

Proliferation and anti-apoptotic markers in myeloid malignancies

Citation for published version (APA):

Mestrum, S. G. C. (2023). *Proliferation and anti-apoptotic markers in myeloid malignancies: understanding their biology and clinical applications*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20230322sm>

Document status and date:

Published: 01/01/2023

DOI:

[10.26481/dis.20230322sm](https://doi.org/10.26481/dis.20230322sm)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.



13

Summary

Myeloid malignancies are a heterogeneous group of hematological neoplasms originating from myeloid stem- and progenitor cells of the bone marrow (BM). These neoplasms are divided into several subgroups in the WHO 2016 classification, including myeloproliferative neoplasms (MPN), myelodysplastic syndromes (MDS), the myelodysplastic/myeloproliferative overlapping syndrome (MDS/MPN) and acute myeloid leukemia (AML). Cell division (proliferation) and cell death (apoptosis) are two crucial cell biological processes in maintaining the normal tissue homeostasis. An imbalance between these two processes leads to development of myeloid malignancies and is a universal concept among all different types of cancer, which indicates that this imbalance is an important biomarker for the identification (diagnosis) of cancers. Whereas derailment of proliferation and apoptosis is involved in the origin of (pre)malignancies, it also plays a role in their progression to more advanced stages and influences the response to therapy.

Cell biological processes, such as proliferation and apoptosis, are often assessed by means of genetic marker profiles. But in case of complex heterogeneous disorders (e.g. MDS and AML), the genetic markers may point in opposite directions for individual cases. More straightforward detection of proliferation and apoptosis in myeloid malignancies by means of flow cytometry has been investigated primarily in the 1990s as described in more detail in **Chapter 2**. At that time, only 2- to 4-color flow cytometry was available, which did not allow the consideration of the heterogeneity of the BM tissue and myeloid malignancies when analyzing the cell biological processes of proliferation and apoptosis. This led to contradictory results for the proliferative and apoptotic activity in myeloid malignancies over the years that in turn prevented the clinical application of such markers for these malignancies, which are nowadays useful markers for personalized clinical practice in solid tumors and lymphoma.

The availability of state-of-the-art 10- to 12-color flow cytometry combined with the extensive knowledge about panels of differentiation markers now allows detection of proliferation and apoptosis in more detail, even at the level of maturing hematopoietic cells. This can have a variety of potential applications in myeloid malignancies, including 1) diagnostic purposes, 2) determination of clinical outcome, and 3) lead to a better understanding of the underlying biology and pathogenesis of myeloid malignancies. There are sufficient markers and technologies available, the challenge is now to find a consensus on standardized procedures and methods that will define how detection of proliferative and apoptotic rates is integrated into the clinical practice of myeloid malignancies. The results presented in this thesis paved the way for integrating these important parameters into the clinical practice by investigating the cell biological background of myeloid malignancies, potential

clinical applications and optimization of the flow cytometry protocols to accelerate subsequent clinical implementation.

This thesis first focusses on what the role of proliferative and anti-apoptotic parameters are in myeloid malignancies to gain a better understanding of the underlying biology of these malignancies. The presented novel assay for simultaneous determination of the Ki-67 proliferative and Bcl-2 anti-apoptotic indices added a new dimension to the analysis of functional biological processes in a heterogeneous cell population such as that of BM tissue, as it now enabled the detection and establishment of reference values for these cellular processes in normal maturing hematopoietic cells of the BM (**Chapter 3**). While MPN is generally characterized by an increase in the proliferative activity and validated that proliferation was appropriately detected with the Ki-67 proliferation index, MDS was characterized by a decrease in the proliferative activity (**Chapter 4**). The MDS/MPN overlapping syndrome showed combined features of MDS and MPN in terms of proliferative activity. This could become of added value for classification of these malignancies based on their biological background. Furthermore, analyzing the proliferative behavior of individual hematopoietic cell populations during maturation could lead to new insights into the role of somatic mutations in the pathogenesis of these malignancies.

As placement of polygonal gates is prone to subjectivity in the analysis of proliferative and anti-apoptotic parameters, the gating strategy for determining these parameters was optimized in **Chapter 5**. By doing so, this allowed more reliable detection of these parameters in order to draw even more accurate conclusions about the proliferative and anti-apoptotic activity in MDS and AML and facilitated potential clinical implementation of these parameters.

The decreased proliferative activity and increased anti-apoptotic activity, as observed in MDS, were even more exacerbated in AML (**Chapter 6**). This illustrated that alterations in the proliferative and anti-apoptotic activity are crucial factors for the neoplastic progression of MDS to AML. The low proliferative activity and high anti-apoptotic activity observed especially in the blast cells of MDS and AML patients explain the low chemotherapy response and high chemotherapy-related mortality of these patients. Chemotherapy targets mainly highly proliferative cells and induces apoptosis in these cells. Therefore, chemotherapy regimens alone are unlikely to resolve these malignancies of the BM as the (malignant) blast cells of MDS and AML patients remain largely unaffected due to their low proliferative and high anti-apoptotic activity. The lineage-committed cells, however, still possess a degree of proliferative activity and a lower degree of anti-apoptotic activity according to these data and will be eradicated by chemotherapy. Existing cytopenia(s) and subsequent

complications are likely to become more severe as a result of the chemotherapy and, more importantly, malignant blast cells (that lost their differentiation capacity) will become more dominant in the BM. These data emphasize the importance of using inhibitors of anti-apoptosis, such as Venetoclax, in conjunction with chemotherapy (or other novel therapies that induce apoptosis such as CAR-T cell therapy) to increase the treatment efficacy and reduce therapy-related mortality.

Currently, biomarkers that predict therapy response are still under investigation. Both the proliferative activity and anti-apoptotic activity are important parameters in the response to (combinations of) these therapies. Therefore, the ratio of these two parameters may allow for a more straightforward and simultaneous prediction of the response on multiple therapies. As a low Bcl-2:Ki-67 ratio indicates that proliferative signaling is favored above resistance to apoptosis and the malignant cells are thus chemosensitive, treatment with solely chemotherapy is preferable over the combination of chemotherapy and Venetoclax. On the contrary, the combination of chemotherapy and Venetoclax is more suitable in patients that show a high Bcl-2:Ki-67 ratio, since the malignant cells in these patients are highly resistant to chemotherapy alone. Integration of this ratio may, therefore, aid in the development of a personalized approach for such combination therapies, which minimizes therapy-related complications and optimizes their efficacy.

In **Chapter 7**, the gating strategy of the Ki-67 proliferation index was further refined for diagnostic use in MDS patients and also validated that placement of rectangular gates is the most straightforward and accurate method to analyze the proliferative activity for diagnosis of MDS. Subsequently, the findings presented in **Chapter 8** illustrated that the Ki-67 proliferation index of erythroid cells can be of additional value for diagnosis of this disorder and integrating this parameter into the Ogata score leads to a faster and more accurate diagnosis of (low-grade) MDS. A faster and more sensitive diagnostic tool for MDS has the potential to contribute to a better mental health/less stress caused by a reduced waiting time for receiving a definitive diagnosis, and adequate treatment in case of swift progression to AML, which is known for its high mortality. More accurate and straightforward diagnosis of MDS also reduces the number of unnecessary clinical visits and additional painful BM biopsies.

Not only was the Ki-67 proliferation index useful in the diagnosis of MDS, but also for the prediction of transfusion-dependence in these patients. As described in **Chapter 9**, the hemoglobin levels are currently used in routine clinical practice to predict transfusion-dependence in MDS patients as part of the Revised International Prognostic Scoring System. However, part of the MDS patients with only mildly reduced hemoglobin levels (mild anemia) were still at risk for developing

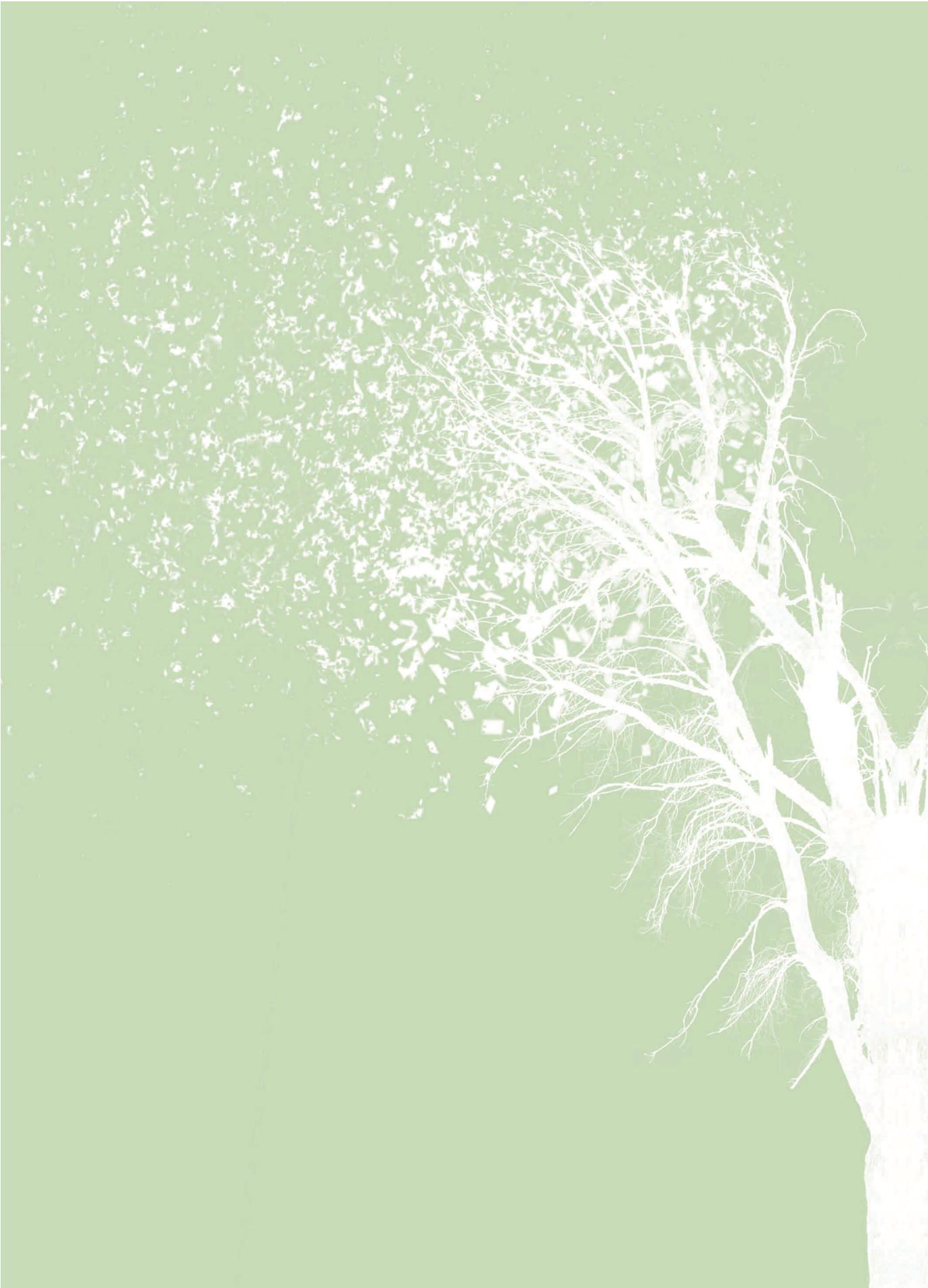
transfusion-dependence within the near future. Combining the measurement of hemoglobin levels in the peripheral blood with the determination of the Ki-67 proliferation index in the BM allowed accurate prediction of the development of transfusion-dependence in MDS patients with mild anemia developed transfusion-dependence within 1 year after diagnosis. This allows for more adequate anticipation of this severe disease complication in clinical practice and paves the way for strategies to better stabilize this debilitating complication. This may allow the reduction of burdensome clinical visits for MDS patients that show no potential to develop transfusion-dependence in the near future, which also leads to a cost reduction for the patient as well as the clinical centers. Furthermore, the Ki-67 proliferation index may become an additional prognostic parameter in the established international scoring systems for determining the prognosis of MDS cases, which also aids in more personalized medicine for these malignancies.

As the blast cell population comprises various maturation stages that can be clinically useful for prognostic and therapeutic purposes in myeloid malignancies, it is of utmost importance to dissect this maturation process and subsequently determine the Ki-67 proliferation index and Bcl-2 anti-apoptotic index in the different maturation stages of these blast cells. To anticipate future investigation of this important subject, an overview of potential markers for dissecting the normal blast cell maturation and subsequent comparison with the maturation of leukemic blast cells was provided in **Chapter 10**. This may enable a more specific clinical diagnosis of AML, minimal residual disease detection and more personalized treatment.

In **Chapter 11**, the findings of this thesis in the context of recent literature were discussed, followed by a synthesis of the discussed findings in a wider theoretical framework and directions for future research. The studies included in this thesis confirmed, in line with the previously available literature, that the proliferative and anti-apoptotic activity are useful parameters in the clinical practice of myeloid malignancies for a wide array of purposes. These studies collectively serve as the first step in the implementation of these important parameters in clinical flow cytometry of myeloid malignancies. Nevertheless, there are many questions regarding this topic that still remain to be addressed in the future. Additional proliferative and/or anti-apoptotic parameters, methods of analyzing these parameters (e.g. expression levels instead of fractions) and combining this method with novel state-of-the-art techniques may further improve the applicability and impact of these parameters in routine clinical practice of myeloid malignancies.

Finally, the impact and implications of the findings that are presented in this thesis were further elaborated on in **Chapter 12**. Summarized, these findings show that biomarkers for cell division and cell death have high potential for a wide variety of

applications during the whole clinical process of myeloid malignancies to improve the curability and quality of life for these patients. The next step towards implementation of the Ki-67 proliferation index and Bcl-2 anti-apoptotic index is investigating these parameters in large scale multi-center studies and the organization of quality assessment rounds for further standardization in the routine clinical setting of myeloid malignancies.





Samenvatting

Myeloïde maligniteiten is een verzamelnaam voor een groep bloedkankers die sterk verschillen van elkaar en allemaal ontstaan in de myeloïde stam- en voorlopercellen van het beenmerg (BM). Deze bloedkankers kunnen verdeeld worden onder verschillende subgroepen op basis van de classificatie van de Wereldgezondheidsorganisatie van 2016, waaronder myeloproliferatieve neoplasmata (MPN), myelodysplastische syndromen (MDS), het myelodysplastisch/myeloproliferatief overlappingsbeeld (MDS/MPN) en acute myeloïde leukemie (AML). Celdeling (ook wel proliferatie) en celdood (ook wel apoptose genoemd) zijn twee cruciale celbiologische processen die betrokken zijn in het doseren van de weefselaanmaak. Een disbalans tussen deze twee processen leidt tot het ontwikkelen van myeloïde maligniteiten en is een universeel concept binnen alle soorten kankers, wat een indicatie is dat deze balans een belangrijke biologische indicator is voor de identificatie (diagnose) van kankers. Terwijl de ontspoorde balans tussen proliferatie en apoptose betrokken is bij het ontstaan van deze (pre)maligniteiten, speelt deze ook een rol in de progressie naar de verder gevorderde stadia van myeloïde maligniteiten en beïnvloedt het de respons op therapie.

Celbiologische processen, zoals proliferatie en apoptose, worden vaak beoordeeld op basis van de genetische marker profielen van de tumorcellen. Echter, in het geval van heterogene afwijkingen (bijvoorbeeld MDS en AML), wijzen de genetische markers in tegengestelde richtingen op het gebied van proliferatie en apoptose in individuele casussen. Rechtstreekse detectie van proliferatie en apoptose in myeloïde maligniteiten middels flowcytometrie is primair onderzocht in de negentiger jaren, zoals in meer detail beschreven is in **Hoofdstuk 2**. In die tijd was alleen 2- tot 4-kleuren flowcytometrie beschikbaar, waarmee beoordeling van de heterogeniteit van het BM weefsel en myeloïde maligniteiten gedurende het analyseren van proliferatie en apoptose niet mogelijk was. Dit heeft geleid tot tegenstrijdige resultaten voor de proliferatieve en apoptotische activiteit over de jaren en vervolgens klinische applicatie van zulke markers in myeloïde maligniteiten belemmerde. Proliferatie en apoptose markers zijn daarentegen tot op heden waardevolle markers voor de personalisatie van de klinische praktijk van solide tumoren en lymfomen.

De beschikbaarheid van state-of-the-art 10- tot 12-kleuren flowcytometrie gecombineerd met de uitgebreide kennis over differentiatie marker panels laat detectie van proliferatie en apoptose in meer detail toe, zelfs op het niveau van de uitrijpende hematopoëtische cel. Deze vernieuwde analyse kan een variëteit aan potentiële applicaties hebben, inclusief 1) diagnostische toepassingen, 2) het bepalen van de klinische uitkomst, en 3) het beter begrijpen van de onderliggende

biologie en pathogenese van myeloïde maligniteiten. Er zijn voldoende markers en technologieën beschikbaar, de uitdaging is nu om een consensus te vinden over gestandaardiseerde procedures en methodes die zullen definiëren hoe detectie van proliferatieve en apoptotische activiteit geïntegreerd worden in de klinische praktijk van myeloïde maligniteiten door de celbiologische achtergrond, potentiële klinische applicaties en geoptimaliseerde flowcytometrie protocollen (die de klinische implementatie bespoedigen) te onderzoeken.

Deze thesis richt zich eerst op de rol van proliferatieve en apoptotische parameters in myeloïde maligniteiten zijn om de onderliggende biologie van deze maligniteiten beter te begrijpen. Het recent ontwikkelde assay voor simultane detectie van de Ki-67 proliferatie index en de Bcl-2 anti-apoptotische index voegt een nieuwe dimensie toe aan de analyse van functionele biologische processen in heterogene celpopulaties zoals die van het BM weefsel, gezien dit het nu mogelijk heeft gemaakt om deze celbiologische processen te detecteren in normale uitrijpende hematopoëtische cellen en referentiewaarden daarvan vast te leggen (**Hoofdstuk 3**). Terwijl MPN hoofdzakelijk gekarakteriseerd zijn met een toegenomen proliferatieve activiteit en valideerde dat proliferatie accuraat gedetecteerd kan worden met behulp van de Ki-67 proliferatie index, werd MDS gekarakteriseerd door een afgenomen proliferatieve activiteit (**Hoofdstuk 4**). Het MDS/MPN overlappingsyndroom liet gecombineerde kenmerken van MDS en MPN zien op het gebied van de proliferatieve activiteit. Deze bevindingen kunnen van toegevoegde waarde zijn voor de classificatie van deze maligniteiten op basis van hun biologische achtergrond. Verder kan het analyseren van het proliferatieve gedrag van de individuele hematopoëtische celpopulaties gedurende de uitrijping leiden tot nieuwe inzichten over de rol van somatische mutaties in de pathogenese van deze maligniteiten.

Omdat het plaatsen van polygonale gates voor het bepalen van proliferatieve en anti-apoptotische parameters vatbaar is voor subjectiviteit, is de gating strategie voor het bepalen van deze parameters geoptimaliseerd in **Hoofdstuk 5**. Door dit te doen werd het mogelijk deze parameters betrouwbaarder te detecteren en accuratere conclusies te trekken over de proliferatieve en anti-apoptotische activiteit in MDS en AML, terwijl dit ook snellere klinische implementatie van deze parameters faciliteert.

De afgenomen proliferatieve activiteit en toegenomen anti-apoptotische activiteit, zoals geobserveerd in MDS, waren verder verergerd in AML (**Hoofdstuk 6**). Dit illustreert dat afwijkingen in de proliferatieve en anti-apoptotische activiteit cruciale factoren zijn voor de neoplastische progressie van MDS en AML. De lage proliferatieve activiteit en hoge anti-apoptotische activiteit, met name in de blast

cellen van MDS en AML, verklaren de lage chemotherapie respons en hoge chemotherapie-gerelateerde mortaliteit van deze patiënten. Chemotherapie richt zich met name op hoog proliferatieve cellen en induceert apoptose in deze cellen. Vandaar dat enkel chemotherapie regimenten deze maligniteiten onvoldoende zullen bestrijden, omdat de (maligne) blast cellen van MDS en AML nauwelijks beïnvloed zullen worden door hun lage proliferatieve en hoge anti-apoptotische activiteit. De cellen die zich reeds hebben toegelegd tot de uitrijping naar een specifiek type bloedcel bezitten, echter, wel nog proliferatieve activiteit en slechts in lagere mate anti-apoptotische activiteit volgens deze data en zullen dus worden uitgeroeid door chemotherapie. Hierdoor zullen bestaande cytopenie(ën) en daaropvolgende complicaties ernstiger worden door behandeling met enkel chemotherapie en, wellicht nog belangrijker, zullen de maligne blast cellen (die hun differentiatie capaciteit verloren hebben) nog dominant worden in het BM. Deze data benadrukken het belang van het gebruik van anti-apoptose remmers, zoals Venetoclax, in combinatie met chemotherapie (of andere nieuw uitgevonden therapieën die apoptose induceren zoals CAR T-cel therapie) om de effectiviteit van de behandeling te verhogen en therapie-gerelateerde mortaliteit te reduceren.

Op dit moment worden biomarkers die therapie respons voorspellen in MDS en AML nog steeds onderzocht. Zowel de proliferatieve activiteit als de anti-apoptotische activiteit zijn belangrijke parameters in de respons op (combinaties van) deze therapieën. Vandaar dat de ratio van deze twee parameters wellicht gebruikt kan worden om een meer rechtstreekse en simultane predictie van de respons op meerdere therapieën te bewerkstelligen. Omdat een lage Bcl-2:Ki-67 ratio een indicatie is dat proliferatieve signalering verkozen wordt boven bescherming tegen apoptose en de maligne cellen dus chemosensitief zijn, zou in dit geval enkel chemotherapie de voorkeur hebben in plaats van de combinatie van chemotherapie en Venetoclax. Daarentegen zou de combinatie van chemotherapie en Venetoclax wel de voorkeur hebben bij patiënten die een hoge Bcl-2:Ki-67 ratio laten zien, omdat de maligne cellen in deze patiënten hoog resistent zijn tegen behandeling met enkel chemotherapie. De integratie van deze ratio in de klinische praktijk kan, daarom, van waarde zijn bij het ontwikkelen van een gepersonaliseerde aanpak voor het beoordelen van de geschiktheid van patiënten voor (combinatie) therapie, zodat therapie-gerelateerde complicaties geminimaliseerd kunnen worden terwijl de effectiviteit van de therapie zo optimaal mogelijk wordt.

In **Hoofdstuk 7** is de gating strategie van de Ki-67 proliferatie index voor diagnostische doeleinden in MDS patiënten geoptimaliseerd en is aangetoond dat het plaatsen van rechthoekige gates de meest rechtstreekse en accurate methode is voor het analyseren van de proliferatieve activiteit voor de diagnose van MDS. Daaropvolgend

illustreert **Hoofdstuk 8** dat de Ki-67 proliferatie index van erythroïde cellen toegevoegde waarde heeft voor diagnose van deze beenmergafwijking en leidde integratie van deze parameter in de reeds bestaande Ogata score tot een snellere en meer accuratere diagnose van (laaggradige) MDS. Een sneller en sensitiever diagnostisch middel voor MDS heeft het potentieel om bij te dragen aan het verbeteren van de mentale gezondheid en het reduceren van stress van patiënten door kortere wachttijden voor het ontvangen van een definitieve diagnose, en adequate behandeling in het geval dat er snelle progressie naar AML (die bekend staat om zijn hoge mortaliteit) plaatsvindt. Ook zorgt meer rechtstreekse en accuratere diagnose van MDS ervoor dat het aantal onnodige klinische bezoeken en additionele pijnlijke beenmergbipten gereduceerd worden.

De Ki-67 proliferatie index was niet alleen van waarde voor de diagnose van MDS, maar ook voor de predictie van transfusie-afhankelijkheid in deze patiënten. Zoals beschreven in **Hoofdstuk 9**, worden de hemoglobine waarden in het perifeer bloed op dit moment gebruikt in de routinematige klinische praktijk om transfusie-afhankelijkheid in MDS patiënten te voorspellen als deel van het Gereviseerde Internationale Prognostische Score Systeem. Een deel van de MDS patiënten met mild verlaagde hemoglobine niveaus (milde anemie) loopt echter nog steeds risico op het ontwikkelen van transfusie-afhankelijkheid in de nabije toekomst. Het combineren van de hemoglobine waarden in het perifeer bloed met de Ki-67 proliferatie index in het BM maakte accuraat voorspellen of MDS patiënten met een milde anemie transfusie-afhankelijkheid ontwikkelen binnen 1 jaar na diagnose mogelijk. Hierdoor kan er adequater geanticipeerd worden op deze ernstige ziektecomplicatie in de klinische praktijk en maakt dit de weg vrij voor strategieën om deze beperkende complicatie beter te stabiliseren. Dit kan er toe leiden dat het aantal klinische bezoeken voor MDS verder gereduceerd kan worden voor patiënten die geen potentieel laten zien om transfusie-afhankelijkheid te ontwikkelen in de nabije toekomst, wat ook tot een reductie in kosten voor zowel de patiënt als klinische centra leidt. Verder kan de Ki-67 proliferatie index een additionele prognostische parameter in de reeds bestaande internationale score systemen voor de prognose van MDS worden, hetgeen het personaliseren van therapie voor deze maligniteiten kan ondersteunen.

Omdat de blast cel populatie bestaat uit verscheidene maturatie stadia die van klinische waarde kunnen zijn voor prognostische en therapeutische doeleinden in myeloïde maligniteiten, is het van groot belang om het uitrijpingsproces van deze cellen te ontleden en daaropvolgend de Ki-67 proliferatie en bcl-2 anti-apoptotische indices te bepalen in de verschillende uitrijpingsstadia van de blast cellen. **Hoofdstuk 10** geeft een overzicht van de potentiële markers om de uitrijping van de normale

blast cel te ontleden en achtereenvolgens te vergelijken met de maturatie van maligne blast cellen. Dit kan ervoor zorgen dat er een accuratere klinische diagnose voor AML gesteld kan worden, minimale residuele ziekte detectie nauwkeuriger geïdentificeerd kan worden en er meer gepersonaliseerde behandeling kan plaatsvinden.

In **Hoofdstuk 11** zijn de bevindingen van deze thesis bediscussieerd in de context van recente literatuur, een synthese van de bediscussieerde bevindingen in een bredere theoretische context en richtingen voor toekomstig onderzoek beschreven. De studies in deze thesis bevestigen, in het verlengde van de reeds beschikbare literatuur, dat de proliferatieve en anti-apoptotische activiteit belangrijke parameters zijn in de klinische praktijk van myeloïde maligniteiten voor een breed scala aan toepassingen. Deze studies dienen gezamenlijk als de eerste stap in de implementatie van deze belangrijke parameters in de klinische flowcytometrie van myeloïde maligniteiten. Desalniettemin, blijven er nog veel vragen over rondom dit onderwerp die nog geadresseerd moeten worden in de toekomst. Additionele proliferatieve en/of (anti-)apoptotische parameters, methodes voor het analyseren van deze parameters (bijvoorbeeld expressie niveaus in plaats van positieve fracties) en het combineren van deze methode met recent uitgevonden state-of-the-art technieken kan mogelijk de toepasbaarheid en impact van deze parameters in de routine praktijk van myeloïde maligniteiten vergroten.

Als laatste worden in **Hoofdstuk 12** de impact en implicaties van de vondsten die gepresenteerd zijn in deze thesis beschreven. Samengevat laten deze bevindingen zien dat biomarkers voor celdeling en celdood een hoog potentieel hebben voor een breed scala aan toepassingen gedurende het hele klinische proces van myeloïde maligniteiten om de kans op genezing en kwaliteit van leven voor deze patiënten te verbeteren. De volgende stap leidend naar implementatie van de Ki-67 proliferatie index en de Bcl-2 anti-apoptotische index is het onderzoeken van deze parameters in grootschalige multicenter studies en het organiseren van kwaliteitsrondes voor verdere standaardisatie van deze methodiek voor de routinematige klinische praktijk van myeloïde maligniteiten.

