

IMUNOFENOTIPIZACIJA AKUTNIH LEUKEMIJA I MINIMALNA OSTATNA BOLEST

KLARA DUBRAVČIĆ¹, DRAGO BATINIĆ^{1,2}

Imunofenotipizacija je etablirana laboratorijska metoda za karakterizaciju neoplazmi krvotvornog sustava i predstavlja jedan od temelja suvremene klasifikacije tih bolesti. U članku se sažeto raspravlja o mogućnostima i dometima protočnocitometrijske imunofenotipizacije leukemijskih stanica u kontekstu suvremene laboratorijske dijagnostike akutnih leukemija. Posebno se naglašava uloga te metode u određivanju stanične loze i stupnja maturacije (subklasifikaciji) malignih stanica čime značajno doprinosi diferencijalnoj dijagnostici akutnih leukemija. Drugo, ona usmjerava citogenetsku i molekularnu analizu u cilju što točnije definicije kliničkog entiteta. Nadalje, ta je metoda važna za otkrivanje biljega s potencijalnim prognostičkim ili terapijskim značenjem, kao i za otkrivanje specifičnih leukemijskih aberacija imunofenotipa na temelju kojih se može pratiti odgovor na terapiju, minimalna ostatna bolest i dijagnosticirati povrat bolesti.

Deskriptori: AKUTNA LEUKEMIJA, IMUNOFENOTIPIZACIJA, MINIMALNA OSTATNA BOLEST

Uvod

Akutne leukemije su izrazito heterogena skupina malignih hematoloških neoplazmi koje karakterizira klonska ekspanzija nezrelih krvotvornih stanica. Stoga je pravovremena i točna dijagnostika važna za odabir adekvatnog terapijskog pristupa i praćenje bolesnika. Nedavna klasifikacija tumora hematopoetskog i limfoidnog sustava od strane Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, 2008.) inkorporira različite biološke parametre malignih stanica, od citomorfologije i citokemije preko imunofenotipa do specifičnih citogenetskih i molekularnih aberacija, a u cilju što pre-

ciznije definicije klinički relevantnih entiteta. Klasifikacija definira gotovo 108 hematopatoloških entiteta, a glavni kriteriji za klasifikaciju akutnih leukemija jesu stanično podrijetlo (stanična loza) te rekurentne citogenetske i molekularne aberacije malignih stanica (1, 2). Bez obzira na tu činjenicu, imunofenotipizacija ima i dalje važno mjesto u dijagnostici i praćenju hematoloških neoplazmi, tim više što i sami autori klasifikacije navode da je protočnocitometrijska imunofenotipizacija metoda izbora za određivanje staničnog podrijetla (loze) blasta u akutnim leukemijama i analizu imunofenotipskih aberacija u cilju praćenja rezidualne bolesti (2). U ovom kratkom pregledu iznose se najvažniji aspekti protočnocitometrijske imunofenotipizacije u rutinskoj dijagnostici i praćenju akutnih leukemija.

Imunofenotipizacija

Imunofenotipizacija je etablirana laboratorijska metoda za dijagnostiku, karakterizaciju i praćenje neoplazmi krvotvornog sustava i čini jedan od temelja suvremene klasifikacije tih bolesti (1, 3-8). Tom se imunološkom metodom

na membrani ili unutar stanica otkrivaju specifični biljezi iz skupine leukocitnih diferencijacijskih antigena (LDA), poznatih i pod nazivom CD-biljega (Tablica 1, Slika 1) (3, 9). U načelu, imunofenotipska karakterizacija leukemija i limfoma temelji se na usporedbi imunofenotipskih značajkama normalnih krvotvornih stanica (3). Na taj je način omogućena identifikacija stanične loze, odnosno podrijetla malignih stanica, njihov stadij diferencijacije i maturacije, ali i otkrivanje aberacije fenotipa specifičnih za leukemiju/limfom (engl. leukemia-associated immunophenotypes, LAIP) (8, 10-11).

Značenje protočnocitometrijske imunofenotipizacije u akutnim leukemijama

Suvremena protočnocitometrijska imunofenotipizacija stanica u uzorcima suspektih na akutnu leukemiju ima jedno od središnjih mjesta u dijagnostici i praćenju akutnih leukemija (1). Uloga protočnocitometrijske imunofenotipizacije u dijagnostici i praćenju akutnih leukemija jest višetruka:

Tablica 1. A
Mješovite ili bifenotipske akutne leukemije (BAL) prema EGIL-u (15)

Bodovi*	B-loza	T-loza	Mijeloidna loza
2	cit.CD79a cit. CD22 cit. IgM	cit. CD3 TCR	cit.MPO (lizozim)
1	CD10 CD19 CD20	CD2 CD5 CD8	CD117 CD65 CD33 CD13
0,5	TdT CD24	TdT CD7 CD1a	CD14 CD15 CD64

*unutar loze zbroj bodova mora biti >2, za definiciju BAL-a zbroj bodova >4

Tablica 1. B
Definicija mješovitih akutnih leukemija (MPAL) prema WHO-klasifikaciji (2)

B-loza	T-loza	Mijeloidna loza
CD19 ^{sko++} + 1 od sljedećih (jako+): cit.CD22, CD79a, CD10 ili CD19 ^{slabo+} s najmanje 2 sljedeća (jako+): cit.CD22, CD79a, CD10	cit. CD3 ili mCD3 (rijetko)	MPO ili monocitna loza s najmanje 2 od sljedećih: CD11c, CD14, CD64, lizozim, nespecifična esteraza

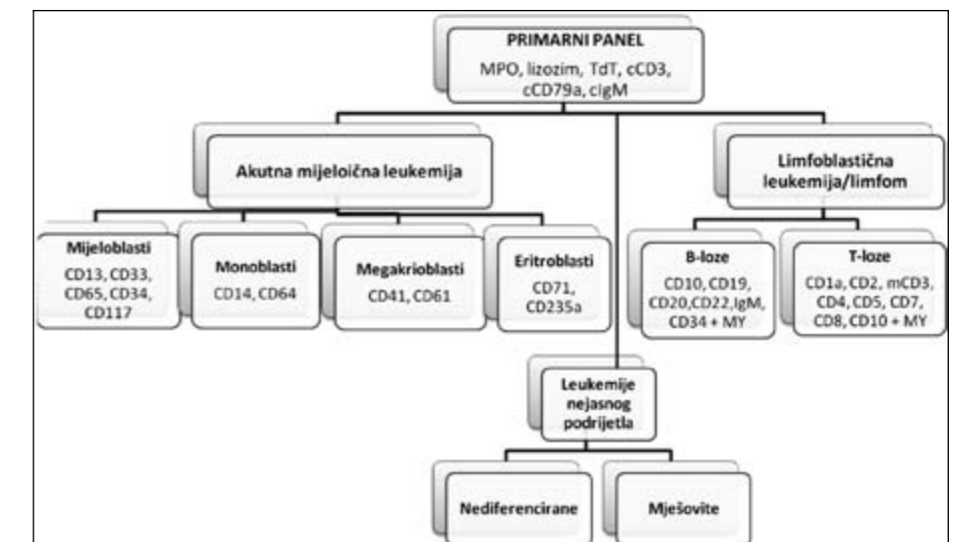
- dijagnostika i diferencijalna dijagnostika neoplazme definiranjem staničnog podrijetla (loze) i određivanja stupnja maturacije (tj. subklasifikacije) malignih stanica (1-10);
- korelacija imunofenotipskih profila s rekurentnim citogenetskim ili molekularnim aberacijama u cilju usmjeravanja citogenetskih i molekularnih analiza za preciznu diferencijalnu dijagnostiku (5, 8, 10);
- identifikacija biljega s potencijalnim prognostičkim ili terapijskim značenjem (12);
- identifikacija imunofenotipskih aberacija karakterističnih za leukemijske stanice koje čine temelj za određivanje minimalne ostatne bolesti tijekom terapije, kao i za dijagnostiku relapsa bolesti (8, 11-14).

Dijagnostičko značenje

Prema WHO, akutne leukemije se dijele u tri osnovne vrste: 1. akutnu mijeloidnu leukemiju (AML) i srodne prekursorske neoplazme; 2. limfoblastične leukemije/limfome (odnosno akutne limfoblastične leukemije - ALL prema staroj terminologiji) koji se prema podrijetlu dodatno razvrstavaju u T- i

B-limfoblastične oblike; i 3. akutne leukemije neodređenog, odnosno nejasnog (engl. ambiguous) podrijetla koje čine <5% svih akutnih leukemija (Slika 1) (1-2). Ove zadnje se dodatno dijele u tri podvrste: a) akutnu nediferenciranu leukemiju (engl. acute undifferentiated leukemia, AUL), b) akutne leukemije u kojem stanica izražavaju mješoviti fenotip (engl. mixed phenotype acute leukemia, MPAL), i c) mješovitu MPAL s dva fenotipski različita klona.

Citomorfološke značajke i imunofenotip blasta ključ su za brzu i pouzdanu dijagnostiku akutnih leukemija koja se u većini slučajeva može postaviti unutar nekoliko sati po primitku uzorka (koštane srži ili periferne krvi ili drugog biološkog materijal). Međutim, treba napomenuti da prilikom obrade uzoraka za protočnocitometrijsku imunofenotipizaciju može doći do oštećenja i/ili gubitka pojedinih vrsta stanica pa ne treba uvijek očekivati visoku podudarnost rezultata



Slika 1.
Imunofenotipizacija akutnih leukemija (modificirano prema ref. 9, 27 i 28)

citomorfološke i imunofenotipske analize. To se posebice odnosi na neke tipova stanica, ponajprije na megakariocite i plazma-stanice.

Imunofenotipizacija ima veliku ulogu u razlikovanju akutne mijeloidne leukemije od limfoblastične leukemije/limfoma i leukemija nejasnog podrijetla, potom u razlikovanju T- i B-limfoblastične leukemije/limfoma i inačica AML (mijeloblastna, monocitna, megakariocitna i eritroblastna). Posebno je važno mjesto imunofenotipizacije u dijagnostici akutnih mješovitih leukemija koje još uvijek predstavljaju složen klinički entite bez jasnih terapijskih smjernica (Tablica 1) (1, 2, 15-17). Na kraju, iako u dijagnostici akutnih leukemija WHO-klasifikacija ne zahtijeva detaljnu imunofenotipsku analizu (dovoljno je utvrditi npr. radi li se o B- ili T-limfoblastičnoj leukemiji), velik broj centara i dalje dodatno klasificira akutne leukemije prema smjericama stručnih udruga, npr. Europske skupine za imunološku fenotipizaciju leukemija (EGIL), odnosno European LeukemiaNet-a (4, 7, 15). Limfoblastične leukemije/limfomi se dodatno razvrstavaju na nekoliko podvrsta: u B-lozi to su pro-B, common, pre-B i B-ALL, a u T-lozi pro-T, pre-T, kortikalna i zrela T-ALL. Budući da te imunofenotipske kategorije nemaju veći prognostički značaj, to ih nova WHO-klasifikacija hematoloških tumora posebno ne spominje. Ipak, detaljan imunofenotipski profil važan je za utvrđivanje povezanosti s rekurentnim citogenetskim i molekularnim aberacijama, kao i za određivanje panela za određivanje minimalne ostatne bolesti (v. dolje).

Povezanost su s rekurentnim citogenetskim i molekularnim aberacijama

Pored dijagnostičkog značaja, imunofenotipizacija je važna za usmjerenje daljnje dijagnostike. Dosadašnja iskustva govore u prilog povezanosti imunofenotipa s određenim citogenetskim i molekularnim aberacijama leukemijskog kлона, što može imati nekoliko implikacija. Nalaz protočne citometrije unutar nekoliko sati od primitka uzorka može sugerirati daljnje citogenetske

i molekularne pretrage i na taj način sudjelovati u što točnoj diferencijalnoj dijagnostici bolesti te istodobno racionalizirati laboratorijske pretrage. Klasičan primjer za jest tipičan mijeloidni imunofenotip bez izražaja CD34 i HLA-DR što sugerira dijagnozu akutne promijelocitne leukemije i indicira daljnje citogenetske pretrage na translokaciju t(15;17) i molekularne analize (PML-RAR α) (5, 8, 10). Ostali "klasični" primjeri uključuju izražaj mijeloidnih biljega CD13 i CD33 te jak izražaj CD34 u BCR-ABL+ B-limfoblastičnoj leukemiji, preuredbu gena MLL u B-limfoblastičnoj leukemiji fenotipa TdT+/CD34+/CD10-/CD15+, kao i preuredbu gena E2A-PBX1 u B-limfoblastičnoj leukemiji fenotipa CD34-/CD10+/cit.IgM(μ)+mIgM-/CD20-/+ (5, 8). Iako se slični primjeri mogu naći i u AML, još jednom treba istaknuti da specifični imunofenotipski profili nikako ne predstavljaju surrogatne markere genetskih abnormalnosti (5, 10). Uloga imunofenotipa kao pokazatelja (cito)genetskih aberacija morat će se definirati velikim multicentričnim studijama s definiranim panelima reagencija.

Prognostičko i terapijsko značenje

Povijesno gledano, imunofenotip je prije 2-3 desetljeća imao važnu prognostičku ulogu i predstavljao jedan od kriterija za odabir odgovarajuće terapije. Primjerice, u prognostički nepovoljne entitete ubrajani su pro-B ALL i nezrela T-ALL, dok su ostali oblici (izuzev prave B-ALL) bili prognostički povoljniji (18). Međutim, ti su podaci dobiveni u eri kada citogenetski i molekularni nalazi nisu korišteni za stratifikaciju bolesnika i odabir terapije. Rezultati istraživanja tijekom zadnjeg desetljeća nesumnjivo govore u prilog činjenice da imunofenotip nije nezavisni prognostički čimbenik, ali u zbog povezanosti s određenim citogenetskim aberacijama pojedinim slučajevima može biti indirektno ukazivati na prognozu (npr. imunofenotip pro-B u dojenačkoj leukemiji) (12).

Unatoč gubitku atributa nezavisnog prognostičkog pokazatelja, imunofenotip i danas ima relativni prognostički značaj koji se može sagledati iz dva aspekta.

Prvo, imunofenotip će ostati važan za odabir specifične terapije, posebice u razvoju novih strategija "ciljanog" liječenja. Primjer za to jest primjena monoklonskih protutijela na antigene CD20 i CD22 u B-limfoblastičnoj i nelarabina (purinskog nukleozida) u T-limfoblastičnoj leukemiji. Slično, u oko 50% bolesnika s T-limfoblastičnom leukemijom/limfomom nalazi se aktivacijska mutacija NOTCH1 čije se djelovanje može zaokčiti specifičnim inhibitorima pa stoga imunofenotip ima "prognostički" značaj u selekciji bolesnika s T-ALL (19). S tim u svezi jest nedavno otkriće prognostički vrlo nepovoljnog oblika T-limfoblastične leukemije vrlo nezrelog prekursorskog imunofenotipa (engl. early T precursor, ETP) kojeg karakterizira izražaj T-, mijeloidnih i nezrelih biljega (20). Detaljna molekularna analiza tog oblika leukemije pokazala je cijeli niz aktivacijskih mutacija i inaktivacijskih lezija u stanicama odgovornih za agresivno biološko ponašanje te leukemije (21).

Drugi aspekt prognostičkog značenja imunofenotipizacije leži u otkrivanju specifičnih imunofenotipskih aberacija leukemijskog kлона (LAIP) koje se kasnije mogu koristiti u praćenju bolesnika tijekom terapije. O tom prognostičkom aspektu temeljenom na terapijskom odgovoru raspravlja se u sljedećem odjeljku.

Praćenje odgovora na terapiju - minimalna ostatna bolest

Određivanje MRD tijekom liječenja limfoblastične leukemije prepoznato je prije više od 15 godina, najprije molekularnim, a potom i protočnicometrijskim pristupom (22, 23). Mjerenje razine MRD tijekom liječenja de facto predstavlja procjenu biološkog potencijala leukemijskog kлона, a time i važan prognostički faktor za tijek i ishod bolesti. Nalaz minimalne ostatne bolesti (MRD) ima slične implikacije bez obzira na vrst akutne leukemije. Drugim riječima, nalaz MRD tijekom liječenja, a posebice na kraju konsolidacije korelira s relapsom bolesti i lošijom prognozom (Bene). Pored toga, mjerenje ranog odgovora na liječenje (tzv. redukcija blasta) može predvidjeti status remisije nakon indukcije i

relaps bolesti nakon terapije (24). Upravo su pedijatrijske studije MRD-a pokazale da ne samo prisutnost blasta, već i njihov udio predstavlja jedan od najvažnijih rizičnih čimbenika za relaps bolesti.

Određivanje MRD protočnom citometrijom temelji se na otkrivanju specifičnih "leukemijskih" aberacija malignih stanica (engl. leukemia-associated immunophenotypes, LAIP). Radi se o promjeni izražaja CD-biljega od strane malignih stanica u odnosu na normalne stanice sličnog maturacijskog statusa, a uključuju sljedeće aberacije: a) manjak ili prekomjernu ekspresiju određenog biljega; b) asinkroni izražaj dvaju biljega (npr. istovremeno nezrelog i zrelog); c) izražaj biljega drugih loza (npr. biljeg limfocita u AML). Iako se studije donekle razlikuju (ovisno da li se radi o AML i ili limfoblastičnoj leukemiji), svi se slažu da napredak tehnologije omogućava mjerenje MRD na razini >0,01%, odnosno 1×10^{-4} što predstavlja subkliničku razinu (bolesti) (25).

U tijeku su brojne studije koje istražuju ulogu MRD u vođenju bolesnika s akutnom leukemijom, a u slučaju limfoblastične leukemija sve ih se više fokusira na rani odgovor na terapiju (redukcija blasta). Republika Hrvatska također sudjeluje u kolaborativnom projektu interkontinentalne radne skupine ALL-IC u okviru pedijatrijske skupine BFM za dijagnostiku i liječenje ALL u djece. Klinička studija zahtijeva procjenu terapijskog odgovora 8. dana liječenja analizom blasta u perifernoj krvi, a 15. dana u koštanoj srži kao dodatna informaciju za stratifikaciju bolesnika u rizične skupine s različitim terapijskim pristupom. Primarni cilj laboratorijske kolaborativne studije FC-MRD bila je standardizacija postupka mjerenja MRD protočnom citometrijom u nacionalnim centrima u cilju primijene analize MRD u praksi. Točnije, udio blasta u koštanoj srži 15. dana liječenja (<0,1%, >0,1%-10% i >10%) sastavni je dio algoritma za stratifikaciju bolesnika u rizične skupine s različitim terapijskim opcijama (26). Klinička vrijednost FC-MRD moći će se procijeniti nakon završetka studije.

Metodološki aspekti

Imunofenotipizacija je metoda za otkrivanje specifičnih staničnih biljega iz skupine leukocitnih diferencijacijskih antigena (LDA), poznatih i pod nazivom CD-biljega. U tu se svrhu rabe životinjska (obično mišja) anti-CD monoklonska protutijela koja se vežu za odgovarajući biljeg na staničnoj membrani ili u unutrašnjosti stanice. U protočnoj citometriji su protutijela obilježena različitim fluorescentnim bojama pa je moguća istodobna analiza izražaja nekoliko (danas čak 6-10) različitih biljega na istoj stanici (27).

U cilju što točnije dijagnostike i klasifikacije hematoloških neoplazmi predloženi su brojni dijagnostički paneli CD-biljega (4-8). Međutim, temeljno načelo dijagnostike je manje-više isto i sastoji se od nekoliko koraka (Slika 1) (8, 9, 28). Općenito, u prvom se koraku primjenjuje ograničen set reagencija kako bi se odredila stanično loza leukemijskih stanica, dok se u sljedećim koracima točnije određuje njihov diferencijacijski i maturacijski status te imunofenotipske aberacije za kasnije praćenje minimalne ostatne bolesti. U prvom se koraku (probiru) ponajčešće rabi detekcija staničnih biljega koji su manje-više specifični za lozu, a to ovisno o panelu i mogućnostima laboratorija uključuje određivanje određenog broja citoplazmatskih i membranskih biljega.

Na temelju rezultata probira (prvog panela) nastavlja se detaljnija imunofenotipizacija sekundarnim panelom. Osim biljega loze, ti paneli sadržavaju i određeni broj biljega drugih loza za koje se pokazalo da se učestalije pojavljuju na blastima, kao npr. biljezi T-i NK-stanica CD2 i CD56 u AML ili mijeloidni biljezi CD13 i CD33 u BP-ALL. Sekundarnim panelom se određuje maturacijski status leukemijskih stanica važan za subklasifikaciju bolesti, otkrivaju leukemijski imunofenotipovi (LAIP) važni za određivanje MRD tijekom liječenja i eventualnu terapijsku stratifikaciju bolesnika (posebice u ALL), utvrđuju imunofenotipske aberacije udružene s rekurentnim citogenetskim ili molekularnim aberacijama malignog kлона i, konačno, daje prognostička informacija.

Autori izjavljuju da nisu bili u sukobu interesa. Authors declare no conflict of interest.

LITERATURA

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition. International Agency for Research on Cancer (IARC). Lyon, 2008; 439.
2. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009; 114 (5): 937-51.
3. Foon KA, Todd RF 3rd. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood*. 1986; 68 (1): 1-31.
4. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995; 9 (10): 1783-6.
5. Orfao A, Ortuño F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry A*. 2004; 58 (1): 62-71.
6. Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematology neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2007; 72 (1): 14-22.
7. Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia*. 2011; 25 (4): 567-74.
8. van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J et al. EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012; 26 (9): 1908-75.
9. Batinić D. Imunološka fenotipizacija akutnih leukemija dječje dobi. *Paediatr Croat* 1997; 41 (1): 83-8.
10. Hrusák O, Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia*. 2002; 16 (7): 1233-58.
11. Kern W, Bacher U, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T. The role of multiparameter flow cytometry for disease monitoring in AML. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010; 23 (3): 379-90.

12. Rowe JM. Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2010; 150 (4): 389-405.
13. Campana D. Minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2012; 19 (4): 313-8.
14. Mejstriková E, Fronková E, Kalina T, Omelka M, Batinić D, Dubravčić K et al. Detection of residual B precursor lymphoblastic leukemia by uniform gating flow cytometry. *Pediatr Blood Cancer*. 2010; 54 (1): 62-70.
15. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A et al. for the European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). The value of c-kit in the diagnosis of biphenotypic acute leukaemia. *Leukemia*. 1998; 12: 2038.
16. Batinić D, Dubravčić K, Rajić Lj, Mikulić M, Labar B. Bifenotipske i bilinijske akutne leukemije. *Acta Med Croatica* 2008; 62: 387-90.
17. Mikulic M, Batinic D, Sucic M, Davidovic-Mrsic S, Dubravcic K, Nemet D et al. Biological features and outcome of biphenotypic acute leukemia: a case series. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2008; 1 (4): 225-30.
18. Hoelzer D, Thiel E, Löffler H, Büchner T, Ganser A, Heil G et al. Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood*. 1988; 71 (1): 123-31.
19. Tammam J, Ware C, Efferson C, O'Neil J, Rao S, Qu X et al. Down-regulation of the Notch pathway mediated by a gamma-secretase inhibitor induces anti-tumour effects in mouse models of T-cell leukaemia. *Br J Pharmacol*. 2009; 158 (5): 1183-95.
20. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, Behm FG, Raimondi SC, Pei D et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol*. 2009; 10 (2): 147-56.
21. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2012; 481 (7380): 157-63.
22. Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciú S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer-Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med*. 1998; 339 (9): 591-8.
23. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 1998; 351 (9102): 550-4. Comment in *Lancet*. 1998; 351 (9111): 1287.
24. Ratei R, Basso G, Dworzak M, Gaipa G, Veltroni M, Rhein P et al. AIEOP-BFM-FCM-MRD-Study Group. Monitoring treatment response of childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction. *Leukemia*. 2009; 23 (3): 528-34.
25. Béné MC, Kaeda JS. How and why minimal residual disease studies are necessary in leukemia: a review from WP10 and WP12 of the European LeukaemiaNet. *Haematologica*. 2009; 94 (8): 1135-50.
26. ALL IC-BFM 2009. A randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia. August, 2009.
27. Batinić D, Rnjak L, Dubravčić K. Protočna citometrija u hematologiji. *Paediatr Croat* 2006; 50 (1): 176-82.
28. Peters JM, Ansari MQ. Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Arch Pathol Lab Med*. 2011; 135 (1): 44-54.

Summary

IMMUNOPHENOTYPING OF ACUTE LEUKEMIA AND MINIMAL RESIDUAL DISEASE

K. Dubravčić, D. Batinić

Immunophenotyping is established laboratory methods for the characterization of hematopoietic neoplasms and represents one of the cornerstones of modern classification of these diseases. The article briefly discusses the capabilities and achievements of flow cytometry immunophenotyping of leukemic cells in the context of contemporary laboratory diagnosis of acute leukemia. Particularly emphasizes the role of the method in determining the cell lineage and stage of maturation (i.e. subclassification) of malignant cells, which contributes significantly to the differential diagnosis of acute leukemia. Second, it directs the cytogenetic and molecular analyses in order to achieve more precise definition of the clinical entity. Furthermore, this method is important for detecting markers with potential prognostic and therapeutic significance, as well as for the detection of specific immunophenotypic aberrations of leukemic useful for monitoring response to therapy, minimal residual disease and disease recurrence.

Descriptors: ACUTE LEUKEMIA, IMMUNOPHENOTYPING, MINIMAL RESIDUAL DISEASE

Primljeno/Received: 26. 3. 2013.

Prihvaćeno/Accepted: 3. 4. 2013.