

mgr Błażej Ratajczak

**Ocena występowania aberracji chromosomowych u chorych z
przewlekłą białaczką szpikową w dobie stosowania
inhibitorów kinaz tyrozynowych**

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. Małgorzata Jarmuż-Szymczak prof. PAN

Katedra Hematologii i Transplantacji Szpiku
Kierownik: prof. dr hab. Krzysztof Lewandowski
Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku
Kierownik: dr hab. Lidia Gil prof. UM

Kolegium Nauk Medycznych
Kancelarz: prof. dr hab. Marek Ruchała



Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2021

Składam serdeczne podziękowania

Pani Promotor dr hab. Małgorzacie Jarmuż-Szymczak prof. PAN

*za opiekę naukową, cenne uwagi merytoryczne,
nieocenioną pomoc oraz wyrozumiałość, cierpliwość i zaufanie,
dziękuję także za wsparcie i możliwość rozwoju*

Panu Profesorowi dr hab. Krzysztofowi Lewandowskiemu

*za zainspirowanie tematem i cenne uwagi oraz
umożliwienie przeprowadzenia badań w Klinice i Katedrze Hematologii i
Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu*

Pani Profesor dr hab. Lidii Gil

*za umożliwienie przeprowadzenia badań w Klinice i Katedrze Hematologii i
Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu*

Wszystkim Pracownikom Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej,

*w szczególności mgr inż. Annie Przybyłowicz-Chaleckiej oraz
mgr inż. Joannie Czerwińskiej-Rybak
za wspólną pracę, pomoc i wsparcie*

Panu mgr Adamowi Ustaszewskiemu

za pomoc w redagowaniu niniejszej pracy

Moim najbliższym

za to, że nigdy nie wątpię

Gutta cavat lapidem, non vi, sed saepe cadendo.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

<i>ABL1</i>	ludzki homolog wirusowego onkogenu abl (v-abl) znaleziony w mysim wirusie białaczki Abelsona	(ang. V-Abl Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1)
ACA	dodatkowe aberracje chromosomowe	(ang. Additional Chromosomal Abnormalities)
add	addycja	(ang. additional material of unknown origin)
AgNOR	barwienie organizatorów jąderkotwórczych	(ang. silver-stained Nucleolar Organizer Regions)
alloBMT	allogeniczny przeszczep komórek macierzystych szpiku kostnego	(ang. allogeneic Bone Marrow Transplantation)
AML	ostra białaczka szpikowa	(ang. Acute Myeloid Leukemia)
AP	faza akceleracji	(ang. Accelerated Phase)
<i>ASS1</i>	gen kodujący syntetazę argininobursztynianu	(ang. Argininosuccinate Synthase 1)
<i>ATM</i>	nazwa genu pochodząca od zespołu ataksji-teleangiektazji	(ang. Ataxia Telangiectasia Mutated)
<i>BCR</i>	gen kodujący białko aktywujące GTPazy	(ang. Breakpoint Cluster Region)
BP	przełom blastyczny	(ang. Blast Phase)
CBG	barwienie heterochromatyny konstytutywnej	(ang. C-bands by Barium hydroxide using Giemsa)
CCA	klonalne aberracje chromosomowe	(ang. Clonal Cytogenetic Abnormalities)
CCyR	całkowita odpowiedź cytogenetyczna	(ang. Complete Cytogenetic Response)
<i>CDKN2A</i>	gen kodujący białka będące inhibitorami kinazy cyklinozależnej 2A	(ang. Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A)
CLL	przewlekła białaczka limfatyczna	(ang. Chronic Lymphocytic Leukemia)
CML	przewlekła białaczka szpikowa	(ang. Chronic Myeloid Leukemia)
CP	faza przewlekła	(ang. Chronic Phase)
DA	dazatynib	(ang. dasatinib)
DAPI	4',6-diamidyno-2-fenylindol	(ang. 4',6-diamidin-2-phenylindole)
DASISION	badanie kliniczne	(ang. Dasatinib vs. Imatinib Study in Treatment-Naive CML Patients)
del	delecja	(ang. deletion)
der	chromosom pochodny, powstały w wyniku aberracji chromosomowej	(ang. derivative chromosome)
DMR	głęboka odpowiedź molekularna	(ang. Deep Molecular Response)
dPCR	emulsyjny PCR	(ang. digital Polymerase Chain Reaction)

dup	duplikacja	(ang. duplication)
EGFR	gen kodujący receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu	(ang. Epidermal Growth Factor Receptor)
ELN	Europejska Sieć LeukemiaNet	(ang. European LeukemiaNet)
ELTS	wskaźnik ryzyka zgonu	(ang. EUTOS long-term survival score)
ENESTFreedom	badanie kliniczne	(ang. Nilotinib Treatment-free Remission Study in CML Patients)
ENESTop	badanie kliniczne	(ang. Treatment-free Remission After Achieving Sustained MR4.5 on Nilotinib)
EURO-SKI	badanie kliniczne	(ang. Discontinuation of Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Chronic Myeloid Leukaemia)
FDA	Agencja Żywności i Leków	(ang. Food and Drug Administration)
FISH	fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i>	(ang. Fluorescence in Situ Hybridization)
G-CSF	czynnik wzrostu granulocytów	(ang. Granulocyte Colony-Stimulating Factor)
GTG	klasyczna technika barwienia chromosomów	(ang. G-bands by Trypsin using Giemsa)
GUS β	gen kodujący β -glukuronidazę	(ang. β -glucuronidase)
HER2	gen kodujący receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2	(ang. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)
HU	hydroksykarbamid	(łac. hydroxycarbamidum)
i	izochromosom	(ang. isochromosome)
idem	łac. ten sam, to samo	(ang. deontes the stemline karyotype in a subclone)
idic	izochromosom dicentryczny	(ang. isodicentric chromosome)
IM	imatynib	(ang. imatinib)
INF α	interferon α	(ang. interferon α)
ins	insercja	(ang. insertion)
inv	inwersja	(ang. inversion)
IRIS	badanie kliniczne	(ang. International Randomized IFN vs. STI571 study)
ISCN	Międzynarodowy System Nazewnictwa Chromosomów	(ang. International System for Human Cytogenetic Nomenclature)
JAK-STAT	ścieżka transdukcji sygnału	(ang. Janus Kinase - Signal Transducer and Activator of Transcription)
KD	domena kinazowa	(ang. domain kinase)
LSI	oznaczenie locus-specyficznych sond molekularnych	(ang. Locus Specific Identifier)
mar	chromosom markerowy	(ang. marker chromosome)
MCyR	mniejsza odpowiedź cytogenetyczna	(ang. Minor Cytogenetic Response)

MDS	zespół mielodysplastyczny	(ang. Myelodysplastic Syndrome)
MECOM	gen kodujący kompleks białkowy N-metylotransferazy histonowo-lizynowej	(ang. MDS1 and EVI1 Complex Locus)
minCyR	minimalna odpowiedź cytogenetyczna	(ang. minimal Cytogenetic Response)
MMR	większa odpowiedź molekularna	(ang. Major Molecular Response)
MolRFS	przeżycie wolne od nawrotu molekularnego	(ang. Molecular Relapse-Free Survival)
MR	odpowiedź molekularna	(ang. Molecular Response)
NIL	nilotinib	(ang. nilotinib)
NCCN	Organizacja Współpracy Międzynarodowej na Rzecz Poprawy Opieki Onkologicznej	(ang. National Comprehensive Cancer Network)
noCyR	brak odpowiedzi cytogenetycznej	(ang. no Cytogenetic Response)
p	ramię krótkie chromosomu	(fr. petit)
PALG	Polska Grupa ds. Leczenia Białaczek u Dorosłych	(ang. Polish Adult Leukemia Group)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy	(ang. Polymerase Chain Reaction)
PCyR	częściowa odpowiedź cytogenetyczna	(ang. Partial Cytogenetic Response)
PDGFR	gen kodujący receptor czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego	(ang. Platelet-Derived Growth Factor Receptor)
Ph	chromosom Philadelphia	(ang. Philadelphia chromosome)
pter	terminalny koniec ramienia krótkiego chromosomu	(ang. terminal end of the short arm)
q	ramię długie chromosomu	(fr. kolejna litera alfabetu w języku francuskim po p)
qter	terminalny koniec ramienia długiego chromosomu	(ang. terminal end of the long arm)
RQ-PCR	ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym	(ang. Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction)
RT-PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy z odwrotną transkrypcją	(ang. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
sAML	wtórna ostra białaczka szpikowa	(ang. secondary Acute Myeloid Leukemia)
STIM1	badanie kliniczne	(ang. Long-Term Follow-Up of the French Stop Imatinib Study)
t	translokacja	(ang. translocation)
TFR	remisja wolna od leczenia	(ang. Treatment Free Remission)
TKI	inhibitor kinazy tyrozynowej	(ang. Tyrosine Kinase Inhibitor)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia	(ang. World Health Organization)

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	3
1. WPROWADZENIE.....	9
1.1 Nowotwory mieloproliferacyjne.....	9
1.2 Przewlekła białaczka szpikowa	9
1.2.1 Charakterystyka kliniczno-laboratoryjna.....	9
1.3 Patogeneza przewlekłej białaczki szpikowej	12
1.4 Chromosom Philadelphia.....	15
1.5 Translokacje wariantowe t(9;22;V)	19
1.6 Przewlekła białaczka szpikowa Philadelphia-ujemna/ <i>BCR-ABL1</i> -dodatnia oraz zamaskowany chromosom Philadelphia	21
1.7 Delecja obejmująca <i>ABL1</i> lub/i <i>BCR</i> w obrębie chromosomów pochodnych.....	22
1.8 Dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie komórek Philadelphia-dodatnich.....	24
1.9 Aberracje chromosomowe w komórkach Philadelphia-ujemnych	27
1.10 Leczenie przewlekłej białaczki szpikowej inhibitorami kinaz tyrozynowych	28
1.10.1 Mesylan imatinibu	28
1.10.2 Inhibitory kinaz tyrozynowych drugiej generacji	30
1.10.2.1 Dazatynib.....	30
1.10.2.1 Nilotynib.....	31
1.10.3 Inne leki stosowane w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej	32
1.11 Badania nad odstawieniem leczenia inhibitorami kinaz tyrozynowych	33
1.12 Oporność na leczenie inhibitorami kinaz tyrozynowych.....	34
1.12.1 Warianty sekwencji aminokwasów w domenie kinazowej <i>BCR-ABL1</i>	35
1.13 Laboratoryjne badania genetyczne w diagnostyce i monitorowaniu przewlekłej białaczki szpikowej	36
1.13.1 Cytogenetyka klasyczna	36
1.13.2 Fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> (FISH)	37
1.13.3 Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)	38

1.14	Kryteria odpowiedzi cytogenetycznej i molekularnej na leczenie inhibitorami kinaz tyrozynowych	40
2.	ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	42
3.	MATERIAŁ	43
3.1	Grupa badana	43
3.2	Materiał do badań	44
3.3	Odczynniki i aparatura badawcza	45
4.	METODY	48
4.1	Cytogenetyka klasyczna	48
4.1.1	Hodowle komórkowe	48
4.1.2	Barwienie prążkowe chromosomów	49
4.1.2.1	Uzyskiwanie prążków G	49
4.1.2.2	Uzyskiwanie prążków C	50
4.2	Cytogenetyka molekularna - fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> (FISH)	50
4.3	Przygotowanie materiału do badań molekularnych	51
4.3.1	Izolacja komórek jądrazstych krwi obwodowej	51
4.3.2	Izolacja RNA	52
4.3.3	Ocena ilościowa i jakościowa RNA	52
4.3.4	Odwrotna transkrypcja	53
4.4	Ocena jakościowa onkogenu <i>BCR-ABL1</i> metodą RT-PCR	54
4.5	Ocena ilościowa transkryptu <i>BCR-ABL1</i>	55
4.5.1	Ocena ilościowa transkryptu <i>BCR-ABL1</i> metodą RQ-PCR	55
4.5.2	Ocena transkryptu <i>BCR-ABL1</i> metodą nested PCR	57
4.6	Badanie wariantów sekwencji domeny kinazowej <i>BCR-ABL1</i> metodą sekwencjonowania	59
4.7	Kryteria podziału i klasyfikacji pacjentów do porównywanych grup	63
4.8	Analiza statystyczna uzyskanych wyników	63
5.	WYNIKI	64
5.1	Klasyczna translokacja t(9;22)(q34;q11.2)	64
5.2	Translokacje wariantowe	66

5.3	Pacjenci z karyotypem Philadelphia-ujemnym/ <i>BCR-ABL1</i> -dodatnim oraz z zamaskowanym chromosomem Philadelphia	79
5.3.1	Insercja genu <i>BCR</i> w locus genu <i>ABL1</i>	81
5.3.2	Insercja genu <i>ABL1</i> w locus genu <i>BCR</i>	83
5.3.3	Zamaskowany chromosom Philadelphia przez inną aberrację	85
5.4	Delecja w obrębie chromosomów pochodnych der(9)t(9;22) lub der(22)t(9;22)	89
5.5	Dodatkowe aberracje chromosomowe w komórkach Philadelphia-dodatnich	100
5.5.1	Porównanie grupy pacjentów z obecnością i bez ACA/Ph+ w karyotypie.....	108
5.5.2	Porównanie grupy pacjentów z ACA/Ph+ stwierdzonymi w chwili rozpoznania choroby i w trakcie monitorowania terapii	112
5.5.3	Porównanie grupy pacjentów z ACA/Ph+ występującymi w formie izolowanej, w różnych klonach komórkowych oraz w formie karyotypu złożonego	115
5.5.4	Porównanie grupy pacjentów z ACA/Ph+ typu „major routes” z grupą pacjentów z ACA/Ph+ typu „minor routes” oraz z jednoczesnym występowaniem ACA/Ph+ typu „major i minor routes”	118
5.5.5	Porównanie grup pacjentów z wybranymi ACA/Ph+	121
5.5.6	Porównanie pacjentów z ACA/Ph+ należących do różnych grup ryzyka cytogenetycznego.....	124
5.6	Warianty sekwencji domeny kinazowej <i>BCR-ABL1</i>	132
5.7	Aberracje chromosomowe w komórkach Philadelphia-ujemnych	136
6.	DYSKUSJA	143
7.	WNIOSKI	163
8.	STRESZCZENIE	165
9.	SUMMARY	168
10.	PIŚMIENNICTWO	170
11.	SUPLEMENT	189

1. WPROWADZENIE

1.1 Nowotwory mieloproliferacyjne

Nowotwór mieloproliferacyjny to klonalna choroba komórek macierzystych szpiku charakteryzująca się proliferacją jednej lub więcej linii krwiotworzenia: granulocytowej, czerwonokrwinkowej, megakariocytowej lub komórek tucznych. Nowotwory te mogą pochodzić z komórki macierzystej już ukierunkowanej w kierunku linii mieloidalnej [1] [2]. Częściej jednak komórka macierzysta dotknięta procesem kancerogenezy jest multipotencjalna i jeszcze nie ukierunkowana: w tych przypadkach fenotyp nowotworu jest szpikowy, nawet jeśli w jego przebiegu mogą pojawić się cechy charakterystyczne dla linii limfoidalnej [3]. Zespoły mieloproliferacyjne mogą przebiegać w sposób ostry, podostry i przewlekły; w zależności od przebiegu i czasu trwania.

1.2 Przewlekła białaczka szpikowa

Przewlekła białaczka szpikowa (*ang. Chronic Myeloid Leukemia, CML*) została uznana za modelowy rodzaj nowotworu, w którym w pełni zastosowano założenia klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia (*ang. World Health Organization, WHO*) [4]. Jest ona rozpoznawana na podstawie obrazu klinicznego, wyników badań laboratoryjnych i cech morfologicznych komórek krwi i szpiku kostnego, natomiast jej patogenezą związana jest z specyficznym zaburzeniem genetycznym - obecnością chromosomu Philadelphia (Ph) powstałego na skutek pierwotnej aberracji chromosomowej - translokacji zrównoważonej pomiędzy długimi ramionami chromosomu 9 i 22 $t(9;22)(q34;q11.2)$, co prowadzi do powstania genu fuzyjnego *BCR-ABL1*. Choroba charakteryzuje się zwiększoną ekspansją klonalnej linii granulocytowej z możliwą transformacją do ostrej białaczki.

1.2.1 Charakterystyka kliniczno-laboratoryjna

Przebieg kliniczny przewlekłej białaczki szpikowej składa się z trzech faz: fazy przewlekłej, fazy akceleracji i fazy przełomu blastycznego. W fazie przewlekłej, która u osób nieleczonych trwa od trzech do pięciu lat, następuje klonalna ekspansja populacji komórek białaczkowych, która wciąż może się normalnie różnicować. W miarę postępu choroby komórka białaczkowa traci zdolność dojrzewania. W fazie akceleracji pacjenci

wykazują oznaki progresji: postępującą niedokrwistość, zmniejszenie lub zwiększenie liczby płytek krwi, leukocytozę ze zmianami jakościowymi leukocytów ze względu na wzrost liczby prekursorów granulocytopoezy (Tabela 1). Podczas biopsji szpik kostny może wykazywać oznaki zwłóknienia i zwiększonej agregacji blastów. Mogą pojawić się objawy kliniczne, takie jak astenia, gorączka, utrata masy ciała, obfite nocne poty, ból kości i mięśni.

Tabela 1. Kryteria rozpoznania fazy akceleracji i kryzy blastycznej przewlekłej białaczki szpikowej (wg WHO 2016, z modyfikacjami).

Kryteria rozpoznania fazy akceleracji (konieczna obecność przynajmniej jednego objawu)
- Kryteria hematologiczne/cytogenetyczne • utrzymująca się lub narastająca leukocytoza (powyżej $10 \times 10^9/L$) oporna na leczenie • utrzymująca się lub narastająca splenomegalia oporna na leczenie • odsetek blastów 10-19% we krwi obwodowej lub/i w szpiku kostnym • bazofilia $\geq 20\%$ we krwi obwodowej • małopłytkowość $< 100\,000/ml$ niezwiązana z leczeniem • nadpłytkowość $> 1\,000\,000/ml$ oporna na leczenie • klonalna ewolucja cytogenetyczna (dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie Ph-dodatnim) • postępujące włóknienie szpiku - Odpowiedź na terapię inhibitorami kinazy tyrozynowej (ang. <i>tyrosine kinase inhibitors</i>, TKI) • oporność hematologiczna (lub nieosiągnięcie pełnej odpowiedzi hematologicznej) podczas terapii pierwszej linii TKI • hematologiczne, cytogenetyczne lub molekularne wykładniki oporności podczas terapii dwóch linii TKI • występowanie dwóch lub więcej mutacji w genie fuzyjnym <i>BCR-ABL1</i> podczas terapii TKI
Kryteria rozpoznania kryzy blastycznej (konieczna obecność przynajmniej jednego objawu)
• odsetek blastów we krwi obwodowej lub szpiku $\geq 20\%$ • pozaszpikowe nacieki białaczkowe • duże skupiska blastów w trepanobiopsji

W momencie, gdy odsetek blastów w krążeniu jest wyższy niż 20%, choroba przybiera obraz ostrego nowotworu mieloproliferacyjnego. Następuje akumulacja transformowanych komórek, będących we wczesnym stadium różnicowania. Ta faza jest znana jako faza przełomu blastycznego bądź kryzy blastycznej.

W 1/3 przypadków blasty mają morfologię limfoidalną i wyrażają na powierzchni typowe markery limfoidalne, takie jak CD10. W 2/3 przypadków blasty mają fenotyp podobny do ostrej białaczki szpikowej i tworzą heterogenną grupę [4]. CML jest chorobą rzadką z częstością występowania 1-1,5 przypadków na 100 000 mieszkańców rocznie.

Szczytowa zapadalność występuje między piątą a szóstą dekadą życia, przy stosunku mężczyzn do kobiet wynoszącym 1,4:1. Rzadko występuje u dzieci.

U około 30% pacjentów rozpoznanie stawiane jest przypadkowo, często w trakcie badań kontrolnych zleconych przez lekarza podstawowej opieki zdrowotnej. Rozpoznanie w 85% pacjentów następuje w fazie przewlekłej choroby.

Objawy, o ile występują, są ogólne i skromne. Można je podzielić na dwie grupy:

- zależne od ekspansji granulocytów i masy płytek krwi, prawie wyłącznie związane ze wzrostem objętości śledziony;
- ogólne: astenia, utrata masy ciała, gorączka, ból kości i mięśni, obfite nocne poty.

Objawy kliniczne choroby, w badaniu fizykalnym, są rzadkie, mogą dotyczyć powiększenia śledziony (zauważalnego w 40% przypadków) z powodu metaplastji mieloidalnej narządu. Znaczna hepatomegalia występuje w mniej niż 10% przypadków.

Ocena morfologii krwi obwodowej ma zasadnicze znaczenie przy podejrzeniu przewlekłej białaczki szpikowej. Stwierdza się leukocytozę, zmienną od kilku tysięcy leukocytów na mm^3 do setek tysięcy, charakteryzującą się obecnością całego szeregu komórek linii granulocytarnej, w rosnącej proporcji od mieloblasta do dojrzałego granulocyta. Liczba płytek krwi w 2/3 przypadków jest prawidłowa, zwiększona w 1/3 przypadków. Łagodna niedokrwistość występuje w 1/3 przypadków; w zaznaczonej formie w 10% przypadków. Badanie cytologiczne (w przypadku aspiratu) i histologiczne (biopsja) szpiku kostnego wykazuje obraz znacznej hiperkomórkowości z hiperplazją wszystkich komórek granulopoezy oraz w wielu przypadkach, również megakariocytopenią. Powyższe wskaźniki badań laboratoryjnych, chociaż stosunkowo charakterystyczne, nigdy nie są absolutnie diagnostyczne. Rozpoznanie musi obligatoryjnie obejmować wykazanie obecności swoistej aberracji chromosomowej – zrównoważonej translokacji wzajemnej $t(9;22)$ i/lub zmiany molekularnej (genu fuzyjnego *BCR-ABL1*), charakterystycznych dla przewlekłej białaczki szpikowej. Natomiast czynniki kliniczno-hematologiczne (wiek, wielkość śledziony, liczba płytek krwi i odsetek blastów, bazofili czy eozynofili we krwi obwodowej) są pomocne do obliczenia względnego ryzyka i oczekiwanej długości życia pacjenta, zgodnie z formułą opracowaną przez Sokala, Hasforda (Euro), EUTOS oraz ELTS [5], [6], [7].

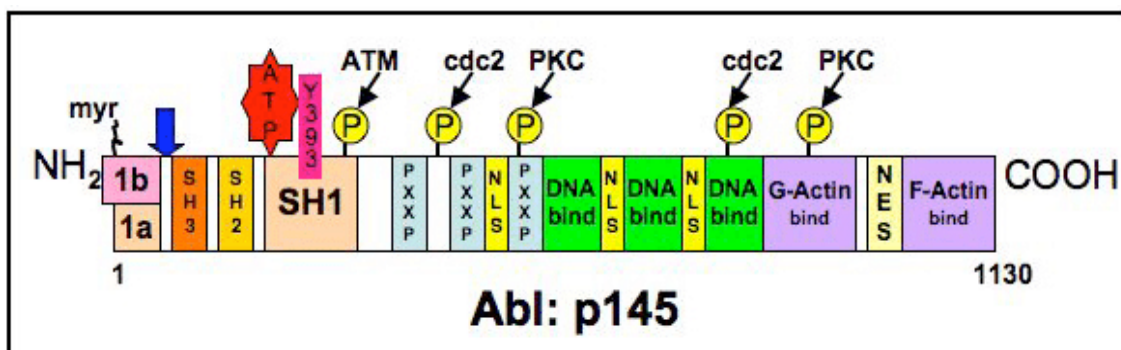
1.3 Patogeneza przewlekłej białaczki szpikowej

Wiodącą rolę w patogenezie przewlekłej białaczki szpikowej odgrywa białko BCR-ABL1. W celu zrozumienia mechanizmów, w których bierze udział produkt genu fuzyjnego *BCR-ABL1* ważne jest poznanie biologicznych funkcji genów zaangażowanych w translokację t(9;22)(q34;q11.2): *ABL1* i *BCR* [8].

Gen *ABL1* składa się z 12 eksonów i wielkością obejmuje 230 kpz. Zlokalizowany jest w regionie q34 chromosomu 9. Transkrypcja tego genu jest przeprowadzana za pomocą alternatywnego splicingu, której końcowym produktem jest mRNA o długości 6 lub 7 kpz, posiadające ekson 1a lub ekson 1b i mające wspólne wszystkie pozostałe eksony o numerach od 2 do 11. Gen koduje niereceptorową kinazę tyrozynową o słabej aktywności enzymatycznej o masie cząsteczkowej 145 kDa (p145), pełniącą ważne funkcje w regulacji cyklu komórkowego i transdukcji niektórych sygnałów, w których pośredniczą integriny (Rycina 1).

Gdy region N-końcowy białka jest kodowany przez ekson 1a, białko znajduje się w jądrze komórkowym, natomiast gdy jest kodowane przez ekson 1b, reszta glicynowa znajdująca się na końcu wiąże się z cząsteczką kwasu mirystynowego, który ma właściwości hydrofobowe, co pozwala białku zakotwiczyć się w błonie plazmatycznej.

Aktywna form białka ABL1 p145 poprzez wiązanie TP53 w obrębie jądra komórkowego ma właściwości proapoptotyczne oraz indukuje blok proliferacyjny w fazie G1/S, na poziomie którego następuje naprawa jakiegokolwiek uszkodzenia DNA [9].

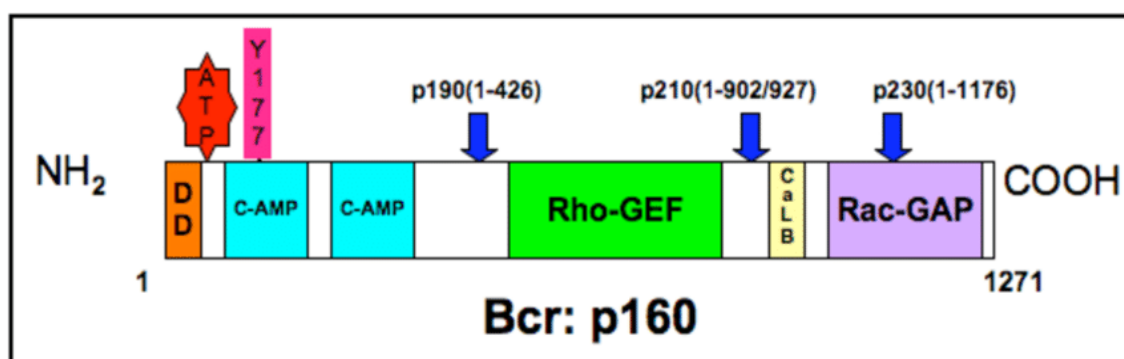


Rycina 1. Schemat budowy ludzkiego białka p145 ABL1 z zaznaczonymi domenami funkcyjnymi oraz miejscem pęknięcia genu oznaczonym niebieską strzałką, prowadzącym do powstania onkogennej kinazy BCR-ABL1 (zmodyfikowano wg Deininger i wsp. 2000; Kurzrock i wsp. 2003).

Gen *BCR* obejmuje długością 130 kpz, zlokalizowany jest w regionie q11.2 chromosomu 22. Składa się z 23 eksonów i jest transkrybowany na dwa mRNA o długości 4,5 kpz i 7 kpz, z których powstają białka o wielkości odpowiednio 130 kDa (p130) i 160 kDa (p160) [10]. Izoforma p130 powstaje w wyniku pominięcia eksonu 16.

Białko BCR jest kinazą serynowo-treoninową (Rycina 2), której ekspresja, podobnie jak białka ABL1, w komórkach hematopoetycznych linii granulocytarnej zachodzi głównie na wczesnych etapach różnicowania komórek (mieloblasty, promielocyty) i zmniejsza się znacząco wraz z różnicowaniem komórek [11]. Białko BCR bierze udział w przekazywaniu sygnału w komórkach - zarówno przez fosforylację, jak i wiązanie guanozynotrifosforanu (GTP). Pośredniczy także w procesach naprawy uszkodzeń DNA [12].

Białko p160 jest zlokalizowane wyłącznie w cytoplazmie, może modyfikować własną konformację sferyczną poprzez wiązanie z GTP/GDP i jest zdolne do tworzenia homotetramerów *in vitro* [13].



Rycina 2. Schemat budowy ludzkiego białka p160 BCR z zaznaczonymi domenami funkcyjnymi oraz miejscami pęknięcia genu oznaczonymi strzałkami, prowadzącymi do powstania onkogennej kinazy BCR-ABL1 (zmodyfikowano wg Deininger i wsp. 2000; Kurzrock i wsp. 2003).

Tworzenie białka hybrydowego p210 BCR-ABL1 prowadzi do strukturalnej zmiany niektórych miejsc regulatorowych normalnych białek ABL1 i BCR [14]–[19] [20]:

- aktywność kinazy tyrozynowej ABL1, zwykle obecna przede wszystkim na poziomie jądrowym, jest głównie przeniesiona do cytoplazmy i konstytutywnie aktywowana, zarówno ze względu na utratę działania hamującego domeny SH3, jak i poprzez oligomeryzację, w której pośredniczy domena N-końcowa BCR, co powoduje autofosforylację;

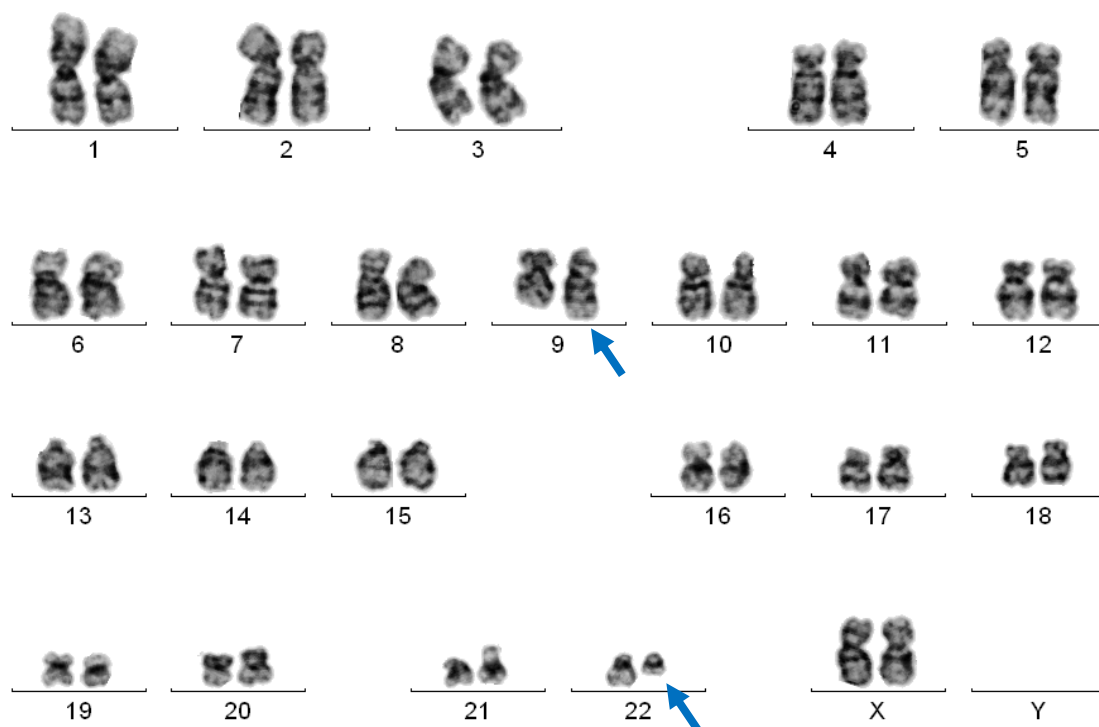
- przestrzenna zmiana konfiguracji w obrębie niektórych domen BCR powoduje dostępność dla wiązania z białkami, które aktywują różne szlaki transdukcji sygnału obejmujące białka RAS, STAT, JAK-1, JUN, MYC i kinazę PIP3;
- znacznie zwiększa powinowactwo C-końcowej domeny ABL1 dla f-aktyny, w porównaniu do p145 ABL1.

Powyższe zmiany powodują, że białko p210 BCR-ABL1 ma wysoką aktywność kinazy tyrozynowej, która odgrywa główną rolę w procesie białaczkowym, ponieważ jest zdolna do wprost nieograniczonej hematopoezy komórek Ph-dodatnich i indukowania progresji choroby poprzez cztery główne mechanizmy (Rycina 3):

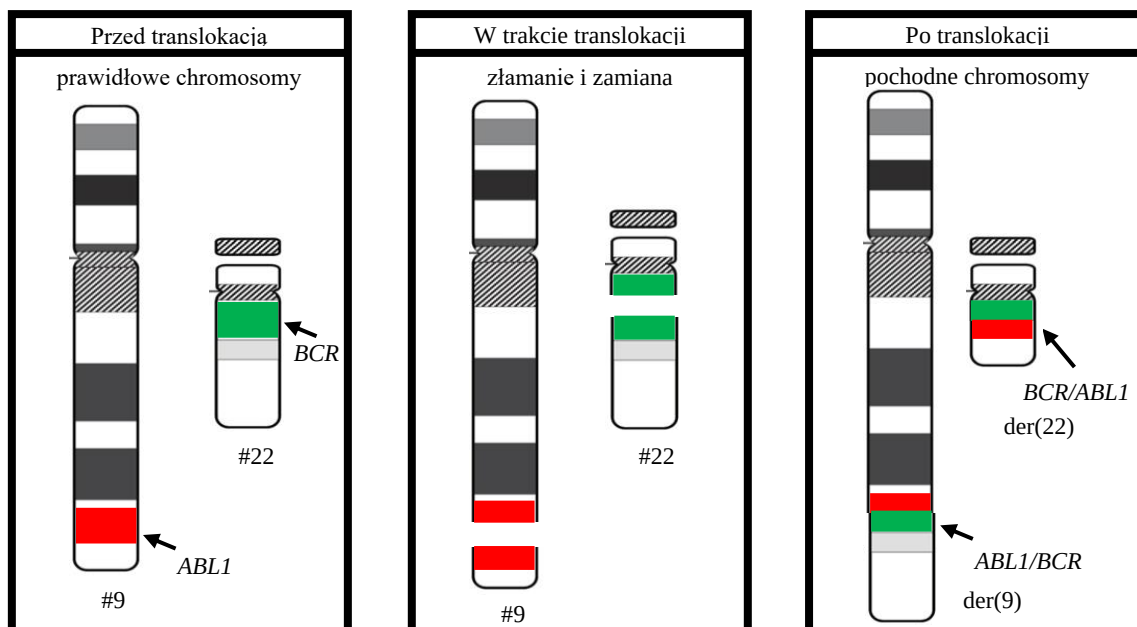
- Modyfikowanie zdolności adhezyjnej mieloidalnych komórek progenitorowych do zrębu szpiku kostnego, wraz ze zwiększonym ich uwalnianiem we krwi obwodowej oraz utrata kontroli proliferacyjnej. Komórki Ph-dodatnie wykazują rozregulowanie transdukcji sygnału za pośrednictwem układu integryny i charakteryzują się hiperfosforylacją CRKL, białka uczestniczącego w procesach adhezji poprzez powiązanie z innymi czynnikami;
- Aktywację sygnałów mitogennych - dwa systemy transdukcji sygnału, RAS i JAK-STAT, zaangażowane zarówno bezpośrednio, poprzez ich fosforylację, jak i pośrednio, poprzez fosforylację substratów pośrednich, uniezależniają komórkę nowotworową od czynników wzrostu;
- Niestabilność genomową - zwiększona proliferacja zachodzi kosztem fazy G0/G1 i prawdopodobnie prowadzi do zniesienia punktu kontrolnego G1/S, co jest kluczowe dla naprawy uszkodzeń DNA przed replikacją genomu. Może to sprzyjać nabywaniu dalszych nieprawidłowości genetycznych, które wydają się odgrywać ważną rolę w progresji choroby do fazy akceleracji bądź kryzy blastycznej;
- Hamowanie apoptozy poprzez aktywację niektórych szlaków transdukcji sygnału, w tym RAS, JAK-STAT i BCL-2. Komórki pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową wykazują zwiększoną ekspresję licznych cząsteczek antyapoptotycznych, które mogą przyczyniać się do zwiększenia przeżywalności komórek białaczkowych, takich jak białka z rodziny Bcl-2 (Bcl-XL, Bcl-1, Bcl-2). Białka rodziny Bcl-2 regulują między innymi

1.4 Chromosom Philadelphia

15



Rycina 4. Kariogram pacjentki z przewlekłą białaczką szpikową z translokacją swoistą $t(9;22)(q34;q11.2)$. Strzałkami zaznaczono chromosomy pochodne zaangażowane w aberrację: $der(9)t(9;22)$ i chromosom Ph - $der(22)t(9;22)$ (źródło: opracowanie własne; zdjęcie wykonane w Pracowni Cytogenetyki Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej).

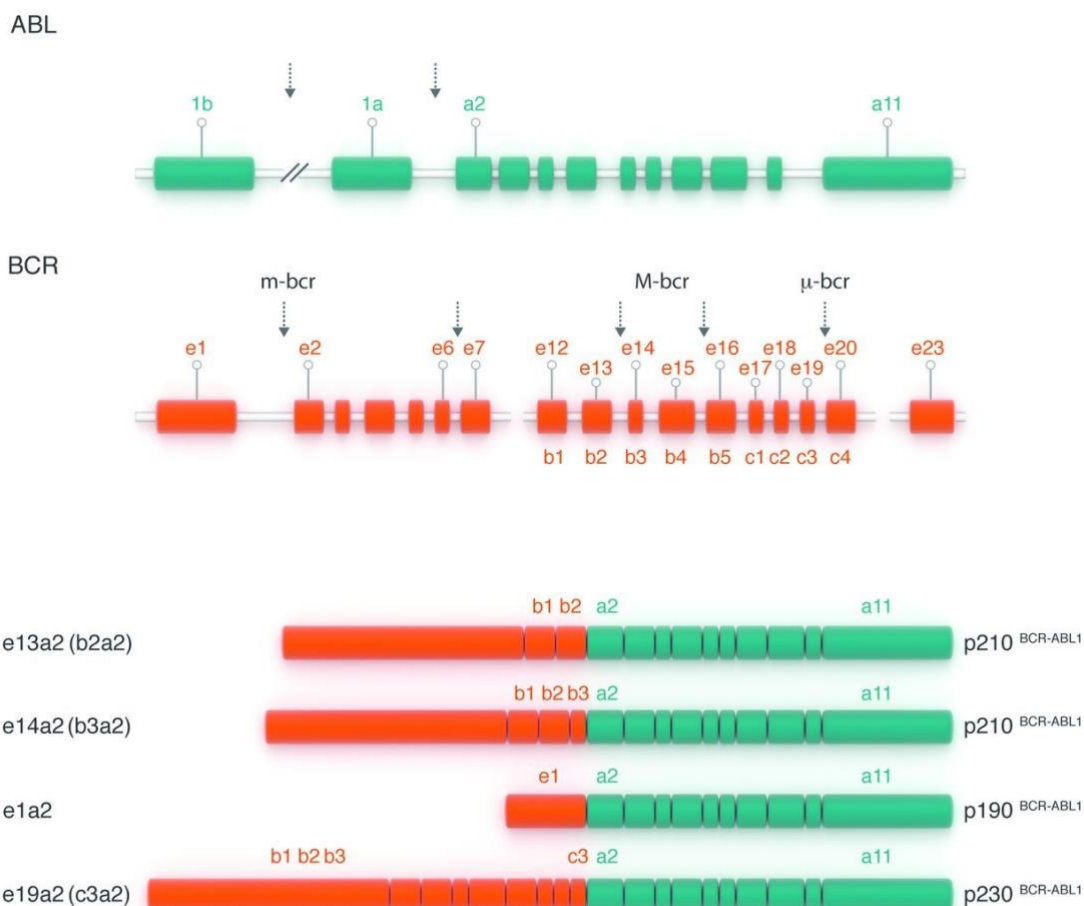


Rycina 5. Schemat przebiegu translokacji pomiędzy fragmentem długiego ramienia chromosomu pary 9 i długiego ramienia chromosomu pary 22. Rezultatem aberracji jest gen fuzyjny na $der(22)$ odpowiedzialny za powstanie kinazy BCR-ABL1 (źródło: opracowanie własne).

ABL1 jest także nie-receptorową kinazą tyrozynową. Fizjologicznie zlokalizowaną zarówno w jądrze komórkowym i w cytoplazmie. W białku hybrydowym BCR-ABL1, ABL1 traci jedną z kluczowych funkcji, która polega na uczestniczeniu w naprawie uszkodzeń DNA w wyniku stresu genotoksycznego. Wpływa to na zwiększoną niestabilność genomową, która jest podstawą gromadzenia się mutacji i dodatkowych zmian chromosomowych. Klinicznie wiąże się to z progresją choroby z fazy przewlekłej do przełomu blastycznego. Pęknięcia w regionie q34 chromosomu 9 zostały zlokalizowane w obrębie genu *ABL1* na dużym obszarze sekwencji intronowej, ponad 300 kpz w obrębie końca 5'. Pęknięcie może powstać bliżej końca 5' względem pierwszego alternatywnego eksonu 1b, w kierunku 3' względem alternatywnego eksonu 1a lub między tymi eksonami [14], [23]. Pęknięcie na chromosomie 22 następuje w obrębie genu *BCR*, składającego się z 23 eksonów: 11 eksonów w tzw. regionie m-bcr, 5 eksonów w tzw. regionie M-bcr (pierwotnie oznaczane były od b1 do b5, obecnie od e12 do e16) oraz 7 eksonów w tzw. regionie μ -bcr. Niezależnie jednak od dokładnego miejsca pęknięcia genu *ABL1* składanie fuzyjnego transkryptu prowadzi do powstania cząsteczki mRNA, w której sekwencja *BCR* jest połączona z drugim eksonem (a2) *ABL1*. Fuzyjne białka BCR-ABL1 charakteryzują się więc takim samym fragmentem pochodzącym z genu *ABL1* (Rycina 6).

Różnice w ich wielkości wynikają z różnych miejsc pęknięcia w genie *BCR*, powodując powstawanie co najmniej trzech różnych genów fuzyjnych kodujących białka o różnej masie cząsteczkowej, które są związane z trzema różnymi postaciami białaczki:

- p210: punkty pęknięcia zwykle występują między eksonami e13 (b2) i e14 (b3) lub między eksonami e14 (b3) i e15 (b4) (M-bcr, *ang. major breakpoint cluster region*, o wielkości około 5,8 kpz), występujące u ponad 90% pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową;
- p190: punkty pęknięcia w pierwszym intronie genu *BCR* między eksonami e1 i e2 (m-bcr, *ang. minor breakpoint cluster region*), związane z 20-30% ostrych białaczek limfoblastycznych;
- p230: punkty pęknięcia występują między eksonem e19 a e20 (μ -bcr, *ang. micro breakpoint cluster region*) w miejscu bardziej proksymalnie do centromeru w porównaniu z M-bcr), kojarzone z podgrupą pacjentów chorujących na przewlekłą białaczkę neutrofilową.



Rycina 6. Schemat przedstawiający miejsca pęknięcia w obrębie genów *BCR* oraz *ABL1* prowadzące do powstania transkryptów kodujących różne warianty kinazy (źródło: Mughal i wsp. 2016).

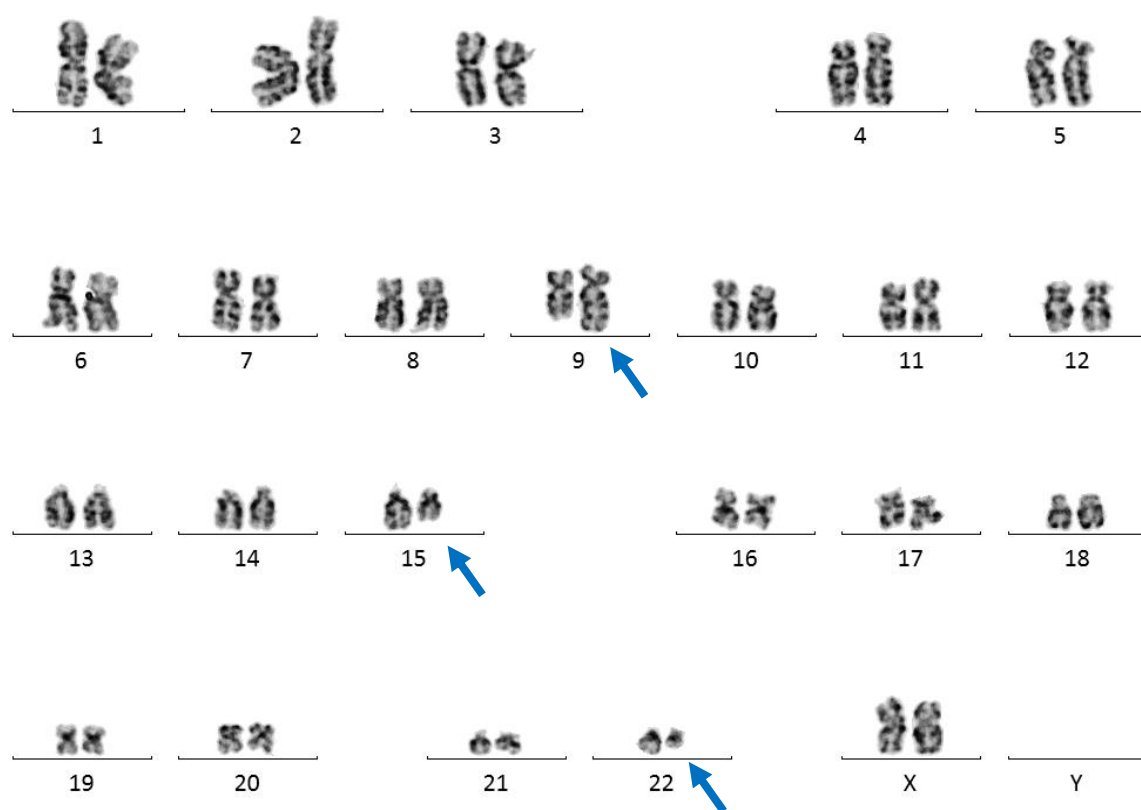
Wykazano, że zwiększenie długości części BCR w białku fuzyjnym związane jest ze spadkiem aktywności kinazy tyrozynowej ABL1: w konsekwencji p230 wykazuje niższą aktywność kinazy tyrozynowej w porównaniu z białkiem p210 i p190, a z kolei białko p210 ma aktywność niższą niż p190. Punkty złamania w *BCR*, które determinują powstanie białka p190, mogą występować preferencyjnie w niedojrzałych limfocytach B, podczas gdy złamania determinujące powstanie białka p210 występują w komórkach macierzystych [8].

Chromosom Philadelphia występuje w 95% przypadków CML w chwili rozpoznania. Ponadto występuje u 5% dzieci i u 15-30% dorosłych z ALL oraz u 2% pacjentów z AML. W około 5% przypadków w analizie metodami cytogenetyki klasycznej, nie stwierdza się chromosomu Ph, rearanżacja *BCR-ABL1* jest identyfikowana za pomocą technik FISH i/lub biologii molekularnej. W takich przypadkach, przewlekła białaczka szpikowa Ph-ujemna może powstawać na skutek bardziej złożonych mechanizmów np. insercji. Mechanizmy promujące translokację nie

zostały wyjaśnione. Jedna z proponowanych hipotez wskazuje na obecność wrażliwych miejsc w punktach pękania DNA. Zgodnie z inną hipotezą, rekombinacji niehomologicznej mogłoby sprzyjać przestrzenne rozmieszczenie chromosomów 9 i 22 wraz z bliską lokalizacją genów *ABL1* i *BCR* podczas podziału komórkowego przed etapem metafazy [24], [25].

1.5 Translokacje wariantowe t(9;22;V)

Chromosom Philadelphia [der(22)t(9;22)(q34;q11.2)] jest obserwowany u ponad 90% pacjentów z rozpoznaniem przewlekłej białaczki szpikowej. Powstaje on w wyniku wzajemnej translokacji z udziałem ramion długich chromosomów pary 9 i 22. Natomiast w 5 – 10% przypadków chromosom Ph powstaje na skutek translokacji wariantowych - oprócz chromosomów 9 i 22, w translokację zaangażowany może być jeden lub więcej chromosomów. Najczęściej opisuje się translokacje wariantowe, w które zaangażowane są trzy chromosomy (Rycina 7) [27, 28].



Rycina 7. Kariogram prezentujący translokację wariantową 46,XX,t(9;22;15)(q34;q11.2;q15). Strzałkami zaznaczono chromosomy pochodne zaangażowane w aberrację (źródło: opracowanie własne; zdjęcie wykonano w Pracowni Cytogenetyki Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej).

Zdarzają się jednak przypadki z czterema lub pięcioma zaangażowanymi chromosomami [28].

Początkowo rozpoznano dwie formy translokacji wariantowych:

- proste: fragment ramienia q chromosomu 22 ulega translokacji na chromosom inny niż chromosom 9, który nie jest zaangażowany w translokację;
- złożone: oprócz chromosomów 9 i 22 zaangażowane są inne chromosomy (od jednego do trzech chromosomów).

Uważano, że proste translokacje wariantowe nie obejmują chromosomu 9, ponieważ podczas konwencjonalnej analizy cytogenetycznej przy rozdzielczości 300-400 prążków na haploidalny zestaw chromosomów, chromosomy pary 9 nie wykazywały zmian w analizie prążkowej w stosunku do prawidłowego wzoru prążkowego. Dopiero wykorzystanie technik cytogenetyki molekularnej potwierdziło bardziej złożone przegrupowanie stwierdzane w tych przypadkach [26], [27]. Fakt ten związany był z zaangażowaniem małych fragmentów innych chromosomów, które były trudne do detekcji przy rozdzielczości metody klasycznej. Analiza fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (ang. *fluorescence in situ hybridization*, FISH) pozwoliła na bardziej szczegółową analizę i scharakteryzowanie wariantów translokacji. Literatura wskazuje, że wszystkie chromosomy mogą brać udział w translokacji wariantowej, natomiast częściej obserwuje się zaangażowanie następujących regionów: 1p36, 3p21, 5q13, 6p21, 9q22, 11q13, 12p13, 17p13, 19q21, 17q25, 19q13, 21q22, 22q12 i 22q13 [26].

Ponadto zaproponowano dwa rodzaje mechanizmów powstania translokacji wariantowych prezentujące odmienne rearanżacje w badaniu FISH, co pozwala na ich identyfikację [28], [29], [30]:

- mechanizm 1-stopniowy: złamania chromosomów następują jednocześnie i do wzajemnej translokacji (najczęściej w obrębie trzech-czterech chromosomów) dochodzi w tym samym czasie (mechanizm najczęściej występujący);
- mechanizm 2-stopniowy: zakłada początkowe powstanie klasycznej translokacji t(9;22), a następnie przeniesienie stranslokowanego fragmentu na inny chromosom.

Innymi ważnymi zmianami, które mogą współwystępować z translokacjami wariantowymi i mogą decydować o odpowiedzi na leczenie są delecje wykrywane techniką FISH w obrębie *ABL1* lub/i *BCR* oraz klonalne aberracje chromosomowe.

Rokowanie pacjentów z translokacją wariantową t(9;22,V) było przedmiotem licznych badań. Część badań sugeruje, że pacjenci z tego typu aberracjami mają gorsze rokowanie niż pacjenci z klasyczną translokacją wzajemną, prawdopodobnie ze względu na liczne złamania chromosomów konieczne do utworzenia translokacji wariantowej, co wskazywałoby na większą łamliwość chromosomów i niestabilność genetyczną [31], [32]. Wraz z wprowadzeniem imatynibu w pierwszej linii leczenia CML, badania wskazywały, że pacjenci z translokacjami wariantowymi nie wykazywali znacząco odmiennego rokowania niż pacjenci z klasyczną translokacją wzajemną, pod względem uzyskiwanych odpowiedzi cytogenetycznych, molekularnych i krzywych przeżycia [33], [34]. W oparciu o dane literaturowe opisujące rearanżacje chromosomowe różnych translokacji wariantowych, czas przeżycia pacjentów może być wynikiem zaangażowania onkogenów lub genów supresji nowotworowej, które mogą pogarszać rokowanie, a także genów, które nie są kluczowe dla proliferacji komórek. Z drugiej strony może również dojść do złamań w chromosomach bez naruszenia integralności sekwencji kodujących. Z tego też powodu pacjenci z translokacjami wariantowymi mogą prezentować zaburzenia genomowe związane ze złym rokowaniem wraz ze zmianami, które rokują dobrze. Ostatecznie określa się rokowanie w tej grupie pacjentów na równi z rokowaniem pacjentów z translokacją t(9;22). Powyższe stwierdzenie ma odzwierciedlenie w aktualnych rekomendacjach Europejskiej Sieci LeukemiaNet (ang. *European LeukemiaNet*, ELN) w których postępowanie z pacjentami z translokacjami wariantowymi jest identyczne jak z pacjentami z obecnością klasycznej translokacji t(9;22) w kariotypie [35], [36], [37].

1.6 Przewlekła białaczka szpikowa Philadelphia-ujemna/*BCR-ABL1*-dodatnia oraz zamaskowany chromosom Philadelphia

Niewielka część pacjentów (~5%) z przewlekłą białaczką szpikową wykazuje typową manifestację kliniczną choroby, jednak w kariotypie nie stwierdza się chromosomu Ph, przy jednoczesnej obecności rearanżacji *BCR-ABL1* w badaniach molekularnych (FISH, PCR w badaniu jakościowym i ilościowym) [38], [39], [40]. Tego typu przypadki określa się mianem przewlekłej białaczki szpikowej Ph-ujemnej *BCR-ABL1*-dodatniej. Rzadziej stwierdza się przypadki chromosomu Ph występującego w kariotypie, ale maskowanego inną aberracją chromosomową, tzw. maskowany Ph.

W przeciwieństwie do badania PCR, które pozwala na wykrycie i ilościową ocenę transkryptu, analiza FISH na metafazach pozwala również na lokalizację genu fuzyjnego. Gen fuzyjny *BCR-ABL1* występuje znacznie częściej na pochodnym chromosomie 22 – der(22) niż na pochodnym chromosomie 9 [39]-[47].

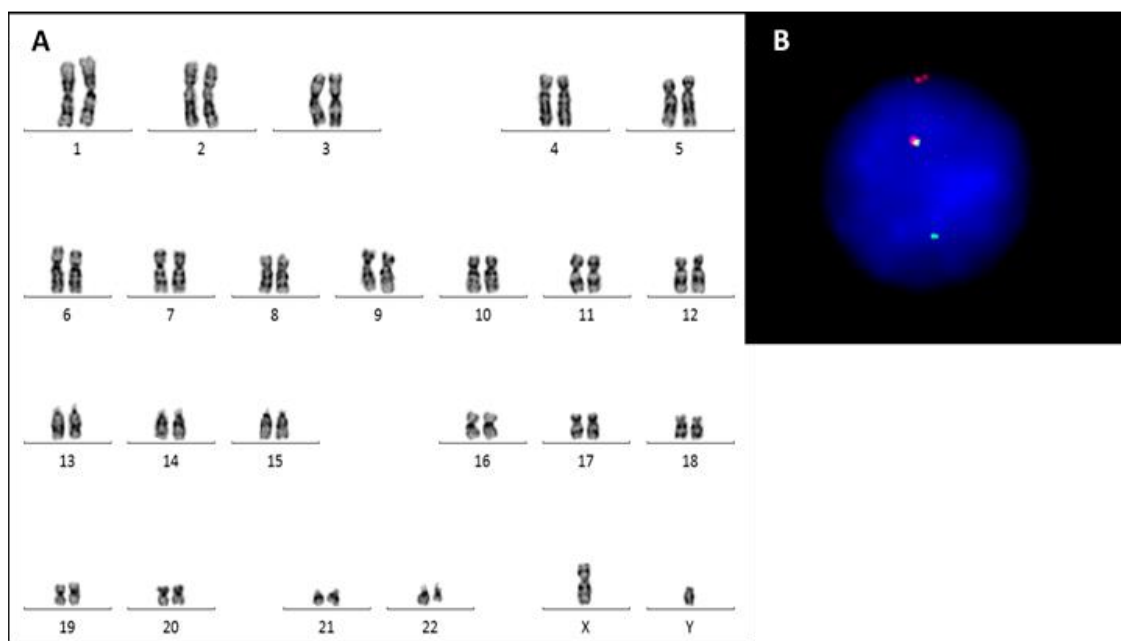
Zaproponowano mechanizmy wyjaśniające pojawianie się rearanżacji *BCR-ABL1* u pacjentów z karyotypem Ph-ujemnym. Jednym z nich jest jednostopniowa submikroskopowa insercja między chromosomami pary 9 i 22. Gen fuzyjny *BCR-ABL1* powstaje bez widocznej modyfikacji morfologii chromosomów, co tłumaczy prawidłowy karyotyp podczas analizy cytogenetycznej. Drugi mechanizm zachodzący dwuetapowo, w których po typowej translokacji t(9;22) następuje kolejna translokacja z innymi punktami złamań i tym samym dochodzi do maskowania wcześniej powstałego chromosomu Ph.

Część danych literaturowych wskazuje na standardowe ryzyko niepowodzenia terapii w odniesieniu do pacjentów z klasyczną translokacją t(9;22), podczas gdy inne przedstawiają gorsze rokowanie, szczególnie u pacjentów, u których gen fuzyjny był zlokalizowany na chromosomie 9 [38], [48], [49]. Większość opisywanych przypadków wykazywało szybki przebieg kliniczny choroby oraz oporność na konwencjonalną chemioterapię. Jednak większość tych doniesień pochodzi sprzed ery stosowania TKI. Natomiast obecnie publikacji opisujących tę grupę pacjentów jest niewiele, a wyniki leczenia przedstawiają się różnie [41]-[44], [50]-[52]. W największej analizie dostępnej w literaturze [53] porównano odpowiedź molekularną oraz wystąpienie zdarzeń niepożądanych w trakcie terapii nilotynibem u pacjentów Ph-ujemnych/*BCR-ABL1* dodatnich (n=28) i Ph-dodatnich/*BCR-ABL1* dodatnich (n=952). Niezależnie od rodzaju aberracji zaobserwowano zbliżone wyniki odpowiedzi molekularnej i podobny profil zdarzeń niepożądanych. Niestety badanie nie zawierało szczegółowych informacji o rodzaju rearanżacji u poszczególnych pacjentów Ph-ujemnych/*BCR-ABL1* dodatnich.

1.7 Delecja obejmująca *ABL1* lub/i *BCR* w obrębie chromosomów pochodnych

Wykrycie delecji obejmującej gen fuzyjny *ABL1/BCR* z pochodnego chromosomu pary 9 – der(9)t(9;22)(q34;q11.2) jest możliwe w rutynowym badaniu FISH, przy użyciu sondy D-BCR/*ABL1*, z równoległą analizą karyotypu. Submikroskopowa delecja obszaru fuzyjnego *ABL1/BCR* na zmienionym chromosomie 9 [der(9)] obserwowana jest, według danych literaturowych, u 10-30% chorych

z przewlekłą białaczką szpikową [54]. W jej wyniku dochodzi do utraty części materiału genetycznego, zawierającego fragmenty jednego lub obu genów zaangażowanych w fuzję, a także genu *ASS1*, zlokalizowanego proksymalnie do locus *ABL1* i/lub genu *IGLL1* przenoszonego z chromosomu 22 wraz z genem *BCR* [55]. Wielkość delecji bywa różna i może wahać się od 120 kpz do 8 Mpz, jednak najczęściej jej wielkość jest poniżej poziomu detekcji klasycznej analizy prążkowej. Najczęściej wykrywa się utratę całego genu fuzyjnego *ABL1/BCR* z der(9) (Rycina 8).



Rycina 8. Analiza cytogenetyczna pacjenta z przewlekłą białaczką szpikową: A) Kariogram prezentujący kariotyp: 46,XY,t(9;22)(q34;q11.2); B) Analiza FISH z sondą D-BCR/ABL1: sygnał fuzyjny – Y, sygnał żółty; *ABL1* – R, sygnał czerwony; *BCR* – G, sygnał zielony. Wynik: nietypowy wzór hybrydyzacji (1Y1R1G), obecna fuzja *BCR/ABL1* z równoczesną delecją *ABL1/BCR* (źródło: opracowanie własne; zdjęcia wykonano w Pracowni Cytogenetyki Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej).

Delecja obejmuje utratę sekwencji genomowej (~300 genów) obu chromosomów 9 i 22 z chromosomu pochodnego der(9) [56], [57]. Bardzo rzadko obserwowane są przypadki, gdzie następuje utrata dużych fragmentów chromosomu (powyżej 10 Mpz), co może być widoczne podczas analizy prążkowej chromosomów [58]. Poza delecjami na pochodnym chromosomie 9 zaobserwowano również delecje na chromosomie Ph, jednak były to małe delecje (8-10 kpz) nie mające znaczenia dla patogenezы choroby – utrata małych regionów intronowych zwykle nie wpływa na proces splicingu koniecznego do utworzenia mRNA, a w ostateczności białka.

Wykazano, że delecja w regionie fuzji *ABL1/BCR* powstaje równocześnie z zajściem translokacji t(9;22), a więc jest zmianą pierwotną [59].

Delecja taka nie pojawia się w trakcie progresji, a częstość jej występowania wydaje się nie zależeć od stadium choroby. Ekspresja *ABL1-BCR* nie wydaje się być czynnikiem rokowniczym, co również wykazano przez fakt, że obecność białka *ABL1-BCR* nigdy nie została wykryta.

Udowodniono, że obecność submikroskopowej delecji w regionie fuzji *ABL1/BCR* była niezależnym czynnikiem złego rokowania u pacjentów leczonym interferonem alfa [60]. Główny mechanizm molekularny wspierający niekorzystne rokowanie związany jest z utratą jednego lub większej liczby genów, szczególnie genów supresji nowotworowej [61]. Może to wiązać się ze zjawiskiem haploinsuficjencji, może przyczyniać się do późniejszej inaktywacji pozostałego, prawidłowego allelu danego genu, co finalnie może wywołać efekt rozwoju nowotworu. Jak wspomniano, usunięte regiony są bogate w geny kodujące: czynniki supresji nowotworu, czynniki transkrypcyjne, składniki szlaków transdukcji sygnału lub białka, które kontrolują cykl komórkowy. Ponadto delecja może być konsekwencją niestabilności genetycznej w czasie tworzenia chromosomu Ph. Zatem negatywne rokowanie odzwierciedlałoby predyspozycje do występowania dodatkowych zmian genetycznych w klonie komórek zmienionych nowotworowo [62], [63]. Zdecydowana większość doniesień literaturowych dowodzi zniesienia negatywnego czynnika prognostycznego w postaci delecji w erze stosowania TKI [35], [64]. Z drugiej strony, porównanie odpowiedzi cytogenetycznej, badanej technikami kariotypowania i FISH, pozwoliło na wykazanie częstszego występowania ewolucji kariotypu, w trakcie leczenia imatinibem, u pacjentów z delecją obszaru *ABL1/BCR* [65]. Mimo że submikroskopowa delecja w regionie fuzji *ABL1/BCR* nie wpływa bezpośrednio na uzyskanie remisji cytogenetycznej w początkowym okresie leczenia, to jednak koreluje z pojawianiem się progresji choroby lub/i oporności wtórnej [65]. Zagadnienie wpływu delecji na rezultat leczenia TKI jest nadal istotnym problemem.

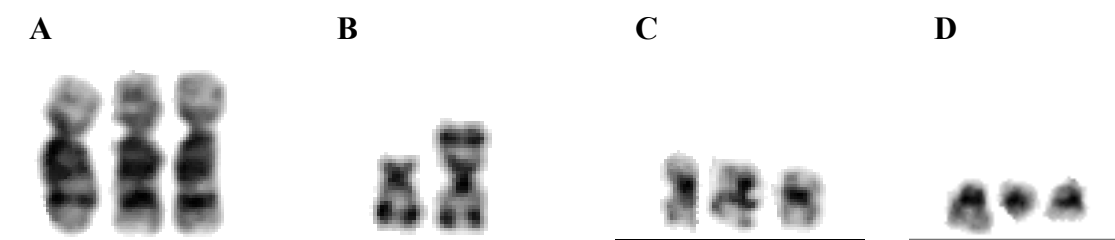
1.8 Dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie komórek Philadelphia-dodatnich

Translokacja wzajemna pomiędzy chromosomami pary 9 i 22 prowadząca do powstania fuzji genowej *BCR-ABL1* jest odpowiedzialna za patogenezę przewlekłej białaczki szpikowej. Jednakże dodatkowe aberracje chromosomowe w komórkach Philadelphia-dodatnich (*ang. Additional Chromosomal Abnormalities/Ph+*, *ACA/Ph+*),

zdefiniowane jako ewolucja klonalna kariotypu, często towarzyszą bądź poprzedzają progresję choroby z fazy przewlekłej poprzez fazę akceleracji do przełomu blastycznego.

W chwili rozpoznania u pacjentów z przewlekłą fazą CML częstość tych zmian wynosi ~5%, podczas gdy wzrasta w trakcie choroby, od 30% w fazie akceleracji do ponad 80% w fazie przełomu blastycznego [66]-[68]. Zjawisko to wydaje się odzwierciedlać niestabilność genomu komórek białaczkowych [69].

Liczne badania potwierdziły, że występowanie ACA/Ph⁺ nie jest losowe. Mitelman i wsp. zaproponował podział dodatkowych aberracji chromosomowych obserwowanych w komórkach Ph-dodatnich na dwie grupy z uwagi na częstość ich występowania [1], [70], [71]. Do pierwszej grupy, najczęściej obserwowanych zmian zaliczono: trisomię 8 (Rycina 9A), izochromosom 17 [i(17)(q10)] (Rycina 9B), trisomię 19 (Rycina 9C) oraz dodatkową kopię chromosomu Ph (Rycina 9D) i określano wspólnym mianem tzw. „major routes”.



Rycina 9. Częściowe kariogramy przedstawiające ACA/Ph⁺ zaliczane do tzw. „major routes”, powodujące niezrównoważenie kariotypu: A) trisomia 8; B) izochromosom długiego ramienia chromosomu pary 17 - występują 3 kopie ramienia q i 1 kopia ramienia p (delecja *TP53*); C) trisomia 19; D) dodatkowa kopia chromosomu Ph (źródło: opracowanie własne; zdjęcie wykonano w Pracowni Cytogenetyki Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej).

Inne, rzadziej występujące aberracje chromosomowe określono mianem tzw. "minor routes", zalicza się do nich: monosomię 7, monosomię 17, trisomię 17, trisomię 21, translokację t(3;21)(q26;q22) i utratę chromosomu Y u mężczyzn. Wpływ utraty chromosomu płci Y na rokowanie jest kontrowersyjny - część badaczy podtrzymuje niekorzystny wpływ na uzyskanie odpowiedzi optymalnej. Inni z kolei uważają aberrację za fizjologiczną, zależną od wieku chorego.

Czas pojawiania się tzw. „major routes” jest różny, jednak wskazuje się na preferencyjną kolejność pojawiania się anomalii chromosomowych począwszy od i(17)(q10), poprzez trisomię 8, dodatkowe Ph, skończywszy na trisomii 19. Wczesniejsze badania wykazały, że aberracje zaliczane do tzw. „minor routes” nie wiążą się z negatywnym wpływem na odpowiedź na leczenie TKI oraz niepomyślne rokowanie

[34]. Jednak przy obecnej wiedzy powyższy pogląd wydaje się być daleko idącym uproszczeniem, ponieważ grupa tych dodatkowych aberracji jest dość niejednorodna i obejmuje różnorodność zmian chromosomowych, których indywidualny wpływ prognostyczny jest trudny do analizy ze względu na ich względną rzadkość występowania. Wang i wsp. wykazał, że niektóre z tzw. „minor routes” (rearanżacja 11q23 i 3q26.2) wiążą się z opornością na TKI i złą prognozą [72], [73]. W związku z powyższym należy podkreślić, że obecnie stosowana klasyfikacja na tzw. „major routes” i „minor routes” oparta jest tylko o częstość występowania aberracji i nie odzwierciedla w sposób wiarygodny roli poszczególnych zmian chromosomowych na rokowanie pacjentów. Dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie Ph-dodatnim są klasyfikowane do różnych grup prognostycznych. Część z nich, tak jak translokacja t(3;21)(q26;q22) oraz powielenie Ph związane jest z negatywnym rokowaniem i szybszą progresją do przełomu blastycznego, podczas gdy inne, np. trisomia 8 są zaliczane do mniej niekorzystnych zmian [34], [67], [74], [75].

Z molekularnego punktu widzenia progresja jest częściej związana z nadmierną ekspresją *BCR-ABL1*, rearanżacją genu *MECOM* (3q26.2), zwiększoną aktywnością telomerazy oraz mutacjami genów supresorowych transformacji nowotworowej w tym *RB1*, *TP53* i *CDKN2A*.

Powszechne stosowanie TKI spowodowało znaczną poprawę w przeżyciu i rokowaniu u pacjentów z CML. Jednak stwierdzenie ACA/Ph+ wiąże się nadal z występowaniem oporności na zastosowane leczenie. Częstość stwierdzanych dodatkowych aberracji chromosomowych była inna przed erą stosowania TKI. U chorych po terapii busulfanem trisomię 8 obserwowano częściej niż w przypadku pacjentów leczonych hydroksymocznikiem, natomiast po stosowaniu interferonu α lub transplantacji komórek szpiku kostnego obserwowano losowe ACA/Ph+ występujące przejściowo.

Klonalna ewolucja kariotypu jest wykładnikiem zaostżenia choroby i koreluje z większym prawdopodobieństwem pojawienia się przełomu blastycznego w przebiegu choroby. Oprócz negatywnie prognostycznego wpływu aberracji związanych z zespołami mielodysplastycznymi, takich jak translokacja t(3;21)(q26;q22) i inwersja paracentryczna inv(3)(q21q26), część zmian chromosomowych spotykana jest częściej w przełomie blastycznym limfoidalnym, część – w mieloidalnym. Dla przykładu, izochromosom i(17)(q10) i delecja lub/i mutacje *TP53* są bardziej powszechne w przełomie mieloblastycznym, podczas gdy monosomia 7, hiperdiploidia i delecja

del(9)(p21) (locus genu *CDKN2A*) są bardziej powszechne w przełomie limfoblastycznym.

Znaczenie prognostyczne ACA/Ph+ nie jest jednolite, do tej pory nie stworzono klasyfikacji aberracji opartej na ryzyku progresji na wzór systemów klasyfikacji wykorzystywanych w odniesieniu do zespołów mielodysplastycznych (IPSS, IPSS-R), czy ostrych białaczek szpikowych. Wydaje się, że aberracje obejmujące i(17)(q10) i dodatkowe kopie Ph wiążą się z niepomyślnym rokowaniem. Znaczenie w prognozowaniu ma również ilość spotykanych aberracji w kariotypie w tym samym momencie oraz czas, w którym występują. Wpływ kliniczny aberracji chromosomowych jest prawdopodobnie modyfikowany przez rodzaj zastosowanego leczenia. WHO rekomenduje rozpoznanie fazy akceleracji choroby w momencie stwierdzenia ACA/Ph+ [4]. Według rekomendacji ELN pojawienie się ACA/Ph+ podczas terapii TKI jest wykładnikiem progresji choroby, formą oporności i niepowodzenia zastosowanej terapii, natomiast obecność dodatkowych zaburzeń cytogenetycznych u pacjentów z przewlekłą fazą choroby w chwili stawiania diagnozy stanowi czynnik ostrzegający, wymagający dokładniejszego monitorowania tej grupy pacjentów [35], [36].

1.9 Aberracje chromosomowe w komórkach Philadelphia-ujemnych

Podczas leczenia TKI, po uzyskaniu remisji cytogenetycznej i molekularnej u części pacjentów obserwuje się przejściowe nieprawidłowości chromosomowe w komórkach Ph-ujemnych. Najczęściej obserwuje się trisomię 8, monosomię 7 i utratę chromosomu płci Y [67]. Częstość występowania tego typu aberracji w różnych grupach badanych szacuje się na 2–17% [67], [76]-[79]. Znaczenie kliniczne występowania aberracji chromosomowych w komórkach Ph-ujemnych pozostaje niejasne [80]. Wytyczne Organizacji Współpracy Międzynarodowej na Rzecz Poprawy Opieki Onkologicznej (ang. *National Comprehensive Cancer Network*, NCCN) i zalecenia ELN sugerują, że ogólne rokowanie pacjentów z klonalnymi aberracjami chromosomowymi w komórkach Ph-ujemnych (ang. *Clonal Cytogenetic Abnormalities/Ph-*, CCA/Ph-) wydaje się być dobre i zależy od odpowiedzi na TKI, z wyjątkiem monosomii 7 lub/i delecji fragmentu długiego ramienia chromosomu 7 [35], [36], [81]. Nieprawidłowości chromosomu 7 powiązane są z wysokim ryzykiem mielodysplazji i rozwinięcia klinicznego obrazu ostrej białaczki [79], [82]. Badania CCA/Ph- przyczyniają się do dokładniejszego zrozumienia patogennych i prognostycznych

implikacji tych nieprawidłowości w kontekście CML, ale również szerzej - nowotworów mieloidalnych. Szczególnie teraz, w czasie szeroko rozpowszechnionych badań nad odstawieniem TKI u pacjentów utrzymujących długotrwałą głęboką odpowiedź molekularną wydaje się zasadne badanie jakościowe i ilościowe tego typu aberracji chromosomowych.

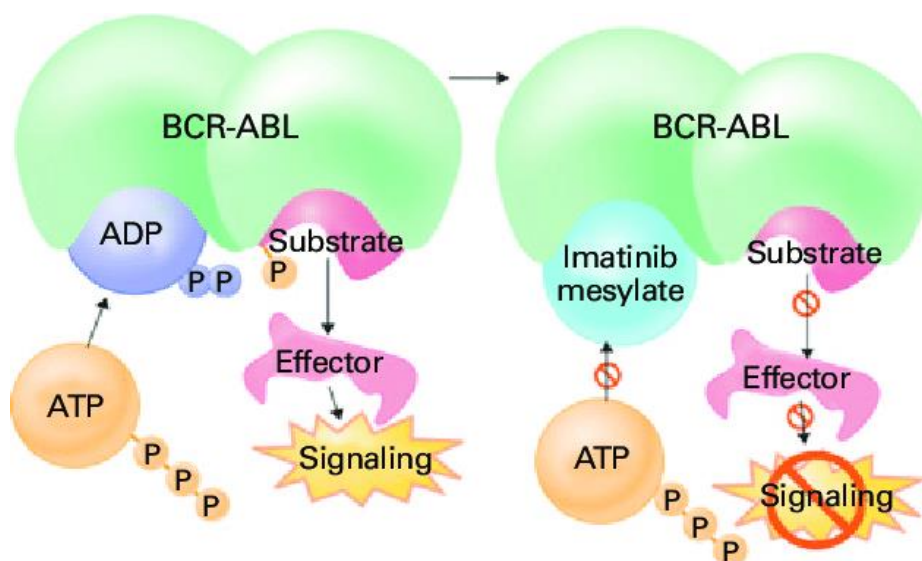
1.10 Leczenie przewlekłej białaczki szpikowej inhibitorami kinaz tyrozynowych

1.10.1 Mesylan imatinibu

Od 1998 roku terapia przewlekłej białaczki szpikowej uległa głębokim zmianom wraz z wprowadzeniem metylosulfonianu imatinibu, środka przeciwnowotworowego opracowanego w celu selektywnego hamowania niektórych kinaz tyrozynowych zaangażowanych w onkogenezę. Wcześniej możliwe było jedynie zmniejszenie masy białaczkowej busulfanem lub hydroksymocznikiem, natomiast opcje terapeutyczne mogące potencjalnie wyleczyć chorobę zostały wprowadzone odpowiednio w 1975 roku – allogeniczny przeszczep szpiku oraz w 1983 roku – interferon α (INF α). Imatinib jest inhibitorem z grupy 2-fenyloaminopirymidyn (do której należy kinaza tyrozynowa ABL1) [78]. Mechanizm działania leku polega na współzawodnictwie z adenozynotrójfosforanem (ATP) o specyficzne dla niego miejsce wiązania w domenie kinazowej (*ang. ATP-binding site*), hamując aktywność kinazową i autofosforylację białka BCR-ABL1 oraz fosforylację reszt tyrozynowych w białkach będących w warunkach prawidłowych substratami dla kinazy tyrozynowej, co ostatecznie prowadzi do apoptozy komórek białaczkowych [83] (Rycina 10).

W konformacji aktywnej kinazy tyrozynowej BCR-ABL1 (fosforylacja tyrozyny w pozycji 393) przyłączenie imatinibu jest niemożliwe, miejsce wiązania leku jest „zasłonięte” przez przemieszczoną pętlę aktywacyjną [83]. Imatinib wiąże się swoiście z sekwencjami ABL1 białka BCR-ABL1 we wszystkich jego izoformach: p190, p210, p230. W badaniach krystalograficznych zaobserwowano, że imatinib wiąże się także z nieaktywną postacią innych kinaz tyrozynowych oprócz ABL1, takich jak kinazy receptora czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego (*ang. Platelet-Derived Growth Factor Receptor*, PDGFR- α i PDGFR- β) i c-KIT czynnika komórek pnia (SCF).

Nie działa natomiast na kinazy SRC i nie hamuje związanych z nimi dróg sygnałowych [83].



Rycina 10. Mechanizm działania imatynibu na BCR-ABL1 (źródło: Namasu i wsp. 2011).

Obserwuje się nieskuteczność imatynibu w przypadku stwierdzenia niektórych wariantów sekwencji onkogenu *BCR-ABL1*, prowadzących do substytucji aminokwasowych np. T315I.

Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) zarejestrowała lek w maju 2001 roku. W 2006 roku opublikowano wyniki badania IRIS (ang. *International Randomized IFN vs. STI571 study*) porównujące skuteczność imatynibu względem INFα u pacjentów z nowo rozpoznaną przewlekłą białaczką szpikową [84]. Po pięciu latach terapii imatynibem pełną remisję cytogenetyczną (ang. *Complete Cytogenetic Response*, CCyR) uzyskało 87% chorych, całkowite przeżycie wyniosło 83%, a u 93% chorych nie doszło do progresji do fazy akceleracji lub przełomu blastycznego. Jedynie u 6,8% chorych, którzy byli leczeni cztery lata imatynibem, doszło do fazy zaostrenia choroby. Wykazano, że prawdopodobieństwo progresji choroby zmniejszało się od trzeciego roku leczenia i w piątym roku wyniosło 0,6%. W grupie chorych, którzy uzyskali CCyR w ciągu 12 miesięcy, po pięciu latach u 3% stwierdzono progresję, natomiast w grupie pacjentów bez większej odpowiedzi cytogenetycznej – progresję zaobserwowano u 19% pacjentów. Uzyskanie większej odpowiedzi molekularnej (ang. *Major Molecular Response*, MMR) po 12 i 18 miesiącach związane było również z lepszym rokowaniem niż w grupie bez takiej odpowiedzi.

W grupie pacjentów, którzy osiągnęli przynajmniej MMR po 18 miesiącach terapii imatynibem, prawdopodobieństwo przeżycia bez progresji choroby wyniosło 100%.

Selektywne hamowanie BCR-ABL1 przez imatynib znacząco zmieniło terapię i naturalną historię choroby. Jednakże, pomimo wysokiego odsetka odpowiedzi hematologicznych, cytogenetycznych i molekularnych, może rozwijać się oporność na zastosowane leczenie.

1.10.2 Inhibitory kinaz tyrozynowych drugiej generacji

Szersze stosowanie imatynibu uświadomiło o istnieniu problemów związanych z jego stosowaniem, między innymi powstawanie wariantów sekwencji powodujących wystąpienie oporności na imatynib, różna wchłanialność, nieprzestrzeganie zaleceń stosowania leku przez pacjentów, potrzeba standaryzacji metod badania choroby resztkowej czy odległe objawy uboczne leczenia. Na tej podstawie spośród wielu badanych związków chemicznych dwie cząsteczki, nilotynib i dazatynib, okazały się najbardziej skuteczne w badaniach klinicznych. Od 2005 roku dostępne stały się TKI drugiej generacji. Szybko potwierdzono ich przydatność w leczeniu chorych na CML i początkowo zarejestrowano do leczenia postaci opornych na leczenie pierwszego rzutu, a następnie do stosowania jako leczenia pierwszoliniowego.

1.10.2.1 Dazatynib

Dazatynib został zarejestrowany w czerwcu 2006 roku do leczenia chorych z CML, w Polsce – w 2007 roku. Jest to pochodna tiazolokarboksamidu należąca do grupy 2-aminotiazoli, która różni się strukturalnie od imatynibu [85].

Hamuje kinazę tyrozynową BCR-ABL1, jak również hamuje c-KIT, SRC kinazy (SRC, LYN, LCK, FYN, FGR i inne), kinazy z rodziny Ephrin i PDGFR- β blokując zarówno ich autofosforylację, jak i fosforylację efektorów poniżej kaskady transdukcji sygnału [86]. Nie aktywuje kinaz receptora czynnika wzrostu naskórka (*ang. Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) i receptora naskórkowego czynnika wzrostu 2 (*ang. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, HER2).

Wiąże się z nieuaktywnioną i aktywną konformacją BCR-ABL1 i hamuje obie, powodując apoptozę komórek białaczkowych. Badania *in vitro* wykazały, że lek ten hamuje około 325-krotnie bardziej autofosforylację niż imatynib, hamuje mutanty BCR-ABL1, w szczególności te, w których zmiany występują na poziomie pętli p

i pętli ABL1 oraz w innych miejscach C-końcowej części białka, z wyjątkiem wariantu z substytucją izoleucyny w miejsce treoniny w pozycji 315 (T315I) [87]. Zdolność dasatinibu do hamowania proliferacji komórek ze zmutowanym BCR-ABL1 wskazuje, na efekt terapeutyczny u pacjentów opornych na imatinib [88]. Poprzez działanie na kinazę SRC przełamuje oporność w zaawansowanych stadiach choroby. Z drugiej strony działając na szerokie spectrum kinaz tyrozynowych spodziewać się można większej liczby działań niepożądanych podczas stosowania tego leku.

Dazatynib początkowo był zarejestrowany do leczenia CML w drugiej linii po stwierdzeniu nieskuteczności lub nietolerancji imatynibu. W październiku 2010 roku został zarejestrowany do leczenia chorych na CML jako postępowanie pierwszego rzutu na podstawie wyników badania DASISION (*ang. Dasatinib vs. Imatinib Study in Treatment-Naive CML Patients*), które wykazały dużą skuteczność tego leku w bezpośrednim porównaniu z imatynibem [89].

1.10.2.2 Nilotynib

Nilotynib został zarejestrowany w 2008 roku, strukturalnie zbliżony jest do imatynibu, lecz hamuje autofosforylację kinazy tyrozynowej BCR-ABL1 10-20-krotnie silniej [90].

W procesie interakcji z nieaktywną formą kinazy BCR-ABL1 wiąże się za pomocą czterech wiązań wodorowych z domenami kinazy ABL1 (Met318, Thr315, Glu226 i Asp381) (Tabela 2) [90], [91].

Podobnie jak dazatynib, wykazuje skuteczność działania w przypadku oporności mutacyjnej w trakcie terapii imatynibem (wyjątek również stanowi substytucja T315I), także w przypadku występowania wariantów sekwencji w obrębie obszarów genu *BCR-ABL1* kodujących okolice miejsca odpowiedzialnego za wiązanie z cząsteczką ATP [91]. Nilotynib wykazuje bardzo słabą aktywność w stosunku do większości innych badanych kinaz białkowych w stężeniach osiągniętych w trakcie leczenia CML. Wielokrotnie słabiej niż na BCR-ABL1 działa na kinazy PDGFR, jeszcze słabiej na c-KIT i EphR [90], [91]. W testach proliferacji i fosforylacji białka wykazano, że nilotynib ma 30 razy większą siłę działania niż imatinib. Ta cecha jest szczególnie ważna dla starszych pacjentów, ponieważ mają oni większą trudność w tolerowaniu imatynibu, zwłaszcza w dużych dawkach [92].

1.10.3 Inne leki stosowane w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej

W leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej stosowane są również inne inhibitory kinaz z rodzin ABL1 i SRC przełamujące oporność mutacyjną na powyżej opisane TKI (Tabela 2). Lekiem działającym w innym mechanizmie do TKI jest omacetaksyna. Indukuje apoptozę komórek białaczkowych w mechanizmie zależnym od kaspazy-3. Lek zarejestrowano w 2012 roku dla leczenia dorosłych z przewlekłą białaczką szpikową w fazie przewlekłej i w fazie akceleracji. Jest jedną z opcji terapeutycznych dla chorych z opornością lub/i nietolerancją dwóch lub więcej TKI.

Tabela 2. Charakterystyka ważniejszych inhibitorów kinaz tyrozynowych.

Lek	Wiązania wodorowe	Aminokwasy wiążące H	Wiązanie z konformacją	Odkrycie	Preparat (producent)
Imatynib (STI571)	6	Met-318, Thr-315, Glu-286, Asp-381, Ile-380, His-361	nieaktywną	opracowane od podstaw	<u>oryginalny:</u> Glivec (Novartis) <u>generyczny:</u> Imakrebin, Imatenil, Imatin b Actavis, Imatinib Polfa, Imatinib Teva, Imatinib Zentiva, Meaxin, Nibix, Telux
Dazatynib (BMS-345825)	3	Met-318, Thr-315	aktywną i nieaktywną	oparte na racjonalnym wzorze	Sprycel (Bristol-Myers Squibb)
Nilotynib (AMN107)	4	Met-318, Thr-315, Glu-284, Asp-381	nieaktywną	oparte na racjonalnym wzorze	Tasigna (Novartis)
Bosutynib (SKI-606)	-	-	nieaktywną	oparte na racjonalnym wzorze	Bosulif (Pfizer)
Ponatynib (AP-24534)	5	Met-318, Asp-381, Glu-286, His-361, Ile-380	nieaktywną	oparte na racjonalnym wzorze	Iclusig (Ariad)
Bafetynib (INNO-406)	6	Met-318, Thr-315, Glu-286, Asp-381, His-361, Ile-360	nieaktywną	oparte na racjonalnym wzorze	-

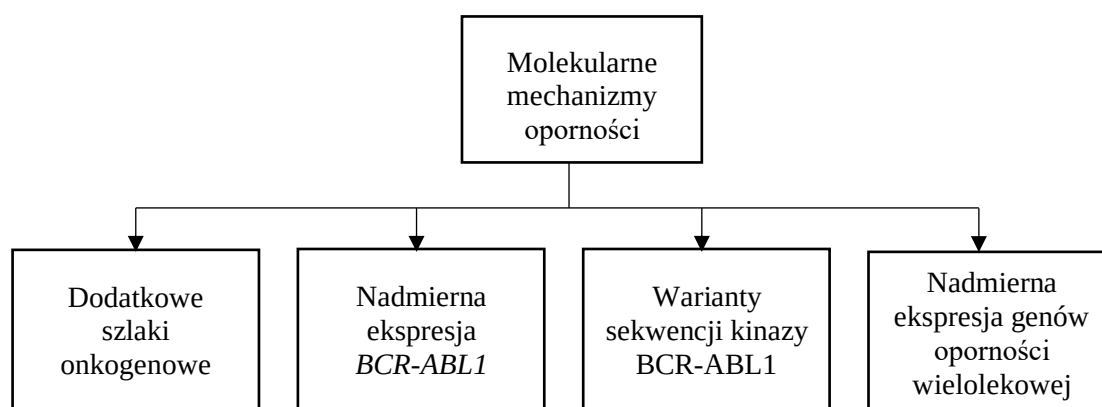
Poza wyżej wymienionymi, zarejestrowanymi już lekami nadal prowadzone są badania eksperymentalne, próby kliniczne z nowymi cząsteczkami np. asciminibem który blokuje BCR-ABL1 w nieaktywnej konformacji za pośrednictwem mechanizmu odmiennego od mechanizmu dla wszystkich innych inhibitorów kinazy tyrozynowej [93]. Asciminib działa zarówno na natywną formę białka, jak i zmutowaną, w tym na mutację T315I.

1.11 Badania nad odstawieniem leczenia inhibitorami kinaz tyrozynowych

Z uwagi na potrzebę dożywotnego stosowania TKI w leczeniu CML i związane z tym koszty dla publicznej służby zdrowia od 2007 roku prowadzono badania nad uzyskaniem remisji wolnej od leczenia (*ang. Treatment Free Remission, TFR*). Pierwsza próba kliniczna STIM1 (*ang. Long-Term Follow-Up of the French Stop Imatinib Study*) obejmowała pacjentów u których odstawiono imatynib po osiągnięciu MR4,5 utrzymującej się powyżej dwóch lat [94], [95]. Po 50-miesięcznym średnim okresie obserwacji skumulowany odsetek nawrotów molekularnych (*ang. Molecular Relapse-Free Survival, MolRFS*) wyniósł 60%, w tym większość nawrotów wystąpiła w pierwszych siedmiu miesiącach od odstawienia leku. Oceniono, że ryzyko nawrotu molekularnego związane było z płcią żeńską, wysokim wskaźnik wg Sokala podczas rozpoznania choroby i krótszym niż 50 miesięcy czasem trwania leczenia imatynibem. W kolejnym badaniu EURO-SKI (*ang. Discontinuation of Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Chronic Myeloid Leukaemia*) po 36 miesiącach obserwacji przeżycie wolne od nawrotu molekularnego osiągnęło 49% chorych. Utrzymanie MolRFS zależało od czasu leczenia TKI i czasu pozostania w głębokiej odpowiedzi molekularnej [96], [97], [98]. Wyniki badania ENESTop (*ang. Treatment-free Remission After Achieving Sustained MR4.5 on Nilotinib*) i ENESTfreedom (*ang. Nilotinib Treatment-free Remission Study in CML Patients*) wykazały, że odsetek chorych z utrzymaną TFR w 96 tygodniu od odstawienia nilotynibu jest zbliżony i wynosi odpowiednio 53% i 48,9% [99], [100]. Na podstawie tych badań FDA zatwierdziła wprowadzenie do charakterystyki nilotynibu zapisu o możliwości odstawienia tego leku jako pierwszego TKI. Dotyczy to pacjentów otrzymujących lek przynajmniej 3 lata, u których głęboka odpowiedź molekularna na poziomie MR4,5 utrzymuje się przynajmniej rok przed zakończeniem leczenia.

1.12 Oporność na leczenie inhibitorami kinaz tyrozynowych

Mimo że terapia celowana z użyciem inhibitorów kinaz tyrozynowych przynosi wymierne i długotrwałe korzyści dla pacjentów, to jednak zdarza się obserwować oporność na stosowane leczenie. Mechanizmy oporności można podzielić na farmakologiczne i molekularne. Pierwsze wynikają z: zróżnicowanej biodostępności, wchłaniania leku, interakcji z innymi substancjami, zaburzonego pobierania leku do komórek bądź eliminacji inhibitora z komórek. Mechanizmy molekularne wiążą się z strukturalnymi zmianami genetycznymi, najczęściej dotyczą genów kodujących białko – cel terapeutyczny dla leku lub są wynikiem zaburzenia ekspresji genów kontrolujących wzrost i proliferację komórek (Rycina 11).



Rycina 11. Znane molekularne mechanizmy oporności na TKI *in vitro* (źródło: opracowanie własne).

Innym mechanizmem oporności będącym wynikiem ewolucji biologicznej i dopasowania komórek nowotworowych do przeżycia w warunkach leczenia celowanego jest rozwój oporności u pacjentów leczonych początkowo imatynibem, a następnie dazatynibem. Udowodniono, że u tych pacjentów komórki białaczkowe z wykrytymi wtórnymi zmianami sekwencji genu fuzyjnego *BCR-ABL1* produkują i wydzielają parakrynnie IL-3, cytokinę silnie aktywującą szlak transdukcji sygnału JAK-STAT [101], [102]. W konsekwencji dochodzi do niezależnej od kinazy *BCR-ABL1* stymulacji tego szlaku, a także pośrednio szlaku RAS-RAF-MEK, zarówno w komórkach z mutacjami, jak również w komórkach, w których nie wykrywa się mutacji. Wykazano, że wystarczy 6% komórek z mutacjami wtórnymi opornymi na dazatynib wśród krążących niezmutowanych komórek białaczkowych, aby w sposób efektywny indukować oporność na ten inhibitor poprzez parakrynnie wydzielanie IL-3.

Z klinicznego punktu widzenia komórki nowotworowe mogą wykazywać oporność pierwotną lub wtórną (nabytą). Oporność pierwotna wynika z zmiany sekwencji onkogenu warunkującej brak wrażliwości komórek białaczkowych na działanie inhibitora od początku zastosowania terapii. Oporność wtórna pojawia się w wyniku adaptacji komórki nowotworowej do warunków stresu terapeutycznego po pewnym okresie leczenia. Wiąże się ona z niestabilnością genetyczną i zwiększoną podatnością na genomowe zmiany wtórne, często niewrażliwe lub częściowo wrażliwe na działanie leku. Dochodzi do selekcji, rozrostu i stopniowej dominacji opornych klonów komórkowych, a w konsekwencji do progresji choroby.

Ponadto istnieje również część pacjentów (~25%), którzy nie są w stanie tolerować leczenia. Oporność na terapię TKI może być wyrażona hematologicznie, cytogenetycznie i molekularnie: dotyczy niezdolności leku do indukowania normalizacji parametrów morfologii krwi, zanikania metafaz Ph-dodatnich lub znacznego zmniejszenia ilości transkryptu *BCR-ABL1*.

1.12.1 Warianty sekwencji aminokwasów w domenie kinazowej BCR-ABL1

Najczęściej spotykanym mechanizmem prowadzącym do oporności wtórnej wśród chorych leczonych TKI jest selekcja klonów komórkowych z wtórnymi zmianami punktowymi w domenie kinazowej (KD) onkogenu będącego celem terapeutycznym [103]-[108]. W komórkach białaczkowych, pochodzących od chorych na CML leczonych imatynibem wykryto ponad 100 różnych wariantów, głównie substytucji, powstających w obrębie KD BCR-ABL1 [109]. Najprawdopodobniej imatynib nie prowadzi do indukowania opornych zmian wtórnych, a jedynie do selekcji klonów komórek z wariantem sekwencji aminokwasowej, które powstały jeszcze przed podaniem inhibitora. Do najczęstszych substytucji w *ABL1*, stanowiących ponad 60% stwierdzanych zmian, należą: H396R, F359V, E355G, M351T, F317L, T315I, E255K, G250E, Q252H, Y253H i M244V. Najczęściej zmiany występują w tzw. pętli P. Efektem tych wariantów może być zmiana konformacyjna kinazy ABL1, utrudniająca bezpośrednio wiązanie imatynibu do białka, jak i preferencyjne utrzymywanie przez kinazę BCR-ABL1 konformacji aktywnej, z którą imatynib nie może się związać.

Warianty sekwencji zostały podzielone według ich roli jaką odgrywają w oporności na imatynib. Wyróżniono zmiany powodujące silną oporność (T315I, E255V, Y253H, L248V, E279K i G250E) oraz warianty powodujące mniejszą oporność (H396R, F359V, F317L, Q252H, L387M, F359C, M351T, M244V, E355G i V379I)

[110]. Stosując powszechnie TKI w leczeniu CML przy wykorzystaniu technik sekwencjonowania następnej generacji wykrywa się obecnie warianty na wyższym poziomie czułości oraz bardziej złożone [104]. Dodatkowo stwierdzono, że różne rodzaje wariantów KD wiążą się z różnym stopniem odporności na pozostałe TKI, np. substytucja T315I jest oporna na prawie wszystkie TKI, natomiast M244V jest wrażliwa na nilotynib i dazatynib. Z kolei, zmiana F359V wykazuje pośrednią oporność na nilotynib i wykazuje wrażliwość na dazatynib [35], [107], [108], [110]. Zaburzenia mechanizmów naprawy DNA, defekty funkcjonowania punktów kontrolnych cyklu komórkowego mogą powodować niestabilność genetyczną w przebiegu CML. Udowodniono, że u pacjentów chorujących na CML z niestabilnością genetyczną istnieje większe prawdopodobieństwo wystąpienia zmian sekwencji w obrębie KD [111]. Z drugiej strony istnieją doniesienia potwierdzające brak korelacji pomiędzy występowaniem zmian KD a występowaniem ACA/Ph+. Badacze sugerują losowe występowanie obu zdarzeń genetycznych reprezentujących różne mechanizmy oporności na leczenie [105], [112].

1.13 Laboratoryjne badania genetyczne w diagnostyce i monitorowaniu przewlekłej białaczki szpikowej

Genetyczna diagnostyka laboratoryjna w przypadku rozpoznania przewlekłej białaczki szpikowej opiera się na następujących metodach:

- cytogenetyce klasycznej;
- fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH);
- reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkryptazą (RT-PCR) i PCR w czasie rzeczywistym (RQ-PCR);

w celu ujawnienia chromosomu Philadelphia i rearanżacji *BCR-ABL1*.

Ponieważ terapia TKI determinuje remisję cytogenetyczną i molekularną, a w konsekwencji wydłużenie fazy przewlekłej, takie analizy stały się ważne nie tylko w momencie rozpoznania choroby, ale także podczas monitorowania terapii. Właściwe monitorowanie wyżej wymienionymi technikami pozwala na wykrycie progresji choroby na wczesnym etapie.

1.13.1 Cytogenetyka klasyczna

Analiza kariotypu jest stosowana do potwierdzenia obecności chromosomu Philadelphia w momencie podejrzenia choroby i monitorowania terapii TKI. Co więcej,

pozwała na wykrycie dodatkowych zmian chromosomowych zarówno w klonie Ph-dodatnim jak i w komórkach Ph-ujemnych, których nie można wykryć za pomocą pozostałych rutynowo stosowanych metod FISH i RQ-PCR.

Ograniczeniami metod oceny prążkowej chromosomów są:

- niska czułość, na poziomie wykrycia 1-5% komórek z aberracją;
- konieczność uzyskania komórek proliferujących, ponieważ analiza jest wykonywana tylko na komórkach w stadium metafazy (standardowo ocenia się 20-30 metafaz).

1.13.2 Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH)

FISH wykorzystuje sondy DNA skoniugowane z fluorochromami, specyficzne dla badanych sekwencji genów zaangażowanych w określone rearanżacje chromosomowe. W ten sposób technika ta pozwala również na analizę komórek nie dzielących się, będących w stadium interfazy, umożliwiając tym samym ocenę pacjentów, u których nie uzyskano metafaz w hodowli komórkowej, bądź uzyskano ich niewystarczającą ilość.

W przypadku przewlekłej białaczki szpikowej, FISH pozwala:

- w momencie rozpoznania dokładnie scharakteryzować translokację t(9;22) rozróżniając rodzaj rearanżacji (translokacja klasyczna lub wariantowa), zdiagnozować przypadki z tzw. „zamaskowanym” Ph oraz potwierdzić lub wykluczyć delecję w obrębie der(9) lub/i der(22);
- w trakcie monitorowania oszacować liczbę komórek *BCR/ABL1*-dodatnich, w przypadkach, w których nie można ocenić kariotypu metodą cytogenetyki klasycznej;
- w momencie podejrzenia i monitorowania leczenia, wykryć amplifikację *BCR/ABL1*. W niektórych przypadkach amplifikacja nie jest związana z duplikacją chromosomu Ph, ale jest spowodowana powieleniem i wprowadzeniem przegrupowania w innych regionach chromosomowych: z tego powodu może nie być widoczna przy rozdzielczości cytogenetyki klasycznej. Amplifikacja *BCR/ABL1* niezależnie od lokalizacji wskazuje na postęp choroby w kierunku przełomu blastycznego [113];
- określić w bardziej czuły sposób, w odniesieniu do metod cytogenetyki klasycznej, chimeryzm po allogenicznej transplantacji komórek szpiku kostnego w sytuacji, gdy dawca był innej płci od biorcy.

FISH jest techniką bardziej czułą niż analiza kariotypu, ponieważ może być analizowana większa liczba komórek, zarówno komórek proliferujących i nieproliferujących (standardowo analizie podlega 100-200 jąder komórkowych). Z drugiej jednak strony FISH z sondą D-BCR/ABL, rutynowo stosowany, wykrywa tylko fuzję *BCR-ABL1*. Z tego powodu niemożliwe jest zidentyfikowanie dodatkowych aberracji chromosomowych w klonie Ph-dodatnim jak i w komórkach Ph-ujemnych bez ich wcześniejszej detekcji metodami cytogenetyki klasycznej, ewentualnie metodami molekularnymi (FISH z sondą celowaną) ukierunkowanymi na aberrację wcześniej wykrytą w badaniu kariotypu.

1.13.3 Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

PCR jest techniką umożliwiającą amplifikację *in vitro* specyficznych sekwencji DNA lub komplementarnego DNA (cDNA). Kinetyka amplifikacji ma charakter wykładniczy, a niewielkie zmiany w warunkach przygotowania reakcji mogą przełożyć się na duże zmiany w ilości produktu końcowego. Konieczne jest poznanie sekwencji docelowego genu, który chcemy zamplifikować, aby zaprojektować parę sensownych (*ang. forward*) i antysensownych (*ang. reverse*) starterów, które będą hybrydyzować z regionami flankującymi sekwencję badaną, odpowiednio na 5' i 3' końcu. Długość starterów wynosi od 15 do 30 nukleotydów; im większa długość, tym wyższa specyficzność. Wykładnicza amplifikacja docelowej sekwencji badanej zachodzi dzięki powtórzeniu serii cykli obejmujących trzy fazy: pierwsza faza obejmuje denaturację termiczną dwuniciowej matrycy DNA (powyżej 90°C), która ma być skopiowana, podczas gdy druga i trzecia faza zapewniają odpowiednio przyłączanie lub renaturację starterów odpowiednimi regionami komplementarnymi (50-65°C) i wydłużanie DNA zaczynając od starterów przy udziale polimerazy Taq (72°C), którą cechuje również aktywność eksonukleazy 5'→3'. Technika PCR transkryptów *BCR-ABL1* u pacjentów w momencie rozpoznania przewlekłej białaczki szpikowej definiuje specyficzny transkrypt powstały w wyniku translokacji t(9;22), która w większości przypadków jest reprezentowana przez transkrypt e13a2 (b2a2) lub e14a2 (b3a2). Limit czułości wynosi około 1/100 000 komórek, co wystarcza do rozpoznania, ale nie do monitorowania terapii. Ponadto nie można stosować tego badania do oznaczania ilościowego transkryptu, co jest szczególnie ważne w monitorowaniu pacjentów otrzymujących TKI, szczególnie u chorych z całkowitą odpowiedzią cytogenetyczną.

Z tego powodu monitorowanie terapii odbywa się za pomocą *Real Time PCR*. Metoda polega na monitorowaniu przyrostu liczby kopii badanej sekwencji w czasie rzeczywistym. Jest to możliwe dzięki znakowaniu produktów amplifikacji cząsteczkami zdolnymi do fluorescencji. Fluorescencja każdej próbki jest proporcjonalna do ilości zsyntetyzowanego produktu. Mierzac fluorescencję próbek po każdym cyklu reakcji, można monitorować jej przebieg. Do obliczania liczby badanych cząsteczek obecnych w mieszaninie na początku reakcji wykorzystuje się moment, w którym poziom fluorescencji barwnika przekroczy zdefiniowany próg (CT). Im wcześniej poziom fluorescencji wzrasta do określonej wartości, tym jest więcej kopii badanej sekwencji w próbce na początku reakcji. Najczęściej CT jest tożsame z wejściem reakcji w fazę logarytmicznego przyrostu ilości produktu. W celu zbadania liczby kopii badanej sekwencji w próbce sporządza się serię rozcieńczeń roztworu o znanym stężeniu i liczbie kopii DNA, według nich wyznacza się krzywą standardową i mając dany punkt CT, na podstawie krzywej standardowej szacuje się liczbę cząsteczek.

Nowym, obiecującym narzędziem służącym zarówno do jakościowej, jak i ilościowej oceny poziomu transkryptu *BCR-ABL1* jest tzw. emulsyjny PCR (*ang. digital PCR*, dPCR) oparty na ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym z tradycyjną amplifikacją oraz detekcją fluorescencji produktu docelowego reakcji, przy jednoczesnej eliminacji krzywych standardowych. Mimo niezaprzeczalnych zalet zastosowanie w chwili obecnej dPCR w ocenie poziomu transkryptu *BCR-ABL1* do celów klinicznych wymaga znacznej rozwagi i doświadczenia. Zaobserwowano, że odsetek uzyskanych głębokich odpowiedzi molekularnych był niższy w przypadku dPCR niż *Real Time PCR* i w związku z tym uzyskiwane odpowiedzi molekularne klasyfikowano jako gorsze. Efekt ten był niezależny od ilości i jakości użytego materiału [114]. Biorąc pod uwagę, że wszystkie aktualne rekomendacje postępowania diagnostyczno-terapeutycznego opierają się na badaniach molekularnych wykonywanych metodą *Real Time PCR*, wyniki badania dPCR używanego do celów klinicznych powinny być poddane wnikliwej ocenie i analizowane w porównaniu z wynikami uzyskanymi techniką *Real Time PCR* w akredytowanych laboratoriach.

1.14 Kryteria odpowiedzi cytogenetycznej i molekularnej na leczenie inhibitorami kinaz tyrozynowych

Analiza kariotypu metodami cytogenetyki klasycznej przeprowadzona na aspiratach szpiku kostnego pozostaje nadal rekomendowaną metodą monitorowania odpowiedzi na leczenie inhibitorami kinaz tyrozynowych, ponadto jest również jedynym stosowanym narzędziem diagnostycznym do oceny innych aberracji chromosomowych poza chromosomem Ph, które mogą odgrywać rolę prognostyczną.

Odpowiedź cytogenetyczną na podstawie odsetka metafaz z chromosomem Ph można ocenić jako:

- całkowitą (*ang. Complete Cytogenetic Response, CCyR*): 0% metafaz Ph+;
- częściową (*ang. Partial Cytogenetic Response, PCyR*): 1-35% metafaz Ph+;
- mniejszą (*ang. Minor Cytogenetic Response, MCyR*): 36-65% metafaz Ph+;
- minimalną (*ang. Minimal Cytogenetic Response, minCyR*): 66-95% metafaz Ph+;
- brak odpowiedzi (*ang. no Cytogenetic Response, noCyR*): 96-100% metafaz Ph+.

Odpowiedź molekularną określa się za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (RQ-PCR). W celu ilościowego oznaczenia ilości RNA w badanych próbkach i normalizacji ekspresji transkryptu *BCR-ABL1* przeprowadza się oznaczenie genu metabolizmu podstawowego (gen *GUSB*, *ABL1*). Standardową krzywą dla genu kontrolnego otrzymuje się przez kwantyfikację przynajmniej trzech seryjnych rozcieńczeń w znanych stężeniach plazmidów zawierających gen kontrolny.

Ilość transkryptu obecnego w analizowanych próbkach wyraża się jako stosunek: *BCR-ABL1/GUSB* %, według skali międzynarodowej. Pracownia Biologii Molekularnej Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej uczestniczy w procesie walidacji oznaczeń poziomu transkryptu *BCR-ABL1* w ramach projektu EUTOS. Uzyskane wyniki oprócz potwierdzenia czułości pozwalają stwierdzić, że wykonywane pomiary są powtarzalne i stabilne w dłuższej perspektywie czasowej.

Odpowiedź molekularną na podstawie poziomu transkryptu *BCR-ABL1/GUSB IS* można ocenić jako:

- większą (*ang. Major Molecular Response, MMR*): przynajmniej 0,1%;
- głęboką (*ang. Deep Molecular Response, DMR*):
 - MR4: przynajmniej 0,01%;
 - MR4,5: przynajmniej 0,0032%;
 - MR5: przynajmniej 0,001%;
- brak odpowiedzi (*ang. no Molecular Response, noMMR*): powyżej 0,1%.

Postęp choroby do bardziej zaawansowanych faz oraz niepowodzenie terapii definiuje się według kryteriów przedstawionych w rekomendacjach Polskiej Grupy ds. Leczenia Białaczek u Dorosłych (*ang. Polish Adult Leukemia Group, PALG*) dotyczących diagnostyki i leczenia przewlekłej białaczki szpikowej oraz ELN [35], [36], [37].

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Głównym celem pracy była charakterystyka aberracji chromosomowych u chorych z rozpoznaną przewlekłą białaczką szpikową leczonych inhibitorami kinaz tyrozynowych.

Praca zakładała wyodrębnienie grupy pacjentów z klasyczną translokacją t(9;22), z translokacją wariantową, z karyotypem Ph-ujemnym/*BCR-ABL1*-dodatnim oraz z zamaskowanym chromosomem Ph. Dokonano analizy występowania delekcji *BCR* lub/i *ABL1* z chromosomów objętych translokacją, a także wariantów sekwencji domeny kinazowej *BCR-ABL1*.

Ocenie poddane zostały dodatkowe aberracje chromosomowe występujące w klonie komórek Ph-dodatnim zarówno w momencie rozpoznania choroby, a także w trakcie terapii inhibitorami kinaz tyrozynowych. W trakcie monitorowania terapii oceniono występowanie zmian chromosomowych w komórkach Ph-ujemnych. Przeanalizowano wpływ rodzaju aberracji, czasu pojawienia się aberracji w przebiegu choroby na uzyskaną odpowiedź na zastosowane leczenie.

Szczegółowe cele pracy:

- I. określenie częstości występowania i charakteru aberracji chromosomowych u chorych na przewlekłą białaczkę szpikową;
- II. ocena ewolucji klonalnej karyotypu w trakcie terapii inhibitorami kinaz tyrozynowych;
- III. ocena wpływu wybranych aberracji chromosomowych na odpowiedź na zastosowane leczenie oraz na przeżycie chorych z przewlekłą białaczką szpikową;
- IV. ocena częstości współwystępowania aberracji chromosomowych z zmianami w obrębie domeny kinazowej *BCR-ABL1*;
- V. próba oceny związku pomiędzy wybranymi aberracjami chromosomowymi a wybranymi parametrami laboratoryjno-klinicznymi oraz fazą choroby.

3. MATERIAŁ

3.1 Grupa badana

Badania miały charakter retrospektywny, realizowane były w Pracowni Cytogenetyki oraz Pracowni Biologii Molekularnej Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej Katedry i Kliniki Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Zgromadzony materiał biologiczny pobrany został w ramach rutynowej diagnostyki w latach 2007-2016. Badania wykonano po uprzednim uzyskaniu zgody uczelnianej Komisji Bioetycznej (nr Uchwały 178/17). Do badań zakwalifikowano 215 pacjentów (111 kobiet oraz 104 mężczyzn), zdiagnozowanych i leczonych z powodu przewlekłej białaczki szpikowej. U poszczególnych pacjentów chorobę rozpoznano w latach 1990-2016. Zebrano dane kliniczne z momentu rozpoznania choroby: od 56 chorych (26%) rozpoznanych w latach 1990-2006 oraz 151 osób (70,2%) rozpoznanych w latach 2007-2016 (Tabela 3). Nie udało się uzyskać danych klinicznych od 8 chorych (3,7%), jednak z uwagi na rzadkość prezentowanych aberracji chromosomowych w tej podgrupie pacjentów uwzględniono chorych w badaniu.

Tabela 3. Charakterystyka kliniczno-laboratoryjna badanej grupy pacjentów z rozpoznaniem przewlekłej białaczki szpikowej.

Badany parametr	Grupa badana (n=215)
Płeć męska/żeńską; n (%)	104/111 (48,4/51,6)
Brak danych klinicznych	8
Dane kliniczne	207
Mediana wieku zachorowania w latach; (zakres)	51 (9-84)
Powiększenie śledziony przy rozpoznaniu; n (%)	132 (63,8)
WBC 10 ⁹ /L przy rozpoznaniu; mediana (zakres)	93 (2-658)
Hg mmol/l przy rozpoznaniu; mediana (zakres)	7,4 (3,5-13)
PLT 10 ⁹ /L przy rozpoznaniu; mediana (zakres)	433 (42-2746)
Blasty we krwi przy rozpoznaniu; mediana % (zakres)	1 (0-68)
Eozynofile we krwi przy rozpoznaniu; mediana % (zakres)	2 (0-20)

Bazofile we krwi przy rozpoznaniu; mediana % (zakres)		2 (0-29)
Ocena ryzyka wg Sokala; n (%)	niskie	70 (33,8)
	pośrednie	83 (40,1)
	wysokie	54 (26,1)
Ocena ryzyka wg Hasforda (Euro); n (%)	niskie	88 (42,5)
	pośrednie	94 (45,4)
	wysokie	25 (12,1)
Ocena ryzyka wg Eutos; n (%)	niskie	193 (93,2)
	wysokie	14 (6,8)
Ocena ryzyka wg ELTS; n (%)	niskie	129 (62,3)
	pośrednie	46 (22,2)
	wysokie	32 (15,5)
Faza choroby przy rozpoznaniu; n (%)	CP	183 (88,4)
	AP	18 (8,7)
	BP	6 (2,9)
Transkrypt; n (%)	e13a2	69 (33,3)
	e14a2	131 (63,3)
	e14a3	2 (1)
	e19a2	1 (0,5)
	e13a2 z mikrodelecją	1 (0,5)
	koekspresja e13a2 i e14a2	3 (1,4)
Czas od rozpoznania do ostatniego badania; mediana czasu m-ce; (zakres)		72 (8-312)
Imatynib; n (%); mediana czasu m-ce; (zakres)		207 (100%); 36 (2-216)
Leczenie TKI II generacji; n (%)		74 (35,7)
Dazatynib; n (%); mediana czasu m-ce; (zakres)		48 (23,2); 18 (1-95)
Nilotinib; n (%); mediana czasu m-ce; (zakres)		49 (23,7); 18 (1-108)
Leczenie sekwencyjne dwoma TKI II generacji; n (%)		23 (11,1)
Warianty domeny kinazowej BCR-ABL1; n (%)		24 (11,6)
Transformacja do BP/AP; n (%)		14 (6,8)
AlloBMT po niepowodzeniu leczenia TKI; n (%)		21 (10,1)
Śmierć; n (%)		22 (10,6)

Skróty: ACA/Ph⁺, dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie komórek Philadelphia-dodatnim; AP, faza akceleracji; alloBMT, allogeniczny przeszczep komórek szpiku kostnego; BP, faza przełomu blastycznego; CP, faza przewlekła; Hb, hemoglobina; PLT, trombocyty; TKI, inhibitory kinaz tyrozynowych; WBC, leukocyty

3.2 Materiał do badań

Materiałem do badań cytogenetycznych był szpik kostny, rzadziej krew obwodowa (przy obecności blastozy powyżej 20% bądź w przypadku podejrzenia aberracji chromosomowej o charakterze konstytutywnym), pobrany na litową heparynę w ilości 4 ml.

Natomiast materiałem do badań metodami biologii molekularnej było 9 ml krwi obwodowej, pozyskanej z nakłucia żyły odłokciowej do probówki z wersenianem dwusodowym.

3.3 Odczynniki i aparatura badawcza

Sondy molekularne wykorzystywane do analizy FISH

Badania FISH przeprowadzono z następującymi sondami DNA w celu scharakteryzowania translokacji t(9;22).

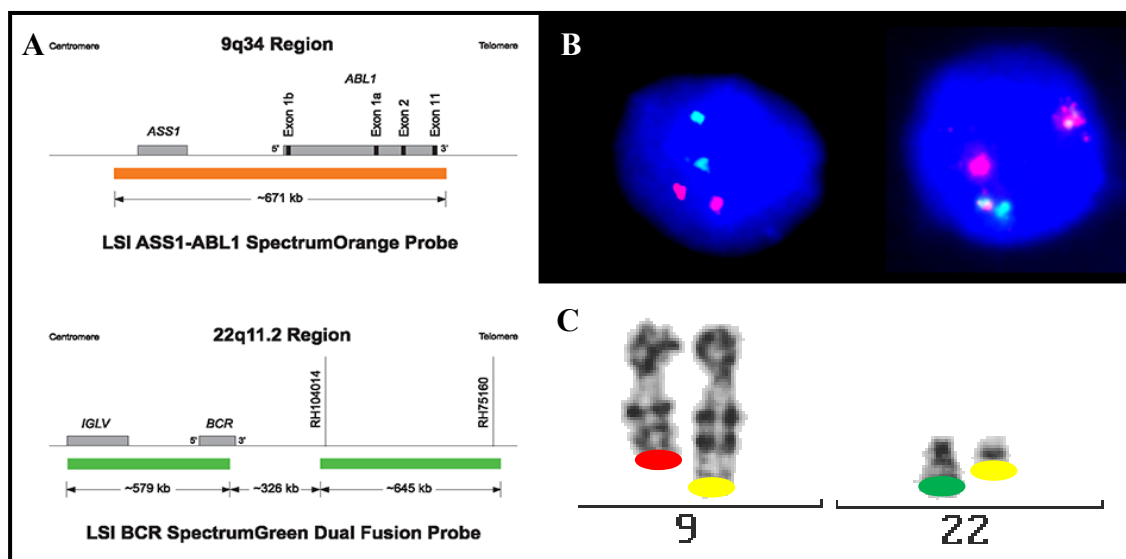
LSI BCR/ABL, Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set Vysis (Abbott Molecular Inc., USA)

Jest to mieszanina dwóch sond: sondy LSI ASS1-ABL1 wyznakowanej na pomarańczowo SpectrumOrange (rodaminą) i sondy LSI BCR wyznakowanej na zielono SpectrumGreen (fluoresceiną).

Sonda ABL1 o wielkości około 671 kpz [chr9:132255025-132926107; Dec. 2013 Assembly (GRCh38/hg38), UCSC Genome Browser] obejmuje gen *ASS1* i rozciąga się do ostatniego eksonu genu *ABL1*.

Sonda BCR obejmuje obszar o wielkości około 1,5 Mbp, obejmuje locus zmiennych sekwencji lekkich łańcuchów lambda immunoglobuliny (*IGLV*) oraz gen *BCR* [około 579 kpz; chr22:21382633-21962088; Dec. 2013 Assembly (GRCh38/hg38), UCSC Genome Browser] kończąc się w punkcie położonym około 900 kpz od końca 3' tego genu. Dystalny fragment sondy obejmuje obszar o wielkości około 645 kpz [chr22:22288218-22932815; Dec. 2013 Assembly (GRCh38/hg38), UCSC Genome Browser]. Pomiędzy dwoma sondami wyznakowanymi na zielono występuje obszar niewyznakowany o wielkości około 326 kpz.

Zarówno sonda ABL1, jak i BCR pokrywają miejsca złamań odpowiadających im genów, typowe dla translokacji t(9;22)(q34;q11.2). Wzór hybrydyzacji dla prawidłowej komórki to dwa czerwone sygnały zlokalizowane na chromosomach pary 9 i dwa zielone sygnały na chromosomach pary 22, podczas gdy komórka z translokacją t(9;22)(q34;q11.2) prezentuje odpowiednio czerwony sygnał i zielony sygnał dla prawidłowego chromosomu 9 i 22 oraz dwa czerwone/zielone (żółte) sygnały fuzyjne dla dwóch pochodnych chromosomów uczestniczących w translokacji: jeden na chromosomie 9, drugi na chromosomie 22 (chromosomie Ph) (Rycina 12).

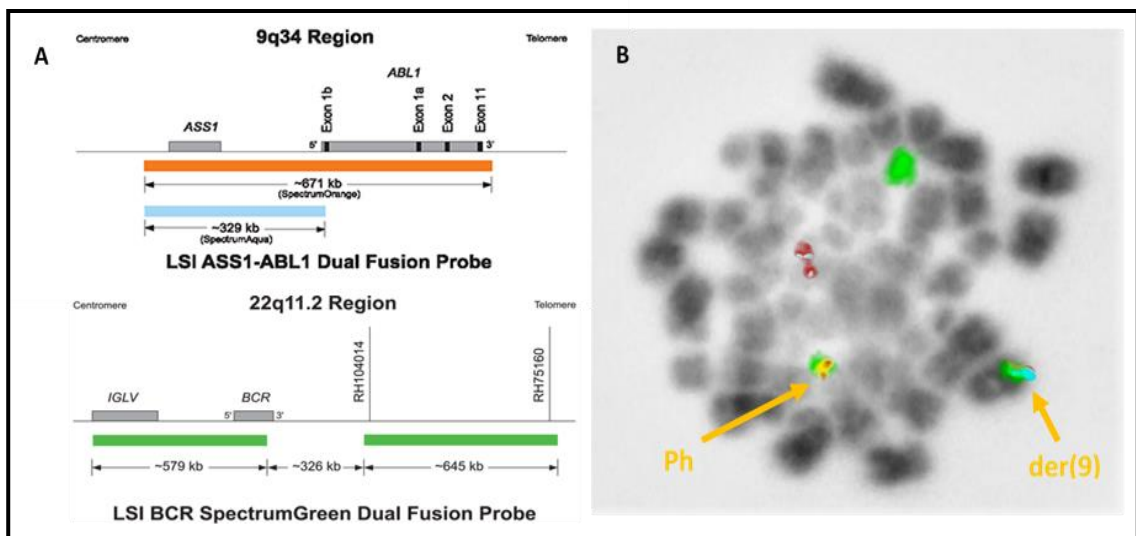


Rycina 12. Wyznakowanie sondy molekularnej LSI DCDF BCR/ABL: A) Schemat sondy (źródło: katalog Abbott Molecular, Vysis FISH); B) Jądro komórkowe w interfazie z prawidłowym wzorem hybrydyzacji (po lewej) oraz z typowym przegrupowaniem sygnałów dla fuzji genów *BCR/ABL1* (po prawej); C) Rozkład sygnałów na poszczególnych chromosomach w przypadku translokacji *t(9;22)* (źródło: opracowanie własne; zdjęcia wykonano w Pracowni Cytogenetyki Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej).

LSI BCR/ABL/ASS, Tri-Color, Dual Fusion Translocation Probe Set Vysis (Abbott Molecular Inc., USA)

Jest to mieszanina dwóch sond: sondy LSI ASS1-ABL1 wyznakowanej na czerwono (SpectrumOrange) i niebiesko (Aqua) oraz LSI BCR wyznakowanej na zielono (SpectrumGreen).

W prawidłowej komórce obserwuje się dwa czerwono-niebieskie sygnały dla chromosomów 9 i dwa zielone sygnały dla chromosomów 22, podczas gdy w komórce z translokacją *t(9;22)(q34;q11.2)* wystąpią odpowiednio: sygnał czerwono-niebieski i sygnał zielony na prawidłowych chromosomach 9 i 22, sygnał fuzyjny czerwono-niebieski/zielony (żółto-niebieski) dla pochodnego chromosomu 9 i sygnał fuzyjny czerwono-zielony (żółty) dla pochodnego chromosomu 22 (chromosomu Ph) (Rycina 13). Opisany zestaw sond pozwala rozróżnić w komórkach interfazowych prawidłowy chromosom 9 i chromosom pochodny 9 od chromosomu Ph pochodzący z translokacji *t(9;22)(q34;q11.2)*, a zatem obniżyć próg odcięcia dla komórek fałszywie dodatnich.



Rycina 13. Wyznakowanie sondy molekularnej BCR/ABL1/ASS1: A) Schemat trójkolorowej sondy fuzyjnej BCR/ABL1/ASS1 (źródło: katalog Abbott Molecular, Vysis FISH); B) Płytką metafazowa z klasyczną rearanżacją *BCR/ABL1*, strzałkami zaznaczono pochodny chromosom 9 (sygnał czerwono-niebieski/zielony) i chromosom Ph (sygnał czerwony/zielony) (źródło: opracowanie własne; zdjęcie wykonano w Pracowni Cytogenetyki Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej).

Ponadto wykorzystywano dostępne na rynku sondy komercyjne, specyficzne oraz malujące w celu scharakteryzowania aberracji obserwowanych w kariotypie (Aneks; Załącznik 1).

Sekwencje starterów oligonukleotydowych wykorzystywanych w badaniach molekularnych zestawiono w formie tabel (Aneks; Załącznik 2-4).

Pozostałe stosowane odczynniki oraz zestawienie wykorzystanej aparatury badawczej przedstawiono w formie tabeli (Aneks; Załącznik 5 i 6).

4. METODY

4.1 Cytogenetyka klasyczna

4.1.1 Hodowle komórkowe

Krótkoterminowe hodowle komórkowe o gęstości 10 milionów komórek w 10 ml pożywki zakładano w warunkach sterylnych po otrzymaniu próbki do badania. Pożywka zawierała RPMI 1640 wzbogacone w 15% płodową surowicę bydlęcą. W każdym przypadku zakładano cztery hodowle komórkowe (dwie stymulowane G-CSF i dwie niestymulowane) i inkubowano w 37°C z 5% CO₂ przez 24 i 48 godzin. Następnie do kultur dodawano kolcemid o stężeniu 10 µg/ml i ponownie inkubowano w 37°C przy 5% CO₂ przez 30 minut w celu zatrzymania cyklu komórkowego komórek szpiku kostnego na etapie metafazy. Po inkubacji hodowle wirowano przy 800 x g przez 10 minut. Po usunięciu supernatantu komórki poddawano działaniu szoku hipotonicznemu przez dodanie 10 ml 0,075 M roztworu KCl. Tak otrzymaną mieszaninę inkubowano w 37°C przez 20 minut, wirowano przy 800 x g przez 10 minut w celu ponownego usunięcia supernatantu. Do osadu komórkowego dodawano kroplami zmrożony utrwalacz Carnoy'a (trzy części metanolu i jedna część kwasu octowego) ciągle mieszając. Proces utrwalenia powtarzano trzy razy, aby wyeliminować zbędny materiał komórkowy, co mogło utrudnić analizę płytek metafazowych. Utrwalone komórki zawieszano w niewielkiej ilości utrwalacza i przechowywano w -20°C. Z każdej hodowli sprawdzano materiał pod kątem liczby i jakości uzyskanych metafaz poprzez rozłożenie kilku kropel materiału na szkiełku podstawowym nad łaźnią wodną. Standardowo przygotowywano 8-10 szkiełek podstawowych „postarzanych” w termostacie/cieplarni w 80°C przez godzinę i pozostawiano do wystygnięcia do dnia następnego, w którym przeprowadzano procedurę uzyskiwania prążków G. Ponadto w przypadku podejrzenia aberracji chromosomowej o charakterze konstytutywnym zakładano 72-godzinne hodowle komórkowe krwi obwodowej (stymulowane LF-7 i niestymulowane). Preparatyka hodowli komórek krwi obwodowej była identyczna z preparatyką hodowli komórek szpiku kostnego.

4.1.2 Barwienie prążkowe chromosomów

Prążkowanie chromosomów polega na stosowaniu różnych metod barwienia umożliwiających podkreślenie normalnie niewidocznej struktury chromosomowej. Uzyskany wzór prążkowy wynika z niejednorodnej, ściśle określonej organizacji struktury chromatyny w chromosomach metafazowych. Najczęściej do analizy kariotypu uwidacznia się wzór prążków G. Identyczny wzór z prążkami G mają prążki Q po wybarwieniu kwinakryną. Jeśli wymagana jest lepsza identyfikacja obszarów telomerowych chromosomów, stosuje się prążki R – uzyskuje się wzór odwrotny do prążków G i Q. W celu wybarwienia regionów chromosomów zawierających heterochromatynę konstytutywną stosuje się prążki C, natomiast organizatory jąderkowe (satelity, nitki satelitonośne) pozwala uwidocznienie srebrzenie (*ang. silver-stained Nucleolar Organizer Regions, AgNOR*). Standardowo w Pracowni Cytogenetyki Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej stosuje się prążki G (*ang. G-bands by Trypsin using Giemsa, GTG*).

4.1.2.1 Uzyskiwanie prążków G

Szkiełka podstawowe z odpowiednio rozłożonym materiałem pacjenta, „postarzone” w 80°C, poddawano działaniu trypsyny (480 µl trypsyny 0,25% w PBS, bez Ca²⁺, Mg²⁺ i 50 ml buforu fosforanowego o pH 6,8). Czas trypsynowania dobierano indywidualnie dla każdego pacjenta (około dziesięć sekund). Po łagodnej proteolizie trypsyną chromosomy poddawano barwieniu 5% roztworem odczynnika Giemzy w buforze fosforanowym o pH 6,8-7,0 przez osiem minut. Pozwoliło to na wizualizację prążków ciemnych (G-pozytywnych, z dużym udziałem par AT, odpowiadających regionom heterochromatynowym bogatym w sekwencje DNA powtarzalne) oraz prążków jasnych (G-negatywnych, z dużym udziałem par GC, utożsamianych z euchromatyną, bogatych w sekwencje unikatowe) dla poszczególnych chromosomów. Metafazy z wyprążkowanymi chromosomami na szkiełkach były znajdowane manualnie pod mikroskopem optycznym (Axio Imager Z1, Z2 lub D1, Zeiss) lub z wykorzystaniem systemu do automatycznego wyszukiwania metafaz Metafinder4 (Metasystems; od listopada 2011 na wyposażeniu pracowni). Do analizy chromosomów wykorzystano oprogramowanie komputerowe Ikaros (Metasystems) podłączone do mikroskopu. W chwili diagnozy starano się analizować 20 metafaz, natomiast podczas monitorowania

terapii 25-30 metafaz. Klasyfikacja chromosomów odbywała się zgodnie z międzynarodową nomenklaturą chromosomową (ang. *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, ISCN). Aberracje chromosomowe oceniano jako klonalne, gdy dwie lub więcej komórek posiadało identyczną nieprawidłowość strukturalną lub ten sam nadliczbowy chromosom oraz gdy w przynajmniej trzech komórkach obserwowano tę samą monosomię. Zmiany obecne w mniejszej liczbie komórek były zdefiniowane jako nieklonalne. W szczególnych przypadkach aberracje chromosomowe były opisywane w kariotypie, nawet jeśli obserwowano aberrację tylko w 1 metafazie, gdy ta sama zmiana chromosomowa wystąpiła podczas rozpoznania i monitorowania terapii, bądź jej klonalność została potwierdzona inną metodą (np. FISH).

4.1.2.2 Uzyskiwanie prążków C

Szkiełka podstawowe z odpowiednio rozłożonym materiałem pacjenta, „postarzone”, inkubowano w 0,2N HCl przez godzinę w temperaturze pokojowej. Po przepłukaniu w wodzie destylowanej szkiełka poddano działaniu 5% wodorotlenku baru w temperaturze 50°C. Czas denaturacji dobierano indywidualnie dla każdego pacjenta (od 10 do 50 sekund). Szkiełka inkubowano w roztworze 2xSSC przez godzinę w temperaturze 60°C, po czym barwiono 5% roztworem odczynnika Giemzy w buforze fosforanowym o pH 6,8-7,0 przez 45 minut. Barwienie tą metodą (ang. *C-bands by Barium hydroxide using Giemsa*, CBG) pozwalało na identyfikację regionów okołocentromerowych wszystkich chromosomów, wariantów morfologicznych heterochromatyny konstytutywnej chromosomów 1, 9, 16 i Y oraz wariantów morfologicznych heterochromatyny wszystkich chromosomów akrocentrycznych.

4.2 Cytogenetyka molekularna - fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH)

Preparaty do badania wykonywano z materiału utrwalonego po krótkoterminowej hodowli szpiku kostnego/krwi obwodowej przechowywanego w -20°C. Następnie szkiełka inkubowano przez 10 minut w temperaturze 37°C w 2xSSC (17,5 g chlorku sodu i 8,2 g cytrynianu tri-sodu w litrze wody destylowanej). Preparaty następnie odwadniano w kolejnych dwuminutowych płukaniach w rosnącym stężeniu etanolu: 70%, 85% i 96%.

Mieszaninę hybrydyzacyjną przygotowywano zgodnie z wskazaniami producenta. Po umieszczeniu 10 µl roztworu sondy na preparacie przykrywano szkiełko podstawowe szkiełkiem nakrywkowym i zaklejano szczelnie fixogumą. Tak przygotowane szkiełka umieszczano w aparacie do jednoczesnej denaturacji i hybrydyzacji Hybrite (Vysis Inc., Richmond, Wielka Brytania) zapewniającym ciemność i odpowiednią wilgotność. Kodenastracja sondy molekularnej i preparatu na szkiełku podstawowym trwała 1 minutę w 73°C, hybrydyzacja między DNA sondy molekularnej i DNA materiału badanego odbywała się przynajmniej 16 godzin w 37°C.

Po zakończeniu hybrydyzacji, po odklejeniu szkiełka nakrywkowego, szkiełka podstawowe płukano przez 2 minuty w roztworze 0,4xSSC/0,1% Tween 20 w 72°C, a następnie w roztworze 2xSSC/0,05% Tween 20 w temperaturze pokojowej przez 1 minutę w celu odpłukania niezwiązanej sondy molekularnej. Po wyjęciu preparatów z buforu nanoszono około 10 µl barwnika 4',6-diamidyno-2-fenylindol (DAPI) przygotowanego z roztworu Vectashield i DAPI w stosunku 2,5:1 i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Preparaty analizowano w ciemności przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (Axio Imager Z1, Zeiss) wyposażonego w filtry jednopasmowe FITC/Spectrum Orange/TRITC/AQUA/Texas Red/DAPI. Analizę przeprowadzano z wykorzystaniem oprogramowania komputerowego Isis (Metasystems) podłączonego do mikroskopu, analizując co najmniej 100 komórek w momencie diagnozy choroby i 200 komórek w trakcie monitorowania leczenia.

Wynik uważano za ujemny dla fuzji genów *BCR-ABL1*, gdy procent jąder dodatnich dla określonego przegrupowania był mniejszy niż 1% (wartość graniczna).

4.3 Przygotowanie materiału do badań molekularnych

4.3.1 Izolacja komórek jądrzastych krwi obwodowej

Krew rozcieńczano hipotonicznym buforem do lizy erytrocytów (LB) w stosunku 1:4,5, mieszano i inkubowano około 20-30 minut w lodzie. Następnie wirowano 20 minut przy 800 x g. Po usunięciu supernatantu osad przemywano niewielką ilością buforu lizującego. Komórki przenoszono do 1,5 ml probówek typu Eppendorf, wirowano 2 minuty przy 10 000 rpm i ponownie zawieszano w 1,2 ml buforu LB.

4.3.2 Izolacja RNA

Ekstrakcję RNA przeprowadzano wykorzystując 1 ml zawiesiny komórek, którą następnie wirowano w temperaturze 25°C przez 2 minuty przy prędkości 11 000 x g. Po usunięciu supernatantu dodawano 1 ml TRIzol i dokładnie mieszano. TRIzol (Total RNA Isolation) jest mieszaniną fenolu, izotiocyanianu guanidyny i innych związków, która prowadzi do lizy komórek i inaktywacji endogennych RNaz. Lizat zamrażano i rozmrażano (celem zwiększenia wydajności izolacji). W kolejnym etapie dodawano 200 µl chloroformu, worteksowano do otrzymania jednolitego zabarwienia i inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej. Wirowano (prędkość 17 000 x g) przez 15 minut w temperaturze 4°C. Wirowanie w obecności chloroformu powodowało utworzenie 3 warstw i tym samym rozdzielenie składników lizatu. Ostrożnie przenoszono górną fazę wodną (zawierającą RNA) do czystej probówki. Dodawano 500 µl izopropanolu w celu wytrącenia i koncentracji RNA, następnie worteksowano, inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej i wirowano 10 minut (prędkość 17 000 x g) w temperaturze pokojowej. Zlewano supernatant, wirowano punktowo i odciągano pozostałość supernatantu. Dodawano 1 ml etanolu 75%, worteksowano, wirowano 5 minut przy prędkości 6 500 x g w temperaturze pokojowej. Ponownie zlewano supernatant, wirowano punktowo i odciągano pozostałość etanolu. Suszono RNA w 55°C przez pięć minut. Rozpuszczano RNA w H₂O_{DEPC} w objętości 10-15 µl. Inkubowano 10 minut w 55°C.

4.3.3 Ocena ilościowa i jakościowa RNA

Celem sprawdzenia stężenia i czystości RNA dokonywano analizy spektrofotometrycznej z użyciem spektrofotometru kropłowego NanoDrop1000. Oceniano iloraz absorbancji A₂₆₀/A₂₃₀ oraz A₂₈₀/A₂₃₀ w celu oszacowania odpowiednio czystości organicznej oraz kontaminacji białkowej danej próbki. W badanym materiale dokonywano także pomiaru stężenia kwasów nukleinowych. Przyjęto, że stężenie RNA powinno wynosić przynajmniej 500 ng/µl, a próbkę powinna cechować czystość organiczna powyżej 1,2 oraz białkowa powyżej 1,4.

4.3.4 Odwrotna transkrypcja

Odwrotna transkrypcja (RT) to reakcja, w której wykorzystuje się enzym pochodzenia retrowirusowego, odwrotną transkryptazę, do przepisania sekwencji z RNA na DNA (cDNA). Etap ten jest niezbędny przy wszystkich badaniach, które wykonuje się z RNA.

Wykorzystywano gotowe zestawy do odwrotnej transkrypcji Superscript VILO cDNA Synthesis Kit firmy Life Technologies. W skład zestawu wchodził bufor VILO (5x stężony) oraz odwrotna transkryptaza (10x stężona). Bufor VILO rozmrażano na lodzie celem uniknięcia gwałtownej zmiany temperatury. Do reakcji wykorzystywano 1250 ng pozyskanego uprzednio RNA. Mieszaninę reakcyjną (Tabela 4) przygotowywano w próbówce reakcyjnej (0,2 ml) na lodzie.

Tabela 4. Składniki mieszaniny w przeliczeniu na pojedynczą reakcję odwrotnej transkrypcji.

Składnik		Stężenie końcowe
Bufor VILO		1x
Odwrotna transkryptaza		1x
RNA	maksymalnie 1250 ng 20 µl końcowej objętości reakcji	
H ₂ O _{DEPC}	uzupełnić do końcowej objętości	

Po dodaniu wody zawartość próbek dokładnie mieszano przez pipetowanie. Próbkówki reakcyjne przenoszono do termocyklera i uruchamiano odpowiedni program:

- i. 25°C, 10 minut
- ii. 42°C, 60 minut
- iii. 85°C, 5 minut
- iv. Pauza w temperaturze 4°C

Inkubację w 42°C można było wydłużyć do 120 minut, co wpływało korzystnie na wydajność reakcji.

4.4 Ocena jakościowa onkogenu *BCR-ABL1* metodą RT-PCR

Metoda multiplex PCR pozwala na wykrycie różnych transkryptów *BCR-ABL1* w jednym badaniu. Po etapie odwrotnej transkrypcji 2 µl cDNA poddawano reakcji multiplex RT-PCR. Do amplifikacji używano gotowych zestawów odczynników do PCR (PCR Taq Core Kit). W zestawie znajdowały się: bufor do PCR, MgCl₂, dNTP-y, Taq polimeraza. Primery - jednoniciowe fragmenty DNA o ściśle określonej sekwencji były w postaci liofilizowanej. Uzyskiwano stężenie starterów 100 µM poprzez podanie odpowiedniej ilości wody (H₂O_{DEPC}). Do badań używano tzw. stężenie robocze - zwykle 10 µM. Jako kontrolę wewnętrzną poprawności przebiegu reakcji stosowano gen referencyjny ludzkiej beta-glukuronidazy *GUSB*. Reakcję prowadzono równolegle dla próbek badanych, kontroli dodatniej (mieszanina transkryptów *BCR-ABL1*: e13a2, e14a2 oraz e1a2), kontroli ujemnej (cDNA osoby zdrowej) oraz kontroli bez matrycy cDNA. 5 µl produktu PCR rozdzielano na 1% żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydydy. Rozdział prowadzono przez okres 30 minut w buforze SB przy napięciu 180V. Do dokumentacji rozdziałów elektroforetycznych wykorzystywano transiluminator VL Infinity VX2 i oprogramowanie Scion Image. Zestawienie odczynników oraz warunki przebiegu reakcji PCR przedstawiono w Tabeli 5 i 6.

Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej RT-PCR na obecność onkogenu *BCR-ABL1*.

Odczynnik	Objętość (µl)
PCR bufor 10x	2,5
MgCl ₂ 25mM	1
dNTP 10mM	0,5
primer b1 A 10uM	0,5
primer a3 B 10uM	0,5
primer e1 A 10uM	0,5
primer e6 S2 10uM	0,5
primer c3 A 10uM	0,5
GUSB F	0,25
GUSB R	0,25
H ₂ O _{DEPC}	15,9
Taq polim.5U/ul	0,1
cDNA (50ng/µl)	2

Tabela 6. Warunki reakcji multiplex RT-PCR stosowanej do wykrywania onkogenu *BCR-ABL1*.

Etap	Temperatura	Czas
1.Denaturacja wstępna	95°C	30s
2.Denaturacja	94°C	30s
3.Annealing	65°C	60s
4.Elongacja	72°C	60s
Kroki 2-4 x35		
Elongacja końcowa	72°C	5min

W wyniku reakcji otrzymywano produkty o określonej wielkości (Tabela 7).

Tabela 7. Produkty onkogenu *BCR-ABL1* otrzymane po reakcji multiplex PCR o różnej wielkości rozdzielone za pomocą elektroforezy kapilarnej lub w żelu agarozowym.

Transkrypt <i>BCR</i>	Transkrypt <i>ABL1</i> a2	Transkrypt <i>ABL1</i> a3
e13 (b2)	342pz	168pz
e14 (b3)	417pz	243pz
e1	521pz	347pz
e6S2	621pz	447pz
e19 (c3)	586pz	412pz
<i>GUSB</i>	620pz	

4.5 Ocena ilościowa transkryptu *BCR-ABL1*

4.5.1 Ocena ilościowa transkryptu *BCR-ABL1* metodą RQ-PCR

Do wykonania badania wykorzystano gotowe zestawy odczynników do PCR zawierające: bufor do PCR, $MgCl_2$, dNTP, polimerazę Taq typu hot start. Do badań przygotowywano tzw. stężenie robocze - zwykle 10 mM. Składniki mieszaniny reakcyjnej wykorzystywane w badaniu zamieszczono w Tabeli 8.

Mieszaninę reakcyjną przygotowywano w probówce typu Eppendorf umieszczonej w naczyniu z lodem. W celu zminimalizowania zmienności wyników z wyprzedzeniem przygotowywano mieszaniny reakcyjne pozbawione wody, polimerazy oraz dNTP, a następnie przechowywano w zamrażarce (-20°C) do późniejszego wykorzystania.

Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej w przeliczeniu na pojedynczą reakcję RQ-PCR.

Składnik	Stężenie końcowe
Bufor do PCR	1x
MgCl ₂	2,5mM
dNTP	0,2mM
ENP541	0,2μM
ENPr1142	0,2μM
e14a2-addF	0,15μM
ENF501	0,3μM
ENR561	0,3μM
ENF1102	0,3μM
ENR1162	0,3μM
HotStart Taq	0,75 U
cDNA	5μl
H ₂ O _{DEPC}	uzupełnić do 25 μl

Każdorazowo przygotowywano o 7 reakcji więcej mieszaniny reakcyjnej niż przygotowanych próbek badanych oraz 5% zapasu w celu zniwelowania ewentualnych niedokładności wynikających z pipetowania. Reakcję prowadzono w probówkach reakcyjnych w pierwszej kolejności dodając 20 μl mieszaniny reakcyjnej, a następnie 5 μl cDNA. Do jednej z 7 nadprogramowych probówek dodawano wodę wykorzystując jako reakcję kontrolną bez matrycy. Do pozostałych probówek dodawano po 5 μl standardów ERM-623. Zamknięte probówki reakcyjne przenoszono do termocyklera RotorGene Q z zachowaniem kolejności próbek.

Wykorzystywano następujący profil termiczny reakcji:

- i. Hold 95°C, 15 minut
- ii. Cycling: 95°C, 15 sekund; 60°C, 30 sekund; 60 powtórzeń
- iii. wprowadzano odczyt fluorescencji na kanale żółtym (dla *BCR-ABL1*) i na kanale czerwonym (dla *GUSB*); na koniec etapu 60°C

Ostatecznie wynik obliczano według wzoru:

$$[\text{średnia ilość kopii } BCR-ABL1] / [\text{średnia ilość kopii } GUSB] \times CF \times 100$$

Wynik ekspresji genu *BCR-ABL1* wyrażany został w procentach, jako stosunek liczby kopii genu fuzyjnego *BCR-ABL1* do liczby kopii genu kontrolnego (*GUSB*)

wyliczonych na podstawie krzywej standardowej. Wystandaryzowany międzynarodowo (IS) wynik uzyskiwano przez korekcję o wartość czynnika korygującego (ang. *conversion factor*, CF) nadawanego indywidualnie dla każdego laboratorium biorącego udział w procesie standaryzacji w ramach EUTOS [114], [115], [116], [117]. Dla Pracowni Biologii Molekularnej LDH w trakcie wykonywania badań CF wyniósł 1. Wprowadzenie CF umożliwia ujednolicenie wyników ekspresji genu *BCR-ABL1*, tak aby wyniki uzyskiwane w różnych laboratoriach były porównywalne. Tym samym minimalizuje się różnice w oznaczeniu ekspresji genu wynikające z stosowania różnych genów kontrolnych czy różnych rodzajów odczynników.

Badanie było powtarzane w przypadku reakcji, których wydajność była niska lub w inny sposób reakcja znacząco odbiegała od innych (reakcję powtarzano z mniejszą ilością RNA w przeliczeniu na reakcję) oraz w przypadku reakcji, w których współczynnik zbieżności krzywej standardowej R^2 dla *BCR-ABL1* bądź *GUSB* wynosił mniej niż 0,995.

W przypadku stwierdzenia produktu PCR (lub nested PCR) sugerującego atypowy wariant transkryptu *BCR-ABL1* (inny niż e13a2 i e14a2) ocena ilościowa nie była wykonywana.

4.5.2 Ocena transkryptu *BCR-ABL1* metodą nested PCR

Równolegle do badania real-time PCR wykonywano dwustopniową reakcję typu nested PCR. Skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystywanej do pierwszej reakcji amplifikacji przedstawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Skład mieszaniny reakcyjnej do pierwszej amplifikacji nested PCR.

Składnik	Stężenie końcowe
Bufor do PCR	1x
MgCl ₂	2,5mM
dNTP	0,2mM
BCR-B1-A	0,5μM
ABL-A3-B	0,5μM
Taq polimerase	0,5 U
cDNA	2μl
H ₂ O _{DEPC}	uzupełnić do 25 μl

W każdej serii wykonywano reakcje kontrolne: kontrolę dodatnią (z obecnością transkryptu *BCR-ABL1* p210), kontrolę ujemną (bez obecności transkryptu *BCR-ABL1* p210) oraz kontrolę bez matrycy (z wodą zamiast cDNA).

Reakcje prowadzono w termocyklerze w probówkach reakcyjnych w poniższych warunkach:

- i. Denaturacja wstępna, 95°C, 30 sekund
- ii. 35 cykli składających się z następujących etapów:
 1. Denaturacja, 95°C, 30 sekund;
 2. Annealing, 65°C, 60 sekund;
 3. Elongacja, 72°C, 60 sekund;
- iii. Pauza, 4°C

Po zakończeniu reakcji przygotowywano mieszaninę reakcyjną do drugiej amplifikacji (Tabela 10).

Profil termiczny reakcji do drugiej amplifikacji był identyczny jak w przypadku pierwszej amplifikacji. Po zakończeniu reakcji produkty obu amplifikacji poddawane były elektroforezie (kapilarnej lub agarozowej). Po elektroforezie określano dla konkretnych próbek wynik (dodatni w pierwszej amplifikacji, dodatni w drugiej amplifikacji, bądź ujemny) oraz rodzaj transkryptu (e13a2, e14a2 bądź inny, atypowy).

Tabela 10. Skład mieszaniny reakcyjnej do drugiej amplifikacji nested PCR.

Składnik	Stężenie końcowe
Bufor do PCR	1x
MgCl ₂	2,5mM
dNTP	0,2mM
BCR-B2-C	0,5μM
ABL-A3-D	0,5μM
Taq polimerase	0,5 U
Produkt pierwszej amplifikacji	2μl
H ₂ O _{DEPC}	uzupełnić do 25 μl

Jednoczesne wykonywanie badania nested PCR i real-time PCR pozwalało na stwierdzenie korelacji pomiędzy badaniami:

- w przypadku ujemnego wyniku nested PCR, liczba kopii *BCR-ABL1* na reakcję nie mogła przekraczać jeden;

- w przypadku dodatniego wyniku nested PCR (II amplifikacja), liczba kopii *BCR-ABL1* na reakcję nie mogła przekraczać 25;
- w przypadku dodatniego wyniku nested PCR (I amplifikacja), liczba kopii *BCR-ABL1* na reakcję przekraczała 15.

Rozbieżności względem wyżej wymienionych kryteriów mogły świadczyć o zanieczyszczeniu próbek, mieszaniny reakcyjnej, błędzie pipetowania bądź zamianie kolejności próbek. W każdym przypadku ustalano przyczynę rozbieżności i podejmowano odpowiednie działania naprawcze i korygujące.

4.6 Badanie wariantów sekwencji domeny kinazowej BCR-ABL1 metodą sekwencjonowania

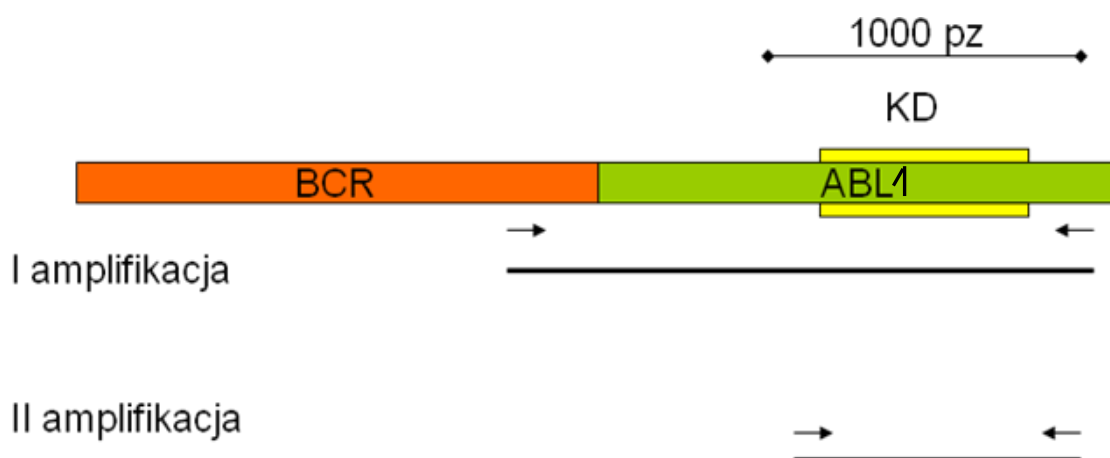
Test na obecność wariantów sekwencji nukleotydowej domeny kinazowej BCR-ABL1 (KD BCR-ABL1) powinien:

- bazować na analizie RNA,
- być przeprowadzany w oparciu o jednostopniowy PCR,
- obejmować całą domenę kinazową ABL1 z możliwością badania zmian dotyczących aminokwasów 244–486,
- cechować się specyficznością dla onkogenu *BCR-ABL1* (nie dla genu *ABL1*),
- posiadać czułość 20-30% (procent klonu z obecnością mutacji KD BCR-ABL1 w stosunku do typu dzikiego) [118], [119], [120].

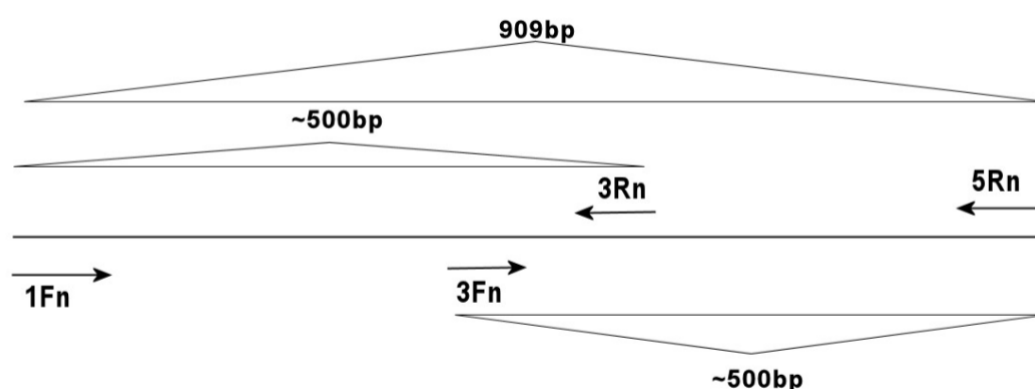
Celem maksymalizacji prawdopodobieństwa uzyskania czystej matrycy do sekwencjonowania, próbkę pacjenta uprzednio poddawano ocenie ilościowej poziomu transkryptu *BCR-ABL1*. Przygotowanie matrycy do sekwencjonowania odbywało się przy zastosowaniu strategii semi-nested PCR, z oczyszczaniem produktu po każdej amplifikacji (Rycina 14, 15). Do wykonania badań użyto gotowych zestawów odczynników do PCR zawierających bufor do PCR, $MgCl_2$, dNTP, polimerazę Taq. Startery syntetyzowane były na zamówienie i dostarczane w formie liofilizowanej. W celu uzyskania stężenia 100 mM do startera lub sondy dodawano H_2O_{DEPC} . Do badań wykorzystywano tzw. stężenie robocze - zwykle 10 mM.

Celem przygotowania reakcji PCR (I amplifikacja) matrycę (cDNA) rozcieńczano na podstawie wyniku ilościowego, tak, aby w 2 μ l znalazło się między 500 a 5000 kopii *BCR-ABL1*. Mniejsza ilość nie gwarantowała amplifikacji produktu, większa z kolei

stwarzała ryzyko wystąpienia produktów niespecyficznych (co często uniemożliwiało odczyt sekwencji).



Rycina 14. Schemat obrazujący umiejscowienie produktów reakcji semi-nested PCR. Kolorem żółtym zaznaczono obszar, w którym występują warianty sekwencji warunkujące oporność na leczenie TKI (źródło: opracowanie własne).



Rycina 15. Schemat prezentujący rozmieszczenie starterów do drugiej amplifikacji oraz starterów do znakowania matrycy (źródło: opracowanie własne).

Mieszaninę reakcyjną przygotowywano w próbówce typu Eppendorf umieszczonej w naczyniu z lodem (Tabela 11). W zależności od występującego u pacjenta transkryptu, stosowano odpowiedni starter *forward* (AuF1 w przypadku p210, BCR-E1-C w przypadku p190). Zamknięte próbówki reakcyjne umieszczano w termocyklerze w celu przeprowadzenia reakcji amplifikacji:

- i. Denaturacja wstępna, 94°C, 120 sekund
- ii. 30 cykli składających się z następujących etapów:
 1. Denaturacja, 94°C, 10 sekund
 2. *Annealing*, 63°C, 30 sekund
 3. Elongacja, 72°C, 120 sekund

- iii. Elongacja końcowa, 72°C, 7 minut
- iv. Pauza w temperaturze 4°C

Tabela 11. Składniki mieszaniny w przeliczeniu na pojedynczą reakcję I amplifikacji.

Składnik	Stężenie końcowe
Bufor do PCR	1x
MgCl ₂	2,5 mM
dNTP	0,2 mM
AuF1 lub BCR-E1-C	0,5 μM
AuRx	0,5 μM
Taq	0,5 U
Matryca (rozc. cDNA)	2 μl
H ₂ O _{DEPC}	Uzupełnić do 25 μl

Uzyskany produkt po reakcji PCR oczyszczano przy użyciu kolumnkowego zestawu (Qiagen QIAquick PCR purification kit lub Syngen PCR mini kit) wg instrukcji producenta. Oczyszczony produkt I amplifikacji rozcieńczano w wodzie 1:200 celem przygotowania matrycy do II amplifikacji. Mieszaninę reakcyjną przygotowywano w próbówce typu Eppendorf umieszczonej w naczyniu z lodem (Tabela 12).

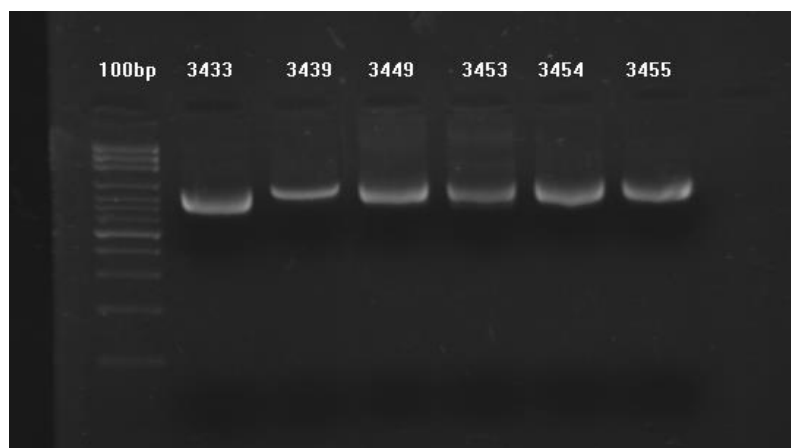
Tabela 12. Składniki mieszaniny w przeliczeniu na pojedynczą reakcję II amplifikacji.

Składnik	Stężenie końcowe
Bufor do PCR	1x
MgCl ₂	2,5 mM
dNTP	0,2 mM
KD1Fn	0,5 μM
KD5Rn	0,5 μM
Taq	0,5 U
Matryca (rozc. cDNA)	2 μl
H ₂ O _{DEPC}	Uzupełnić do 25 μl

Zamknięte próbówki reakcyjne umieszczano w termocyklerze w celu przeprowadzenia reakcji amplifikacji:

- i. Denaturacja wstępna, 94°C, 10 minut
- ii. 35 cykli składających się z następujących etapów:
 - 1. Denaturacja, 94°C, 30 sekund
 - 2. *Annealing*, 62°C, 45 sekund
 - 3. Elongacja, 72°C, 60 sekund
- iii. Elongacja końcowa, 72°C, 2 minuty
- iv. Pauza w temperaturze 4°C

Uzyskany produkt po reakcji PCR oczyszczano i poddawano elektroforezie w 1% żelu agarozowym (Rycina 16).



Rycina 16. Elektroforegram produktu uzyskanego po reakcji semi-nested PCR rozdzielnego w 1% żelu agarozowym wykorzystywany do sekwencjonowania (ścieżka pierwsza od lewej – marker wielkości; ścieżki kolejne - produkt w postaci wyraźnego i pojedynczego prążka) (źródło: opracowanie własne; zdjęcie wykonano w Pracowni Biologii Molekularnej Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej).

Opisane próbówki z matrycami oraz starterami do znakowania (KD3Fn oraz KD3Rn) dostarczano do Wydziałowej Pracowni Technik Biologii Molekularnej Wydziału Biologii UAM, gdzie dokonywano sekwencjonowania przygotowanego i oczyszczonego fragmentu (wg zmodyfikowanej metodyki dostępnej w literaturze) [119]. Niezależnie sekwencjonowano uzyskane produkty PCR z obu kierunków, stosowano w trakcie sekwencjonowania odczynnik Big Dye 3 terminator (metodyka wg producenta), przeprowadzano elektroforezę kapilarną 2-10 μ l (w zależności od używanego sekwenatora) oczyszczonego produktu PCR.

Sekwenogramy analizowano wykorzystując program SeqMan z pakietu DNASTar Lasergene 8.0. Analizowano zgodność odczytanej sekwencji z sekwencją referencyjną (X16416 wg GeneBank). Każdorazowo zwracano szczególną uwagę na czytelność nukleotydów od 800 do 1650 oraz na ewentualną obecność opisanych dotychczas polimorfizmów w genie *ABL1*: 894A>G, 1062A>G, 1334G>T, 1335T>G, 1375A>G. W momencie stwierdzenia rozbieżności między sekwencją analizowaną a referencyjną, potwierdzano badanie w drugiej próbce RNA wyizolowanej od chorego w tym samym czasie (lub z tej samej próbki RNA).

Zapisywano zmianę w sekwencji zarówno nukleotydowej, jak i aminokwasowej:

- i. numerację aminokwasów odpowiadającą natywnemu białku ABL1
- ii. pozycję nukleotydową 799 odpowiadającą aminokwasowi 218 (sekwencja referencyjna zawiera 5'UTR)
- iii. fragment chromatogramu zawierający zmianę zapisywano w osobnym pliku graficznym
- iv. sprawdzano w literaturze informacje dotyczące wrażliwości danego wariantu na inhibitory kinaz tyrozynowych [118], [120].

4.7 Kryteria podziału i klasyfikacji pacjentów do porównywanych grup

Analiza pacjentów głównie opierała się na klasyfikacji do poszczególnych grup w zależności od obecności bądź braku badanych zmian genetycznych: wybranych aberracji chromosomowych oraz wariantów sekwencji KD BCR-ABL1. W przypadku analizy pacjentów z ACA/Ph⁺ podział na poszczególne grupy chorych uwzględniał czas stwierdzenia aberracji, ich liczbę oraz rodzaj. Uwzględniono również klasyfikację Mitelmana i wsp. bazującą na częstości występowania ACA/Ph⁺ [1] oraz klasyfikację Gonga i wsp. związaną z ryzykiem progresji do zaawansowanych faz choroby [182].

4.8 Analiza statystyczna uzyskanych wyników

Obliczenia statystyczne wykonano przy pomocy pakietu R w wersji 4.0.2. W przypadku danych jakościowych, przyjęto $p\text{-value} < 0,05$ za poziom istotności statystycznej uzyskany dla dokładnego testu Fishera. Również taki poziom istotności przyjęto dla danych ilościowych, które w większości cechował rozkład odbiegający od rozkładu normalnego, stąd w analizach dwóch grup wykorzystano alternatywnie dwustronny test Manna-Whitneya-Wilcoxona. Dla zbadania różnic w większej liczbie grup skorzystano z jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), a także nieparametrycznego wariantu tego testu, jakim jest test Kruskalla-Wallisa. Wreszcie wykorzystano testy *post-hoc* w oparciu o metodę wielokrotnych porównań średnich rang (test Tukeya) z korektami na wielokrotne testowanie (korekta Yatesa, korekta Holma w zależności od liczby analizowanych grup). Analizę prawdopodobieństwa całkowitego przeżycia szacowano metodą Kaplana-Meiera.

5. WYNIKI

5.1 Klasyczna translokacja t(9;22)(q34;q11.2)

W badanej grupie (n=215) u 189 pacjentów (87,9%) zaobserwowano chromosom Philadelphia powstały w wyniku klasycznej translokacji zrównoważonej t(9;22)(q34;q11.2) charakterystycznej dla CML. Grupa pacjentów z translokacją klasyczną stanowiła grupę odniesienia dla pacjentów z translokacjami wariantowymi (opisanymi poniżej). Charakterystykę obu grup przedstawiono w Tabeli 13.

Porównując grupę chorych z klasyczną translokacją t(9;22) z grupą pacjentów z translokacjami wariantowymi stwierdzono zbieżne dane w odniesieniu do danych demograficznych, hematologicznych oraz oceny wskaźników prognostycznych. Jedynie splenomegalię obserwowano istotnie częściej w grupie pacjentów z translokacją wariantową (p=0,03). Częstość występowania delekcji *ABL1* lub/i *BCR* oraz dodatkowych aberracji chromosomowych w klonie Ph-dodatnim była porównywalna w badanych grupach. W dwóch analizowanych grupach dominował transkrypt e14a2, natomiast warianty sekwencji KD BCR-ABL1 występowały częściej u pacjentów z translokacją wariantową (4/13; 30,8% vs. 19/189; 10%). Tylko w grupie pacjentów z klasyczną translokacją t(9;22) stwierdzono nietypowe rodzaje transkryptu *BCR-ABL1* (4/189; 2,1%): e14a3 u dwóch pacjentów, e19a2 u jednego pacjenta oraz e13a2 z mikrodelecją u jednego pacjenta. Również w tej grupie znaleźli się pacjenci z jednoczesną ekspresją transkryptu e14a2 i e13a2 (3/189; 1,6%).

U pacjentów z translokacją wariantową zaobserwowano większą liczbę chorych z transformacją do fazy akceleracji/kryzy blastycznej w trakcie trwania choroby (23,1% vs. 5,8%; p=0,05, na granicy istotności statystycznej) oraz wyższy odsetek śmierci (30,8% vs. 9,5%; p=0,03).

Tabela 13. Porównanie wybranych parametrów kliniczno-laboratoryjnych i skal prognostycznych pomiędzy grupą pacjentów z translokacją wariantową i translokacją klasyczną t(9;22).

Badany parametr		Pacjenci z translokacją wariantową (n=13)	Pacjenci z translokacją klasyczną (n=189)	p-value
Mediana wieku zachorowania w latach; (zakres)		51 (23-69)	51 (9-84)	0,5925
Płeć męska/żeńską; n (%)		5/8 (38,5/61,5)	92/97 (48,7/51,3)	0,5723
Powiększenie śledziony przy rozpoznaniu; n (%)		12 (92,3)	118 (62,4)	0,0349
WBC 10 ⁹ /L przy rozpoznaniu; mediana (zakres)		89 (14-426)	95 (2-658)	0,834
Hg mmol/l przy rozpoznaniu; mediana (zakres)		7,3 (5,0-8,8)	7,4 (3,5-13,0)	0,5915
PLT 10 ⁹ /L przy rozpoznaniu; mediana (zakres)		562 (85-2746)	419 (42-2299)	0,0711
Blasty we krwi przy rozpoznaniu; mediana % (zakres)		2 (0-15)	1 (0-68)	0,0801
Eozynofile we krwi przy rozpoznaniu; mediana % (zakres)		3 (0-20)	2 (0-17)	0,9465
Bazofile we krwi przy rozpoznaniu; mediana % (zakres)		2 (0-14)	2 (0-29)	0,8142
Ocena ryzyka wg Sokala; n (%)	niskie	2 (15,4)	68 (36)	0,2567
	pośrednie	6 (46,1)	74 (39,1)	
	wysokie	5 (38,5)	47 (24,9)	
Ocena ryzyka wg Hasforda (Euro); n (%)	niskie	4 (30,8)	81 (42,8)	0,327
	pośrednie	6 (46,1)	88 (46,6)	
	wysokie	3 (23,1)	20 (10,6)	
Ocena ryzyka wg Eutos; n (%)	niskie	10 (83,3)	177 (93,7)	0,1989
	wysokie	2 (16,7)	12 (6,3)	
Ocena ryzyka wg ELTS; n (%)	niskie	7 (53,8)	117 (61,9)	0,72
	pośrednie	4 (30,8)	41 (21,7)	
	wysokie	2 (15,4)	31 (16,4)	
Faza choroby przy rozpoznaniu; n (%)	CP	10 (76,9)	168 (88,9)	0,2047
	AP	2 (15,4)	16 (8,5)	
	BP	1 (7,7)	5 (2,6)	
ACA/Ph+; n (%)		4 (30,8)	48 (25,4)	0,7439
Delecja ABL1 lub/i BCR; n (%)		1 (7,7)	19 (10)	0,99
Transkrypt	e13a2 (b2a2); n (%)	4 (30,8)	61 (32,3)	0,99
	e14a2 (b3a2); n (%)	9 (69,2)	121 (64)	
	inny/koekspresja; n (%)	0	4 (2,1) / 3 (1,6)	
Warianty KD BCR-ABL1; n (%)		4 (30,8)	19 (10)	0,0528
Transformacja do BP/AP; n (%)		2 (15,4)	19 (10)	0,0503
AlloBMT po niepowodzeniu leczenia TKI; n (%)		3 (23,1)	11 (5,8)	0,99
Śmierć; n (%)		4 (30,8)	18 (9,5)	0,0393

Skróty: ACA/Ph+, dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie komórek Philadelphia-dodatnim; alloBMT, allogeniczny przeszczep szpiku kostnego; AP, faza akceleracji; BP, faza przełomu blastycznego; CP, faza przewlekła; Hb, hemoglobina; KD, domena kinazowa; PLT, trombocyty; TKI, inhibitor kinaz tyrozynowych; WBC, leukocyty

5.2 Translokacje wariantowe

U 21 chorych (9,8%) wykryto translokacje wariantowe skutkujące powstaniem chromosomu Philadelphia. Dane kliniczno-laboratoryjne zebrano od 13 chorych (Tabela 14). Mediana wieku rozpoznania choroby wyniosła 51 lat. U 12 osób potwierdzono splenomegalię w badaniu USG jamy brzusznej. Chorobę rozpoznano w fazie przewlekłej u dziesięciu chorych, w fazie akceleracji u dwóch chorych oraz w fazie kryzy blastycznej u jednego chorego. U wszystkich pacjentów stwierdzono leukocytozę (mediana liczby leukocytów wyniosła $89 \times 10^9/l$). Spadek stężenia hemoglobiny stwierdzono u siedmiu badanych. Nadpłytkowość stwierdzono u dziesięciu chorych, natomiast małopłytkowość u jednego pacjenta. Wszyscy pacjenci byli leczeni imatynibem. U siedmiu pacjentów konieczne było zastosowanie inhibitorów drugiej generacji (dazatynib zastosowano u czterech pacjentów, nilotynib – u trzech chorych). Czterech chorych wymagało zastosowania leczenia TKI w trzeciej linii: w trzech przypadkach zastosowano nilotynib, w jednym – dazatynib. Mediana czasu obserwacji od rozpoczęcia leczenia TKI do ostatniego badania cytogenetycznego wyniosła 42 miesiące.

Translokacje wariantowe (opisane w Tabeli 15) u 17 chorych obejmowały, poza chromosomem pary 9 i 22, jeden dodatkowy chromosom autosomalny (17/20; 85%; Rycina 17B, 17C). U jednej pacjentki stwierdzono zaangażowanie dwóch dodatkowych chromosomów (nr 203; Rycina 17A), u jednego pacjenta – trzech dodatkowych chromosomów (nr 207). Natomiast w karyotypie pacjentki nr 210 obserwowano translokację wariantową z zaangażowaniem tylko dwóch chromosomów: pary 9 i 22, przy czym punkt złamania chromosomu 22 obejmował zarówno ramię długie oraz ramię krótkie.

Tabela 14. Charakterystyka kliniczno-laboratoryjna pacjentów z translokacją wariantową.

W chwili rozpoznania choroby										
L.p.	Nr pacjenta	Wiek	Płeć	Spleno- megalia	WBC (x10 ⁹ /l)	Hb (mmol/l)	PLT (x10 ⁹ /l)	Faza choroby	TKI	Czas obserwacji (m-ce) *
1	190	53	K	tak	84,3	6,1	2746	AP	IM DA NIL	103
2	191	56	K	tak	14,4	8,5	825	CP	IM	30
3	192	49	M	tak	89	7,8	85	BP	IM NIL	42
4	193	36	M	tak	253,5	6,1	269	CP	IM NIL	38
5	194	23	M	tak	43,8	5	553	CP	IM	50
6	195	62	M	tak	31,2	8,1	872	CP	IM	36
7	196	45	K	tak	426	7,3	516	AP	IM DA	15
8	197	69	K	tak	114	6,4	1360	CP	IM DA NIL	74
9	198	50	M	tak	133,2	7,9	550	CP	IM NIL DA	118
10	199	49	K	tak	219	5,9	663	CP	IM DA NIL	53
11	200	66	K	nie	42	8,7	562	CP	IM	36
12	201	55	K	tak	90,2	5,6	181	CP	IM	6
13	202	51	K	tak	74,9	8,8	801	CP	IM	96
14	203	bd	K	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd
15	204	bd	K	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd
16	205	bd	M	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd
17	206	bd	K	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd
18	207	bd	M	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd
19	208	bd	M	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd
20	209	bd	M	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd
21	210	bd	K	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd

* od włączenia TKI do ostatniego badania cytogenetycznego
Skróty: AP, faza akceleracji; bd, brak danych; BP, przełom blastyczny; CP, faza przewlekła; DA, dazatynib; Hb, hemoglobina; IM, imatynib; K, kobieta; M, mężczyzna; NIL, nilotynib; PLT, trombocyty; TKI, inhibitor kinazy tyrozynowej; WBC, leukocyty

Tabela 15. Charakterystyka cytogenetyczna pacjentów z translokacją wariantową.

L.p.	Nr pacjenta	Translokacja wariantowa	Punkt złamania chromosomu zaangażowanego w translokację wariantową	Punkt złamania w jasnym prążku G	FISH D-BCR-ABL1 Dominujący wzór hybrydyzacji	Status delecji	Mechanizm	Odpowiedź cytogenetyczna w 12 miesiącu	Odpowiedź cytogenetyczna (ostatnie badanie)
1	190	t(7;9;22)(q11.2;q34;q11.2)	7q11.2	tak	1Y2R2G / 2Y2R2G [¶]		jedno-stopniowy	noCyR	noCyR
2	191	t(9;22;19)(q34;q11.2;q13.3)	19q13.3	tak	1Y2R2G		jedno-stopniowy	CCyR	CCyR
3	192	t(6;9;22)(p21;q34;q11.2)	6p21	tak	1Y2R2G		jedno-stopniowy	CCyR	CCyR
4	193	t(2;9;22)(q11.2;q34;q11.2)	2q11.2	tak	1Y2R2G		jedno-stopniowy	noCyR	CCyR
5	194	t(9;22;16)(q34;q11.2;p11.2)	16p11	tak	1Y2R2G		jedno-stopniowy	CCyR	CCyR
6	195	t(9;22;V)(q34;q11.2;?) – tylko FISH	?	?	1Y2R2G		jedno-stopniowy	CCyR	CCyR
7	196	t(9;22;11)(q34;q11.2;q12)	11q12	nie	1Y2R2G		jedno-stopniowy	minCyR	minCyR
8	197	t(9;22;22)(q34;q11.2;q13)	22q13	tak	1Y2R2G or 1Y2R1G ⁺		jedno-stopniowy	noCyR	CCyR
9	198	t(8;9;22)(q22;q34;q11.2)	8q22	tak	1Y2R2G/ 2Y2R2G [¶]		jedno-stopniowy	noCyR	noCyR
10	199	t(1;9;22)(q32;q34;q11.2)	1q32	tak	1Y1R2G	delecja ABL1	jedno-stopniowy	PCyR	PCyR

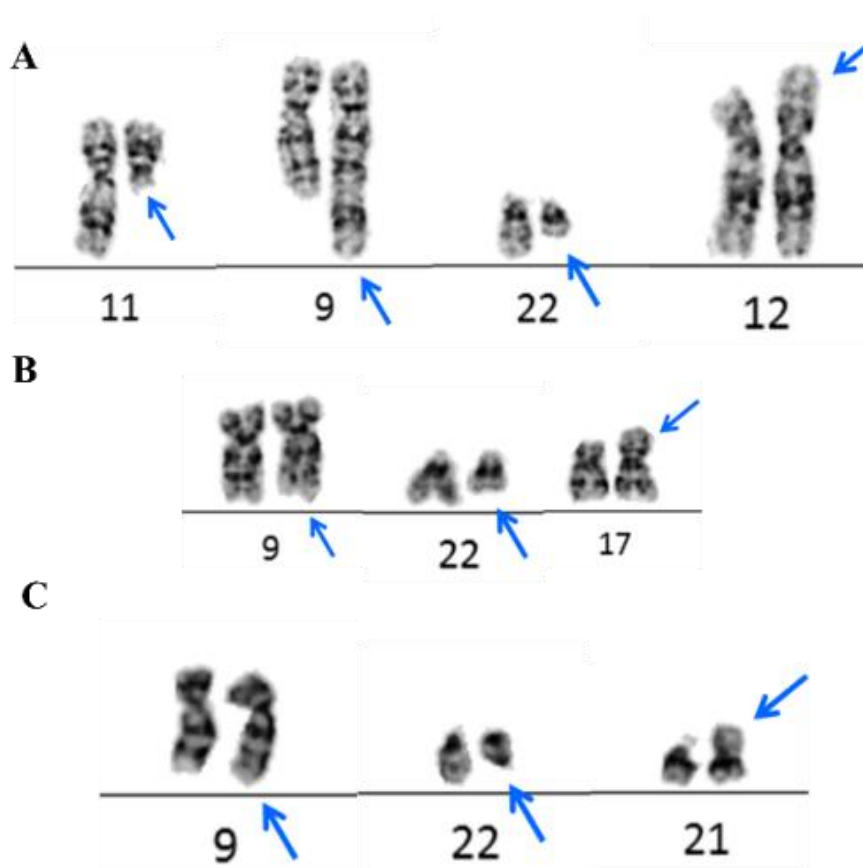
11	200	t(9;22;15)(q34;q11.2;q15)	15q15	tak	1Y2R2G		jedno-stopniowy	CCyR	CCyR
12	201	t(1;9;22)(p36.1;q34;q11.2)	1p36.1	tak	1Y2R2G		jedno-stopniowy	noCyR*	noCyR
13	202	t(9;22;15)(q34;q11.2;q22)	15q22	tak	1Y2R2G		jedno-stopniowy	CCyR	CCyR
14	203	t(11;9;22;12)(q12;q34;q11.2;p13)	11q12/12p13	nie/tak	1Y2R2G		jedno-stopniowy	bd	bd
15	204	t(9;22;17)(q34;q11.2;q21)	17q21	tak	1Y2R2G		jedno-stopniowy	bd	bd
16	205	t(9;22;17)(q34;q11.2;p13)	17p13	tak	1Y2R2G		jedno-stopniowy	CCyR	CCyR
17	206	t(9;22;21)(q34;q11.2;p11.1)	21p11.1	centro-mer	1Y2R2G		jedno-stopniowy	CCyR	PCyR
18	207	der(5)(22qter→22q11.2::5p13?→5qter), der(8)(8pter→8q24::9q13→9q34::10q21→10qter), der(9)(9pter→9q13), der(10)(10pter→10q21::?5p13→5pter), der(22)(22pter→22q11.2::9q34→9qter)	5p13/8q24/10q21	tak/tak/nie	1Y2R2G		wielo-stopniowy	bd	CCyR
19	208	t(9;22;11)(q34;q11;p14)	11p14	nie	1Y2R2G		jedno-stopniowy	bd	CCyR
20	209	t(9;22;17)(q34;q11;q23)	17q23	tak	1Y1R2G	delecja ABL1	jedno-stopniowy	noCyR	noCyR
21	210	t(9;22;22)(q34;q11.2;p12)	22p12	nie	1Y2R2G		jedno-stopniowy	PCyR	PCyR

* odpowiedź cytogenetyczna w 6 miesiącu

¶ dodatkowa kopia *BCR-ABL1*

+ w zależności od długości chromosomu

Skróty: bd, brak danych; CCyR, całkowita odpowiedź cytogenetyczna; FISH, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*; G, sygnał zielony; minCyR, minimalna odpowiedź cytogenetyczna; noCyR, brak odpowiedzi cytogenetycznej; p, ramię krótkie chromosomu; PCyR, częściowa odpowiedź cytogenetyczna; q, ramię długie chromosomu; R, sygnał czerwony; Y, sygnał fuzyjny



Rycina 17. Częściowe kariogramy prezentujące translokacje wariantowe: A) $t(11;9;22;12)(q12;q34;q11.2;p13)$ u pacjentki nr 203; B) $t(9;22;17)(q34;q11.2;p13)$ u pacjenta nr 205; C) $t(9;22;21)(q34;q11.2;p11.1)$ u pacjentki nr 206; strzałkami zaznaczono chromosomy pochodne powstałe w wyniku translokacji (źródło: opracowanie własne; zdjęcie wykonano w Pracowni Cytogenetyki Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej).

U pacjenta nr 195 nie uzyskano metafaz do analizy kariotypu, jednak wzór hybrydyzacji dla sondy D-BCR/ABL1 w badaniu FISH sugerował wystąpienie translokacji wariantowej. Najczęściej zaangażowanym chromosomem w translokacji był chromosom 11 ($n=3$) oraz chromosom 17 ($n=3$). Zidentyfikowano 23 punkty złamań w obrębie dodatkowych chromosomów zaangażowanych w 20 translokacji wariantowych.

Najczęściej stwierdzonym punktem złamania (poza regionem 9q34 i 22q11.2) biorącym udział w translokacji wariantowej był region 11q12 (pacjentka nr 196 i 203). Ramiona długie chromosomów były częściej zaangażowane w translokacje ($n=14$; 61%) niż ramiona krótkie. Punkty złamań w większości przypadków były zlokalizowane w jasnych prążkach G-negatywnych ($n=17$; 74%). Pozostałe punkty złamań zlokalizowane zostały w ciemnych prążkach G-pozytywnych (10q21, 11p14, 11q12; 22p12) oraz w regionie okołocentromerowym (21p11.1).

Dodatkowe aberracje w klonie komórek Philadelphia-dodatnim potwierdzono u siedmiu z 21 (33%) pacjentów (Tabela 16). Ewolucję kariotypu zaobserwowano u czterech pacjentów. Najczęściej występowała trisomia 8 (n=4), monosomia 21 (n=3), dodatkowy chromosom Ph, izochromosom Ph, monosomia 22 i utrata chromosomu płci Y (n=2). U pacjentki nr 197 potwierdzono konstytutywny charakter translokacji zrównoważonej t(3;7)(p25;q34), natomiast u pacjenta nr 198 kariotyp był prawidłowy po 72 godzinnej hodowli *in vitro* komórek krwi stymulowanych LF-7. Wskazuje to, że wszystkie aberracje chromosomowe występujące w komórkach szpiku kostnego pacjenta nr 198 były związane z przebiegiem choroby.

Tabela 16. Dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie Ph-dodatnim wskazujące na ewolucję kariotypu u pacjentów z translokacją wariantową.

Nr pacjenta	Kariotyp	Aberracja	ACA/Ph+	Obecność w trakcie terapii innym TKI
			Czas stwierdzenia	
190	46,XX,t(7;9;22)(q11;q34;q11.2)[3]/ 47,XX,idem,+8[20]	+8	57 miesiąc leczenia IM	+
	46,XX,t(7;9;22)(q11.2;q34;q11.2)[24]/ 44~45,XX,idem,-21[3],-der(22)	-21,-der(22)	22 miesiąc leczenia DA	+
	t(7;9;22)(q11.2;q34;q11.2)[3][cp5]/ 46,XX,idem,ider(22)(q10)	ider(22) (q10)		-
	t(7;9;22)(q11.2;q34;q11.2)[1]			
193	46,XX,t(7;9;22)(q11.2;q34;q11.2)[2]/ 46,XX,idem,ider(22)(q10)	ider(22) (q10)	trzeci miesiąc leczenia NIL	+
	t(7;9;22)(q11.2;q34;q11.2)[19]			
	46,XY,t(2;9;22)(q11.2;q34;q11.2)[17]/ 45,XY,idem,-20[3]	-20	rozpoznanie	-
197	46,XY,t(2;9;22)(q11.2;q34;q11.2)[22]/ 45,X,-Y,idem[3]/48,XY,idem,+8, +der(22)t(2;9;22)(q11.2;q34;q11.2)[2]/	-Y +8, +der(22)	trzeci miesiąc leczenia IM	-
	46,XX,t(3;7)(p25;q34), t(9;22;22)(q34;q11.2;q13)[20]	t(3;7) (p25;q34)	rozpoznanie	+

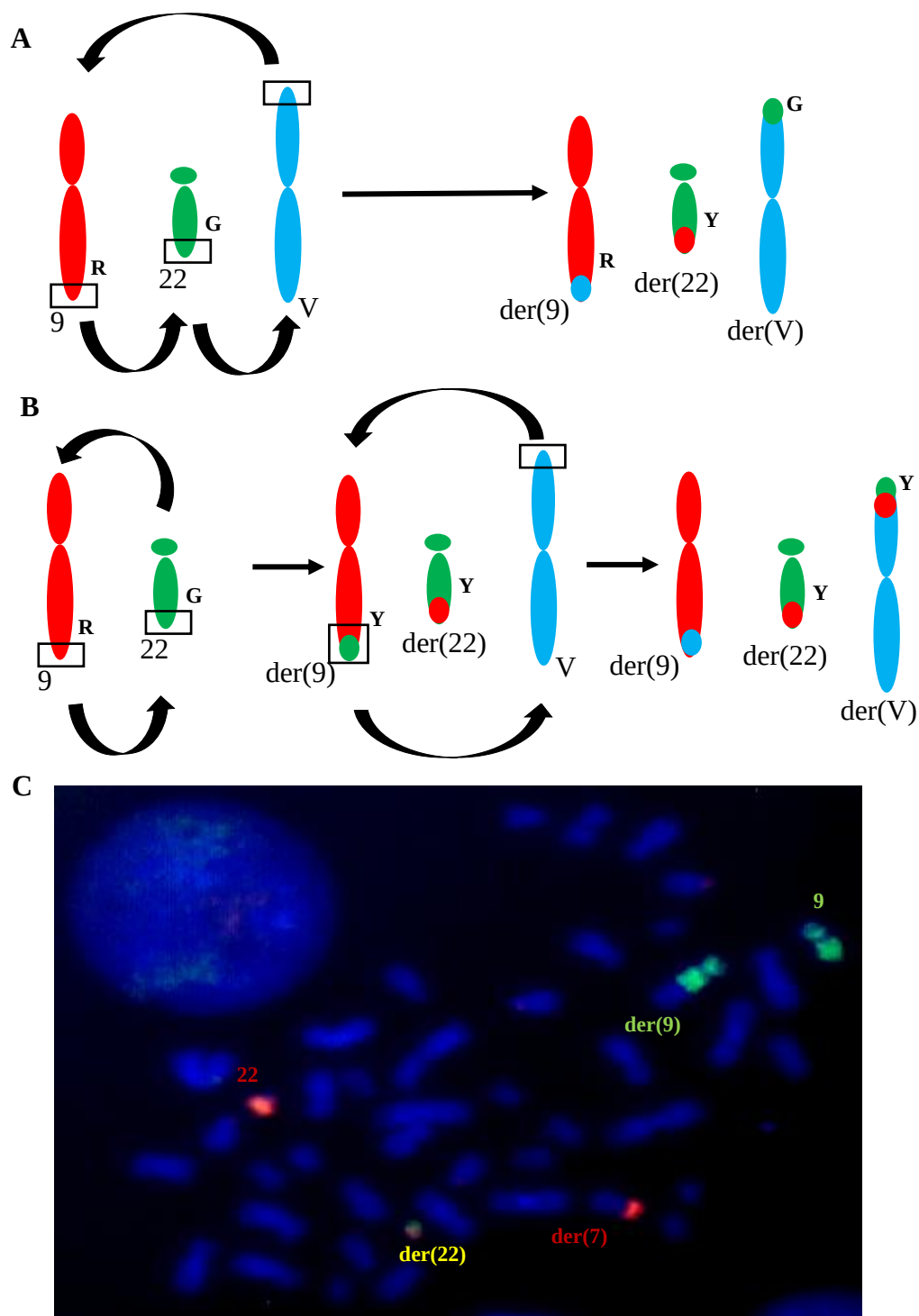
198	45,X,-Y,t(8;9;22)(q22;q34;q11.2), der(12)t(12;17;18)(q13;q?;q?), der(17)t(12;17;18)(q13;q12;?), der(17)t(17;18)(q12;?)[25]	-Y, der(12), der(17), der(17)	rozpoznanie	+
	46,X,-Y,idem,+der(22) t(9;22)(q34;q11.2)[25]	+der(22)	szósty miesiąc leczenia DA	*
	44~46,X,-Y[30],t(8;9;22) (q22;q34;q11.2)[30], der(12)t(12;17;18)(q13;q?;q?)[29], -15[3],der(17)t(12;17;18) (q13;q12;?)[30], der(17)t(17;18) (q12;?)[28],-20[5],-21[5], +der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[26][cp30]	-15,-20,-21	68 miesiąc leczenia DA	*
	43~46,X,-Y[20],t(8;9;22) (q22;q34;q11.2)[20], der(12)t(12;17;18)(q13;q?;q?)[19], der(17)t(12;17;18)(q13;q12;?)[20], der(17)t(17;18)(q12;?)[18],-19[4], -20[3],-21[3],+der(22)t(9;22) (q34;q11.2)[17][cp20]	-19	74 miesiąc leczenia DA	*
	46,X,-Y,t(8;9;22)(q22;q34;q11.2), der(12)t(12;17;18)(q13;q12;?), der(17)t(17;18;18)(q13;q?;q?), der(17)t(12;17;18)(q12;?), +der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[14]/ 48,idem,+8, +der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[8]	+8	78 miesiąc leczenia DA	*
201	46,XX,t(1;9;22)(p36.1;q34;q11.2)[9]/ 90~92,XXXX,t(1;9;22) (p36.1;q34;q11.2)x2[6],-4[3],-6[3][cp6]	<4n>	drugi miesiąc leczenia IM piąty miesiąc leczenia IM	*
	46,XX,t(1;9;22)(p36.1;q34;q11.2)[18]/ 47,XX,idem,+8[1]	+8		*
204	46,XX,t(9;22;17)(q34;q11.2;q21), t(6;11)(p21;p15)[21]/ 46,XX,ins(1;6)(q21;q23q27), t(9;22;17)(q34;q11.2;q21), t(6;11)(p21;p15)[4]/ 46X,-X,t(9;22;17)(q34;q11.2;q21), t(6;11)(p21;p15),+mar[1]	t(6;11) (p21;p15), ins(1;6) (q21;q23q27), -X, +mar	bd	bd
210	46,XX,-8,?der(22)t(9;22;22) (q34;q11.2;p?12),+mar1[3]/ 46,XX,-21,?der(22)t(9;22;22) (q34;q11.2;p?12),+mar2[2]/46,XX[14]	-8, +mar1 -21, +mar2	bd	bd

* ostatnia linia leczenia TKI lub alloBMT

Skróty: ACA/Ph+, dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie komórek Philadelphia-dodatnim; alloBMT, allogeniczny przeszczep szpiku kostnego; bd, brak danych; DA, dazatynib; IM, imatynib; NIL, nilotynib; TKI, inhibitory kinaz tyrozynowych

Badanie FISH z sondą LSI BCR/ABL1 zostało wykonane we wszystkich 21 przypadkach i pozwoliło wykryć fuzję genową *BCR-ABL1*. Najczęstszym wzorem hybrydyzacji był 1Y2R2G (19 przypadków; 90,5%): sygnał fuzyjny zlokalizowany był na pochodnym chromosomie 22 powstałym na skutek translokacji pomiędzy długimi ramionami chromosomu pary 9 i 22 - der(22)t(9;22)(q34;q11.2), dwa czerwone sygnały – jeden na prawidłowym chromosomie 9 i drugi na pochodnym chromosomie 9 powstałym na skutek translokacji pomiędzy długim ramieniem tego chromosomu i fragmentem chromosomu trzeciego (V) zaangażowanego w translokację wariantową – der(9)t(9;V)(q34;?) oraz dwa zielone sygnały na prawidłowym chromosomie 22 i na trzecim chromosomie zaangażowanym w translokację wariantową – der(V)t(V;22)(?;q11.2). Stwierdzony wzór hybrydyzacji wskazywał na jednostopniowy mechanizm powstania translokacji wariantowej, w której trzy chromosomy uczestniczyły jednocześnie w tworzeniu przegrupowania genów *BCR* i *ABL1* (Tabela 15; Rycina 18A, 18C). W jednym przypadku (nr 203; 4,8%) w jednostopniowym mechanizmie powstania translokacji wariantowej uczestniczyły cztery chromosomy, w jednym przypadku (nr 210; 4,8%) – dwa chromosomy.

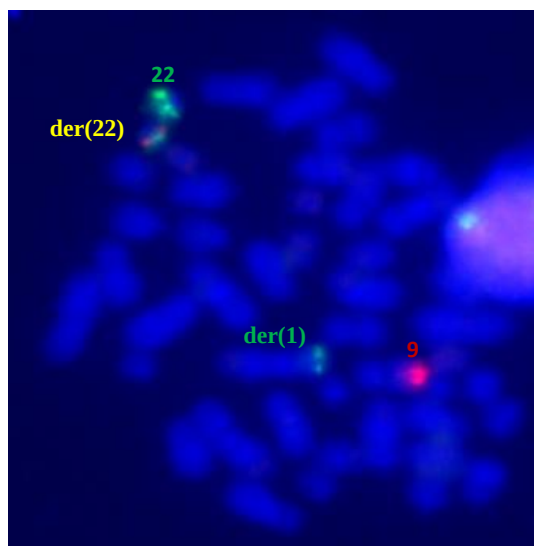
Translokacje wariantowe powstałe w mechanizmie dwustopniowym są wynikiem typowej translokacji t(9;22) po której następuje wtórna translokacja między chromosomem pochodnym pary 9 – der(9)t(9;22)(q34;q11.2) z fuzją genową *ABL1-BCR*, a trzecim chromosomem zaangażowanym w translokację – der(V) (Rycina 18B). W takich przypadkach obserwuje się dwa sygnały fuzyjne (jeden na chromosomie Ph i drugi na trzecim zaangażowanym chromosomie V), jeden sygnał czerwony (na prawidłowym chromosomie 9) i jeden sygnał zielony (na prawidłowym chromosomie 22). W badanej grupie nie stwierdzono wzoru hybrydyzacji typowego dla translokacji wariantowej powstałej w mechanizmie dwustopniowym (2Y1R1G).



Rycina 18. Schemat przedstawiający mechanizm powstania translokacji wariantowej: A) mechanizm jednostopniowy z rozkładem sygnałów w analizie FISH z sondą LSI BCR/ABL1 DF; G-sygnal zielony, R-sygnal czerwony, Y-sygnal żółty (fuzyjny); V-trzeci chromosom zaangażowany w translokację wariantową; B) mechanizm dwustopniowy z rozkładem sygnałów w analizie FISH z sondą LSI BCR/ABL1 DF; C) badanie FISH z sondami malującymi chromosomy 9 (kolor zielony) i 22 (kolor czerwony) potwierdzające jednostopniowy mechanizm powstania translokacji wariantowej $t(7;9;22)(q11.2;q34;q11.2)$ u pacjentki nr 190. W wyniku aberracji chromosomowej w karyotypie obserwowano trzy chromosomy pochodne: $der(7)t(7;22)$, $der(9)t(7;9)$ i $der(22)t(9;22)$ (źródło: opracowanie własne; zdjęcie wykonano w Pracowni Cytogenetyki Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej).

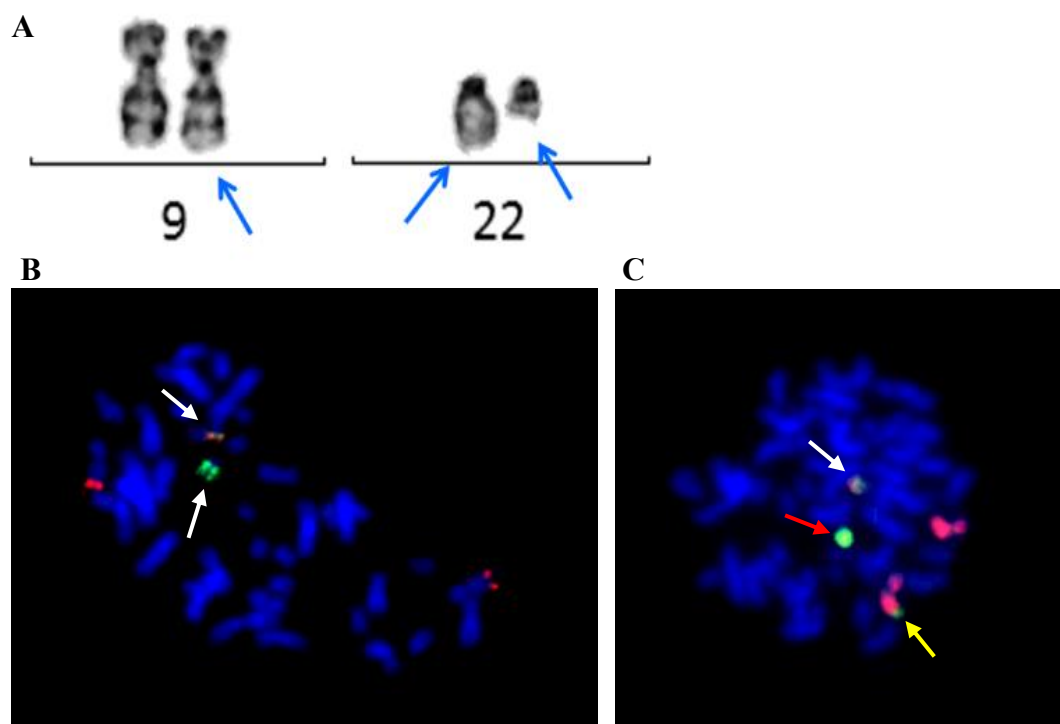
U pięciu chorych (nr 190, 197-199, 209; Tabela 15) zaobserwowano inne dominujące wzory hybrydyzacji w analizie FISH mogące wskazywać na dodatkowe kopie fuzji genowej *BCR-ABL1* lub delecje w obrębie chromosomów zaangażowanych w translokację wariantową:

- Nietypowe znakowanie (2Y2R2G) wskazujące na obecność translokacji wariantowej z fuzją genów *BCR/ABL1* z obecnością dodatkowego sygnału fuzyjnego stwierdzono u pacjentów nr 190 i 198. U chorej nr 190 nietypowe znakowanie zaobserwowano w 22 miesiącu leczenia dazatynibem. Analiza prążkowa potwierdziła ewolucję kariotypu – powstanie izochromosomu pochodnego chromosomu pary 22 zawierającego dwie kopie chromosomu Ph – *ider(22)(q10)t(7;9;22)(q11.2;q34;q11.2)* (Tabela 15). U pacjenta nr 198 wzór hybrydyzacji również był wynikiem ewolucji kariotypu i potwierdzał obecność dodatkowego chromosomu Ph w badaniu prążkowym kariotypu (Tabela 15).
- W przypadku dwóch pacjentów (nr 199 i 209) zaobserwowano jeden sygnał fuzyjny, dwa sygnały zielone i jeden sygnał czerwony (1Y1R2G), co świadczyło o jednostopniowym powstaniu fuzji genowej *BCR-ABL1* z jednoczesną delecją genu *ABL1* z chromosomu pochodnego *der(9)t(9;17)* biorącego udział w translokacji wariantowej w przypadku pacjenta nr 209 oraz z *der(9)t(1;9)* w przypadku pacjentki nr 199 (Rycina 19).



Rycina 19. Analiza FISH z sondą LSI DCDF-BCR/ABL1 u pacjentki nr 199 z translokacją wariantową *t(1;9;22)(q32;q34;q11.2)*. Sygnał fuzyjny znajduje się na chromosomie Ph – *der(22)t(9;22)*, sygnał czerwony jest na prawidłowym chromosomie 9, sygnał zielony jest zlokalizowany na prawidłowym chromosomie 22 i *der(1)t(1;22)*. Delecji uległ sygnał czerwony z *der(9)t(1;9)* (źródło: opracowanie własne; zdjęcie wykonano w Pracowni Cytogenetyki Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej).

- U pacjentki nr 197 obserwowano jeden sygnał fuzyjny na chromosomie Ph – der(22)t(9;22), dwa sygnały czerwone: jeden na prawidłowym chromosomie 9, drugi na pochodnym chromosomie 9 – der(9)t(9;22) oraz w zależności od uzyskanej rozdzielczości chromosomów dwa lub jeden większy sygnał zielony na drugim chromosomie pochodnym 22 – der(22)t(22;22) (Rycina 20).

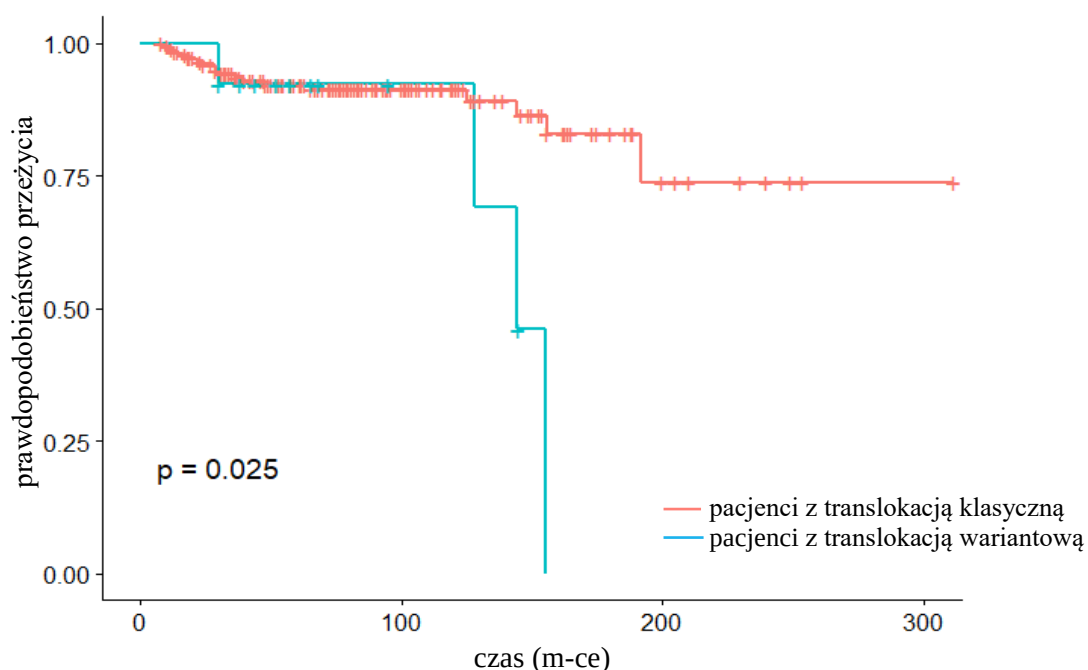


Rycina 20. Wynik analizy cytogenetycznej pacjentki nr 197: A) Częściowy kariotyp prezentujący translokację wariantową $t(9;22;22)(q34;q11.2;q13)$; B) Analiza FISH z sondą LSI DCDF-BCR/ABL1. Strzałki wskazują sygnał fuzyjny na der(22)t(9;22) i dodatkowy sygnał zielony na homologicznym chromosomie 22 – der(22)t(22;22); C) Analiza FISH z sondami malującymi chromosomy pary 9 (kolor czerwony) i 22 (kolor zielony). Żółta strzałka wskazuje fragment chromosomu 22 na chromosomie 9 – der(9)t(9;22). Biała strzałka wskazuje mały chromosom 22 z fragmentem chromosomu 9 – der(22)t(9;22). Czerwona strzałka wskazuje chromosom pary 22 z fragmentem przeniesionym z drugiego chromosomu 22 – der(22)t(22;22) (źródło: opracowanie własne; zdjęcia wykonano w Pracowni Cytogenetyki Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej).

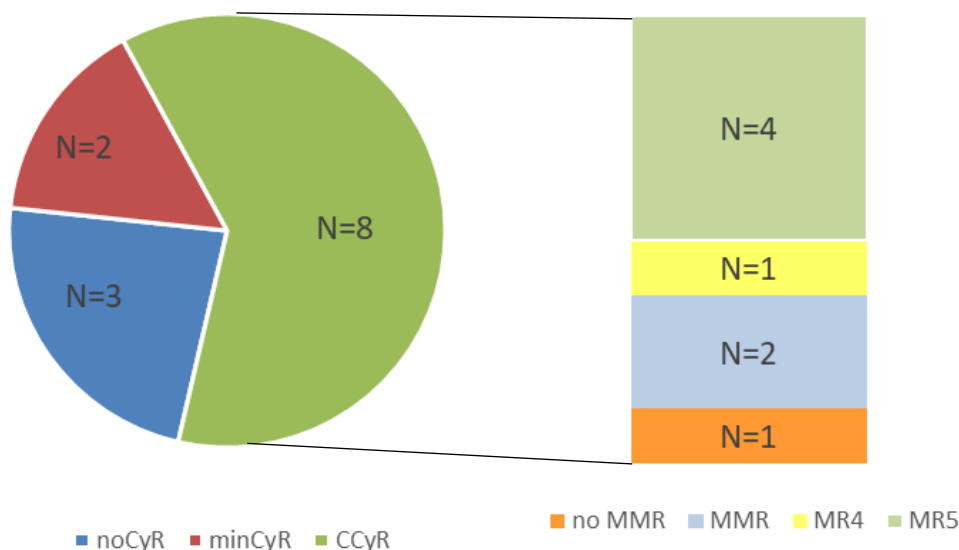
U pacjenta nr 207 wzór hybrydyzacji był charakterystyczny dla przebiegu jednostopniowego mechanizmu powstania translokacji wariantowej, natomiast zaangażowanie chromosomów pary 5, 8 i 10 poza chromosomem pary 9 i 22 oraz sposób ich przegrupowania sugerował wielostopniowy mechanizm powstania translokacji wariantowej. Aberracje potwierdzono techniką FISH z zastosowaniem sond malujących dla chromosomów pary 8, 9, 10 i 22.

Prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia w obu grupach było porównywalne, natomiast dłuższe przeżycie powyżej 10 lat od rozpoznania choroby było częściej obserwowane w grupie pacjentów z translokacją klasyczną ($p=0,02$; Wykres 1).

Spośród grupy pacjentów z translokacją wariantową całkowitą odpowiedź cytogenetyczną uzyskało ośmiu pacjentów (61,5%): sześciu w trakcie terapii imatynibem, dwóch w trakcie leczenia nilotynibem (Wykres 2). Pięciu pacjentów leczonych imatynibem uzyskało głęboką odpowiedź molekularną (czterech na poziomie MR5 oraz jeden – MR4). Dwóch pacjentów po niepowodzeniu terapii imatynibem uzyskało większą odpowiedź molekularną (MMR) podczas leczenia nilotynibem. Jedna pacjentka z całkowitą odpowiedzią cytogenetyczną nie uzyskała odpowiedzi molekularnej na poziomie MMR.



Wykres 1. Porównanie prawdopodobieństwa całkowitego przeżycia (krzywe Kaplana-Meiera) pomiędzy grupą pacjentów z translokacją klasyczną t(9;22) i grupą pacjentów z translokacją wariantową (źródło: opracowanie własne).



Wykres 2. Diagram prezentujący uzyskaną odpowiedź w trakcie terapii TKI u pacjentów z translokacją wariantową (źródło: opracowanie własne).

Skróty: CCyR=0% Ph, minCyR=66-95% Ph, noCyR=96-100% Ph, MMR=0,1% lub mniej transkryptu BCR-ABL1, MR4=0,01% lub mniej transkryptu, MR5=0,001 lub mniej transkryptu, brak MMR=powyżej 0,1% transkryptu

Podsumowanie

- Translokacje wariantowe stwierdzono u 9,8% pacjentów.
- W 85% przypadków translokacje wariantowe były wynikiem zaangażowania jednego dodatkowego chromosomu poza chromosomem 9 i 22.
- Dominującym mechanizmem powstania translokacji wariantowych był mechanizm jednostopniowy, najczęściej obserwowano zaangażowanie chromosomu 11 oraz 17.
- Splenomegalię w momencie rozpoznania choroby obserwowano częściej w grupie pacjentów z translokacjami wariantowymi w porównaniu do grupy pacjentów z translokacją klasyczną t(9;22).
- Prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia w obu grupach było porównywalne, natomiast dłuższe przeżycie powyżej 10 lat od rozpoznania choroby było częściej obserwowane w grupie pacjentów z translokacją klasyczną.

5.3 Pacjenci z kariotypem Philadelphia-ujemnym/*BCR-ABL1*-dodatnim oraz z zamaskowanym chromosomem Philadelphia

W kariotypie pięciu pacjentów (2,3%) stwierdzono tzw. „zamaskowany” chromosom Ph. Charakterystykę kliniczną pacjentów przedstawiono w Tabeli 17.

Tabela 17. Kliniczno-laboratoryjna charakterystyka pacjentów z tzw. „zamaskowanym” Ph w momencie rozpoznania choroby.

L.p.	Nr pacjenta	Płeć/ wiek (lata)	W momencie rozpoznania choroby							Faza choroby	Wskaźnik prognostyczny			
			WBC 10 ⁹ /L	PLT 10 ⁹ /L	BLT (%)	Eo (%)	Bso (%)	Hb mmol/L	Spleno- megalia (USG)		Sokal	Euro	Eutos	ELTS
1	211	M/70	35	332	1	7	1	8,8	nie	CP	I	L	L	I
2	212	M/53	20	1925	0	2	2	8,8	nie	CP	H	H	L	L
3	213	K/53	124	422	2	0	0	8,5	nie	CP	L	L	L	L
4	214	M/58	240	554	0	0	2	7,4	tak	CP	I	I	L	L
5	215	K/62	16	824	0	3	0	8,4	tak	CP	I	L	L	L

Skróty: BLT, blasty; Bso, bazofile; CP, faza przewlekła; Eo, eozynofile; H, wysoki; Hb, hemoglobina; I, pośredni; K, kobieta; L, niski; M, mężczyzna; PLT, płytki krwi; WBC, leukocyty

W badanej grupie było trzech mężczyzn oraz dwie kobiety, mediana wieku wyniosła 59 lat (zakres 53–70). Ocenia wskaźników prognostycznych w badanej grupie pacjentów była różna. Mediana liczby leukocytów wyniosła 35x10⁹/L (zakres 16-240), mediana liczby płytek krwi – 554x10⁹/L (zakres 332-1925). Splenomegalię stwierdzono u dwóch pacjentów. U czterech pacjentów (nr 212-215) stwierdzono transkrypt *e13-a2*, u pacjenta nr 211 – transkrypt *e14-a2*. Szczegółową charakterystykę genetyczną pacjentów przedstawiono w Tabeli 18. W klasycznym badaniu cytogenetycznym prawidłowe chromosomy pary 9 i 22 stwierdzono u czterech pacjentów (1,9%), podczas gdy badaniem molekularnym i analizą FISH potwierdzono gen fuzyjny *BCR-ABL1*. U jednej pacjentki (pacjentka nr 213) z prawidłowymi chromosomami 9 i 22 w części metafaz stwierdzono aberrację chromosomu płci X – najprawdopodobniej duplikację regionu q27 do q28 (Rycina 21). Cały nieprawidłowy chromosom X w FISH metafazowym pokryty został sondą malującą.

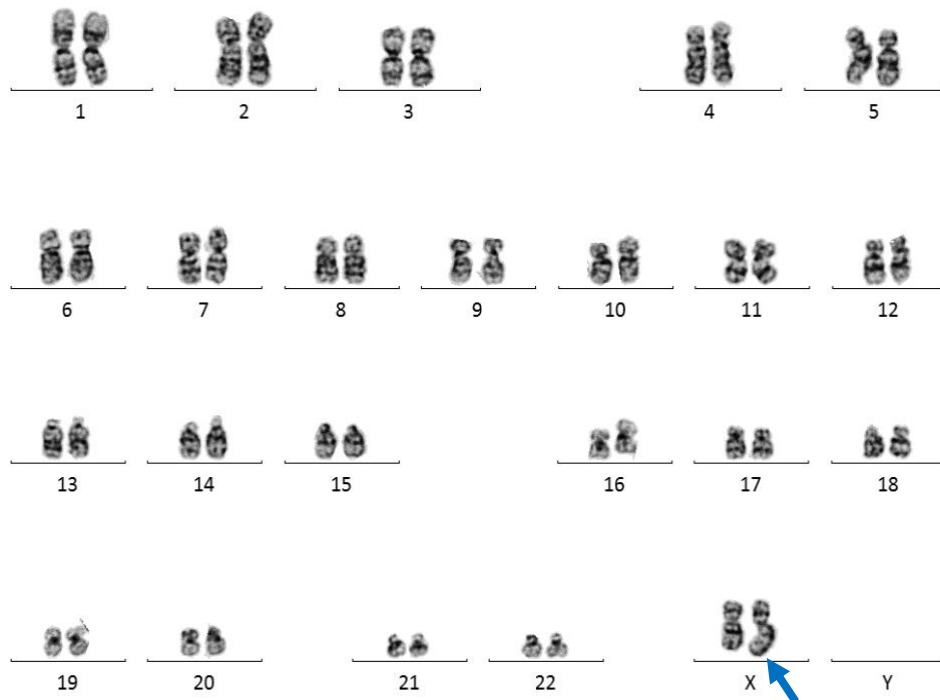
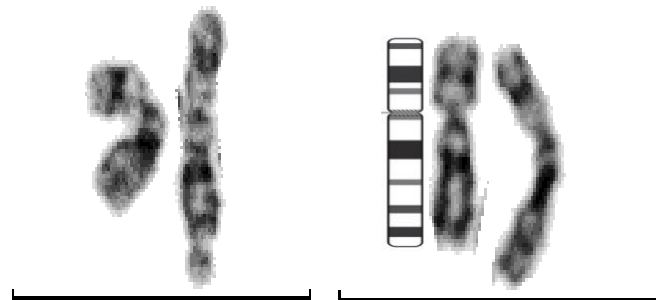
Dokładna analiza FISH pozwoliła ocenić i określić lokalizację genu fuzyjnego oraz ustalić proponowany mechanizm wykrytych rearanżacji. Obserwowano trzy wzory hybrydyzacji: 1Y1R2G (jeden sygnał zielony był mniejszy) u dwóch pacjentów

(nr 211 i 212), 1Y2R1G (jeden sygnał czerwony był mniejszy) u kolejnych dwóch pacjentów (nr 213 i 214) oraz wzór hybrydyzacji typowy dla klasycznej translokacji t(9;22)(q34;q11.2) – 2Y1R1G u pacjentki nr 215. Klasyczna analiza prążkowa wykazała nieprawidłowy kariotyp z obecnością trzech pochodnych chromosomów: der(9), der(22) i der(7), gdzie chromosom Ph został zamaskowany przez translokację między 7q22 a 22p12 (pacjentka nr 215). Również w analizie FISH z sondą tri-color dual fusion BCR/ABL1/ASS1 potwierdzono rearanżację w obrębie badanych genów *BCR* i *ABL1* oraz wykluczono delecję genu *ASS1* u wszystkich pięciu pacjentów.

Tabela 18. Genetyczna charakterystyka i odpowiedź na terapię TKI pacjentów z tzw. „zamaskowanym” Ph.

W momencie rozpoznania choroby								
Nr pa- cjenta	DC DF BCR/ABL; (% fuzji <i>BCR/ABL1</i>)	del(9q) <i>ASS1</i>	Mechanizm rearanżacji	Kariotyp	Tran- skrypt	TKI	Zmiana KD BCR- ABL1	Najlepsza odpowiedź (ostatnie badanie, m-ce)
211	1Y1R2G (87)	nie	jedno- stopniowy	46,XY[31]	e14a2	IM	nie badano	optymalna DMR (57)
212	1Y1R2G (51)	nie	jedno- stopniowy	46,XY[22]	e13a2	IM	nie badano	optymalna DMR (108)
213	1Y2R1G (45)	nie	jedno- stopniowy	46,X,?dup(X) (q27q28)[9]/ 46,XX[17]	e13a2	IM	nie badano	sub- optymalna MMR (63)
214	1Y2R1G (98)	nie	jedno- stopniowy	46,XY[20]	e13a2	IM NIL	A397P	sub- optymalna DMR (57)
215	2Y1R1G (100)	nie	dwu- stopniowy	46,XX,der(7) t(7;22)(q22;p11), der(9)t(9;22) (q34;q11.2), der(22)t(7;22) (q22;p11) t(9;22) (q34;q11.2)[20]	e13a2	IM DA	brak	niepowo- dzenie (13)

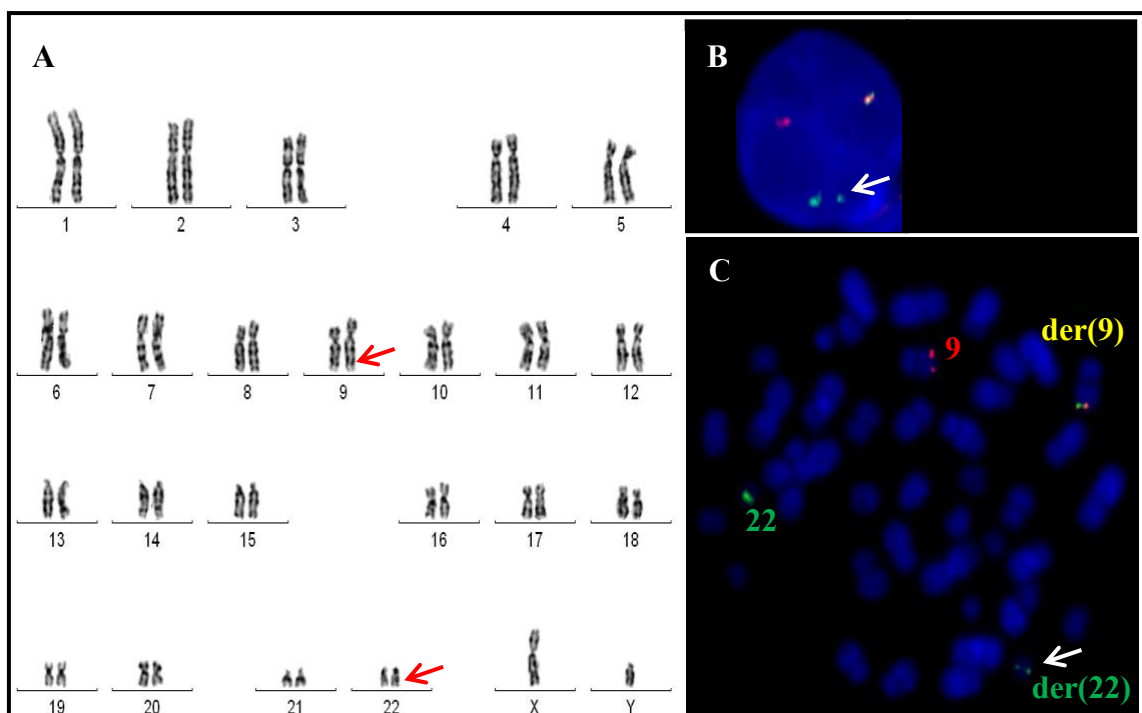
Skróty: DA, dazatynib; der, chromosom pochodny; DMR, głęboka odpowiedź molekularna; G, zielony sygnał; IM, imatynib; MMR, większa odpowiedź molekularna; NIL, nilotynib; R, czerwony sygnał; TKI, inhibitory kinazy tyrozynowej; Y, żółty sygnał

A**B**

Rycina 21. Aberracja chromosomu X w kariotypie Ph-/BCR-ABL1+: A) Kariogram pacjentki nr 213 prezentujący kariotyp 46,X,?dup(X)(q27q28). Aberrację obserwowano w 9 z 26 (35%) analizowanych metafazach. Zduplikowany region chromosomu X zaznaczono strzałką; B) Chromosomy X pochodzące z innych metafaz wraz z ideogramem (po prawej stronie zmieniony chromosom) (źródło: opracowanie własne; zdjęcia wykonano w Pracowni Cytogenetyki Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej).

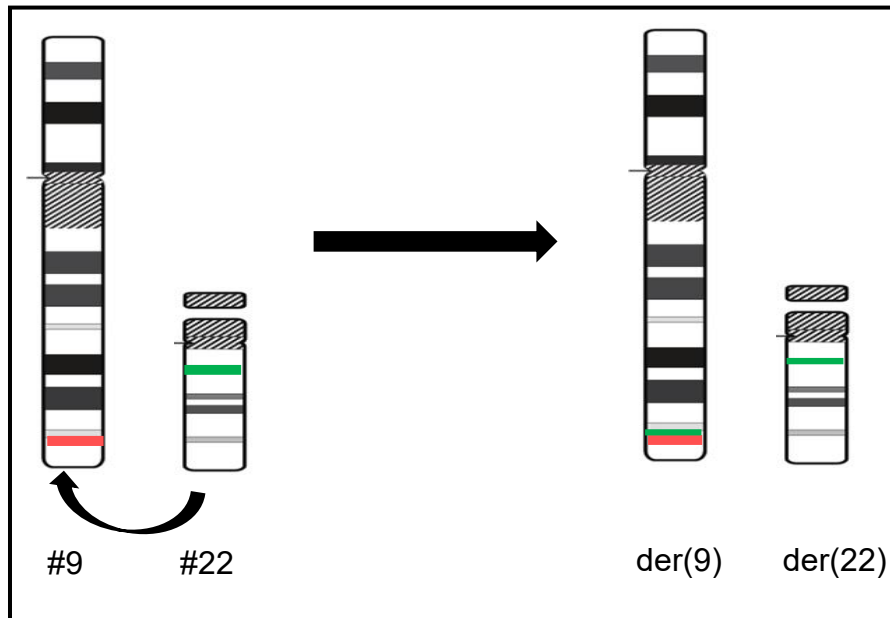
5.3.1. Insercja genu *BCR* w locus genu *ABL1*

U pacjentów nr 211 i 212 FISH metafazowy pozwolił zlokalizować sygnał fuzyjny na chromosomie pary 9, sygnał czerwony na prawidłowym chromosomie 9, dwa sygnały zielone na dwóch chromosomach 22, przy czym intensywność jednego sygnału była mniejsza (Rycina 22).



Rycina 22. Wyniki analizy cytogenetycznej pacjenta nr 211 (podobne wyniki uzyskano u pacjenta nr 212): A) Prawidłowy kariotyp w badaniu prążkowym chromosomów metodą GTG. Chromosomy pary 9 i 22 zaznaczono strzałką; B) Badanie FISH z sondą D-BCR/ABL1 na jądrach interfazowych z nietypowym wzorem hybrydyzacji 1Y1R2G; jeden sygnał zielony był mniejszy, oznaczony strzałką; C) Analiza FISH z sondą D-BCR/ABL1 na metafazach (sygnał fuzyjny na chromosomie 9, sygnał czerwony na drugim chromosomie 9 oraz sygnały zielone na chromosomach 22) (źródło: opracowanie własne; zdjęcia wykonano w Pracowni Cytogenetyki Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej).

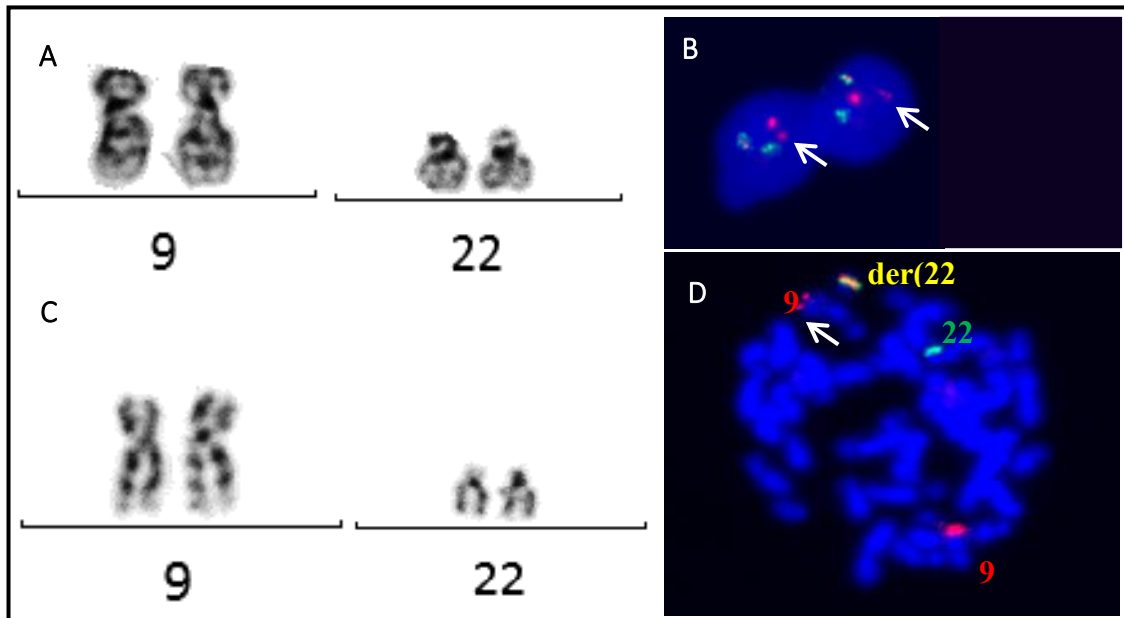
Zaobserwowany rozkład sygnałów w badaniu FISH oraz brak chromosomu Ph w klasycznym badaniu prążkowym sugerował rearanżację *BCR/ABL1* na skutek dwóch złamań w regionie 22q11.2, a następnie submikroskopowej insercji tego regionu obejmującego 5' genu *BCR* na długie ramię chromosomu pary 9 w okolicę genu *ABL1*, czego rezultatem była fuzja genowa *BCR/ABL1* na der(9) w mechanizmie jednostopniowej rearanżacji - ins(9;22)(q34;q11.2q11.2)(ABL1+,BCR+;BCR+,ABL1-) (Rycina 23).



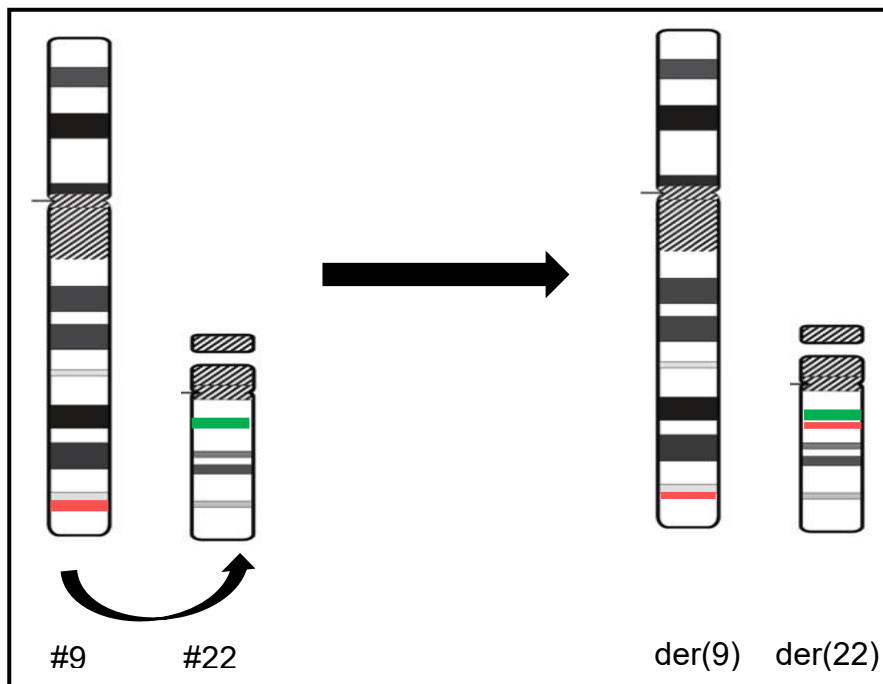
Rycina 23. Schemat jednostopniowej rearanżacji *BCR/ABL1* na skutek submikroskopowej insercji fragmentu długiego ramienia chromosomu pary 22 obejmującego 5' *BCR* na długie ramię chromosomu 9 w locus genu *ABL1* (źródło: opracowanie własne).

5.3.2. Insercja genu *ABL1* w locus genu *BCR*

U pacjentki nr 213 i pacjenta nr 214 również zaobserwowano prawidłowe chromosomy pary 9 i 22 bez występowania chromosomu Ph w badaniu prążkowym przy standardowo uzyskanej rozdzielczości (Rycina 24A, 24C). W badaniu FISH sygnał fuzyjny zlokalizowano na pochodnym chromosomie 22 - der(22), sygnał zielony na prawidłowym chromosomie 22 i sygnały czerwone na chromosomach 9, z których jeden był mniejszy (Rycina 24B, 24D). Analiza wyników wykazała insercję regionu 9q34 w długie ramię chromosomu 22 w obrębie locus genu *BCR* powodując fuzję genową *BCR/ABL1* na der(22) - ins(22;9)(q11.2;q34q34)(BCR+,ABL1+;ABL1+,BCR-) (Rycina 25).



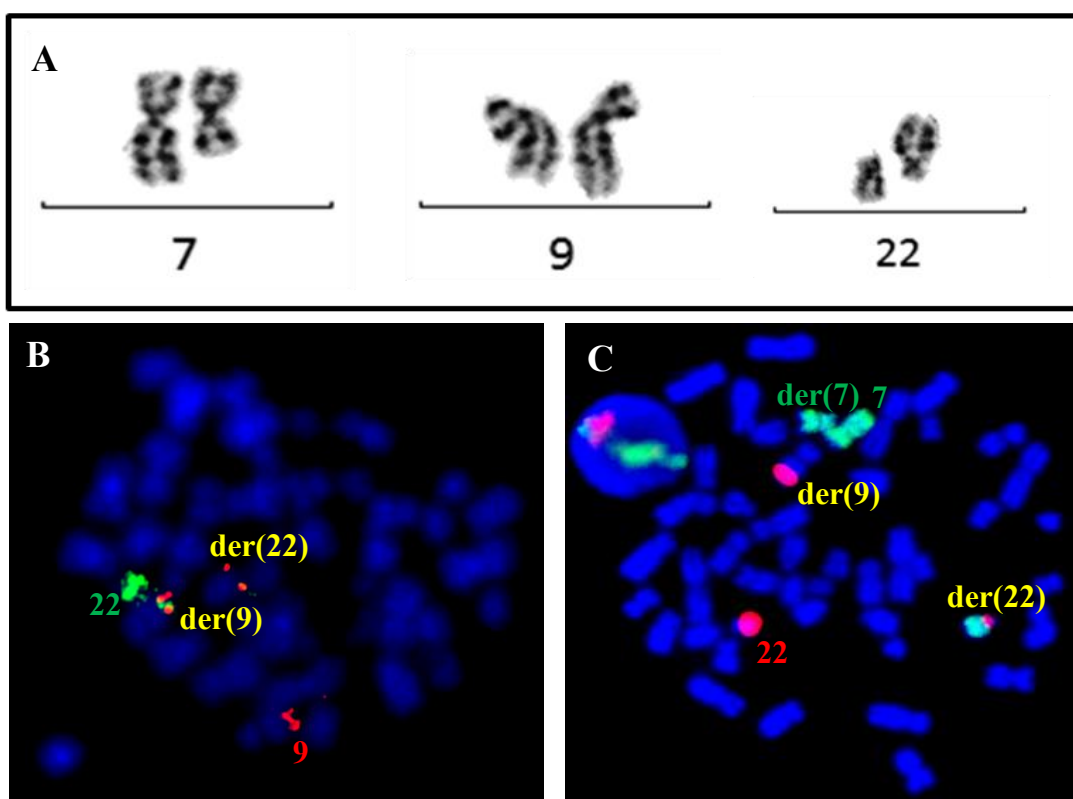
Rycina 24. Wyniki analizy cytogenetycznej pacjentki nr 213 i pacjenta nr 214: A) Częściowy kariogram pacjentki nr 213 prezentujący prawidłowe chromosomy pary 9 i 22 w badaniu prążkowym chromosomów metodą GTG; B) Badanie FISH z sondą D-BCR/ABL1 na jądrach interfazowych z nietypowym wzorem hybrydyzacji 1Y2R1G u pacjentki nr 213; jeden sygnał czerwony mniejszy, zaznaczony strzałką; C) Prawidłowe chromosomy pary 9 i 22 w badaniu prążkowym chromosomów metodą GTG pacjenta nr 214; D) Analiza FISH z sondą D-BCR/ABL1 na metafazach u pacjenta nr 214 - sygnał fuzyjny na chromosomie 22, sygnał zielony na drugim chromosomie 22 oraz sygnały czerwone na chromosomach 9 (źródło: opracowanie własne; zdjęcia wykonano w Pracowni Cytogenetyki Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej).



Rycina 25. Schemat jednostopniowej rearanżacji *BCR/ABL1* na skutek submikroskopowej insercji fragmentu długiego ramienia chromosomu pary 9 obejmującego 3' *ABL1* na długie ramię chromosomu 22 w locus genu *BCR* (źródło: opracowanie własne).

5.3.3 Zamaskowany chromosom Philadelphia przez inną aberrację

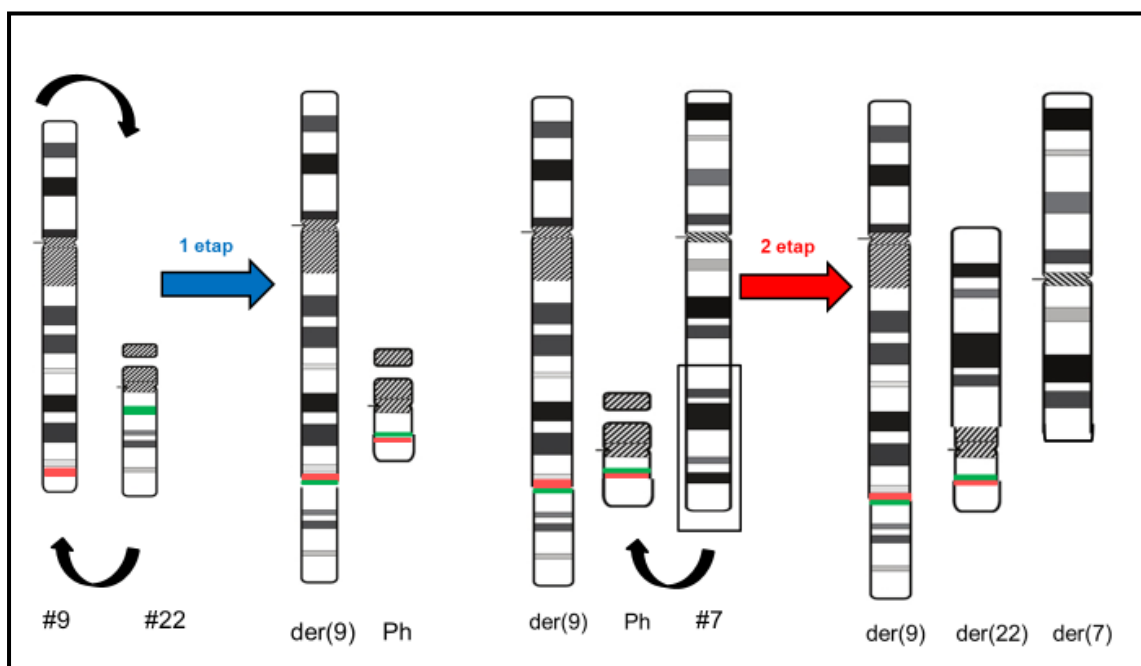
W kariotypie pacjentki nr 215 zaobserwowano zmieniony chromosom pary 7, 9 i 22 bez obecności typowego chromosomu Ph. Wzór hybrydyzacji w badaniu FISH był typowy dla wystąpienia translokacji wzajemnej $t(9;22)(q34;q11.2)$ – sygnały fuzyjne były zlokalizowane na pochodnym chromosomie pary 9 i 22. Użycie sond malujących potwierdziło materiał genetyczny z chromosomu 7 na pochodnym chromosomie 22 – $der(22)t(9;22)(q34;q11.2)$ i materiał genetyczny z chromosomu 22 na pochodnym chromosomie 9 – $der(9)t(9;22)(q34;q11.2)$ (Rycina 26).



Rycina 26. Maskowanie chromosomu Ph wtórną aberracją. A) Częściowy kariogram pacjentki nr 215 uzyskany w badaniu prążkowym chromosomów metodą GTG prezentujący zmienione chromosomy pary 7, 9 i 22 bez obecności typowego chromosomu Ph; B) W badaniu FISH D-BCR/ABL1 stwierdzono typowy wzór hybrydyzacji dla translokacji $t(9;22)(q34;q11.2)$ 2Y1R1G – sygnały fuzyjne zlokalizowane były na chromosomach pochodnych pary 9 i 22, sygnał czerwony na chromosomie 9 i sygnał zielony na chromosomie 22; C) Analiza FISH z sondami malującymi chromosomy pary 7 (kolor zielony) i 22 (kolor czerwony) potwierdziła występowanie fragmentu chromosomu 22 na chromosomie 9 – $der(9)t(9;22)(q34;q11.2)$ i przeniesienie fragmentu długiego ramienia chromosomu 7 na chromosom 22 – $der(22)t(7;22)(q22;p12)$. Brak sygnałów czerwonych i/lub zielonych na innych chromosomach wyklucza translokację wariantową i wskazuje na niezależne pochodzenie translokacji $t(7;22)(q22;p12)$ (źródło: opracowanie własne; zdjęcia wykonano w Pracowni Cytogenetyki Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej).

W analizie FISH wykluczono delecję w locus 7q31.

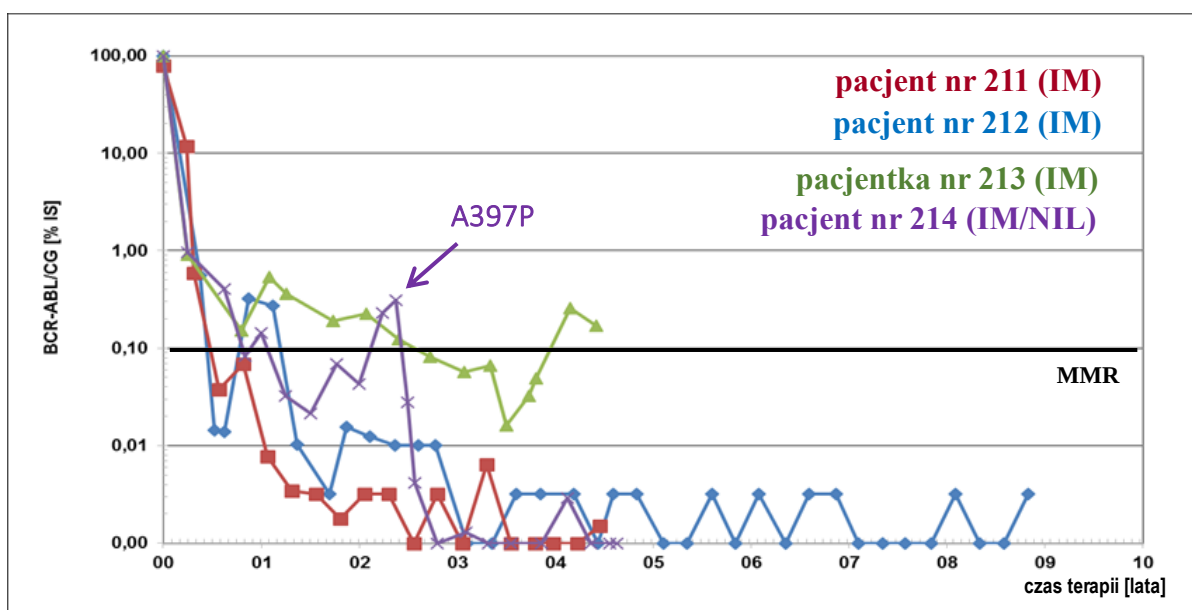
Translokacje materiału genetycznego pomiędzy trzema chromosomami oraz brak typowego chromosomu Ph w kariotypie wynikał z dwuetapowego mechanizmu rearanżacji (Rycina 27). W pierwszym etapie doszło do powstania prostej translokacji t(9;22)(q34;q11.2), w wyniku której powstał chromosom Ph. W drugim etapie chromosom Ph uległ maskowaniu na skutek translokacji wtórnej angażującej chromosom Ph i długie ramię chromosomu pary 7.



Rycina 27: Schemat dwustopniowej rearanżacji *BCR/ABL1*. W pierwszym etapie dochodzi do zrównoważonej translokacji t(9;22)(q34;q11.2) w wyniku której powstaje chromosom Ph. W drugim etapie chromosom Ph ulega maskowaniu na skutek translokacji wtórnej pomiędzy Ph i chromosomem 7. Ostatecznie w kariotypie stwierdza się 3 chromosomy pochodne: der(7)t(7;22)(q22;p12), der(9)t(9;22)(q34;q11.2) i der(22)t(9;22)(q34;q11.2)t(7;22)(q22;p12) (źródło: opracowanie własne).

Analiza FISH wykazała eradykację komórek *BCR-ABL1*-dodatnich u czterech pacjentów (pacjenci nr 211-214). RQ-PCR potwierdziła u tych pacjentów większą odpowiedź molekularną (MMR) (zakres uzyskania MMR w czasie leczenia imatynibem: 5-36 miesięcy, mediana 7,5 miesiąca). Głęboka odpowiedź molekularna (MR4) została potwierdzona u dwóch osób (nr 211 i nr 212), odpowiednio po 12 i 15 miesiącu terapii imatynibem (Wykres 3). U trzech pacjentów (nr 211, 212 i 214) potwierdzono brak transkryptu w badaniu techniką nested-PCR (po 24 miesiącach leczenia TKI). W badaniach molekularnych u dwóch pacjentów osiągnięto MMR podczas terapii

imatynibem, jednak głębokiej odpowiedzi molekularnej nie udało się uzyskać: u pacjenta nr 213 nie obserwowano dalszej poprawy odpowiedzi molekularnej (utrzymywanie odpowiedzi molekularnej na poziomie MMR w trakcie 48 miesięcy obserwacji). W innym przypadku (pacjent nr 214) nastąpiła utrata MMR po 27 miesiącach terapii imatynibem (oporność nabyta z powodu wariantu A397P KD BCR-ABL1). W tym przypadku leczenie nilotynibem w drugiej linii pozwoliło odzyskać MMR po dwóch miesiącach terapii i ostatecznie uzyskać głęboką odpowiedź molekularną (MR5) trzy miesiące później. Niestety, 33 miesiące po zmianie inhibitora pacjent zmarł z przyczyn niezależnych od choroby. W przypadku pacjentki nr 215 z maskowanym Ph przez translokację t(7;22) badanie kariotypu oraz analiza FISH potwierdziła nieoptymalną odpowiedź zgodnie z wytycznymi ELN [22] zarówno na leczenie imatynibem i dazatynibem.



Podsumowanie

- Technika FISH w komórkach proliferujących pozwoliła ustalić lokalizację sygnału fuzyjnego oraz wyjaśnić mechanizm powstania rearanżacji *BCR-ABL1* u pacjentów z karyotypem Philadelphia-ujemnym/*BCR-ABL1*-dodatnim.
- Potwierdzono niską częstość występowania „zamaskowanego” chromosomu Ph (2,3%).
- W badanej grupie udało się prześledzić dwa mechanizmy powstania rearanżacji *BCR-ABL1*:
 - w mechanizmie insercyjnym;
 - w wyniku wtórnej aberracji z udziałem *BCR-ABL1*.
- Charakter rearanżacji genu *BCR-ABL1* w badanej grupie pacjentów wydaje się nie wpływać na odpowiedź na terapię TKI.

5.4 Delecja w obrębie chromosomów pochodnych der(9)t(9;22) lub der(22)t(9;22)

W badanej grupie u 21 pacjentów (9,8%) zaobserwowano submikroskopową delecję obejmującą *ABL1* lub/i *BCR* w obrębie chromosomu pochodnego der(9) lub der(22). Niestety od jednego pacjenta z translokacją wariantową t(9;22;17)(q34;q11;q23) nie uzyskano pełnych danych klinicznych, w związku z powyższym wykluczono pacjenta z dalszych analiz. Wyniki analizy cytogenetycznej i molekularnej zestawiono w Tabeli 19. Badanie FISH potwierdziło u wszystkich pacjentów obecność fuzji genów *BCR/ABL1*. Natomiast dominujący wzór hybrydyzacji odbiegał od typowego (2Y1R1G) – u 19 pacjentów wykazano tylko jeden sygnał fuzyjny, co wskazywało na delecję w obszarze fuzji badanych genów. U chorych z nietypowym obrazem fuzji w jądrach interfazowych występowały różne dominujące wzory hybrydyzacji w badaniu FISH D-*BCR/ABL1*: 1Y1R1G (n=13; 65%), 1Y1R2G (n=5; 25%), 1Y2R1G (n=1; 5%) oraz 2Y1R2G i 2Y1R1G (n=1; 5%). Spośród pacjentów z wzorem hybrydyzacji 1Y1R1G u 12 chorych analiza metafaz potwierdziła obecność sygnału fuzyjnego na chromosomie Ph [der(22)]. Z kolei w zaobserwowanych metafazach pacjenta nr 111 sygnał fuzyjny zlokalizowany był na chromosomie der(9).

Wzór hybrydyzacji 1Y1R2G stwierdzono u pięciu kolejnych chorych (nr 5, 115, 169, 175 i 199), w tym u jednej pacjentki z translokacją wariantową (nr 199). Analizując metafazy stwierdzono fuzję *BCR/ABL1* na der(22). U pacjentów nr 5, 115, 169 i 175 obserwowane dwa sygnały zielone odpowiadały prawidłowemu genowi *BCR* (chromosom 22) i fragmentowi 3' genu *BCR*, przeniesionemu na der(9) w rezultacie translokacji. Jeden sygnał czerwony odpowiadał genowi *ABL1* na prawidłowym chromosomie 9. Brak drugiego sygnału fuzyjnego był efektem utraty regionu 5' genu *ABL1* (znakowanie czerwone) ze zmienionego chromosomu 9. U pacjentki nr 199 z translokacją wariantową t(1;9;22)(q32;q34;q11.2) dwa sygnały zielone odpowiadały prawidłowemu genowi *BCR* (chromosom 22) i fragmentowi 3' genu *BCR*, przeniesionemu na der(1) w rezultacie translokacji t(1;22)(q32;q11.2). Jeden sygnał czerwony odpowiadał genowi *ABL1* na prawidłowym chromosomie 9. Brak drugiego sygnału czerwonego był wynikiem utraty regionu 5' genu *ABL1* (znakowanie czerwone) ze zmienionego chromosomu 9 będącego rezultatem translokacji t(1;9)(q32;q34).

U pacjentki nr 83 stwierdzono inny wzór hybrydyzacji – 1Y2R1G. Sygnał fuzyjny wynikał z fuzji *BCR/ABL1* na der(22), dwa sygnały czerwone odpowiadały

prawidłowemu genowi *ABL1* (chromosom 9) i fragmentowi 3' genu *ABL1*, przeniesionemu na der(22) w wyniku translokacji t(9;22)(q34;q11.2). Jeden sygnał zielony odpowiadał genowi *BCR* na prawidłowym chromosomie 22. Brak drugiego sygnału fuzyjnego był efektem utraty regionu 3' genu *BCR* (znakowanie zielone) z pochodnego chromosomu 9.

Analizę kariotypu w chwili rozpoznania przeprowadzono u 13 pacjentów, u których uzyskano figury podziałowe w hodowlach *in vitro*. U 12 z tych pacjentów stwierdzono obecność klasycznej translokacji t(9;22)(q34;q11.2), która w dziesięciu przypadkach była zmianą izolowaną. U pacjentki nr 9 translokacji t(9;22)(q34;q11.2) towarzyszyła aberracja chromosomowa w postaci dodatkowego chromosomu Ph – der(22)t(9;22)(q34;q11.2). Natomiast u pacjenta nr 153 we wszystkich metafazach dodatkowo obserwowano translokację pomiędzy chromosomami pary 1, 12 i 13 z delecją fragmentu chromosomu pary 13. W komórkach szpiku pacjentki nr 199 stwierdzono translokację wariantową t(1;9;22)(q32;q34;q11.2).

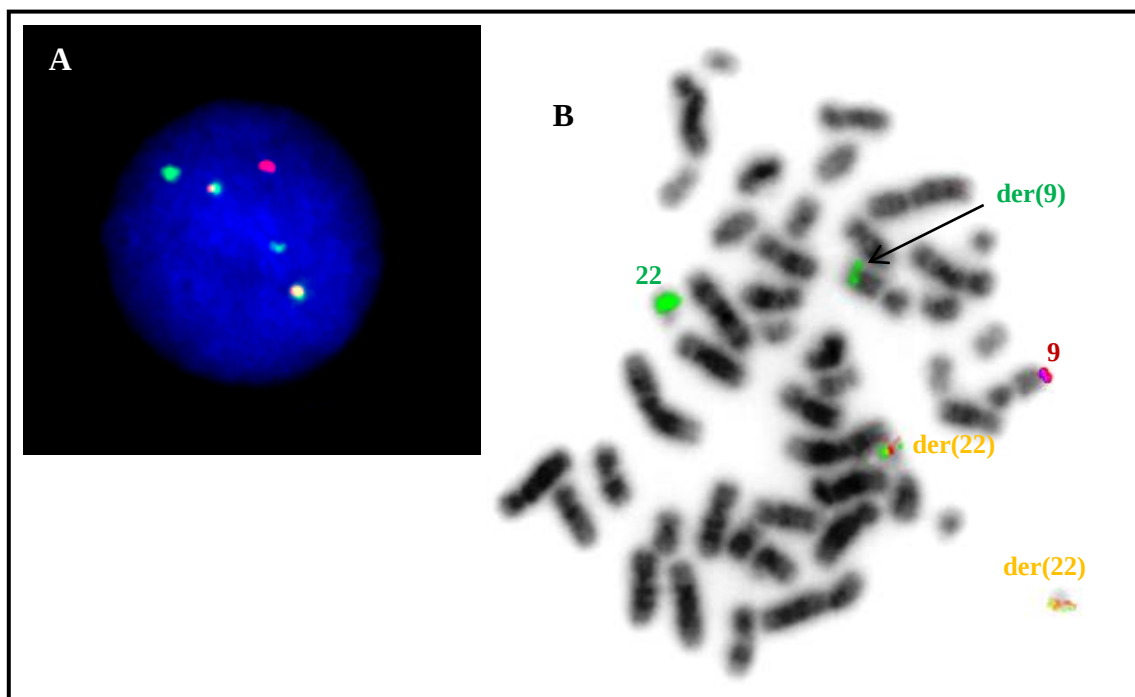
U pacjentki nr 9 obserwowano dwa sygnały fuzyjne (2Y1R2G oraz 2Y1R1G), co bez badania kariotypu i/lub analizy FISH na metafazach można było interpretować jako klasyczną fuzję genową z obecnością dodatkowej kopii wyznakowanego regionu chromosomu pary 22 obejmującego gen *BCR*. W rzeczywistości w kariotypie stwierdzono dodatkowy chromosom Ph (dodatkowy sygnał fuzyjny w analizie FISH) i potwierdzono u pacjentki delecję obejmującą gen *ABL1* na chromosomie 9 objętym translokacją (Rycina 28).

Tabela 19. Wyniki analizy cytogenetycznej i molekularnej pacjentów z delecją wykrytą techniką FISH (D-BCR/ABL).

L.p.	Nr pacjenta	Kariotyp w chwili rozpoznania	FISH D-BCR/ABL wzór hybrydyzacji (%) w chwili rozpoznania	Czas obserwacji w trakcie leczenia TKI (m-ce)	Najlepsza odpowiedź cytogenetyczna w trakcie leczenia TKI	ACA/Ph+ w trakcie leczenia TKI	Transkrypt BCR-ABL1 / Wariant KD BCR-ABL	Najlepsza odpowiedź molekularna w trakcie leczenia TKI
1	5	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[20]	2Y1R1G (75) 1Y1R2G (20) 2R2G (5)	36	CCyR	nie	e14a2	MMR
2	9	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[13]/ 47,XX,idem,+der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[7]	2Y1R2G (39) 2Y1R1G (37) 2R2G (24)	15	noCyR	tak	e19a2	nie monitorowano
3	26	brak kariotypu przy rozpoznaniu	1Y1R1G (96) 2R2G (4)	40	CCyR	nie	e14a2	MR5
4	47	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[9]	1Y1R1G (94) 2Y1R1G (1) 2R2G (5)	40	CCyR	tak	e13a2 z mikrodelecją	nie monitorowano
5	83	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[19]	1Y2R1G (81) 2Y1R1G (1) 2R2G (18)	66	CCyR	nie	e13a2	MR5
6	104	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[19]	1Y1R1G (87) 2Y1R1G (1) 2R2G (12)	72	CCyR	nie	e13a2	MR5
7	111	brak kariotypu przy rozpoznaniu	1Y1R1G (90) 2R2G (10)	66	CCyR	nie	e14a2	MR5
8	115	brak kariotypu przy rozpoznaniu	1Y1R2G (74) 2R2G (24) 2Y1R1G (2)	60	CCyR	nie	e13a2	MR5
9	125	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[21]/46,XX[2]	1Y1R1G (72) 2R2G (28)	60	CCyR	nie	e13a2	MR4

10	130	brak kariotypu przy rozpoznaniu	1Y1R1G (68) 2Y1R1G (13) 2R2G (19)	60	CCyR	nie	e14a2	MR4
11	138	brak kariotypu przy rozpoznaniu	1Y1R1G (97) 2R2G (3)	60	CCyR	nie	e14a2	MR5
12	153	45,XY,der(1)t(1;12)(p34;q13), t(9;22)(q34;q11.2),-12, der(13)t(12;13)(q13;q?12)[20]	1Y1R1G (100)	6	noCyR	tak	e13a2	brak MMR
13	158	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[31]	1Y1R1G (95) 2Y1R1G (1) 2R2G (4)	25	PCyR	nie	e13a2	brak MMR
14	169	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[20]	1Y1R2G (99) 2Y1R1G (1)	12	CCyR	nie	e14a2	MR4
15	170	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[18]	1Y1R1G (94) 2Y1R1G (2) 2R2G (4)	20	CCyR	nie	e14a2	MR5
16	175	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[20]	1Y1R2G (84) 1Y1R1G (13) 2R2G (3)	30	PCyR	nie	e14a2 / T315I	brak MMR
17	176	brak kariotypu przy rozpoznaniu	1Y1R1G (85) 2R2G (15)	30	CCyR	tak	e13a2	MR4
18	180	brak kariotypu przy rozpoznaniu	1Y1R1G (97) 2R2G (3)	12	CCyR	nie	e14a2	MR4,5
19	182	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]	1Y1R1G (100)	21	noCyR	nie	e14a2	brak MMR
20	199	46,XX,t(1;9;22)(q32;q34;q11.2)[20]	1Y1R2G (82) 2R2G (18)	53	minCyR	nie	e14a2	brak MMR

Skróty: ACA/Ph+, dodatkowe aberracje chromosomowe w komórkach Ph-dodatnich; G, zielony sygnał; MMR, większa odpowiedź molekularna; MR4, głęboka odpowiedź molekularna na poziomie 4log; MR4,5, głęboka odpowiedź molekularna na poziomie 4,5log; MR5, głęboka odpowiedź molekularna na poziomie 5log; R, czerwony sygnał; TKI, inhibitory kinazy tyrozynowej; Y, żółty sygnał



Rycina 28. Wynik hybrydyzacji w badaniu FISH u pacjentki nr 9: A) Jądro interfazowe po hybrydyzacji z sondą DCDF-BCR/ABL1 prezentujące nietypowy wzór hybrydyzacji 2Y1R2G; B) Metafaza po hybrydyzacji z sondą TCDF-BCR/ABL1/ASS1. Sygnały fuzyjne znajdują się na dwóch kopiach chromosomu Ph, natomiast na der(9) zlokalizowano sygnał zielony z *BCR* – doszło do delecji fragmentu obejmującego gen *ABL1* i *ASS1*. Drugi sygnał zielony (*BCR*) reprezentowany był na prawidłowym chromosomie 22, natomiast sygnał czerwony (*ABL1*) i niebieski (*ASS1*) – na prawidłowym chromosomie 9 (źródło: opracowanie własne; zdjęcia wykonano w Pracowni Cytogenetyki Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej).

Mediana wieku rozpoznania choroby w badanej grupie pacjentów z delecją w obrębie chromosomów der(9) lub der(22) wyniosła 54,4 lata. U 15 osób stwierdzono splenomegalię. Chorobę rozpoznano w fazie przewlekłej u 18 chorych, u dwóch chorych – w fazie akceleracji. Mediana czasu obserwacji od rozpoczęcia leczenia TKI do ostatniego badania cytogenetycznego w grupie chorych z delecją w obrębie der(9) lub der(22) wyniosła 38 miesięcy. Całkowitą odpowiedź cytogenetyczną w trakcie terapii TKI uzyskało 14 chorych (70%) z badanej grupy pacjentów z delecją. Z kolei 12 pacjentów utrzymywało głęboką odpowiedź molekularną (siedmiu na poziomie MR5, jeden – MR4,5 oraz czterech – MR4). Jeden pacjent utrzymywał większą odpowiedź molekularną (Tabela 19). Procedurę allogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych szpiku kostnego przeprowadzono u pacjentki nr 9.

Charakterystykę porównawczą dwóch grup pacjentów: z delecją w obrębie der(9) lub der(22) oraz bez delecji przedstawiono w Tabeli 20.

Tabela 20. Porównanie wybranych parametrów kliniczno-laboratoryjnych i skal prognostycznych pomiędzy grupą pacjentów z delecją w obrębie der(9) lub der(22) potwierdzonej badaniem FISH BCR/ABL1 i bez delecji.

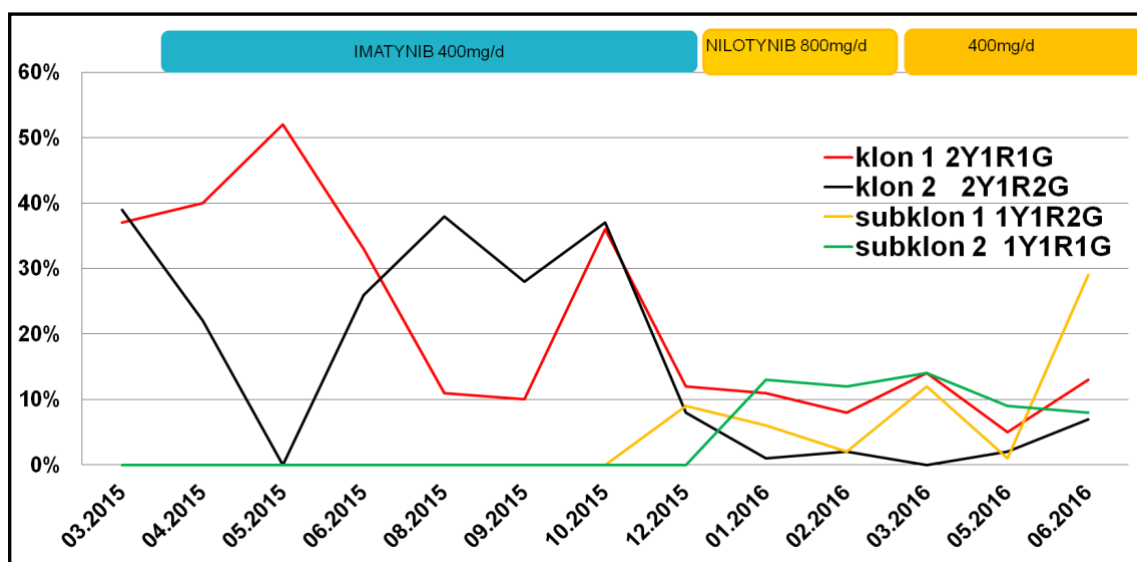
Badany parametr		Pacjenci z delecją (n=20)	Pacjenci bez delecji (n=182)	p-value
Mediana wieku zachorowania w latach; (zakres)		54,4 (25-74)	50 (9-84)	0,1278
Płeć męska/żeńską; n (%)		11/9 (55/45)	86/96 (47,3/52,7)	0,99
Powiększenie śledziony przy rozpoznaniu; n (%)		15 (75)	115 (63,2)	0,3367
WBC 10 ⁹ /L przy rozpoznaniu; mediana (zakres)		92,5 (33-307,8)	96 (2-658)	0,3849
Hg mmol/l przy rozpoznaniu; mediana (zakres)		6,9 (4,7-13,0)	7,4 (3,5-10,3)	0,2625
PLT 10 ⁹ /L przy rozpoznaniu; mediana (zakres)		475,5 (128-1900)	419 (42-2746)	0,3156
Blasty we krwi przy rozpoznaniu; mediana % (zakres)		1,5 (0-7)	1 (0-68)	0,6382
Eozynofile we krwi przy rozpoznaniu; mediana % (zakres)		1 (0-5)	2 (0-20)	0,0147
Bazofile we krwi przy rozpoznaniu; mediana % (zakres)		2 (0-10)	2 (0-29)	0,5555
Ocena ryzyka wg Sokala; n (%)	niskie	4 (20)	65 (35,7)	0,1781
	pośrednie	12 (60)	68 (37,4)	
	wysokie	4 (20)	49 (26,9)	
Ocena ryzyka wg Hasforda (Euro); n (%)	niskie	10 (50)	75 (41,2)	0,844
	pośrednie	8 (40)	85 (46,7)	
	wysokie	2 (10)	22 (12,1)	
Ocena ryzyka Eutos; n (%)	niskie	20 (100)	168 (92,3)	0,3691
	wysokie	0	14 (7,7)	
Ocena ryzyka ELTS; n (%)	niskie	12 (60)	113 (62,1)	0,2231
	pośrednie	7 (35)	38 (20,9)	
	wysokie	1 (5)	31 (17)	
Faza choroby - rozpoznanie; n (%)	CP	18 (90)	160 (87,9)	0,0014*
	AP	2 (10)	16 (8,8)	
	BP	0	6 (3,3)	
ACA/Ph+; n (%)		4 (20)	48 (26,4)	0,7878
Translokacja wariantowa; n (%)		1 (5)	12 (6,6)	0,99
Transkrypt	e13a2 (b2a2); n (%)	7 (35)	58 (31,9)	0,0585
	e14a2 (b3a2); n (%)	11 (55)	119 (65,4)	
	inny/koekspresja; n (%)	2 (10) / 0	2 (1,1) / 3 (1,6)	
Warianty KD BCR-ABL1; n (%)		1 (5)	22 (10,6%)	0,7049
Transformacja do BP/AP; n (%)		0	14 (7,7)	0,3691
AlloBMT; n (%)		1 (5)	20 (11)	0,7008
Śmierć, n (%)		3 (15)	19 (10,4)	0,4629

Skróty: ACA/Ph+, dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie komórek Philadelphia-dodatnim; alloBMT, allogeniczny przeszczep komórek szpiku kostnego; AP, faza akceleracji; BP, faza przełomu blastycznego; CP, faza przewlekła; Hb, hemoglobina; KD, domena kinazowa; PLT, trombocyty; TKI, inhibitory kinaz tyrozynowych; WBC, leukocyty

*analiza post-hoc	p-value po korekcji
CP vs. AP	0,0181
CP vs. BP	0,0364
AP vs. BP	0,99

Dane kliniczne grupy pacjentów bez obecnej delecji w obrębie der(9) lub der(22) zebrano od 182 chorych (wykluczono pięciu pacjentów z tzw. „zamaskowanym” Ph oraz ośmiu pacjentów z translokacją wariantową bez zebranych danych klinicznych niezbędnych do analizy). Dwie analizowane grupy pacjentów były zbliżone w odniesieniu do danych demograficznych, hematologicznych, oceny wskaźników prognostycznych. Różnicę istotną statystycznie stwierdzono w liczbie eozynofili w krwi w chwili rozpoznania choroby (większa liczba w grupie pacjentów bez delecji; $p=0,01$). Wykazano istotną statystycznie zależność fazy choroby w badanych grupach pacjentów. Analiza *post-hoc* wykazała istotność statystyczną pomiędzy liczbą pacjentów z fazą przewlekłą a fazą akceleracji oraz pomiędzy liczbą pacjentów z fazą przewlekłą a fazą kryzy blastycznej w badanych grupach.

Częstość wystąpienia translokacji wariantowych oraz dodatkowych aberracji chromosomowych w klonie Ph-dodatnim była porównywalna w obu grupach. W dwóch analizowanych grupach dominował transkrypt *BCR-ABL* e14a2. U pacjenta nr 47 stwierdzono transkrypt e13a2 z mikrodelecją, natomiast u pacjentki nr 9 – rzadki transkrypt e19a2. W przypadku rzadkich wariantów transkryptu *BCR/ABL1* molekularne badanie ilościowe RQ-PCR nie było rutynowo wykonywane z powodu braku dostępnych plazmidów niezbędnych do wykonania krzywej standardowej. W takim przypadku częściej wykonywano badania cytogenetyczne, najczęściej z krwi obwodowej. U pacjentki nr 9 nakładając wykresy odsetka komórek Ph+ prezentujących obserwowane wzory hybrydyzacji w badaniu FISH wykazano odwrotną proporcjonalność wielkości klonu komórek z klasyczną fuzją *BCR/ABL1* (klon 1) w stosunku do klonu z dodatkowym Ph z jednoczesną delecją *ABL1* z sygnału fuzyjnego na der(9) (klon 2) obserwowaną do 6 miesięcy terapii imatynibem. Po włączeniu nilotynibu klony uległy redukcji na korzyść dwóch subklonów z delecją na der(9) bez dodatkowego Ph (subklon 1 z delecją *ABL1* i subklon 2 z delecją *ABL1/BCR*) (Wykres 4).



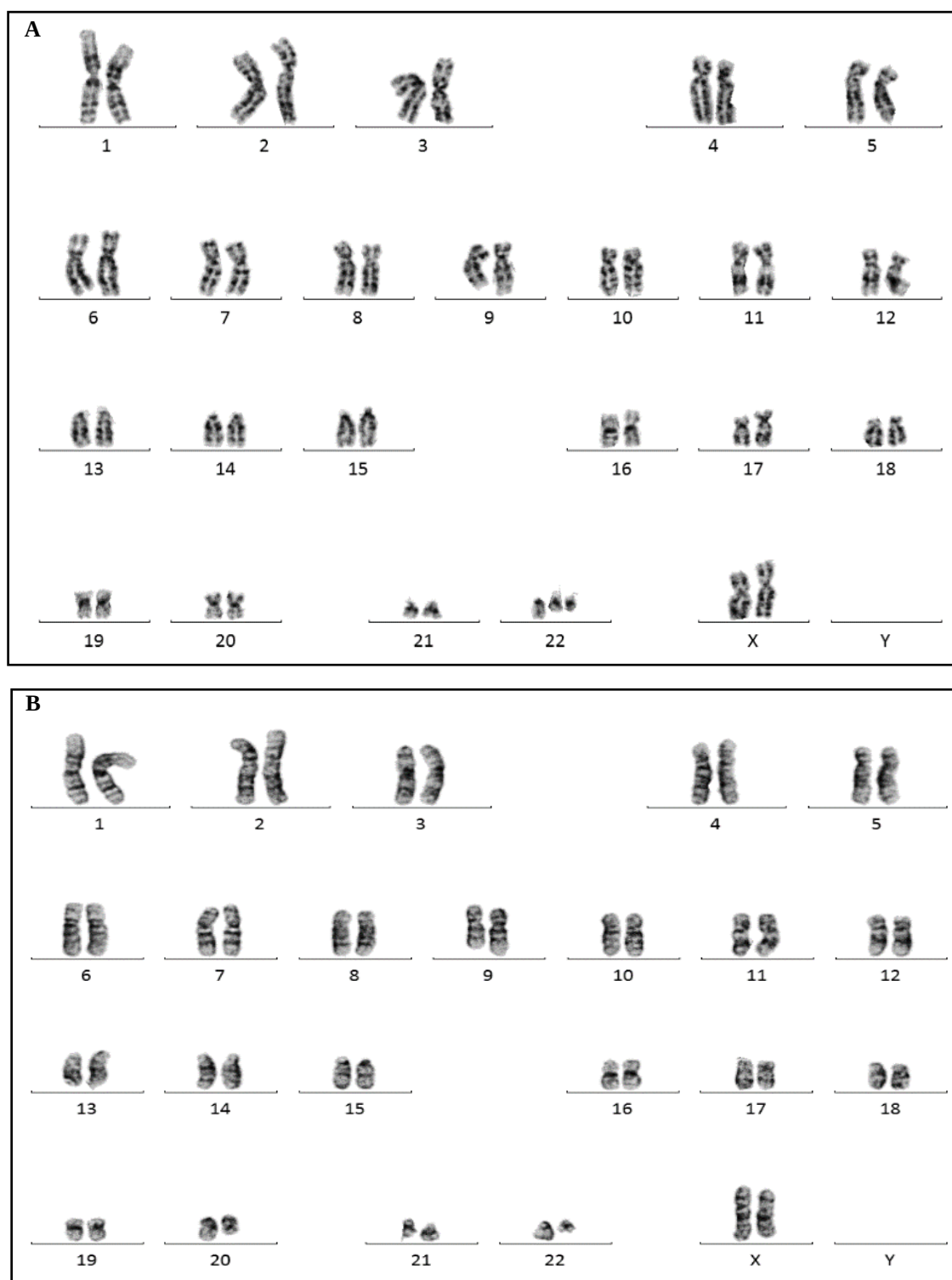
Wykres 4. Monitorowanie terapii TKI techniką FISH sondą DCDF-BCR/ABL1 u pacjentki nr 9 (opis w tekście; źródło: opracowanie własne).

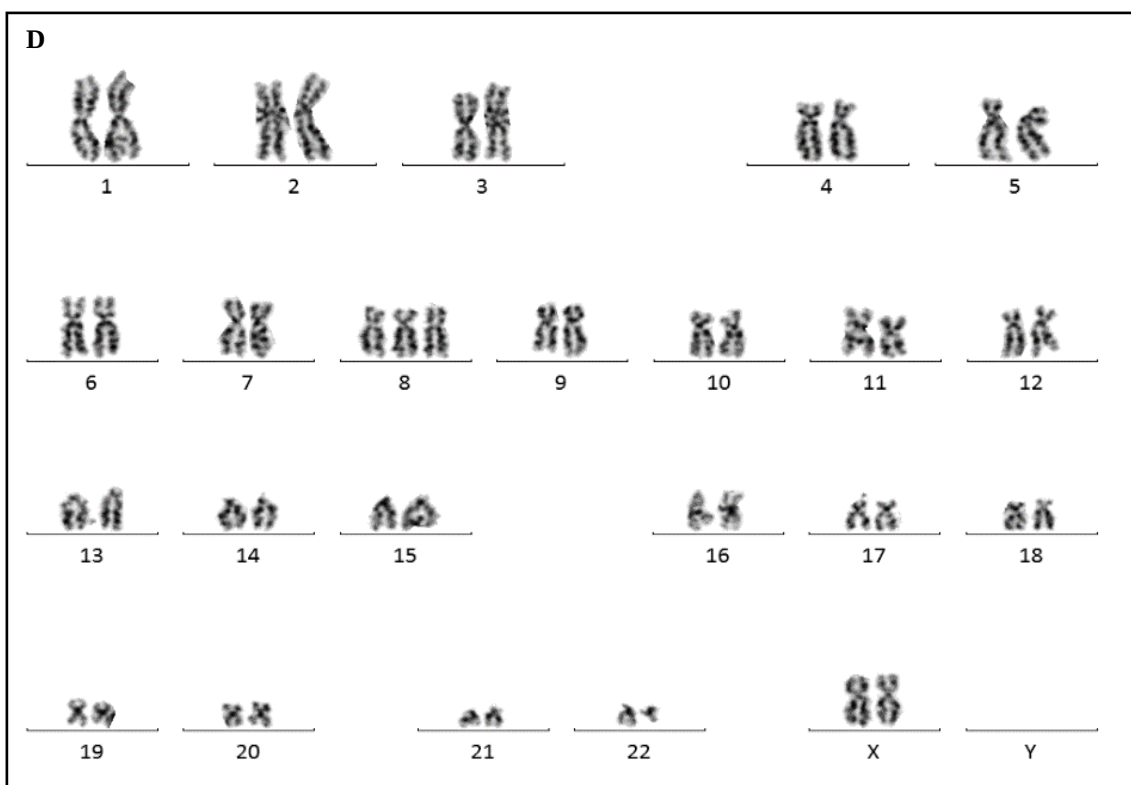
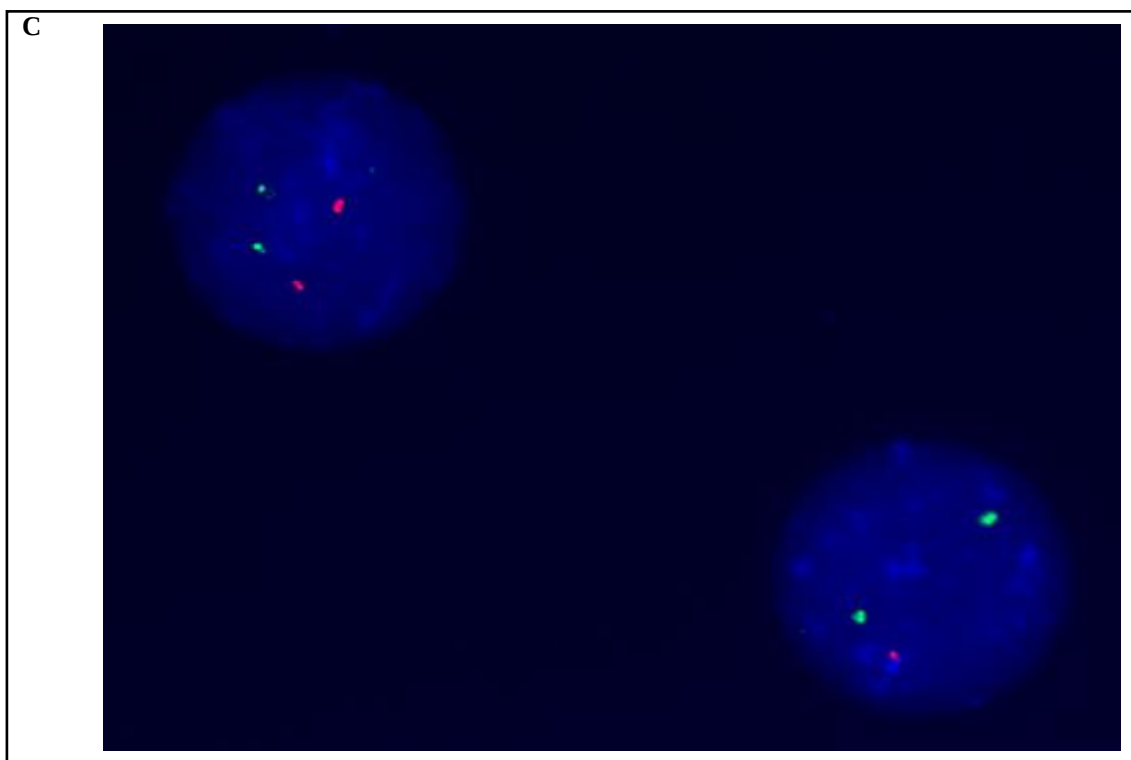
Występowanie ACA/Ph+ potwierdzono u czterech pacjentów (nr 9, 47, 153, 176; 20% chorych z delecją na jednym z chromosomów pochodnych) (Tabela 21).

Tabela 21. Dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie Ph-dodatnim oraz ewolucja kariotypu u pacjentów z delecją na der(9) lub der(22).

Nr pacjenta	Kariotyp	Moment stwierdzenia ACA/Ph+
9	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[13]/47,XX,idem, +der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[7]	rozpoznanie
	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[16]/47,XX,idem,+der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[11]/46,XX,idem,del(20)(q11.2)[3]	7 miesiąc leczenia imatynibem
	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[19]/47,XX,idem, +der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[5]/47,XX,idem,+8[4]/46,XX,idem,del(20)(q11.2)[2]	3 miesiąc leczenia nilotynibem
47	40~45,X,-Y[3],-1[3],-2[3],-8[3],t(9;22)(q34;q11.2)[4],-14[4],-17[3],-20[6],-21[8],-22[4][cp16]/46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[4]/46,XY[12]	6 miesiąc leczenia imatynibem
153	45,XY,der(1)t(1;12)(p34;q13),t(9;22)(q34;q11.2),-12,der(13)t(12;13)(q13;q12)[20]	rozpoznanie
	46,XY,idem,+der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[20]	6 miesiąc leczenia imatynibem
176	46,XX,t(8;17)(q13;q25),t(9;22)(q34;q11.2)[4]/46,XX[26]	6 miesiąc leczenia imatynibem

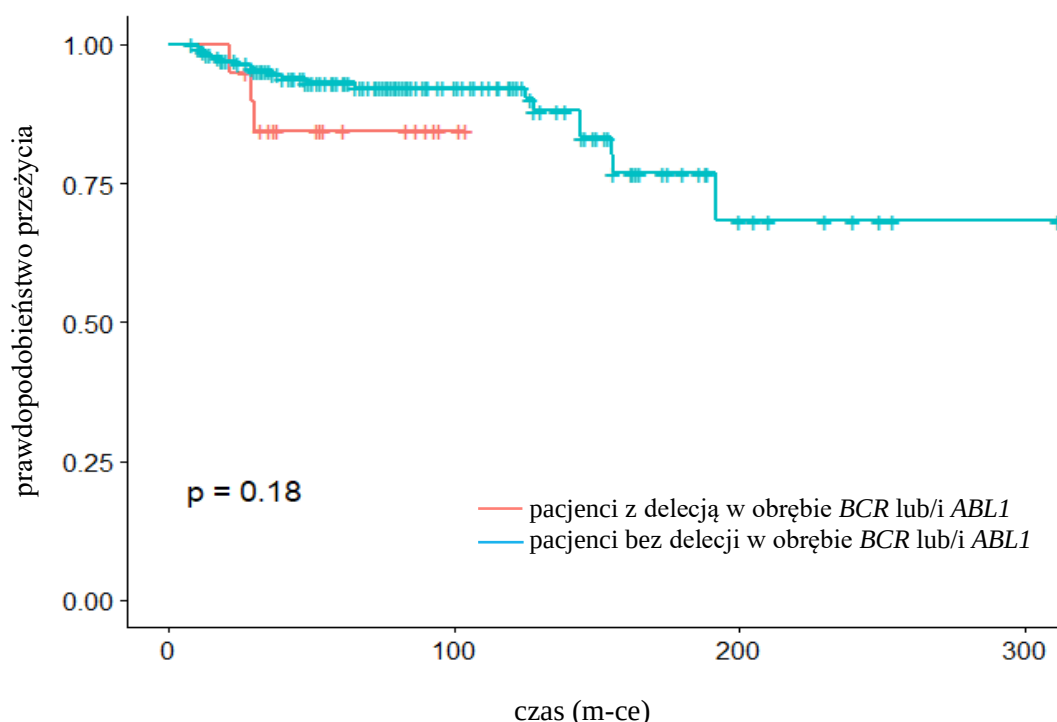
Wyrazem ewolucji kariotypu u pacjenta nr 47 były aneuploidie autosomów oraz utrata chromosomu płci Y, u pacjenta nr 153 dodatkowy chromosom Ph, u pacjentki nr 176 – translokacja t(8;17)(q13;q25), natomiast u pacjentki nr 9 – delecja del(20)(q12) oraz trisomia 8 (Rycina 29).





Rycina 29. Ewolucja kariotypu u pacjentki nr 9: A) Kariogram (metoda GTG) w momencie rozpoznania prezentujący $t(9;22)(q34;q11.2)$ wraz z dodatkowym chromosomem Ph; B) Kariogram po 7 miesiącu leczenia imatynibem prezentujący $t(9;22)(q34;q11.2)$ wraz z delecją fragmentu długiego ramienia chromosomu 20 – $del(20)(q12)$; C) FISH interfazowy z sondami 20q (sygnał czerwony) i 20pTEL (sygnał zielony) potwierdzający delecję $del(20)(q12)$; D) Kariogram po 12 miesiącach terapii TKI (3 miesiąc leczenia nilotinibem) przedstawiający wtórną aberrację w postaci trisomii 8 (źródło: opracowanie własne; zdjęcia wykonano w Pracowni Cytogenetyki Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej).

Nie stwierdzono różnicy istotnej statystycznie w całkowitym przeżyciu pacjentów z dwóch analizowanych grup (Wykres 5).



Wykres 5. Porównanie prawdopodobieństwa całkowitego przeżycia (analiza Kaplana-Meiera) pomiędzy grupą pacjentów z delecją w obrębie *BCR* lub/i *ABL1* i grupą pacjentów bez delecji (źródło: opracowanie własne).

Podsumowanie

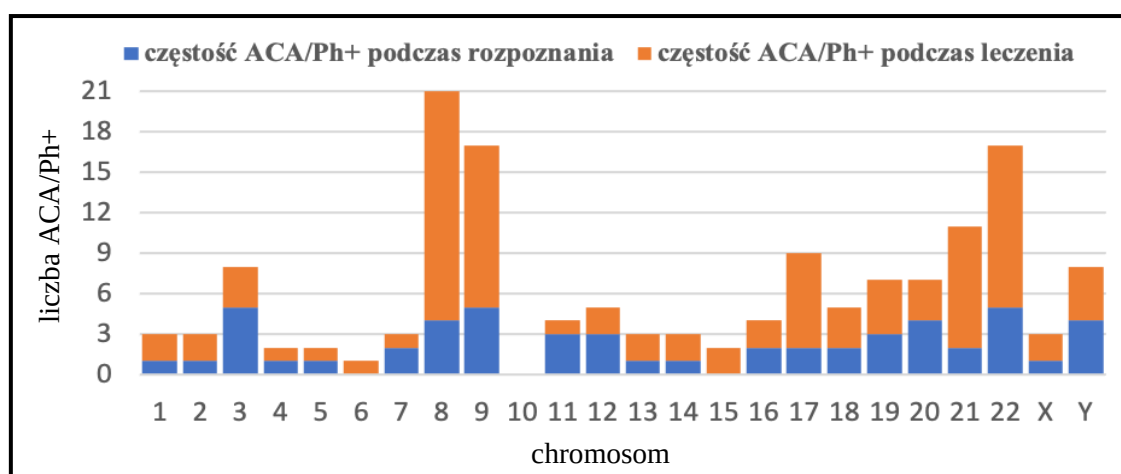
- Technika FISH na jądrach interfazowych uniemożliwia różnicowanie pacjentów z submikroskopową delecją obejmującą gen *ABL1* i/lub *BCR* z pacjentami z karyotypem Ph-ujemnym/*BCR/ABL1*-dodatnim bez jednoczesnego wykorzystania technik cytogenetyki klasycznej.
- Delecję stwierdzono u 9,8% analizowanych chorych: w 95% przypadków delecja wystąpiła w obrębie pochodnego chromosomu pary 9. U jednego pacjenta (5%) zaobserwowano delecję na chromosomie pochodnym pary 22.
- U pacjentów z delecją obejmującą gen *ABL1* i/lub *BCR* obserwowano mniejszą liczbę eozynofili w krwi obwodowej w chwili rozpoznania choroby w odniesieniu do pacjentów bez delecji.
- Delecja w obrębie locus *ABL1* i/lub *BCR* wydaje się nie wpływać negatywnie na przeżycie chorych w dobie stosowania TKI.

5.5 Dodatkowe aberracje chromosomowe w komórkach Philadelphia-dodatnich

Dodatkowe aberracje chromosomowe występujące w komórkach Philadelphia-dodatnich/*BCR-ABL1*-dodatnich (ACA/Ph+) stwierdzono u 53 (26,1%) spośród 203 chorych (z grupy 215 pacjentów wyłączono ośmiu pacjentów z translokacją wariantową od których nie zebrano pełnych danych klinicznych oraz czterech pacjentów Philadelphia-ujemnych/*BCR-ABL1*-dodatnich).

U 34 pacjentów (64,1%) stwierdzono tylko jedną dodatkową aberrację chromosomową. U 10 chorych (18,9%) stwierdzono kariotyp złożony (przynajmniej trzy aberracje występujące w jednym klonie), u pozostałych dziewięciu pacjentów (17%) – dodatkowe aberracje występujące w kilku klonach.

Najczęściej (u 21 pacjentów) w aberracji zaangażowany był chromosom 8 (Wykres 6). W 19 przypadkach wystąpiła trisomia 8, w jednym przypadku – monosomia 8, w kolejnym translokacja t(8;17)(q13;q25). Dodatkowe aberracje chromosomowe w komórkach Ph-dodatnich z zaangażowaniem chromosomu pary 9 i 22 obserwowano u 17 pacjentów, przy czym w 14 przypadkach zaangażowanie tych chromosomów wynikało jedynie z obecności dodatkowego chromosomu Ph, w tym w jednym przypadku – występowania izodicentrycznego chromosomu Ph (pacjent nr 92). Chromosom 21 brał udział w aberracjach chromosomowych w komórkach Ph-dodatnich u 11 chorych. Zaangażowanie chromosomu 17 obserwowano u dziewięciu pacjentów, chromosomu pary 3 i chromosomu płci Y – u ośmiu chorych, chromosomu pary 19 – w siedmiu przypadkach. Nie zaobserwowano aberracji angażujących chromosom pary 10.



Wykres 6. Wykres przedstawiający częstość zaangażowania poszczególnych chromosomów w aberracje występujące w komórkach Ph-dodatnich (źródło: opracowanie własne).

Spośród 53 pacjentów z ACA/Ph+ u 23 chorych aberracje obserwowano w chwili rozpoznania choroby (43,4%), z kolei u pozostałych (56,6%) – podczas monitorowania terapii (Tabela 22).

Ewolucję klonalną kariotypu stwierdzono u 11 pacjentów, u których obserwowano wtórne dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie Ph-dodatnim (Tabela 23). Ewolucja kariotypu była częściej obserwowana u pacjentów, u których wcześniej obserwowano ACA/Ph+ w trakcie terapii (pacjent nr 3, 4, 33, 74, 105, 162, 190 i 201) niż u chorych z ACA/Ph+ stwierdzonych w chwili rozpoznania choroby (pacjent nr 9, 193 i 198). Spośród wtórnych zmian chromosomowych większość miało charakter przejściowy, natomiast siedem stwierdzono w kariotypie częściej niż raz podczas monitorowania terapii. Ewolucję kariotypu obserwowano częściej, gdy w kariotypie wcześniej wykryto trisomię 8 (czterech pacjentów), izochromosom i(17q) (dwóch pacjentów) i dodatkowy chromosom Ph (dwóch pacjentów). Najczęstszą wtórną ACA/Ph+ była trisomia 8 (sześciu pacjentów), dodatkowy chromosom Ph (trzech pacjentów) i monosomia 21 (trzech pacjentów). Najczęściej wtórne aberracje chromosomowe obserwowano w trakcie terapii dazatynibem (Tabela 23). W grupie pacjentów z wtórnymi ACA/Ph+ śmiertelność wyniosła 63,6% (n=7/11).

Aberracje typu „major routes” wystąpiły u 25 pacjentów (47,2%), aberracje typu „minor routes” - u 34 pacjentów (64,1%). Spośród aberracji typu „major routes” najczęściej występowała trisomia 8 (13x), dodatkowy chromosom Ph stwierdzono u 12 pacjentów, izochromosom 17q wystąpił u trzech chorych, natomiast trisomię 19 stwierdzono w dwóch przypadkach. Warto podkreślić, iż jedyną aberracją nie obserwowaną w chwili rozpoznania, natomiast pojawiającą się jedynie w trakcie leczenia był izochromosom 17q.

U większości pacjentów dodatkowe aberracje chromosomowe obserwowano w subklonach (w zakresie od 3% do 97% metafaz), podczas gdy u ośmiu pacjentów (nr 12, 134, 146, 153, 179, 185, 198 i 215) ACA/Ph+ występowały we wszystkich analizowanych komórkach.

Tabela 22. Kariotypy pacjentów z dodatkowymi aberracjami chromosomowymi w komórkach Philadelphia-dodatnich (ACA/Ph+ zaznaczono pogrubioną czcionką).

L.p.	Nr pacjenta	Płeć	Kariotyp z ACA/Ph+ w momencie rozpoznania	Faza choroby w momencie ACA/Ph+	Kariotyp złożony (min. 3 aberracje)	Ewolucja klonalna kariotypu	Odpowiedź na TKI (ostatnie badanie)	Ostatnie badanie (m-ce)
1	9	K	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[13]/47,XX,idem,+ der(22)t(9;22)(q34;q11.2) [7]	CP		+	noCyR	21
2	64	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[19]/47,XY,idem,+ der(22)t(9;22)(q34;q11.2) [1]	CP			minCyR	34
3	58	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[20]/47,XY,idem,+ 8 [1]	CP			MR 4,5	34
4	70	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[19]/47,XY,idem,+ 8 [2]/46,XY[1]	CP			MR 4,5	74
5	143	K	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[30]/47,XX,idem,+ 8 [1]	CP			noCyR	50
6	12	K	46,XX, t(3;9)(p12;q21) ,t(9;22)(q34;q11.2)[20]	CP			MR 4	81
7	93	K	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[21]/46,XX,idem, add(17)(p13) [3]/46,XX[2]	CP			MR 5	81
8	102	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[24]/45,X,idem,-Y[5]	CP			MR 5	63
9	173	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[14]/46,XY,idem, del(3)(p21p21) [2]	CP			minCyR	18
10	179	M	46,XY, t(2;3)(p14;q26) ,t(9;22)(q34;q11.2)[20]	BP			noCyR	13
11	181	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[4]/46,XY,idem, t(3;4)(q28;q33) [19]	CP			MR 5	48
12	194	M	46,XY,t(2;9;22)(q11.2;q34;q11.2)[17]/45,XY,idem,- 20 [3]	CP		+	MMR	38
13	215	K	46,XX, t(7;22)(q22;p11) ,t(9;22)(q34;q11.2)[20]	CP			minCyR	13
14	22	K	54,XX,+ 8 ,t(9;22)(q34;q11.2),+ 11 ,+ 12 ,+ 16 ,+ 19 ,+ 20 ,+ 21 , + der(22)t(9;22)(q34;q11.2) [5]/55,XX,idem,+ 9 [9]/46,XX[1]	BP	+		MR 5	100
15	146	K	46,XX, t(9;11)(p22;q23) ,t(9;22)(q34;q11.2)[1]/ 47,XX,idem,+ der(22)t(9;22)(q34;q11.2) [36]/ 48,XX,idem,+ der(22)t(9;22)(q34;q11.2)x2 [3]	BP	+		MCyR	12
16	153	M	45,XY, der(1)t(1;12)(p34;q13) ,t(9;22)(q34;q11.2), - 12 , der(13)t(12;13)(q13;q?12) [20]	CP	+		noCyR	32

17	187	K	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[21]/ 40~45,X,idem,-X[3],-3[4],-16[3],-18[4],-21[4][cp14]	CP			noCyR	61
18	198	M	45,X,-Y,t(8;9;22)(q22;q34;q11.2), der(12)t(12;17;18)(q13;q?;q?), der(17)t(12;17;18)(q13;q12;?),der(17)t(17;18)(q12;?)[25]	CP	+	+	noCyR	155
19	2	K	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[15]/ 46,XX,idem, add(7)(p?21),del(11)(q14)[5]	AP	+		CCyR	12
20	29	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[17]/45,X,idem,-Y[4]/ 45,XY,idem,- 19[3]/46,XY[1]	CP			MR 5	40
21	136	K	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[29]/45,XX,idem,- 19[3]/45,XX,idem,-20[3]	CP			MR 5	78
22	168	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[23]/45,X,idem,-Y[10]/ 45,XY,idem,- 20[3]/46,XY[1]	CP			MR 5	42
23	185	K	46,XX,t(5;14)(q11;q13),t(9;22)(q34;q11.2)[20]	CP			noCyR	28
L.p.	Nr pacjenta	Płeć	Kariotyp z ACA/Ph+ podczas monitorowania leczenia TKI	Faza choroby w momencie ACA/Ph+	Kariotyp złożony (min. 3 aberracje)	Ewolucja klonalna kariotypu	Odpowiedź na TKI (ostatnie badanie)	Ostatnie badanie (m-ce)
24	1	K	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[5]/47,XX,idem,+ der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[15]	AP			minCyR	120
25	20	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[20]/47,XY,idem,+ der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[1]/ 46,XY[5]	CP			MR 4,5	150
26	46	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[2]/47,XY,idem,+ der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[1]/ 46,XY[24]	CP			MR 4	130
27	21	K	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[16]/47,XX,idem,+ der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[12]	CP			CCyR	124
28	92	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[9]/ 46,XY,idem, der(22)idic(22)(p11)t(9;22)(q34;q11.2)[11]	CP			PCyR	65
29	39	M	47,XY,+8,t(9;22)(q34;q11.2)[3]/47,XY,+9[1]/46,XY[20]	CP			MR 5	188
30	186	K	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[25]/47,XX,idem,+8[1]	CP			noCyR	156
31	190	K	46,XX,t(7;9;22)(q11;q34;q11.2)[3]/47,XX,idem,+8[20]	BP		+	noCyR	144
32	74	K	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[8]/47,XX,idem,+8[16]	AP		+	noCyR	210

33	105	K	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[5]/47,XX,idem,+8[2]/46,XX[18]	CP		+	PCyR	125	
34	65	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[3]/ 48,XY,idem,+8,+der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[7]/ 47,XY,idem,+der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[6]/48,XY,+8,+9[1]/46,XY[2]	CP		+	noCyR	46	
35	33	K	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[19]/46,XX,idem,+8,-22[2]/47,XX,idem,+8[1]/ 48,XX,idem,+8,+der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[1]/ 45,XX,idem,-17,-21,+der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[1]	CP		+	+	noCyR	175
36	64	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[4]/41~46,XY,idem,+8[5],add(12)(q24)[8], -13[3],-16[3],-17[4],-18[7],-19[3],-21[3][cp12]/46,XY[2]	AP		+	minCyR	34	
37	122	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[4]/49,XY,idem,t(1;3)(q25;q26),+8,+14,+19[17]	BP		+	noCyR	18	
38	3	K	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[12]/46,XX,idem,i(17)(q10)[5]/ 47,XX,idem,+mar[1]/46,XX,i(17)(q10)[1]/46,XX[1]	CP			+	noCyR	39
39	4	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[18]/46,XY,idem,i(17)(q10)[2]	BP			+	CCyR	192
40	7	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[7]/46,XY,idem,i(17)(q10)[7]/46,XY[10]	CP				MR5	154
41	49	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[17]/45,XY,idem,-21[3]	CP				CCyR	38
42	96	K	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[27]/45,XX,idem,-21[3]	CP				MCyR	240
43	103	K	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[19]/45,XX,idem,-18[3]	CP				noCyR	115
44	154	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[4]/ 46,XY,idem,der(9)t(9;22)(q34;q11.2)del(9)(p21)[12]	BP				CCyR	20
45	176	K	46,XX,t(8;17)(q13;q25),t(9;22)(q34;q11.2)[4]/46,XX[26]	CP				MR 4	38
46	178	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[1]/46,XY,idem,t(15;21)(q22;q22)[16]	BP				noCyR	10
47	27	K	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[3]/46,X,idem,dup(X)(q27q28)[7]/ 46,X,dup(X)(q27q28)[8]/46,XX[7]	CP				CCyR	52
48	54	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[26]/45,X,idem,-Y[3]/46,XY[1]	CP				MCyR	53
49	47	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[4]/40~45,X,-Y[3],-1[3],-2[3],-8[3], t(9;22)(q34;q11.2)[4],-14[4],-17[3],-20[6],-21[8],-22[4][cp16]/46,XY[12]	CP				CCyR	54
50	188	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[18]/45,X,idem,-Y[3]/ 45,XY,idem,-7[3]/45,XY,idem,-19[3]	CP				noCyR	24

51	134	M	47,XY, inv(3)(q21q26) ,t(9;22)(q34;q11.2),+ der(22)t(9;22)(q34;q11.2) [25]	BP	+	noCyR	15	
52	162	K	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[18]/ 92,XXXX ,t(9;22)(q34;q11.2)x2[5]/ 46,XX, inv(7)(p22q11.2) ,t(9;22)(q34;q11.2)[2]	CP		+	MR 4	89
53	201	K	46,XX,t(1;9;22)(p36.1;q34;q11.2)[9]/ 90~92,XXXX ,t(1;9;22)(p36.1;q34;q11.2)x2[6],-4[3],-6[3][cp6]	CP		+	noCyR	30

Skróty: ACA/Ph+, dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie komórek Philadelphia-dodatnim; AP, faza akceleracji; BP, faza przełomu blastycznego; CCyR, całkowita odpowiedź cytogenetyczna; CP, faza przewlekła; K, kobieta; M, mężczyzna; mCyR, mniejsza odpowiedź cytogenetyczna; minCyR, minimalna odpowiedź cytogenetyczna; MMR, większa odpowiedź molekularna; MR4, głęboka odpowiedź molekularna na poziomie 4log; MR4,5, głęboka odpowiedź molekularna na poziomie 4,5log; MR5, głęboka odpowiedź molekularna na poziomie 5log; noCyR, brak odpowiedzi cytogenetycznej; PCyR, częściowa odpowiedź cytogenetyczna; TKI, inhibitory kinaz tyrozynowych

Tabela 23. Ewolucja klonalna kariotypu (wtórne ACA/Ph+ zaznaczono pogrubioną czcionką).

L.p.	Nr pa- cjenta	Wtórna ACA/Ph+	Kolejność wystąpienia ACA/Ph+	Faza choroby w chwili ACA/Ph+	Czas od rozpoznania choroby do wystąpienia ACA/Ph+ (m-ce)	Czas od wystąpienia ACA/Ph+ do ostatniego badania (m-ce)	ACA/Ph+ obserwo- wana częściej niż raz	TKI w trakcie wystąpienia ACA/Ph+	Trans- formacja do AP/BP w trakcie trwania choroby	Allo BMT	Śmierć
1	3	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[5]/ 47,XX,idem,+8[22]	i(17)(q10) → +8	BP	39	0		dazatynib		+	+
2	4	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[10]/ 46,XY,idem, der(2)ins(2;13)(p21;q34q12), der(12)(12pter→12q12::13q12?), der(13)(13p12?→; 13q12::12q12→12qter) [25]/	i(17)(q10) → der(2), der(12), der(13)	CP	156	38		wznowa po alloBMT, dazatynib	+	+	+

3		46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[16]/ 47,XX,idem,+der(22) t(9;22)(q34;q11.2)[11]/ 46,XX,idem, del(20)(q11.2) [3]	+Ph → del(20q) → +8	CP	7	14	+	imatynib, nilotynib, dazatynib			
	9	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[7]/ 47,idem,+8[6]/ 46,XX,idem,del(20)(q11.2)[1]/ 47,XX,idem, +der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[1]		CP	18	3		dazatynib			
5		46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[21]/ 46,XX,idem, t(11;16)(p11.2;p13.3) [4]	+Ph, +8 →	CP	74	101	+	imatynib, nilotynib		+	
	33	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[15]/ 46,XX,idem, t(11;16)(p11.2;p13.3)[7]/ 46,XX,idem, t(3;5)(p21;q35) [1]/ 46,XX[6]	t(11;16) → t(3;5)	CP	126	49		nilotynib			
7	74	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[18]/ 45,XX,idem,- 21 [4]/46,XX[1]	+8 → -21	AP	150	60		nilotynib	+	+	
8	105	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[9]/ 46,X,idem, del(X)(q22-24) /46,XX[21]	+8 → del(Xq)	CP	120	5		dazatynib			+
9	162	47,XX,+8,t(9;22)(q34;q11.2)[1]/ 47,XX,+8[12]/47,XX,+6[2]/46,XX[10]	4n, inv(7) → +8	CP	66	23		dazatynib			
10	190	46,XX,t(7;9;22)(q11.2;q34;q11.2)[24]/ 44~45,XX,idem,- 21 [3],-der(22) t(7;9;22)(q11.2;q34;q11.2)[3][cp5]/ 46,XX,idem, ider(22)(q10) [1]	+8 → -21, ider(22) (q10)	CP	123	21	+	dazatynib, nilotynib	+	+	+
11	193	46,XY,t(2;9;22)(q11.2;q34;q11.2)[22]/ 48,XY,idem,+8,+ der(22) t(2;9;22) (q11.2;q34;q11.2)[2]/ 45,X,idem,- Y [3]	-20 → +8,+der(22), -Y	CP	3	35	+	imatynib			

12		46,X,-Y,t(8;9;22)(q22;q34;q11.2), der(12)t(12;17;18)(q13;q?:q?), der(17)t(12;17;18)(q13;q12;?), der(17)t(17;18)(q12;?),+ der(22) t(8;9;22) (q22;q34;q11.2)[25]	AP	72	83	+	dazatynib		
13		44~46,X,-Y[30], t(8;9;22)(q22;q34;q11.2)[30],der(12) t(12;17;18)(q13;q?:q?)[29],- 15 [3], der(17)t(12;17;18)(q13;q12;?)[30], der(17)t(17;18)(q12;?)[28], - 20 [5],- 21 [5],+der(22) t(9;22)(q34;q11.2)[26][cp30]	CP	140	15	+	dazatynib		
14	198	43~46,X,-Y[20], t(8;9;22)(q22;q34;q11.2)[20], der(12)t(12;17;18)(q13;q?:q?)[19], der(17)t(12;17;18)(q13;q12;?)[20], der(17)t(17;18)(q12;?)[18],- 19 [4], -20[3],-21[3],+der(22) t(9;22)(q34;q11.2)[17][cp20]	-Y, der(12), der(17), der(17) → +Ph → -15, -20, -21 → -19 → +8	CP	146	9	dazatynib	+	+
15		46,X,-Y,t(8;9;22)(q22;q34;q11.2), der(12)t(12;17;18)(q13;q?:q?), der(17)t(12;17;18)(q13;q12;?), der(17)t(17;18)(q12;?), +der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[14]/ 48,idem,+ 8 ,+der(22) t(9;22)(q34;q11.2)[8]	BP	150	5	+	dazatynib		
16	201	46,XX,t(1;9;22)(p36.1;q34;q11.2)[18]/ 47,XX,idem,+ 8 [1]	4n → +8	CP	6	24	imatynib	+	+

Skróty: ACA/Ph+, dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie komórek Philadelphia-dodatnim; alloBMT, allogeniczny przeszczep komórek szpiku kostnego; AP, faza akceleracji; BP, faza przełomu blastycznego; CP, faza przewlekła; TKI, inhibitory kinaz tyrozynowych

Podsumowanie

- ACA/Ph+ stwierdzono u 26,1% chorych.
- W aberracje zaangażowane były wszystkie chromosomy poza chromosomem 10.
- U pacjentów z ACA/Ph+ częściej obserwowano aberracje typu „minor routes” niż aberracje typu „major routes”.
- Analizując poszczególne aberracje najczęściej obserwowano trisomię 8.
- Izochromosom i(17q) był jedyną spośród powtarzających się ACA/Ph+ obserwowanym wyłącznie w trakcie monitorowania leczenia.
- W analizowanej grupie pacjentów 14,8% ACA/Ph+ obserwowano podczas monitorowania terapii TKI, pozostałe 11,3% - w chwili rozpoznania CML.
- Ewolucję klonalną kariotypu stwierdzono u 20,7% pacjentów z ACA/Ph+ (co stanowi 5,4% spośród wszystkich pacjentów).
- Częściej ewolucja dotyczyła pacjentów, którzy wcześniej prezentowali w kariotypie +8, i(17q)(q10) lub +der(22)t(9;22)(q34;q11.2).
- Najczęstszą wtórną ACA/Ph+ była +8, +der(22)t(9;22)(q34;q11.2) i -21.
- Wtórne aberracje najczęściej obserwowano w trakcie terapii dazatynibem.
- W grupie pacjentów z wtórnymi ACA/Ph+ śmiertelność wyniosła 63,6%.

5.5.1 Porównanie grupy pacjentów z obecnością i bez ACA/Ph+ w kariotypie

W grupie chorych, u których stwierdzono ACA/Ph+ dominowali mężczyźni (Tabela 24). Splenomegalia występowała częściej u pacjentów z ACA/Ph+ w porównaniu do pacjentów bez ACA/Ph+ (79,2% vs. 58,7%; $p=0,007$). Odsetek blastów we krwi obwodowej u pacjentów z ACA/Ph+ był wyższy (mediana odsetka blastów 2% vs. 1%; $p=0,007$). Również w tej grupie stwierdzano wyższy odsetek pacjentów z wysokimi wskaźnikami prognostycznymi oszacowanymi w chwili rozpoznania. Liczba pacjentów z wysokim i niskim ryzykiem ocenionym wg skali Hasforda różniła się istotnie w zależności od obecności ACA/Ph+ ($p=0,04$). Podobną zależność stwierdzono pomiędzy liczbą pacjentów z wysokim i niskim ryzykiem ($p=0,002$) oraz między pośrednim i wysokim ryzykiem ($p=0,01$) wg skali ELTS. Częstsze występowanie faz zaostrenia choroby u pacjentów na etapie diagnozy wiązało się z częstszym

stwierdzeniem ACA/Ph+ w ich kariotypie ($p=0,01$). U pacjentów z ACA/Ph+ istotnie częściej wykonywano allotransplantację komórek szpiku kostnego z powodu większego ryzyka transformacji do zaawansowanych faz choroby i większej śmiertelności. Zaobserwowano istotną statystycznie różnicę w przeżyciu pomiędzy badanymi grupami (Wykres 7).

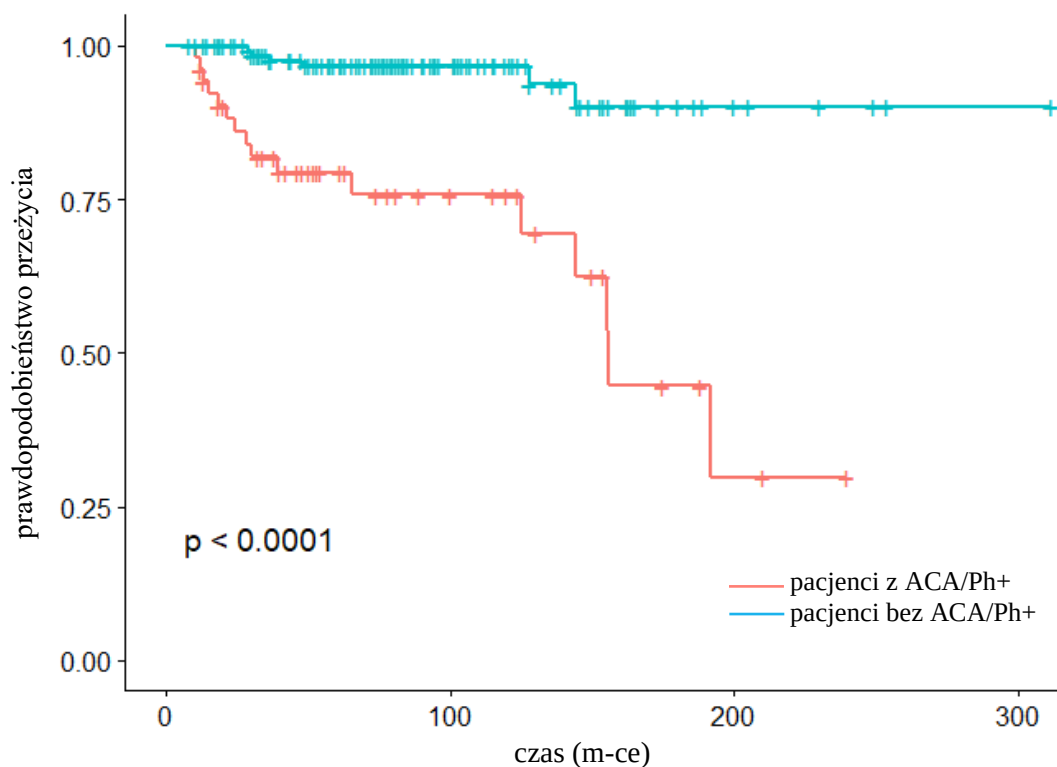
Tabela 24. Porównanie wybranych parametrów kliniczno-laboratoryjnych i skal prognostycznych pomiędzy grupą pacjentów z ACA/Ph+ i bez ACA/Ph+ w kariotypie.

Badany parametr		Pacjenci z ACA/Ph+ (n=53)	Pacjenci bez ACA/Ph+ (n=150)	p-value
Mediana wieku zachorowania w latach; (zakres)		50 (19-83)	51 (9-84)	0,7301
Płeć męska/żeńską; n (%)		28 /25 (52,8 /47,2)	69 /81 (46 /54)	0,4264
Powiększenie śledziony przy rozpoznaniu; n (%)		42 (79,2)	88 (58,7)	0,0077
Hg mmol/l przy rozpoznaniu; mediana (zakres)		7,1 (4,4-9,9)	7,5 (3,5-13,0)	0,1155
WBC $10^9/L$ przy rozpoznaniu; mediana (zakres)		108,8 (2,2-528)	91,3 (5,7-658)	0,3798
PLT $10^9/L$; przy rozpoznaniu; mediana (zakres)		418 (51-2746)	431 (42-2299)	0,3397
Blasty we krwi przy rozpoznaniu; mediana % (zakres)		2 (0-68)	1 (0-50)	0,0071
Eozynofile we krwi przy rozpoznaniu; mediana % (zakres)		2 (0-20)	2 (0-17)	0,5506
Bazofile we krwi przy rozpoznaniu; mediana % (zakres)		2 (0-18)	2 (0-29)	0,6743
Ocena ryzyka wg Sokala; n (%)	niskie	14 (26,4)	55 (36,7)	0,0389*
	pośrednie	18 (34)	63 (42)	
	wysokie	21 (39,6)	32 (21,3)	
Ocena ryzyka wg Hasforda (Euro); n (%)	niskie	17 (32,1)	68 (45,3)	0,0446*
	pośrednie	25 (47,2)	69 (46)	
	wysokie	11 (20,7)	13 (8,7)	
Ocena ryzyka wg Eutos; n (%)	niskie	46 (86,8)	143 (95,3)	0,0539
	wysokie	7 (13,2)	7 (4,7)	
Ocena ryzyka wg ELTS; n (%)	niskie	26 (49)	99 (66)	0,0024*
	pośrednie	10 (18,9)	35 (23,3)	
	wysokie	17 (32,1)	16 (10,7)	
Faza choroby przy rozpoznaniu; n (%)	CP	41 (77,4)	138 (92)	0,0146*
	AP	8 (15,1)	10 (6,7)	
	BP	4 (7,5)	2 (1,3)	
Translokacja wariantowa; n (%)		4 (7,5)	9 (6)	0,7459
"Zamaskowany" Ph; n (%)		1 (1,9)	0	0,2611
Delecja <i>ABL1</i> lub/i <i>BCR</i> ; n (%)		4 (7,5)	16 (10,7)	0,6024

	e13a2 (b2a2)	16 (30,2)	50 (33,3)	
Transkrypt; n (%)	e14a2 (b3a2)	33 (62,3)	97 (64,7)	0,1713
	inny/koeekspresja	2 /2 (7,5)	2 /1 (1,3 /0,7)	
Warianty KD BCR-ABL1; n (%)		8 (15,1)	15 (10)	0,3205
Transformacja do BP/AP; n (%)		11 (20,7)	3 (2)	<0,0001
AlloBMT; n (%)		18 (34)	3 (2)	<0,0001
Śmierć, n (%)		16 (30,2)	6 (4)	<0,0001

Skróty: ACA/Ph+, dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie komórek Philadelphia-dodatnim; alloBMT, allogeniczny przeszczep komórek szpiku kostnego; AP, faza akceleracji; BP, faza przełomu blastycznego; CP, faza przewlekła; Hb, hemoglobina; KD, domena kinazowa; PLT, trombocyty; TKI, inhibitory kinaz tyrozynowych WBC, leukocyty

*analiza post-hoc	p-value po korekcji
Ocena ryzyka wg Sokala	
niskie vs. pośrednie	0,8429
niskie vs. wysokie	0,0514
pośrednie vs. wysokie	0,0514
Ocena ryzyka wg Hasforda (Euro)	
niskie vs. pośrednie	0,3775
niskie vs. wysokie	0,0496
pośrednie vs. wysokie	0,1258
Ocena ryzyka ELTS	
niskie vs. pośrednie	0,8340
niskie vs. wysokie	0,0025
pośrednie vs. wysokie	0,0135
Faza choroby przy rozpoznaniu	
CP vs. AP	0,1216
CP vs. BP	0,0953
AP vs. BP	0,6404



Wykres 7. Porównanie prawdopodobieństwa całkowitego przeżycia (analiza Kapłana-Meiera) pomiędzy grupą pacjentów z ACA/Ph+ i grupą pacjentów bez ACA/Ph+ w kariotypie (źródło: opracowanie własne).

Podsumowanie

- Powiększenie śledziony oraz zwiększony odsetek blastów we krwi podczas rozpoznania choroby obserwowano istotnie statystycznie częściej u pacjentów z ACA/Ph+ w odniesieniu do pacjentów bez ACA/Ph+ w kariotypie.
- W badanej grupie obserwowano statystycznie wyższe odsetki pacjentów z wysokim ryzykiem progresji choroby oceniane wg skali Sokala, Hasforda i ELTS.
- Występowanie ACA/Ph+ związane było z istotnie statystycznie krótszym całkowitym przeżyciem oraz większym ryzykiem transformacji choroby do zaawansowanych faz w porównaniu z pacjentami bez ACA/Ph+ w kariotypie.

5.5.2 Porównanie grupy pacjentów z ACA/Ph+ stwierdzonymi w chwili rozpoznania choroby i w trakcie monitorowania terapii

Porównano podgrupy pacjentów z ACA/Ph+ (Tabela 25). Nie zaobserwowano istotnych różnic w charakterystyce kliniczno-laboratoryjnej pomiędzy badanymi grupami pacjentów.

Tabela 25. Porównanie wybranych parametrów kliniczno-laboratoryjnych i skal prognostycznych w chwili rozpoznania choroby pomiędzy grupą pacjentów z ACA/Ph+ wykrytymi w chwili rozpoznania oraz podczas monitorowania terapii.

Badany parametr		Pacjenci z ACA/Ph+ stwierdzonymi w trakcie rozpoznania n=23	Pacjenci z ACA/Ph+ stwierdzonymi w trakcie leczenia n=30	p-value
Mediana wieku zachorowania w latach; (zakres)		52 (19-81)	47,5 (20-83)	0,8591
Płeć męska/żeńską; n (%)		12/11 (52,2/47,8)	16/14 (53,3/46,7)	0,99
Powiększenie śledziony; n (%)		19 (82,6)	23 (76,7)	0,7379
Hb mmol/l; mediana (zakres)		7,2 (4,7-9,9)	6,9 (4,4-9,6)	0,8468
WBC 10 ⁹ /L; mediana (zakres)		89,7 (2,25-307,8)	118 (22,5-528)	0,1123
PLT 10 ⁹ /L; mediana (zakres)		418 (51-1200)	404 (58-2746)	0,5168
Blasty we krwi; mediana % (zakres)		2 (0-68)	2 (0-16)	0,9056
Eozynofile we krwi; mediana % (zakres)		2 (0-16)	2 (0-20)	0,8913
Bazofile we krwi; mediana % (zakres)		2 (0-18)	2 (0-11)	0,9483
Ocena ryzyka wg Sokala; n (%)	niskie	6 (26,1)	8 (26,7)	0,938
	wysokie	7 (30,4)	11 (36,7)	
	pośrednie	10 (43,5)	11 (36,7)	
Ocena ryzyka wg Hasforda (Euro); n (%)	niskie	6 (26,1)	11 (36,7)	0,6291
	pośrednie	11 (47,8)	14 (46,7)	
	wysokie	6 (26,1)	5 (16,7)	
Ocena ryzyka wg Eutos; n (%)	niskie	21 (91,3)	25 (83,3)	0,6851
	wysokie	2 (8,7)	5 (16,7)	
Ocena ryzyka wg ELTS; n (%)	niskie	12 (52,2)	14 (46,7)	0,99
	pośrednie	4 (17,4)	6 (20)	
	wysokie	7 (30,4)	10 (33,3)	
Faza choroby; n (%)	CP	17 (73,9)	24 (80)	0,0451*
	AP	2 (8,7)	6 (20)	
	BP	4 (17,4)	0	
Transkrypt; n (%)	e13a2 (b2a2)	8 (34,8)	8 (26,7)	0,6828
	e14a2 (b3a2)	14 (60,9)	19 (63,3)	
	inny/koekspresja	1 /0 (4,3)	1 /2 (3,3 /6,7)	

Skróty: ACA/Ph+, dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie komórek Philadelphia-dodatnim; AP, faza akceleracji; BP, faza przełomu blastycznego; CP, faza przewlekła; Hb, hemoglobina; PLT, trombocyty; WBC, leukocyty

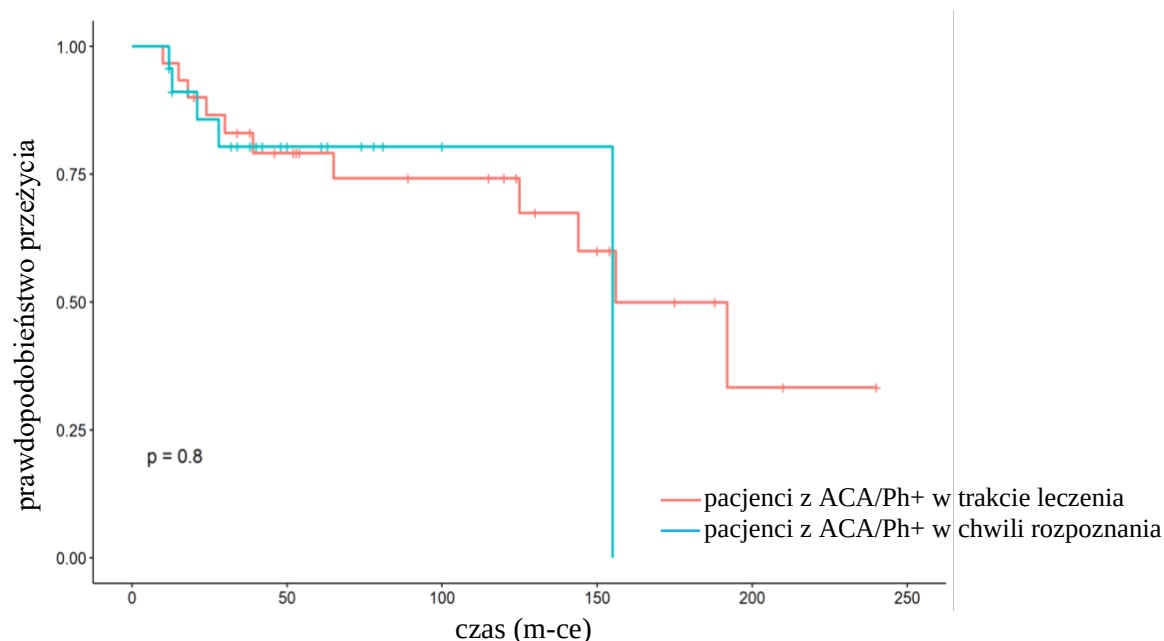
*analiza post-hoc	p-value po korekcji
Faza choroby przy rozpoznaniu	
CP vs. AP	0,4583
CP vs. BP	0,0909
AP vs. BP	0,0909

Mediana czasu stwierdzenia ACA/Ph+ u pacjentów w trakcie leczenia choroby wyniosła 19 miesięcy (Tabela 26). Statystycznie u większej liczby pacjentów z ACA/Ph+ stwierdzonych w trakcie leczenia obserwowano transformację blastyczną w porównaniu do grupy chorych z ACA/Ph+ stwierdzonymi w chwili rozpoznania choroby (33,3% vs. 4,3%; $p=0,01$). Mimo to nie obserwowano różnicy istotnej statystycznie pomiędzy badanymi grupami pacjentów w odniesieniu do całkowitego przeżycia (Wykres 8).

Tabela 26. Porównanie wybranych parametrów klinicznych oraz genetycznych pomiędzy grupą pacjentów z ACA/Ph+ stwierdzonymi w chwili rozpoznania choroby i grupą z ACA/Ph+ w trakcie monitorowania leczenia TKI.

Badany parametr		Pacjenci z ACA Ph+ stwierdzonymi w trakcie rozpoznania n=23	Pacjenci z ACA Ph+ stwierdzonymi w trakcie leczenia n=30	p-value
Czas od diagnozy do stwierdzenia ACA/Ph+ (m-ce)	mediana	0	19	
	zakres	0	3-197	
Faza choroby w momencie wystąpienia ACA/Ph+; n (%)	CP	18 (78,3)	21 (70)	0,8969
	AP	2 (8,7)	3 (10)	
	BP	3 (13)	6 (20)	
Odsetek metafaz z ACA/Ph+; (%)	mediana	17	17	0,5889
	zakres	3-100	4-100	
Status ACA Ph+; n (%)	1 ACA/Ph+	13 (56,5)	21 (70)	0,3906
	więcej niż 1 ACA/Ph+	10 (43,5)	9 (30)	
Ewolucja klonalna kariotypu; n (%)		3 (13)	8 (26,7)	0,3126
Czas od obserwacji ACA/Ph+ do ostatniego badania (m-ce)	mediana	40	48	0,5122
	zakres	12-155	3-113	
Warianty KD BCR-ABL1; n (%)		1 (4,3)	7 (23,3)	0,1178
Transformacja do BP/AP; n (%)		1 (4,3)	10 (33,3)	0,0149
AlloBMT; n (%)		5 (21,7)	13 (43,3)	0,1451
Śmierć; n (%)		5 (21,3)	11 (36,7)	0,3661

Skróty: alloBMT, allogeniczny przeszczep komórek szpiku kostnego; ACA/Ph+, dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie Ph-dodatnim; AP, faza akceleracji; BP, faza przełomu blastycznego; CP, faza przewlekła; TKI, inhibitory kinaz tyrozynowych



Wykres 8. Porównanie prawdopodobieństwa całkowitego przeżycia (estymator Kaplana-Meiera) pomiędzy grupą pacjentów z ACA/Ph+ zaobserwowanymi w trakcie leczenia i grupą pacjentów z ACA/Ph+ stwierdzonymi w chwili rozpoznania choroby (źródło: opracowanie własne).

Podsumowanie

- Stwierdzenie fazy akceleracji bądź kryzy blastycznej w chwili diagnozowania pacjenta wiązało się z statystycznie częstszym występowaniem ACA/Ph+ w tym samym czasie ($p=0,04$).
- Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w charakterystyce wykładników hematologicznych pomiędzy porównywanymi grupami pacjentów.
- U pacjentów z ACA/Ph+ stwierdzonych w trakcie leczenia istotnie częściej obserwowano transformację blastyczną w porównaniu do grupy chorych z ACA/Ph+ stwierdzonymi w chwili rozpoznania choroby (33,3% vs. 4,3%; $p=0,01$).
- Nie zaobserwowano różnicy istotnej statystycznie pomiędzy badanymi grupami pacjentów w odniesieniu do całkowitego przeżycia.

5.5.3 Porównanie grupy pacjentów z ACA/Ph+ występującymi w formie izolowanej, w różnych klonach komórkowych oraz w formie kariotypu złożonego

Pacjentów z dodatkowymi aberracjami chromosomowymi w klonie Philadelphia-dodatnim podzielono na trzy grupy. Najliczniejszą grupę stanowili pacjenci tylko z jedną ACA/Ph+ w kariotypie (34 chorych; 64,1% wszystkich chorych z ACA/Ph+). Tego typu aberracje – chromosom Ph z jedną dodatkową aberracją w kariotypie, określono jako ACA/Ph+ izolowane. U 10 osób (18,9% wszystkich chorych z ACA/Ph+) obserwowano kariotyp złożony (przynajmniej trzy aberracje występujące w tym samym klonie komórek), natomiast dziewięciu chorych (17% wszystkich chorych z ACA/Ph+) aberracje występowały w postaci kilku klonów w kariotypie. Mediana czasu wystąpienia ACA/Ph+ od rozpoznania choroby była najdłuższa w grupie chorych z jedną dodatkową aberracją ACA/Ph+ i najkrótsza w grupie chorych z złożonym kariotypem (Tabela 27). W grupie pacjentów z kariotypem złożonym częściej stwierdzano hematologiczne wykładniki fazy akceleracji i kryzy blastycznej w chwili pojawienia się ACA/Ph+. W tej grupie pacjentów wyższy był również odsetek metafaz z ACA/Ph+. W grupie pacjentów z kariotypem złożonym zaobserwowano najwyższy odsetek wykonanych alloBMT (50% chorych), transformacji blastycznej w trakcie trwania choroby (30% chorych) oraz liczby zgonów (40% chorych).

Tabela 27. Porównanie wybranych parametrów kliniczno-laboratoryjnych i skal prognostycznych pomiędzy grupą pacjentów z ACA/Ph+ jako jedyną dodatkową aberracją, z ACA/Ph+ występującymi w formie kilku klonów oraz grupą z kariotypem złożonym.

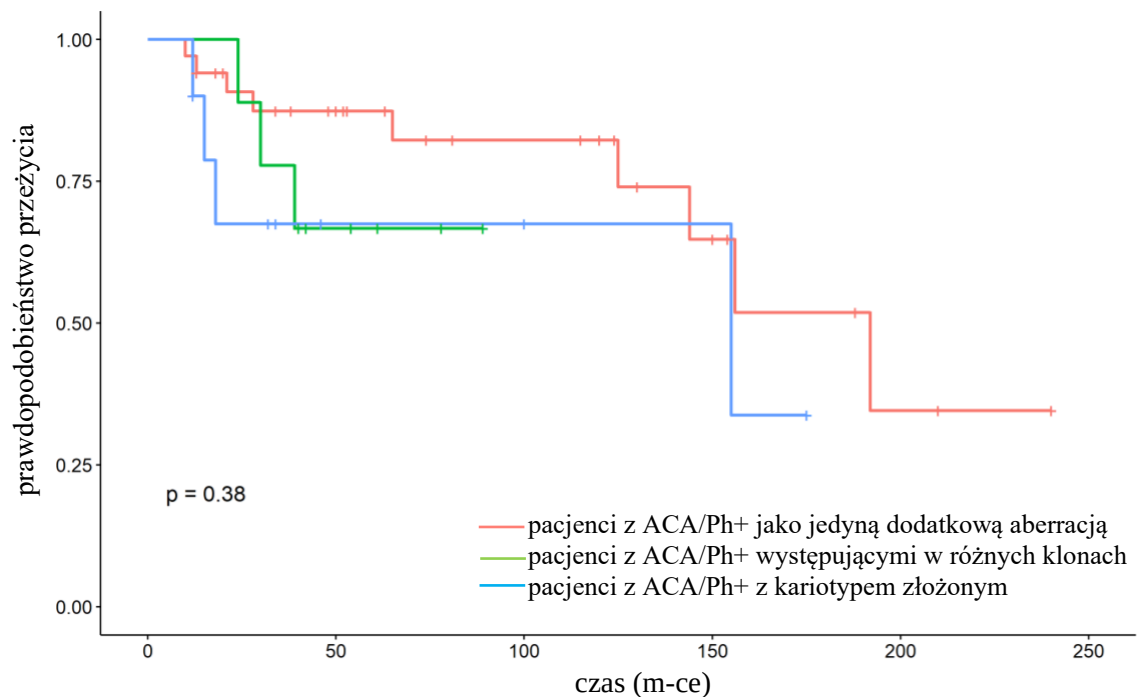
Badany parametr		Pacjenci z ACA/Ph+ izolowane n=34	Pacjenci z ACA/Ph+ różne klony n=9	Pacjenci z ACA/Ph+ kariotyp złożony n=10	p-value
Płeć; n (%)	mężczyźni	18 (52,9)	4 (44,4)	6 (60)	0,7891
	kobiety	16 (47,1)	5 (55,6)	4 (40)	
Wiek zachorowania; (lata)					
	mediana	50	55	50	0,766
	zakres	19-83	35-64	30-60	
Czas od diagnozy do stwierdzenia ACA/Ph+ (m-ce)					
	mediana	6	3	1,5	0,3431
	zakres	0-197	0-20	0-62	
ACA/Ph+ w trakcie rozpoznania;					
	n (%)	14 (41,2)	4 (44,4)	5 (50)	0,9212
ACA/Ph+ w trakcie leczenia;					
	n (%)	20 (58,8)	5 (55,6)	5 (50)	

Faza choroby w momencie wystąpienia ACA/Ph+; n (%)				
CP	26 (76,5)	9 (100)	4 (40)	0,0466*
AP	3 (8,8)	0	2 (20)	
BP	5 (14,7)	0	4 (40)	
Odsetek metafaz z ACA/Ph+; (%)				
mediana	15	12	44	0,0102*
zakres	3-100	8-40	4-100	
Ewolucja klonalna kariotypu; n (%)	6 (17,6)	3 (33,3)	2 (20)	0,551
Czas od obserwacji ACA/Ph+ do ostatniego badania (m-ce)				
mediana	49	42	31,5	0,5048
zakres	3-110	8-78	9-155	
AlloBMT; n (%)	11 (32,3)	2 (22,2)	5 (50)	0,4442
Transformacja do BP/AP; n (%)	8 (23,5)	0	3 (30)	0,262
Śmierć; n (%)	9 (26,5)	3 (33,3)	4 (40)	0,6881

Skróty: alloBMT, allogeniczny przeszczep komórek szpiku kostnego; ACA/Ph+, dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie Ph-dodatnim; AP, faza akceleracji; BP, faza przełomu blastycznego; CP, faza przewlekła; TKI, inhibitory kinaz tyrozynowych

*analiza post-hoc	p-value po korekcje
Faza choroby w momencie wystąpienia ACA/Ph+	
CP vs. AP	0,2686
CP vs. BP	0,0824
AP vs. BP	0,99
Procent metafaz z ACA/Ph+	
ACA/Ph+ izolowane vs. ACA/Ph+ kariotyp złożony	0,1311
ACA/Ph+ różne klony vs. ACA/Ph+ izolowane	0,0894
ACA/Ph+ różne klony vs. ACA/Ph+ kariotyp złożony	0,0030

Odsetek pacjentów z 2-letnim całkowitym przeżyciem był najwyższy u chorych z ACA/Ph+ występujących jako jedyna dodatkowa aberracja (Wykres 9). Nie stwierdzono jednak istotności statystycznej pomiędzy badanymi podgrupami pacjentów dotyczącej całkowitego przeżycia.



Wykres 9. Porównanie prawdopodobieństwa całkowitego przeżycia (analiza Kaplana-Meiera) pomiędzy: grupą pacjentów z ACA/Ph+ jako jedyną dodatkową aberracją, grupą pacjentów z ACA/Ph+ występującymi w różnych klonach oraz grupą chorych z kariotypem złożonym (źródło: opracowanie własne).

Podsumowanie

- Najczęściej w kariotypie występowała jedna dodatkowa aberracja w klonie Ph-dodatnim. Obserwowano trend skrócenia czasu pojawienia się ACA/Ph+ od rozpoznania choroby zależny od liczby stwierdzanych ACA/Ph+.
- Faza zaostżenia choroby stwierdzana podczas rozpoznania statystycznie częściej występowała u pacjentów z kariotypem złożonym. W tej grupie wyższy był również odsetek metafaz z ACA/Ph+.

5.5.4 Porównanie grupy pacjentów z ACA/Ph+ typu „major routes” z grupą pacjentów z ACA/Ph+ typu „minor routes” oraz z jednoczesnym występowaniem ACA/Ph+ typu „major i minor routes”

Kierując się podziałem dodatkowych aberracji chromosomowych w komórkach Ph-dodatnich bazującym na częstości występowania wprowadzonym przez Mitelmana i wsp. [1], podzielono pacjentów do trzech podgrup: z aberracjami typu „major routes”, z aberracjami typu „minor routes” i do podgrupy z obecnością w tym samym czasie w kariotypie aberracji typu „major i minor routes” (Tabela 28).

Tabela 28. Porównanie wybranych parametrów kliniczno-laboratoryjnych i skal prognostycznych pomiędzy grupą pacjentów z ACA/Ph+ typu „major routes”, typu „minor routes” oraz grupą z jednoczesną obecnością aberracji typu „major i minor routes”.

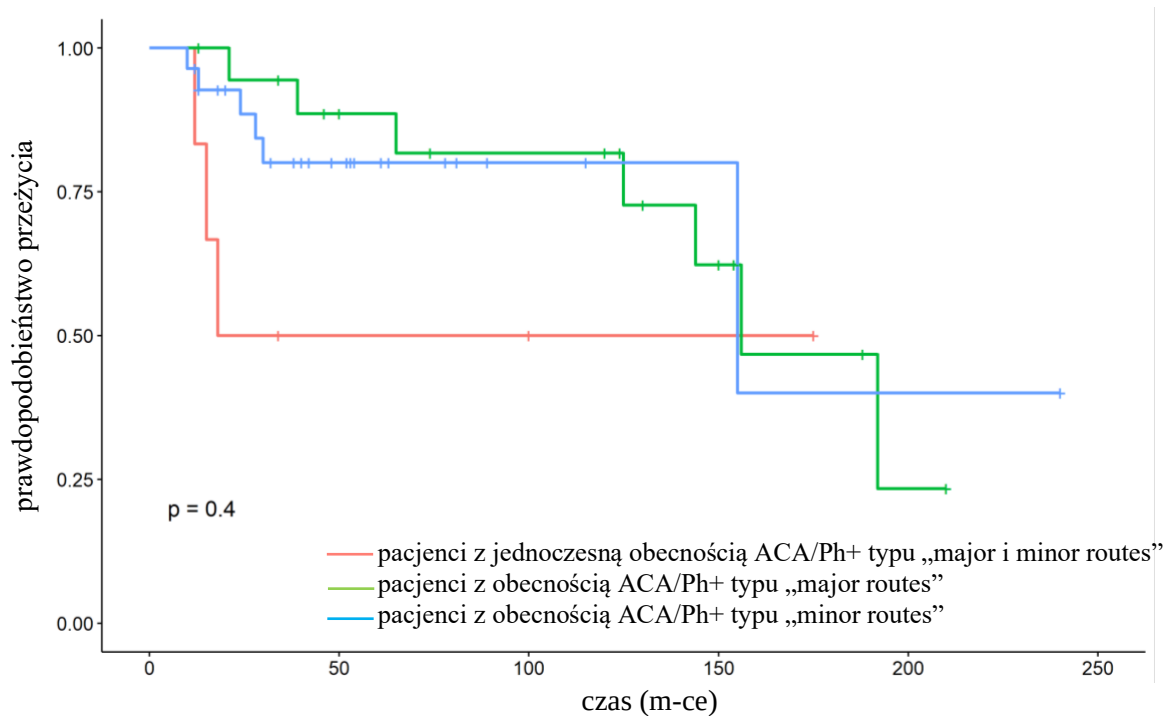
Badany parametr		Pacjenci z aberracjami typu			p-value
		major routes n=19	major i minor routes n=6	minor routes n=28	
Płeć; n (%)	mężczyźni	10 (52,6)	3 (50)	15 (53,6)	0,99
	kobiety	9 (47,4)	3 (50)	13 (46,4)	
Wiek zachorowania; (lata)	mediana	49	51	52	0,552
	zakres	20-73	30-60	19-83	
Czas od diagnozy do stwierdzenia ACA/Ph+ (m-ce)	mediana	42	5	0	0,0036*
	zakres	0-100	0-62	0-197	
ACA/Ph+ w trakcie rozpoznania; n (%)		5 (26,3)	2 (33,3)	16 (57,1)	0,1178
ACA/Ph+ w trakcie leczenia; n (%)		14 (73,7)	4 (66,7)	12 (42,9)	
Faza choroby w momencie wystąpienia ACA/Ph+; n (%)	CP	15 (79)	1 (16,7)	23 (82,2)	0,0119*
	AP	2 (10,5)	1 (16,7)	2 (7,1)	
	BP	2 (10,5)	4 (66,7)	3 (10,7)	
Odsetek metafaz z ACA/Ph+; (%)					0,1378
	mediana	21	31	15	
	zakres	3-87	4-97	4-100	
Status ACA/Ph+; n (%)	1 ACA/Ph+	18 (94,7)	0	17 (60,7)	0,0007*
	2 ACA/Ph+	1 (5,3)	2 (33,3)	7 (25)	
	> 2 ACA/Ph+	0	4 (66,7)	4 (14,3)	
Ewolucja klonalna kariotypu; n (%)		6 (31,6)	1 (16,7)	4 (14,3)	0,3935
Czas od obserwacji ACA/Ph+ do ostatniego badania (m-ce)	mediana	64	22	41	0,0661
	zakres	12-110	9-113	3-155	
AlloBMT; n (%)		8 (42,1)	3 (50)	7 (25)	0,3735
Transformacja do BP/AP; n (%)		5 (26,3)	2 (33,3)	4 (14,3)	0,4403
Śmierć; n (%)		7 (36,8)	3 (50)	6 (21,4)	0,2946

Skróty: ACA/Ph+, dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie Ph-dodatnim; alloBMT, allogeniczny przeszczep komórek szpiku kostnego; AP, faza akceleracji; BP, faza przełomu blastycznego; CP, faza przewlekła

*analiza post-hoc	p-value po korekcji
Czas od diagnozy do stwierdzenia ACA/Ph+	
aberracje typu "major routes" vs. "major i minor routes"	0,1810
aberracje typu "minor routes" vs. "major i minor routes"	0,9963
aberracje typu "minor routes" vs. "major routes"	0,0130
Faza choroby w momencie wystąpienia ACA/Ph+	
CP vs. AP	0,4892
CP vs. BP	0,0137
AP vs. BP	0,8002
Status ACA/Ph+	
jedyna ACA/Ph+ vs. 2 ACA/Ph+	0,0091
jedyna ACA/Ph+ vs. > 2 ACA/Ph+	0,0002
2 ACA/Ph+ vs. > 2 ACA/Ph+	0,3213

Co ciekawe najbardziej liczną grupą byli pacjenci z aberracjami typu „minor routes” (n=28/53; 52,8%). Grupa tzw. „major routes” obejmowała 19 pacjentów (35,8%), natomiast grupa jednocześnie prezentująca w kariotypie dwa typy aberracji – sześciu chorych (11,3%). Czas, w którym wykryto ACA/Ph+ od momentu rozpoznania był najkrótszy w grupie pacjentów z aberracjami typu „minor routes” w porównaniu z pacjentami z aberracjami typu „major i minor routes” oraz w porównaniu z pacjentami z aberracjami typu „major routes” w kariotypie. Czas ten był najdłuższy w grupie pacjentów z aberracjami typu „major routes” (mediana czasu wyniosła odpowiednio 0 vs. 5 vs. 42 miesiące). Istotność statystyczną obserwowano pomiędzy grupą pacjentów z aberracjami typu „major routes” a grupą z aberracjami typu „minor routes” (p=0,01) w odniesieniu do czasu wystąpienia ACA/Ph+ od chwili rozpoznania choroby. Stwierdzono różnicę pomiędzy liczbą pacjentów z fazą przewlekłą choroby oraz fazą przełomu blastycznego w czasie obserwowania ACA/Ph+ w kariotypie pomiędzy badanymi grupami pacjentów (p=0,01). Faza przewlekła choroby dominowała w chwili stwierdzenia aberracji typu „major routes” lub „minor routes”, natomiast faza kryzy blastycznej – podczas wykrycia jednoczesnego występowania aberracji typu „major i minor routes”. Istotnie statystycznie różnice obserwowano w badanych grupach pomiędzy pacjentami z ACA/Ph+ występującymi jako izolowana ACA/Ph+ i dwoma ACA/Ph+ w kariotypie (p=0,009) oraz pomiędzy pacjentami z izolowaną ACA/Ph+ i kariotypem złożonym (p=0,0002). Aberracje typu „major routes” u 18 z 19 chorych (94,7%) występowały jako jedyna ACA/Ph+. Prawdopodobieństwo przeżycia było najkrótsze w grupie pacjentów z aberracjami typu „major i minor routes”,

co może wynikać z najwyższego odsetka pacjentów prezentujących kariotyp złożony w tej grupie chorych (Wykres 10).



Wykres 10. Porównanie prawdopodobieństwa całkowitego przeżycia (analiza Kapłana-Meiera) pomiędzy: grupą pacjentów z jednoczesną obecnością aberracji typu „major i minor routes”, z aberracjami typu „major routes” oraz z aberracjami typu „minor routes” (źródło: opracowanie własne).

Podsumowanie

- Aberracje typu „minor routes” dominowały w grupie pacjentów z ACA/Ph+. Również tego typu aberracje obserwowano w kariotypie wcześniej od chwili rozpoznania choroby w porównaniu z aberracjami typu „major routes” (mediana 0 vs. 42 miesiące). Aberracje typu „major routes” częściej były obserwowane podczas monitorowania terapii.
- Aberracje typu „major routes” najczęściej występowały jako izolowane ACA/Ph+. Z kolei występowanie aberracji typu „minor routes” częściej związane było z obecnością kariotypu złożonego.
- Pacjenci z jednoczesnym występowaniem aberracji typu „major i minor routes” wykazali statystycznie istotne prawdopodobieństwo wystąpienia wykładników fazy przełomu blastycznego w chwili stwierdzenia aberracji w kariotypie.

5.5.5 Porównanie grup pacjentów z wybranymi ACA/Ph+

Spośród wszystkich aberracji chromosomowych występujących w komórkach Ph-dodatnich poddano analizie wybrane aberracje typu „major routes” oraz „minor routes”. Kryterium wyboru dokonano na podstawie częstości występowania aberracji w badanej grupie oraz znaczenia klinicznego opisanego w literaturze (Tabela 29). Najczęstszą aberracją typu „major routes” była trisomia 8 (n=19/53; 35,8%) oraz dodatkowy chromosom Ph (n=15/53; 28,3%). Izochromosom i(17)(q10) był obecny u trzech pacjentów (5,7%), natomiast trisomia 19 – u dwóch chorych (3,8%). Z grupy aberracji typu „minor routes” najczęściej występowała utrata chromosomu Y u mężczyzn (n=7/28; 25%) i monosomia 21 (n=9/53; 17%). Inne aberracje powtarzające się w grupie pacjentów z aberracjami typu „minor routes” obejmowały między innymi monosomię 19 (n=5/53; 9,4%), aberracje angażujące chromosom 7 (n=4/53; 7,5%) oraz rearanżacje angażujące region 3q26.2 (n=3/53; 5,7%).

Warto zaznaczyć, że część aberracji chromosomowych (-Y, -19, -21) zaliczanych do grupy aberracji typu „minor routes” występowały w badanej grupie częściej niż izochromosom i(17)(q10) czy trisomia 19 zaliczane do aberracji typu „major routes” z definicji występujących częściej. Najczęściej w chwili rozpoznania obserwowano utratę chromosomu Y. U pacjentów z rearanżacją genu *MECOM* oraz u pacjentów z aberracjami angażującymi chromosom 7 [-7, add(7)(p?21), inv(7)(p22q11.2), t(7;22)(p22;q11)] mediana czasu obserwacji aberracji od rozpoznania choroby wyniosła 6 miesięcy. Spośród analizowanych aberracji najdłuższy czas wystąpienia od chwili rozpoznania dotyczył izochromosomu i(17q) i monosomii 21 (mediana czasu wyniosła odpowiednio 58 i 62 miesiące). Izochromosom i(17)(q10) nie był obserwowany u pacjentów w chwili rozpoznania choroby. Wszyscy pacjenci prezentujący w kariotypie utratę Y w chwili stwierdzenia aberracji prezentowali klinicznie fazę przewlekłą choroby, z kolei wszyscy pacjenci z rearanżacją genu *MECOM* - fazę kryzy blastycznej w momencie obserwacji dodatkowej aberracji w kariotypie poza translokacją t(9;22). Rearanżacja genu *MECOM* w postaci translokacji bądź inwersji angażującej region 3q26.2 obserwowana była w najwyższym odsetku metafaz (n=3; odpowiednio 81% metafaz, 100% metafaz i 100% metafaz). Jako jedyną dodatkową aberrację chromosomową w klonie Ph-dodatnim był izochromosom i(17q), trisomia 8 oraz dodatkowy chromosom Ph.

Z kolei monosomia 19 była jedyną aberracją chromosomową spośród wszystkich zaobserwowanych zmian, która nie wystąpiła w formie izolowanej. W kariotyp złożony

najczęściej zaangażowana była rearanżacja regionu 3q26.2, dodatkowy chromosom Ph oraz trisomia 8. Spośród badanych aberracji tylko izochromosom i(17q) nie występował w kariotypach złożonych. Żaden z pacjentów z obecnością jednej z wymienionych aberracji: izochromosomu i(17q), rearanżacji regionu 3q26.2, aberracji obejmującej chromosom 7 czy monosomii 21, nie odpowiedział optymalnie na zastosowane leczenie imatynibem. W grupie pacjentów otrzymujących inhibitor II generacji żaden pacjent z obecnością w kariotypie rearanżacji regionu 3q26.2 lub monosomii 19 nie osiągnął odpowiedzi optymalnej. Ponadto 75% chorych z aberracjami chromosomu pary 7 również nie uzyskało odpowiedzi optymalnej w trakcie stosowania TKI II generacji. Mediana czasu od pojawienia się badanej aberracji do ostatniej obserwacji była najkrótsza w grupie z rearanżacją regionu 3q26.2 i z aberracjami chromosomu 7 (odpowiednio 12 i 11 miesięcy). Największy odsetek pacjentów z transformacją do zaawansowanych faz choroby, pacjentów poddanych alloprzeszczepieniu komórek krwiotwórczych szpiku kostnego oraz pacjentów z najwyższą śmiertelnością dotyczył chorych z rearanżacją regionu 3q26.2 oraz izochromosomem i(17)(q10).

Podsumowanie

- Najczęściej występującymi aberracjami była +8, +der(22)t(9;22), a także aberracje zaliczane do „minor routes”: -21 i -Y.
- Utrata Y była najczęściej obserwowana w chwili rozpoznania choroby, natomiast i(17)(q10) zawsze był obserwowany podczas leczenia.
- Utrata Y u wszystkich pacjentów była stwierdzana w fazie przewlekłej choroby, z kolei rearanżacja genu *MECOM* w fazie przełomu blastycznego.
- Występowanie rearanżacji genu *MECOM* oraz izochromosomu i(17q), wiązało się z najwyższą śmiertelnością spośród pacjentów z analizowanymi aberracjami.
- Spośród badanych ACA/Ph+ najgorzej rokowali pacjenci z obecnością w kariotypie kolejno wymienionych aberracji chromosomowych: rearanżacji genu *MECOM*, i(17)(q10), aberracji chromosomu 7, +8, +der(22)t(9;22), -21, -19, -Y.

Tabela 29. Porównanie wybranych parametrów kliniczno-laboratoryjnych pomiędzy grupami pacjentów z wybranymi aberracjami chromosomowymi.

Badany parametr		ABERRACJE TYPU MAJOR ROUTES			ABERRACJE TYPU MINOR ROUTES				
		+ 8 n=19	+ Ph n=15	i(17q) n=3	- Y n=8	- 21 n=9	- 19 n=5	rearanżacja MECOM n=3	aberracje 7 n=4
Czas od diagnozy do stwierdzenia ACA/Ph+ (m-ce)	mediana	18	18	58	0	62	3	6	6
	zakres	0-150	0-123	20-98	0-15	0-197	3-146	0-6	0-15
ACA/Ph+ w trakcie rozpoznania; n (%)		4 (21,1)	4 (26,7)	0	4 (50)	1 (11,1)	2 (40)	1 (33,3)	2 (50)
ACA/Ph+ w trakcie leczenia; n (%)		15 (78,9)	11 (73,3)	3 (100)	4 (50)	8 (88,9)	3 (60)	2 (66,7)	2 (50)
Faza choroby w momencie wystąpienia ACA/Ph+; n (%)									
	CP	13 (68,4)	10 (66,7)	2 (66,7)	8 (100)	7 (77,8)	4 (80)	0	3 (75)
	AP	1 (5,3)	2 (13,3)	0	0	2 (22,2)	1 (20)	0	1 (25)
	BP	5 (26,3)	3 (20)	1 (33,3)	0	0	0	3 (100)	0
Odsetek metafaz z ACA/Ph+; (%)	mediana	12	43	29	16	15	12	100	16
	zakres	3-93	3-100	10-30	8-100	3-25	8-20	81-100	8-100
Status ACA/Ph+ (%)	jako jedyna ACA/Ph+	11 (57,9)	7 (46,7)	2 (66,7)	2 (25)	3 (33,3)	0	1 (33,3)	1 (25)
	kilka klonów	1 (5,3)	1 (6,6)	1 (33,3)	5 (62,5)	4 (44,5)	4 (80)	0	2 (50)
	złożony kariotyp	7 (36,8)	7 (46,7)	0	1 (12,5)	2 (22,2)	1 (20)	2 (66,7)	1 (25)
Czas od obserwacji ACA/Ph+ do ostatniego badania (m-ce)	mediana	35	44	96	45	43	31	12	11
	zakres	0-113	9-113	12-96	9-155	15-113	9-78	9-13	9-77
Transformacja do BP/AP; n (%)		4 (21)	4 (26,7)	1 (33,3)	1 (14,3)	3 (33,3)	1 (20)	2 (66,7)	0
AlloBMT; n (%)		8 (42,1)	8 (53,3)	2 (66,7)	0	4 (44,5)	0	2 (66,7)	1 (25)
Śmierć; n (%)		8 (42,1)	6 (40)	2 (66,7)	2 (28,6)	2 (22,2)	2 (40)	3 (100)	1 (25)

Skróty: ACA/Ph+, dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie Ph-dodatnim; alloBMT, allogeniczny przeszczep komórek szpiku kostnego; AP, faza akceleracji; BP, faza przełomu blastycznego; CP, faza przewlekła; i, izochromosom; Ph, chromosom Philadelphia

5.5.6 Porównanie pacjentów z ACA/Ph+ należących do różnych grup ryzyka cytogenetycznego

Analizując kariotypy pacjentów z ACA/Ph+ oraz korzystając z danych literaturowych klasyfikujących poszczególne aberracje chromosomowe do grup związanych z określonym ryzykiem transformacji do zaawansowanych faz choroby [182], dokonano podziału wszystkich pacjentów do czterech grup: bardzo wysokiego ryzyka, wysokiego ryzyka, pośredniego oraz standardowego ryzyka cytogenetycznego (Tabela 30).

Grupa bardzo wysokiego ryzyka (n=8/203; 3,9%) obejmowała pacjentów z: rearanżacją regionu 3q26.2 (*MECOM*), rearanżacją regionu 11q23 (*KMT2A*), izochromosomem i(17q), monosomią 7 oraz z kariotypem złożonym obejmującym przynajmniej jedną z wymienionych aberracji. Do grupy wysokiego ryzyka (n=7/203; 3,4%) włączono pacjentów z złożonym kariotypem obejmującym ACA/Ph+ inne niż występujące w grupie bardzo wysokiego ryzyka. Grupę pośredniego ryzyka (n=38/203; 18,7%) stanowili pacjenci, u których obserwowano wszystkie pozostałe ACA/Ph+ z wyłączeniem zmian wymienionych w grupie bardzo wysokiego i wysokiego ryzyka. Grupą prezentującą standardowe ryzyko była grupa pacjentów bez ACA/Ph+ (n=150/203; 74%). Podział na powyższe grupy pacjentów korespondował z podziałem wprowadzonym przez Gonga i wsp. [182].

W grupie bardzo wysokiego ryzyka mediana wieku rozpoznania choroby była najniższa wśród badanych grup pacjentów i wynosiła 42 lata (w grupie standardowego ryzyka mediana wieku wyniosła 51 lat). 75% pacjentów w grupie bardzo wysokiego ryzyka stanowili mężczyźni. Dominujący odsetek mężczyzn wystąpił również w grupie wysokiego ryzyka (57,1%). Z kolei w grupie pośredniego i standardowego ryzyka przeważały kobiety (odsetek mężczyzn wyniósł odpowiednio 47,4% i 46%). Splenomegalia w chwili rozpoznania choroby stwierdzana była u 87,5% chorych w grupie bardzo wysokiego ryzyka. Pacjenci z aberracjami wysokiego ryzyka wykazywali istotnie niższe stężenie hemoglobiny w stosunku do pacjentów z aberracjami pośredniego ryzyka i pacjentów z standardowym ryzykiem. Istotność statystyczną również wykazano w odsetku blastów we krwi obwodowej pomiędzy badanymi grupami chorych. Odsetek ten był największy w grupie wysokiego ryzyka i bardzo wysokiego ryzyka w porównaniu z grupą pacjentów pośredniego i standardowego ryzyka

(mediana 9% vs. 6,5% vs. 1% vs. 1%). Najwyższy odsetek bazofili we krwi obwodowej (mediana 3,5%) stwierdzono w grupie bardzo wysokiego ryzyka. Skale prognostyczne Sokala, Euro, Eutos i ELTS były najmniej korzystne w grupie chorych zaliczonych do bardzo wysokiego ryzyka, przy czym obserwowano zmianę niekorzystnej tendencji w grupie wysokiego, pośredniego i standardowego ryzyka. Istotne statystycznie różnice stwierdzono w odniesieniu do ELTS w grupie pacjentów niskiego i wysokiego ryzyka. Obserwowana zależność wskazuje na trafność włączenia poszczególnych pacjentów z konkretnymi aberracjami chromosomowymi do grup ryzyka cytogenetycznego.

Stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy pacjentami zakwalifikowanymi do poszczególnych grup ryzyka cytogenetycznego a stwierdzeniem fazy przewlekłej choroby oraz fazy przełomu blastycznego w chwili rozpoznania choroby. Większość pacjentów z aberracjami wysokiego ryzyka (57,2%) w chwili rozpoznania rozwijała kliniczne wykładniki zaostrzenia choroby. Zbliżony odsetek pacjentów (50%) z wykładnikami akceleracji/kryzy blastycznej stwierdzono w grupie bardzo wysokiego ryzyka. Z kolei w grupie pacjentów pośredniego i standardowego ryzyka odsetek ten był zdecydowanie mniejszy (odpowiednio 10,5% i 8%).

Tabela 30. Porównanie wybranych parametrów kliniczno-laboratoryjnych i skal prognostycznych w chwili rozpoznania choroby pomiędzy grupami pacjentów z ACA/Ph+ należącymi do różnych grup ryzyka cytogenetycznego.

Badany parametr	Pacjenci z aberracjami bardzo wysokiego ryzyka n=8	Pacjenci z aberracjami wysokiego ryzyka n=7	Pacjenci z aberracjami pośredniego ryzyka n=38	Pacjenci bez ACA/Ph+; standardowe ryzyko n=150	p-value
Mediana wieku zachorowania w latach; (zakres)	42 (31-60)	50 (30-60)	53 (19-83)	51 (9-84)	0,489
Płeć męska/żeńską; n (%)	6/2 (75/25)	4/3 (57,1/42,9)	18/20 (47,4/52,6)	69 /81 (46 /54)	0,3503
Powiększenie śledziony; n (%)	7 (87,5)	5 (71,4)	30 (78,9)	88 (58,7)	0,7545
Hg mmol/l; mediana (zakres)	6,0 (4,4-8,9)	5,9 (4,7-7,9)	7,4 (4,4-9,9)	7,5 (3,5-13,0)	0,0122*
WBC 10 ⁹ /L; mediana (zakres)	183,2 (2,25-528)	133,2 (7,75-307,8)	90,7 (16-367)	91,4 (5,7-658)	0,1872
PLT 10 ⁹ /L; mediana (zakres)	342 (63-768)	264 (51-828)	434 (117-2746)	431 (42-2299)	0,3189
Blasty we krwi; mediana % (zakres)	6,5 (0-55)	9 (0-68)	1 (0-9)	1 (0-50)	0,0004*
Eozynofile we krwi; mediana % (zakres)	2 (0-12)	1 (0-11)	2 (0-20)	2 (0-17)	0,315
Bazofile we krwi; mediana % (zakres)	3,5 (0-11)	2 (0-3)	1 (0-18)	2 (0-29)	0,2349
Ocena ryzyka wg Sokala	niskie; n (%)	0	1 (14,3)	55 (36,7)	0,0718
	pośrednie; n (%)	2 (25)	2 (28,6)	63 (42)	
	wysokie; n (%)	6 (75)	4 (57,1)	32 (21,3)	
Ocena ryzyka wg Hasforda (Euro)	niskie; n (%)	1 (12,5)	1 (14,3)	68 (45,3)	0,3019
	pośrednie; n (%)	5 (62,5)	3 (42,85)	69 (46)	
	wysokie; n (%)	2 (25)	3 (42,85)	13 (8,7)	
Ocena ryzyka Eutos	niskie; n (%)	6 (75)	6 (85,7)	143 (95,3)	0,549
	wysokie; n (%)	2 (25)	1 (14,3)	7 (4,7)	
Ocena ryzyka ELTS	niskie; n (%)	1 (12,5)	2 (28,6)	99 (66)	0,0339*
	pośrednie; n (%)	2 (25)	1 (14,3)	35 (23,3)	
	wysokie; n(%)	5 (62,5)	4 (57,1)	16 (10,7)	

Faza choroby	CP; n (%)	4 (50)	3 (42,8)	34 (89,5)	138 (92)	0,0022*
	AP; n (%)	2 (25)	2 (28,6)	4 (10,5)	10 (6,7)	
	BP; n (%)	2 (25)	2 (28,6)	0	2 (1,3)	
Transkrypt	e13a2 (b2a2); n (%)	2 (25)	1 (14,3)	11 (28,9)	50 (33,3)	0,561
	e14a2 (b3a2); n (%)	5 (62,5)	5 (71,4)	25 (65,8)	97 (64,7)	
	inny lub koekspresja; n (%)	1 (12,5)	1 (14,3)	2 (5,3)	3 (2)	

Skróty: ACA/Ph+, dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie komórek Philadelphia-dodatnim; AP, faza akceleracji; BP, faza przełomu blastycznego; CP, faza przewlekła; Hb, hemoglobina; PLT, trombocyty; WBC, leukocyty

<i>*analiza post-hoc</i>	<i>p-value po korekcji</i>
Hg mmol/l przy rozpoznaniu	
aberracje bardzo wysokiego ryzyka vs. aberracje wysokiego ryzyka	0,9684
aberracje bardzo wysokiego ryzyka vs. aberracje pośredniego ryzyka	0,196
aberracje bardzo wysokiego ryzyka vs. bez ACA/Ph+; standardowe ryzyko	0,1412
aberracje wysokiego ryzyka vs. aberracje pośredniego ryzyka	0,0705
aberracje pośredniego ryzyka vs. bez ACA/Ph+; standardowe ryzyko	0,9999
aberracje wysokiego ryzyka vs. bez ACA/Ph+; standardowe ryzyko	0,0454
Blasty we krwi przy rozpoznaniu	
aberracje bardzo wysokiego ryzyka vs. aberracje wysokiego ryzyka	0,908
aberracje bardzo wysokiego ryzyka vs. aberracje pośredniego ryzyka	0,034
aberracje bardzo wysokiego ryzyka vs. bez ACA/Ph+; standardowe ryzyko	0,013
aberracje wysokiego ryzyka vs. aberracje pośredniego ryzyka	0,033
aberracje pośredniego ryzyka vs. bez ACA/Ph+; standardowe ryzyko	0,787
aberracje wysokiego ryzyka vs. bez ACA/Ph+; standardowe ryzyko	0,014

<i>*analiza post-hoc</i>	<i>p-value po korekcji</i>
Ocena ryzyka ELTS	
niskie vs. pośrednie	0,5053
niskie vs. wysokie	0,0249
wysokie vs. pośrednie	0,6470
Faza choroby przy rozpoznaniu	
CP vs. AP	0,1452
CP vs. BP	0,0066
AP vs. BP	0,4182

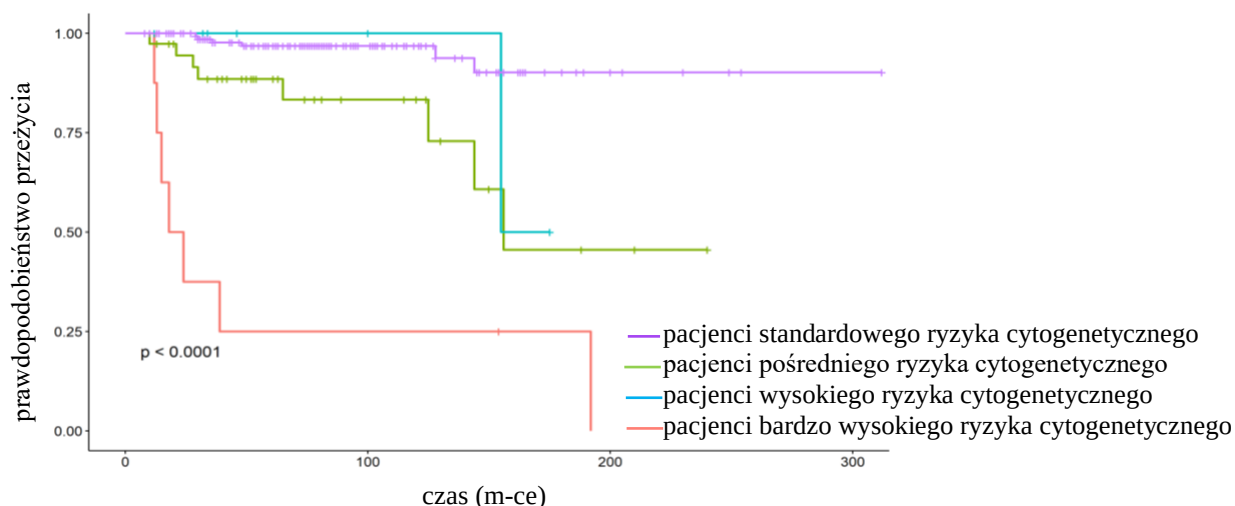
Aberracje były obserwowane częściej w chwili stwierdzenia wykładników wskazujących na fazę akceleracji lub przełom blastyczny u pacjentów w grupie bardzo wysokiego ryzyka (62,5% chorych) w odróżnieniu od pacjentów z grupy wysokiego (42,9%) i pośredniego ryzyka (15,8%). Co ciekawe ewolucja kariotypu wystąpiła we wszystkich badanych grupach pacjentów z ACA/Ph+ w zbliżonych odsetku przypadków (Tabela 31). Zaobserwowano różnice istotne statystycznie pomiędzy badanymi grupami w odniesieniu do liczby stwierdzonych ACA/Ph+. Uzyskane wyniki wiązały się z zakwalifikowaniem do grupy wysokiego ryzyka wyłącznie pacjentów, u których stwierdzono złożony kariotyp. Kariotyp złożony częściej obserwowano w grupie bardzo wysokiego ryzyka niż w grupie pośredniego ryzyka. We wszystkich grupach dominował transkrypt e14a2. Nie zaobserwowano istotnych różnic w częstości występowania wariantów sekwencji KD BCR-ABL1 u pacjentów z badanych grup. Aberracje chromosomowe w grupie pacjentów bardzo wysokiego ryzyka pojawiały się częściej w trakcie monitorowania leczenia niż przy rozpoznaniu choroby w porównaniu do grupy wysokiego i pośredniego ryzyka (75% vs. 42,9% vs. 55,3%). Mediana czasu od pojawienia się aberracji do ostatniego badania była najkrótsza w grupie bardzo wysokiego ryzyka i wyniosła 12 miesięcy, w grupie wysokiego ryzyka mediana ocenianego czasu wyniosła 32 miesiące, a w grupie pośredniego ryzyka - 48 miesięcy. U pacjentów z grupy bardzo wysokiego ryzyka częściej przeprowadzano allogeniczny przeszczep komórek krwiotwórczych szpiku kostnego. Obserwowano istotną statystycznie różnicę w prawdopodobieństwie przeżycia chorych zakwalifikowanych do poszczególnych grup ryzyka cytogenetycznego (Wykres 11).

Tabela 31. Porównanie wybranych parametrów kliniczno-laboratoryjnych pomiędzy grupami pacjentów z ACA/Ph+ należącymi do różnych grup ryzyka cytogenetycznego.

Badany parametr		Pacjenci z bardzo wysokim ryzykiem cytogenetycznym n=8	Pacjenci z wysokim ryzykiem cytogenetycznym n=7	Pacjenci z pośrednim ryzykiem cytogenetycznym n=38	Pacjenci bez ACA/Ph+; standardowe ryzyko n=150	p-value
Czas od diagnozy do stwierdzenia ACA/Ph+ (m-ce).	mediana zakres	10,5 0-98	0 0-62	3 0-197	nie dotyczy nie dotyczy	0,4334
ACA/Ph+ w trakcie rozpoznania; n (%)		2 (25)	4 (57,1)	17 (44,7)	nie dotyczy	0,4587
ACA/Ph+ w trakcie leczenia; n (%)		6 (75)	3 (42,9)	21 (55,3)	nie dotyczy	
Faza choroby w momencie wystąpienia ACA/Ph+; n (%)	CP AP BP	3 (37,5) 0 5 (62,5)	4 (57,1) 2 (28,6) 1 (14,3)	32 (84,2) 3 (7,9) 3 (7,9)	nie dotyczy nie dotyczy nie dotyczy	0,0037*
Odsetek metafaz z ACA/Ph+; (%)						
	mediana zakres	30 4-100	32 4-100	13 3-100	nie dotyczy nie dotyczy	0,1216
Status ACA/Ph+; n (%)	1 ACA/Ph+ więcej niż 1 ACA/Ph+	4 (50) 4 (50)	0 7 (100)	31 (81,6) 7 (18,4)	nie dotyczy nie dotyczy	0,0048*
Ewolucja kariotypu; n (%)		2 (25)	2 (28,6)	11 (28,9)	nie dotyczy	
Czas od obserwacji ACA/Ph+ do ostatniego badania (m-ce)	mediana zakres	12 9-96	32 12-155	48 3-110	nie dotyczy nie dotyczy	0,1211
Warianty KD BCR-ABL1; n (%)		1 (12,5)	1 (14,3)	6 (16,2)	15 (10)	0,99
AlloBMT; n (%)		5 (62,5)	3 (42,9)	9 (24,3)	8 (5,2)	0,0725
Śmierć; n (%)		5 (62,5)	1 (14,3)	8 (21,1)	10 (6,5)	0,0474*

Skróty: ACA/Ph+, dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie Ph-dodatnim; alloBMT, allogeniczny przeszczep komórek szpiku kostnego; AP, faza akceleracji; BP, faza przełomu blastycznego; CP, faza przewlekła; KD, domena kinazowa

<i>*analiza post-hoc</i>	<i>p-value po korekcji</i>
Faza choroby w momencie wystąpienia ACA	
CP vs. AP	0,1587
CP vs. BP	0,0102
AP vs. BP	0,1587
Status ACA Ph+	
aberracje bardzo wysokiego ryzyka vs. aberracje wysokiego ryzyka	0,0789
aberracje bardzo wysokiego ryzyka vs. aberracje pośredniego ryzyka	0,0789
aberracje wysokiego ryzyka vs. aberracje pośredniego ryzyka	0,0002
Śmierć	
aberracje bardzo wysokiego ryzyka vs. aberracje wysokiego ryzyka	0,1783
aberracje bardzo wysokiego ryzyka vs. aberracje pośredniego ryzyka	0,0918
aberracje wysokiego ryzyka vs. aberracje pośredniego ryzyka	0,99



	pośrednie ryzyko cytogenetyczne	wysokie ryzyko cytogenetyczne	standardowe ryzyko (bez ACA/Ph+)
wysokie ryzyko cytogenetyczne	0,5173	-	0,3432
standardowe ryzyko (bez ACA/Ph+)	0,0006	0,3432	-
bardzo wysokie ryzyko cytogenetyczne	0,0017	0,0467	<0,0001

Wykres 11. Porównanie prawdopodobieństwa całkowitego przeżycia (krzywe Kaplana-Meiera) pomiędzy grupami pacjentów z różnym cytogenetycznym ryzykiem progresji do bardziej zaawansowanych faz choroby (źródło: opracowanie własne).

Podsumowanie

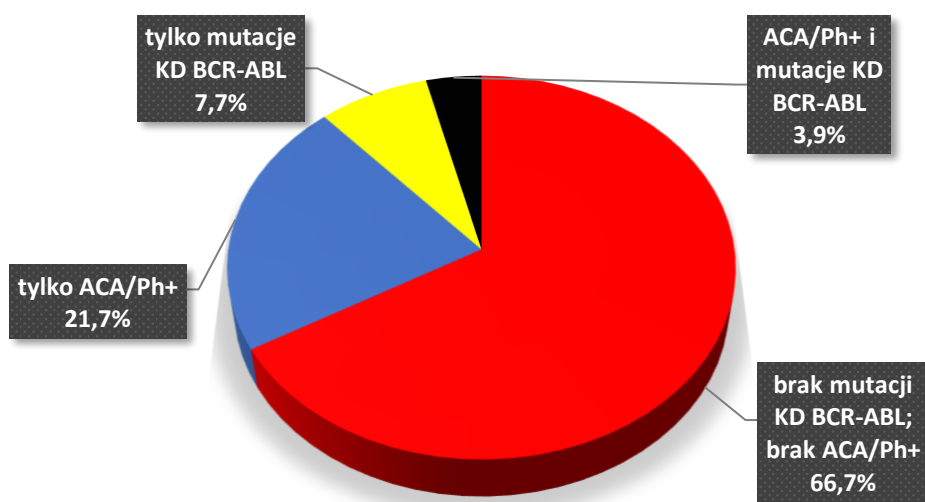
- Stwierdzenie w karyotypie ACA/Ph+ zakwalifikowanych do grupy bardzo wysokiego i wysokiego ryzyka cytogenetycznego wiąże się z statystycznie większym prawdopodobieństwem wystąpienia wykładników przełomu blastycznego, szczególnie zwiększonego odsetka blastów we krwi obwodowej.
- W zaproponowanej klasyfikacji pacjentów do poszczególnych grup ryzyka cytogenetycznego obserwowano istotne statystycznie różnice w prawdopodobieństwie przeżycia chorych.

5.6 Warianty sekwencji domeny kinazowej BCR-ABL1

Ocena wariantów w obrębie sekwencji kodującej domeny kinazowej BCR-ABL1 pozwoliła na potwierdzenie występowania 30 zmian punktowych u 24 pacjentów (11,6%) z badanej grupy chorych leczonych TKI. Do opisu obserwowanych zmian wykorzystano powszechnie stosowany zapis substytucji aminokwasów.

Najczęściej stwierdzane warianty sekwencji obejmowały: F317L (4x), M351T, T315I i V299L (3x), F359I, M244V, G250E i Y253H (2x). W pojedynczych przypadkach obserwowano: E453K, E255K, L248V, K285E, L273M, F359V, H396P, D276G oraz A397P. U sześciu pacjentów obserwowano dwa niezależne warianty badanej sekwencji, przy czym u dwóch pacjentek (nr 21 i 197) warianty współwystępowały w jednej subpopulacji komórek – obie zmiany w chromatogramach stanowiły 100% w porównaniu do sekwencji referencyjnej (V299L+F359I i V299L+D276G). U pozostałych czterech chorych warianty stwierdzano sekwencyjnie po zmianie TKI na inny.

Spośród 24 pacjentów z wariantami sekwencji KD BCR-ABL1 u 8 chorych stwierdzono również ACA/Ph+ (Wykres 12).



Wykres 12. Rozkład występowania wariantów sekwencji KD BCR-ABL1 oraz ACA/Ph+ w badanej grupie chorych (źródło: opracowanie własne).

Porównanie grupy pacjentów z wykrytą przynajmniej jedną zmianą w KD BCR-ABL1, z grupą chorych u których: nie było wskazania do badania mutacji, bądź wykluczono występowanie wariantów sekwencji KD BCR-ABL1, przedstawiono w Tabela 32.

Tabela 32. Porównanie wybranych parametrów kliniczno-laboratoryjnych i skal prognostycznych pomiędzy grupą pacjentów z wykrytymi wariantami sekwencji KD BCR-ABL1 i grupą bez wskazań do badania w kierunku wykrycia takich zmian lub wykluczeniem występowania KD BCR-ABL1.

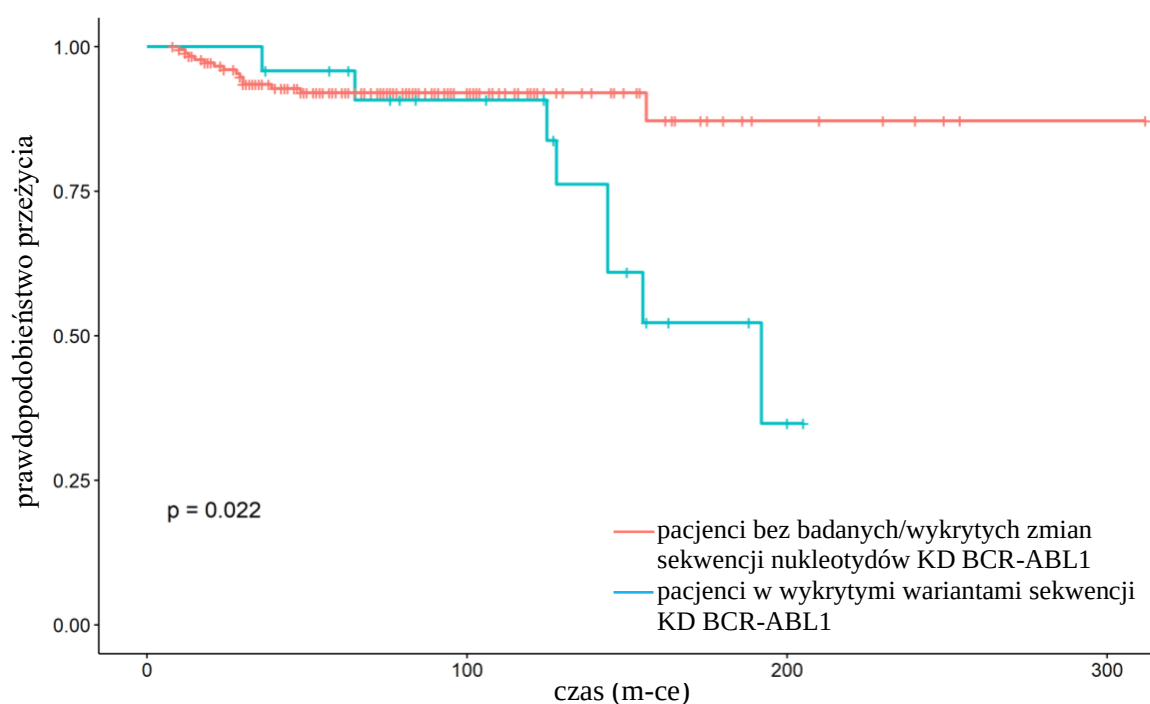
Badany parametr		Pacjenci z wykrytymi zmianami KD BCR-ABL n=24	Pacjenci bez wskazań do badania/bez zmian KD BCR-ABL n=183	p-value
Mediana wieku zachorowania w latach; (zakres)		51,5 (19-77)	51 (9-84)	0,5429
Płeć męska/żeńską; n (%)		13 /11 (54,2 /45,8)	87 /96 (47,5 /52,5)	0,6649
Powiększenie śledziony przy rozpoznaniu; n (%)		17 (70,8)	115 (62,8)	0,0033
Hg mmol/l przy rozpoznaniu; mediana (zakres)		7,3 (3,6-9,6)	7,5 (3,5-13,0)	0,4958
WBC 10 ⁹ /L przy rozpoznaniu; mediana (zakres)		131,1 (24,4-426)	89,9 (2,2-658)	0,0266
PLT 10 ⁹ /L przy rozpoznaniu; mediana (zakres)		441 (42-2746)	433 (51-2299)	0,8213
Blasty we krwi przy rozpoznaniu; mediana % (zakres)		2,5 (0-50)	1 (0-68)	0,1101
Eozynofile we krwi przy rozpoznaniu; mediana % (zakres)		2,5 (0-8)	2 (0-20)	0,5181
Bazofile we krwi przy rozpoznaniu; mediana % (zakres)		1,5 (0-29)	2 (0-18)	0,6678
Ocena ryzyka wg Sokala; n (%)	niskie	5 (20,8)	65 (35,5)	0,2719
	pośrednie	10 (41,7)	73 (39,9)	
	wysokie	9 (37,5)	45 (24,6)	
Ocena ryzyka wg Hasforda (Euro); n (%)	niskie	7 (29,1)	80 (43,7)	0,312
	pośrednie	13 (54,2)	82 (44,8)	
	wysokie	4 (16,7)	21 (11,5)	
Ocena ryzyka wg Eutos; n (%)	niskie	20 (83,3)	173 (94,5)	0,0629
	wysokie	4 (16,7)	10 (5,5)	
Ocena ryzyka wg ELTS; n (%)	niskie	12 (50)	117 (63,9)	0,3442
	pośrednie	7 (29,2)	39 (21,3)	
	wysokie	5 (20,8)	27 (14,8)	
Faza choroby przy rozpoznaniu; n (%)	CP	20 (83,3)	163 (89,1)	0,4272
	AP	3 (12,5)	15 (8,2)	
	BP	1 (4,2)	5 (2,7)	
ACA/Ph+; n (%)		8 (33,3)	45 (24,6)	0,1649
ACA/Ph+ w trakcie rozpoznania; n (%)		1 (12,5)	22 (48,9)	
ACA/Ph+ w trakcie leczenia; n (%)		7 (87,5)	23 (51,1)	

ACA/Ph+ "major route"; n (%)	7 (87,5)	12 (26,7)	
ACA/Ph+ "major i minor route"; n (%)	0	6 (13,3)	0,0059*
ACA/Ph+ "minor route"; n (%)	1 (12,5)	27 (60)	
Translokacja wariantowa; n (%)	4 (16,7)	9 (4,9)	
"Zamaskowany" Ph; n (%)	1 (4,2)	4 (2,9)	0,05949
Delecja <i>ABL1</i> lub/i <i>BCR</i> ; n (%)	1 (4,2)	22 (12)	
	e13a2 (b2a2)	7 (29,2)	62 (33,9)
Transkrypt; n (%)	e14a2 (b3a2)	16 (66,6)	115 (62,8)
	inny/koekspresja	0 /1 (4,2)	4 /2 (2,2 /1,1)

Skróty: ACA/Ph+, dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie komórek Philadelphia-dodatnim; AP, faza akceleracji; BP, faza przełomu blastycznego; CP, faza przewlekła; Hb, hemoglobina; KD, domena kinazowa; PLT, trombocyty; WBC, leukocyty

*analiza post-hoc	p-value po korekcji
ACA/Ph+	
"major route" vs. "major i minor route"	0,2058
"major route" vs. "minor route"	0,0142
"minor route" vs. "major i minor route"	0,99

Mediana wieku rozpoznania choroby była porównywalna w obu badanych grupach pacjentów. Częściej warianty sekwencji KD BCR-ABL1 stwierdzano u mężczyzn (54,2% vs. 45,8%). W trakcie diagnozowania splenomegalia oraz zwiększona liczba leukocytów była istotnie częściej obserwowana w grupie pacjentów z zmianami sekwencji KD BCR-ABL1. Odsetek blastów we krwi obwodowej był większy w porównaniu do grupy pacjentów bez wariantów sekwencji (mediana 2,5% vs. 1%, brak istotności statystycznej). Wśród ACA/Ph+ u pacjentów z wykrytymi zmianami KD BCR-ABL1 dominowały aberracje typu „major routes”, z kolei u pacjentów należących do drugiej grupy, ACA/Ph+ obejmowały częściej aberracje typu „minor routes” ($p=0,01$). W dwóch analizowanych grupach dominował transkrypt *BCR-ABL1* e14a2. Obserwowano istotną statystycznie różnicę w prawdopodobieństwie przeżycia w grupie chorych z stwierdzonymi wariantami KD BCR-ABL1 w porównaniu do pacjentów bez wskazań do badania w tym kierunku (Wykres 13).



Wykres 13. Porównanie prawdopodobieństwa całkowitego przeżycia (analiza Kaplana-Meiera) pomiędzy grupą chorych u których nie było wskazań do badania lub nie wykryto wariantów sekwencji nukleotydowych KD BCR-ABL1 i grupą pacjentów z zmianami w KD BCR-ABL1 (źródło: opracowanie własne).

Podsumowanie

- W badanej grupie stwierdzono 30 wariantów sekwencji KD BCR-ABL1 u 24 pacjentów (11,6%), w tym najczęściej występowały: F317L, M351T, T315I i V299L.
- W 3,9% przypadków zmiany KD BCR-ABL1 obserwowano w grupie pacjentów, u których stwierdzono również ACA/Ph+, natomiast u 7,7% chorych - obserwowano wyłącznie zmiany nukleotydowe.
- Splenomegalia oraz zwiększona liczba leukocytów w chwili rozpoznania choroby wiązała się z większym prawdopodobieństwem wystąpienia zmian w obrębie KD BCR-ABL1 w trakcie leczenia.
- Aberracje chromosomowe typu „major routes” statystycznie częściej obserwowano u chorych z wykrytymi wariantami KD BCR-ABL1, natomiast aberracje typu „minor routes” dominowały w grupie chorych bez wskazań do badania /bez wykrytych wariantów.
- Niski odsetek pacjentów z jednoczesnym występowaniem w przebiegu choroby zmian KD BCR-ABL1 oraz ACA/Ph+ w kariotypie, a także krótsze całkowite przeżycie chorych z wykrytymi wariantami KD wskazuje na występowanie mutacji KD BCR-ABL1 jako niezależny czynnik prognostyczny.

5.7 Aberracje chromosomowe w komórkach Philadelphia-ujemnych

Oceniając występowanie aberracji chromosomowych w komórkach Philadelphia-ujemnych (CCA/Ph-) uwzględniono tylko zmiany obserwowane przynajmniej dwa razy w kariotypie pacjentów utrzymujących całkowitą odpowiedź cytogenetyczną (CCyR) w trakcie terapii TKI. U 47 spośród 162 pacjentów z całkowitą odpowiedzią cytogenetyczną (29%) stwierdzono CCA/Ph-. W grupie pacjentów z aberracjami w komórkach Ph-ujemnych przeważali mężczyźni (61,7%; $p=0,02$). Wartości badanych parametrów hematologicznych podczas rozpoznania choroby były porównywalne w grupie chorych, u których na dalszym etapie leczenia obserwowano w kariotypie powtarzające się CCA/Ph- i u których nie stwierdzano tego typu aberracji (Tabela 33).

Tabela 33. Porównanie wybranych parametrów kliniczno-laboratoryjnych i skal prognostycznych pomiędzy grupą pacjentów z CCyR z powtarzającymi się CCA/Ph- i grupą pacjentów z CCyR bez takich zmian.

Badany parametr		Pacjenci z CCA/Ph- n=47	Pacjenci bez CCA/Ph- n=115	p-value
Mediana wieku zachorowania w latach; (zakres)		50 (19-81)	49 (9-84)	0,9177
Płeć męska/żeńską; n (%)		29 /18 (61,7/38,3)	48 /67(41,7 /58,3)	0,0247
Powiększenie śledziony przy rozpoznaniu; n (%)		27 (57,4)	69 (60)	0,8604
Hg mmol/l przy rozpoznaniu; mediana (zakres)		7,3 (4,4-10,3)	7,6 (3,5-13,0)	0,2844
WBC 10 ⁹ /L przy rozpoznaniu; mediana (zakres)		96 (5,7-658)	87,8 (6-438)	0,2642
PLT 10 ⁹ /L przy rozpoznaniu; mediana (zakres)		451 (109-1026)	435 (51-2299)	0,7706
Blasty we krwi przy rozpoznaniu; mediana % (zakres)		1 (0-68)	1 (0-11)	0,5224
Eozynofile we krwi przy rozpoznaniu; mediana % (zakres)		3 (0-17)	2 (0-12)	0,2881
Bazofile we krwi przy rozpoznaniu; mediana % (zakres)		3 (0-18)	2 (0-17)	0,2598
Ocena ryzyka wg Sokala; n (%)	niskie	18 (38,3)	46 (40)	0,9739
	pośrednie	20 (42,6)	47 (40,9)	
	wysokie	9 (19,1)	22 (19,1)	
Ocena ryzyka wg Hasforda (Euro); n (%)	niskie	20 (42,6)	57 (49,6)	0,7367
	pośrednie	25 (53,2)	52 (45,2)	
	wysokie	2 (4,2)	6 (5,2)	

Ocena ryzyka wg Eutos; n (%)	niskie	44 (93,6)	110 (95,7)	0,6919
	wysokie	3 (6,4)	5 (4,3)	
Ocena ryzyka wg ELTS; n (%)	niskie	29 (61,7)	82 (71,3)	0,3425
	pośrednie	15 (31,9)	24 (20,9)	
	wysokie	3 (6,4)	9 (7,8)	
Faza choroby przy rozpoznaniu; n (%)	CP	45 (95,8)	107 (93,1)	0,6186
	AP	1 (2,1)	6 (5,2)	
	BP	1 (2,1)	2 (1,7)	
ACA/Ph+; n (%)		12 (25,5)	13 (11,3)	0,0309
Translokacja wariantowa; n (%)		1 (2,1)	7 (6,1)	0,4397
Delecja <i>ABL1</i> lub/i <i>BCR</i> ; n (%)		3 (6,4)	11 (9,6)	0,759
Transkrypt; n (%)	e13a2 (b2a2)	8 (17)	43 (37,4)	0,0237*
	e14a2 (b3a2)	38 (80,9)	70 (60,9)	
	inny	1 (2,1)	2 (1,7)	
Warianty domeny kinazowej <i>BCR-ABL1</i> ; n (%)		9 (19,1)	5 (4,3)	0,0102
Transformacja do BP/AP; n (%)		2 (4,2)	4 (3,5)	0,99
AlloBMT; n (%)		1 (2,1)	4 (3,5)	0,99
Śmierć; n (%)		0	2 (1,7)	0,99

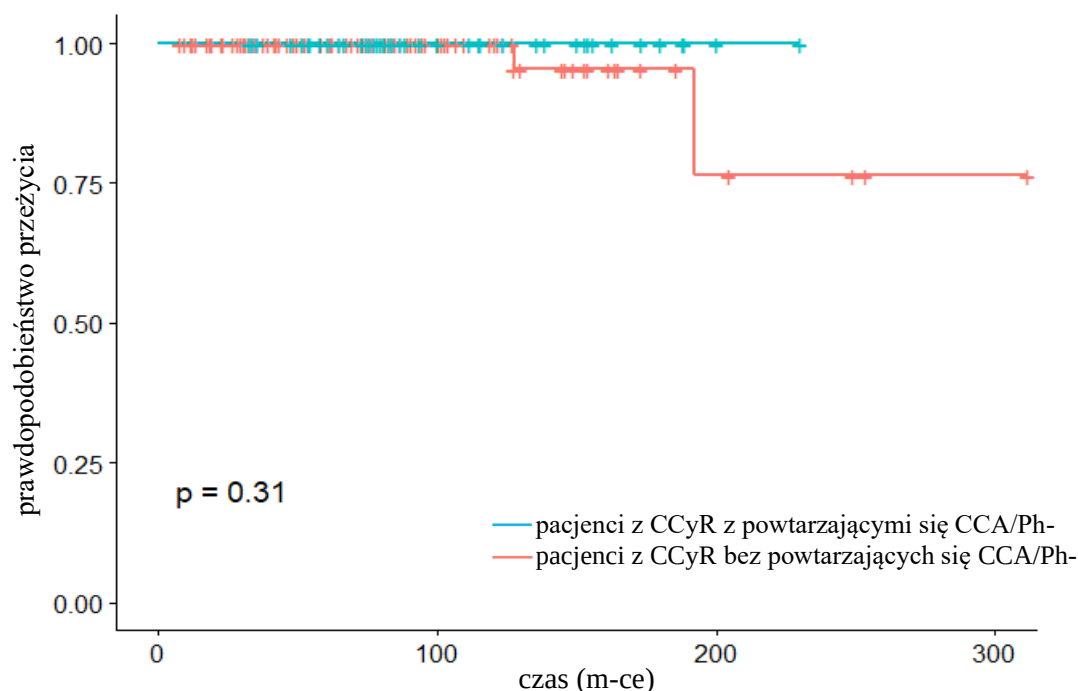
Skróty: ACA/Ph+, dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie komórek Philadelphia-dodatnim; alloBMT, allogeniczny przeszczep komórek szpiku kostnego; AP, faza akceleracji; BP, faza przełomu blastycznego; CCA/Ph-, klonalne aberracje w komórkach Ph-ujemnych; CP, faza przewlekła; Hb, hemoglobina; KD, domena kinazowa; PLT, trombocyty; WBC, leukocyty

*analiza post hoc	adj. p-value
Transkrypt	
e13a2 vs. e14a2	0,0431
e13a2 vs. inny/koekspresja	0,6419
e14a2 vs. inny/koekspresja	0,99

Ocena ryzyka progresji choroby według skal prognostycznych w obu analizowanych grupach była porównywalna. Odsetek ACA/Ph+ był wyższy w grupie pacjentów z CCA/Ph- w kariotypie ($p=0,03$). U trzech pacjentek (nr 10, 12, 162) aberracje występujące w klonie Ph-dodatnim: trisomia 8 w dwóch przypadkach oraz translokacja $t(3;9)(p12;q21)$, były obserwowane również w komórkach Ph-ujemnych po eradykacji klonu komórek z chromosomem Ph. W grupie z aberracjami w komórkach Ph-ujemnych istotnie częściej stwierdzono transkrypt e14a2, rzadziej – e13a2 ($p=0,04$) oraz częściej obserwowano warianty sekwencji KD BCR/ABL1 w trakcie terapii (19,1% vs. 4,3%; $p=0,01$). Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w prawdopodobieństwie przeżycia pomiędzy badanymi grupami pacjentów (Wykres 14).

U 47 pacjentów stwierdzono 90 aberracji chromosomowych w komórkach Ph-ujemnych. U 26 chorych (55,3%) obserwowano jeden rodzaj aberracji powtarzający się podczas obserwacji. U 10 pacjentów (21,3%) obserwowano dwa rodzaje aberracji,

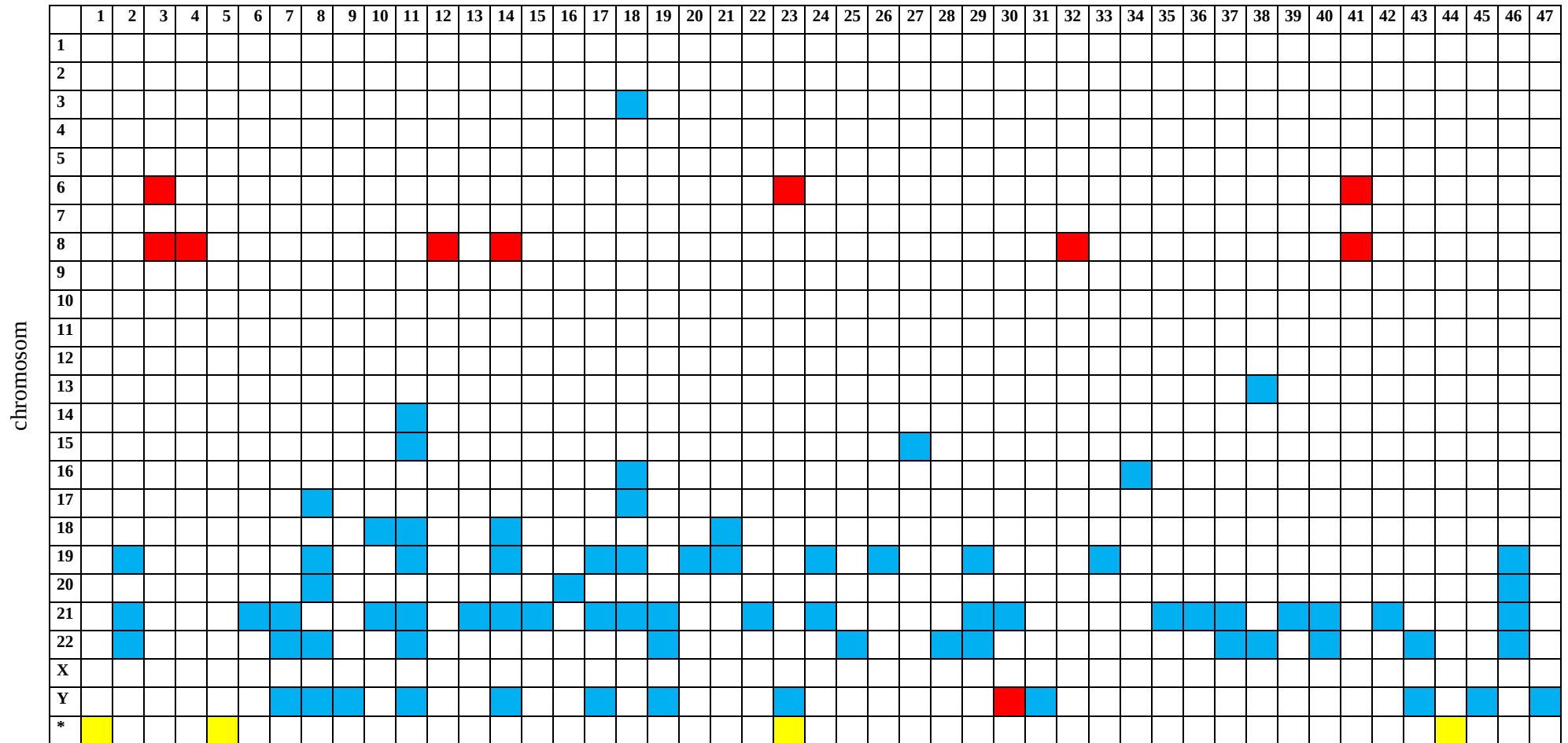
natomiast u sześciu chorych (12,8%) trzy różne rodzaje aberracji w komórkach Ph-ujemnych. U pozostałych pięciu pacjentów (10,6%) stwierdzono powyżej trzech aberracji: siedem różnych aberracji u pacjenta nr 20, po pięć aberracji u pacjenta nr 16, 23 i 38 oraz cztery aberracje u pacjentki nr 189 (Suplement; Załącznik 7).



Wykres 14. Porównanie prawdopodobieństwa całkowitego przeżycia (estymator Kaplana-Meiera) pomiędzy grupą pacjentów z CCyR z obecnością w karyotypie powtarzających się CCA/Ph- i grupą pacjentów z CCyR bez tego rodzaju aberracji chromosomowych (źródło: opracowanie własne).

Najczęściej aberracje dotyczyły zmian liczbowych chromosomów autosomalnych ($n=73/90$; 81,1%), przede wszystkim monosomii ($n=64/90$; 71,1%) (Rycina 30). Monosomia 21 była najczęściej występującą zmianą obserwowaną u 22 pacjentów, następnie pod względem częstości występowania dominowała monosomia 22 (stwierdzana u 13 pacjentów) i monosomia 19 (u 13 chorych). U 12 chorych obserwowano utratę chromosomu płci Y. Trisomię 8 stwierdzono u sześciu pacjentów, monosomię 18 u czterech chorych, natomiast trisomię 6 i monosomię 20 odpowiednio u trzech chorych. Trisomie 6 i 8 były jedynymi trisomiami obserwowanymi w badanej grupie. U dwóch pacjentów stwierdzono mały chromosom markerowy, wielkością zbliżony do chromosomów z grupy G, u jednego pacjenta – dodatkowy chromosom Y.

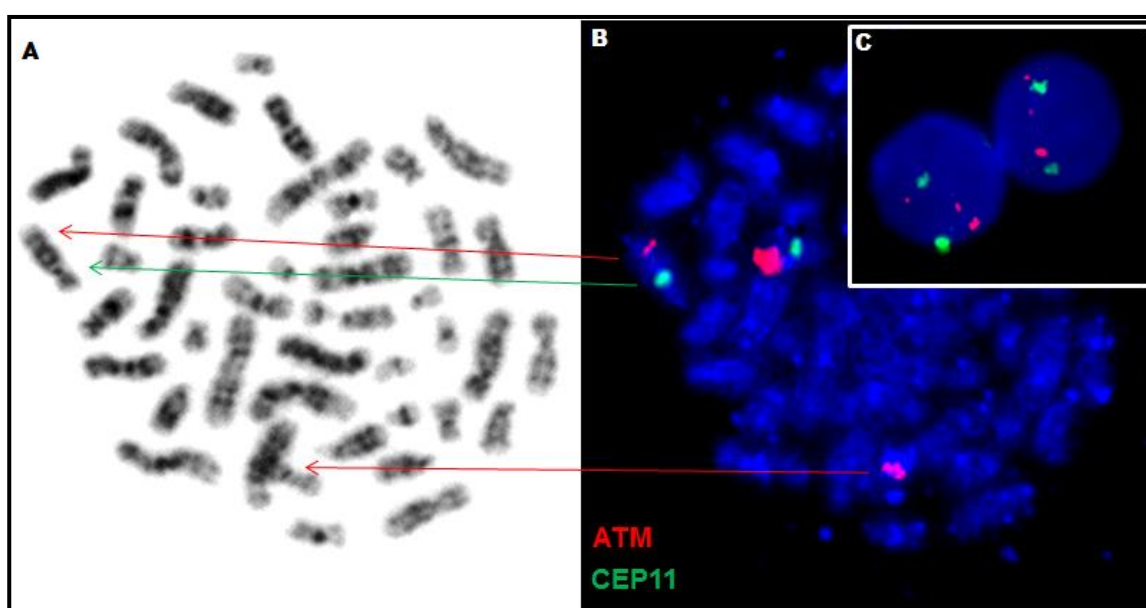
L.p. pacjenta



* +mar [2x]; t(3;9)(p12;q21) [1x]; t(?8;11)(q?13;q22) [1x]

Rycina 30. Dystrybucja CCA/Ph-. Każdy wiersz reprezentuje chromosomy ponumerowane od 1 do 22 z dodatkowymi wierszami dla chromosomów płciowych i wiersz oznaczony „inne” dla aberracji strukturalnych i chromosomów markerowych. Każda kolumna przedstawia pacjenta z CCA/Ph-. Niebieski kolor oznacza utratę; czerwony - dodatkową kopię; żółty - aberracje strukturalne i chromosomy markerowe (źródło: opracowanie własne).

U dwóch pacjentów (nr 12 i 174) zaobserwowano aberracje strukturalne: translokację $t(3;9)(p12;q21)$ i translokację $t(8;11)(q24;q22)$. Co ciekawe, u pacjenta nr 174 translokacja $t(8;11)(q24;q22)$ wiązała się z rearanżacją genu *ATM* i rozpoznaniem przewlekłej białaczki limfocytowej (CLL) po dziewięciu latach leczenia imatynibem (Rycina 30). Aberrację obserwowano w jednej metafazie na 29 analizowanych, natomiast rearanżację *ATM* potwierdzono badaniem FISH w 72% komórkach nieproliferujących. Retrospektywne badanie próbek wykazało, że rearanżacja była obecna przed manifestacją kliniczną CLL w niższym odsetku komórek nieproliferujących (46%).



Rycina 30. Płytki metafazalne oraz jądra interfazowe pacjenta nr 174. A) Metafaza po barwieniu GTG ze zmienionymi chromosomami 8 i 11 (zaznaczone strzałkami). B) FISH z sondą *ATM/CEP11* na odbarwionej metafazie wykazała rearanżację regionu 11q22.3 (dwa mniejsze czerwone sygnały w porównaniu do prawidłowego sygnału na chromosomie 11. C) FISH na jądrach interfazowych wykazała trzy sygnały (jeden normalny i dwa mniejsze sygnały) pochodzące z locus genu *ATM* i dwa sygnały pochodzące z centromeru chromosomu 11 (źródło: opracowanie własne; zdjęcia wykonano w Pracowni Cytogenetyki Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej).

Poszczególne klonalne, powtarzające się aberracje przedstawiono w Suplemencie (Załącznik 7). Mediana czasu pojawienia się zmian CCA/Ph- od chwili włączenia leczenia TKI wyniosła 54 miesiące (zakres 3 - 147). W czasie od włączenia TKI do ostatniej oceny cytogenetycznej (mediana 74 miesiące; zakres 12-159) tą samą aberracją u poszczególnych pacjentów w badanej grupie obserwowano od dwóch do 11 razy. Najczęściej u pacjenta nr 23 obserwowano utratę Y (11x) i trisomię 8 (9x) oraz trisomię 8 u pacjentki nr 10 (10x) i pacjentki nr 8 (9x).

Najczęściej metafazy z CCA/Ph- stanowiły do 30% wszystkich analizowanych płytek metafazalnych (Tabela 34). Wszyscy pacjenci z powtarzającymi się w kariotypie CCA/Ph- utrzymywali całkowitą odpowiedź cytogenetyczną. Głęboka odpowiedź molekularna wystąpiła u 35 chorych (74,5%), w tym: u 22 pacjentów stwierdzono odpowiedź

na poziomie MR5, u siedmiu - MR4,5, u sześciu - MR4. U sześciu pacjentów (12,8%) obserwowano odpowiedź na poziomie większej odpowiedzi molekularnej. Kolejnych sześciu chorych (12,8%) nie uzyskało większej odpowiedzi molekularnej w trakcie leczenia TKI, natomiast jednego z nich poddano allogenicznemu przeszczepowi komórek szpiku kostnego z pozytywnym skutkiem.

Tabela 34. Charakterystyka powtarzających się, klonalnych aberracji chromosomowych w komórkach Ph-ujemnych oraz odpowiedź na leczenie TKI w grupie pacjentów z powtarzającymi się CCA/Ph-.

Badany parametr		CCA/Ph- n=90
Częstość występowania CCA/Ph-; n	mediana	2
	zakres	2-11
Najwyższy odsetek metafaz z CCA/Ph-; n (%)	do 10%	12 (13,3)
	do 30%	69 (76,7)
	do 50%	4 (4,4)
	powyżej 50%	5 (5,6)
Czas wystąpienia CCA/Ph- od rozpoczęcia leczenia TKI (m-ce)	mediana	54
	zakres	3-147
TKI w chwili stwierdzenia CCA/Ph- (%)	imatynib	42,9
	dazatynib	27,7
	nilotynib	29,5
Badany parametr		Pacjenci z CCA/Ph- n=47
Czas od włączenia TKI do ostatniej oceny cytogenetycznej na TKI (m-ce)	mediana	74
	zakres	12-159
Odpowiedź cytogenetyczna (ostatnie badanie); n (%)	CCyR	47 (100)
Odpowiedź molekularna (ostatnie badanie); n (%)	MR5	22 (46,8)
	MR4,5	7 (14,8)
	MR4	6 (12,8)
	MMR	6 (12,8)
	brak MMR	6 (12,8)

Skróty: CCA/Ph-, klonalne aberracje w komórkach Ph-ujemnych; CCyR, całkowita odpowiedź cytogenetyczna; MMR, większa odpowiedź molekularna; MR4, głęboka odpowiedź molekularna na poziomie 4log; MR4,5, głęboka odpowiedź molekularna na poziomie 4,5log; MR5, głęboka odpowiedź molekularna na poziomie 5log; TKI, inhibitor kinaz tyrozynowych

Podsumowanie

- U 29% pacjentów stwierdzono powtarzające się podczas leczenia TKI aberracje chromosomowe w komórkach Philadelphia-ujemnych.
- Wśród stwierdzonych CCA/Ph- dominowały zmiany liczbowe chromosomów autosomalnych, w tym najczęściej stwierdzano monosomie chromosomów z grupy F i G. Najczęściej klon komórek z CCA/Ph- stanowił od 11 do 30 % analizowanych metafaz.
- Stwierdzono częstsze wystąpienia tego typu aberracji u mężczyzn.
- Obecność transkryptu e13a2 istotnie częściej obserwowano u chorych bez CCA/Ph- w karyotypie, natomiast e14a2 – częściej u chorych z CCA/Ph-.
- W grupie pacjentów z powtarzającymi się CCA/Ph- w karyotypie 74,5% chorych uzyskało głęboką odpowiedź molekularną w trakcie terapii TKI. Występowanie CCA/Ph- nie wpływało niekorzystnie na całkowite przeżycie chorych.

6. DYSKUSJA

Przewlekła białaczka szpikowa jest klonalną chorobą mieloproliferacyjną z obecnością charakterystycznej, wzajemnej translokacji pomiędzy chromosomami pary 9 i 22 z zaangażowaniem dwóch genów *ABL1* i *BCR*, które ulegają aberracji tworząc chimeryczny gen fuzyjny *BCR-ABL1* [125]. Ten specyficzny typ rearanzacji jest znamieny dla przewlekłej białaczki szpikowej i jest identyfikowany przez obecność chromosomu Philadelphia w komórkach białaczkowych. Wykrycie chromosomu Philadelphia było wydarzeniem o dużym znaczeniu historycznym, ponieważ był to pierwszy cytogenetyczny marker powiązany specyficznie z nowotworem układu krwiotwórczego. W 1960 roku Peter Nowell i David Hungerford jako pierwsi odkryli obecność małego, zmienionego chromosomu wielkością zbliżonego do 1/3 wielkości chromosomów z grupy G w komórkach białaczkowych pacjentów chorujących na przewlekłą białaczkę szpikową [126]. Wprowadzone w latach 70 techniki prążkowego barwienia chromosomów umożliwiły identyfikację każdego chromosomu na podstawie wzoru prążkowego, detekcję aneuploidii oraz dużych rearanzacji strukturalnych [127]. Po raz pierwszy w 1973 roku Janet Rowley analizowała komórki od dziewięciu pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową przy użyciu technik barwienia wykorzystujących quinakrynę oraz Giemę i wykazała, że chromosom Ph u wszystkich pacjentów pochodzi z wzajemnej translokacji dystalnej części ramienia długiego chromosomu 22 do dystalnej części ramienia długiego chromosomu 9 [22]. Podobnie po wprowadzeniu hybrydyzacji *in situ* w 1982 roku De Klein i wsp. [128] wykazali, że poprzednio opisana translokacja jest wzajemna. Badania molekularne wskazały, iż ta translokacja powoduje powstanie fuzji genowej *BCR-ABL1*. Powyższe odkrycia zrewolucjonizowały diagnostykę przewlekłej białaczki szpikowej. Umożliwiły wykrycie wzajemnej translokacji swoistej dla tej jednostki chorobowej - t(9;22)(q34;q11.2), której produkt genowy został uznany za cel terapeutyczny w erze stosowania inhibitorów kinaz tyrozynowych w leczeniu CML [14]. Pomimo wprowadzenia i standaryzacji badań molekularnych w diagnostyce CML [129], diagnostyka cytogenetyczna pozostaje złotym standardem wykrywania chromosomu Ph, a także dodatkowych aberracji chromosomowych w klonie Ph-dodatnim, związanych z procesem białaczkowym, a także aberracji chromosomowych występujących w komórkach Ph-ujemnych w trakcie leczenia.

W momencie rozpoznania około 90–95% pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową prezentuje klasyczną translokację $t(9;22)(q34;q11.2)$, z kolei translokacje wariantowe występują z częstością 5-10% przypadków. Większość danych opisujących translokacje wariantowe pochodzi z analizy małych grup pacjentów bądź opisu przypadków. Niektóre dane literaturowe wskazują, że pacjenci z translokacją wariantową mają gorsze rokowanie [130], [28], [31], inne z kolei nie potwierdzają tej tezy [29], [33], [131], [132]. El-Zimaity i wsp. przedstawili 44 przypadki z translokacjami wariantowymi, co stanowiło 4% pacjentów z całej grupy badanej. Pacjenci byli w różnych fazach choroby, wszyscy leczeni byli imatynibem po niepowodzeniu terapii interferonem. Wykazano brak wpływu występowania translokacji wariantowych na odsetek całkowitych odpowiedzi cytogenetycznych, całkowite przeżycie lub czas trwania odpowiedzi podczas terapii imatynibem [131]. Podobne wyniki uzyskał Marzocchi i wsp. [33]. Z 559 pacjentów leczonych imatynibem u 30 (5%) potwierdzono translokację wariantową. Również nie stwierdzono różnic pomiędzy grupą pacjentów z translokacją wariantową a translokacją klasyczną w ocenie przeżycia wolnego od progresji, przeżycia wolnego od zdarzeń niepożądanych i przeżycia całkowitego. Osiągnięto podobne odsetki całkowitej odpowiedzi hematologicznej, całkowitej odpowiedzi cytogenetycznej i większej odpowiedzi molekularnej w obu grupach pacjentów. W innym badaniu opisano 10 pacjentów (6,5%) z translokacjami wariantowymi rozpoznanymi w fazie przewlekłej choroby [31]. Uzyskane wyniki wskazywały na niekorzystne znaczenie kliniczne translokacji wariantowych, ponieważ tylko dwóch pacjentów uzyskało optymalną odpowiedź na zastosowane leczenie imatynibem i nilotynibem. Autorzy wskazali, że udział dodatkowych chromosomów w przegrupowaniu genów *BCR* i *ABL1* może mieć wpływ na wynik terapii, szczególnie w przypadku selektywnego inhibitora kinazy tyrozynowej i może być markerem niestabilności genomu oraz substytutem ewolucji klonalnej kariotypu.

Jednoczesna ocena kariotypu wraz z analizą FISH ułatwia scharakteryzowanie translokacji wariantowych. Technika FISH z zastosowaniem sond molekularnych ukierunkowanych na wykrycie fuzji genowej *BCR/ABL1*, nie tylko w jądrach interfazowych, ale także na metafazach, ma kluczowe znaczenie dla stwierdzenia rearanżacji genów *BCR* i *ABL1*, ich lokalizacji, a także wykrycia dodatkowych zmian chromosomowych w obrębie badanych loci np. dodatkowej kopii genu fuzyjnego *BCR/ABL1*, który może mieć znaczenie dla interpretacji przebiegu klinicznego i rokowania pacjenta.

W prezentowanej grupie chorych u 21 pacjentów (9,8%) stwierdzono translokację wariantową. W powstawanie translokacji wariantowych zaangażowane były różne chromosomy autosomalne, najczęściej chromosom 11 i 17. Autosomy pary 3, 4, 9, 13, 14, 18, 20 oraz heterosomy nie brały udziału w stwierdzonych translokacjach wariantowych. Wszystkie obserwowane translokacje poza translokacją $t(11;9;22;12)(q12;q34;q11.2;p13)$, $t(9;22;22)(q34;q11.2;p12)$ oraz translokacją powstałą na skutek wielostopniowego przegrupowania, były obserwowane w literaturze [26]. Dane literaturowe wskazują na udział wszystkich chromosomów w powstanie translokacji wariantowej, jednak zaangażowanie niektórych regionów chromosomów obserwuje się częściej [26]. W analizowanej grupie 21 pacjentów część regionów zaangażowanych w powstanie translokacji wariantowej należało do najczęściej wymienianych w piśmiennictwie: 1p36, 6p21, 11q12, 12p13, 17p13, 19q13 i 22q13, przy czym najczęściej zaangażowanym locus w badanej grupie był region 11q12. Pozostałe stwierdzone regiony chromosomowe nie należały do często wymienianych w danych literaturowych. Częściej zaangażowane w translokację wariantową były regiony chromosomowe zlokalizowane w ramionach długich autosomów niż w ramionach krótkich (61% vs. 39%). Analizując regiony złamań chromosomów zaangażowanych w wykryte translokacje wariantowe stwierdzono, że przeważająca większość (74%) występuje w jasnych prążkach G-negatywnych uzyskanych po barwieniu odczynnikiem Giemsy. Wyjątek stanowiły punkty złamań 10q21, 11p14, 11q12, 22p12 zlokalizowane w ciemnych prążkach G-pozytywnych oraz 21p11.1 w regionie okołocentromerowym.

Za większą częstość złamań w prążkach G-negatywnych odpowiada dystrybucja w tych regionach genomu sekwencji bogatych w guaninę (G) i cytozynę (C) oraz wysp CpG. Tego rodzaju sekwencje są charakterystyczne dla euchromatyny w obrębie której występuje duża skłonność do złamań oraz częściej dochodzi do rekombinacji. W procesie niehomologicznej rekombinacji zaangażowane są powtórzenia *Alu* występujące we fragmentach bogatych w pary GC, określane mianem tzw. „hot spot” [133]. Jeffs i wsp. badając wariantowe rearanżacje *BCR/ABL1* udowodnili, że odcinek 3' translokowanego genu *BCR* ulega rekombinacji z tymi powtórzeniami [134]. Także badania Fishera i wsp. wskazują na większą podatność euchromatyny na złamania, co w konsekwencji przyczynia się do powstawania translokacji, w tym translokacji wariantowych [135].

Dane literaturowe sugerują, że przebieg choroby może być zależny do położenia punktu złamania na trzecim chromosomie uczestniczącym w translokację wariantową [130], [136], [137]. Wiele wcześniej opisanych punktów złamań obejmuje loci genów supresorowych, onkogenów oraz genów mutatorowych powiązanych z nowotworzeniem: region 8q22 to locus genu *RUNX1* [138], region 7q11 – locus genu *GTF2I* [139], których rola poznana jest w patogenezie ostrych białaczek szpikowych oraz regiony 17q23, 12p13, 17p13, czy 8q24, w których zlokalizowane są geny zaangażowane w patomechanizm rozwoju nowotworów limfoidalnych czy guzów litych [138].

Wykorzystanie analizy FISH umożliwiło w badanej grupie pacjentów wskazanie potencjalnego mechanizmu powstania translokacji wariantowej, wskazując na zdecydowaną przewagę (95,2%) występowania jednostopniowego mechanizmu powstawania tego rodzaju translokacji, w którym zaangażowanie trzeciego (lub większej liczby) chromosomu zachodzi jednocześnie wraz z powstaniem chromosomu Ph. Dwustopniowy mechanizm, w którym po translokacji klasycznej t(9;22) następuje wtórna translokacja pomiędzy der(9)(q34) a trzecim chromosomem, nie został stwierdzony w badanej grupie pacjentów. Mechanizm dwustopniowy powstania translokacji wariantowej, podobnie jak mechanizm wielostopniowy stwierdzony w badanej grupie u jednego pacjenta (4,8%), zdarza się bardzo rzadko. Z energetycznego punktu widzenia jest bardziej niekorzystny, ponieważ wiąże się z większą liczbą złamań chromosomów. Z drugiej strony dwustopniowy mechanizm związany jest z występowaniem w karyotypie aberracji wtórnej co może mieć niekorzystny wpływ na uzyskanie całkowitej odpowiedzi cytogenetycznej oraz głębokiej odpowiedzi molekularnej.

Porównując badaną grupę pacjentów z translokacją wariantową i z grupą chorych z translokacją klasyczną t(9;22) w karyotypie, u pacjentów z translokacją wariantową częściej obserwowano splenomegalię w momencie rozpoznania choroby w porównaniu do grupy pacjentów z translokacją klasyczną t(9;22). Pod względem pozostałych cech klinicznych oraz cech demograficznych nie obserwowano różnic pomiędzy analizowanymi grupami. Dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie Ph-dodatnim występowały częściej u pacjentów z translokacją wariantową (30,8% vs. 25,4%). Ponadto w tej grupie chorych częściej występowały warianty sekwencji domeny kinazowej BCR-ABL1 (30,8% vs. 10,6%). Wskazuje to na występowanie w grupie pacjentów z translokacjami wariantowymi dodatkowych czynników ryzyka, które przyczyniają się do uzyskania gorszych odpowiedzi na leczenie

inhibitorami kinaz tyrozynowych, a także na większy odsetek transformacji do zaawansowanych faz choroby oraz wyższy odsetek zgonów. Według aktualnych rekomendacji występowanie w kariotypie pacjentów z CML translokacji wariantowej nie zmienia postępowania w porównaniu z pacjentami z translokacją klasyczną t(9;22) w kariotypie [35], [36], [37].

W badanej grupie pacjentów z translokacjami wariantowymi całkowitą odpowiedź cytogenetyczną uzyskało ośmiu pacjentów (61,5%): sześciu w trakcie terapii imatynibem, dwóch w trakcie leczenia nilotynibem. Obecnie informacje na temat oceny głębokiej odpowiedzi molekularnej u pacjentów z translokacjami wariantowymi są ograniczone. W badanej grupie pięciu pacjentów (38,5%) leczonych imatynibem uzyskało głęboką odpowiedź molekularną (czterech na poziomie MR5 oraz jeden – MR4). Dwóch pacjentów po niepowodzeniu terapii imatynibem uzyskało większą odpowiedź molekularną (MMR) podczas leczenia nilotynibem. Jedna pacjentka z całkowitą odpowiedzią cytogenetyczną nie uzyskała odpowiedzi molekularnej na poziomie MMR. Wyniki badań Inokuchi i wsp. [140] sugerują, że uzyskanie głębokiej odpowiedzi molekularnej w dobie stosowania TKI może być trudniejsze u pacjentów z translokacją wariantową w odniesieniu do pacjentów z translokacją klasyczną t(9;22). Przedstawione powyżej dane są jednymi z nielicznych opisującymi uzyskanie głębokiej odpowiedzi molekularnej po zastosowaniu TKI u pacjentów chorujących na CML w populacji polskiej z translokacjami wariantowymi w kariotypie.

Zjawisko submikroskopowej rearanżacji *BCR/ABL1* występuje u chorych z kliniczną manifestacją przewlekłej białaczki szpikowej z kariotypem Ph-ujemnym, *BCR-ABL1*-dodatnim (~5% chorych) oraz w przypadkach, w których chromosom Ph nie jest wykrywany w konwencjonalnej analizie cytogenetycznej na skutek maskowania inną aberracją chromosomową (częstość występowania takich przypadków wynosi ~1%). Z tych powodów wstępna diagnostyka pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową powinna obejmować jednoczesną analizę kariotypu w celu wykrycia chromosomu Ph oraz analizę FISH w celu potwierdzenia statusu genu fuzyjnego *BCR/ABL1*. Zgodnie z standardami opracowanymi przez Polską Grupę Leczenia Białaczek [37], rekomendacjami European LeukemiaNet [35], [36] oraz National Comprehensive Cancer Network (NCCN v1.2019) [81], badanie RQ-PCR (wynik w formie wystandaryzowanej międzynarodowo) jest preferowaną metodą oceny minimalnej choroby resztkowej. Analiza FISH nie jest zalecana do monitorowania terapii, jednak jest to skuteczna,

alternatywna metoda w sytuacjach szczególnych, gdy u pacjenta wykrywa się rzadki, nietypowy transkrypt *BCR-ABL1* [52], bądź w kariotypie nie stwierdza się chromosomu Ph mimo potwierdzenia rearanżacji genu *BCR* i *ABL1*. W analizowanej grupie pacjentów wykrycie submikroskopowych rearanżacji obejmujących wspomniane geny było możliwe ze względu na jednoczesne zastosowanie metod cytogenetyki klasycznej i molekularnej podczas diagnozy. Badanie potwierdziło niską częstość występowania submikroskopowej insercji w obrębie genów *BCR* i *ABL1* z kariotypem Ph-ujemnym, *BCR-ABL1*-dodatnim (1,8%) oraz maskowania chromosomu Ph inną, wtórną aberracją chromosomową (0,5%), co odpowiadało danym dokumentujących inne badania [38], [40], [41], [42], [43], [51], [141]. Według dostępnego piśmiennictwa gen fuzyjny u pacjentów z CML Ph-ujemnych *BCR-ABL1*-dodatnich jest najczęściej zlokalizowany na der(22), rzadziej na der(9). Obecność rearanżacji na der(9) odnotowuje się u około 30% pacjentów opisanych w literaturze [179]. Warto podkreślić, że w badanej grupie u 50% pacjentów stwierdzono rearanżację w obrębie der(9).

Poprzednie badania potwierdziły, że mechanizm rearanżacji *BCR-ABL1* wynika z insercji części chromosomu 22 zawierającego 5'*BCR* w locus genu *ABL1* na chromosomie 9 lub odwrotnie. Mechanizm ten jest bardziej prawdopodobny niż dwie sekwencyjne translokacje, ponieważ wymaga tylko dwóch punktów złamań w 22q11.2 i jednego punktu złamania w 9q34 bądź odwrotnie. Z kolei w mechanizmie dwuetapowym dochodzi do czterech punktów złamań [41]. Analiza FISH pozwala wyjaśnić możliwy mechanizm rearanżacji *BCR-ABL1*.

U jednej z badanych pacjentek (nr 215) wskazano na dwuetapowy mechanizm powodujący finalnie maskowanie aberracją wtórną powstałego pierwotnie chromosomu Ph. U czterech pozostałych pacjentów (nr 211-214) potwierdzono submikroskopowe insercje powstałe w mechanizmie jednoetapowym.

Obserwacja 3 różnych wzorów hybrydyzacji w badaniu FISH w małej, badanej grupie pacjentów z kariotypem Ph-ujemnym *BCR-ABL1*-dodatnim oraz z zamaskowanym Ph wtórną aberracją, dowodzi dużej heterogenności genetycznej badanej grupy pacjentów.

Znaczenie prognostyczne submikroskopowej rearanżacji *BCR-ABL1* zostało opisane w piśmiennictwie, jednak dane dotyczące odpowiedzi na TKI u pacjentów Ph-ujemnych *BCR-ABL1*-dodatnich lub z maskowanym chromosomem Ph są ograniczone [41], [42], [43], [50], [51], [44]. Czterech pacjentów w badanej grupie osiągnęło MMR (nr 211-214), a dwóch z nich (nr 211-212) uzyskało głęboką odpowiedź

molekularną (zdefiniowaną jako brak transkryptu w badaniu RT-PCR wraz z co najmniej MR4,5 w RQ-PCR). Wspomniane dane sugerują neutralny wpływ submikroskopowej insercji na wynik leczenia TKI. Uzyskanie głębokiej odpowiedzi molekularnej może być ograniczone przez rozwój oporności mutacyjnej lub obecność dodatkowych aberracji chromosomowych. Dwóch pacjentów w badanej podgrupie z pozornie prawidłowym kariotypem z jednoczesną rearranżacją *BCR-ABL1* nie uzyskało odpowiedzi optymalnej na leczenie imatynibem. Jeden z nich (nr 214) rozwinął oporność mutacyjną, po włączeniu nilotinibu ostatecznie osiągnął odpowiedź na poziomie MR5. U pacjentki nr 213 w momencie diagnozy stwierdzono w kariotypie duplikację obejmującą fragment długiego ramienia chromosomu płci X, co mogło mieć wpływ na uzyskaną odpowiedź na leczenie TKI w porównaniu z pacjentami, którzy nie wykazywali dodatkowych aberracji chromosomowych w kariotypie. Z kolei w kariotypie pacjentki nr 215 stwierdzono zamaskowany chromosom Ph wtórną translokacją t(7;22)(q22;p12). W tym przypadku obserwowano nieoptymalną odpowiedź na zastosowane leczenie TKI. Nie można wykluczyć, że sam udział chromosomu 7 (który jest uważany u pacjentów z CML za niekorzystny czynnik ryzyka) w translokację jest związany z niepowodzeniem terapii TKI [34], [136]. Do tej pory opisano kilkanaście przypadków przewlekłej białaczki szpikowej z translokacją t(7;22), jednak w żadnym przypadku złamanie nie obejmowało ramienia krótkiego w obrębie chromosomu 22 [26]. W związku z powyższym opisany przypadek jest pierwszym przedstawiającym translokację t(7;22)(q22;p12) zachodzącą po pierwotnej translokacji t(9;22)(q34;q11.2). Mimo, że w analizie FISH nie stwierdzono delecji w locus 7q31 (co stosunkowo często obserwuje się w przebiegu zespołu mielodysplastycznego lub ostrej białaczki szpikowej), nie można wykluczyć występowania mikrodelecji w obrębie 7q22, co zostało wcześniej opisane i co może wiązać się z niepowodzeniem leczenia [142].

Delecje submikroskopowe obejmujące gen *ABL1* i/lub *BCR* na chromosomie pochodnym powstałym na skutek translokacji klasycznej dla przebiegu choroby spotyka się u części chorych z rozpoznaniem przewlekłej białaczki szpikowej. Dotyczą one fragmentów o wielkości od kilku kbp do kilku Mbp i obejmują również sekwencje flankujące geny zaangażowane w translokację [55], [60]. Dane literaturowe określają odsetek przypadków z delecją *ABL1/BCR* w zakresie od 9% do 30% [28], [59], [60], [143], [144]. W grupie badanej obecność submikroskopowej delecji stwierdzono u 9,8% pacjentów, z przewagą przypadków wykazujących utratę całego genu fuzyjnego *ABL1/BCR* na pochodnym chromosomie 9. Wykrycie submikroskopowych delecji w

obrębie *ABL1* i/lub *BCR* było możliwe w rutynowym badaniu FISH, przy użyciu sondy D-*BCR/ABL1*, z równoległą analizą kariotypu. Wykazano, że delecje w regionie genu fuzyjnego *ABL1/BCR* powstają równocześnie z zajściem translokacji t(9;22), a więc są zmianą pierwotną [59], [145]. Badania prowadzone przed erą inhibitorów kinaz tyrozynowych były podstawą kwalifikacji pacjentów z delecją w obrębie der(9) do grupy gorszego rokowania w odniesieniu do pacjentów bez tego typu zaburzenia chromosomowego [59], [60]. Po wprowadzeniu rewolucyjnej terapii mesylanem imatinibu, a następnie leczenia inhibitorami kinaz tyrozynowych kolejnych generacji obserwowano wzrost liczby doniesień literaturowych przedstawiających rozbieżne wyniki. Duża część opublikowanych prac oryginalnych dowodzi braku znaczenia rokowniczego delecji w obrębie der(9) w erze stosowania TKI, podczas gdy druga połowa nadal podtrzymuje gorsze wyniki leczenia w podgrupie pacjentów z opisywaną delecją. Huntly i wsp. [32] przedstawili wyniki 397 pacjentów wśród których u 59 stwierdzono delecję w obrębie der(9). Odsetek uzyskania całkowitej odpowiedzi hematologicznej i całkowitej odpowiedzi cytogenetycznej był niższy u pacjentów z delecją w porównaniu do pacjentów bez delecji. Czas do progresji choroby był krótszy w grupie pacjentów z delecją. Nie obserwowano różnicy w prawdopodobieństwie przeżycia między dwiema grupami. Zbliżone dane uzyskała Pieńkowska-Grela i wsp. [65]. W badanej, 39-osobowej kohorcie obserwowano 10 pacjentów (26%) z delecją w obrębie der(9). Wykazano, że ryzyko progresji cytogenetycznej było ponad dziesięć razy wyższe dla pacjentów z delecją w stosunku do pozostałych pacjentów w badanej próbie otrzymujących imatynib. Z kolei jednym z pierwszych doniesień, które przedstawiło zbliżone wyniki w grupie pacjentów z delecją w obrębie der(9) i bez delecji była praca Quintas-Cardama i wsp. [146]. Autorzy przebadali 352 pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową leczonych imatynibem, u 33 (9%) stwierdzili delecję w obrębie der(9). Nie uzyskano różnic dotyczących czasu uzyskania całkowitej odpowiedzi cytogenetycznej, czasu trwania CCyR czy różnic dotyczących całkowitego przeżycia. Podobne wyniki autorzy otrzymali w odniesieniu do leczenia inhibitorami drugiej generacji [147]. W jednym z ostatnich doniesień Švabek i wsp. [148] zbadali 122 pacjentów z CML leczonych TKI, z których u 20 (16,4%) wykryto delecję w obrębie der(9) i podobnie jak we wcześniejszych badaniach wykazano, że badana delecja nie ma wpływu na rokowanie. Wyniki uzyskane w trakcie analizy pacjentów diagnozowanych i leczonych w Klinice Hematologii w Poznaniu zbliżone są do powyższych badań. Zaobserwowano, że pacjenci z submikroskopową delecją

w obszarze genu fuzyjnego *ABL1/BCR* wykazywali mniejszą liczbę eozynofilii we krwi obwodowej w chwili rozpoznania choroby w odniesieniu do pacjentów bez delecji. W obu grupach dominowali pacjenci z fazą przewlekłą choroby w chwili rozpoznania. Pacjenci uzyskali podobne wyniki odpowiedzi cytogenetycznej i molekularnej w dwóch analizowanych grupach (w grupie pacjenci z delecją *der(9)* lub *der(22)* oraz w grupie pacjenci bez delecji). Interesujące wyniki przedstawił Chandran i wsp. [63] analizując 489 pacjentów na różnych etapach rozwoju przewlekłej białaczki szpikowej. Wyższą częstość delecji zaobserwowano w fazie przełomu blastycznego (41,67%), w fazie akceleracji (36,84%), podczas gdy w fazie przewlekłej odpornej na imatynib oraz w fazie przewlekłej *de novo* odsetek omawianej aberracji był niższy (odpowiednio 23,08% i 16,61%). Pacjenci z delecją w zaawansowanych stadiach choroby wykazywali słabą odpowiedź na zastosowanie imatynibu, natomiast pacjenci we wczesnych stadiach – odpowiadali dobrze. Wyniki sugerują, że delecja *ABL1* i/lub *BCR* może być jednym ze zdarzeń inicjujących progresję choroby. Potwierdzenie tej hipotezy wymaga dalszych badań, szczególnie obejmujących dłuższy okres obserwacji. Metodologicznie trudność może również sprawić zebranie dużej liczby pacjentów w zaawansowanej fazie choroby z delecją w obrębie *der(9)* z uwagi na niższy odsetek pacjentów w fazie kryzy blastycznej/akceleracji w populacji europejskiej, w stosunku na przykład do krajów azjatyckich, zależny od różnego poziomu opieki zdrowotnej na świecie.

Występowanie w karyotypie dodatkowych aberracji chromosomowych w klonie Ph-dodatnim wiąże się z progresją przewlekłej białaczki szpikowej [34], [67], [74], [107], [111]. W chwili rozpoznania przewlekłej białaczki szpikowej 10-12% pacjentów prezentuje dodatkowe aberracje chromosomowe poza chromosomem Ph. Częstość ACA/Ph⁺ wzrasta z fazą zaawansowania choroby do fazy akceleracji (do 30%) i kryzy blastycznej (do 60-80%). W niniejszym badaniu oceniono częstość występowania dodatkowych aberracji chromosomowych w klonie Ph-dodatnim i ich możliwy wpływ na rokowanie. ACA/Ph⁺ wystąpiły u 53/203 pacjentów (26,1%) (41 pacjentów rozpoznanych w CP, ośmiu pacjentów w AP i czterech pacjentów w BP), co stanowiło wyższy odsetek pacjentów z ACA/Ph⁺ niż obserwowano we wcześniejszych opublikowanych danych [34], [67], [136], [149]. W badanej grupie u 11,3% stwierdzono ACA/Ph⁺ w chwili rozpoznania oraz u 14,8% chorych - w trakcie przebiegu choroby. Najczęściej obserwowano trisomię 8 (15/53 chorych; 28,3%).

Porównując grupę pacjentów z dodatkowymi aberracjami chromosomowymi z grupą pacjentów bez takich aberracji stwierdzono podczas diagnozy wyższy odsetek blastów we krwi oraz częściej stwierdzano splenomegalię u pacjentów z ACA/Ph+. Również w tej grupie obserwowano wyższy odsetek pacjentów z wysokim wskaźnikiem ryzyka wg Sokala, Hasforda i ELTS. Więcej pacjentów z ACA/Ph+ rozpoznano z wykładnikami fazy akceleracji/przełomu blastycznego niż w grupie chorych bez dodatkowych aberracji. Niepowodzenie terapii imatynibem stwierdzono u 83% pacjentów z ACA/Ph+ w kariotypie w porównaniu z grupą pacjentów bez ACA/Ph+ w kariotypie, gdzie odsetek wynosił 23,3%. U 11 pacjentów stwierdzono wtórne zmiany chromosomowe obserwowane w trakcie leczenia. Spośród tych aberracji większość miało charakter przejściowy, natomiast siedem aberracji obserwowano częściej niż raz w kariotypie. Częściej ewolucja kariotypu dotyczyła pacjentów, którzy wcześniej prezentowali w kariotypie trisomię 8, izochromom i(17q) i dodatkowy chromosom Ph. Najczęstszą wtórną ACA/Ph+ była trisomia 8, dodatkowy chromosom Ph i monosomia 21. Najczęściej wtórne aberracje chromosomowe obserwowano w trakcie terapii dasatynibem. W grupie wszystkich pacjentów z wtórnymi ACA/Ph+ śmiertelność wyniosła 63,6% (n=7/11).

Miteleman i wsp. podzielili pacjentów z dodatkowymi aberracjami na dwie grupy: z aberracjami typu „major routes” i grupę z aberracjami typu „minor routes” [1], [150]. Aberracje typu „major routes” obejmują +8, +Ph, i(17q) oraz +19 i były związane z negatywnym wpływem na przeżycie [68], [70], [71], [111], [151]. Z kolei aberracje typu „minor routes” nie zostały zbadane w takim samym stopniu, jak aberracje typu „major routes”. Sześć aberracji typu „minor routes”, w tym pięć zmian liczbowych (-7, -17, +17, +21 i -Y) i tylko jedna aberracja strukturalna t(3;21)(q26;q22) zostało początkowo opisanych przez Mitelmana i wsp. [150]. Klasyfikacja aberracji zaproponowana przez Mitelmana i wsp. opierała się o częstość występowania dodatkowych aberracji chromosomowych w klonie Ph-dodatnim.

W badanej grupie pacjentów z ACA/Ph+ częściej obserwowano aberracje typu „minor routes” niż aberracje typu „major routes”. Stwierdzenie ACA/Ph+ wiązało się z istotnie statystycznie krótszym całkowitym przeżyciem w porównaniu z pacjentami bez ACA/Ph+ w kariotypie. Aberracje typu „minor routes” obserwowano w kariotypie wcześniej od momentu rozpoznania choroby w porównaniu z aberracjami typu „major routes” (mediana 0 vs. 42 miesiące). Z tego powodu aberracje typu „major routes” częściej były obserwowane podczas monitorowania terapii. Aberracje typu

„major routes” najczęściej występowały jako jedyne ACA/Ph+. Z kolei występowanie aberracji typu „minor routes” częściej związane było z obecnością kariotypu złożonego. Grupa pacjentów, u których stwierdzono jednocześnie występowanie aberracji typu „major i minor routes” wykazała statystycznie istotne prawdopodobieństwo wystąpienia wykładników fazy przełomu blastycznego w chwili stwierdzenia aberracji w kariotypie w porównaniu do pacjentów z aberracjami wyłącznie typu „major routes” lub „minor routes”. W dużej, niemieckiej grupie pacjentów z CML u 3,6% chorych stwierdzono aberracje typu „major routes” w chwili rozpoznania choroby [34]. Autorzy po medianie obserwacji 5,3 lat przedstawili dane wskazujące na pięcioletnie przeżycie wolne od progresji (PFS) wynoszące 96% i 50% oraz pięcioletnie całkowite przeżycie wynoszące odpowiednio 96% i 53% odpowiednio w grupie pacjentów z aberracjami typu „minor routes” i grupie chorych z aberracjami typu „major routes”. Czas utrzymania CCyR i MMR był dłuższy w grupie pacjentów z aberracjami typu „major routes”. Podobne badanie zostało przeprowadzone przez grupę włoską [136]. ACA/Ph+ stwierdzane w momencie rozpoznania choroby wiązały się z gorszymi wynikami leczenia w zaprezentowanej przez autorów grupie chorych. Aberracje typu „major routes” przeważały u pacjentów z gorszymi wskaźnikami uzyskania CCyR i MMR w stosunku do pacjentów bez ACA/Ph+. Ponadto czas do osiągnięcia CCyR i MMR był znacznie dłuższy w tej grupie chorych. W przeciwieństwie do wyników badania grupy niemieckiej, grupa włoska nie obserwowała różnic pomiędzy grupą pacjentów z ACA/Ph+ i bez ACA/Ph+ pod kątem przeżycia wolnego od progresji oraz całkowitego przeżycia. Niemniej jednak, rekomendacje wskazują aberracje typu „major routes” stwierdzone w chwili rozpoznania choroby jako sygnał ostrzegawczy u pacjentów leczonych TKI w pierwszej linii [35]–[37]. Wykrycie dodatkowych aberracji chromosomowych w klonie Ph-dodatnim jest uważane za jedną z cech akceleracji/przełomu blastycznego choroby, przy czym Światowa Organizacja Zdrowia podkreśla wystąpienie ACA/Ph+ w innym czasie niż rozpoznanie choroby, jako wykładnik ewolucji klonalnej kariotypu [4].

Wang i wsp. ponownie dokonali próby zbadania związku pomiędzy występowaniem ACA/Ph+ u pacjentów z CML a ich wynikami na leczenie TKI [71]. Największy problem z uwagi na liczebność i heterogenność stanowiła grupa pacjentów z aberracjami typu „minor routes”. Wśród 608 pacjentów z CML gorszym przeżyciem charakteryzowali się chorzy z pojawieniem się jednocześnie dwóch lub większej liczby dodatkowych zmian chromosomowych poza Ph. Wśród izolowanych ACA/Ph+

najczęściej stwierdzano +8, -Y, +Ph, i(17)(q10), -7/del(7q) i rearanżację 3q26.2. Wang i wsp. dokonali podziału pacjentów na dwie grupy: pierwsza grupa obejmowała +8, -Y i +Ph ze stosunkowo dobrą odpowiedzią na leczenie i lepszym całkowitym przeżyciem; druga grupa obejmowała i(17)(q10), -7/del(7q) i rearanżację 3q26.2 z stosunkowo słabszą odpowiedzią na leczenie TKI i gorszym przeżyciem. Warto zauważyć, że pacjenci z utratą Y nie wykazywali istotnych różnic dotyczących przeżycia w stosunku do pacjentów bez ACA/Ph+. Czas pojawienia się ACA/Ph+ również został poddany ocenie. W grupie pierwszej tendencje do wyższego odsetka chorych z CCyR i MMR obserwowano u pacjentów z ACA/Ph+ w momencie rozpoznania choroby w porównaniu z pacjentami z ACA/Ph+, które pojawiły się w trakcie leczenia [71]. W naszej grupie pacjentów gorszą odpowiedź na leczenie imatynibem prezentowali pacjenci z ACA/Ph+ obserwowanymi podczas monitorowania leczenia. Odpowiedź na TKI drugiej generacji była porównywalna w grupie chorych z ACA/Ph+ stwierdzonych w czasie rozpoznania i w grupie chorych z ACA/Ph+ stwierdzonych w trakcie leczenia. Nie zaobserwowano różnicy istotnej statystycznie pomiędzy badanymi grupami pacjentów w odniesieniu do całkowitego przeżycia. Zaobserwowano, że faza zaostrzenia choroby stwierdzana podczas rozpoznania statystycznie częściej występowała u pacjentów z kariotypem złożonym. W tej grupie wyższy był również odsetek metafaz z ACA/Ph+.

W poprzednich rekomendacjach European LeukemiaNet [35] obowiązujących ponad sześć lat jedynie aberracje typu „major routes” były uwzględniane jako aberracje związane z gorszym rokowaniem. Aberracje typu „minor routes” nie były wymieniane w grupie złego rokowania. W przedstawionej analizie Wang i wsp. zaobserwowali, że mimo iż trisomia 8 i dodatkowy chromosom Ph zaliczane są do grupy aberracji typu „major routes”, ich występowanie w kariotypie wiązało się z lepszym rokowaniem w stosunku do pacjentów z innymi analizowanymi aberracjami. Najgorszym rokowaniem w badanej grupie charakteryzowały się aberracje chromosomowe obejmujące między innymi rearanżacje genu *MECOM*, *KMT2A*, aberracje chromosomu 7 i należące do grupy aberracji typu „minor routes”. Na podstawie ostatnich badań powyższe aberracje [71]–[73], [151] zostały uwzględnione w najnowszej wersji rekomendacji ELN [36].

Trisomia 8 oraz dodatkowy chromosom Ph to najczęściej występujące dodatkowe aberracje, które wiązały się z relatywnie dobrym rokowaniem w stosunku do innych ACA/Ph+. W innych nowotworach mieloidalnych (AML i MDS) +8 jest również najczęstszą aberracją liczbową i wiąże się z pośrednim rokowaniem [152], [153]. Patomechanizm pojawiania się trisomii 8 nie jest znany. Badania podkreślają

heterogenność genetyczną pacjentów z AML z obecnością w kariotypie +8 i brak korelacji współwystępowania tej aberracji z innym defektem genetycznym [154].

W przeprowadzonym badaniu, analizując częstość występowania poszczególnych ACA/Ph+ najczęściej obserwowano +8, +der(22)t(9;22), a także aberracje zaliczane do „minor routes”: -21 i -Y. Trisomia 8 była również najczęstszą wtórną aberracją pojawiającą się w trakcie leczenia obok dodatkowego chromosomu Ph oraz izochromosomu 17q.

Obecnie trisomia 8, która wcześniej była uważana za zły czynnik prognostyczny w przewlekłej białaczce szpikowej, okazuje się być czynnikiem pośredniego ryzyka, gdy występuje jako jedyna ACA/Ph+ i czynnikiem niekorzystnego ryzyka w połączeniu z innymi aberracjami w kariotypie poza translokacją t(9;22) [71], [75].

Utratę chromosomu Y u mężczyzn wiąże się z wiekiem pacjentów i niejednokrotnie wyklucza się jako ACA/Ph+. W przeprowadzonej analizie utratę Y uwzględniono jako jedną z ACA/Ph+, ponieważ aberracja ta nie występowała u pacjentów po uzyskaniu CCyR, co potwierdza związek -Y z przebiegiem choroby. Chociaż poprzednie badania przedstawiały różne, często skrajne wyniki dla prognostycznego wpływu utraty chromosomu płci Y u pacjentów z CML [34], [155], uważa się, że aberracja nie ma związku z niekorzystnym rokowaniem [78]. W przeprowadzonej analizie utrata Y była najczęściej obserwowana w chwili rozpoznania choroby. U wszystkich pacjentów była stwierdzana w fazie przewlekłej. W stosunku do innych badanych ACA/Ph+, utrata Y nie była związana z niekorzystnym rokowaniem.

Mechanizmy przyczyniające się do gorszej odpowiedzi na terapię TKI i krótsze przeżycie w grupie pacjentów, u których obserwuje się w kariotypie aberracje bardzo wysokiego ryzyka są związane ze zmianami molekularnymi które mogą indukować obecne w kariotypie anomalie chromosomowe. W badanej grupie najgorsze rokowanie wiązało się z występowaniem rearanżacji genu *MECOM*, i(17)(q10), aberracji chromosomu 7, -21, -19.

Rearanżacje w locus 3q26.2 genu *MECOM* indukują nieprawidłową nadekspresję tego onkogenu [156], [157]. Nieprawidłowa ekspresja produktu białkowego genu *MECOM*, poprzez wpływ na czynniki zaangażowane w proliferację i różnicowanie, pobudza leukemogenezę [158]. W AML występowanie rearanżacji genu *MECOM* związane jest z najgorszym przeżyciem wśród pacjentów z aberracjami chromosomowymi [159], [160]. W przypadku MDS wykrycie inv(3)/t(3;3) kwalifikuje

pacjentów do grupy złego rokowania [152]. U wszystkich pacjentów w badanej grupie rearanżacja genu *MECOM* była stwierdzana w fazie przełomu blastycznego.

Niekorzystne rokowanie u pacjentów z izochromosomem i(17)(q10) jest prawdopodobnie związane z delecją *TP53* - genu supresji nowotworowej odgrywającego kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego i procesu apoptozy [161]. Dezaktywacja *TP53* powoduje niestabilność genomową, transformację nowotworową i progresję choroby. Utrata tego genu jest również związana ze złym rokowaniem u pacjentów z AML i MDS [162], [163]. W badanej grupie izochromosom i(17)(q10) nie był obserwowany w chwili rozpoznawania choroby.

Również delecja w obrębie długiego ramienia chromosomu pary 7 oraz monosomia 7 wiąże się z niekorzystnym rokowaniem u chorych z AML oraz należy do grupy złego rokowania również w przypadku pacjentów z MDS [152].

Analizując kariotypy z dodatkowymi aberracjami chromosomowymi w klonie Ph-dodatnim oraz korzystając z danych literaturowych prezentujących klasyfikacje poszczególnych aberracji chromosomowych do grup związanych z określonym ryzykiem transformacji do zaawansowanych faz choroby [182], dokonano podziału wszystkich pacjentów do czterech grup ryzyka. Warto nadmienić, że w grupie pacjentów z ACA/Ph+ w kariotypie dominowali nieznacznie mężczyźni (52,3%), co odzwierciedlało dane w piśmiennictwie. Odsetek mężczyzn w grupie bez ACA/Ph+ był niższy i wynosił 46%. Z kolei w grupie pacjentów z aberracjami bardzo wysokiego ryzyka mężczyźni stanowili 75% wszystkich chorych. W zaproponowanej klasyfikacji pacjentów do poszczególnych grup ryzyka cytogenetycznego obserwowano istotne statystycznie różnice w całkowitym przeżyciu chorych.

Podsumowując, dokonana stratyfikacja pacjentów z CML do czterech grup prognostycznych w zależności od występowania ACA/Ph+ w kariotypie uwzględnia wpływ ACA/Ph+ na odpowiedź na leczenie TKI i całkowite przeżycie chorych w poszczególnych grupach. Zastosowany system klasyfikacji pacjentów do poszczególnych grup ryzyka cytogenetycznego na podstawie aberracji chromosomowych może być przydatny w ustaleniu strategii leczenia i rokowania u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową, u których pojawiają się ACA/Ph+ jako manifestacja ewolucji klonalnej.

W badanej grupie warianty sekwencji aminokwasowej domeny kinazowej BCR-ABL1 zidentyfikowano u 24 pacjentów (11,6%), w tym u ośmiu chorych z ACA/Ph+ (3,9%). Częstość występowania zmian w obrębie KD BCR-ABL1 odpowiada

częstości prezentowanej w literaturze [108]. W badanej grupie najczęściej do zmian sekwencji KD dochodziło w obrębie pętli P oraz w regionie wiązania ATP. Najczęściej stwierdzoną zmianą była: F317L (n=4; 16,7%), następnie M351T, T315I i V299L (n=3; 12,5%). Warianty M351T, F359I i F317L u chorych z ACA/Ph+ stwierdzano najczęściej (wystąpiły dwukrotnie) – obserwowane były podczas ewolucji klonalnej kariotypu (pacjent nr 4, 105, 190, 198).

Meggyesi i wsp. przedstawili badanie, w którym ACA/Ph+ były raportowane wraz z występowaniem zmian KD E255V, T315I, F317L, F359C, F359V i H396R. Co więcej, wykazano, że pojawienie się rearanżacji 3q26.2.2 często koresponowało z obecnością zmian sekwencji KD BCR-ABL1 [68]. Z drugiej strony inne doniesienia wykazały, że ACA/Ph+ i warianty KD współwystępują przypadkowo u pacjentów z CML reprezentując różne mechanizmy oporności na leczenie [105]. Z tego punktu widzenia ACA/Ph+ jak i defekty KD są efektem niestabilności genomowej, a niektóre podtypy mutacji KD BCR-ABL1 częściej koegzystują z ACA/Ph+. W analizowanej grupie aberracje chromosomowe typu „major routes” statystycznie częściej obserwowano u chorych z stwierdzonymi wariantami sekwencji KD BCR-ABL1.

W badanej grupie pacjentów z występowaniem zmian sekwencji KD BCR-ABL1 stwierdzono wyższy odsetek mężczyzn w porównaniu z grupą pacjentów bez wskazań do wykonania badania w kierunku wykrycia mutacji i pacjentów z wskazaniem u których tego typu zmian nie stwierdzono (54,2% vs. 47,5%; brak istotności statystycznej). Ponadto w grupie pacjentów z jednoczesnym występowaniem zmian w obrębie sekwencji KD BCR-ABL1 i ACA/Ph+ odsetek mężczyzn w stosunku do liczby kobiet był jeszcze większy (n=5/8; 62,5%). Podobny rozkład płci obserwowano również w innych badaniach, co wskazuje, że wykrywanie ACA/Ph+ i/lub mutacji KD BCR-ABL1 jest częstsze u mężczyzn [71], [74]. Splenomegalia oraz zwiększona liczba leukocytów w chwili rozpoznania choroby wiązała się z większym prawdopodobieństwem wystąpienia zmian sekwencji KD BCR-ABL1 w trakcie leczenia.

Stwierdzono niski odsetek pacjentów z jednoczesnym występowaniem zmian w obrębie KD BCR-ABL1 oraz ACA/Ph+ w kariotypie. Ponadto krótsze całkowite przeżycie chorych z wariantami KD BCR-ABL1 w porównaniu z grupą pacjentów bez wskazań do wykonania badania mutacji i pacjentów z wskazaniem u których tego typu zmian nie stwierdzono, potwierdziło występowanie wariantów sekwencji KD BCR-ABL1 jako niezależny czynnik prognostyczny.

W badanej grupie u 29% pacjentów obserwowano 90 klonalnych, powtarzających się aberracji chromosomowych w komórkach Ph-ujemnych obserwowanych w kariotypie po medianie czasu wynoszącym 54 miesiące od chwili włączenia terapii TKI. Częstość obserwowanych anomalii chromosomowych wydaje się większa niż częstość prezentowana we wcześniejszych badaniach [67], [77], [164]. Rozbieżność może wynikać z faktu dłuższego czasu obserwacji od włączenia TKI (mediana 74 miesiące; zakres 12-159 miesięcy) oraz uwzględnienia utraty chromosomu płci Y. Duże rozbieżności danych literaturowych dotyczą utraty tego chromosomu, ponieważ udowodniono, że zmiana ta może pojawiać się u starszych pacjentów niezależnie od występowania nowotworu, z drugiej strony aberracja występowała u około 10% pacjentów z różnymi zaburzeniami hematologicznymi [165]. Ponadto wykazywano również negatywny wpływ utraty Y na ryzyko rozwoju nowotworu [166].

Zdecydowaną większość zaburzeń cytogenetycznych stanowiły aberracje liczbowe – głównie aneuploidie chromosomów autosomalnych. Najczęściej obserwowano monosomię 21, 22 i 19 oraz utratę chromosomu płci Y. Często obserwowano również trisomię 8. Częstość występowania +8 i -Y była zgodna z wcześniejszymi badaniami [79], [80], [139], natomiast częściej w badanej grupie stwierdzano utraty chromosomów z grupy F i G.

Aberracje strukturalne, w tym translokacje stwierdzono w dwóch przypadkach: t(3;9)(p12;q21) oraz t(8?;11)(q?13;q22). Co ciekawe u pacjenta nr 174 translokacja t(8?;11)(q?13;q22) wiązała się z rearanżacją genu *ATM* i kliniczną manifestacją przewlekłej białaczki limfocytowej po dziewięciu latach leczenia imatynibem przewlekłej białaczki szpikowej. Aberrację obserwowano w jednej metafazie na 29 analizowanych, natomiast rearanżację *ATM* potwierdzono badaniem FISH w 72% komórkach nieproliferujących szpiku kostnego [168]. Badanie retrospektywne próbek szpiku kostnego wcześniej przesłanych w ramach monitorowania terapii TKI wykazało, że rearanżacja była obecna rok przed manifestacją kliniczną przewlekłej białaczki limfocytowej, a po zastosowaniu sterydów - uległa eliminacji.

Większość badań wykazywało, przejściową obecność CCA/Ph- [67], [77], [164]. Powtarzanie się tych samych zmian w kariotypie udokumentowano u mniej niż 30% pacjentów [82], [167]. W badanej grupie wyodrębniono wyłącznie pacjentów z klonalnymi aberracjami, powtarzającymi się przynajmniej dwukrotnie w kariotypie podczas monitorowania terapii TKI. W przeprowadzonej analizie aberracje chromosomowe najczęściej występowały w niewielkim odsetku metafaz (10-30%),

co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi. W badanej grupie częściej CCA/Ph- występowały u mężczyzn. Występowanie transkryptu e14a2 istotnie częściej obserwowano u chorych z CCA/Ph- w kariotypie, natomiast e13a2 – częściej u chorych z kariotypem prawidłowym.

Znaczenie prognostyczne CCA/Ph- nie jest jasne. Większość doniesień wykazała, że obecność CCA/Ph- nie ma negatywnego wpływu na uzyskane długoterminowe wyniki odpowiedzi na leczenie TKI oraz całkowite przeżycie pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową [80], [164], [169]. Issa i wsp. wykazali, że po wykluczeniu pacjentów z utratą chromosomu Y, u pacjentów z CCA/Ph- stwierdzono krótsze przeżycie i zwiększone ryzyko rozwoju MDS lub AML [78]. Przeciwnie do tych doniesień w badanej grupie pacjentów nie wykazano negatywnego wpływu występowania aberracji chromosomowych w komórkach Ph-ujemnych na odpowiedź na zastosowane leczenie, co jest zgodne z rekomendacjami ELN oraz NCCN [35], [36], [81]. Jedynie rzadkie przypadki związane z mielodysplazją oraz aberracjami typowymi dla przebiegu zespołów mielodysplastycznych [-7/del(7q)] w komórkach Ph-ujemnych jest czynnikiem ewolucji choroby do MDS lub sAML [170]. Groves i wsp. przedstawili 16 spośród 51 pacjentów (31,3%) z aberracjami w komórkach Ph-ujemnych prezentujących -7 bądź del(7q) podczas terapii TKI, którzy po około sześciu miesiącach transformowali z CML do MDS/sAML [82]. Ponadto opisywano przypadki pacjentów z aberracjami chromosomowymi z zaangażowaniem regionu 3q26.2 (locus genu *MECOM*) w metafazach Ph-ujemnych podczas leczenia TKI, które to aberracje również wiązały się z pojawieniem MDS lub wtórnej ostrej białaczki [171], [172]. W badanej grupie nie obserwowano pacjentów z -7/del(7q) bądź rearanżacją 3q26.2 w komórkach Ph-ujemnych. Dokładne mechanizmy prowadzące do rozwoju klonalnych nieprawidłowości chromosomowych w komórkach Ph-ujemnych nie są znane. Zaproponowano kilka hipotez, jedna z nich zakłada indukowanie zmian chromosomowych działaniem inhibitorów kinaz tyrozynowych [173]. Jednak wcześniejsze badania wykonane przed erą stosowania TKI dowodzą, że tego rodzaju aberracje obserwowano również u pacjentów leczonych interferonem, co jednocześnie wskazuje na brak związku pomiędzy występowaniem CCA/Ph- a zastosowaniem TKI. Inna hipoteza zakłada zmniejszenie odsetka metafaz z klonem Ph-dodatnim na skutek działania TKI z jednoczesnym pobudzeniem nieprawidłowej klonalnej hematopoezy i w rezultacie pojawieniem się komórek bez chromosomu Ph z innymi aberracjami [173]. Ekspresja izoenzymu dehydrogenazy

glukozy-6-fosforanowej w Ph-ujemnych limfocytach B transformowanych wirusem EBV wykazała fenotyp komórek Ph-dodatnich typowych dla CML, sugerując, że klonalna hematopoeza poprzedza nabycie chromosomu Ph. W myśl tej hipotezy chromosom Ph byłby zdarzeniem wtórnym, przynajmniej u niektórych pacjentów [174]. Ostatnie badania genomowe wykazały, że klony Ph⁺ i Ph⁻ mogą zarówno pochodzić ze wspólnej komórki progenitorowej, poprzedzonej nabyciem *BCR/ABL1* [175], bądź powstawać niezależnie [176]. W trakcie rozwoju białaczki klon z translokacją t(9;22) uzyskuje korzyść proliferacyjną, maskując jednocześnie leżącą u podstaw różnorodność klonalną. Leczenie za pomocą TKI hamuje proliferację komórek Ph-dodatnich, co pozwala na pojawienie się innych nieprawidłowych klonów. Trzecia hipoteza sugeruje, że Ph-ujemne komórki z aberracjami chromosomowymi pojawiające się po długotrwałej optymalnej odpowiedzi na leczenie TKI mogą pochodzić z komórek, w których znacznemu skróceniu mogły ulec telomery [177]. Skracanie telomerów może być spowodowane długotrwałym współistnieniem hematopoezy prawidłowej z nowotworową, wysiłkiem proliferacyjnym związanym z ponownym zasiedlaniem nisz szpiku kostnego po usunięciu komórek Ph-dodatnich oraz farmakologicznym hamowaniem telomerazy poprzez zastosowanie TKI [177]. Skrócone telomery mogą prowadzić do niestabilności genomu oraz pojawiania się klonalnych aberracji chromosomowych. Badania z wykorzystaniem głębokiego sekwencjonowania celowanego na próbkach od pacjentów z CML wykazały różnorodne wzorce nabywania wariantów sekwencji. Podczas gdy u części pacjentów stwierdzano zmiany przed rozwojem nowotworu, inni pacjenci nabywali nowe defekty podczas leczenia TKI [170].

Związek pomiędzy aberracjami w klonie Ph-dodatnim i w komórkach Ph-ujemnych zaprezentował Bacher i wsp. [178]. U sześciu spośród 16 (38%) chorych z aberracjami w komórkach Ph-ujemnych Bacher i wsp. zaobserwowali klonalną ewolucję kariotypu w komórkach Ph-dodatnich podczas leczenia imatynibem lub interferonem. Warto podkreślić, że u pięciu pacjentów (31%) Bacher i wsp. obserwowali ewolucję klonalną kariotypu zarówno w komórkach Ph-dodatnich i Ph-ujemnych, przy czym początkowo aberracje występowały w komórkach Ph-ujemnych.

W badanej grupie pacjentów z CCA/Ph⁻ wykazano wyższą częstość występowania ACA/Ph⁺ (n=12/47) w porównaniu z pacjentami bez CCA/Ph⁻ (n=13/115; 25,5% vs. 11,3%; p=0,03). U trzech pacjentek (nr 10, 12, 162) aberracje występujące

w klonie Ph-dodatnim były obserwowane również w komórkach Ph-ujemnych po eliminacji klonu komórek z chromosomem Ph. Współwystępowanie tej samej aberracji chromosomowej w komórkach Ph-dodatnich i Ph-ujemnych może wskazywać, że obserwowane zaburzenia chromosomowe pochodzą z różnych klonalnych hematopoetycznych komórek progenitorowych. Trisomię 8 u pacjentek nr 10 i 162 początkowo obserwowano w komórkach Ph-dodatnich, następnie po uzyskaniu remisji cytogenetycznej – w komórkach Ph-ujemnych. Identyczna sytuacja dotyczyła pacjentki nr 12 z translokacją t(3;9)(p12;q21). Wykrycie trisomii 8, szczególnie w komórkach Ph-ujemnych szpiku kostnego może także wynikać z obecności zespołu Warkany’ego u pacjenta. Jest to bardzo rzadko występujący zespół genetyczny w którym trisomia 8 jest aberracją konstytutywną, obecną w formie mozaikowej [180]. Przyczyną choroby jest najczęściej postzygotyczna nondysjunkcja mitotyczna powstająca *de novo*. Wraz z wiekiem obserwuje się zanik komórek trisomicznych w limfocytach z uwagi na selektywną przewagę komórek bez aberracji [181].

Wcześniejsze badania ujawniły, że nie było znaczącej różnicy w odpowiedzi na leczenie TKI między pacjentami z CCA/Ph- i bez tego rodzaju aberracji [78]. W badanej grupie 47 pacjentów u 26 chorych (55,3%) obserwowano jeden rodzaj aberracji powtarzający się podczas obserwacji. U 10 pacjentów (21,3%) obserwowano dwa rodzaje aberracji, natomiast u sześciu chorych (12,8%) trzy różne rodzaje aberracji w komórkach Ph-ujemnych. U pozostałych pięciu pacjentów (10,6%) stwierdzono powyżej trzech aberracji: siedem różnych aberracji u pacjenta nr 20, po pięć aberracji u pacjenta nr 16, 23 i 38 oraz cztery aberracje u pacjentki nr 189. Nie wykazano związku pomiędzy liczbą aberracji w komórkach Ph-ujemnych, a gorszą odpowiedzią na zastosowane leczenie. Wśród sześciu pacjentów, którzy w ostatnim badaniu ilościowym transkryptu *BCR-ABL1* nie uzyskali MMR w pięciu przypadkach stwierdzono pojedyncze, klonalne, powtarzające się aberracje. W jednym przypadku – dwie aberracje. Najczęściej stwierdzano trisomię 8 (u trzech chorych). Warto zaznaczyć, że w badanej grupie trisomię 8 obserwowano u sześciu pacjentów w komórkach Ph-ujemnych, przy czym trzech z nich nie uzyskało MMR. Obecność tej zmiany chromosomowej w komórkach Ph-ujemnych może wiązać się z nieuzyskaniem głębokiej odpowiedzi molekularnej.

Analiza chorych pod kątem klonalnych, powtarzających się aberracji chromosomowych w komórkach Ph-ujemnych u pacjentów z CML leczonych TKI wykazała najczęstsze występowanie monosomii 21, 22, 19, utraty chromosomu płci Y

oraz trisomii 8. Obecność CCA/Ph- w większości przypadków nie miała wpływu na uzyskanie głębokiej odpowiedzi molekularnej, za wyjątkiem występowania trisomii 8. U 74,4% pacjentów z CCA/Ph- stwierdzono głęboką odpowiedź molekularną. Występowanie CCA/Ph- nie wpływało niekorzystnie na całkowite przeżycie chorych w odniesieniu do pacjentów bez CCA/Ph- w karyotypie. Różnorodność aberracji chromosomowych, szczególnie aneuploidii sugeruje, że pacjenci z przewlekłą białaczką szpikową z CCA/Ph- mogą reprezentować szerokie spektrum heterogennych zmian genetycznych. Potrzebne są dodatkowe badania w celu zdefiniowania molekularnych uwarunkowań i długoterminowych implikacji tego zjawiska. Dalsza analiza pacjentów z CML prezentujących CCA/Ph-, szczególnie z nieoptymalną odpowiedzią na leczenie TKI może pomóc ujawnić więcej molekularnych mechanizmów oporności na TKI.

Pomimo rosnącego znaczenia technik molekularnych (jakościowa i ilościowa PCR z odwrotną transkrypcją, emulsyjny PCR, sekwencjonowanie następnej generacji), zastosowanie technik cytogenetycznych jest nadal użyteczne z uwagi na możliwość wykrycia innych aberracji chromosomowych poza klasyczną translokacją przy relatywnie niskich kosztach badań. Każdy hematolog powinien pamiętać o równoległej ocenie molekularnej oraz cytogenetycznej w chwili diagnozowania pacjenta oraz w trakcie monitorowania odpowiedzi na leczenie TKI, szczególnie w sytuacjach braku odpowiedzi na zastosowaną terapię. Badanie cytogenetyczne musi być również przeprowadzone, w połączeniu z molekularną oceną ilościową transkryptu *BCR-ABL1* i analizą wariantów sekwencji KD *BCR-ABL1*, każdorazowo, gdy pacjent rozwinie oporność na TKI w celu oceny występowania klonalnej ewolucji karyotypu.

Wydaje się, że w dobie prób odstawienia leczenia TKI u pacjentów, którzy uzyskali i utrzymują głęboką odpowiedź molekularną badania cytogenetyczne będą traciły na znaczeniu. W momencie rozpoznania oraz po trzech miesiącach terapii, analiza karyotypu będzie nadal badaniem niezbędnym, natomiast po osiągnięciu MMR prym będą wiodły techniki wyższej czułości w celu lepszej stratyfikacji pacjentów w odniesieniu do poziomu odpowiedzi na leczenie. Ponadto w przypadku przerwania leczenia TKI monitorowanie poziomu transkryptu musi zawsze być wykonywane technikami molekularnymi, ponieważ nawet niewielkie fluktuacje w ilości transkryptu mogą wiązać się z ponownym włączeniem leczenia TKI. Z drugiej jednak strony, w przypadku utraty odpowiedzi podczas prób odstawienia TKI i wzrostu transkryptu powyżej 1%, ponowne badanie karyotypu w celu oceny ewentualnych dodatkowych aberracji chromosomowych wydaje się zasadne.

7. WNIOSKI

I.

Częstość występowania aberracji chromosomowych prowadzących do powstania fuzji genowej *BCR-ABL1* (translokacji klasycznej, translokacji wariantowej i tzw. „zamaskowanego” chromosomu Philadelphia) w badanej grupie pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową jest zbliżona do częstości opisywanej w dostępnym piśmiennictwie.

Najczęściej obserwuje się:

- submikroskopową delecję w obrębie chromosomu pochodnego pary 9 [der(9)t(9;22)(q34;q11.2)];
- dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie Ph-dodatnim typu „major routes” w przebiegu monitorowania terapii inhibitorami kinaz tyrozynowych;
- aberracje typu „major routes” jako jedną dodatkową aberracją chromosomową w kariotypie;
- aberracje typu „minor routes” u pacjentów z kariotypem złożonym.

II.

Wtórne dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie Ph-dodatnim potwierdzają występowanie zjawiska ewolucji klonalnej kariotypu u około 5% chorych w trakcie terapii inhibitorami kinaz tyrozynowych wskazując na niekorzystny przebieg choroby i tym samym potrzebę wnikliwego monitorowania terapii w tej grupie pacjentów metodami cytogenetyki klasycznej.

III.

Stratyfikacja pacjentów do czterech grup ryzyka cytogenetycznego (bardzo wysokiego, wysokiego, pośredniego i standardowego) umożliwia przewidywanie prawdopodobieństwa uzyskania optymalnej odpowiedzi na zastosowane leczenie inhibitorami kinaz tyrozynowych u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową.

IV.

Warianty sekwencji domeny kinazowej *BCR-ABL1* współwystępują najczęściej z aberracjami typu „major routes” i wydają się być niekorzystnym czynnikiem prognostycznym niezależnym od występowania dodatkowych aberracji chromosomowych w klonie Ph-dodatnim.

V.

Występuje zależność pomiędzy wybranymi parametrami kliniczno-laboratoryjnymi w chwili rozpoznania choroby (splenomegalia, liczba leukocytów, eozynofilia, odsetek blastów we krwi obwodowej, faza choroby, płeć) a częstością występowania określonych aberracji chromosomowych.

Wyniki niniejszej pracy wskazują, iż w dobie stosowania inhibitorów kinaz tyrozynowych nadal istnieje potrzeba monitorowania terapii z użyciem metod cytogenetycznych.

8. STRESZCZENIE

Przewlekła białaczka szpikowa była pierwszym nowotworem układu krwiotwórczego w którym scharakteryzowano podłoże genetyczne, co zrewolucjonizowało diagnostykę oraz przyczyniło się do rozwoju terapii ukierunkowanej w postaci wprowadzenia do leczenia inhibitorów kinaz tyrozynowych. Mimo występowania u większości pacjentów klasycznej translokacji t(9;22)(q34;q11.2), obserwuje się również inne aberracje chromosomowe powodujące powstanie fuzji genowej *BCR/ABL1* na chromosomie 22 zaangażowanym w aberrację (zwanym chromosomem Philadelphia; Ph). Poza tym obserwuje się dodatkowe zmiany genetyczne w klonie Ph-dodatnim oraz w komórkach Ph-ujemnych które mogą wpływać na uzyskanie odpowiedzi optymalnej na zastosowane leczenie.

W niniejszej rozprawie doktorskiej scharakteryzowano aberracje chromosomowe u 215 chorych z rozpoznaną przewlekłą białaczką szpikową leczonych inhibitorami kinaz tyrozynowych. Wyodrębniono grupę pacjentów z klasyczną translokacją t(9;22), z translokacją wariantową, z kariotypem Ph-ujemnym/*BCR-ABL1*-dodatnim oraz z zamaskowanym chromosomem Ph. Dokonano analizy występowania delecji *BCR* lub/i *ABL1* z chromosomów objętych translokacją, a także wariantów sekwencji domeny kinazowej *BCR-ABL1*.

Ocenie poddane zostały dodatkowe aberracje chromosomowe występujące w klonie Ph-dodatnim zarówno w momencie rozpoznania choroby, a także w trakcie terapii inhibitorami kinaz tyrozynowych. W trakcie monitorowania terapii oceniono występowanie zmian chromosomowych w komórkach Ph-ujemnych. Przeanalizowano wpływ występowania dodatkowych aberracji chromosomowych na uzyskaną odpowiedź na zastosowane leczenie oraz prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia.

Częstość występowania aberracji chromosomowych prowadzących do powstania fuzji genowej *BCR-ABL1* w badanej grupie pacjentów była zbliżona do częstości opisywanej w dostępnym piśmiennictwie. Jednoczesna ocena kariotypu wraz z analizą FISH umożliwia wskazanie potencjalnego mechanizmu powstania translokacji wariantowej. Technika FISH pozwala stwierdzić rearanżację genów *BCR* i *ABL1*, ich lokalizację, a także wykrycie delecji i dodatkowych zmian chromosomowych w obrębie badanych loci, co może mieć znaczenie dla interpretacji przebiegu klinicznego i rokowania pacjenta.

W przeprowadzonym badaniu u 26,1% chorych obserwowano dodatkowe aberracje chromosomowe w klonie Ph-dodatnim (ACA/Ph+), w tym najczęściej stwierdzano +8. Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia w grupie chorych z ACA/Ph+ było krótsze w porównaniu do grupy bez tego typu aberracji w kariotypie. Wykładnikiem ewolucji klonalnej kariotypu w badanej grupie chorych były wtórne dodatkowe zmiany chromosomowe najczęściej obserwowane w trakcie terapii dazatynibem.

Analizowano czas stwierdzenia dodatkowych zmian chromosomowych, ich liczbę oraz rodzaj. Uwzględniono również klasyfikację opartą na częstości występowania tych aberracji oraz ryzyko progresji do zaawansowanych faz choroby. Częściej obserwowano aberracje typu „minor routes” niż aberracje typu „major routes”. Z kolei aberracje typu „major routes” najczęściej występowały jako jedyne ACA/Ph+, a aberracje typu „minor routes” częściej związane były z kariotypem złożonym. Wykazano współwystępowanie aberracji typu „major routes” z wariantami sekwencji domeny kinazowej BCR-ABL1.

Dokonano podziału pacjentów z ACA/Ph+ do czterech grup ryzyka cytogenetycznego: bardzo wysokiego, wysokiego, pośredniego i standardowego ryzyka. W grupie pacjentów z aberracjami bardzo wysokiego ryzyka dominowali mężczyźni. Obserwowano istotne statystycznie różnice w prawdopodobieństwie całkowitego przeżycia chorych zakwalifikowanych do poszczególnych grup ryzyka cytogenetycznego. Powyższy wynik wskazuje na możliwość wykorzystania zaproponowanej klasyfikacji do przewidywania prawdopodobieństwa uzyskania optymalnej odpowiedzi na zastosowane leczenie inhibitorami kinaz tyrozynowych u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową.

W badanej grupie u 29% pacjentów obserwowano klonalne, powtarzające się aberracje chromosomowe w komórkach Ph-ujemnych (CCA/Ph-). Zdecydowaną większość zaburzeń cytogenetycznych stanowiły monosomie: 21, 22 i 19 oraz -Y. Często obserwowano również +8. Obserwowane CCA/Ph- najczęściej występowały w niewielkim odsetku metafaz (10-30%). CCA/Ph- częściej występowały u mężczyzn oraz u chorych z transkryptem e14a2. Obecność CCA/Ph- nie miała wpływu na uzyskanie głębokiej odpowiedzi molekularnej, za wyjątkiem występowania trisomii 8.

Przeprowadzone badania wykazały zależność pomiędzy wybranymi parametrami kliniczno-laboratoryjnymi ocenionymi w momencie rozpoznania choroby a występowaniem określonych aberracji chromosomowych.

Wyniki niniejszej pracy potwierdziły potrzebę wykorzystywania metod cytogenetycznych w diagnostyce i monitorowaniu pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową w dobie stosowania inhibitorów kinaz tyrozynowych.

9. SUMMARY

Chronic myeloid leukemia is the first human neoplasm with established genetic pathomechanism. This revolutionized diagnostics and contributed to the development of targeted therapy by introducing tyrosine kinase inhibitors to the treatment. Although the classical translocation $t(9;22)(q34;q11.2)$ is present in most patients, other chromosomal aberrations are also observed. All these alterations result in the formation of the *BCR/ABL1* fusion gene on chromosome 22 called the Philadelphia chromosome (Ph). Besides, additional genetic abnormalities are observed in the Ph-positive and Ph-negative cells, which may affect the optimal response to the applied treatment.

In the present dissertation, chromosomal aberrations in 215 patients diagnosed with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors were described. Four group of patients were distinguished: 1) with the classical translocation $t(9;22)$, 2) with a variant translocation, 3) with a Ph-negative/*BCR-ABL1*-positive karyotype, and 4) with a masked Ph chromosome. The occurrence of *BCR* and/or *ABL1* deletions from derivative chromosomes was analyzed, as well as sequence variants of the *BCR-ABL1* kinase domain.

Additional chromosomal aberrations occurring in the Ph-positive clone at the stage of disease diagnosis and during therapy with tyrosine kinase inhibitors were assessed. The presence of chromosomal changes in Ph-negative cells during the therapy was monitored. The influence of the presence of additional chromosomal aberrations on the obtained response to the applied treatment and the probability of overall survival were analyzed.

The frequency of chromosomal aberrations leading to the formation of the *BCR-ABL1* gene fusion in the studied group of patients was similar to the frequency described in the available literature. Simultaneous evaluation of the karyotype together with the FISH analysis enable the identification of a potential mechanism for the emergence of a variant translocation. The FISH technique allows the identification of the rearrangement of the *BCR* and *ABL1* genes, their localization, as well as the detection of deletions and additional chromosomal changes within the studied loci, which may be important for the interpretation of the clinical course and patient prognosis. In the current study, additional chromosomal aberrations in the Ph-positive clone (ACA/Ph+) were observed in 26.1% of patients, with the most common of trisomy 8.

The probability of overall survival in the group of patients with ACA/Ph+ was lower compared to the group without ACA/Ph+. The clonal karyotype evolution observed as secondary additional chromosomal changes was most often noted during dasatinib therapy.

The time of finding additional chromosomal changes, their number, and type were analyzed. A classification based on the frequency of these aberrations and the risk of progression to advanced stages of the disease were also included. Minor routes aberrations were observed more often than major routes. On the other hand, the major routes aberrations were observed most often as the only ACA/Ph+, while the minor routes aberrations were more often associated with the complex karyotype. The coexistence of major routes aberrations with sequence variants of the BCR-ABL1 kinase domain was demonstrated.

Patients with ACA/Ph+ were divided into four cytogenetic risk groups: very high, high, intermediate, and standard risk. The group of patients with very high-risk aberrations was dominated in males. Statistically significant differences were observed concerning the probability of the overall survival of patients assigned to particular cytogenetic risk groups. This result indicates the possibility of using the proposed classification to predict the probability of obtaining an optimal response to the treatment with tyrosine kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia.

In the study group, 29% of patients had clonal, repeated chromosomal aberrations in Ph-negative cells (CCA/Ph-). The vast majority of cytogenetic disorders were monosomes: 21, 22, 19, and -Y. Trisomy 8 was also frequently observed. The observed CCA/Ph- most often occurred in a small percentage of metaphases (10-30%). CCA/Ph- were more common in males and patients with the e14a2 transcript. The presence of CCA/Ph- did not affect obtaining of deep molecular response, except for the presence of trisomy 8.

The conducted studies showed a relationship between selected clinical and laboratory parameters assessed at the stage of diagnosing the disease and the occurrence of specific chromosomal aberrations.

This study further confirmed the effectiveness of cytogenetic methods in diagnosing and monitoring of patients with chronic myeloid leukemia in the era of using tyrosine kinase inhibitors.

10. PIŚMIENNICTWO

- [1] S. Heim, F. Mitelman, „Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells, 4th Edition Wiley”, *Wiley.com*. <https://www.wiley.com/enus/Cancer+Cytogenetics%3A+Chromosomal+and+Molecular+Genetic+Aberrations+of+Tumor+Cells%2C+4th+Edition-p-9781118795538> (udostępniono mar. 02, 2020).
- [2] I. Hus, A. Dmoszyńska, T. Robak, „Podstawy hematologii - Czelej”. <https://www.medbook.com.pl/ksiazka/pokaz/id/16481/tytul/podstawy-hematologii-hus-dmoszynska-robak-czelej> (udostępniono mar. 14, 2020).
- [3] S.H. Sverdlow, E. Campo, N.L. Harris, *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC Press, 2008.
- [4] S. H. Swerdlow i wsp., „WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (Revised 4th edition)”, *IARC: Lyon*, t. 421, 2017.
- [5] B. Hu, B. N. Savani, „Impact of risk score calculations in choosing front-line tyrosine kinase inhibitors for patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in the chronic phase”, *Eur. J. Haematol.*, t. 93, nr 3, s. 179–186, wrz. 2014, doi: 10.1111/ejh.12356.
- [6] J. Hasford i wsp., „Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score”, *Blood*, t. 118, nr 3, s. 686–692, lip. 2011, doi: 10.1182/blood-2010-12-319038.
- [7] M. Pfirrmann i wsp., „Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia”, *Leukemia*, t. 30, nr 1, s. 48–56, sty. 2016, doi: 10.1038/leu.2015.261.
- [8] A. S. Advani, A. M. Pendergast, „Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects”, *Leuk. Res.*, t. 26, nr 8, s. 713–720, sie. 2002, doi: 10.1016/s0145-2126(01)00197-7.
- [9] M. W. Wagner i wsp., „Role of c-Abl kinase in DNA mismatch repair-dependent G2 cell cycle checkpoint arrest responses”, *J. Biol. Chem.*, t. 283, nr 31, s. 21382–21393, sie. 2008, doi: 10.1074/jbc.M709953200.
- [10] S. Dhut i wsp., „Identification of two normal bcr gene products in the cytoplasm”, *Oncogene*, t. 3, nr 5, s. 561–566, lis. 1988.

- [11] M. Wetzler *i wsp.*, „Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation”, *J. Clwsp. Invest.*, t. 92, nr 4, s. 1925–1939, paź. 1993, doi: 10.1172/JCI116786.
- [12] R. Kurzrock *i wsp.*, „Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics”, *Ann. Intern. Med.*, t. 138, nr 10, s. 819–830, maj 2003, doi: 10.7326/0003-4819-138-10-200305200-00010.
- [13] M. Wetzler *i wsp.*, „Cell cycle-related shifts in subcellular localization of BCR: association with mitotic chromosomes and with heterochromatin”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, t. 92, nr 8, s. 3488–3492, kwi. 1995, doi: 10.1073/pnas.92.8.3488.
- [14] M. W. Deininger, J. M. Goldman, J. V. Melo, „The molecular biology of chronic myeloid leukemia”, *Blood*, t. 96, nr 10, s. 3343–3356, lis. 2000.
- [15] C. Gambacorti-Passerini *i wsp.*, „Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis”, *Blood Cells Mol. Dis.*, t. 23, nr 3, s. 380–394, grudz. 1997, doi: 10.1006/bcmd.1997.0155.
- [16] A. Pierce *i wsp.*, „Bcr-Abl protein tyrosine kinase activity induces a loss of p53 protein that mediates a delay in myeloid differentiation”, *Oncogene*, t. 19, nr 48, s. 5487–5497, lis. 2000, doi: 10.1038/sj.onc.1203940.
- [17] A. Di Bacco *i wsp.*, „Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis”, *Oncologist*, t. 5, nr 5, s. 405–415, 2000, doi: 10.1634/theoncologist.5-5-405.
- [18] A. S. Shet, B. N. Jahagirdar, C. M. Verfaillie, „Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression”, *Leukemia*, t. 16, nr 8, s. 1402–1411, sie. 2002, doi: 10.1038/sj.leu.2402577.
- [19] J. R. McWhirter, J. Y. Wang, „An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias”, *EMBO J.*, t. 12, nr 4, s. 1533–1546, kwi. 1993.
- [20] L. Hazlehurst *i wsp.*, „Signaling Networks Associated with BCR–ABL–Dependent Transformation”, *Cancer control: journal of the Moffitt Cancer Center*, t. 16, s. 100–7, maj 2009, doi: 10.1177/107327480901600202.
- [21] A. S. Gillings *i wsp.*, „Apoptosis and autophagy: BIM as a mediator of tumour cell death in response to oncogene-targeted therapeutics”, *The FEBS Journal*, t. 276, nr 21, s. 6050–6062, 2009, doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07329.x.

- [22] J. D. Rowley, „A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining”, *Nature*, t. 243, nr 5405, s. 290–293, cze. 1973, doi: 10.1038/243290a0.
- [23] J. V. Melo, „The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype”, *Blood*, t. 88, nr 7, s. 2375–2384, paź. 1996.
- [24] H. Neves i wsp., „The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARalpha genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation”, *Blood*, t. 93, nr 4, s. 1197–1207, luty 1999.
- [25] S. Mai, „The three-dimensional cancer nucleus”, *Genes, Chromosomes and Cancer*, t. 58, nr 7, s. 462–473, 2019, doi: 10.1002/gcc.22720.
- [26] „Mitelman Database Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer”. <https://mitelmandatabase.isb-cgc.org/> (udostępniono mar. 16, 2020).
- [27] S. Naumann, H. J. Decker, „Genesis of variant Philadelphia chromosome translocations in chronic myelocytic leukemia”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, t. 147, nr 1, s. 18–22, lis. 2003, doi: 10.1016/s0165-4608(03)00128-6.
- [28] M. Gorusu i wsp., „On the genesis and prognosis of variant translocations in chronic myeloid leukemia”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, t. 173, nr 2, s. 97–106, mar. 2007, doi: 10.1016/j.cancergencyto.2006.10.006.
- [29] S. Richebourg i wsp., „Mechanisms of genesis of variant translocation in chronic myeloid leukemia are not correlated with ABL1 or BCR deletion status or response to imatinib therapy”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, t. 182, nr 2, s. 95–102, kwi. 2008, doi: 10.1016/j.cancergencyto.2008.01.005.
- [30] J. L. Huret, „Complex translocations, simple variant translocations and Ph-negative cases in chronic myelogenous leukaemia”, *Hum. Genet.*, t. 85, nr 6, s. 565–568, paź. 1990, doi: 10.1007/bf00193575.
- [31] F. Stagno i wsp., „Influence of complex variant chromosomal translocations in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors”, *Acta Oncol*, t. 49, nr 4, s. 506–508, maj 2010, doi: 10.3109/02841861003660031.
- [32] B. J. P. Huntly i wsp., „Imatinib improves but may not fully reverse the poor prognosis of patients with CML with derivative chromosome 9 deletions”, *Blood*, t. 102, nr 6, s. 2205–2212, wrz. 2003, doi: 10.1182/blood-2002-09-2763.
- [33] G. Marzocchi i wsp., „Variant Philadelphia translocations: molecular-cytogenetic characterization and prognostic influence on frontline imatinib therapy, a

- GIMEMA Working Party on CML analysis”, *Blood*, t. 117, nr 25, s. 6793–6800, cze. 2011, doi: 10.1182/blood-2011-01-328294.
- [34] A. Fabarius *i* wsp., „Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation of 1151 patients from the randomized CML Study IV”, *Blood*, t. 118, nr 26, s. 6760–6768, grudz. 2011, doi: 10.1182/blood-2011-08-373902.
- [35] M. Baccarani *i* wsp., „European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013”, *Blood*, t. 122, nr 6, s. 872–884, sie. 2013, doi: 10.1182/blood-2013-05-501569.
- [36] A. Hochhaus *i* wsp., „European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia”, *Leukemia*, mar. 2020, doi: 10.1038/s41375-020-0776-2.
- [37] T. Sacha *i* wsp., „Rekomendacje PALG dotyczące diagnostyki i leczenia przewlekłej białaczki szpikowej w 2013 r.”, *Acta Haematologica Polonica*, t. 44, nr 4, s. 345–362, paź. 2013, doi: 10.1016/j.achaem.2013.07.008.
- [38] R. S. Verma, P. Chandra, „Clinical significance of reverse BCR/ABL gene rearrangement in Ph-negative chronic myelogenous leukemia”, *Leuk. Res.*, t. 24, nr 7, s. 631–635, lip. 2000, doi: 10.1016/s0145-2126(00)00034-5.
- [39] N. Takahashi *i* wsp., „Duplication of chromosome 9 carrying a BCR/ABL chimeric gene in Philadelphia chromosome negative chronic myeloid leukemia”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, t. 89, nr 2, s. 166–169, lip. 1996, doi: 10.1016/0165-4608(96)00039-8.
- [40] A. Hagemeijer *i* wsp., „Translocation of BCR to chromosome 9: a new cytogenetic variant detected by FISH in two Ph-negative, BCR-positive patients with chronic myeloid leukemia”, *Genes Chromosomes Cancer*, t. 8, nr 4, s. 237–245, grudz. 1993, doi: 10.1002/gcc.2870080406.
- [41] S. Haigh, G. Cuthbert, „Fluorescence in situ hybridization characterization of different cryptic BCR-ABL rearrangements in chronic myeloid leukemia”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, t. 155, nr 2, s. 132–137, grudz. 2004, doi: 10.1016/j.cancergencyto.2004.02.026.
- [42] M. M. Brahmbhatt *i* wsp., „Location of the BCR/ABL Fusion Genes on Both Chromosomes 9 in Ph Negative Young CML Patients: An Indian Experience”, *Indian J Hematol Blood Transfus*, t. 30, nr 4, s. 241–246, grudz. 2014, doi: 10.1007/s12288-013-0316-6.

- [43] S. Luatti *i wsp.*, „Cryptic BCR-ABL fusion gene as variant rearrangement in chronic myeloid leukemia: molecular cytogenetic characterization and influence on TKIs therapy”, *Oncotarget*, t. 8, nr 18, s. 29906–29913, maj 2017, doi: 10.18632/oncotarget.15369.
- [44] A. Bennour *i wsp.*, „Molecular cytogenetic characterization of Philadelphia-negative rearrangements in chronic myeloid leukemia patients”, *J. Cancer Res. Clwsp. Oncol.*, t. 137, nr 9, s. 1329–1336, wrz. 2011, doi: 10.1007/s00432-011-1002-4.
- [45] K. S. Reddy, B. Grove, „A Philadelphia-negative chronic myeloid leukemia with a BCR/ABL fusion gene on chromosome 9”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, t. 107, nr 1, s. 48–50, lis. 1998, doi: 10.1016/s0165-4608(98)00064-8.
- [46] M. Sessarego *i wsp.*, „Complex chromosome rearrangements may locate the bcr/abl fusion gene sites other than 22q11”, *Haematologica*, t. 85, nr 1, s. 35–39, sty. 2000.
- [47] O. Yehuda *i wsp.*, „Clinical implications of fluorescence in situ hybridization analysis in 13 chronic myeloid leukemia cases: Ph-negative and variant Ph-positive”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, t. 114, nr 2, s. 100–107, paź. 1999, doi: 10.1016/s0165-4608(99)00067-9.
- [48] L. Vieira *i wsp.*, „Insertion of the 5' part of BCR within the ABL gene at 9q34 in a Philadelphia-negative chronic myeloid leukemia”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, t. 114, nr 1, s. 17–21, paź. 1999, doi: 10.1016/s0165-4608(99)00036-9.
- [49] E. Abruzzese *i wsp.*, „Identification of BCR-ABL fusion on chromosome 9 by fluorescence in situ hybridization in two chronic myeloid leukemia cases”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, t. 105, nr 2, s. 164–167, wrz. 1998, doi: 10.1016/s0165-4608(98)00020-x.
- [50] D. A. S. Batista *i wsp.*, „BCR/ABL rearrangement in two cases of Philadelphia chromosome negative chronic myeloid leukemia: deletion on the derivative chromosome 9 may or not be present”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, t. 163, nr 2, s. 164–167, grudz. 2005, doi: 10.1016/j.cancergencyto.2005.04.021.
- [51] G. Fugazza *i wsp.*, „Masked Philadelphia chromosome due to atypical BCR/ABL localization on the 9q34 band and duplication of the der(9) in a case of chronic myelogenous leukemia”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, t. 163, nr 2, s. 173–175, grudz. 2005, doi: 10.1016/j.cancergencyto.2005.05.010.

- [52] M.-H. Duan, H. Li, H. Cai, „A rare e13a3 (b2a3) BCR-ABL1 fusion transcript with normal karyotype in chronic myeloid leukemia: The challenges in diagnosis and monitoring minimal residual disease (MRD)”, *Leuk. Res.*, t. 59, s. 8–11, 2017, doi: 10.1016/j.leukres.2017.05.009.
- [53] A. Hochhaus *i wsp.*, „Nilotinib first-line therapy in patients with Philadelphia chromosome-negative/BCR-ABL-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENEST1st sub-analysis”, *J. Cancer Res. Clwsp. Oncol.*, t. 143, nr 7, s. 1225–1233, lip. 2017, doi: 10.1007/s00432-017-2359-9.
- [54] E. Kolomietz *i wsp.*, „Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis”, *Blood*, t. 97, nr 11, s. 3581–3588, cze. 2001, doi: 10.1182/blood.v97.11.3581.
- [55] C. T. Storlazzi *i wsp.*, „Breakpoint characterization of der(9) deletions in chronic myeloid leukemia patients”, *Genes Chromosomes Cancer*, t. 35, nr 3, s. 271–276, lis. 2002, doi: 10.1002/gcc.10116.
- [56] A. Zagaria *i wsp.*, „Molecular cytogenetic characterization of deletions on der(9) in chronic myelocytic leukemia”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, t. 167, nr 2, s. 97–102, cze. 2006, doi: 10.1016/j.cancergencyto.2006.01.011.
- [57] P. B. Sinclair *i wsp.*, „Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia”, *Blood*, t. 95, nr 3, s. 738–743, luty 2000.
- [58] P. T. Xinh *i wsp.*, „Coexistence of Philadelphia chromosome positive cells with and without der(9) deletion in a patient with chronic myelogenous leukemia”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, t. 164, nr 2, s. 122–127, sty. 2006, doi: 10.1016/j.cancergencyto.2005.07.012.
- [59] B. J. Huntly *i wsp.*, „Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia”, *Blood*, t. 98, nr 6, s. 1732–1738, wrz. 2001, doi: 10.1182/blood.v98.6.1732.
- [60] N. Cohen *i wsp.*, „Subgroup of patients with Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia characterized by a deletion of 9q proximal to ABL gene: expression profiling, resistance to interferon therapy, and poor prognosis”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, t. 128, nr 2, s. 114–119, lip. 2001, doi: 10.1016/s0165-4608(01)00412-5.

- [61] G. Specchia *i wsp.*, „Derivative chromosome 9 deletions in chronic myeloid leukemia are associated with loss of tumor suppressor genes”, *Leuk. Lymphoma*, t. 45, nr 4, s. 689–694, kwi. 2004, doi: 10.1080/10428190310001623900.
- [62] Y. K. Lee *i wsp.*, „Deletion of any part of the BCR or ABL gene on the derivative chromosome 9 is a poor prognostic marker in chronic myelogenous leukemia”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, t. 166, nr 1, s. 65–73, kwi. 2006, doi: 10.1016/j.cancergencyto.2005.08.028.
- [63] R. K. Chandran *i wsp.*, „Prognostic Implications of Derivative Chromosome 9 Deletions in Patients with Advanced-Stage Chronic Myelogenous Leukemia”, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, t. 37, nr 2, s. 117–126, 2018, doi: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2018026023.
- [64] F. Castagnetti *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 imatinib mesylate: GIMEMA CML Working Party analysis”, *J. Clwsp. Oncol.*, t. 28, nr 16, s. 2748–2754, cze. 2010, doi: 10.1200/JCO.2009.26.7963.
- [65] B. Pieńkowska-Grela *i wsp.*, „Karyotype changes during long-term targeted therapy of chronic myeloid leukemia with imatinib”, *Leuk. Lymphoma*, t. 50, nr 6, s. 952–965, cze. 2009, doi: 10.1080/10428190902838384.
- [66] M. Molica, F. Massaro, M. Breccia, „Diagnostic and prognostic cytogenetics of chronic myeloid leukaemia: an update”, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, t. 17, nr 11, s. 1001–1008, 2017, doi: 10.1080/14737159.2017.1383156.
- [67] S. Bozkurt *i wsp.*, „Prognostic importance of additional cytogenetic anomalies in chronic myeloid leukemia”, *Med. Oncol.*, t. 30, nr 1, s. 443, mar. 2013, doi: 10.1007/s12032-012-0443-1.
- [68] Z. Chen *i wsp.*, „Cytogenetic landscape and impact in blast phase of chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy”, *Leukemia*, t. 31, nr 3, s. 585–592, 2017, doi: 10.1038/leu.2016.231.
- [69] N. Muvarak, P. Nagaria, F. V. Rassool, „Genomic instability in chronic myeloid leukemia: targets for therapy?”, *Curr Hematol Malig Rep*, t. 7, nr 2, s. 94–102, cze. 2012, doi: 10.1007/s11899-012-0119-0.
- [70] F. Millot *i wsp.*, „Additional cytogenetic abnormalities and variant t(9;22) at the diagnosis of childhood chronic myeloid leukemia: The experience of the International Registry for Chronic Myeloid Leukemia in Children and

- Adolescents”, *Cancer*, t. 123, nr 18, s. 3609–3616, wrz. 2017, doi: 10.1002/cncr.30767.
- [71] W. Wang *i wsp.*, „Risk stratification of chromosomal abnormalities in chronic myelogenous leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy”, *Blood*, t. 127, nr 22, s. 2742–2750, 02 2016, doi: 10.1182/blood-2016-01-690230.
- [72] W. Wang *i wsp.*, „Chromosomal rearrangement involving 11q23 locus in chronic myelogenous leukemia: a rare phenomenon frequently associated with disease progression and poor prognosis”, *J Hematol Oncol*, t. 8, s. 32, kwi. 2015, doi: 10.1186/s13045-015-0128-2.
- [73] W. Wang *i wsp.*, „Clinical and prognostic significance of 3q26.2.2 and other chromosome 3 abnormalities in CML in the era of tyrosine kinase inhibitors”, *Blood*, t. 126, nr 14, s. 1699–1706, paź. 2015, doi: 10.1182/blood-2015-05-646489.
- [74] A. M. Akram *i wsp.*, „Presence of novel compound BCR-ABL mutations in late chronic and advanced phase imatinib sensitive CML patients indicates their possible role in CML progression”, *Cancer Biol. Ther.*, t. 18, nr 4, s. 214–221, 03 2017, doi: 10.1080/15384047.2017.1294289.
- [75] W. Wang *i wsp.*, „Clinical significance of trisomy 8 that emerges during therapy in chronic myeloid leukemia”, *Blood Cancer J*, t. 6, nr 11, s. e490, 04 2016, doi: 10.1038/bcj.2016.96.
- [76] H. Ni *i wsp.*, „Clinical implications of clonal chromosomal abnormalities in Philadelphia negative cells in CML patients after treated with tyrosine kinase inhibitors”, *Cancer Genet*, t. 238, s. 44–49, 2019, doi: 10.1016/j.cancergen.2019.07.008.
- [77] G. Sheng *i wsp.*, „Occurrence of chromosomal abnormalities in Philadelphia chromosome-negative metaphases in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia undergoing TKI treatments”, *Leuk. Lymphoma*, t. 60, nr 14, s. 3503–3511, grudz. 2019, doi: 10.1080/10428194.2019.1636984.
- [78] G. C. Issa *i wsp.*, „Clonal chromosomal abnormalities appearing in Philadelphia chromosome-negative metaphases during CML treatment”, *Blood*, t. 130, nr 19, s. 2084–2091, lis. 2017, doi: 10.1182/blood-2017-07-792143.
- [79] N. Larsson *i wsp.*, „Genetic analysis of dasatinib-treated chronic myeloid leukemia rapidly developing into acute myeloid leukemia with monosomy 7 in

- Philadelphia-negative cells”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, t. 199, nr 2, s. 89–95, cze. 2010, doi: 10.1016/j.cancergencyto.2010.02.005.
- [80] M. W. N. Deininger *i wsp.*, „The prognosis for patients with chronic myeloid leukemia who have clonal cytogenetic abnormalities in philadelphia chromosome-negative cells”, *Cancer*, t. 110, nr 7, s. 1509–1519, paź. 2007, doi: 10.1002/cncr.22936.
- [81] J. P. Radich *i wsp.*, „Chronic Myeloid Leukemia, Version 1.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology”, *J Natl Compr Canc Netw*, t. 16, nr 9, s. 1108–1135, 2018, doi: 10.6004/jnccn.2018.0071.
- [82] M. J. Groves *i wsp.*, „Factors influencing a second myeloid malignancy in patients with Philadelphia-negative -7 or del(7q) clones during tyrosine kinase inhibitor therapy for chronic myeloid leukemia”, *Cancer Genet*, t. 204, nr 1, s. 39–44, sty. 2011, doi: 10.1016/j.cancergencyto.2010.08.017.
- [83] B. J. Druker, N. B. Lydon, „Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia”, *J. Clwsp. Invest.*, t. 105, nr 1, s. 3–7, sty. 2000, doi: 10.1172/JCI9083.
- [84] B. J. Druker *i wsp.*, „Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia”, *N. Engl. J. Med.*, t. 355, nr 23, s. 2408–2417, grudz. 2006, doi: 10.1056/NEJMoa062867.
- [85] L. J. Lombardo *i wsp.*, „Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays”, *J. Med. Chem.*, t. 47, nr 27, s. 6658–6661, grudz. 2004, doi: 10.1021/jm049486a.
- [86] S. Nam *i wsp.*, „Action of the Src family kinase inhibitor, dasatinib (BMS-354825), on human prostate cancer cells”, *Cancer Res.*, t. 65, nr 20, s. 9185–9189, paź. 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1731.
- [87] M. Lindauer, A. Hochhaus, „Dasatinib”, *Recent Results Cancer Res.*, t. 212, s. 29–68, 2018, doi: 10.1007/978-3-319-91439-8_2.
- [88] J. S. Tokarski *i wsp.*, „The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants”, *Cancer Res.*, t. 66, nr 11, s. 5790–5797, cze. 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4187.

- [89] H. Kantarjian *i wsp.*, „Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia”, *N. Engl. J. Med.*, t. 362, nr 24, s. 2260–2270, cze. 2010, doi: 10.1056/NEJMoa1002315.
- [90] E. Weisberg *i wsp.*, „Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl”, *Cancer Cell*, t. 7, nr 2, s. 129–141, luty 2005, doi: 10.1016/j.ccr.2005.01.007.
- [91] E. Jabbour *i wsp.*, „Nilotinib: a novel Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor for the treatment of leukemias”, *Expert Opin Investig Drugs*, t. 17, nr 7, s. 1127–1136, lip. 2008, doi: 10.1517/13543784.17.7.1127.
- [92] H. Kantarjian *i wsp.*, „Impact of treatment end point definitions on perceived differences in long-term outcome with tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukemia”, *J. Clwsp. Oncol.*, t. 29, nr 23, s. 3173–3178, sie. 2011, doi: 10.1200/JCO.2010.33.4169.
- [93] A. A. Wylie *i wsp.*, „The allosteric inhibitor ABL001 enables dual targeting of BCR-ABL1”, *Nature*, t. 543, nr 7647, s. 733–737, 30 2017, doi: 10.1038/nature21702.
- [94] F.-X. Mahon *i wsp.*, „Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial”, *The Lancet Oncology*, t. 11, nr 11, s. 1029–1035, lis. 2010, doi: 10.1016/S1470-2045(10)70233-3.
- [95] P. Rousselot *i wsp.*, „Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years”, *Blood*, t. 109, nr 1, s. 58–60, sty. 2007, doi: 10.1182/blood-2006-03-011239.
- [96] D. M. Ross *i wsp.*, „Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study”, *Blood*, t. 122, nr 4, s. 515–522, lip. 2013, doi: 10.1182/blood-2013-02-483750.
- [97] P. Rousselot *i wsp.*, „Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease”, *J. Clwsp. Oncol.*, t. 32, nr 5, s. 424–430, luty 2014, doi: 10.1200/JCO.2012.48.5797.
- [98] N. Thielen *i wsp.*, „Imatinib discontinuation in chronic phase myeloid leukaemia patients in sustained complete molecular response: A randomised trial of the

- Dutch–Belgian Cooperative Trial for Haemato-Oncology (HOVON)”, *European Journal of Cancer*, t. 49, nr 15, s. 3242–3246, paź. 2013, doi: 10.1016/j.ejca.2013.06.018.
- [99] D. M. Ross *i wsp.*, „Durable treatment-free remission in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase following frontline nilotinib: 96-week update of the ENESTfreedom study”, *J. Cancer Res. Clwsp. Oncol.*, t. 144, nr 5, s. 945–954, maj 2018, doi: 10.1007/s00432-018-2604-x.
- [100] T. Sacha, G. Saglio, „Nilotinib in the treatment of chronic myeloid leukemia”, *Future Oncol*, t. 15, nr 9, s. 953–965, mar. 2019, doi: 10.2217/fon-2018-0468.
- [101] J. Liu *i wsp.*, „BCR-ABL mutants spread resistance to non-mutated cells through a paracrine mechanism”, *Leukemia*, t. 22, nr 4, s. 791–799, kwi. 2008, doi: 10.1038/leu.2008.3.
- [102] A. Samanta *i wsp.*, „Janus kinase 2 regulates Bcr-Abl signaling in chronic myeloid leukemia”, *Leukemia*, t. 25, nr 3, s. 463–472, mar. 2011, doi: 10.1038/leu.2010.287.
- [103] A. B. Patel, T. O’Hare, M. W. Deininger, „Mechanisms of Resistance to ABL Kinase Inhibition in Chronic Myeloid Leukemia and the Development of Next Generation ABL Kinase Inhibitors”, *Hematol. Oncol. Clwsp. North Am.*, t. 31, nr 4, s. 589–612, 2017, doi: 10.1016/j.hoc.2017.04.007.
- [104] J. S. Khorashad *i wsp.*, „BCR-ABL1 compound mutations in tyrosine kinase inhibitor-resistant CML: frequency and clonal relationships”, *Blood*, t. 121, nr 3, s. 489–498, sty. 2013, doi: 10.1182/blood-2012-05-431379.
- [105] N. Meggyesi *i wsp.*, „Additional chromosome abnormalities, BCR-ABL tyrosine kinase domain mutations and clinical outcome in Hungarian tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myelogenous leukemia patients”, *Acta Haematol.*, t. 127, nr 1, s. 34–42, 2012, doi: 10.1159/000331472.
- [106] S. Schnittger *i wsp.*, „Associations between imatinib resistance conferring mutations and Philadelphia positive clonal cytogenetic evolution in CML”, *Genes Chromosomes Cancer*, t. 49, nr 10, s. 910–918, paź. 2010, doi: 10.1002/gcc.20801.
- [107] T. D. Kim *i wsp.*, „Impact of additional chromosomal aberrations and BCR-ABL kinase domain mutations on the response to nilotinib in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia”, *Haematologica*, t. 95, nr 4, s. 582–588, kwi. 2010, doi: 10.3324/haematol.2009.014712.

- [108] K. Lewandowski *i wsp.*, „Frequency of BCR-ABL gene mutations in Polish patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib: a final report of the MAPTEST study”, *Pol. Arch. Med. Wewn.*, t. 119, nr 12, s. 789–794, grudz. 2009.
- [109] M. E. Gorre *i wsp.*, „Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification”, *Science*, t. 293, nr 5531, s. 876–880, sie. 2001, doi: 10.1126/science.1062538.
- [110] G. K. Kayastha *i wsp.*, „The use of Imatinib resistance mutation analysis to direct therapy in Philadelphia chromosome/BCR-ABL1 positive chronic myeloid leukaemia patients failing Imatinib treatment, in Patan Hospital, Nepal”, *Br. J. Haematol.*, t. 177, nr 6, s. 1000–1007, 2017, doi: 10.1111/bjh.14683.
- [111] C. Y. Pan *i wsp.*, „[Clinical significance of cytogenetic monitoring in chronic myeloid leukemia]”, *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, t. 38, nr 2, s. 112–117, luty 2017, doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.02.006.
- [112] K. Savasoglu *i wsp.*, „The effect of the additional cytogenetic abnormalities on major molecular response and BCR-ABL kinase domain mutations in long-term follow-up chronic myeloid leukemia patients, a cross sectional study”, *Leuk. Lymphoma*, t. 58, nr 8, s. 1958–1962, 2017, doi: 10.1080/10428194.2016.1265112.
- [113] M. T. Vargas, „BCR/ABL1 Extra Fusions in Patients with Chronic Myeloid Leukaemia (CML)”, *Myeloid Leukemia - Basic Mechanisms of Leukemogenesis*, grudz. 2011, doi: 10.5772/25875.
- [114] G. N. Franke *i wsp.*, „Comparison of Real-Time Quantitative PCR and Digital Droplet PCR for BCR-ABL1 Monitoring in Patients with Chronic Myeloid Leukemia”, *J Mol Diagn*, t. 22, nr 1, s. 81–89, sty. 2020, doi: 10.1016/j.jmoldx.2019.08.007.
- [115] E. Beillard *i wsp.*, „Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using «real-time» quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program”, *Leukemia*, t. 17, nr 12, s. 2474–2486, grudz. 2003, doi: 10.1038/sj.leu.2403136.
- [116] J. J. van Dongen *i wsp.*, „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*, t. 13, nr 12, s. 1901–1928, grudz. 1999, doi: 10.1038/sj.leu.2401592.
- [117] G. Damaj *i wsp.*, „Typical essential thrombocythaemia does not express bcr-abelson fusion transcript”, *Br. J. Haematol.*, t. 116, nr 4, s. 812–816, mar. 2002, doi: 10.1046/j.0007-1048.2002.03343.x.
- [118] N. C. P. Cross *i wsp.*, „Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia”, *Leukemia*, t. 29, nr 5, s. 999–1003, maj 2015, doi: 10.1038/leu.2015.29.
- [119] T. Hughes *i wsp.*, „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*, t. 108, nr 1, s. 28–37, lip. 2006, doi: 10.1182/blood-2006-01-0092.
- [120] J. Gabert *i wsp.*, „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*, t. 17, nr 12, s. 2318–2357, grudz. 2003, doi: 10.1038/sj.leu.2403135.
- [121] T. Sacha *i wsp.*, „Standardization of quantitative detection of BCR-ABL gene expression by RQ-PCR in patients with chronic myeloid leukemia in cooperation with European Leukemia Net”, *Prz. Lek.*, t. 67, nr 7, s. 454–459, 2010.
- [122] T. O’Hare, C. A. Eide, M. W. N. Deininger, „Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia”, *Blood*, t. 110, nr 7, s. 2242–2249, paź. 2007, doi: 10.1182/blood-2007-03-066936.
- [123] S. Branford, T. Hughes, „Detection of BCR-ABL mutations and resistance to imatinib mesylate”, *Methods Mol. Med.*, t. 125, s. 93–106, 2006, doi: 10.1385/1-59745-017-0:93.
- [124] S. Redaelli *i wsp.*, „Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants”, *J. Clwsp. Oncol.*, t. 27, nr 3, s. 469–471, sty. 2009, doi: 10.1200/JCO.2008.19.8853.
- [125] J. F. Apperley, „Chronic myeloid leukaemia”, *Lancet*, t. 385, nr 9976, s. 1447–1459, kwi. 2015, doi: 10.1016/S0140-6736(13)62120-0.
- [126] P. C. Nowell, D. A. Hungerford, „Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes”, *J. Natl. Cancer Inst.*, t. 25, s. 85–109, lip. 1960.

- [127] T. Caspersson *i wsp.*, „Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents”, *Chromosoma*, t. 30, nr 2, s. 215–227, 1970, doi: 10.1007/BF00282002.
- [128] A. de Klein *i wsp.*, „A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia”, *Nature*, t. 300, nr 5894, s. 765–767, grudz. 1982, doi: 10.1038/300765a0.
- [129] M. C. Müller *i wsp.*, „Improvement of molecular monitoring of residual disease in leukemias by bedside RNA stabilization”, *Leukemia*, t. 16, nr 12, s. 2395–2399, grudz. 2002, doi: 10.1038/sj.leu.2402734.
- [130] M. Jarmuz *i wsp.*, „Megakaryocytic blast crisis in a chronic myeloid leukemia patient with a rare variant of Philadelphia rearrangement t(9;22;22) and a constitutional translocation t(3;7)”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, t. 199, nr 1, s. 45–47, maj 2010, doi: 10.1016/j.cancergencyto.2010.01.017.
- [131] M. M. T. El-Zimaity *i wsp.*, „Results of imatinib mesylate therapy in chronic myelogenous leukaemia with variant Philadelphia chromosome”, *Br. J. Haematol.*, t. 125, nr 2, s. 187–195, kwi. 2004, doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.04899.x.
- [132] D. Costa *i wsp.*, „Conventional and molecular cytogenetic studies to characterize 32 complex variant Philadelphia translocations in patients with chronic myeloid leukemia”, *Oncol Lett*, t. 17, nr 6, s. 5705–5710, cze. 2019, doi: 10.3892/ol.2019.10245.
- [133] E. Kolomietz *i wsp.*, „The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors”, *Genes Chromosomes Cancer*, t. 35, nr 2, s. 97–112, paź. 2002, doi: 10.1002/gcc.10111.
- [134] A. R. Jeffs *i wsp.*, „The BCR gene recombines preferentially with Alu elements in complex BCR-ABL translocations of chronic myeloid leukaemia”, *Hum. Mol. Genet.*, t. 7, nr 5, s. 767–776, maj 1998, doi: 10.1093/hmg/7.5.767.
- [135] A. M. Fisher *i wsp.*, „Breakpoints of variant 9;22 translocations in chronic myeloid leukemia locate preferentially in the CG-richest regions of the genome”, *Genes Chromosomes Cancer*, t. 43, nr 4, s. 383–389, sie. 2005, doi: 10.1002/gcc.20196.
- [136] S. Luatti *i wsp.*, „Additional chromosomal abnormalities in Philadelphia-positive clone: adverse prognostic influence on frontline imatinib therapy: a GIMEMA Working Party on CML analysis”, *Blood*, t. 120, nr 4, s. 761–767, lip. 2012, doi: 10.1182/blood-2011-10-384651.

- [137] A. G. Reid *i wsp.*, „Survival implications of molecular heterogeneity in variant Philadelphia-positive chronic myeloid leukaemia”, *Br. J. Haematol.*, t. 121, nr 3, s. 419–427, maj 2003, doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04291.x.
- [138] „Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology”. <http://www.atlasgeneticsoncology.org/index.html> (udostępniono mar. 18, 2020).
- [139] J. Li *i wsp.*, „GTF2I-RARA is a novel fusion transcript in a t(7;17) variant of acute promyelocytic leukaemia with clinical resistance to retinoic acid”, *Br. J. Haematol.*, t. 168, nr 6, s. 904–908, mar. 2015, doi: 10.1111/bjh.13157.
- [140] K. Inokuchi *i wsp.*, „Therapeutic effects of tyrosine kinase inhibitors and subtypes of BCR-ABL1 transcripts in Japanese chronic myeloid leukemia patients with three-way chromosomal translocations”, *Leuk. Res.*, t. 65, s. 74–79, 2018, doi: 10.1016/j.leukres.2018.01.005.
- [141] D. Costa *i wsp.*, „Chimeric BCR/ABL gene detected by fluorescence in situ hybridization in three new cases of Philadelphia chromosome-negative chronic myelocytic leukemia”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, t. 141, nr 2, s. 114–119, mar. 2003, doi: 10.1016/s0165-4608(02)00662-3.
- [142] K. Fischer *i wsp.*, „Molecular cytogenetic delineation of deletions and translocations involving chromosome band 7q22 in myeloid leukemias”, *Blood*, t. 89, nr 6, s. 2036–2041, mar. 1997.
- [143] F. A. González *i wsp.*, „Deletion of BCR region 3' in chronic myelogenous leukemia”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, t. 130, nr 1, s. 68–74, paź. 2001, doi: 10.1016/s0165-4608(01)00469-1.
- [144] A. Bennour *i wsp.*, „Molecular cytogenetic characterization of variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukemia: genesis and deletion of derivative chromosome 9”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, t. 194, nr 1, s. 30–37, paź. 2009, doi: 10.1016/j.cancergencyto.2009.05.010.
- [145] A. Bennour *i wsp.*, „Molecular cytogenetic study of derivative chromosome 9 deletion in chronic myeloid leukemia patients”, *Med. Oncol.*, t. 29, nr 2, s. 1151–1160, cze. 2012, doi: 10.1007/s12032-011-9918-8.
- [146] A. Quintas-Cardama *i wsp.*, „Imatinib mesylate therapy may overcome the poor prognostic significance of deletions of derivative chromosome 9 in patients with chronic myelogenous leukemia”, *Blood*, t. 105, nr 6, s. 2281–2286, mar. 2005, doi: 10.1182/blood-2004-06-2208.

- [147] A. Quintás-Cardama *i wsp.*, „Prognostic Impact of Deletions of Derivative Chromosome 9 in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia Treated with Nilotinib or Dasatinib”, *Cancer*, t. 117, nr 22, s. 5085–5093, lis. 2011, doi: 10.1002/cncr.26147.
- [148] Ž. T. Švabek *i wsp.*, „The incidence of atypical patterns of BCR-ABL1 rearrangement and molecular-cytogenetic response to tyrosine kinase inhibitor therapy in newly diagnosed cases with chronic myeloid leukemia (CML)”, *Blood Res*, t. 53, nr 2, s. 152–159, cze. 2018, doi: 10.5045/br.2018.53.2.152.
- [149] M. Xue *i wsp.*, „Outcomes of 219 chronic myeloid leukaemia patients with additional chromosomal abnormalities and/or tyrosine kinase domain mutations”, *Int J Lab Hematol*, t. 41, nr 1, s. 94–101, luty 2019, doi: 10.1111/ijlh.12928.
- [150] F. Mitelman, „The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia”, *Leuk. Lymphoma*, t. 11 Suppl 1, s. 11–15, 1993, doi: 10.3109/10428199309047856.
- [151] A. Fabarius *i wsp.*, „Impact of unbalanced minor route versus major route karyotypes at diagnosis on prognosis of CML”, *Ann. Hematol.*, t. 94, nr 12, s. 2015–2024, grudz. 2015, doi: 10.1007/s00277-015-2494-9.
- [152] P. L. Greenberg *i wsp.*, „Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes”, *Blood*, t. 120, nr 12, s. 2454–2465, wrz. 2012, doi: 10.1182/blood-2012-03-420489.
- [153] S. R. Wolman *i wsp.*, „Impact of trisomy 8 (+8) on clinical presentation, treatment response, and survival in acute myeloid leukemia: A Southwest Oncology Group study”, *Blood*, t. 100, nr 1, s. 29–35, lip. 2002, doi: 10.1182/blood.v100.1.29.
- [154] H. Becker *i wsp.*, „Prognostic gene mutations and distinct gene- and microRNA-expression signatures in acute myeloid leukemia with a sole trisomy 8”, *Leukemia*, t. 28, nr 8, s. 1754–1758, sie. 2014, doi: 10.1038/leu.2014.114.
- [155] E. Lippert *i wsp.*, „Loss of the Y chromosome in Philadelphia-positive cells predicts a poor response of chronic myeloid leukemia patients to imatinib mesylate therapy”, *Haematologica*, t. 95, nr 9, s. 1604–1607, wrz. 2010, doi: 10.3324/haematol.2009.019109.
- [156] S. Gröschel *i wsp.*, „A single oncogenic enhancer rearrangement causes concomitant EVI1 and GATA2 deregulation in leukemia”, *Cell*, t. 157, nr 2, s. 369–381, kwi. 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.02.019.

- [157] H. Yamazaki *i wsp.*, „A remote GATA2 hematopoietic enhancer drives leukemogenesis in inv(3)(q21;q26) by activating EVI1 expression”, *Cancer Cell*, t. 25, nr 4, s. 415–427, kwi. 2014, doi: 10.1016/j.ccr.2014.02.008.
- [158] J.-Y. Métais, C. E. Dunbar, „The MDS1-EVI1 gene complex as a retrovirus integration site: impact on behavior of hematopoietic cells and implications for gene therapy”, *Mol. Ther.*, t. 16, nr 3, s. 439–449, mar. 2008, doi: 10.1038/sj.mt.6300372.
- [159] S. Lugthart *i wsp.*, „Clinical, molecular, and prognostic significance of WHO type inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2) and various other 3q abnormalities in acute myeloid leukemia”, *J. Clwsp. Oncol.*, t. 28, nr 24, s. 3890–3898, sie. 2010, doi: 10.1200/JCO.2010.29.2771.
- [160] D. Grimwade *i wsp.*, „Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials”, *Blood*, t. 116, nr 3, s. 354–365, lip. 2010, doi: 10.1182/blood-2009-11-254441.
- [161] K. H. Vousden, X. Lu, „Live or let die: the cell’s response to p53”, *Nat. Rev. Cancer*, t. 2, nr 8, s. 594–604, sie. 2002, doi: 10.1038/nrc864.
- [162] H. Seifert *i wsp.*, „The prognostic impact of 17p (p53) deletion in 2272 adults with acute myeloid leukemia”, *Leukemia*, t. 23, nr 4, s. 656–663, kwi. 2009, doi: 10.1038/leu.2008.375.
- [163] S. Horiike *i wsp.*, „Configuration of the TP53 gene as an independent prognostic parameter of myelodysplastic syndrome”, *Leuk. Lymphoma*, t. 44, nr 6, s. 915–922, cze. 2003, doi: 10.1080/1042819031000067620.
- [164] M. Gniot *i wsp.*, „Transient presence of clonal chromosomal aberrations in Ph-negative cells in patients with chronic myeloid leukemia remaining in deep molecular response on tyrosine kinase inhibitor treatment”, *Cancer Genetics*, t. 207, nr 10–12, s. 503–510, paź. 2014, doi: 10.1016/j.cancergen.2014.10.003.
- [165] L. Zhang *i wsp.*, „Molecular genetic evidence of Y chromosome loss in male patients with hematological disorders”, *Chwsp. Med. J.*, t. 120, nr 22, s. 2002–2005, lis. 2007.
- [166] L. A. Forsberg *i wsp.*, „Mosaic loss of chromosome Y in peripheral blood is associated with shorter survival and higher risk of cancer”, *Nat. Genet.*, t. 46, nr 6, s. 624–628, cze. 2014, doi: 10.1038/ng.2966.

- [167] E. Jabbour *i wsp.*, „Chromosomal abnormalities in Philadelphia chromosome negative metaphases appearing during imatinib mesylate therapy in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase”, *Blood*, t. 110, nr 8, s. 2991–2995, paź. 2007, doi: 10.1182/blood-2007-01-070045.
- [168] K. Lewandowski *i wsp.*, „B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia with 11q22.3 Rearrangement in Patient with Chronic Myeloid Leukemia Treated with Imatinib”, *Case Rep Med*, t. 2016, s. 9806515, 2016, doi: 10.1155/2016/9806515.
- [169] E. M. Wasilewska *i wsp.*, „Clonal chromosomal aberrations in Philadelphia negative cells such as monosomy 7 and trisomy 8 may persist for years with no impact on the long-term outcome in patients with chronic myeloid leukemia”, *Cancer Genet*, t. 216–217, s. 1–9, paź. 2017, doi: 10.1016/j.cancergen.2017.04.066.
- [170] T. Kim *i wsp.*, „Spectrum of somatic mutation dynamics in chronic myeloid leukemia following tyrosine kinase inhibitor therapy”, *Blood*, t. 129, nr 1, s. 38–47, 05 2017, doi: 10.1182/blood-2016-04-708560.
- [171] P. Dvorak, M. Hrubá, I. Subrt, „Development of acute myeloid leukemia associated with Ph-negative clone with inv(3)(q21q26) during imatinib therapy for chronic myeloid leukemia”, *Leuk. Res.*, t. 33, nr 6, s. 860–861, cze. 2009, doi: 10.1016/j.leukres.2008.09.021.
- [172] T. Bumm *i wsp.*, „Emergence of clonal cytogenetic abnormalities in Ph- cells in some CML patients in cytogenetic remission to imatinib but restoration of polyclonal hematopoiesis in the majority”, *Blood*, t. 101, nr 5, s. 1941–1949, mar. 2003, doi: 10.1182/blood-2002-07-2053.
- [173] M. Loriaux, M. Deininger, „Clonal cytogenetic abnormalities in Philadelphia chromosome negative cells in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib”, *Leuk. Lymphoma*, t. 45, nr 11, s. 2197–2203, lis. 2004, doi: 10.1080/10428190410001723278.
- [174] N. C. P. Cross *i wsp.*, „BCR-ABL1-positive CML and BCR-ABL1-negative chronic myeloproliferative disorders: some common and contrasting features”, *Leukemia*, t. 22, nr 11, s. 1975–1989, lis. 2008, doi: 10.1038/leu.2008.231.
- [175] M. Schmidt *i wsp.*, „Molecular-defined clonal evolution in patients with chronic myeloid leukemia independent of the BCR-ABL status”, *Leukemia*, t. 28, nr 12, s. 2292–2299, grudz. 2014, doi: 10.1038/leu.2014.272.

- [176] K. Krysiak *i wsp.*, „A genomic analysis of Philadelphia chromosome-negative AML arising in patients with CML”, *Blood Cancer J*, t. 6, s. e413, kwi. 2016, doi: 10.1038/bcj.2016.18.
- [177] C. Lobetti-Bodoni *i wsp.*, „Telomere loss in Philadelphia-negative hematopoiesis after successful treatment of chronic myeloid leukemia: evidence for premature aging of the myeloid compartment”, *Mech. Ageing Dev.*, t. 133, nr 7, s. 479–488, lip. 2012, doi: 10.1016/j.mad.2012.05.007.
- [178] U. Bacher *i wsp.*, „Clonal aberrations in Philadelphia chromosome negative hematopoiesis in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib or interferon alpha”, *Leukemia*, t. 19, nr 3, s. 460–463, mar. 2005, doi: 10.1038/sj.leu.2403607.
- [179] Z. Tang *i wsp.*, „Chronic myeloid leukemia with insertion-derived *BCR-ABL1* fusion: redefining complex chromosomal abnormalities by correlation of FISH and karyotype predicts prognosis”, *Mod Pathol* **33**, 2035–2045 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41379-020-0564-6>.
- [180] G. Giraldo *i wsp.*, „Mosaic trisomy 8 detected by fibroblasts cultured of skin”, *Colomb Med (Cali)*, 2016 sty. 30;47(2):100-4. PMID: 27546932; PMCID: PMC4975130.
- [181] B.J. Hulley *i wsp.*, „Trisomy 8 mosaicism: selective growth advantage of normal cells vs. growth disadvantage of trisomy 8 cells”, *Am J Med Genet A*, 2003;116A(2):144–146.
- [182] Z. Gong *i wsp.*, „Cytogenetics-based risk prediction of blastic transformation of chronic myeloid leukemia in the era of TKI therapy”, *Blood Adv.* 2017;1(26):2541-2552. Published 2017 grudz. 8. doi:10.1182/bloodadvances.2017011858.

11. SUPLEMENT

Załącznik 1. Sondy molekularne stosowane w badaniu FISH.

Nazwa sondy	Rodzaj aberracji	Producent
BCR/ABL1 DC, DF	t(9;22)(q34;q11.2)	Vysis
BCR/ABL1/ASS1 TC, DF	t(9;22)(q34;q11.2)	Vysis
i(17q)(MPO/p53) DC, BA	i(17)(q10)	Kreatech
FIP1L1-CHIC2-PDGFR(4q12) TC, BA	rearanżacja regionu 4q12	Kreatech
PDGFRB(5q32) DC, BA	rearanżacja regionu 5q32	Kreatech
EVI t(3;3), inv(3)(3q26.2) DC, BA	t(3;3)(q26;q26); inv(3)(q21q26)	Kreatech
EVI t(3;3), inv(3), TC, BA	t(3;3)(q26;q26); inv(3)(q21q26)	Kreatech
LSI D7S522(7q31)/CEP 7 DC	-7/del(7)(q31)	Vysis
20q- (PTPRT20q12)/SE 20 DC	del(20)(q12)	Kreatech
20q- (PTPRT20q12) Spectrum Orange	del(20)(q12)	Vysis
CSF 1R/D5S721, D5S23 DC	-5/del(5)(q33-34)	Vysis
5q- (5q31;5q33) DC	-5/del(5)(q31-33)	Vysis
RUNX1/RUNX1T1 DC, DF	t(8;21)(q21;q22)	Vysis
PML/RARA DC, DF	t(15;17)(q24;q21)	Vysis
CBFB, inv(16) DC, BA	inv(16)(p13q22)	Vysis
Panel CLL (p53/ATM i D13S319/13q34, CEP12) DC+TC	del(11)(q22.3); del(17)(p13.1); del(13)(q14.3); del(13)(q34); +12	Vysis
ETV6/RUNX1 DC, DF	t(12;21)(p13;q22)	Vysis
BCL6 DC, BA	del(3)(q27)	Vysis
P53/CEP17 DC	del(17)(p13.1)/CEP17	Vysis
ETV6 DC, BA	rearanżacja regionu 12p13	Vysis
ATM/CEP11 DC	del(11)(q22.3)/CEP11	Vysis
IGH/FGFR3 DC, DF	t(4;14)(p16;q32)	Vysis
IGH/MAF DC, DF	t(14;16)(q32;q23)	Vysis
IGH/MYC, CEP8 TC, DF	t(8;14)(q24;q32)	Vysis
IGH/CCND1(BCL1) DC, DF	t(11;14)(q13;q32)	Vysis
IGH/MALT DC, DF	t(14;18)(q32;q21)	Vysis
CDKN2A/CEP9 DC	del(9)(p21)/CEP9	Vysis
BIRC3(API2)/MALT1 DC, DF	t(11;18)(q21;q21)	Vysis
IGH/BCL2 DC, DF	t(14;18)(q32;q21)	Vysis
MLL DC, BA	rearanżacja regionu 11q23	Vysis
FGFR1 8p12 DC, BA	rearanżacja regionu 8p12	Kreatech
1q21/SRD (1p36) DC	ocena ilości kopii loci 1q21 i 1p36	Kreatech
ALK (2p23) DC, BA	rearanżacja regionu 2p23	Vysis
E2A(TCF3)/PBX1 DC, DF	t(1;19)(q23;p13.3)	Vysis
MYB Blue	del(6)(q23)	Vysis
MYC DC, BA	rearanżacja regionu 8q24	Vysis
CEP X/Y DC	ocena chimeryzmu płciowego	Vysis
CEP1; CEP8; CEP12; CEP9 CEP11; CEP17; CEP18, CEP22	ocena ilości kopii chromosomu 1, 8, 9, 11, 12, 17, 18, 22	Vysis
WCP (w zależności od potrzeb)	złożone aberracje chromosomowe	Kreatech

Skróty: BA, break apart - sonda rozdzielna; CEP, sonda centromerowa; DC, dual color - sonda dwukolorowa; DF, BA, dual fusion - sonda fuzyjna (sygnały fuzyjne zlokalizowane na dwóch chromosomach pochodnych); TC, tri-color - sonda trójkolorowa; WCP, sondy malujące całe chromosomy

Załącznik 2. Sekwencje starterów oligonukleotydowych wykorzystywanych w multiplex RT-PCR, stosowanej do oceny jakościowej onkogeny *BCR-ABL1*.

L.p.	Nazwa startera	Sekwencja nukleotydowa	Transkrypt	Wielkość amplikonu	Bibliografia
1	BCR b1A	5' GAA GTG TTT CAG AAG CTT CTCC 3'	BCR-ABL1 e13a2	342pz	[111]
2	ABL1 a3B	5' GTT TGG GCT TCA CAC CAT TCC 3'	BCR-ABL1 e14a2	417pz	
3	BCR e1A	5' GAC TGC AGC TCC AAT GAG AAC 3'	BCR-ABL1 e1a2	521pz	
4	BCR e6S2	5' GAC TTA CCT GAG CCA CCT GGA 3'	BCR-ABL1 e13a3	168pz	[112]
5	BCR c3A	5' ACG GCG AGA GCA CGG ACA 3'	BCR-ABL1 e14a3	243pz	
6	GUSB F	5' CCT GTG ACC TTT GTG AGC AA 3'	GUSB	620pz	[113]
7	GUSB R	5' GTC TGC CGT GAA CAG TCC A 3'			

Załącznik 3. Sekwencje oligonukleotydowe wykorzystywane w badaniu ilościowym genu fuzyjnego *BCR-ABL1* metodą RQ-PCR.

Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja	Długość (nt)	Temperatura topnienia (°C)
b3a2-addF	TCAGCCACTGGATTAAAGCAGA	22	52,4-54,4
ENF501	TCCGCTGACCATCAAyAAGGA	21	
ENR561	CACTCAGACCCTGAGGCTCAA	21	56,3
ENF1102	GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT	26	54,8
ENR1162	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA	22	53,0
ENP541	YakimaYellow CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA BHQ-1	25	62,6
ENPr1142	Cy5 CCAGCACTCTCGTCGGTGACTGTTCA BHQ-3	26	62,7
BCR-B1-A	AAAAGGACAAAAAAGACAGTAATGAGTA TC	30	54,8
ABL-A3-B	GTTTGGGCTTCACACCATTCC	21	54,4
BCR-B2-C	CAGATGCTGACCAACTCGTGT	21	54,4
ABL-A3-D	TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA	23	51,7

Załącznik 4. Sekwencje oligonukleotydowe wykorzystywanych w badaniu wariantów sekwencji domeny kinazowej BCR-ABL1 metodą sekwencjonowania.

Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja	Długość (nt)	Temperatura topnienia
KD1Fn	CTCATCACCACGCTCCATTATCCAG	25	59.3°C
KD3Fn	CTGAGGGAGTGCAACCGGCAGGAG	24	64.2°C
KD3Rn	AGCATGGGCTGTGTAGGTGTCC	22	58.6°C
KD5Rn	CCCCAGCTCCTTTTCCACTTCGTC	24	60.8°C
AuF1 (w przypadku p210)	TGACCAACTCGTGTGTGAAACTC	23	55.3°C
BCR-E1-C (w przypadku p190)	CAGAACTCGCAACAGTCCTTC	21	54.4°C
AuRx	CACGTCAGTGGTGTCTCTGTGC	22	58.6°C

Załącznik 5. Wykaz zastosowanych odczynników.

L.p.	Nazwa odczynnika	Producent
1	4',6-diamidyno-2-fenylindol (DAPI)	Vysis; Abbott Molecular Inc.
2	12-hydrat wodorooortofosforanu (V) disodu	Chempur
3	20xSSC	Vysis; Abbott Molecular Inc.
4	Agaroza BioReagent low EEO	Sigma-Aldrich
5	Alkohol etylowy 96% cz.d.a.	Merck
6	Alkohol izopropylowy	Merck
7	Bufor bezbarwny 10x	Qiagen
8	Chlorek amonu cz.d.a.	Merck
9	Chlorek potasowy cz.d.a.	Chempur
10	Chlorek sodu (NaCl)	Chempur
11	Chlorek magnezu 25mM	Chempur
12	Chloroform	Merck
13	dNTP	Qiagen
14	Fixoguma	Marabu
15	G-CSF (filgrastym 30ug/0,5ml)	Amgen
16	Kolcemid 10ug/ml	PAN Biotech
17	Kwas octowy lodowaty bezwodny	Merck
18	Lazur Giemsy eozyina i błękit metylenowy	Merck
19	LF-7 (Lektyna nieczyszczona z Phaseolus vulgaris)	IBSS Biomed
20	Metanol	Merck
21	Olejek imersyjny do mikroskopii	Merck
22	QIAamp Blood Mini Kit	Qiagen
23	QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
24	QIAxcel DNA Kits	Qiagen
25	QX DNA Size Marker	Qiagen
26	Płodowa surowica bydlęca (FBS)	PAN Biotech
27	PCR Mini Kit	Qiagen
28	Płyn Hanksa z 0,5% hydrolizatem laktoalbuminy i węglanem sodu	Biomed Lublin
29	Podłoże RPMI-1640 z L-glutaminą i wodorowęglanem sodu	Biomed Lublin
30	Polimeraza Taq PCR Core Kit	Qiagen

31	Sondy molekularne do analizy FISH (Załącznik 1)	Vysis; Abbott Molecular Inc. Kreatech
32	Superscript VILO	Life Technologies
33	TRIzol	Life Technologies
34	Trypsyna (1;250) 0,25% w PBS, bez Ca^{2+} , Mg^{2+}	Biochrom
35	Tween 20 (monolaurynian polioksyetylenosorbitanu)	Sigma-Aldrich
36	Wersenian sodu	Sigma-Aldrich
37	Woda dietylopiranowęglanowa wolna od RNA-az	Milipore
38	Wodorowęglan (V) potasu	Chempur
39	Wodorowęglan potasu cz.d.a.	Chempur

Załącznik 6. Wykaz zastosowanej aparatury.

L.p.	Urządzenie	Producent
1	Aparat do elektroforezy agarozowej Delfin AG10	DNA Gdańsk
2	Aparat do elektroforezy kapilarnej QIAxcel	Qiagen
3	Blok grzewczy Thermomixer Comfort	Eppendorf
4	Cieplarka mikrobiologiczna BD-115	Binder
5	Dygestorium WCS-2	Polon
6	Dyspenser elektroniczny Multipipette X-Stream	Eppendorf
7	ThermoBrite - aparat do jednoczesnej hydrydyzacji/denaturacji	Leica Biosystems/Abbott Molecular
8	Inkubator CO ₂ z płaszczem powietrznym Galaxy 170R	New Brunswick
9	Komora laminarna Bioban 48	Steril
10	Łaźnia wodna WB-10/WB-14	Memmert
11	Metafer - automatyczny stolik do wyszukiwania metafaz SCAN 8	Metasystems GMBH
12	Mikroskop AxioImager D1	Zeiss
13	Mikroskop AxioImager Z1	Zeiss
14	Mikroskop AxioImager Z2	Zeiss
15	Mikroskop Optiphot-2	Nikon
16	Sekwenator kapilarny SeqStudio	Thermo Fisher
17	Spektrometr kroplowy NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific
18	System komputerowy wraz z oprogramowaniem do analizy kariotypu (Ikaros) i FISH (Isis)	Metasystems GMBH
19	Termocykler MasterCycler EP Gradient S	Eppendorf
20	Termocykler RotorGene Q	Qiagen
21	Transiluminator VL Infinity VX2	Vilber Lourmat
22	Wirówka Centrifuge 5810R	Eppendorf
23	Wirówka MiniSpin Plus	Eppendorf
24	Wirówka Universal 32R	Hettich
25	Wirówka Universal 320R	Hettich
26	Vortex VELP Wizard	StarLab
27	Zamrażarka New Brunswick Scientific Innova U360	New Brunswick Scientific

Załącznik 7. Charakterystyka powtarzających się CCA/Ph- w kariotypie pacjentów z CCyR.

L.p.	Nr pacjenta	Aberracja w komórkach Ph-ujemnych	Częstość występowania aberracji w komórkach Ph-ujemnych	% metafaz z aberracją	Czas wystąpienia aberracji od rozpoczęcia leczenia TKI (m-ce)	TKI w chwili stwierdzenia aberracji	Odpowiedź molekularna w trakcie stwierdzenia aberracji	Czas od włączenia TKI do ostatniej oceny cytogenetycznej na TKI (m-ce)	Odpowiedź molekularna (ostatnie badanie)
1	5	+mar	3	42-50	6	IM	MMR	36	MR4,5
2	7	-22	2	11-20	78	DA	MR5	132	MR5
		-19	2	10	108	DA, NIL	MR5		
		-21	2	10-20	114	DA, NIL	MR5		
3	8	+8	9	7-26	60	DA	brak MMR	134	brak MMR
		+6	4	3-10	102	DA	brak MMR		
4	10	+8	10	8-96	24	IM, DA	brak MMR	126	MR5
5	12	t(3;9)(p12;q21)	6	57-100	20	IM, NIL	brak MMR	73	MR4
6	13	-21	2	12-15	60	DA, NIL	brak MMR	108	MMR
7	15	-22	3	10-16	30	IM, NIL, DA	MMR	132	MR5
		-Y	2	13-18	60	IM, DA	brak MMR		
		-21	2	8-10	78	DA, NIL	MR5		
8	16	-Y	4	9-17	78	NIL	MR5	138	MR5
		-19	2	10-17	102	NIL	MR5		
		-17	2	9-20	108	NIL	MR5		
		-20	2	9-20	108	NIL	MR5		
		-22	2	9-20	108	NIL	MR5		
		-22	2	9-20	108	NIL	MR5		

9	18	-Y	2	8-27	42	IM, NIL	brak MMR	92	MMR
10	19	-21	2	9-11	18	IM	MR4,5	98	MR5
		-18	2	10-11	54	IM, DA	MMR		
11	20	-14	2	10-13	84	DA	MR4	131	MR4,5
		-18	2	10-14	84	DA	MR4		
		-22	3	11-14	84	DA	MR4		
		-Y	5	11-13	96	DA	MR4		
		-15	2	12-13	114	DA	MR4,5		
		-19	2	12-14	114	DA	MR4,5		
		-21	3	10-18	120	DA	MR4,5		
12	21	+8	4	4-40	58	NIL	MMR	82	brak MMR
13	22	-21	2	13-24	12	IM	MR5	96	MR5
14	23	-Y	11	23-65	30	IM, NIL	brak MMR	75	MR5
		+8	9	3-28	30	IM, NIL	brak MMR		
		-21	3	13-28	54	NIL	MR4		
		-19	2	11-21	59	NIL	MR4		
		-18	3	13-21	72	NIL	MR4,5		
15	32	-21	2	10	58	NIL	MR5	70	MR5
16	36	-20	2	10-11	36	IM	MR4,5	55	MR5
17	37	-19	2	11-13	26	IM	MMR	128	MR4
		-Y	3	8-17	56	IM	MMR		
		-21	2	10-14	104	IM	MR4		
18	38	-3	2	10-12	114	IM, NIL	MMR	159	MR5
		-16	2	10-13	114	IM, NIL	MMR		

		-19	4	13-20	114	IM, NIL	MMR		
		-21	3	13-16	114	IM, NIL	MMR		
		-17	2	10-16	147	NIL	MR4,5		
19	39	-Y	5	8-17	54	IM, DA, NIL	MR4	150	MR5
		-22	4	14-17	102	DA, NIL	MR5		
		-21	3	10-14	108	DA, NIL	MR5		
20	42	-19	3	10-21	78	IM	MR4,5	151	MR4
21	43	-18	2	10	24	IM	brak MMR	70	MR4,5
		-19	2	10-13	40	DA	MMR		
22	47	-21	2	10-13	12	IM, DA	brak MMR	40	brak MMR
23	51	-Y	3	10-23	38	DA	brak MMR	62	MMR
		+6	2	7-10	38	DA	brak MMR		
		+mar	2	7	50	DA	MMR		
24	58	-19	2	10-12	3	IM	brak MMR,	18	MR4,5
		-21	2	10-14	3	IM	brak MMR	18	MR4,5
25	79	-22	2	11-17	66	IM	MR5	102	MR5
26	86	-19	3	10-14	42	DA	MMR	76	MR5
27	91	-15	2	11-19	60	NIL	brak MMR	66	brak MMR
28	93	-19	2	12-18	36	IM	MR5	48	MR5
		-21	2	11-12	36	IM	MR5		
		-22	2	12-25	36	IM	MR5		
29	101	+Y	4	6-9	88	DA	MMR	106	MR4,5
		-21	2	12-19	88	DA	MMR		
30	107	-Y	2	13-16	6	IM	MR4,5	24	MR5

31	130	-22	2	10-15	24	IM	MMR	48	MMR
32	131	-19	2	19	33	IM	brak MMR	51	brak MMR
33	136	-16	2	14-18	6	IM	MMR	48	MR5
34	138	-21	2	10-12	36	IM	MR5	60	MR5
35	142	-21	2	18-23	18	IM	MR4,5	54	MR4
36	151	-21	3	10	24	IM	MR5	54	MR5
		-22	3	10	24	IM	MR5		
37	148	-13	2	11-19	12	IM	MMR	42	MR4,5
		-22	2	13-18	12	IM	MMR		
38	150	-21	2	11-20	18	IM	MR5	30	MR5
39	156	-21	2	11-18	30	IM	brak MMR	78	MR4,5
		-22	2	10-15	30	IM	brak MMR		
40	159	+8	5	7-40	6	IM	brak MMR	30	brak MMR
41	162	+8	4	37-48	51	DA	MMR	80	MR4
		+6	3	4-8	63	DA	MR4		
42	163	-Y	3	55-63	3	IM	brak MMR	12	MR4
		-22	2	10-13	3	IM	brak MMR		
43	164	-21	2	10-13	38	NIL	MR5	74	MR5
44	174	$t(?8;11)(q?13;q22)$	2	3	108	IM	MR4	120	MMR
45	181	-Y	3	20-61	6	IM	MMR	24	MR5
46	189	-20	2	12-13	60	NIL	MR5	108	MR5
		-21	2	14-20	72	NIL	MR5		
		-22	3	15-20	72	NIL	MR5		
		-19	2	13-14	96	NIL	MR5		

47	195	-Y	2	14-17	24	IM	MMR	36	MMR
----	-----	----	---	-------	----	----	-----	----	-----

Skróty: CCA/Ph-, klonalne aberracje w komórkach Ph-ujemnych; CCyR, całkowita odpowiedź cytogenetyczna; mar, chromosom markerowy; MMR, większa odpowiedź molekularna; MR4, głęboka odpowiedź molekularna na poziomie 4log; MR4,5, głęboka odpowiedź molekularna na poziomie 4,5log; MR5, głęboka odpowiedź molekularna na poziomie 5log; TKI, inhibitor kinaz tyrozynowych



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 178/17

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. 2008 Nr 45, poz. 271 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz. U. 2011 nr 82 poz. 451); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 02 lutego 2017 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu: dr hab. Małgorzata Jarmuż-Szymczak prof. PAN

Miejsce prowadzenia badań:

**Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Główny badacz: mgr Błażej Ratajczak

**Członkowie zespołu
badawczego:**

**dr hab. Małgorzata Jarmuż-Szymczak prof. PAN
mgr inż. Anna Przybyłowicz-Chalecka
mgr inż. Joanna Czerwińska-Rybak
prof. dr hab. Krzysztof Lewandowski
dr inż. Michał Gniot
dr n. med. Agata Lehmann-Kopydłowska**

Temat badań:

„Ocena występowania aberracji chromosomowych u chorych z przewlekłą białaczką szpikową w dobie stosowania inhibitorów kinaz tyrozynowych”.

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

Ratajczak B., Gniot M., Przybyłowicz-Chalecka A., Czerwinska-Rybak J., Komarnicki M., Lewandowski K., Jarmuz-Szymczak M. Characterization and significance of the Philadelphia negative/*BCR-ABL1* positive rearrangement or masked Philadelphia translocation in patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors: a single-center study. *Leuk Lymphoma*. 2020 Jan; 61(1):189-193. doi: 10.1080/10428194.2019.1648807.

Lewandowski K., Gniot M., Lewandowska M., Wache A., **Ratajczak B.**, Czyż A., Jarmuz-Szymczak M., Komarnicki M. B-cell chronic lymphocytic leukemia with 11q22.3 rearrangement in patient with chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *Case Rep. Med.* 2016; Vol. 2016, art. 9806515, [s. 1-6].

Lewandowska M., Gniot M., **Ratajczak B.**, Jarmuz-Szymczak M., Lewandowski K. Głęboka odpowiedź molekularna po podaniu dazatynibu w 3. linii terapii u chorego na przewlekłą białaczkę szpikową w fazie przewlekłej. *Hematologia* 2015;6(2):213-217.

Lewandowski K., Lehmann-Kopydłowska A., Gniot M., Czyż A., **Ratajczak B.**, Komarnicki M. Limfocytoza CD4+CD8+ oraz wysięki osierdziowy i opłucny u chorego na przewlekłą białaczkę szpikową w fazie przewlekłej leczonego dazatynibem z powodu niepowodzenia terapii imatynibem. *Hematologia* 2015;6(3):301-307.

Gniot M., Lewandowski K., **Ratajczak B.**, Lewandowska M., Lehmann-Kopydłowska A., Jarmuz-Szymczak M., Komarnicki M. Transient presence of clonal chromosomal aberrations in Ph-negative cells in patients with chronic myeloid leukemia remaining in deep molecular response on tyrosine kinase inhibitor treatment. *Cancer Genet.* 2014; Vol.207(10-12):503-10.

Jarmuz-Szymczak M., Czerwińska-Rybak J., Przybyłowicz-Chalecka A., **Ratajczak B.**, Komarnicki M. Zastosowanie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* w hematologii. *Analiza DNA. Praktyka. pod red.: Ryszarda Słomskiego. Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, 2014; s. 127-145.*

Jarmuz M., Kroll R., Przybyłowicz-Chalecka A., **Ratajczak B.**, Gniot M., Szyfter K., Komarnicki M. Megakaryocytic blast crisis in a chronic myeloid leukemia patient with rare variant of Philadelphia rearrangement t(9;22;22) and constitutional translocation t(3;7). *Cancer Genet. Cytogenet.*; 2010: Vol. 199, nr 1, s. 45-47.

PUBLIKACJE OBEJMUJĄCE TEMATYKĘ SPOZA ZAKRESU PRACY DOKTORSKIEJ

Łuczak M., Kubicki T., Rzetelska Z., Szczepaniak T., Przybyłowicz-Chalecka A., **Ratajczak B.**, Czerwińska-Rybak J., Nowicki A., Joks M., Jakubowiak A., Komarnicki M., Dytfeld D. Comparative proteomic profiling of sera from patients with refractory multiple myeloma reveals potential biomarkers predicting response to bortezomib-based therapy. *Pol Arch Intern Med.* 2017 Jun 30;127(6):392-400. doi: 10.20452/pamw.4032.

Dytfeld D., Łuczak M., Wróbel T., Usnarska-Zubkiewicz L., Brzeźniakiewicz K., Jamroziak K., Giannopoulos K., Przybyłowicz-Chalecka A., **Ratajczak B.**, Czerwińska-Rybak J., Nowicki A., Joks M., Czechowska E., Zawartko M., Szczepaniak T., Grzasko N., Morawska M., Bochenek M., Kubicki K., Morawska M., Tusznió K., Jakubowiak A., Komarnicki M. Comparative proteomic profiling of refractory/relapsed multiple myeloma reveals biomarkers involved in resistance to bortezomib-based therapy. *Oncotarget.* 2016 Aug 30;7(35):56726-56736. doi: 10.18632/oncotarget.11059.

Woroniecka R., Rymkiewicz G., Grygalewicz B., Błachnio K., Rygier J., Jarmuż-Szymczak M., **Ratajczak B.**, Pieńkowska-Grela B. Cytogenetic and flow cytometry evaluation of Richter syndrome reveals *MYC*, *CDKN2A*, *IGH* alterations with loss of CD52, CD62L and increase of CD71 antigen expression as the most frequent recurrent abnormalities. *American Journal of Clinical Pathology*; 2015 Jan; 143(1):25-35.

PREZENTACJE USTNE OBEJMUJĄCE TEMATYKĘ Z ZAKRESU PRACY DOKTORSKIEJ

Ratajczak B., Przybyłowicz-Chalecka A., Czerwińska-Rybak J., Gniot M., Lewandowski K., Komarnicki M., Jarmuż-Szymczak M. Przypadki zamaskowanego chromosomu Philadelphia w przebiegu przewlekłej białaczki szpikowej – badanie jednośrodkowe. *Acta Haemat. Pol.*; 2017: T. 48, Suppl.1, s. 25.

Stefaniak A., Kulikowska A., Pastwińska A., Chmarzyńska-Mróż E., Pawelec K., Matysiak M., Paluszewska M., Tormanowska M., Jędrzejczak W., **Ratajczak B.**, Jarmuż-Szymczak M., Lewandowska M., Gil L., Komarnicki M., Borkowska K., Pieńkowska-Grela B., Haus O., Jaśkowiec A., Stąpor S., Bodzenta E., Górnicka B. Znaczenie rokownicze rearanżacji genu *MECOM (EVI1)* u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową. *Acta Haemat. Pol.*; 2015: T. 46, Suppl.1, s. 5.

Jarmuż-Szymczak M., Czerwińska-Rybak J., **Ratajczak B.**, Przybyłowicz-Chalecka A., Komarnicki M. Zastosowanie FISH w hematologii. 9-10.2014 10. Konferencja „Analiza DNA – praktyka” (Inst. Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich), Poznań.

Ratajczak B., Czerwińska-Rybak J., Przybyłowicz-Chalecka A., Gniot M., Lewandowski K., Lewandowska M., Lehmann-Kopydłowska A., Komarnicki M., Jarmuż-Szymczak M. Brak odpowiedzi cytogenetycznej po leczeniu imatynibem u chorych z przewlekłą białaczką szpikową a rezultat terapii za pomocą IKT 2. generacji. *Acta Haemat. Pol.*; 2013: T. 44, Suppl., s. 26. XXV Zjazd Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów. Poznań, 25-28 września 2013.

Gniot M., Lewandowski K., **Ratajczak B.**, Lewandowska M., Lehmann-Kopydłowska A., Jarmuż-Szymczak M., Komarnicki M. Występowanie przejściowych klonalnych zaburzeń cytogenetycznych w Philadelphia-ujemnych komórkach u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową leczonych inhibitorami kinaz tyrozynowych. *Acta Haemat. Pol.*; 2013: T. 44, Suppl., s. 25. XXV Zjazd Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów. Poznań, 25-28 września 2013.

PREZENTACJE USTNE OBEJMUJĄCE TEMATYKĘ SPOZA ZAKRESU PRACY DOKTORSKIEJ

Kandula Z., Gniot M., Wojtaszewska M., Eling K., Iwoła M., Narkun M., Gil L., Kozłowski P., Nawrocka P., **Ratajczak B.**, Lulkiewicz M., Lewandowski K. Obecność defektów molekularnych i zmian w kariotypie a ekspresja genu *JAK2* u chorych na nadpłytkowość samoistną. *Acta Haemat. Pol.*; 2019: T. 48, Suppl.1, s. 42.

Ratajczak B. Zespół mielodysplastyczny – wyzwanie dla diagnostyki – cytogenetyka. *Konferencja Naukowo-Diagnostyczna, Abbott Laboratories, 5-7.09.2018, Poznań.*

Lewandowski K., **Ratajczak B.**, Kandula Z., Wojtaszewska M., Przybyłowicz-Chalecka A., Gniot M., Eling K., Narkun M., Jarmuż-Szymczak M., Komarnicki M. Relatywnie wysoka częstość współwystępowania mutacji *JAK2* lub *CALR* z klonalnymi aberracjami cytogenetycznymi u chorych na nadpłytkowość samoistną. *Acta Haemat. Pol.*; 2017: T. 48, Suppl.1, s. 108.

Przybyłowicz-Chalecka A., Ratajczak B., Czerwińska- Rybak J., Kolanowska A., Jarmuż- Szymczak M. Wartość diagnostyczna cytogenetyki molekularnej w ostrych białaczkach szpikowych i zespołach mielodysplastycznych. *Konferencja Naukowo- Szkoleniowa- Użyteczność cytogenetyki molekularnej w postępowaniu diagnostyczno- terapeutycznym w onkologii, Licheń 19-20. 04.2016.*

Wojtaszewska M., **Ratajczak B.**, Lewandowska M., Jarmuż-Szymczak M., Komarnicki M., Lewandowski K. Współwystępowanie zaburzeń cytogenetycznych i mutacji genu *JAK2* lub *CALR* u chorych na nowotwory mieloproliferacyjne Filadelfia ujemne. *Acta Haemat. Pol.*; 2015: T. 46, Suppl.1, s. 42.

Dytfeld D., Łuczak M., Przybyłowicz-Chalecka A., **Ratajczak B.**, Czerwińska-Rybak J., Nowicki A., Joks M., Szczepaniak T., Bochenek M., Jakubowiak A., Komarnicki M. Porównawcza ocena proteomu plazmocytów chorych z opornym/nawrotowym szpiczakiem plazmocytowym celem identyfikacji białek oraz szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za oporność na leczenie bortezomibem *Acta Haemat. Pol.*; 2015: T. 46, Suppl.1, s. 55.

SESJE PLAKATOWE OBEJMUJĄCE TEMATYKĘ Z ZAKRESU PRACY DOKTORSKIEJ

Ratajczak B., Przybyłowicz-Chalecka A., Czerwińska-Rybak J., Kopydłowska-Lehmann A., Iwoła M., Kolanowska A., Lewandowski K., Komarnicki M., Jarmuż-Szymczak M. A rare case of chronic myeloid leukemia with transcript e19a2. *V Polski Kongres Genetyki 19-22 wrzesień 2016 Łódź.*

Ratajczak B., Przybyłowicz-Chalecka A., Czerwińska-Rybak J., Gniot M., Lewandowska M., Jarmuż-Szymczak M., Komarnicki M. Translokacja wariantowa z dodatkowymi zaburzeniami kariotypu w przebiegu przewlekłej białaczki szpikowej odpornej na leczenie inhibitorami kinazy tyrozynowej - opis przypadku. *IV Polski Kongres Genetyki. Poznań, 10-13 IX 2013. Streszczenia.*

Ratajczak B., Przybyłowicz-Chalecka A., Czerwińska-Rybak J., Lewandowska M., Komarnicki M., Jarmuż-Szymczak M. Wpływ współwystępowania translokacji wariantowych i innych zaburzeń kariotypu na odpowiedź cytogenetyczną podczas leczenia przewlekłej białaczki szpikowej. *Acta Haemat. Pol.*; 2013: T. 44, Suppl., s. 85-86. *XXV Zjazd Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów. Poznań, 25-28 września 2013.*

Kroll R., Jarmuż M., Przybyłowicz-Chalecka A., **Ratajczak B.**, Gniot M., Komarnicki M. Megakaryocytic blast crisis in patient with rare variant of Philadelphia rearrangement t(9;22;22) and additional translocation t(3;7). *Haematologica*; 2009: Vol. 94 suppl. 2, s. 483. *14th Congress of the European Hematology Association. Berlin, Germany, June 4-7, 2009.*

Kroll R., Jarmuż M., **Ratajczak B.**, Przybyłowicz-Chalecka A., Komarnicki M. Monitorowanie odpowiedzi cytogenetycznej u chorych leczonych z powodu przewlekłej białaczki szpikowej w Klinice Hematologii UM w Poznaniu. *Acta Haemat. Pol.*; 2009: T. 40, nr 2 suppl., s. 187. *XXIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów. Wrocław, 18-20 VI 2009.*

Lewandowski K., Barańska M., Gniot M., Lewandowska M., Iwoła M., Kroll R., Jarmuż M., **Ratajczak B.**, Komarnicki M. Mutacje onkogenu *BCR-ABL1* u chorych z CML leczonych imatynibem: ocena związku z kliniczną, cytogenetyczną i molekularną progresją choroby - doświadczenia jednego ośrodka. *Acta Haemat. Pol.*; 2009: T. 40, nr 2 suppl., s. 208. *XXIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów. Wrocław, 18-20 VI 2009.*

SESJE PLAKATOWE OBEJMUJĄCE TEMATYKĘ SPOZA ZAKRESU PRACY
DOKTORSKIEJ

Przybyłowicz-Chalecka A., **Ratajczak B.**, Czerwińska-Rybak J., Kolanowska A., Komarnicki M., Jarmuż-Szymczak M. *KMT2A* and *MYC* amplification in patients with acute myeloid leukemia. *V Polski Kongres Genetyki 19-22 wrzesień 2016 Łódź.*

Dytfeld D., Usnarska-Zubkiewicz L., Brzeźniakiewicz K., Jamroziak K., Giannopoulos K., Grząsko N., Morawska M., Przybyłowicz-Chalecka A., **Ratajczak B.**, Czerwińska-Rybak J., Nowicki A., Joks M., Czechowska E., Zawartko M., Szczepaniak T., Komarnicki M., Łuczak M., Wróbel T. Proteomic signature predicting complete response to PAD in refractory multiple myeloma patients qualified for autoPBSCT and VD consolidation - multicenter, Polish Myeloma Consortium 001 study. *Haematologica 2016: Vol. 101, suppl. 1, s. 516-517 abstr. E1252. 21th Congress of the European Hematology Association. Copenhagen, Denmark, June 9-12, 2016.*

Dytfeld D., Luczak M., Przybyłowicz-Chalecka A., Ratajczak B., Nowicki A., Czerwińska-Rybak J., Joks M., Szczepaniak T., Bochenek M., Jakubowiak A., Komarnicki M. Comparative proteomic profiling of refractory/relapsed multiple myeloma patient plasma cells reveals biomarkers and pathways involved in bortezomib-based-therapy resistance. *ASH 2015 Annual Meeting Abstract; 2986*

Przybyłowicz-Chalecka A., **Ratajczak B.**, Czerwińska-Rybak J., Komarnicki M., Jarmuż-Szymczak M. Zaangażowanie długiego ramienia chromosomu pary 11 w aberracje występujące u pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML). *Acta Haemat. Pol.; 2013: T. 44, Suppl., s. 78. XXV Zjazd Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów. Poznań, 25-28 września 2013.*

Przybyłowicz-Chalecka A., Wojtkowiak-Szlachcic A., Czerwińska-Rybak J., **Ratajczak B.**, Gil L., Jarmuż-Szymczak M., Komarnicki M. Złożony kariotyp u pacjentki z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej typu M1. *IV Polski Kongres Genetyki. Poznań, 10-13 IX 2013.*

Czerwińska J., Wojtkowiak-Szlachcic A., Przybyłowicz-Chalecka A., **Ratajczak B.**, Jarmuż M., Kroll R., Komarnicki M. Analiza cytogenetyczna pacjentki z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej typu M6. *III Polski Kongres Genetyki. XVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Genetycznego. VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka. Lublin, 12-15 IX 2010.*

POZOSTAŁA AKTYWNOŚĆ

Udział w projektach naukowych:

- AML - projekt CPTAC.
Międzynarodowy Instytut Onkologii Molekularnej Poznań.
- Proteomic profiling of multiple myeloma cells using iTRAQ quantitative proteomics for the prediction of complete and near complete response to the second line treatment with bortezomib based chemotherapy.
UMP Poznań.
- Phase 3 Randomized trial of carfilzomib, lenalidomide, dexamethasone versus lenalidomide alone after stem-cell transplant for multiple myeloma.
PMC006 (ATLAS) Polish Myeloma Consortium.
- Proteomiczna ocena komórki szpiczaka plazmocytozowego celem określenia białek oraz szlaków sygnałowych zaangażowanych w nabytą oporność na inhibitory proteasomów.
Narodowe Centrum Nauki nr N N403 153140.
- PRE-emptive DAratumumab Therapy of minimal Residual disease reappearance or biochemical relapse in multiple myeloma.
PMC008 (PREDATOR) Polish Myeloma Consortium.
- Randomizowane, otwarte badania kliniczne fazy 3, porównując zastosowanie Karfilzomibu w skojarzeniu z Lenalidomidem i Deksametazonem (KRd vs. VRd) u chorych z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmocytozowym.
PMC010 (COBRA) Polish Myeloma Consortium.
- Phase 1/2 study of liposomal anthracycline for the treatment of subjects with acute myeloid leukemia (AML) that is refractory to or relapsed after standard induction therapy.
MB-105 Moleculin.

Specjalista z zakresu Laboratoryjnej Genetyki Medycznej.

Członek Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka.

Członek Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów (oddział poznański).

Członek Zarządu Fundacji „Pomoc Chorym na Białaczkę”.

Przewodniczący sesji VI: Diagnostyka laboratoryjna zespołów mielodysplastycznych.
Konferencja Naukowo-Diagnostyczna, Abbott Laboratories, 5-7.09.2018, Poznań.

Uczestnictwo w kursie *Cytogenetics and Molecular Genetics. Applied for the study of Hematological Neoplasms. Josep Carreras Leukemia Research Institute, Badalona, Spain 30-31.05.2017.*

Udział w organizacji VI edycji konferencji naukowo-szkoleniowej: *Laboratoryjna Diagnostyka Hematologiczna. 25.04.2017; Poznań.*

Udział w organizacji XII Ogólnopolskich Warsztatów Cytogenetyki Hematoonkologicznej.
2-3.06.2011; Poznań

