Εργαστηριακή παρακολούθηση ασθενών με ΧΜΛ και κλινική αξιολόγηση

Τασούλα Τουλουμενίδου, Αποστολία Παπαλεξανδρή, Κώστας Σταματόπουλος

ΠΕΡΊΛΗΨΗ: Οι γενετικές βλάβες που συμβαίνουν στα πλαίσια της καρκινογένεσης είναι ειδικοί δείκτες των καρκινικών κυττάρων, βοηθούν στη διάκρισή τους από τα φυσιολογικά κύτταρα και χρησιμοποιούνται ευρέως τόσο για την ταξινόμηση των νεοπλασιών, ιδίως του αιμοποιητικού ιστού, όσο και για την επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι ευαίσθητη και ειδική μέθοδος για την αναζήτηση χιμαιρικών μεταγράφων που προκύπτουν από χρωμοσωμικές μεταθέσεις σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες, μεταξύ άλλων και χρόνια μυελογενή λευχαιμία (ΧΜΛ). Σήμερα, η μοριακή παρακολούθηση της ΧΜΛ ουσιαστικά ταυτίζεται με την ποσοτική μέτρηση των χιμαιρικών μεταγράφων *BCR-ABL* με τεχνική real-time PCR (RQ-PCR). Με το συγκεκριμένο ζήτημα έχουν ασχοληθεί συστηματικά κι εντατικά ερευνητικές ομάδες από την Ευρώπη, τις ΗΠΑ και την Αυστραλία, καταλήγοντας στη διατύπωση κατευθυντήριων οδηγιών ώστε να διασφαλίζεται η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων του μοριακού ελέγχου. Οι συγκεκριμένες οδηγίες καλύπτουν κάθε παράμετρο, από τη συλλογή του δείγματος έως την έκφραση του αποτελέσματος, και θέτουν τους ορισμούς για την αξιολόγηση της ανταπόκρισης (μείζων μοριακή ανταπόκριση, πλήρης μοριακή ανταπόκριση). Επίσης, προτείνουν το ενδεδειγμένο χρονοδιάγραμμα παρακολούθησης και υποδεικνύουν τις περιστάσεις κατά τις οποίες πρέπει να διενεργείται έλεγχος για ανίχνευση μεταλλάξεων στην περιοχή κινάσης της τυροσίνης της χιμαιρικής πρωτεΐνης BCR-ABL, όπως επίσης και τη μεθοδολογία ανίχνευσης.

Haema 2012; 3(1): 57-64 Copyright ΕΑΕ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η χρόνια μυελογενής λευχαιμία (ΧΜΛ) είναι η πρώτη ανθρώπινη κακοήθεια η οποία συσχετίσθηκε με μια συγκεκριμένη χρωμοσωμική ανωμαλία. Συγκεκριμένα, το 1960 στη Φιλαδέλφεια των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής οι Peter Nowell και David Hungerford ανέφεραν την παρουσία ενός βραχύτερου χρωμοσώματος 22 μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο λευχαιμικών κυττάρων μυελού των οστών ασθενών με ΧΜΛ. Γι' αυτό το λόγο, η συγκεκριμένη χρωμοσωμική ανωμαλία ονομάστηκε χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας (Ph).

Το 1973, η Janet Rowley ανακάλυψε ότι η δημιουργία του χρωμοσώματος Ph είναι αποτέλεσμα αμοιβαίας μετάθεσης γενετικού υλικού ανάμεσα στα χρωμοσώματα 9 και 22 και, συγκεκριμένα, ανάμεσα στις ζώνες q34 και q11. Σε μοριακό επίπεδο συμβαίνει θραύση δύο γονιδίων που βρίσκονται σε αυτές τις ζώνες (*c-ABL* και *c-BCR,* αντιστοίχως) και δημιουργία του χιμαιρικού γονιδίου *BCR-ABL*.

Ανάλογα με τη θέση θραύσης του γονιδίου *BCR*, η χιμαιρική πρωτεΐνη BCR/ABL μπορεί έχει μέγεθος από 190 έως 230 KDa. Το σημείο θραύσης στο γονίδιο *BCR* εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στην περιοχή M-bcr, μεταξύ των εξωνίων 13 και 14, ή αλλιώς b2 και b4. Η σύνδεση γίνεται σταθερά με το ιντρόνιο μεταξύ των εξωνίων 1b και 2 του *ABL*. Το αποτέλεσμα είναι ένα χιμαιρικό μετάγραφο που περιλαμβάνει αλληλουχίες του *BCR* και το a2 εξώνιο του *ABL* και κωδικοποιεί τη χιμαιρική πρωτεΐνη p210.

Οι περισσότεροι ασθενείς με ΧΜΛ έχουν χιμαιρικά μετάγραφα με τις συμβολές b3-a2 (55%) ή b2-a2 (40%), ενώ σε ποσοστό 5% μπορεί ν' ανιχνευθούν και τα δύο μετάγραφα. Ο τύπος του χιμαιρικού μεταγράφου δε συσχετίζεται με την κλινική πορεία της νόσου. Σπανιότερα,

Αιματολογική Κλινική και ΜΜΜΟ, ΓΝ Γ. Παπανικολάου, Θεσσαλονίκη
Διεύθυνση Αλληλογραφίας: Κώστας Σταματόπουλος, Αιματολογική Κλινική και ΜΜΜΟ, ΓΝ «Γ. Παπανικολάου», Εξοχή, 57010 Θεσσαλονίκη, Τηλ.: 2313.307992 / Fax: 2313.307579, E-mail: kostas.stamatopoulos@gmail.com

το σημείο θραύσης στο γονίδιο *BCR* μπορεί να βρίσκεται στην περιοχή m-bcr, οδηγώντας στην παραγωγή της χιμαιρικής πρωτεΐνης p190 (συχνότερη στην ΟΛΛ). Σποραδικά αναφέρεται η δημιουργία μεγαλύτερης πρωτεΐνης p230, από τη θραύση του γονιδίου *BCR* στο εξώνιο 19[1-3].

Το γονίδιο *ABL* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p145[abl], μια κυτταροπλασματική κινάση της τυροσίνης η οποία περιέχει κρίσιμες λειτουργικές αλληλουχίες γι' αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν σ' ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης, για την ενδοκυττάρια εντόπισή της και για την αλληλεπίδραση με τον κυτταροσκελετό. Η λειτουργία της πρωτεΐνης p145 βρίσκεται υπό αυστηρό έλεγχο ώστε ν' αποφεύγεται το ενδεχόμενο απρόσφορης ή υπέρμετρης ενεργοποίησης των κυττάρων.

Η πρωτεΐνη p210 που κωδικοποιείται από το χιμαιρικό γονίδιο *BCR-ABL* έχει ιδιοσύστατα ενεργοποιημένη δραστικότητα κινάσης τυροσίνης και μάλιστα πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με την αντίστοιχη της p145. Επίσης, αντιθέτα από την p145, η p210 εμφανίζει ικανότητα αυτοφωσφορυλίωσης με συνέπεια να παραμένει συνεχώς ενεργός, διαταράσσοντας πολλές θεμελιώδεις λειτουργίες του κυττάρου (μεταξύ άλλων, πολλαπλασιασμός, απόπτωση, διακυττάρια επικοινωνία, εγκατάσταση στο σωστό μικροπεριβάλλον, προσκόλληση στο στρώμα)[4,5].

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ

Οι διάφορες μορφές καρκίνου προκύπτουν από απορρύθμιση της λειτουργίας γονιδίων που εμπλέκονται στον έλεγχο της αύξησης και διαφοροποίησης όπως επίσης και του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης των κυττάρων. Η απορρύθμιση μπορεί να επέλθει από ποικίλες δομικές μεταβολές του DNA, π.χ. σημειακές μεταλλάξεις και αμοιβαίες χρωμοσωμικές μεταθέσεις. Οι συγκεκριμένες δομικές μεταβολές είναι ειδικοί δείκτες των καρκινικών κυττάρων, βοηθούν στη διάκρισή τους από τα φυσιολογικά κύτταρα και χρησιμοποιούνται ευρέως τόσο για την ταξινόμηση των νεοπλασιών, ιδίως του αιμοποιητικού ιστού, όσο και για την επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι ευαίσθητη και ειδική μέθοδος για την αναζήτηση χιμαιρικών μεταγράφων που προκύπτουν από χρωμοσωμικές μεταθέσεις σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες. Τα χιμαιρικά μετάγραφα παρέχουν έναν ειδικό δείκτη για την αναγνώριση του λευχαιμικού κυττάρου, τόσο κατά τη διάγνωση και τυποποίηση της νόσου, όσο και κατά τη αναζήτηση της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (ΕΥΝ).

Η αναζήτηση των χιμαιρικών μεταγράφων με τη μέθοδο PCR στηρίζεται στο σχεδιασμό ειδικών εκκινητών (primers) που υβριδίζονται με αλληλουχίες των δύο διαφορετικών γονιδίων που συμμετέχουν στη δημιουργία του χιμαιρικού γονιδίου, ώστε το προιόν της PCR να περιλαμβάνει τη χιμαιρική αλληλουχία. Επειδή τα σημεία θραύσης των χιμαιρικών γονιδίων μπορεί να ποικίλουν και να κατανέμονται σε μεγάλη έκταση, δημιουργώντας προβλήματα στην επιλογή της περιοχής-στόχου του DNA με βάση την οποία θα σχεδιαστούν οι εκκινητές, ακολουθείται μια εναλλακτική στρατηγική. Συγκεκριμένα, με υπόστρωμα ολικό κυτταρικό RNA (περιέχει το σύνολο των μεταγράφων, κανονικών και χιμαιρικών) συντίθεται συμπληρωματικό (complementary DNA, cDNA) με τη δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase, RT). Το cDNA είναι απαλλαγμένο από ιντρόνια, οπότε η ενίσχυση των χιμαιρικών αλληλουχιών είναι ευχερέστερη. Έτσι, σε πολλές εφαρμογές, αντί για PCR σε γενωμικό DNA χρησιμοποιείται RT-PCR, οπότε αντί για χιμαιρικά γονίδια στην ουσία ανιχνεύονται χιμαιρικά μετάγραφα.

ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ BCR-ABL

Η RT-PCR απαιτεί μικρή ποσότητα αρχικού υλικού, ολοκληρώνεται σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα κι έχει τη μεγαλύτερη ευαισθησία από όλες τις χρησιμοποιούμενες τεχνικές, βασικό πλεονέκτημα στο πλαίσιο ανίχνευσης ΕΥΝ μετά από θεραπεία. Η ευαισθησία της φθάνει στην ανίχνευση ενός νεοπλασματικού κυττάρου μέσα σε 10^5-10^6 φυσιολογικά κύτταρα. Ωστόσο, βασικό μειονέκτημα της "συμβατικής" (ποιοτικής) PCR είναι η αδυναμία ποσοτικής εκτίμησης του φορτίου της νόσου. Με δεδομένη αυτή την αδυναμία, έχουν αναπτυχθεί τεχνικές ποσοτικής σε πραγματικό χρόνο PCR (Real time Quantitative PCR, RQ-RCR) που επιτρέπουν τον ποσοτικό προσδιορισμό της ΕΥΝ και χρησιμοποιούνται ευρέως στην παρακολούθηση των ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες γενικότερα και ΧΜΛ ειδικότερα[6-10].

Σήμερα, η μοριακή παρακολούθηση της ΧΜΛ ουσιαστικά ταυτίζεται με την ποσοτική μέτρηση των χιμαιρικών μεταγράφων *BCR-ABL* με RQ-PCR. Με το συγκεκριμένο ζήτημα έχουν ασχοληθεί συστηματικά κι εντατικά ερευνητικές ομάδες από την Ευρώπη, τις ΗΠΑ και την Αυστραλία, έχοντας ως βασική επιδίωξη τη διατύπωση κατευθυντήριων οδηγιών ώστε να διασφαλίζεται η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων του μοριακού ελέγχου. Στις ενότητες που ακολουθούν θα παρουσιαστούν οι σχετικές δραστηριότητες και κατευθυντήριες οδηγίες όπως επίσης και η «στρατηγική» μοριακής παρακολούθησης στην εποχή των αναστολέων της κινάσης της τυροσίνης BCR-ABL[6-11].

RQ-PCR ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΜΛ: ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ, ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΖΗΤΗΜΑΤΑ ΕΝΑΡΜΟΝΙΣΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

Η RQ-RCR πραγματοποιείται σε ειδικούς θερμοκυκλοποιητές που φέρουν ανιχνευτή φθορισμού και καταγράφουν την ποσότητα του προϊόντος PCR σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Σήμερα υπάρχουν ποικίλα όργανα για RQ-PCR με διαφορετική μεθοδολογία, όπως το σύστημα TaqMan που βασίζεται στην υδρόλυση διπλά σημασμένων ανιχνευτών, και η τεχνολογία LightCycler, που χρησιμοποιεί ένα ζεύγος γειτονικών ανιχνευτών υβριδισμού. Το αποτέλεσμα μπορεί να δοθεί ως απόλυτη τιμή ή να εκφραστεί σε σχέση μ' ένα γονίδιο αναφοράς.

Η ετερογένεια ως προς τις τεχνικές, τα γονίδια αναφοράς και τον τρόπο έκφρασης του αποτελέσματος στις διάφορες μελέτες δημιουργούν προβλήματα στη συγκριτική αξιολόγηση δεδομένων από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες. Στα πλαίσια αυτά, εκπονήθηκαν διεθνή συνεργατικά προγράμματα με σκοπό την προτυποποίηση της RQ-PCR[8,9]. Τα συμπεράσματα των προγραμμάτων και οι βασικές κατευθυντήριες οδηγίες έχουν ως εξής:[11,12]

1. *Είδος δείγματος*: για την ανίχνευση ΕΥΝ μπορεί να χρησιμοποιηθεί αίμα ή αναρρόφημα μυελού των οστών. Ωστόσο, ο ταυτόχρονος προσδιορισμός μεταγράφων *BCR-ABL* σε αίμα και μυελό έδειξε αποκλίσεις σε ορισμένους ασθενείς (διαφορά αριθμού μεταγράφων έως και ένα λογάριθμο μεταξύ των δύο δειγμάτων). Συνεπώς, για τη διαχρονική παρακολούθηση του ασθενούς συνιστάται η χρησιμοποίηση αποκλειστικά του ίδιου είδους δείγματος (αίμα ή αναρρόφημα μυελού των οστών).

2. *Κυτταροβρίθεια δείγματος*: προϋπόθεση για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων είναι η ικανοποιητική κυτταροβρίθεια του δείγματος (τουλάχιστον 1-2X10^7 λευκοκύτταρα, που αντιστοιχούν σε 5-10 ml αίμα).

3. *Επεξεργασία δείγματος*: η απομόνωση του RNA πραγματοποιείται σε λευκοκύτταρα μετά από λύση των ερυθροκυττάρων και όχι σε στοιβάδα μονοπυρήνων.

4. *Πρωτόκολλο RQ-PCR*: συνήθως χρησιμοποιούνται ανιχνευτές υδρόλυσης ή υβριδισμού.

5. *Εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος – Γονίδιο αναφοράς*: ένας σημαντικός εσωτερικός έλεγχος για την ποιότητα του δείγματος συνίσταται σε ποσοτικοποίηση των μεταγράφων ενός γονιδίου αναφοράς. Το γονίδιο αναφοράς πρέπει να έχει ορισμένα χαρακτηριστικά:

- να μη διαθέτει σχετιζόμενα ψευδογονίδια
- να εκφράζεται σε συγκρίσιμο επίπεδο με το γονίδιο-στόχο
- να εκφράζεται σε όλες τις κυτταρικές σειρές
- να μην επηρεάζεται από την υποκείμενη νόσο
- να μην εμφανίζει διακυμάνσεις έκφρασης ανάλογα με τη φάση της νόσου.

Για τη μοριακή παρακολούθηση ΕΥΝ σε ασθενείς με ΧΜΛ, ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιούνται τα γονίδια *ABL*, *BCR*[13] ή *BGUS*, με πιο διαδεδομένο το *ABL*[14]. Ο ελάχιστος αποδεκτός αριθμός μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς *ABL* είναι 10.000. Ωστόσο, προκειμένου να επιτευχθεί υψηλή ευαισθησία και να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία του αποτελέσματος σε πολύ χαμηλά φορτία μεταγράφων BCR-ABL, ο απαιτούμενος αριθμός μεταγράφων του γονιδίου *ABL* είναι τουλάχιστον 30.000[11]. Πρόκειται για κρίσιμο ζήτημα στο πλαίσιο αξιολόγησης της πλήρους μοριακής ύφεσης, τόσο υπό αναστολείς της κινάσης BCR-ABL όσο και μετά μεταμόσχευση αλλογενών αιμοποιητικών κυττάρων.

6. *Ποσοτικός προσδιορισμός των χιμαιρικών μεταγράφων*: δημιουργείται καμπύλη αναφοράς με πλασμίδια που περιέχουν γνωστές συγκεντρώσεις του γονιδίου-στόχου και του γονιδίου αναφοράς, αντιστοίχως. Ως ευαισθησία της μεθόδου ορίζεται η κατώτερη αραίωση πλασμιδίου στην οποία προκύπτει θετικό αποτέλεσμα (5-10 αντίγραφα). Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως εκατοστιαία αναλογία έκφρασης του *BCR-ABL* προς το γονίδιο αναφοράς *ABL* (*BCR-ABL/ABL* X100).

7. *Ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων*: τ' αποτελέσματα κάθε ανάλυσης ομαλοποιούνται με τη χρήση συντελεστή μετατροπής (conversion factor, CF)[11,12], ειδικού για κάθε εργαστήριο, που προσδιορίζεται με μια προτυποποιημένη κι επίπονη διαδικασία ανταλλαγής δειγμάτων μεταξύ εργαστηρίου(-ων) αναφοράς και κατά τόπους εργαστηρίων. Η ομαλοποίηση επιτρέπει την έκφραση των αποτελεσμάτων σε «Διεθνή Κλίμακα», δηλαδή υπό μορφή που μπορεί ν' αξιολογηθεί για την εξαγωγή συμπερασμάτων ανεξάρτητα από τις τυχόν μεθοδολογικές διαφορές μεταξύ εργαστηρίων.

«ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ» ΣΤΗ ΧΜΛ: ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΑΝΟΙΧΤΑ ΖΗΤΗΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες (European LeukemiaNet), η ανταπόκριση όπως αξιολογείται με βάση την RQ-PCR προσδιορίζεται με βάση δύο «ορόσημα». Συγκεκριμένα:

ως μείζων μοριακή ανταπόκριση (major molecular response, MMR) ορίζεται η ελάττωση του «φορτίου» των *BCR-ABL* μεταγράφων κατά τρεις λογάριθμους σε σχέση με το διαγνωστικό δείγμα (έκφραση των αποτελεσμάτων αναφορικά με το διεθνές πρότυπο, IRIS scale)[15].

ως πλήρης μοριακή ανταπόκριση (complete molecular response, CMR) *θα έπρεπε να ορίζεται* η μη ανίχνευση χιμαιρικών μεταγράφων *BCR-ABL*. Ωστόσο, το ζήτημα δεν είναι απλό και, προς το παρόν, δεν υπάρχει ομοφωνία ως προς την ακριβή σημασία της CMR επειδή σε πολύ χαμηλά φορτία μεταγράφων η ποσοτικοποίηση παρουσιάζει εγγενείς δυσχέρειες, ιδίως όταν δεν υπάρχει ικανο-

ποιητικός αριθμός μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς. Κατά σύμβαση, ως CMR ορίζεται η ελάττωση του φορτίου των *BCR-ABL* μεταγράφων κατά τουλάχιστον 4 (κατ' άλλους 4.5, 5 ή και περισσότερο) λογάριθμους σε σχέση με το διαγνωστικό δείγμα[11,16,17].

ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΤΗ ΧΜΛ: ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΣΕ ΧΡΟΝΙΑ ΦΑΣΗ

Σύμφωνα με τις αναθεωρημένες οδηγίες του European LeukemiaNet[16], η παρακολούθηση ασθενών με ΧΜΛ υπό αναστολείς των κινασών της τυροσίνης *BCR-ABL* (Tyrosine Kinase Inhibitors. TKI) βασίζεται στις εξής εξετάσεις: αιμοδιάγραμμα, κυτταρογενετικός έλεγχος, μοριακή ανίχνευση μεταγράφων *BCR-ABL* με RQ-PCR και ανίχνευση μεταλλάξεων *BCR-ABL* σε ειδικές περιπτώσεις (Πίνακας 1).

Κατά τη διάγνωση είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός του τύπου του μεταγράφου που φέρει ο ασθενής, ο οποίος πραγματοποιείται με ποιοτική RT-PCR[18], συνήθως σύμφωνα με προτυποποιημένα πρωτόκολλα του European LeukemiaNet[14]. Σε σπάνιες περιπτώσεις με κλινική και αιματολογική εικόνα ΧΜΛ, η RT-PCR για χιμαιρικά μετάγραφα *BCR-ABL* που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη p210 είναι αρνητική. Σε τέτοιες περιπτώσεις πρέπει ν' αποκλειστεί το ενδεχόμενο της παρουσίας εναλλακτικών μεταγράφων *BCR-ABL*, όπως τα μετάγραφα που κωδικοποιούν τις χιμαιρικές πρωτεΐνες p190 ή p230 (<1% του συνόλου των ασθενών), για τα οποία δεν υπάρχουν πρωτυποποιημένα πρωτόκολλα ποσοτικοποίησης με RQ-PCR (ιδίως για τα p230).

Απαραίτητη διαγνωστική ενέργεια κατά τη διάγνωση είναι και η ποσοτικοποίηση του φορτίου των χιμαιρικών μεταγράφων με RQ-PCR, ώστε να υπάρχει σημείο αναφοράς για τη μετέπειτα παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία.

Πίνακας 1. Κατευθυντήριες οδηγίες για την παρακολούθηση ασθενών με ΧΜΛ υπό αναστολείς κινασών της τυροσίνης.

Αιμοδιάγραμμα	Στη διάγνωση, ανά 15 μέρες μέχρι την πλήρη αιματολογική ύφεση και στη συνέχεια τουλάχιστον ανά 3 μήνες.
Κυτταρογενετικός έλεγχος	Στη διάγνωση, στους 3 και 6 μήνες. Στη συνέχεια, ανά 6 μήνες μέχρι την επίτευξη CCyR και, έπειτα, ανά 12 μήνες. Σε κάθε περίπτωση αποτυχίας ή ανεξήγητων κυτταροπενιών.
RQ-PCR	Ανά 3 μήνες μέχρι την επίτευξη MMR. Έπειτα, τουλάχιστον ανά 6 μήνες.
Ανίχνευση μεταλλάξεων *BCR-ABL*	Σε πρωτογενή αντίσταση ή υποβέλτιστη απάντηση. Σε αλλαγή της θεραπείας.

CCyR: πλήρης κυτταρογενετική ανταπόκριση. MMR: μείζων μοριακή ανταπόκριση.

Ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου σε ασθενείς υπό Imatinib mesylate

Σύμφωνα με τις διεθνείς συστάσεις[16], η ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου με τεχνική RQ-PCR μετά θεραπεία με Imatinib Mesylate (Glivec) πρέπει να διενεργείται κάθε 3 μήνες έως την επίτευξη MMR. Έπειτα, ο μοριακός έλεγχος μπορεί να διενεργείται τουλάχιστον κάθε 6 μήνες, με βέλτιστη συχνότητα τους 3-4 μήνες. Τακτικότερη παρακολούθηση συνιστάται σε ασθενείς με υποβέλτιστη απάντηση (με βάση τα κριτήρια ELN, Πίνακας 2) και ασθενείς με χαρακτηριστικά υψηλού κινδύνου (υψηλό Sokal score, επιπρόσθετες χρωμοσωμικές ανωμαλίες).

Ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου σε ασθενείς υπό 2ης γενιάς TKI ως θεραπεία 1ης γραμμής

Οι ασθενείς που λαμβάνουν 2ης γενιάς αναστολείς κινασών της τυροσίνης (Nilotinib, Dasatinib) ως θεραπεία 1ης γραμμής επιτυγχάνουν βαθύτερες υφέσεις και ταχύτερη CCyR. Σε αυτό το πλαίσιο τίθεται ο προβληματισμός αν οι συγκεκριμένοι ασθενείς πρέπει να ελέγχονται με RQ-PCR με μεγαλύτερη συχνότητα μέχρι την επίτευξη MMR[16], άποψη την οποία συμμερίζονται και οι συγγραφείς του παρόντος άρθρου.

Ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου σε ασθενείς μετά από αλλογενή μεταμόσχευση

Οι ασθενείς με ΧΜΛ που υποβάλλονται σε αλλογενή μεταμόσχευση πρέπει να παρακολουθούνται *επ'αόριστον* σε διαστήματα 3- ή 6- μηνών. Η ανίχνευση μεταγράφων *BCR-ABL* σε χαμηλό φορτίο (<0.02%) σ' ένα μόνο στιγμιότυπο δεν σηματοδοτεί μοριακή υποτροπή. Οι ασθενείς με περιοδική θετικότητα για μετάγραφα *BCR-ABL* σε χαμηλό επίπεδο μπορεί να παραμείνουν σε μακρόχρονη ύφεση. Οι ασθενείς με σταθερά αρνητικό φορτίο (ή ένα στιγμιότυπο χαμηλού φορτίου) *BCR-ABL* μεταγρά-

Πίνακας 2. Αναθεωρημένα κριτήρια ELN για την αξιολόγηση του Imatinib Mesylate ως θεραπεία 1ης γραμμής σε 1η χρόνια φάση.

	Στη Διάγνωση	+3	+6	+12	+18	Κάθε χρονική στιγμή
Βέλτιστη απάντηση	-	CHR και τουλάχιστον minor CyR	τουλάχιστον PCyR	CCyR	MMR	Σταθερή ή βελτιούμενη MMR
Υποβέλτιστη απάντηση	-	Χωρίς CyR (Ph>95%)	Χωρίς PcyR	PCyR	Χωρίς MMR	Απώλεια MMR Μεταλλάξεις[1]
Αποτυχία	-	Χωρίς CHR	Χωρίς CyR (Ph>95%)	Χωρίς PCyR	Χωρίς CCyR	Απώλεια CHR, Απώλεια CCyR, Μεταλλάξεις[2], CCA/(Ph+)
Προειδοποιήσεις	Ασθενείς υψηλού κινδύνου (Sokal)/CCA/(Ph+)	-	-	Λιγότερο από MMR	-	Αύξηση των μεταγράφων *BCR/ABL**, CCA/(Ph-)

CHR: Πλήρης αιματολογική ύφεση, ***minor CyR***: ελάσσων κυτταρογενετική ανταπόκριση (Ph+<=65%), ***PcyR:*** μερική κυτταρογενετική ανταπόκριση (Ph+ 1% εώς 35%), ***CCyR:*** πλήρης κυτταρογενετική ύφεση, ***MMR*:** Μείζων μοριακή ανταπόκριση, ***CCA*:** επιπρόσθετες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, εκτός από del9q+

1.Μεταλλάξεις ευαίσθητες στο Imatinib Mesylate

2. Μεταλλάξεις ανθεκτικές σε TKI's.

*Η αύξηση των μεταγράφων μπορεί να είναι 2/σια έως 10/σια.

Αποτυχία στο Imatinib επιβάλλει αλλαγή στη θεραπεία

Υποβέλτιστη απάντηση επιδεικνύει ότι παρότι ο ασθενής μπορεί να ωφεληθεί από τη συνέχιση του Imatinib, πιθανότερο η αλλαγή της αγωγής θα τον οφελήσει περισσότερο μακροπρόθεσμα.

Σε **βέλτιστη** απάντηση δεν υπάρχει καμία ένδειξη για αλλαγή στη θεραπεία.

φων έχουν εξαιρετικά μικρότερη πιθανότητα υποτροπής (2.7%) από ασθενείς με περιοδικά εμφανιζόμενο χαμηλό φορτίο (20.8%) και ασθενείς με σταθερα θετικό χαμηλό φορτίο *BCR-ABL* (30%)[19].

ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Η κλινική σημασία της μοριακής παρακολούθησης με RQ-PCR σε ασθενείς με ΧΜΛ υπό TKI είναι αδιαφιλονίκητη. Τα πρώτα σχετικά δεδομένα προήλθαν από τη μελέτη IRIS. Συγκεκριμένα, μετά από 7 έτη παρακολούθησης, επιβεβαιώνεται η αξία της ταχείας μοριακής ανταπόκρισης στο Imatinib Mesylate[20] εφόσον:

1. Ασθενείς με MMR στους 12 μήνες έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα επιβίωσης χωρίς σύμβαμα (event-free survival, EFS) στα 7 έτη (91% έναντι 79%), ενώ επίσης εμφανίζουν μηδενική πιθανότητα εξέλιξης σ' επιταχυνόμενη φάση ή βλαστική κρίση.

2. Ασθενείς με MMR στους 18 μήνες έχουν μηδενική πιθανότητα εξέλιξης σ' επιταχυνόμενη φάση ή βλαστική κρίση, 95% EFS στα 7 έτη και μικρότερη πιθανότητα κυτταρογενετικής υποτροπής (3% vs 26%) σε σχέση με ασθενείς με CCyR χωρίς όμως MMR.

3. Η επίτευξη MMR σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της θεραπείας μειώνει την πιθανότητα κυτταρογενετικής υποτροπής ή εξέλιξης της νόσου.

Στις αναθεωρημένες συστάσεις του ELN για την αντιμετώπιση της ΧΜΛ, ως βέλτιστος χρόνος επίτευξης MMR ορίζονται οι 12 μήνες. Από ορισμένες μελέτες, η επίτευξη MMR στους 6 μήνες θεωρείται εξαιρετικά θετικός προγνωστικός παράγοντας[21,22], αυτό ωστόσο δεν έχει επιβεβαιωθεί από την IRIS. Με δεδομένη τη βαθύτερη ύφεση που επιτυγχάνεται με τους διαθέσιμους TKI 2ης γενιάς, μένει ν' αποσαφηνιστεί αν η υποβέλτιστη μοριακή ανταπόκριση σε αναθεωρημένα χρονικά ορόσημα (π.χ. στους +3 ή +6 μήνες) πρέπει ν' αποτελέσει κριτήριο γι' αλλαγή της αγωγής από το Imatinib Mesylate σε TKI 2ης γενιάς.

Η προγνωστική αξία της MMR σε θεραπεία 1ης γραμμής με TKI 2ης γενιάς είναι ζήτημα υπό διερεύνηση[23]. Φαίνεται ότι τα χρονικά ορόσημα πρέπει να διαφοροποιηθούν, με σημαντικότερο το αποτέλεσμα του μοριακού ελέγχου κατά το τρίμηνο. Γενικότερα, ωστόσο, ο χρόνος παρακολούθησης είναι ακόμα μικρός και δεν επιτρέπει την εξαγωγή οριστικών συμπερασμάτων.

ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΚΙΝΑΣΩΝ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΟΥ ΧΙΜΑΙΡΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ BCR-ABL

Παρότι οι αναστολείς των κινασών της τυροσίνης έχουν βελτιώσει εντυπωσιακά την κλινική πορεία των ασθενών με ΧΜΛ, μερικοί ασθενείς χάνουν την ανταπόκριση ή εμφανίζουν αντοχή. Στα υποκείμενα αίτια συμπεριλαμβάνονται, μεταξύ άλλων, τροποποίησεις σε μεταφορείς φαρμάκων, επιπρόσθετες κυτταρογενετικές ανωμαλίες, επαύξηση (amplification) του γονιδίου *BCR-ABL*, ενεργοποιήση άλλων κινασών τυροσίνης κ.λπ.[24,25]. Ωστόσο, ίσως το σημαντικότερο ρόλο (ιδίως από την άποψη των περαιτέρω θεραπευτικών χειρισμών) διαδραματίζουν οι μεταλλάξεις που ανιχνεύονται στην περιοχή κινάσης του γονιδίου *BCR-ABL*.

Σήμερα γνωρίζουμε ότι 45-50% των ασθενών που εμφανίζουν αντοχή στο Imatinib Mesylate έχουν μεταλλάξεις του γονιδίου *BCR-ABL*. Όλες οι μεταλλάξεις δεν έχουν την ίδια συχνότητα ούτε τον ίδιο κλινικό αντίκτυπο[26,27], καθώς κάποιες μεταλλάξεις φαίνεται να μην παίζουν ρόλο στην εξέλιξη της νόσου. Ωστόσο, υπάρχει ομοφωνία για το γεγονός ότι τη δυσμενέστερη πρόγνωση μεταξύ όλων των μεταλλάξεων έχει η T315I. Εφόσον ανιχνευθεί η συγκεκριμένη μετάλλαξη, προς το παρόν, η μοναδική αποτελεσματική επιλογή για τους ασθενείς είναι η μεταμόσχευση αλλογενών αιμοποιητικών κυττάρων. Επίσης, πρόσφατα αναφέρθηκε ότι η παρουσία πολλαπλών μεταλλάξεων επηρεάζει αρνητικά την πρόγνωση[28].

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΟΥ ΧΙΜΑΙΡΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ BCR-ABL

Υπάρχουν αρκετές διαθέσιμες τεχνικές για την ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου *BCR-ABL* που ποικίλουν ως προς την ευαισθησία, το κόστος και το βαθμό δυσκολίας. Ορισμένες (π.χ. pyrosequencing, ligation-dependent competitive PCR, φασματοσκοπία μαζών, mutation-specific PCR, polymerase colony assay) έχουν μεν εξαιρετική ευαισθησία (0.0003% έως 0.1%) αλλά είναι τεχνικά δύσκολες και (προς το παρόν) ιδιαίτερα δαπανηρές. Έτσι, στην εργαστηριακή πρακτική χρησιμοποιούνται η αποδιατακτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (D-HPLC) και η αλληλούχηση του DNA[29,30]. Η πρώτη τεχνική υπερτερεί από την άποψη της ευαισθησίας (1% έναντι 10-15%), αλλά είναι ακριβή και δεν τυποποιεί τη μετάλλαξη, γι' αυτό και κυρίως εφαρμόζεται η αλληλούχηση του DNA. Στη συγκεκριμένη προσέγγιση αναλύονται οι αλληλουχίες των εξωνίων 4-10 του γονιδίου *ABL* που συμμετέχει στη δημιουργία του χιμαιρικού γονιδίου, στις οποίες συμπεριλαμβάνεται και η περιοχή με ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης.

Πρόσφατα ολοκληρώθηκε η διεθνής συνεργατική προσπάθεια για τη διατύπωση κατευθυντήριων οδηγιών σχετικά με τη μεθοδολογία ανίχνευσης μεταλλάξεων και το χρόνο διενέργειας της εξέτασης (Πίνακας 3)[31]. Σύμφωνα με αυτές τις οδηγίες, ο έλεγχος κατά τη διάγνωση πρέπει να γίνεται μόνο όταν η νόσος εκδηλώνεται σ' επιταχυνόμενη φάση (ΕΦ) ή βλαστική κρίση (ΒΚ) επειδή σε χρόνια φάση πολύ σπάνια ανιχνεύονται μεταλλάξεις, των οποίων μάλιστα η κλινική σημασία είναι αδιευκρίνιστη. Αντίθετα, σε ΕΦ/ΒΚ οι μεταλλαξεις είναι συχνές, πιθανότατα στα πλαίσια γενετικής αστάθειας του λευχαιμικού κλώνου, και η ανίχνευσή τους μπορεί να καθορίσει την επιλογή της θεραπείας.

Κατά τη θεραπεία 1ης γραμμής με Imatinib Mesylate**,** ο έλεγχος για μεταλλάξεις δεν πρέπει να πραγματοποιείται ως εξέταση ρουτίνας. Αντίθετα, 29% των ασθενών με *αποτυχία* στο Imatinib έχουν μεταλλάξεις και η ανίχνευσή τους μπορεί να καθοδηγήσει την επιλογή της θεραπείας 2ης γραμμής. Μεταξύ των ασθενών με *υποβέλτιστη απάντηση*, 16% φέρουν μεταλλάξεις, ιδίως πρόκειται για υποβέλτιστη κυτταρογενετική παρά μοριακή απάντηση. Τέλος, σε αύξηση των μεταγράφων *BCR-ABL* που οδηγεί σε *απώλεια της MMR* κρίνεται απαραίτητη η ανίχνευση μεταλλάξεων ως αίτιο αντίστασης του κλώνου στη θεραπεία. Ασθενείς που αυξάνουν τον αριθμό των μεταγράφων *BCR-ABL* αλλά παραμένουν σε MMR πρέπει να παρακολουθούνται προσεκτικά ώστε να διαπιστωθεί αν το φορτίο των μεταγράφων έχει αυξητική τάση. Γενικότερα, δεν έχει τεκμηριωθεί συσχέτιση τέτοιων μικρών διακυμάνσεων (στα όρια του τεχνικού λάθους) με την παρουσία μεταλλάξεων στην περιοχή της κινάσης της τυροσίνης.

Τέλος**,** σε θεραπεία 2ης γραμμής με Dasatinib/Nilotinib, μεταλλάξεις αναζητούνται σε περίπτωση αιματολογικής ή κυτταρογενετικής αποτυχίας (καμία κυτταρογενετική απάντηση σε 3 μήνες, ελάχιστη σε 6 μήνες ή μικρότερη από μερική σε 12 μήνες). Προς το παρόν, τα διαθέσιμα δεδομένα από τη χορήγηση αυτών των φαρμάκων ως θεραπεία 1ης γραμμής δεν επαρκούν για την εξαγωγή συμπερασμάτων και κατευθυντήριων γραμμών.

Πίνακας 3. Κατευθυντήριες οδηγίες του ELN για το χρόνο ανίχνευσης μεταλλάξεων.

Στη διάγνωση	Μόνο σε επιταχυνόμενη φάση ή βλαστική κρίση
Θεραπεία 1ης γραμμής με Imatinib Mesylate	Αποτυχία θεραπείας Απώλεια MMR Υποβέλτιστη απάντηση
Θεραπεία 2ης γραμμής με Dasatinib/ Nilotinib	Σε περίπτωση αιματολογικής ή κυτταρογενετικής αποτυχίας

Guidelines for the molecular monitoring of patients with CML treaτed with tyrosine kinase inhibitors

by Tassoula Touloumenidou, Apostolia Papalexandri, Kostas Stamatopoulos

Hematology Department and HCT Unit, G. Papanicolaou Hospital, Thessaloniki, Greece

ABSTRACT: The advent of therapies with a curative potential for patients with hematological malignancies created the need for better assessment of response. Hence, sensitive and accurate detection of minimal residual disease (MRD) is considered as a pre-requisite for therapeutic success. MRD assessment in chronic myeloid leukemia (CML) is based on the detection of the chimeric *BCR-ABL* mRNA transcripts which serve as a "molecular signature" which can be used for the discrimination of residual malignant cells from normal hematopoietic cells. Modern PCR protocols for the detection of *BCR-ABL* transcripts fulfil some important criteria: in particular, (i) they provide specificity for malignancy and, (ii) they are characterized by satisfactory sensitivity. However, limitations persist: thus, standardization is suboptimal or not fully implemented, while the precise quantification of MRD levels is still an open issue. Today, the molecular monitoring of *BCR-ABL* transcripts in CML is performed by real-time quantitative PCR (RQ-PCR) protocols. Thanks to international multi-institutional initiatives, recommendations for harmonizing the differing RQ-PCR methodologies with the objective of maximizing reliability of analysis for clinical decision making now exist: all aspects of the analysis are covered, from source and number of cells to validation of PCR amplification efficiencies, ensuring the comparability of the results from different trials and/or medical centers. A cornerstone of the follow-up of CML patients treated with tyrosine kinase inhibitors relates to the accurate detection of somatic mutations within the *BCR-ABL* kinase domain, which represent the major mechanism of acquired resistance. Several approaches are available for mutation detection; however, presently the most widely used method is direct sequencing. More sensitive approaches may be beneficial, but are yet to prove their clinical utility.

Βιβλιογραφία

1. Vardiman JW. Chronic myelogenous leukemia, BCR-ABL1+. Am J Clin Pathol. 2009; 132(2):250-60.
2. Jabbour E, Fava C, Kantarjian H. Advances in the biology and therapy of patients with chronic myeloid leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol. 2009; 22(3):395-407.
3. Burke BA, Carroll M. BCR-ABL: a multi-faceted promoter of DNA mutation in chronic myelogeneous leukemia. Leukemia. 2010; 24(6):1105-12.
4. Sloma I, Jiang X, Eaves AC, Eaves CJ. Insights into the stem cells of chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2010; 24(11):1823-33.
5. Carter BZ, Mak DH, Cortes J, Andreeff M. The elusive chronic myeloid leukemia stem cell: does it matter and how do we eliminate it? Semin Hematol. 2010; 47(4):362-70.
6. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. Leukemia. 2003; 1 2:2318-57.
7. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia. 2003; 6:1013-34.
8. Branford S, Cross N, Hochhaus A, et al. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. Leukemia. 2006; 20:1925–1930.
9. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. Blood. 2006; 108:28-37.
10. Melo JV, Ross DM. Minimal residual disease and discontinuation of therapy in chronic myeloid leukemia: can we aim at a cure? Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2011; 2011:136-42.
11. Branford S, Hughes TP. Practical considerations for monitoring patients with chronic myeloid leukemia. Semin Hematol. 2010; 47(4):327-34.
12. Müller MC, Cross NC, Erben P, et al. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. Leukemia. 2009; 23:1957–1963.
13. Ross DM, Branford S, Seymoyr JF, et al. Patients with chronic myeloid leukemia who maintain a complete molecular response after stopping imatinib treatment have evidence of persistent leukemia by DNA PCR. Leukemia. 2010; 24:1719-1724.
14. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal

residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. Leukemia. 1999; 13(12):1901-1928.
15. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, et al, for the International Randomised Study of Interferon versus STI571 (IRIS) Study Group. Frequency of Major Molecular Responses to Imatinib or Interferon Alfa plus Cytarabine in Newly Chronic Myeloid Leukemia N Engl J Med. 2003; 349(15):1423-1432.
16. Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet., J Clin Oncol. 2009; 27(35):6041-6051.
17. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, et al; European Leukemia Net.Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. Blood. 2006; 108(6):1809-1820.
18. Hughes T, Branford S. Molecular monitoring of BCR-ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia. Blood Rev. 2006; 20(1):29- 41.
19. Kaeda J, O'Shea D, Szydlo RM, et al. Serial measurement of BCR-ABL transcripts in the peripheral blood after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia: an attempt to define patients who may not require further therapy. Blood. 2006; 107(10):4171-6.
20. Hughes TP, Hochhaus A, Branford S, et al, IRIS investigators. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS) Blood. 2010; 116: 3758-3765.
21. Branford S, Lawrence R, Grigg A, et al. Long term follow up of patients with CML in chronic phase treated with first-line imatinib suggests that earlier achievement of a major molecular response leads to greater stability of response. Blood. 2008; 112:2113.
22. Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Jones D, et al. Delayed achievement of cytogenetic and molecular response is associated with increased risk of progression among patients with chronic myeloid leukemia in early chronic phase receiving high-dose or standard-dose imatinib therapy. Blood. 2009; 113(25):6315-21.
23. Jabbour E, Kantarjian HM, O'Brien S, et al. Front-line therapy with second-generation tyrosine kinase inhibitors in patients with early chronic phase chronic myeloid leukemia: what is the optimal response? J Clin Oncol. 2011; 29(32):4260-4265.
24. Apperley JF, Part I. Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. Lancet Oncol. 2007; 8:1018-29.
25. Mathisen MS, Kantararjian HM, Cortes J, Jabbour E. Mutant BCR-ABL clones in chronic myeloid leukemia Haematologica. 2011; 96(3):347-349.
26. O' Hare T, Eide CA, Deininger MWN. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia Blood. 2007; 110:2242-2249.
27. Branford S, Melo JV, Hughes TP. Selecting optimal second-line tyrosine kinase inhibitor therapy for chronic myeloid leukemia patients after imatinb failure: does the BCR-ABL mutation status really matter? Blood. 2009; 114:5426-5435.
28. Parker WT, Ho M, Scott HS, Hughes TP, Branford S. Poor response to second-line kinase inhibitors in CML patients with multiple low level mutations, irrespective of their resistance profile Blood 2011 (Epub a head of print), PMID 22210874.
29. Ernst T, Erben P, Mueller MC, et al. Dynamics of BCR-ABL mutated clones prior to hematologic or cytogenetic resistance to imatinib. Haematologica. 2008; 93(2):187-192.
30. Ernst T, Hoffmann J, Erben P, et al. ABL single nucleotide polymorphisms may masquerade as BCR-ABL mutations associated with resistance to tyrosine kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia. Haematologica. 2008; 93(9):1389-1393.
31. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. Blood. 2011; 118(5):1208-1215.