD20, στ. CD10/CD5/CD19, ζ. CD19/slg κ/slg λ. Φυσικά εάν υπάρχει η δυνατότητα 4 ή και 6 φθοριοχρωμάτων, τότε οι συνδυασμοί μπορούν να είναι ακόμη πιο πληροφοριακοί. Εκεί που ο συνδυασμός τεσσάρων ή περισσότερων αντιγόνων είναι πολύτιμος, είναι η παρακολούθηση της ελαχίστης υπολειπομένης νόσου, όπου η κυτταρομετρία ροής μπορεί να εντοπίσει την υπολειπόμενη νόσο με ευαισθησία της τάξεως 10⁻⁵.



Αντιγόνα Επιφανείας ως Θεραπευτικοί Στόχοι στα Β-ΧΛΝ

Μέχρι σήμερα για ορισμένα αντιγόνα επιφανείας τα οποία εκφράζονται στα λεμφικά κύτταρα των Β-ΧΛΝ έχουν παραχθεί αντισώματα και για θεραπευτικούς σκοπούς. Στα αντισώματα αυτά περιλαμβάνονται: Το αντι-CD20 ελεύθερο (Rituximab, Fatumomab) ή συνδεδεμένο με ραδιενεργό ισότοπο (^{131}I Tositumomab, ^{90}Y Ibritumomab tiuxetan) με ευρεία εφαρμογή του στην κλινική πράξη σε όλα τα Β-ΧΛΝ. Το αντι-CD52w (Alemtuzumab) το οποίο εκφράζεται στα Β αλλά και στα Τ-λεμφοκύτταρα με σημαντική εφαρμογή σε ασθενείς με ΧΛΛ. Το αντι-CD22 (Epratuzumab) με εφαρμογή του σε όλα τα Β-ΧΛΝ και το αντι-CD23 (Lumiliximab) με ένδειξη την ανθεκτική ΧΛΛ.

Επίκριση

Για τη σωστή αξιοποίηση των ευρημάτων του ανοσοφαινοτύπου με ΚΡ απαιτείται η σωστή εφαρμογή του συνδυασμού των υπό μελέτη δεικτών. Ιδιαίτερα εκείνων οι οποίοι μπορεί να εκφράζονται σε περισσότερες από μία υποκατηγορία κυττάρων (π.χ. CD5+ σε φυσιολογικά Τ και Β κύτταρα, καθώς και κύτταρα ΧΛΛ και ΛΚΜ).

Επίσης απαιτείται η αξιολόγηση της έντασης της έκφρασης της θετικότητας του αντιγόνου στην επιφάνεια των κυττάρων καθώς και του ποσοστού των θετικών κυττάρων.

Η σημασία της θετικότητας ενός αντιγόνου εκτός από τη συνεισφορά του στη διάγνωση και επακριβή ταξινόμηση της νόσου αφορά και στη δυνατότητα επιλογής του ως στόχου για θεραπευτικούς σκοπούς.

Επιλεγμένες Βιβλιογραφίες

1. Πάγκαλης Γεράσιμος, ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη, Αθήνα 2008.
2. Pangalis GA, Angelopoulou MK, Vassilakopoulos TP, et al. B-chronic lymphocytic leukemia, small lymphocytic lymphoma, and lymphoplasmacytic lymphoma, including Waldenström's macroglobulinemia: a clinical, morphologic, and biologic spectrum of similar disorders. *Semin Hematol.* 1999 Apr;36(2):104-14.
3. Pangalis Ga, Kyrtsolis MC, Kontopidou FN et al. Differential diagnosis of Waldenstrom macroglobulinemia and other B-cell disorders. *Clin Lymphoma Myeloma* 5: 235-240, 2005.
4. Pangalis GA, Vassilakopoulos TP, Dimopoulou MN et al. B-Chronic Lymphocytic Leukemia: Practical aspects. *Hematol Oncol* 20: 103-146, 2002.
5. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J and Vardiman JW (Eds): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC, Lyon 2008.
6. Catovsky D: Immunophenotypic analysis of chronic lymphoid leukemias. *Rev Clin Exp Hematol* 1:3-14, 1997.
7. Καλπαδάκη Χ, Πάγκαλης ΓΑ, Σαχανάς Σ και συν. Πρωτοπαθές λέμφωμα οριακής ζώνης μυελού των οστών (ΠΛΟΖΜΟ). Μία νέα υποκατηγορία νόσου; *Haema* 12 (suppl1), 60, 2009.
8. Catovsky D, Matutes E. Splenic lymphoma with circulating villous lymphocytes/splenic marginal-zone lymphoma. *Semin Hematol*, 36,148-154, 1999.
9. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, et al. The immunophenotype of hairy cell leukemia (HCL). Proposal for a scoring system to distinguish HCL from B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Leuk Lymphoma*, 14 (Suppl 1) 57-61, 1994.
10. Batata A, Shen B. Immunophenotyping of subtypes of B-chronic (mature) lymphoid leukemia: A study of 242 cases. *Cancer* 70:2436-2443, 1992.
11. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 10:1640-1645, 1994.
12. Schwonzen M, Steinmetz PT, Seckler W, et al. Immunophenotyping of low-grade B-cell lymphoma in blood and bone marrow: Poor correlation between immunophenotype and cytological/histological classification. *Br J Haematol* 83: 232-239, 1993.
13. Krishnan B, Matutes E, Dearden C. Prolymphocytic leukemias. *Semin Oncol* 33:257-263, 2006.
14. Geisler CH, Larsen JK, Hansen NE, et al. Prognostic importance of flow cytometric immunophenotyping of 540 consecutive patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 78: 1795-1802, 1991.
15. Campo E, Raffeld M, Jaffe ES. Mantle cell lymphoma. *Semin Hematol* 36:115-127, 1999.
16. Angelopoulou MK, Siakantaris MP, Vassilakopoulos TP, et al. The Splenic Form of Mantle Cell Lymphoma. *Eur J Hematol* 68: 12-21, 2002.
17. Bellido M, Rubiol E, Ubeda J, et al. Flow cytometry using the monoclonal antibody CD10-Pe/Cy5 is a useful tool to identify follicular lymphoma cells. *Eur J Haematol.* 66:100-6, 2001.
18. Detry G, Drénou B, Ferrant A, et al. Tracking the follicular lymphoma cells in flow cytometry: characterisation of a new useful antibody combination. *Eur J Haematol.* 73:325-31, 2004.
19. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, et al. The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. *Blood* 83:1558-1562, 1994.
20. Matutes E. Immunophenotyping and differential diagnosis of hairy cell leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 20:1051-1063, 2006.
21. Del Giudice I, Matutes E, Morilla R, et al. The diagnostic value of CD123 in B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Haematologica.* 89:303-8, 2004.
22. Bain BJ, Barnett D, Linch D, et al. Revised guideline on immunophenotyping in acute leukaemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clin Lab Haematol* 24:1-13, 2002.
23. Sánchez ML, Almeida J, Vidriales B, et al. Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Leukemia* 16:1460-9, 2002.