

Aberantni imunofenotipovi u prognozi akutne mijeloične leukemije

Prognostic value of aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia

Mirta Mikulić^{1*}, Vedran Hostić², Drago Batinić³, Ranka Serventi-Seiwerth¹, Renata Zadro³, Sanja Davidović³, Klara Dubravčić³, Pavle Rončević¹, Damir Nemet¹, Boris Labar¹

Sažetak. Cilj: Dijagnoza akutne mijeloične leukemije (AML) temelji se na nalazu citomorfologije, imunofenotipizacije i citogenetike. Osnovna uloga imunofenotipizacije jest određivanje krvne loze te prepoznavanje aberantnih fenotipova. U ovom članku određena je učestalost i prognostička vrijednost aberantnih fenotipova u bolesnika s AML-om. **Metode:** U retrospektivnom istraživanju prikupljeni su podaci o dijagnozi i liječenju 123 odrasla bolesnika s novodijagnosticiranom akutnom mijeloičnom leukemijom, koji su liječeni u Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC-a Zagreb u razdoblju od 2000. do 2007. godine. **Rezultati:** Učestalost aberantnih imunofenotipova iznosila je 74.8 %. Najčešća je bila asinkrona ekspresija biljega, nađena u 70 % bolesnika, zatim koekspresija limfocitnih biljega u 35 % bolesnika, te neizražaj biljega specifičnih za lozu u 24 % bolesnika. U procjeni odgovora na liječenje nađeno je da bolesnici s aberantnim fenotipom po tipu neizražaja biljega specifičnog za lozu: CD33-CD13+ imaju lošiji odgovor na uvodno liječenje; u analizi preživljenja bolesnici s aberantnim fenotipom po tipu asinkroniciteta: CD117+C34+CD15+/CD14+/CD11b+ imaju kraće ukupno preživljenje i preživljenje bez znakova bolesti. **Rasprava i zaključak:** Uz dijagnostičku, imunofenotipizacija procjenom prisustva aberantnih imunofenotipova ima i prognostičku vrijednost u bolesnika s AML-om.

Ključne riječi: aberantni imunofenotip, akutna mijeloična leukemija, imunofenotipizacija

Abstract. Aim: Diagnosis of acute myeloid leukemia (AML) is based on cytomorphological, immunophenotypic and cytogenetic findings. The main role of immunophenotyping is lineage assignment and detection of aberrant phenotypes. The objective of this study was to analyze the incidence and the prognostic value of aberrant phenotypes in AML. **Methods:** Data on diagnosis and treatment of 123 patients with newly diagnosed AML, treated in the University Hospital Center Zagreb in the period from 2000-2007, was retrospectively analyzed. **Results:** The incidence of aberrant phenotypes was 74.8 %. The most frequent aberrant phenotype was asynchronous expression which was found in 70 % of patients, followed by co-expression of lymphoid markers in 35 % of patients and loss of lineage-specific markers in 24 % of patients. The aberrant phenotype CD33-CD13+ correlates with lower complete remission rate, while the aberrant phenotype CD117+C34+CD15+/CD14+/CD11b+ correlates with shorter overall and disease-free survival. **Discussion and conclusion:** In addition to its diagnostic role, immunophenotyping of AML offers information about patient prognosis through the detection of aberrant phenotypes.

Keywords: aberrant immunophenotype, acute myeloid leukemia, immunophenotyping

¹Zavod za hematologiju,
Klinika za unutarnje bolesti,
KBC Zagreb, Zagreb

²Zavod za hitnu medicinu grada Zagreba,
Zagreb

³Zavod za laboratorijsku dijagnostiku,
KBC Zagreb, Zagreb

Primljeno: 20. 4. 2011.

Prihvaćeno: 28. 7. 2011.

Adresa za dopisivanje:

Dr. sc. Mirta Mikulić
Zavod za hematologiju
Klinika za unutarnje bolesti, KBC Zagreb
Kišpatićeva 12, 10 000 Zagreb
e-mail: mpisk@mef.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD

Akutne mijeloične leukemije (AML) morfološki i genetički heterogena su skupina klonalnih bolesti krvotvornih matičnih stanica. Temeljne značajke AML-a jesu zastoj u sazrijevanju i nekontrolirana proliferacija leukemijskih matičnih stanica uz istodobno potiskivanje zdravih matičnih stanica. Zbog toga se nakupljaju nefunkcionalne nezrele stanice koje se nazivaju blasti¹. Prema klasifikaciji zloćudnih krvotvornih tumora Svjetske zdravstve-

Imunofenotipizacija protočnom citometrijom neizostavna je metoda u dijagnostici akutne mijeloične leukemije, no ona ima i nedovoljno ispitano prognostičku vrijednost.

ne organizacije (SZO) iz 2001. i 2008. godine^{2,3}, za postavljanje dijagnoze i ispravnu karakterizaciju AML-a nužno je primijeniti više komplementarnih metoda analize aspirata koštane srži: citomorfologiju, imunofenotipizaciju protočnom citometrijom, kariotipizaciju te molekularnu dijagnostiku. Imunofenotipizacijom zdravih krvotvornih stanica moguće je odrediti diferencijacijske putove različitih krvnih loza i to identifikacijom promjena u izražaju citoplazmatskih i membranskih biljega koji su povezani s određenom lozom ili specifični za nju. Imunofenotipizacija protočnom citometrijom rutinski se koristi u dijagnostici zloćudnih hematoloških bolesti ponajprije u razlikovanju mijeloidne od limfoidne loze, razlikovanju B- i T-staničnih akutnih leukemija i u prepoznavanju mješovitih leukemija. Dijagnostička vrijednost polazi od procjene zrelosti stanica i određivanja broja blasta, te procjene odstupanja u ekspresiji biljega koja se u hematološkim zloćudnim tumorima mogu podijeliti u pet kategorija:

- (i) neuobičajeno povišena ili snižena razina biljega normalno izraženih kod pojedinoga staničnog tipa u određenome razvojnom stadiju, što u pojedinim slučajevima uključuje potpuni gubitak normalnih antigena;
- (ii) asinkrona ekspresija biljega (izražaj biljega koji se normalno nalaze na određenom tipu stanice, ali u pogrešnom stadiju sazrijevanja);
- (iii) neuobičajeno homogena ekspresija jednog biljega ili više njih na populaciji koja normalno ima više heterogenu ekspresiju;

- (iv) izražaj biljega koji se normalno ne nalaze na tom tipu stanica ili staničnoj lozi (tzv. koekspresija);
- (v) neuobičajena ekspresija biljega u odnosu na vrijednosti vezane uz raspršenje svjetlosti (FSC i SSC).

Navedeni se poremećaji u izražaju biljega nazivaju aberantnim ili leukemijskim imunofenotipovima (eng. *leukemia-associated phenotype*)⁴⁻⁹.

U AML-u se imunofenotipizacija koristi za prepoznavanje populacije blasta i njezino svrstavanje u mijeloidnu lozu, a posebno je važna u dijagnostici minimalno diferenciranog AML-a i akutne megakarioblastne leukemije. Dijagnoza AML-a temelji se na nalazu ekspresije biljega rane mijelomonocitne diferencijacije, uključujući CD13, CD15, CD33, CD64 CD117 i citoplazmatsku mijeloperoksidazu (MPO), a česta je i aberantna ekspresija limfocitnih biljega^{6,7,10}.

Osim dijagnostičke vrijednosti imunofenotipizacije u AML-u, u brojnim je studijama prepoznata i njezina prognostička vrijednost, u smislu korelacije ekspresije pojedinih biljega ili kombinacije biljega s odgovorom na liječenje i preživljenjem bolesnika¹¹⁻¹³, i u smislu korelacije ekspresije biljega s drugim laboratorijskim nalazima, ponajprije citogenetičkim promjenama¹⁴.

Uz navedena ispitivanja prognostičke vrijednosti pojedinih antigena, u posljednje se vrijeme pokušalo istražiti i prognostičku vrijednost aberantnih imunofenotipova^{15,16}, ili kombinacija biljega^{17,18}, kao i mogućnost njihove upotrebe u praćenju minimalne ostatne bolesti¹⁹⁻²¹.

Cilj ovog ispitivanja bio je procijeniti učestalost i značaj prisustva aberantnih imunofenotipova u bolesnika s akutnom mijeloičnom leukemijom.

BOLESNICI I METODE

U ovom retrospektivnom istraživanju prikupljeni su podaci o dijagnozi i liječenju 123 odrasla bolesnika s novodijagnosticiranom akutnom mijeloičnom leukemijom, koji su liječeni u Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC-a Zagreb, u razdoblju od 2000. do 2007. godine. Uključeni su bolesnici u kojih je prema klasifikaciji SZO-a³ postavljena dijagnoza AML-a sa specifičnim genetičkim promjenama (bez akutne promijelocitne leukemije) ili AML-a neklasificirana drukčije. Bolesnici s AML-om s promjenama pridruženim mijelodisplaziji nisu bili uključeni u ispitivanje.

Istraživanje su odobrila etička povjerenstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Dijagnoza AML-a postavljena je prema podjeli SZO-a³. Citološka dijagnostika uključivala je citomorfološku i citokemijsku analizu. Citogenetičke tehnike G-pruganja i fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) korištene su u dijagnostici kromosomskih promjena. Tehnikom FISH ispitane su sljedeće kromosomske promjene: inv(16), t(15;17), t(8;21), abn. 11q23. Molekularna tehnika PCR primijenjena je za dokaz promjena gena MLL, te dokaz fuzijskih gena PML/RARA, AML/ETO, CBFβ-MYH11 i BCR/ABL. Ovisno o citogenetičkom nalazu, te PCR, ispitanici su podijeljeni u skupine dobrog, srednjeg i lošeg rizika, prema smjernicama Europske mreže za leukemiju (engl. *European LeukemiaNet*)²².

Imunofenotipizacija se provodila standardnim postupkom prema EGIL-u⁶. Nakon lize eritrocita, leukociti koštane srži analizirani su na izražaj specifičnih leukocitnih biljega koristeći panel monoklonskih protutijela i protočnu citometriju (FACScan i FACSCalibur tvrtke BD Biosciences, SAD). Korištena su sljedeća protutijela konjugirana s FITC, (R)PE, RP-CY5, PerCP i APC fluorokromima, u procedurama dvostrukog, trostrukog te četverostrukog bojenja: CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD22, CD33, CD34, CD41, CD45, CD56, CD64, CD65w, CD71, CD79a, c-kit/CD117, anti-glycophorin A, anti-MPO, anti-Tdt, anti-lysozyme i anti-HLA DR. Kao granica pozitivnosti određena je razina ekspresije u više od 20 % blasta za sve mijeloične te B/T limfocitne biljege, osim za MPO, gdje je granica pozitivnosti na 10 %. Aberantni su imunofenotipovi definirani prisutnošću > 10 % blasta na kojima su istodobno izraženi biljezi prema tipu: asinkroniciteta (CD117+CD34+CD15+/CD14+/CD11b+; CD117-CD34+CD15+/CD14+/CD11b+; CD117+CD34+CD56+), izostanka biljega specifičnog za lozu (CD33+CD13-, CD33-CD13+) ili koekspresije limfocitnih biljega CD7, CD2, CD19, CD10. Bolesnici su liječeni intenzivnom kemoterapijom prema protokolima AML10²³ ili AML12²⁴ Europske organizacije za istraživanje i liječenje raka (EORTC), koji uključuju i autolognu ili alogeničnu

transplantaciju krvotvornih matičnih stanica (TKMS), ovisno o postojanju srodnoga podudarnog davatelja. U pripremi za transplantaciju primjenjivan je standardni mijeloablativni program s busulfanom u kombinaciji s ciklofosamidom²³.

U statističkoj analizi korišten je program SPSS15 (SPSS Inc., USA). U analizi vjerojatnosti povezanosti izražaja pojedinih biljega ili prisustva aberantnog fenotipa s citogenetičkim svojstvima i ishodom liječenja korišten je χ^2 i Fisherov egzaktni test; a u univarijantnoj analizi preživljenja Kaplan-

Akutne mijeloične leukemije u velikog se dijela bolesnika odlikuju prisustvom aberantnih imunofenotipova, što označava istovremeni izražaj biljega na način na koji se na zdravim stanicama ne može naći.

Tablica 1. Karakteristike bolesnika

Table 1. Patient characteristics

N	123
Dob	46 (20-59)
Godine, medijan (raspon)	
Spol m/ž	57/66
	Medijan (raspon)
Leukociti , x10 ⁹ /L	64 (0,8-455,6)
Hemoglobin , g/dL	94 (36-157)
Trombociti , x10 ⁹ /L	52 (5-548)
Blasti u koštanoj srži (%)	64 (20-99)
FAB podtip	N (%)
M0	8 (6,5)
M1	16 (13,0)
M2	55 (44,7)
M3	0
M4	20 (16,3)
M5	19 (15,4)
M6	1 (0,8)
M7	0
Nepoznato	4 (3,3)
Kemoterapija	N (%)
Standardne doze Ara-C	75 (61,0)
Visoke doze Ara-C	45 (36,6)
“Mini-ICE”	1 (0,8)
Ostalo ^a	2 (1,6)
Transplantacija krvotvornih matičnih stanica	
Autologna	66 (53,7)
Alogenična	15 (13,8)

^apalijativno ili suportivno liječenje

Tablica 2. Zastupljenost aberantnih fenotipova**Table 2.** Aberrant phenotype distribution

	Svi bol. N=123		
	Test.	Poz.	
	N	N	% ^a
Koekspresija limfocitnih biljega			
CD7	109	27	24,8
CD10	53	3	5,7
CD19	114	11	9,6
CD2	66	5	7,6
Više biljega		5	
Asinkroni izražaj biljega			
CD117+CD34+CD15/CD14/CD11b+		19	28,4
CD117+CD34-CD15/CD14/CD11b+	67	14	20,9
CD117+CD34+CD56+		14	20,9
Gubitak biljega specifičnog za lozu			
CD33+CD13-		17	14,8
CD33-CD13+	115	11	9,6
Istovremeno 2 tipa aberacije		22	
Istovremeno 3 tipa aberacije		3	

^apostotak od broja testiranih bolesnika

Određivanjem prisustva aberantnih imunofenotipova pri dijagnozi i tijekom liječenja može se procjenjivati minimalna ostatna bolest, a neki tipovi aberantnih imunofenotipova imaju utjecaj na prognozu.

-Meierove krivulje te log-rank test za usporedbu preživljenja pojedinih skupina bolesnika.

REZULTATI

Kliničke i laboratorijske značajke 123 bolesnika uključenih u ispitivanje navedene su u tablici 1. Učestalost pojedinih tipova aberantnih imunofenotipova navedena je u tablici 2. Pojavnost aberantnih imunofenotipova bila je 74,8 %. Asinkrona ekspresija biljega nađena je u 70 % bolesnika, neizražaj biljega specifičnih za lozu u 24 % bolesnika, a koekspresija limfocitnih biljega u 35 % bolesnika. U 22 bolesnika (17,9 %) nađena su istovremeno dva tipa aberacije, a u 3 bolesnika (2,4 %) istovremeno tri tipa aberacije.

U analizi povezanosti koekspresije limfocitnih biljega s citogenetskim promjenama nađeno je da blasti bolesnika kod kojih je identificirana promjena t(8;21) značajno češće izražavaju biljeg CD19 (33 naspram 3 %, $P = 0,028$) i CD56 (57 naspram 11 %, $P = 0,028$). Nije nađena povezanost

između prisustva aberacije po tipu asinkronije ili neizražaja biljega specifičnog za lozu s citogenetskim promjenama dobrog, lošeg ili srednjeg rizika ($P = 0,058$, i $P = 0,796$).

Kompletna remisija nakon uvodne terapije postignuta je u 72 % bolesnika. Bolesnici s aberantnim fenotipom CD33-CD13+ teže postižu kompletnu remisiju u usporedbi s bolesnicima s aberantnim fenotipom CD33+CD13- (47,4 % naspram 81,5 %, $P = 0,017$). Nije nađena povezanost između prisustva aberacije po tipu asinkroniciteta i postizanja kompletne remisije ($P = 0,862$).

Srednje preživljenje svih bolesnika iznosi 47,6 mjeseci (95 % CI, 39,4 – 55,7), a srednje preživljenje bez znakova bolesti 55,9 mjeseci (95 % CI, 46,7 – 65,2). Srednje preživljenje ispitanika bez asinkrone ekspresije iznosi 50,7 mjeseci (95 % CI, 28,7 – 72,9), bolesnika s CD117+CD34-CD15+/CD14+/CD11b+ 51,6 mjeseci (95 % CI, 33 – 70,2), a bolesnika s CD117+CD34+CD15+/CD14+/CD11b+ 25,2 mjeseca (95 % CI, 10,5 – 40). Razlika u preživljenju između potonje dvije skupine aberantnih fenotipova statistički je značajna ($P = 0,031$) (slika 1).

Bolesnici s fenotipom CD117+CD34+CD15+/CD14+/CD11b+ imaju značajno lošije preživljenje bez znakova bolesti – 21,8 mjeseci (95 % CI, 5,3 – 38,2), nego bolesnici bez asinkrone ekspresije – 54,4 mjeseca (95 % CI, 30,5 – 78,1) i ispitanici s CD117+CD34-CD15+/CD14+/CD11b+ fenotipom – 53,1 mjesec (95 % CI, 9,8 – 72,4), te ispitanici s fenotipom CD117+CD34+CD56+ – 44,1 mjesec (95 % CI, 21,9 – 66,3) ($P = 0,037$) (slika 2).

Srednje preživljenje bolesnika bez izostanka izražaja biljega specifičnog za lozu iznosi 53,1 mjeseca (95 % CI, 43,3 – 62,9), ispitanika s CD33+CD13-32 mjeseca (95 % CI, 15,2 – 48,8), a ispitanika s CD33-CD13+ 18,1 mjeseci (95 % CI, 8,1 – 27,3), no razlika nije statistički značajna ($P = 0,082$). Također nije nađena statistički značajna razlika u preživljenju bez znakova bolesti u bolesnika s izostankom biljega specifičnih za lozu ($P = 0,278$).

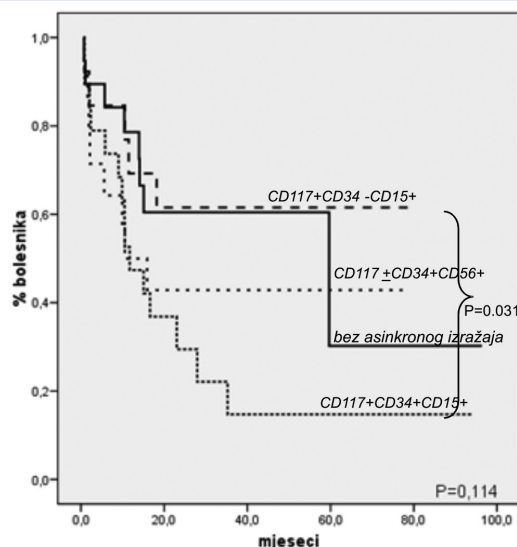
U analizi preživljenja i preživljenja bez znakova bolesti nije nađena statistički značajna razlika između bolesnika s i bez koekspresije limfocitnih biljega.

RASPRAVA

Incidencija aberantnih fenotipova od 74,8 % u našoj skupini ispitanika sukladna je s podacima u lite-

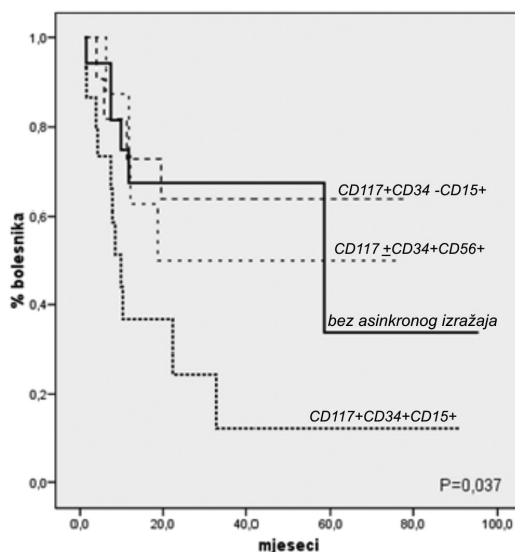
raturi, gdje se kreće od 64 – 94 %, ovisno o broju zadanih fenotipova, broju korištenih biljega i postupcima višestrukog bojenja^{9,16,21,25}. Stopa pojavnosti pojedinih tipova, pri čemu je najčešća asinkrona ekspresija, zatim koekspresija limfocitnih biljega te izostanak biljega specifičnog za lozu, također odgovara podacima u literaturi. U svom smo istraživanju pokušali procijeniti značaj pojedinih tipova aberantnih fenotipova. Analizom korelacije prisustva aberantnih fenotipova s citogenetičkim promjenama našli smo da je koekspresija limfocitnog biljega CD19, te biljega CD56, češća u t(8;21), što je sukladno podacima u literaturi¹⁴. U analizi utjecaja prisustva aberantnog fenotipa na odgovor na liječenje našli smo da bolesnici čiji su blasti CD33-CD13+ teže postižu remisiju bolesti, a budući da smo pronašli trend lošijeg preživljenja u bolesnika s tim fenotipom, moglo bi se ovu aberaciju svrstati u nepovoljne, što do sada nije bilo pokazano. U analizi utjecaja prisutnosti aberantnog fenotipa na ishod liječenja također smo pokazali da je asinkroni fenotip CD117+C34+CD15+/CD14+/CD11b+ prognostički nepovoljan u odnosu na nepostojanje asinkronog fenotipa ili njihove druge oblike: CD117+C34-CD15+/CD14+/CD11b+ ili CD117+C34+CD56+. Povoljan prognostički značaj fenotipa CD117+CD34-CD15+ poznat je od ranije¹⁶, no ovaj bi se nalaz mogao objasniti i prisutnošću, odnosno odsutnošću ekspresije biljega CD34, koji je do sada u više radova identificiran kao nepovoljan prognostički biljeg²⁶. Od ranije je poznato da koekspresija limfocitnih biljega nema utjecaj na prognozu bolesnika, kao što smo i pokazali u ovom ispitivanju¹⁰, no u pojedinim je radovima pokazan negativan utjecaj ekspresije biljega CD7²⁷, što nismo uspjeli potvrditi.

Relativno visok udio aberantnih fenotipova u bolesnika s AML-om čini ih pogodnima za praćenje minimalne ostatne bolesti i odgovora na liječenje kao što je već pokazano u više studija^{19,20}. Usto, ovim smo rezultatima potvrdili da uz dijagnostičku vrijednost, imunofenotipizacija ima i prognostički značaj. Iako se danas bolesnici s AML-om stratificiraju u skupine rizika ovisno o genskim promjenama²², kod određenog broja bolesnika nalaz citogenetike pri dijagnozi nije informativan, kao npr. nalaz normalnog kariotipa ili tehničke neadekvatnosti. U tih bolesnika imunofenotipiza-



Slika 1. Preživljenje ispitanika s akutnom mijeloičnom leukemijom u odnosu na prisutnost asinkronog aberantnog imunofenotipa

Figure 1. Survival of patients with AML in relation to the presence of asynchronous aberrant immunophenotype



Slika 2. Preživljenje bez znakova bolesti ispitanika s akutnom mijeloičnom leukemijom u odnosu na prisutnost asinkronog aberantnog imunofenotipa

Figure 2. Survival of patients with AML without symptoms in relation to the presence of asynchronous aberrant immunophenotype

cija bi se mogla koristiti kao komplementarna metoda, kako za određivanje stupnja rizika, tako i za odluku o intenzivitetu postremisijskog liječenja, što je potrebno prethodno istražiti i u prospektivnim multicentričnim studijama.

ZAKLJUČAK

Imunofenotipizacija je danas rutinska i standardna dijagnostička metoda u bolesnika s AML-om. Njenom se primjenom uz ostale dijagnostičke postupke mogu bolje odrediti pojedini podtipovi AML-a. Čini se da aberantni fenotipovi imaju značaj u prognozi AML-a, što je potrebno u budućim kliničkim istraživanjima potvrditi. Usto, aberantni fenotipovi AML-a vjerojatno su pogodni za praćenje i procjenu minimalne ostatne bolesti, kao i za procjenu odgovora na liječenje.

LITERATURA

1. Labar B, Hauptman E (eds). Hematologija. 2nd edition. Zagreb: Školska knjiga, 2007;201-31.
2. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, 2001.
3. Wardiman JW, Brunning RD, Arber DA, Le Beau MM, Porwit A, Tefferi A et al. Introduction and overview of the classification of the myeloid neoplasms. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. (eds) WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, Lyon: IARC, 2008;17-30.
4. Batinić D, Boranić M. Lineage and differentiation-stage specific markers for classification/diagnosis of leukaemia. *Period Biol* 1988;90:105-14.
5. Batinić D, Rnjak L, Dubravčić K. Protočna citometrija u hematologiji. *Pediatr Croat* 2006;50(Suppl 1):176-82.
6. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995;15:1673-4.
7. Bene MC. Immunophenotyping of acute leukaemias. *Immunol Lett* 2005;98:9-21.
8. Basso G, Baldini B, Zen L, Orfao A. New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica* 2001;86:675-92.
9. Al-Mawali A, Gillis D, Hissaria P, Lewis I. Incidence, sensitivity, and specificity of leukemia-associated phenotypes in acute myeloid leukemia using specific five-color multiparameter flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 2008;129:934-45.
10. Ball ED, Davis RB, Griffin JD, Mayer RJ, Davey FR, Arthur DC et al. Prognostic value of lymphocyte surface markers in acute myeloid leukemia. *Blood* 1991;77:2242-50.
11. Mason KD, Juneja SK, Szer J. The immunophenotype of acute myeloid leukemia: is there a relationship with prognosis? *Blood Rev* 2006;20:71-82.
12. Repp R, Schaeckel U, Helm G, Thiede C, Soucek S, Pascheberg U et al. Immunophenotyping is an independent factor for risk stratification in AML Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 2003;53B:11-9.
13. Chang H, Salma F, Yi Q, Patterson B, Brien B, Mindenc MD. Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2004;28:43-8.
14. Orfao A, Ortuno F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry Part A* 2004;58A:62-71.
15. Al-Mawali A, To LB, Gillis D, Hissaria P, Mundy J, Lewis I. The presence of leukaemia-associated phenotypes is an independent predictor of induction failure in acute myeloid leukaemia. *Int Jnl Lab Hem* 2007;31:61-8.
16. Bahia DM, Yamamoto M, Chauffaille ML, Kimura EY, Bordin JO, Filgueiras MA et al. Aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia: a high frequency and its clinical significance. *Haematologica* 2001;86:801-6.
17. Derolf ÅR, Björklund E, Mazur J, Björkholm M, Porwit A. Expression patterns of CD33 and CD15 predict outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2008;49:1279-91.
18. Plesa C, Chelghoum Y, Plesa A, Elhamri M, Tigaud I, Michallet M et al. Prognostic Value of Immunophenotyping in Elderly Patients With Acute Myeloid Leukemia. A Single-institution Experience *Cancer* 2008;112:572-80.
19. Kern W, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer* 2008;112:4-16.
20. Kern W, Voskova D, Schoch C, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T. Prognostic impact of early response to induction therapy as assessed by multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2004;89:528-40.
21. Campana D, Coustan-Smith E. Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia by Flow Cytometry. *Cytometry* 1999;38:139-52.
22. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010;115:453-74.
23. Keating S, Suci S, de Witte T, Zittoun R, Mandelli F, Belhabri A et al. The stem cell mobilizing capacity of patients with acute myeloid leukemia in complete remission correlates with relapse risk: results of the EORTC-GIMEMA AML-10 trial. *Leukemia* 2003;17:60-7.
24. Willemze R, Suci S, Mandelli F, de Witte T, Labar B, Marie JP et al. High dose cytosine arabinoside (HD-AraC) vs standard dose araC (SD-AraC) during Induction, and stem cell transplantation followed by IL-2 or no maintenance in acute myelogenous leukemia (AML): First report on the AML-12 Phase III trial of the EORTC Leukemia Group (LG) and GIMEMA. *Blood (Abstract book)* 2005;106:271.
25. Kussick SJ, Wood BL. Using 4-Color Flow Cytometry to Identify Abnormal Myeloid Populations. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:1140-7.
26. Cascavilla, N, Musto P, d'Arena G, Ladogana S, Matera R, Carotenuto M. Adult and childhood acute lymphoblastic leukemia: clinicobiological differences based on CD34 antigen expression. *Haematologica* 1997;82:31-7.
27. Venditti A, del Poeta G, Buccisano F, Tamburini A, Cox-Froncillo MC, Aronica G et al. Prognostic relevance of the expression of Tdt and CD7 in 335 cases of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1998;12:1056-63.