

Diagnostyka i ocena skuteczności leczenia przewlekłej białaczki szpikowej

Diagnosis and monitoring of chronic myeloid leukemia therapy

Tomasz Sacha, Kajetana Foryciarz

Katedra Hematologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie

W diagnostyce przewlekłej białaczki szpikowej (CML) wykorzystywane są badania morfologiczne krwi obwodowej i szpiku kostnego, badania cytogenetyczne oraz badania molekularne oparte na różnych odmianach reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Badania morfologiczne pozwalają między innymi na ustalenie fazy choroby w chwili rozpoznania, która jest wówczas najważniejszym czynnikiem rokowniczym. Konwencjonalne badanie kariotypu umożliwia ustalenie rozpoznania i dostarcza informacji o dodatkowych zaburzeniach cytogenetycznych, które mogą mieć znaczenie rokownicze. Na podstawie badań PCR ustala się typ i ilość transkryptu BCR-ABL1. Celem leczenia CML jest jak największa redukcja liczby komórek białaczkowych. Dlatego w trakcie terapii konieczne jest stosowanie metod badawczych o odpowiedniej czułości. Niezwykle ważne jest ściśle przestrzeganie zaleceń dotyczących czasu i rodzaju wykonywanych badań służących ocenie skuteczności leczenia. Osiągnięcie i utrzymanie całkowitej odpowiedzi cytogenetycznej (CCyR) w czasie przewidzianym dla odpowiedzi optymalnej to wskaźnik o największej wartości, wpływający na czas do progresji choroby i całkowity czas przeżycia chorych. Podobne, lecz mniej udokumentowane znaczenie ma osiągnięcie większej odpowiedzi molekularnej (MMoR). Śledzenie kinetyki zmian ilości transkryptu BCR-ABL1 w pierwszych miesiącach leczenia imatynibem (IM) może służyć prognozowaniu odpowiedzi podczas dalszego leczenia, później może ostrzegać o zbliżającym się nawrocie lub progresji CML. W przypadku oporności na IM analiza mutacji kinazy ABL1, stężenia leku w surowicy krwi i ekspresji hOCT1 może pomóc w podjęciu decyzji o wyborze dalszego leczenia.

Słowa kluczowe: przewlekła białaczka szpikowa, diagnostyka, ocena skuteczności leczenia

Hematologia 2010; 1, 3: 219–228

Abstract

The diagnosis of chronic myeloid leukemia (CML) is based on various techniques, including morphology of peripheral blood and bone marrow, conventional karyotyping and different types of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. The phase of CML at diagnosis, revealed by morphologic investigation, is the most important risk factor before introduction of therapy. Additional cytogenetic abnormalities could have some prognostic significance and can be detected by conventional karyotyping. PCR-based methods inform about the type and quantity of BCR-ABL1 transcript. The goal of CML therapy is to reduce maximally the number of leukemic cells, therefore, diagnostic methods used for therapy monitoring should have optimal

sensitivity. The complete cytogenetic response (CCyR), achieved in the optimal time, is the strongest and best confirmed measure of therapy success influencing progression free and overall survival. Similar, but less documented value has the achievement of major molecular response (MMoR). Early monitoring of BCR-ABL1 level after starting imatinib (IM) therapy may be useful in predicting response, and subsequently, it could precede the relapse or progression of the disease. In case of resistance, the analysis of ABL1 kinase mutations, IM blood level or hOCT1 expression may help in future therapy choice decision making process.

Key words: chronic myeloid leukemia, diagnosis, treatment monitoring

Hematologia 2010; 1, 3: 219–228

Wprowadzenie

Przewlekła białaczka szpikowa (CML, *chronic myeloid leukemia*) jest klonalną chorobą komórki macierzystej szpiku wywołaną pojawieniem się chimerowego genu *BCR-ABL1* powstającego w wyniku połączenia protoonkogenu Abelsona (*ABL1*) znajdującego się na chromosomie 9 z genem *BCR* zlokalizowanym na chromosomie 22. Powstały w rezultacie tego połączenia gen fuzyjny koduje konstytutywnie aktywny enzym — kinazę tyrozynową *BCR-ABL1* [1]. W ponad 95% przypadków opisana wyżej translokacja jest zrównoważona i doprowadza do powstania skróconego chromosomu 22 pary, zwanego chromosomem *Philadelphia* (Ph) [2, 3].

Wiedza na temat patogenezy CML była podstawą do opracowania pierwszego z inhibitorów kinazy tyrozynowej (TKI, *tyrosine kinase inhibitors*) — imatynibu (IM, *imatinib*) — leku, który hamuje aktywność enzymatyczną białka *ABL1* oraz *BCR-ABL1* [4]. Wyniki badań klinicznych nad skutecznością IM spowodowały, że niedługo po ich opublikowaniu stał się on lekiem pierwszego wyboru w fazie przewlekłej (CP, *chronic phase*) CML i odsunął na dalszy plan terapię z wykorzystaniem allogenicznego przeszczepienia macierzystych komórek krwiotwórczych (allo-HSCT, *allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*).

Całkowity czas przeżycia (OS, *overall survival*) chorych otrzymujących IM w ramach badania IRIS (*International Randomized Study of Interferon and STI571*) po 8 latach obserwacji wynosi 87% [5]. Jednak wkrótce po rejestracji IM okazało się, że istnieje grupa chorych wykazujących oporność na ten inhibitor [6, 7], a po 6 latach pierwotną dawkę IM (400 mg/d.) przyjmuje jedynie około 60% chorych, co oznacza, że u około 40% pacjentów istnieje konieczność jej zwiększenia lub zastosowania innego leku, głównie TKI II generacji [5, 8, 9].

Zastosowanie tych leków w przypadku oporności na leczenie I linii prowadzi do uzyskania całko-

witej odpowiedzi cytogenetycznej (CCyR, *complete cytogenetic response*) u 44–50% chorych [10, 11]. Procedura allo-HSCT daje szansę trwałego wyleczenia u 75–77% pacjentów w CP, jednak jej wykonanie wiąże się z istotnym ryzykiem poważnych powikłań [12, 13]. Każdy ze sposobów terapii jest mniej skuteczny u pacjentów w bardziej zaawansowanych stadiach CML w porównaniu z CP. Fakt ten uzasadnia konieczność ścisłej kontroli przebiegu leczenia w celu odpowiednio wczesnego wykrycia nawrotu lub progresji choroby. U większości pacjentów z CML pod wpływem leczenia TKI sukcesywnie zmniejsza się liczba komórek białaczkowych. Konieczne jest zatem stosowanie w trakcie terapii badań diagnostycznych charakteryzujących się odpowiednią czułością, tak aby miarodajnie śledzić ten proces.

Badania morfologiczne krwi obwodowej i szpiku kostnego

Ocena morfologiczna krwi obwodowej i szpiku kostnego należy do standardu rutynowej diagnostyki CML. Obie metody charakteryzują się małą czułością, i o ile mają duże praktyczne znaczenie w procesie diagnostyki, o tyle stają się niewystarczające w monitorowaniu leczenia. W chwili rozpoznania w morfologii krwi obwodowej występuje neutrofilowa leukocytoza, zwykle przekraczająca 20 G/l (wartość średnia w chwili rozpoznania to ok. 100 G/l). W rozmazie obecne są komórki układu granulocytowego na wszystkich etapach dojrzewania, często z blastami włącznie. Ich odsetek zwiększa się w miarę wzrostu leukocytozy, jednak zwykle nie przekracza 10%. Bazofilia będąca bardzo charakterystycznym, choć nieczęstym objawem laboratoryjnym w CML może o kilka lat wyprzedzać pojawienie się leukocytozy, podobnie jak nadpłytkowość, która występuje u około 1/3 chorych w chwili rozpoznania. W momencie rozpoznania zwykle nie występuje niedokrwistość, która jest częściej obecna w bardziej zaawansowanych fazach choroby —

Tabela 1. Kryteria rozpoznania fazy akceleracji i kryzy blastycznej przewlekłej białaczki szpikowej (wg WHO, zmodyfikowane)**Table 1.** Diagnostic criteria for accelerated and blastic phase of chronic myeloid leukemia (acc. to WHO, modified)**Kryteria rozpoznania fazy akceleracji (konieczna obecność przynajmniej jednego objawu)**

- Odsetek blastów we krwi obwodowej lub szpiku 10–19%
- Bazofilia $\geq 20\%$
- Małopłytkowość $< 100\,000/\mu\text{l}$ (niezwiązana z leczeniem)
- Nadpłytkowość $> 1\,000\,000/\mu\text{l}$ (oporna na leczenie)
- Klonalna ewolucja cytogenetyczna (dodatkowe aberracje chromosomowe)
- Powiększenie śledziony odporne na leczenie
- Wzrost leukocytozy oporny na leczenie

Kryteria rozpoznania kryzy blastycznej (konieczna obecność przynajmniej jednego objawu)

- Odsetek blastów we krwi obwodowej lub szpiku $\geq 20\%$
- Pozaszpikowe nacieki białaczkowe

WHO (World Health Organization) — Światowa Organizacja Zdrowia

akceleracji (AP, *accelerated phase*) lub kryzy blastycznej (BP, *blastic phase*). Od czasu rozpoznania badania morfologii krwi obwodowej powinno się wykonywać co 15 dni, aż do uzyskania całkowitej odpowiedzi hematologicznej (CHR, *complete hematologic response*), a następnie przynajmniej co 3 miesiące oraz w przypadku zaistnienia innych wskazań klinicznych (tab. 1) [14].

Punkcja szpiku wykonana w momencie rozpoznania CML jest niezbędna, ponieważ dostarcza materiału do oceny cytologicznej i kariotypu. Ocena cytologiczna aspiratu dostarcza informacji między innymi o odsetku blastów i bazofilów, który — podobnie jak ich odsetek we krwi obwodowej — jest jednym z kryteriów definiujących fazę choroby. Szpik jest najczęściej bogatokomórkowy, a odsetek dojrzewających prawidłowo do stadium segmenta komórek linii granulocytarnej — zwiększony; wzrasta także odsetek komórek linii megakariocytowej i zwykle dochodzi do zmniejszenia odsetka komórek linii czerwonej krwi. W trepanobiopsji można dodatkowo stwierdzić cechy włóknienia retikulinoznego i neoangiogenezy.

Do momentu rozpoczęcia leczenia TKI faza choroby oceniona za pomocą badania morfologicznego krwi obwodowej i szpiku kostnego jest najważniejszym czynnikiem rokowniczym CML. Zastosowanie TKI w leczeniu AP i BP daje znacznie gorsze rezultaty niż w leczeniu CP. Dotyczy to zarówno

IM [15–17], jak i nilotynibu [18, 19] oraz dazatynibu [20–22]. W opracowaniu opartym na analizie przebiegu leczenia 138 pacjentów Kliniki Hematologii CMUJ w Krakowie zaobserwowano istotną statystycznie korelację między osiąganą CCyR oraz większą odpowiedzią molekularną (MMoLR, *major molecular response*) a między innymi fazą choroby oraz występowaniem dodatkowych zaburzeń cytogenetycznych w klonie komórek Ph(+) również w chwili rozpoznania. Wykazano, że ścisłe przestrzeganie przyjętych kryteriów AP i rozpoczęcie leczenia IM w dawce zwiększonej do 600 mg na dobę pozwala uzyskać wyniki porównywalne z rezultatami terapii chorych w późnej CP, w tym około 50-procentową CCyR i 30-procentową MMoLR [23].

Analiza wyniku badania morfologii krwi obwodowej wraz z wynikiem badania przedmiotowego pozwala także na obliczenie wskaźników rokowniczych Sokala [24] i Hasforda [25], które nie utraciły swojego znaczenia w erze leczenia IM [14]. Odsetki CCyR uzyskiwane w badaniu IRIS wynosiły 78%, 68% i 51%, a MMoLR — 66%, 45% i 38% w grupach chorych z odpowiednio niskim, pośrednim i wysokim wskaźnikiem Sokala [26]. Po 6 latach obserwacji w tym badaniu odnotowano wyraźne różnice w OS, przeżyciu wolnym od progresji (PFS, *progression free survival*) i przeżyciu wolnym od zdarzeń (EFS, *event free survival*) w zależności od kategorii ryzyka według Sokala. Wszystkie te różnice były istotne statystycznie [8]. Osiągnięcie CCyR w toku leczenia niwelowało jednak niekorzystny wpływ wysokiej wartości wskaźnika Sokala na PFS [27]. Wyniki badania IRIS potwierdzono w tym zakresie w dwóch innych, niezależnych badaniach klinicznych [28, 29].

Badania cytogenetyczne w diagnostyce CML

Badanie kariotypu wykonane w chwili rozpoznania umożliwia nie tylko ustalenie diagnozy CML, ale dostarcza także informacji na temat dodatkowych zaburzeń cytogenetycznych. Materiałem badawczym jest szpik kostny. Typową translokację t(9;22)(q34;q11) wykrywa się metodami konwencjonalnej cytogenetyki u około 85% chorych z CML. U dalszych 5% pacjentów chromosom Ph powstaje w przebiegu wymiany fragmentów trzech, a czasami większej liczby chromosomów, zawsze jednak z udziałem chromosomu 9 i 22 pary [30]. U pozostałych 10% chorych chromosom Ph nie jest wykrywany metodami konwencjonalnej cytogenetyki. Zastosowanie technik molekularnych, takich jak hybrydyzacja fluorescencyjna *in situ* (FISH, *fluore-*

scence in situ hybridization) do jąder komórkowych w interfazie (I-FISH) lub w metafazie albo reakcja łańcuchowa polimerazy poprzedzona odwrotną transkrypcją (RT-PCR, *reverse transcriptase polymerase chain reaction*) pozwala na wykrycie genu *BCR-ABL1* u ponad 50% z tych pacjentów [31]. Osoby, u których występują kliniczne cechy CML, a chromosom Ph i gen *BCR-ABL1* nie są wykrywane wspomnianymi technikami, stanowią około 5% chorych [32, 33]. Uważa się, że czułość stosowanych obecnie testów pozwala na wykluczenie obecności translokacji *BCR-ABL1* w tej grupie pacjentów, a mechanizm powstawania u nich tego typu schorzenia pozostaje, jak dotąd, niewyjaśniony [34–36].

Ocena kariotypu za pomocą badania cytogenetycznego wykonanego metodą konwencjonalną w chwili diagnozy, poza umożliwieniem ustalenia rozpoznania, dostarcza informacji na temat dodatkowych zaburzeń cytogenetycznych. Możliwość ich wykrycia nie stwarza badanie FISH, o ile nie wykona się go z użyciem specyficznych sond wykrywających te zaburzenia. Nie potwierdzono znaczenia rokowniczego, uważanej do niedawna za niekorzystny czynnik rokowniczy, delecji ramienia długiego chromosomu 9 (del q9) [37, 38] ani translokacji wariantowych chromosomu Ph [39, 40], wykrywanych u 4–8% chorych leczonych IM [41, 42]. Znaczenie rokownicze mają natomiast dodatkowe, klonalne zaburzenia cytogenetyczne wykrywane w komórkach Ph(+) w chwili rozpoznania u 5–10% chorych, wpływając niekorzystnie na PFS i OS [28].

Do najczęstszych dodatkowych zaburzeń chromosomowych w klonie komórek Ph(+), wyprzedzających pojawienie się objawów klinicznych zaostrzenia choroby, należą trisomia chromosomu 8, występowanie izochromosomu 17, dodatkowego chromosomu Ph oraz trisomia chromosomu 19 [43]. Trisomia 8 pary chromosomów dość często występuje u chorych z CML w BP. Należy jednak zaznaczyć, że niekoniecznie jest zaburzeniem stymulującym progresję białaczki, a jej występowanie w klonie komórek Ph(–) obserwowano także u pacjentów pozostających w CCyR. Izochromosom 17 występuje w klonie komórek Ph(+) u około 20% chorych z CML w BP, dodatkowy chromosom Ph — u ponad 30% chorych, a trisomia chromosomu 19 — u 12% pacjentów. Inne aberracje odgrywające rolę w progresji CML do BP, występujące u kilku procent chorych, to utrata chromosomu Y, trisomia chromosomu 21 i monosomia 7 [43].

Występowanie dodatkowych zaburzeń cytogenetycznych w komórkach Ph(–) w chwili postawienia diagnozy należy do rzadkości [44]. Częstość tych

zaburzeń zwiększa się w trakcie leczenia TKI (3,6–8,1%), jednak ich znaczenie rokownicze nie jest ustalone. Ryzyko transformacji do ostrej białaczki szpikowej (AML, *acute myeloid leukemia*) lub zespołu mielodysplastycznego (MDS, *myelodysplastic syndrome*) wynosi w tej grupie mniej niż 10% i dotyczy głównie chorych z monosomią 7 [28, 45].

Badanie cytogenetyczne w ocenie skuteczności leczenia za pomocą TKI

Zgodnie z rekomendacjami ekspertów Europejskiej Sieci Białaczkowej (ELN, *European Leukemia-Net*) badanie cytogenetyczne należy wykonywać po 3 i 6 miesiącach od rozpoczęcia leczenia IM, co 6 miesięcy do osiągnięcia CCyR, a następnie co 12 miesięcy, jeśli regularna kontrola przebiegu leczenia za pomocą ilościowego badania reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (RQ-PCR, *real-time quantitative polymerase chain reaction*) nie jest możliwa (tab. 2). Badanie cytogenetyczne powinno być także wykonane w każdym przypadku niepowodzenia leczenia (oporność pierwotna i wtórna), a także w przypadku pojawienia się niewyjaśnionej niedokrwistości, leukopenii lub małopłytkowości [25].

Śledzenie skuteczności leczenia CML za pomocą konwencjonalnej cytogenetyki ma bardzo istotne znaczenie. Osiągnięcie i utrzymanie odpowiedzi cytogenetycznej (CyR, *cytogenetic response*) jest wskaźnikiem o największej wartości, wpływającym na PFS i OS podczas leczenia TKI [26, 46]. Znajduje to wyraz między innymi w opublikowanych wynikach badań wykorzystanych w opracowaniu kryteriów ELN, dotyczących odpowiedzi optymalnej i suboptymalnej [28, 47]. Pacjenci, którzy w 6. i 12. miesiącu osiągają jedynie odpowiedź suboptymalną, mają istotnie gorsze rokowanie niż uzyskujący odpowiedź optymalną [47–49]. U chorych, którzy po 6 miesiącach leczenia w ramach badania IRIS nie uzyskali CyR, osiągnęli mniejszą (mCyR, *minor cytogenetic response*) lub częściową odpowiedź cytogenetyczną (PCyR, *partial cytogenetic response*), szansa na osiągnięcie CCyR po 2 latach leczenia wynosiła odpowiednio 15%, 50% i 80% [50]. W innym opracowaniu, w przypadku nieuzyskania PCyR po 6 miesiącach leczenia, odsetek CCyR wyniósł 25% [49]. Podobna ocena dokonana u chorych, którzy po 12 miesiącach nie uzyskali CyR lub osiągnęli mCyR, wskazuje, że szansę na osiągnięcie CCyR po 2 latach kontynuacji dotychczasowej dawki IM ma mniej niż 20% pacjentów oraz około 50% chorych, którzy po roku terapii uzyskali PCyR. Osiągnięcie po 12 lub 18 miesiącach CCyR było znaczą-

Tabela 2. Definicje odpowiedzi hematologicznej, cytogenetycznej i molekularnej (źródło: [14])**Table 2.** Definitions of hematologic, cytogenetic and molecular response (source: [14])

Typ odpowiedzi	Definicja
Całkowita hematologiczna (CHR)	Leukocytoza $< 10 \times 10^9/l$ Bazofilia $< 5\%$ Bez mielocytów, promielocytów i mieloblastów w rozmazie krwi obwodowej Liczba płytek krwi $< 450 \times 10^9/l$ Niebadalna śledziona
Cytogenetyczna:	
• całkowita (CCyR)	Bez metafaz Ph(+)
• częściowa (PCyR)	1–35% metafaz Ph(+)
• mniejsza (mCyR)	36–65% metafaz Ph(+)
• minimalna (minCyR)	66–95% metafaz Ph(+)
• brak (noCyR)	$> 95\%$ metafaz Ph(+)
Molekularna:	
• całkowita (CMoIR)	<i>BCR-ABL1</i> mRNA niewykrywalny w badaniach RQ-PCR lub RT-PCR w dwóch kolejnych próbkach krwi o odpowiedniej jakości (czułość $> 10^4$)
• większa (MMoIR)	Stosunek <i>BCR-ABL1/ABL1</i> lub innego genu referencyjnego $\leq 1\%$ w skali międzynarodowej [IS]

CHR (complete hematologic response) — całkowita odpowiedź hematologiczna; CCyR (complete cytogenetic response) — całkowita odpowiedź cytogenetyczna; PCyR (partial cytogenetic response) — częściowa odpowiedź cytogenetyczna; mCyR (minor cytogenetic response) — mniejsza odpowiedź cytogenetyczna; CMoIR (complete molecular response) — całkowita odpowiedź molekularna; MMoIR (major molecular response) — większa odpowiedź molekularna; RQ-PCR (real-time quantitative PCR) — ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym; RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) — reakcja łańcuchowa polimerazy poprzedzona odwrotną transkrypcją

nie korzystniejsze dla pacjentów niż uzyskanie tylko PCyR i przekładało się na istotnie lepsze wskaźniki 5-letnich PFS i OS (odpowiednio 99% v. 87% i 98% v. 76%) [9, 27, 51].

Według definicji CCyR, ocenianej metodą konwencjonalnej cytogenetyki, do wydania miarodajnej opinii konieczna jest analiza wybarwionych metodą prążkową komórek szpiku zatrzymanych w metafazie, których liczba wynosi co najmniej 20. Nie zawsze warunki te są spełnione, dlatego w takiej sytuacji coraz częściej stosuje się technikę I-FISH. W doniesieniu Testoni i wsp. [52] autorzy porównali wyniki konwencjonalnej cytogenetyki i I-FISH na podstawie prospektywnej analizy 664 próbek szpiku kostnego i odnieśli je do rezultatów jednocześnie prowadzonych badań RQ-PCR krwi obwodowej. Uzyskane wyniki wykazały dużą zgodność między ocenianymi metodami w grupie chorych, którzy

osiągnęli CCyR, i sugerują, że I-FISH może być bardziej czułą metodą w wykrywaniu choroby resztkowej. Autorzy analizy podkreślają, że wyniki badania I-FISH uzyskiwane z krwi obwodowej są porównywalne z rezultatami badania szpiku kostnego. Potwierdzono to w wielu innych badaniach [53, 54]. We wnioskach sugeruje się, że I-FISH nie jest odpowiednią metodą oceny różnych stopni CyR (od minimalnej do częściowej), jednak może zastąpić badanie metodą konwencjonalnej cytogenetyki, jeżeli odpowiedź ta jest całkowita [52]. Jest to zgodne z rekomendacją ekspertów ELN, zgodnie z którą badanie I-FISH można wykorzystać do potwierdzenia osiągnięcia CCyR w sytuacji, kiedy uzyskanie miarodajnego wyniku metodą konwencjonalnej cytogenetyki nie jest możliwe [25].

Badania metodą PCR w diagnostyce CML

Chimerowy gen *BCR-ABL1* powstaje w wyniku fuzji fragmentów genu *BCR* i genu *ABL1*. Pęknięcie w obrębie genu *ABL1* może wystąpić w dowolnym miejscu fragmentu zlokalizowanego na jego końcu 5' [55]. W obrębie genu *BCR* znaleziono kilka możliwych miejsc pęknięcia. U znacznej większości chorych z CML i u około 1/3 pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL, *acute lymphoblastic leukemia*) do złamania genu *BCR* dochodzi w obrębie tak zwanego większego miejsca złamania (m-bcr, *major breakpoint cluster region*), a u około 2/3 chorych z ALL oraz w rzadkich przypadkach CML i AML (ok. 2%) pęknięcie w genie *BCR* znajduje się w obrębie tak zwanego mniejszego regionu złamania (m-bcr, *minor breakpoint cluster region*) [56].

Pęknięcie genu *BCR* umiejscowione poza najczęściej występującymi lokalizacjami, jak również nietypowe miejsca pęknięcia genu *ABL1*, należą do rzadkości. Skutkiem tego typu nietypowych translokacji jest powstanie transkryptów *BCR-ABL1* z połączeniami typu b2a3 lub b3a3, lub innych [35]. Istnieje ryzyko, że te nietypowe produkty translokacji *BCR-ABL1* pozostaną niewykryte, jeżeli w teście RT-PCR zostaną użyte niewłaściwe startery, które będą się przyłączać w miejscach nieobjmujących całego regionu translokacji. W tej sytuacji może dojść do uzyskania niezmiernie rzadko spotykanego układu wyników, w którym metodą klasycznej cytogenetyki zostanie wykryty chromosom Ph, jednocześnie bez obecności translokacji *BCR-ABL1* wykrywalnej w teście RT-PCR. Badanie RT-PCR wykonywane w odmianie multipleks, z wykorzystaniem jednocześnie wielu par starterów, pozwala zapobiec tego typu rozbieżnościom i powinno być rutynowo wykorzystywane w diagno-

Tabela 3. Rekomendacje Europejskiej Sieci Białaczkowej dotyczące monitorowania skuteczności leczenia imatinibem (źródło: [14])**Table 3.** European LeukemiaNet recommendation of monitoring the response to imatinib (source: [14])

Badanie	Opis, terminy wykonania
Morfologia krwi obwodowej	Diagnoza Co 15 dni do uzyskania i potwierdzenia CHR, następnie przynajmniej raz na 3 miesiące lub wg potrzeby
Cytogenetyka konwencjonalna (punkcja szpiku)	Diagnoza Po 3 i 6 miesiącach, następnie co 6 miesięcy do uzyskania i potwierdzenia CCyR*, następnie co 12 miesięcy, jeśli regularna kontrola RQ-PCR nie jest możliwa Niepowodzenie (oporność pierwotna i wtórna) Niewyjaśniona niedokrwistość, leukopenia lub małopłytkowość
RQ-PCR	Co 3 miesiące do uzyskania i potwierdzenia MMolR, następnie przynajmniej raz na 6 miesięcy
Analiza mutacji genu <i>ABL1</i>	Odpowiedź suboptymalna lub niepowodzenie Zawsze przed zmianą na inny TKI lub inne leczenie

*Metoda I-FISH nie jest zalecana do oceny odpowiedzi częściowej (jedynie jako metoda potwierdzająca uzyskanie CCyR, jeśli analiza cytogenetyczna nie jest możliwa/niemiarodajna), konieczna ocena ≥ 200 jąder komórkowych. Częstszego monitorowania molekularnego mogą wymagać pacjenci z odpowiedzią suboptymalną lub warunkami ostrzeżenia i leczenia TKI II generacji (ze względu na szybciej uzyskiwane odpowiedzi); CHR (*complete hematologic response*) — całkowita odpowiedź hematologiczna; CCyR (*complete cytogenetic response*) — całkowita odpowiedź cytogenetyczna; RQ-PCR (*real-time quantitative PCR*) — ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym; MMolR (*major molecular response*) — większa odpowiedź molekularna; stosunek *BCR-ABL1/ABL1* lub do innego genu referencyjnego $\leq 0,1\%$ w międzynarodowej skali [IS]; TKI (*tyrosine kinase inhibitor*) — inhibitory kinazy tyrozynowej

stycie molekularnej CML. Do identyfikacji typu transkryptu *BCR-ABL1* wykorzystuje się badanie krwi obwodowej lub szpiku metodą RT-PCR, natomiast badanie krwi metodą RQ-PCR pozwala określić jego ilość z czułością sięgającą 10^{-5} .

Badania metodą PCR w ocenie skuteczności leczenia za pomocą TKI

W celu śledzenia choroby resztkowej i oceny odpowiedzi na leczenie wykonuje się badanie RQ-PCR (tab. 3). Powtarzanie badania RT-PCR, służącego jedynie stwierdzeniu obecności transkryptu po rozpoznaniu choroby oraz w trakcie leczenia, nie ma żadnego uzasadnienia, z wyjątkiem grupy chorych, u których udało się uzyskać całkowitą odpowiedź molekularną (CMolR, *complete molecular response*). Określanie ilości transkryptu *BCR-ABL1* nabiera szczególnego znaczenia u chorych, którzy osiągnęli CCyR. Śledzenie dynamiki zmian jego ilości dostarcza wówczas istotnych informacji na temat skuteczności terapii TKI, może ostrzegać przed pojawieniem się oporności i progresji choroby. Ze względu na złożoność i czułość tej metody oraz konieczność ścisłego przestrzegania standardów laboratoryjnych badania te powinny być wykonywane w doświadczonych laboratoriach, poddawanych regularnej kontroli w ramach procesu standaryzacji.

W najnowszej analizie wyników badania IRIS wykazano, że uzyskanie MMolR w czasie do 18 mie-

sięcy od wdrożenia leczenia IM wiąże się z lepszym 6-letnim EFS (98% v. 88%) [57]. Podkreślenia wymaga fakt, że w powyższej grupie chorych nie odnotowano żadnego przypadku progresji do AP ani BP, natomiast w grupie pacjentów, którzy osiągnęli CCyR, ale nie uzyskali redukcji transkryptu *BCR-ABL1* ponad 3 log., odsetek progresji do bardziej zaawansowanych faz CML wyniósł 3% [57]. W innych badaniach również odnotowano nieznacznie dłuższe PFS i OS u chorych, którzy uzyskali MMolR po 12 i 18 miesiącach leczenia, ale należy zaznaczyć, że w czterech doniesieniach różnice te osiągnęły znaczącość statystyczną [58–61], a w dwóch nie [28, 51].

Metodę RQ-PCR można zastosować także w celu prognozowania odpowiedzi na TKI. Wyniki badań dynamiki zmniejszania ilości transkryptu *BCR-ABL1* w pierwszych miesiącach od wdrożenia leczenia wskazują na możliwość oceny szans uzyskania MMolR. U pacjentów, u których po 3 miesiącach terapii IM doszło do mniejszego niż 1 log spadku ilości transkryptu, prawdopodobieństwo osiągnięcia MMolR wynosiło 13%. U chorych, u których spadek przekraczał 1 log, szansa osiągnięcia MMolR po 2,5 roku leczenia wynosiła ponad 70% [62]. Podobne wyniki uzyskano w innym badaniu, w którym w zależności od uzyskanej redukcji ilości transkryptu po 3 miesiącach terapii IM (o 1 log > 2 log i > 3 log), szansę na osiągnięcie MMolR po 2 latach oceniono odpowiednio na 55%, 84% i 95% [63].

Według rekomendacji ekspertów ELN badanie RQ-PCR należy wykonywać co 3 miesiące do uzyskania MMolR, a następnie nie rzadziej niż co 6 miesięcy. Trzeba jednak podkreślić, że utrata MMolR i/lub ponad 2,5-krotny wzrost ilości transkryptu BCR-ABL1 powinien stać się powodem zwiększenia częstości wykonywania tego testu [59]. W celu upewnienia się, że obserwowany wzrost jest wyrazem rzeczywistej tendencji, a nie artefaktem związanym z technicznymi aspektami wykonanego badania RQ-PCR, test należy powtórzyć (najlepiej w ciągu miesiąca). Jeżeli tendencja wzrostowa się utrzymuje, należy wykonać badanie mutacji ABL1. Wzrost ilości transkryptu nieprzekraczający poziomu 0,1% (kryterium MMolR) nie wydaje się istotny.

Wykrywanie mutacji punktowych kinazy ABL1

Występowanie mutacji punktowych w sekwencji kodującej domenę kinazową ABL1 jest jednym z molekularnych mechanizmów oporności na TKI. Wynikiem pojawienia się takiej mutacji może być zmniejszenie lub całkowita utrata wrażliwości kinazy BCR-ABL1 na stosowany inhibitor [64]. Oporność zależna od występowania mutacji ABL1 rzadko się zdarza we wczesnym etapie CML i dotyczy, ze wzrastającą częstością, osób w bardziej zaawansowanych fazach choroby [65], chociaż zdarzają się także przypadki jej występowania u pacjentów, u których wcześniej nie stosowano TKI [64].

Do tej pory opisano kilkadziesiąt mutacji ABL1. Niektóre występują częściej. Około 66% przypadków stanowią takie, w których mutacja dotyczy co najmniej jednego z 7 aminokwasów (Y253, T315, M351, H396, G250, F359, E255). Niektóre miejsca występowania mutacji są bardziej charakterystyczne dla CP (L248, M244, F317, S417, H396), inne wykrywane są częściej w bardziej zaawansowanych stadiach choroby (Y253, E255, Q252, T315, F486 i F459) [66].

Standardem diagnostycznym dla wykrywania mutacji punktowych domeny kinazowej *ABL1* jest metoda bezpośredniego sekwencjonowania. Jej czułość pozwala na wykrycie mutacji punktowej, jeśli ta dotyczy około 10–20% populacji komórek Ph(+), którą uważa się za istotną dla rozwoju oporności. Inne dostępne metody charakteryzują się znacznie większą czułością, w tym allelospecyficzna PCR i test oparty na badaniu polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych, jednak uzyskiwane wyniki nie zawsze mają znaczenie kliniczne [66]. W badaniu przesiewowym niekiedy stosuje się wysokosprawną denaturacyjną chromatografię cieczową (D-HPLC,

denaturing high-performance liquid chromatography), której czułość wynosi 1–5%. Konieczność systematycznego wykonywania badania RQ-PCR wynika zatem także z potrzeby zidentyfikowania tych pacjentów, u których potencjalne ryzyko wystąpienia mutacji jest wyższe. Dlatego racjonalnymi wskazaniami do badania mutacji są: wystąpienie u chorego zaawansowanej fazy CML, oporność na leczenie TKI lub odpowiedź suboptymalna w przebiegu CP i konieczność zmiany leczenia na inny TKI [14]. Przesiewowe badanie mutacji ABL1 u chorych w CP daje pozytywny wynik u mniej niż 5% pacjentów. Mimo że ryzyko nawrotu w trakcie dalszego leczenia w takim przypadku ocenia się na około 4-krotnie większe, to — ze względu na niewielką liczbę tych chorych — rutynowe wykonywanie badania wydaje się zbyt kosztowne w stosunku do potencjalnych korzyści. W związku z tym przesiewowe badanie mutacji nie jest zalecane [67].

Zależny od rodzaju mutacji profil wrażliwości na TKI, określony w badaniach *in vitro*, może posłużyć jako dodatkowa informacja pomagająca zmodyfikować dalsze leczenie [68]. Najbardziej jednoznacznym przykładem jest mutacja T315I, która wywołuje całkowitą oporność na dotychczas stosowane TKI. Pozostałe mutacje nie wywołują całkowitej oporności, ale mogą wpływać na głębokość uzyskanej remisji. Ocenia się, że CCyR rzadko udaje się uzyskać u chorych z mutacją E255K/V leczonych nilotynibem, natomiast u chorych leczonych dazatynibem CCyR rzadko jest osiągnięta w przypadku wystąpienia mutacji F317L/I [69].

Mimo braku ostatecznych dowodów, dokumentujących poprawę odległych wyników leczenia wskutek zmiany terapii pod wpływem wzrastającej ilości transkryptu BCR-ABL1 jeszcze przed utratą CCyR, z praktycznego punktu widzenia można przyjąć, że u chorych ze stale się zwiększającym poziomem transkryptu BCR-ABL1 i współistniejącą mutacją, powodującą całkowitą lub względną niewrażliwość na leczenie IM, leczenie należy zmodyfikować jeszcze zanim dojdzie do utraty remisji cytogenetycznej [67].

Badanie stężenia IM w surowicy krwi

Jedną z istotnych przeszkód w osiągnięciu optymalnych efektów leczenia TKI jest nieprzestrzeganie zaleceń lekarskich dotyczących regularnego przyjmowania leku. Średni wskaźnik przestrzegania właściwego dawkowania IM wynosi około 70% [70]. Analiza pomiarów stężenia IM w surowicy krwi, przeprowadzona w ramach badania IRIS, ujawniła istotną korelację między wyższym odsetkiem

uzyskiwanych CCyR i MMoLR a stężeniem IM przekraczającym 1000 ng/ml [71].

Oznaczanie stężenia IM w surowicy krwi ma wprawdzie ograniczone znaczenie w przewidywaniu uzyskiwanej odpowiedzi, jednak — według doświadczenia autorów — ma istotne znaczenie w obiektywnej ocenie przestrzegania zaleceń, a w kontekście wyników regularnie wykonywanych badań molekularnych pozwala na indywidualne ustalenie optymalnego stężenia leku u poszczególnych pacjentów. Dlatego metoda ta powinna być wykorzystywana wraz z innymi u chorych z mniejszą niż oczekiwana skutecznością leczenia w celu wyjaśnienia przyczyn tego zjawiska.

Zaburzenia transportu IM do wnętrza komórek

Badanie ekspresji genu lub aktywności białka hOCT1 (*human organic cation transporter-1*), które jest zależnym od adenosynotrifosforanu transporterem kationów organicznych, wydaje się mieć istotne znaczenie dla przebiegu leczenia IM, choć do tej pory nie znalazło się w panelu badań wykonywanych rutynowo. Lek jest dostarczany do wnętrza komórek przez hOCT1 w mechanizmie aktywnego transportu. Zaobserwowano, że szansa osiągnięcia CCyR i MMoLR jest istotnie większa u chorych z wysokim poziomem ekspresji hOCT1 [72]. Różnica ta jest szczególnie wyraźna w grupie chorych otrzymujących IM 400 mg na dobę i nie występuje w grupie otrzymującej większe dawki (600–800 mg/d.). Wskazuje to na możliwość wykorzystania pomiaru ekspresji lub aktywności tego białka jeszcze przed podjęciem leczenia w celu identyfikacji chorych, u których optymalnym postępowaniem mogłoby się okazać zastosowanie większych dawek IM [72]. Należy zaznaczyć, że TKI II generacji (nilotinib, dasatinib) nie są transportowane z udziałem hOCT1 [73, 74].

Podsumowanie

Metody wykorzystywane w diagnostyce i ocenie skuteczności leczenia CML są bardzo pomocne w procesie podejmowania decyzji o wyborze terapii. Zarówno metody przyjęte jako standard postępowania, do których należą ocena kariotypu, badanie PCR, ocena obecności mutacji ABL1, oraz metody, których skuteczność podlega jeszcze weryfikacji klinicznej, pozwalają na dobór optymalnego sposobu leczenia. Jest to tym bardziej istotne, że dzięki ogromnemu postępowi terapii, jaki się dokonał na drodze opracowania TKI, istnieje dziś możliwość

uzyskania wysokiego odsetka wieloletnich przeżyć, także w grupie młodszych chorych. Należy pamiętać, że staranne monitorowanie i indywidualizacja postępowania pozwalają na identyfikację także tych chorych, u których najlepsze rezultaty można uzyskać poprzez zastosowanie allo-HSCT. Racjonalne wykorzystanie wyników powyższych badań może istotnie poprawić skuteczność leczenia CML.

Piśmiennictwo

1. Shtivelman E., Lifshitz B., Gale R.P., Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 1985; 315: 550–554.
2. Nowell P.C., Hungerford D.A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132: 1497–1500.
3. Rowley J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243: 290–293.
4. Druker B.J., Lydon N.B. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Invest.* 2000; 105: 3–7.
5. Deininger M., O'Brien S.G., Guilhot F. i wsp. International randomized study of interferon and STI571 (IRIS) 8-year follow-up: sustained survival and low risk for progression or events in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with IM. *Blood* 2009; 114: (abstrakt 1126).
6. le Coutre P., Tassi E., Varella-Garcia M. i wsp. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood* 2000; 95: 1758–1766.
7. Mahon F.X., Deininger M.W., Schultheis B. i wsp. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanism of resistance. *Blood* 2000; 96: 1070–1079.
8. Hochhaus A., O'Brien S.G., Guilhot F. i wsp. Six-year follow-up of patients receiving IM for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2009; 23: 1054–1061.
9. De Lavallade H., Apperley J.F., Khorashad J.S. i wsp. IM for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: incidence of sustained responses in an intention to treat analysis. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 3358–3363.
10. Shah N.P., Kim D.W., Kantarjian H. i wsp. Potent, transient inhibition of BCR-ABL with dasatinib 100 mg daily achieved rapid and durable cytogenetic responses and high transformation-free survival rates in chronic phase chronic myeloid leukemia patients with resistance, suboptimal response or intolerance to IM. *Hematologica* 2010; 95: 232–240.
11. Kantarjian H., Giles F.G., Bhalla K.N.P. i wsp. Nilotinib in chronic myeloid leukemia patients in chronic phase (CML-CP) with IM resistance or intolerance: 24-month follow-up results of a phase 2 study. *Haematologica* 2009; 94: (abstrakt 627).
12. Radich J.P., Gooley T., Bensinger W. i wsp. HLA-matched related hematopoietic cell transplantation for chronic-phase CML using a targeted busulfan and cyclophosphamide preparative regimen. *Blood* 2003; 102: 31–35.
13. Pffirmann M., Saussele S., Leitner A. i wsp. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) with a related donor in chronic myeloid leukemia (CML): an explanation for fast improvement of survival in two consecutive German CML studies. *Blood* 2009; 114: (abstrakt 3281).

14. Baccarani M., Cortes J., Pane F. i wsp. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 6041–6051.
15. Kantarjian H., Talpaz M., O'Brien S., Giles F. Survival benefit with IM mesylate therapy in patients with accelerated-phase chronic myelogenous leukemia-comparison with historic experience. *Cancer* 2005; 103: 2099–2108.
16. Kantarjian H.M., Cortes J., O'Brien S. i wsp. IM mesylate (STI571) therapy for Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in blast phase. *Blood* 2002; 99: 3547–3553.
17. Sureda A., Carrasco M., de Miguel M.J. i wsp. IM mesylate as treatment for blastic transformation of Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia. *Haematologica* 2003; 88: 1213–1220.
18. Kantarjian H., Giles F., Wunderle L. Nilotinib in IM-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354: 2542–2551.
19. Giles J., Larson R.A., Kantarjian H.M. i wsp. Nilotinib in chronic myelogenous leukaemia in blast crises (CML-BC) patients with IM-resistance or -intolerance: updated phase 2 results. *Haematologica* 2008; 93: (abstrakt 0117).
20. Guilhot F., Apperley J., Kim D.W. Dasatinib induces significant hematologic and cytogenetic responses in patients with IM-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in accelerated phase. *Blood* 2007; 109: 4143–4150.
21. Gambacorti C., Cortes J., Kim D.W. i wsp. Efficacy and safety of dasatinib in patients with chronic myeloid leukemia in blast phase whose disease is resistant or intolerant to IM: 2-year follow-up data from the START Program. *Blood* 2007; 110: 472.
22. Cortes J., Kim D.W., Raffoux E. i wsp. Efficacy and safety of dasatinib in IM-resistant or -intolerant patients with chronic myeloid leukemia in blast phase. *Leukemia* 2008; 22: 2176–2183.
23. Foryciarz K., Sacha T., Florek I., Czekalska S., Zawada M., Skotnicki A.B. Prognostic factors in treatment of chronic myeloid leukemia with tyrosine kinase inhibitors — single center experience. *Blood* 2009; 114: (abstrakt 2210).
24. Sokal J.E., Cox E.B., Baccarani M. i wsp. Prognostic discrimination in “good-risk” chronic granulocytic leukemia. *Blood* 1984; 63: 789–799.
25. Hasford J., Pflrman M., Hehlmann R. i wsp. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998; 90: 850–858.
26. Hughes T.P., Kaeda J., Brandford S. i wsp. Frequency of major molecular response to IM or interferon alpha plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349: 1423–1432.
27. Druker B.J., Guilhot F., O'Brien S.O. i wsp. Five-year follow-up of patients receiving IM for chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 2408–2417.
28. Marin D., Milojkovic D., Olavarria E. i wsp. European Leukemia-Net criteria for failure or suboptimal response reliably identify patients with CML in early chronic phase treated with IM whose eventual outcome is poor. *Blood* 2008; 112: 4437–4444.
29. Baccarani M., Rosti G., Castagnetti F. i wsp. A comparison of IM 400 mg and 800 mg daily in the first-line treatment of patients with high risk, Philadelphia-positive, chronic myeloid leukaemia: an European LeukemiaNet study. *Blood* 2009; 113: 4497–4504.
30. Kessel G.A.H.M., van Agthoven A.J., de Groot P.G., Hagemeijer A. Characterization of a complex Philadelphia translocation (1p-;9q+;22q-) by gene mapping. *Human Genet.* 1981; 58: 162–165.
31. Groffen J., Stephenson J.R., Heisterkamp N., de Klein A., Bartram C.R., Grosveld G. Philadelphia chromosomal break-points are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 1984; 36: 93–99.
32. Shepherd P.C.A., Ganesan T.S., Galton D.A.G. Haematological classification of the chronic myeloid leukemias. *Bailliere's Clin. Haematol.* 1987; 1: 887–906.
33. Wiedemann L.M., Karhi K.K., Shivji M.K. i wsp. The correlation of breakpoint cluster region rearrangement and P210 ph/abl expression with morphological analysis of Ph-negative chronic myeloid leukemia and other myeloproliferative diseases. *Blood* 1998; 71: 349–355.
34. Cogswell P.C., Morgan R., Dunn M. i wsp. Mutations of the Ras protooncogenes in chronic myelogenous leukemia: a high frequency of Ras mutations in bcr/abl rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1989; 74: 2629–2633.
35. Melo J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 751–756.
36. Sella L., Emilia G., Luppi M. i wsp. Chronic myelogenous leukemia with typical clinical and morphological features can be Philadelphia negative and 'bcr negative'. *Hematol. Pathol.* 1990; 4: 67–77.
37. Kim D.H.D., Popradi G., Sriharsha L. i wsp. No significance of derivative chromosome 9 deletion on the clearance kinetics of BCR-ABL fusion transcripts, cytogenetic or molecular response, loss of response, or treatment failure to IM mesylate therapy for chronic myeloid leukemia. *Cancer* 2008; 113: 772–781.
38. Castagnetti F., Testoni N., Luatti S. i wsp. Deletions of the derivative chromosome 9 do not influence the response and the outcome of chronic myeloid leukemia in early chronic phase treated with IM mesylate: GIMEMA CML Working Party analysis. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 2748–2754.
39. Chase A., Huntly B.J.P., Cross N.C.P. Cytogenetics of chronic myeloid leukemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2001; 14: 553–571.
40. Albano F., Anelli L., Zagaria A. i wsp. “Home-brew” FISH assay shows higher efficiency than BCR-ABL dual-color, dual fusion probe in detecting microdeletion and complex rearrangements associated with t(9;22) in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2007; 174: 121–126.
41. Richebourg S., Eclache V., Perot C. i wsp. Mechanisms of genesis of variant translocations in chronic myeloid leukemia are not correlated with ABL1 or BCR deletion status or response to IM therapy. *Cancer Gen. Cytogen.* 2008; 182: 95–102.
42. Batty N., Kantarjian H., Borthakur G. i wsp. Patients with chronic myeloid leukemia with variant Philadelphia chromosome (Ph) translocations have a similar outcome as those with classic Ph when treated with IM or 2nd generation TKI. *Blood* 2008; 112: (abstrakt 3228).
43. Radich J.P. The biology of CML blast crisis. *Hematology* 2007; 1: 384–391.
44. Zaccaria A., Valenti A.M., Dotti E. i wsp. Persistence of chromosomal abnormalities additional to the Philadelphia chromosome after Philadelphia chromosome disappearance during IM therapy for chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2007; 92: 564–565.
45. Jabbour E., Kantarjian H.M., Abruzzo L.V. i wsp. Chromosomal abnormalities in Philadelphia chromosome negative metaphases appearing during IM mesylate therapy in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Blood* 2007; 110: 2991–2995.
46. Baccarani M., Pane F., Saglio G. Monitoring treatment of chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2008; 93: 161–166.
47. Franceschino A., Tornaghi L., Piazza R. i wsp. IM failed to eradicate chronic myeloid leukemia in a patient with minimal residual disease. *Haematologica* 2006; 91 (supl.): ECR14.

48. Castagnetti F., Gugliotta G., Palandri F. i wsp. Chronic myeloid leukemia (CML) patients with "suboptimal" response to IM (IM) according to European LeukemiaNet criteria have a poorer outcome with respect to "optimal" responders: a GIMEMA CML WORKING PARTY analysis. *Blood* 2009; 112: (abstrakt 2196).
49. Alvarado Y., Kantarjian H., Faderl S. i wsp. Significance of sub-optimal response to IM, as defined by the European LeukemiaNet, in long-term outcome for patients (Pts) with chronic phase (CP) chronic myeloid leukemia (CML). *Blood* 2007; 110: (abstrakt 1932).
50. O'Brien S.G., Guilhot F., Larson R.A. i wsp. IM compared with interferon and low dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 994–1004.
51. Kantarjian H., O'Brien S., Shan J. i wsp. Cytogenetic and molecular responses and outcome in chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 2008; 112: 837–845.
52. Testoni N., Marzocchi G., Luatti S. i wsp. Chronic myeloid leukemia: a prospective comparison of interphase fluorescence in situ hybridization and chromosome banding analysis for the definition of complete cytogenetic response: a study of the GIMEMA CML WP. *Blood* 2009; 114: 4939–4943.
53. Reinhold U., Henning E., Leiblein S. i wsp. FISH for BCR-ABL on interphase of peripheral blood neutrophils but not of unselected white bone marrow cytogenetics in CML patients treated with IM. *Leukemia* 2003; 17: 1925–1929.
54. Raanani P., Ben-Bassat I., Gan S. i wsp. Assessment of the response to IM in chronic myeloid leukemia patients: comparison between the FISH, multiplex and RT-PCR methods. *Eur. J. Haematol.* 2004; 73: 2243–2550.
55. Melo J.V., Myint H., Galton D.A.G. i wsp. P190 BCR-ABL chronic myeloid leukemia: the missing link with chronic myelomonocytic leukemia? *Leukemia* 1994; 8: 208–211.
56. Chissoe S.L., Bodenteich A., Wang Y.F. i wsp. Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics* 1995; 27: 67–82.
57. Hughes T., Hochhaus A., Branford S. i wsp. Reduction of BCR-ABL transcript levels at 6, 12, and 18 months correlates with long-term outcomes on IM (IM) at 72 mo: an analysis from the international randomized study of interferon versus STI571 (IRIS) in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia (CML-CP). *Blood* 2008; 112: (abstrakt 334).
58. Press R.D., Galderisi C., Yang R. i wsp. A half-log increase in BCR-ABL RNA predicts a higher risk of relapse in patients with chronic myeloid leukemia with an IM induced complete cytogenetic response. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 6136–6143.
59. Press R.D., Love Z., Tronnes A.A. i wsp. BCR-ABL mRNA levels at and after the time of a complete cytogenetic response (CCR) predict the duration of CCR in IM mesylate-treated patients with CML. *Blood* 2006; 107: 4250–4256.
60. Muller M.C., Hanfstein B., Erben P. i wsp. Molecular response to first line IM therapy is predictive for long-term event-free survival in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukaemia: an interim analysis of the randomized German CML study IV. *Blood* 2008; 112: (abstrakt 333).
61. Branford S., Lawrence R., Grigg A. i wsp. Long-term follow-up of patients with CML in chronic phase treated with first-line IM suggests that earlier achievement of a major molecular response leads to greater stability of response. *Blood* 2008; 112: (abstrakt 2113).
62. Branford S., Rudzki Z., Harper A. i wsp. IM produces significantly superior molecular responses compared to interferon alfa plus cytarabine in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Leukemia* 2003; 17: 2401–2409.
63. Cortes J., Talpaz M., O'Brien S. i wsp. Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with IM mesylate. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 3425–3432.
64. Shah N.P., Nicol J.M., Nagar B. i wsp. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor IM (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2002; 2: 117–125.
65. Soverini S., Martinelli G., Rosti G. i wsp. ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with upfront cytogenetic resistance to IM are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEMA Working Party on chronic myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 4100–4109.
66. Apperley J. Part I: mechanisms of resistance to IM in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* 2007; 8: 1018–1029.
67. Radich J. How I monitor residual disease in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009; 114: 3376–3381.
68. Jabbour E., Jones D., Kantarjian H.M. i wsp. Long-term outcome of patients with chronic myeloid leukemia treated with second-generation tyrosine kinase inhibitors after IM failure is predicted by the in vitro sensitivity of BCR-ABL kinase domain mutations. *Blood* 2009; 114: 2037–2043.
69. Deininger M., Mauro M., Matloub Y. i wsp. Prevalence of T315I, dasatinib-insensitive BCR-ABL mutations, and nilotinib-specific resistant mutations at the time of IM resistance in chronic myeloid leukemia (CP-CML). *Blood* 2008; 112: (abstrakt 3236).
70. Halpern R., Barghout V., Williams D. Relationship between compliance with IM mesylate and medical costs for patients with CML and GIST. *ASCO Annual Meeting Proceedings. Part I.* 2007; 25: 6618.
71. Larson R.A., Driker B.J., Guilhot F. i wsp. IM pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood* 2008; 111: 4022–4028.
72. White D.L., Saunders V.A., Dang P. i wsp. Most CML patients who have a suboptimal response to IM have low OCT-1 activity: higher doses of IM may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood* 2007; 110: 4064–4072.
73. Davies A., Giannoudis A., Lucas C.M. i wsp. Unlike IM, nilotinib transport into chronic myeloid leukaemia cells is not dependent on hOCT1 expression. *Br. J. Haematol.* 2008; 141 (supl. 1): 41–42.
74. Giannoudis A., Davies A., Lucas C.M. i wsp. Effective dasatinib uptake may occur without human organic cation transporter (hOCT1): implications for the treatment of IM-resistant chronic myeloid leukemia. *Blood* 2008; 112: 334–3354.