

**MAGDALENA ZAWADA**

**Zastosowanie ilościowej PCR (RQ-PCR)  
w monitorowaniu choroby resztkowej u chorych na  
przewlekłą białaczkę szpikową**

*Praca doktorska*

Promotor: **Prof. dr hab. med. Aleksander B. Skotnicki**

Pracę wykonano w Katedrze i Klinice Hematologii CMUJ  
Kierownik jednostki: Prof. dr hab. med. Aleksander B. Skotnicki

Kraków 2007

*Składam serdecznie podziękowania  
Panu Profesorowi Aleksandrowi B. Skotnickiemu  
za umożliwienie mi wykonania niniejszej Pracy,  
opiekę w czasie studiów doktoranckich,  
wsparcie, zaufanie, serdeczność i ogromną życzliwość.  
Dziękuję Panu Doktorowi Tomaszowi Sacha  
Za zainteresowanie mnie tematem pracy  
a także za nieocenioną pomoc i zaangażowanie w jej przygotowaniu.  
Z całego serca dziękuję mojej Rodzinie za cierpliwość i wsparcie.*

*Niniejszą Pracę dedykuję Moim Kochanym Rodzicom*

# SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	7
<b>WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....</b>	<b>7</b>
<b>ROZDZIAŁ I .....</b>	<b>9</b>
<b>WSTĘP.....</b>	<b>9</b>
1.1. CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA PRZEWLEKLEJ BIAŁACZKI SZPIKOWEJ.....	9
<b>WSTĘP.....</b>	<b>10</b>
1.2. MOLEKULARNE PODŁOŻE CML.....	10
1.3. SZLAKI SYGNAŁOWE KINAZY TYROZYNOWEJ.....	12
1.3.1. <i>Zmiany w cytoszkielecie oraz adhezji komórkowej</i> .....	14
1.3.2. <i>Sygnały proliferacyjne</i> .....	14
1.3.3. <i>Sygnały antyapoptotyczne</i> .....	14
1.4. MOŻLIWOŚCI LECZNICZE CHORYCH NA CML.....	15
1.4.1. <i>Allogeniczne przeszczepienie komórek hematopoetycznych</i> .....	15
1.4.2. <i>Leczenie cytoredukcyjne</i> .....	15
1.4.3. <i>Terapia interferonem <math>\alpha</math></i> .....	15
1.4.4. <i>Terapia imatinibem</i> .....	16
1.5. METODY STOSOWANE W DIAGNOSTYCE ORAZ MONITOROWANIU CHOROBY RESZTKOWEJ W CML.....	17
1.5.1. <i>Sposoby wyrażania odpowiedzi na terapię u chorych na CML</i> .....	19
1.5.2. <i>Technika RQ-PCR</i> .....	20
<b>ROZDZIAŁ II.....</b>	<b>22</b>
<b>CELE PRACY.....</b>	<b>22</b>
<b>CELE PRACY.....</b>	<b>23</b>
<b>ROZDZIAŁ III.....</b>	<b>24</b>
<b>MATERIAŁY I METODY.....</b>	<b>24</b>
3. 1. CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ.....	25
<b>MATERIAŁY I METODY.....</b>	<b>25</b>
3.1.1. <i>Liczebność grupy i kryteria włączenia</i> .....	25
3.2. NARZĘDZIA BADAWCZE.....	26
3.2.1. <i>Odczynniki</i> .....	26
3.2.2. <i>Aparatura</i> .....	26
3.3. METODYKA.....	27
3.3.1. <i>Izolacja komórek jednojądrzastych ze szpiku kostnego</i> .....	27
3.3.2. <i>Izolacja RNA</i> .....	27
3.3.3. <i>Spektrofotometryczny pomiar RNA</i> .....	27
3.3.4. <i>Reakcja odwrotnej transkrypcji (synteza cDNA)</i> .....	28
3.3.5. <i>Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) (analiza jakościowa)</i> .....	28
3.3.5.1. <i>Warunki reakcji PCR multipleks</i> .....	30
3.3.5.2. <i>Warunki reakcji PCR gniazdowej (nested)</i> .....	31
3.3.5.3. <i>Analiza produktów PCR</i> .....	32
3.3.6. <i>RQ-PCR (analiza ilościowa w czasie rzeczywistym)</i> .....	32
3.3.6.1. <i>Wybór genu kontrolnego do analizy RQ-PCR</i> .....	36
3.3.6.2. <i>Warunki reakcji RQ-PCR</i> .....	37
3.4. SPOSÓB WYRAŻANIA I ANALIZY WYNIKÓW .....	38
3.4.1. <i>RT-PCR</i> .....	38
3.4.2. <i>RQ-PCR</i> .....	39
3.5. ZAPOBIEGANIE KONTAMINACJOM.....	40

3.6. ANALIZA STATYSTYCZNA.....	40
<b>ROZDZIAŁ IV.....</b>	<b>42</b>
<b>WYNIKI.....</b>	<b>42</b>
4.1. WYBÓR GRUPY BADANEJ.....	43
<b>WYNIKI.....</b>	<b>44</b>
4.2. TECHNIKI RQ-PCR ORAZ RT-PCR.....	43
4.2.1. Opracowanie optymalnej metody izolacji RNA i kolejnych etapów polimerazowej reakcji łańcuchowej.....	43
4.2.1.1. Izolacja materiału genetycznego (RNA).....	43
4.2.1.2. Sposób przeprowadzania reakcji odwrotnej transkrypcji.....	46
4.2.1.3. Ustalenie czułości wykrywania transkryptu BCR-ABL techniką RT-PCR.....	46
4.2.2. Ustalenie parametrów krzywej standardowej.....	48
4.2.3. Czulość testu RQ-PCR.....	50
4.3. OCENA CHOROBY RESZTKOWEJ.....	51
4.3.1. Wyniki analiz RT-PCR.....	51
4.3.2. Wyniki analiz RQ-PCR.....	51
4.3.3. Kinetyka zmian liczby kopii transkryptu BCR-ABL u badanych chorych.....	54
4.3.4. Porównanie spadku ilości transkryptu po 12 miesiącach terapii Imatinibem.....	57
4.3.5. Porównanie wyników RQ-PCR z wynikami RT-PCR.....	58
4.3.6. Porównanie wyników RQ-PCR z wynikami uzyskanymi techniką cytogenetyki klasycznej.....	60
4.3.7. Korelacja wyników badania techniką RQ-PCR z przebiegiem klinicznym CML.....	62
<b>ROZDZIAŁ V.....</b>	<b>64</b>
<b>DYSKUSJA.....</b>	<b>64</b>
5.1. WPROWADZENIE.....	65
<b>DYSKUSJA.....</b>	<b>65</b>
5.2. IZOLACJA MATERIAŁU OD PACJENTÓW.....	65
5.3. WYBÓR ODPowiedNIEGO MATERIAŁU DO BADAŃ.....	66
5.4. JAKOŚCIOWA OCENA CHOROBY RESZTKOWEJ NA PODSTAWIE GENU FUZYJNEGO.....	66
5.5. ILOŚCIOWA ANALIZA KINETYKI TRANSKRYPTU BCR-ABL.....	68
5.5.1. Wybór genu kontrolnego.....	68
5.5.2. Sposoby wyrażania wyników RQ-PCR.....	69
5.5.3. Analiza czułości RQ-PCR.....	70
5.5.4. Częstość wykonywania badania RQ-PCR.....	70
5.5.5. Rodzaje odpowiedzi na terapię.....	70
5.5.6. Korelacja wyników uzyskanych metodami molekularnymi oraz cytogenetycznymi.....	72
5.5.7. Leczenie przewlekłej białaczki szpikowej.....	74
5.5.8. Standard w badaniach diagnostycznych i monitorujących leczenie chorych na CML.....	75
5.6. PODSUMOWANIE.....	76
<b>ROZDZIAŁ VI.....</b>	<b>78</b>
<b>WNIOSKI.....</b>	<b>78</b>
<b>WNIOSKI.....</b>	<b>79</b>
ANEKS – TABEL.....	80
<b>ANEKS.....</b>	<b>80</b>
SPIS TABEL.....	86
<b>SPIS TABEL.....</b>	<b>86</b>
SPIS RYCIN.....	87
<b>SPIS RYCIN.....</b>	<b>88</b>
STRESZCZENIE.....	89
<b>STRESZCZENIE.....</b>	<b>91</b>

SUMMARY.....	91
<b>ROZDZIAŁ VII.....</b>	<b>92</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>92</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>101</b>

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

**ABL** – gen kontrolny *ABL*

**ACC** (*Accelerated Phase*) – faza akceleracji

**Allo-BMT** (*allogeneic Bone Marrow Transplantation*) – allogeniczna transplantacja szpiku kostnego

**Auto-PBSCT** (*autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation*) – autologiczna transplantacja komórek macierzystych krwi obwodowej

**ARA-C** – arabinozyd cytozyny

**BC** (*Blast Crisis*) – kryza blastyczna

**BCR-ABL** – gen fuzyjny *BCR-ABL*

**BCR-ABL/ABL** – stosunek genu fuzyjnego *BCR-ABL* do genu kontrolnego *ABL*

**BMT** (*Bone Marrow Transplantation*) - przeszczep szpiku kostnego

**BU** – Busulfan

**CF** (*Conversion Factor*) – czynnik korygujący

**CML** (*Chronic Myeloid Leukemia*) – przewlekła białaczka szpikowa

**CHR** (*Complete Hematological Remission*) – całkowita remisja hematologiczna

**CP** (*Chronic Phase*) – faza chroniczna

**DNA** (*deoxiribonucleic acid*) – kwas deoksyrybonukleinowy

**cDNA** (*complementary DNA*) – DNA komplementarne

**EAC program** (*Europe Against Cancer Program*) – program Europa przeciwko rakowi

**ELN** (*European Leukemia Net*) – Europejska Sieć Białaczkowa

**FISH** (*Fluorescence in situ Hybridisation*) – miejscowa hybrydyzacja fluorescencyjna

**HR** (*Hematologic Response*) – remisja hematologiczna

**HU** (*Hydroxyurea*) – Hydroksymocznik

**INF $\alpha$**  (*Interferone  $\gamma$* ) - interferon  $\gamma$

**IRIS** (*International Randomised Study of Interferon versus STI571*) – międzynarodowe randomizowane badania dotyczące leczenia pacjentów Interferonem w porównaniu do leczenia Imatinibem

**Mini-ICE** – schemat chemioterapii: mini - Idarubicyna, Ara-C, Etopozyd

**MCR** (*Major Cytogenetic Response*) - większa odpowiedź cytogenetyczna

**MMR** (*Major Molecular Response*) – większa odpowiedź molekularna

**MR** (*Molecular Remission*) – remisja molekularna

**mRNA** (*messenger Ribonucleid Acid*) -kwas rybonukleinowy informacyjny

**MRD** (*Minimal Residual Disease*) – minimalna choroba resztkowa

**NF- $\kappa$ B** (*Nuklear Factor  $\kappa$ B*) - czynnik jądrowy  $\kappa$ B

**PCR** (*Polimerase Chain Reaction*) – polimerazowa reakcja łańcuchowa

**Ph** - chromosom *Philadelphia*

**RQ-PCR** (*Real-time Quantitative PCR*) - ilościowa PCR w czasie rzeczywistym

**RT-PCR** (*Reverse Transcriptase – Polimerase Chain Reaction*) – Reakcja PCR poprzedzona odwrotną transkrypcją

**STAT** – kinaza STAT

**STI571** (*Signal Transduction Inhibitor*) - inhibitor transdukcji sygnału 571

**Jak** – kinaza Jak



Rozdział I

WSTĘP

### **1.1. Charakterystyka kliniczna przewlekłej białaczki szpikowej**

Przewlekła białaczka szpikowa (*CML – Chronic Myeloid Leukemia*) powstaje w wyniku mutacji niezróżnicowanych, multipotencjalnych komórek macierzystych szpiku kostnego. CML jest chorobą nabytą i stanowi ok.15% wszystkich białaczek, występuje we

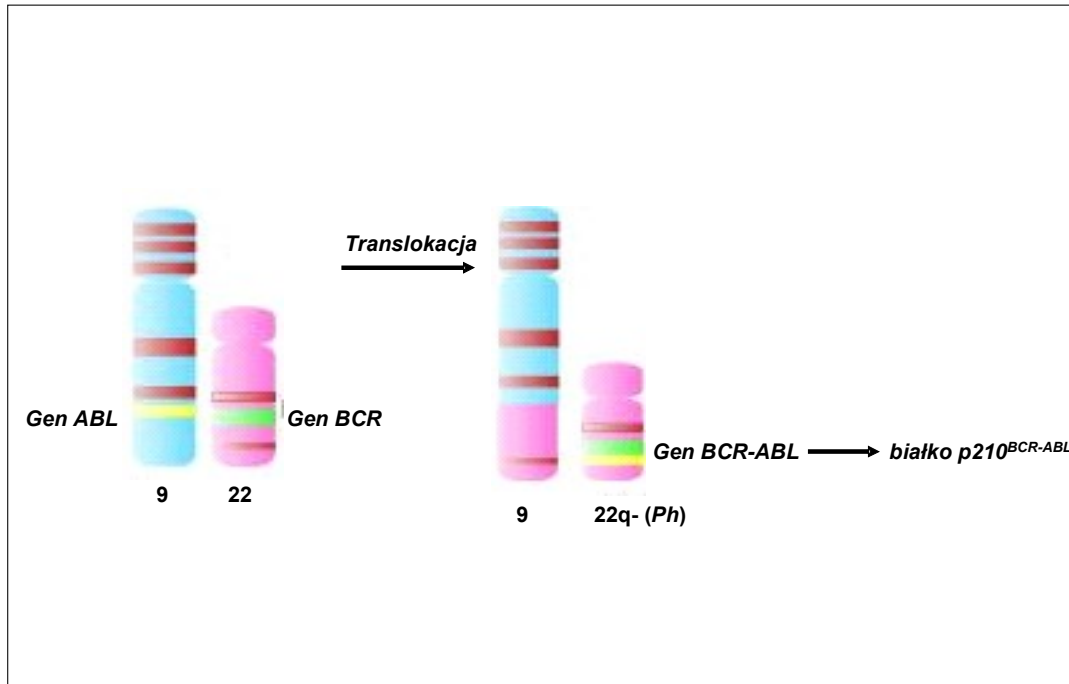
wszystkich grupach wiekowych, jednak najczęściej u osób pomiędzy 55 a 60 rokiem życia, częstość jej występowania wynosi 1 - 1,5: 100 000 osób rocznie [1, 2].

Klinicznie CML charakteryzuje się typowym trójfazowym przebiegiem. Choroba ta najczęściej diagnozowana jest we wstępnej fazie przewlekłej (CP – *Chronic Phase*), której czas trwania wynosi średnio 3 – 5 lat. Początkowo przebiega ona zwykle skąpoobjawowo. Do objawów klinicznych należą: zmęczenie, utrata apetytu, utrata wagi, zwiększone pocenie się. Jeśli występuje splenomegalia (powiększona śledziona), pacjenci mogą odczuwać dyskomfort w obrębie jamy brzusznej. W naturalnym przebiegu choroby dochodzi do progresji przebiegającej poprzez fazę akceleracji (AP – *Accelerated Phase*). Fazę tę można rozpoznać po gwałtownym podwojeniu leukocytozy, obecności więcej niż 10% komórek blastycznych w krwi obwodowej lub szpiku kostnym, zwiększenie liczby płytek krwi  $>1\ 000\ 000/\text{ul}$  czy pojawienie się dodatkowych aberracji cytogenetycznych. Podczas tej fazy, w niektórych przypadkach może występować gorączka, poty nocne lub powiększona śledziona [3].

Obraz kliniczny kryzy blastycznej (BC – *Blast Crisis*) zbliżony jest do ostrej białaczki i charakteryzuje się nasiloną proliferacją w obrębie jam szpikowych i poza nimi, opornością na leczenie cytostatyczne oraz złym rokowaniem [4]. Towarzyszą jej zwykle charakterystyczne objawy: utrata wagi, gorączka oraz bóle kostne. U chorych może również występować obniżone stężenie hemoglobiny, nawracające infekcje oraz krwawienia. Podczas kryzy blastycznej komórki białaczkowe mogą naciekać inne tkanki. W obrazie morfologicznym krwi obwodowej występuje zwykle podwyższona liczba leukocytów ( $30\text{-}100 \times 10^9/\text{l}$  lub więcej) [3].

## 1.2. Molekularne podłoże CML

W 1960 roku wyjaśniono podstawowe mechanizmy powstawania przewlekłej białaczki szpikowej. Nowell oraz Hungerford na łamach *Science* opublikowali odkrycie, że u chorych na CML występuje charakterystyczna aberracja chromosomalna tzw. chromosom *Philadelphia* (*Ph'*) [5]. Dziś wiadomo, że ta charakterystyczna anomalia chromosomowa występuje w komórkach macierzystych układu hematopoetycznego u 95% chorych na CML. W 1973 roku, Janett Rowley dzięki zastosowaniu techniki prążkowej identyfikacji chromosomów wykazała, że chromosom ten powstaje w wyniku wzajemnej translokacji pomiędzy długimi ramionami chromosomów 9 oraz 22 pary -  $t(9;22)(q34;q11)$  [6]. Molekularnym ekwiwalentem chromosomu *Ph* jest gen fuzyjny *BCR-ABL* powstający z połączenia końca 5' genu *BCR* zlokalizowanego na chromosomie 22 (22q11) oraz prawie całą kodującą sekwencją protoonkogenu *ABL* z chromosomu 9 (9q34) [7] (Rycina 1.1).



**Rycina 1.1.** Schemat przedstawiający powstawanie genu *BCR-ABL*

Gen *BCR-ABL* koduje białko enzymatyczne obdarzone patologicznie wysoką aktywnością kinazy tyrozynowej [4]. W eksperymentach na zwierzętach udowodniono istotną patofizjologiczną rolę powyższego białka w powstawaniu i rozwoju przewlekłej białaczki szpikowej. U większości pacjentów miejsca połączenia genu *ABL* z genem *BCR* różnią się ze względu na możliwe trzy regiony pękania genu *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*):

- a) *M-bcr* (*major breakpoint cluster region*) - region ulokowany pomiędzy 12 i 16 egzonem (b1 do b5) o wielkości 5.8 pz (par zasad). W wyniku fuzji tych miejsc z dużym intronem leżącym pomiędzy egzonem 1b i 2 (a2) genu *ABL* powstaje mRNA kodujące białko o masie 210kDa ( $p210^{BCR-ABL}$ ). U większości pacjentów cierpiących na CML regiony te składają się na transkrypt b2a2 (40%) lub b3a2 (55%). U 5% przypadków, w wyniku alternatywnego składania RNA mogą powstawać równocześnie obie formy tego białka [8]. Występowanie jednego bądź drugiego typu translokacji nie ma znaczenia prognostycznego [9].
- b) *m-bcr* (*minor breakpoint cluster region*) - sekwencja o wielkości 55 pz leżąca pomiędzy dwoma egzonami alternatywnymi i egzonem 2. W przypadku *m-bcr*, gen fuzyjny powstaje w wyniku połączenia pierwszego egzonu (e1) genu *BCR* z egzonem drugim (a2) genu *ABL*. Koduje on białko o masie 190 kDa ( $p190^{BCR-ABL}$ ) rzadko występujące u pacjentów z CML,

natomiast występuje u 60% pacjentów cierpiących na ostrą białaczkę limfoblastyczną z obecnym chromosomem Ph' (ALL Ph+) [8].

- c)  $\mu$ -bcr (*micro breakpoint cluster region*) umiejscowiony jest pomiędzy egzonem 19 i 20 genu *BCR*. W wyniku fuzji egzonu 19 (c3) z egzonem 2 genu *ABL* powstaje mRNA kodujące duże białko o masie 230 kDa (p230<sup>BCR-ABL</sup>) występujące jednak stosunkowo rzadko [8].

Sporadycznie, u pacjentów z CML sekwencje *BCR* łączą się z egzonem a3 zamiast a2 genu *ABL* [10]. Wszystkie powyższe białka wykazują aktywność kinaz tyrozynowych - enzymów odpowiedzialnych za kontrolę sygnału transdukcji zależną od cytokin. Ich zwiększona ekspresja prowadzi do niekontrolowanej proliferacji komórek hematopoetycznych, uniezależnienia ich wzrostu od obecności cytokin, zahamowania procesu apoptozy i różnicowania oraz powoduje powstawanie anomalii w cytoszkieletcie [11].

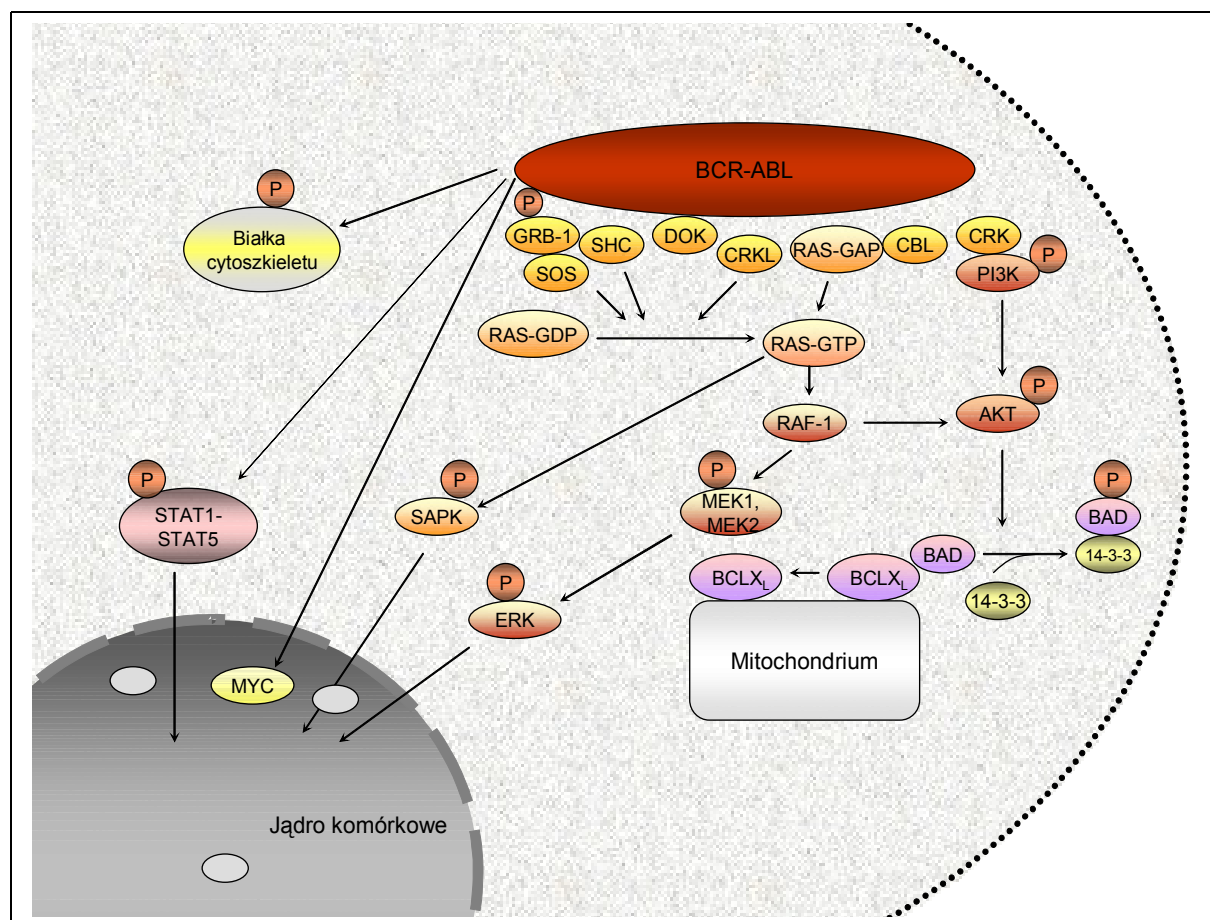
### 1.3. Szlaki sygnałowe kinazy tyrozynowej

Białko fuzyjne p210<sup>BCR-ABL</sup> posiada szereg domen, z których najważniejszą jest domena wykazująca aktywność kinazy tyrozynowej. Kinaza tyrozynowa kodowana przez homolog 1 SRC domeny *ABL* pełni kluczową rolę w transformacji nowotworowej [12]. Inne domeny pełniące ważne funkcje to: SH2 - odpowiedzialna za interakcję białko-białko oraz domena zlokalizowana w części C-końca wchodząca w interakcję z aktyną. W domenie pochodzącej od białka *BCR* najważniejszą funkcję pełnią: fragment skręt – skręt kodowany przez pierwszy egzon genu *BCR* odpowiedzialny za dimeryzację białka nowotworowego; tyrozyna w leżąca pozycji 177 pełniąca kluczową rolę w przyłączaniu białek adaptorowych (jak białko łączące się z receptorem czynnika wzrostu), fosfoseryna oraz fosfotreonina zlokalizowane przy N-końcu odpowiedzialne za interakcje z białkami (w tym również z białkiem *ABL*) zawierającymi element SH2 [7]. W komórkach z translokacją nowotworową obserwuje się aktywację białek należących do ścieżek sygnałowych różnych efektorów RAS, RAC, RAF-1, PI-3k/Akt, MAPK/ERK, białek SAPK/JNK aktywowanych pod wpływem mitogenów, czynnika jądrowego  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) oraz transduktorów sygnału i aktywatorów transkrypcji STAT [13]. Większość tych interakcji przebiega na drodze fosforylacji tyrozyny i wymaga przyłączenia kinazy *BCR-ABL* do białek adaptorowych takich jak GRB-2, DOK, CRK, CRKL, SHC oraz CBL. Listę innych białek substratowych dla kinazy *BCR-ABL* przedstawiono w tabeli 1.1 [12].

**Tabela 1.1.** Białka substratowe dla kinazy *BCR-ABL* [12]

NAZWA BIAŁKA	PEŁNIONA FUNKCJA
Białko łączące się z receptorem dla czynnika wzrostu	Białko adaptorowe

(GRB-2)	
DOK	Białko adaptorowe
CRK	Białko adaptorowe
SHC - Białko zawierające homologi SRC	Białko adaptorowe
Talina	Cytoszkielek i błona komórkowa
Paksylina	Cytoszkielek i błona komórkowa
FAK	Cytoszkielek i błona komórkowa
FES	Różnicowanie mieloidalne
RAS – białko aktywujące GTPazę	GTPasa RAS
Fosfolipaza C- $\gamma$ (PLC- $\gamma$ )	Fosfolipaza
GCKR	Kinaza serynowo-treoninowa
Kinaza fosfatydyloinozytolu 3	Kinaza serynowa
Białko wchodzące w interakcję z ABL (1 oraz 2)	Supresja nowotworowa
Syp	Fosfataza cytoplazmatyczna
Inozytol 5' fosfataza zawierająca SH2 (SHIP1, SHIP2)	Fosfataza cytoplazmatyczna
BAP-1	Białko 14-3-3
VAV	Różnicowanie hematopoetyczne



Rycina 1.2. Szlaki transdukcji sygnału poprzez kinazę BCR-ABL [12]

### 1.3.1. Zmiany w cytoszkielecie oraz adhezji komórkowej

Patologiczna kinaza BCR-ABL oddziałuje z cytoszkieletem komórkowym poprzez aktywną domenę przy C-końcu kinazy ABL. Wiele białek strukturalnych oraz enzymatycznych łączących się ze szkieletem aktynowym i kompleksami adhezyjnymi wchodzi w interakcję lub są substratami dla kinazy BCR-ABL. Są to białka takie jak paksylina, vinkulina, tensyna, kinaza p125 FAK, p210 CBL, cCRK, oraz CRK-L. Ponadto, w proces ten zaangażowane jest też białko z rodziny GTPaz Rho, RAC1. Wszystkie wymienione interakcje prowadzą do zahamowania adhezji komórek CML do komórek podścieliska w szpiku kostnym [14].

### 1.3.2. Sygnały proliferacyjne

Ekspresja kinazy BCR-ABL w komórkach hematopoetycznych prowadzi do ich niekontrolowanego wzrostu i przeżycia bez wymaganych czynników wzrostu. Droga PI-3k/Akt jest kluczowym mechanizmem odpowiedzialnym za wzrost komórek CML a jej aktywacja jest niezbędna w procesie proliferacji komórek *Ph+* [14]. Wiele jest mechanizmów tej aktywacji ze względu na mnogość interakcji tej drogi przekazywania sygnałów z kinazą tyrozynową BCR-ABL poprzez wiele domen. Może ona przebiegać przede wszystkim poprzez domenę SH2 białka p85 oraz domenę SH3 kinazy i region bogaty w prolinę białka p85 a także poprzez inne białka takie jak RAS, SHC, CRKL, GRB-2, GAP lub c-CBL, które mogą również wpływać na aktywację PI-3k. Raz zaktywowana kinaza PI-3 może pociągać za sobą wiele zdarzeń powstałych na drodze aktywacji kinazy Akt [15].

### 1.3.3. Sygnały antyapoptotyczne

Do ścieżek zaangażowanych w przekaz sygnału apoptotycznego pochodzącego od kinazy BCR-ABL należą PI-3/Akt, STAT5 oraz NFκB [16]. Ponadto, BCR-ABL wywołuje przedłużoną aktywację punktu kontrolnego w fazie G2 cyklu komórkowego poprzez utrzymywanie fosforylacji białka CDC2, co prowadzi do zahamowania procesu apoptozy [14]. Kinaza BCR-ABL oddziałuje na antyapoptotyczne białka Bcl-x<sub>L</sub> oraz Bcl-2, a także na proapoptotyczne białko Bad. Zahamowanie apoptotycznego szlaku zależnego od białka STAT5 przebiega poprzez domenę SH2 oraz SH3 kinazy BCR-ABL co prowadzi do podwyższonej ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-x<sub>L</sub> [13, 17]. Z kolei, kinaza serynowo-treoninowa Akt aktywowana poprzez BCR-ABL, może prowadzić do fosforylacji oraz aktywacji białka Bad, które utrzymywane jest w kompleksie z białkiem 14-3-3 z dala od mitochondrium. To z kolei może zapobiegać uwolnieniu cytochromu c z mitochondrium i aktywować kaspazę 3 [12]. Antyapoptotyczne działanie czynnika jądrowego κB aktywowanego przez kinazę BCR-ABL

przebiega natomiast na drodze jego nasilonej translokacji do jądra komórkowego i regulacji transkrypcji genów [18].

## **1.4. Możliwości lecznicze chorych na CML**

### **1.4.1. Allogeniczne przeszczepienie komórek hematopoetycznych**

Powodzenie terapii u chorych na CML zależy od stopnia redukcji wielkości klonu białaczkowego. Szansę znacznego przedłużenia życia oraz trwałego wyleczenia z przewlekłej białaczki szpikowej stwarza allogeniczne przeszczepienie komórek hematopoetycznych (allo-HSCT). Tego typu leczenie stosowane jest jedynie u ok. 30% chorych na CML, zwykle pacjentów młodych (do 35 roku życia) dla których możliwe jest znalezienie zgodnego w głównym układzie antygenów tkankowych (HLA) dawcy rodzinnego. Pozostała część chorych ma szansę znalezienia zgodnego w HLA dawcy niespokrewnionego, jednak możliwość taka istnieje również tylko dla ok. 30% pacjentów. Metoda przeszczepiania komórek hematopoetycznych mimo ciągłych udoskonaleń związana jest wciąż z wysoką śmiertelnością sięgającą 20-30% oraz wysokim ryzykiem powikłań i nie znajduje zastosowania w grupie starszych chorych [19].

### **1.4.2. Leczenie cytoredukcyjne**

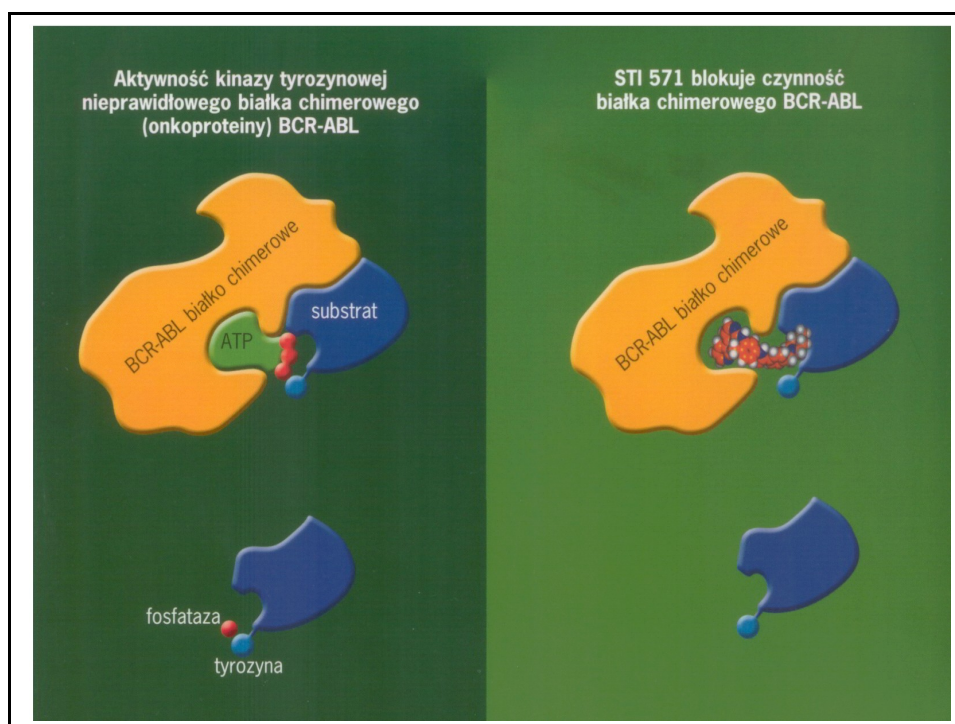
W leczeniu cytoredukcyjnym stosuje się busulfan i hydroksykarbamid. Doprowadzają one do unormowania parametrów krwi obwodowej jednak nie powodują usunięcia klonu komórek *Ph+* a tym samym nie wpływają na przebieg choroby oraz na długość przeżycia [20].

### **1.4.3. Terapia interferonem $\alpha$**

Istnieje kilka możliwości leczenia farmakologicznego (zachowawczego) CML. Należy do nich między innymi terapia interferonem alfa ( $IFN\alpha$ ). Działanie antyproliferacyjne tego leku polega na wydłużaniu cyklu komórkowego poprzez hamowanie syntetazy 2'-5'-oligoadenylowej i modulację onkogenów takich jak *c-fos*, *c-myc* oraz *h-ras* [21].  $IFN\alpha$  powoduje także zmniejszenie stężenia metabolitów niezbędnych do podziałów komórkowych.  $IFN\alpha$  stymuluje także wytwarzanie przeciwciał powodujących lizę komórek nowotworowych, zwiększa ekspresję niektórych antygenów na powierzchni komórek, co ułatwia ich rozpoznawanie i niszczenie przez limfocyty cytotoksyczne [22]. Odpowiedź cytogenetyczna uzyskana w trakcie tego leczenia koreluje z długością przeżycia i może być uważana za czynnik prognostyczny [3].

#### 1.4.4. Terapia imatinibem

W ostatnich latach nastąpił istotny przełom w leczeniu farmakologicznym przewlekłej białaczki szpikowej. Pojawiła się bowiem możliwość leczenia pacjentów przy pomocy leku działającego selektywnie i kompetytywnie na patologiczną kinazę tyrozynową BCR-ABL. Imatinib (Glivec™) ma zdolność blokowania miejsca aktywnego wszystkich poznanych odmian kinazy BCR-ABL. Współzawodniczy on z ATP (adenozynotrifosforan) o miejsce wiązania w specyficznym miejscu domeny kinazy, hamując fosforylację białka bcr-abl. Uniemożliwia to jej interakcję z białkami substratowymi przekazującymi sygnał proliferacyjny do jądra komórkowego i wywołuje apoptozę komórek białaczkowych. IFN $\alpha$  i Imatinib są w stanie wpłynąć na naturalny przebieg choroby, ponieważ obniżają ilość komórek białaczkowych [3].



**Rycina 1.3.** Schemat działania Imatinibu [23]

Zastosowanie Imatinibu wskazane jest w leczeniu świeżo rozpoznanej białaczki szpikowej z chromosomem *Philadelphia* u pacjentów, którzy z różnych powodów nie są kwalifikowani do zabiegu allogenicznej transplantacji szpiku, u pacjentów w fazie przewlekłej odpornej na leczenie IFN $\alpha$  lub w bardziej zaawansowanych fazach choroby. Celem leczenia Imatinibem jest uzyskanie całkowitej remisji cytogenetycznej (CCR – *Complete Cytogenetic Remission*), obserwuje się także remisje na poziomie molekularnym. W związku z tym w



ostatnich latach niezwykle istotnego znaczenia nabrało zagadnienie odpowiedniego monitorowania przebiegu leczenia CML tym lekiem.

## **1.5. Metody stosowane w diagnostyce oraz monitorowaniu choroby resztkowej w CML**

Właściwe monitorowanie leczenia polega m.in. na wykonywaniu w odpowiednim czasie badań morfologicznych krwi, badań cytogenetycznych oraz molekularnych.

Podstawowym badaniem wykonywanym u chorych na CML jest badanie kliniczne, morfologiczne krwi obwodowej, preparat szpiku kostnego, określenie aktywności fosfatazy alkalicznej granulocytów oraz na badaniu cytogenetycznym i molekularnym [2, 24]. Badanie cytogenetyczne komórek szpiku kostnego pozwala stwierdzić obecność chromosomu *Ph* wśród jednej na  $10^2$  komórek zdrowych, jego ogromną zaletą jest możliwość wykrycia dodatkowych aberracji chromosomowych takich jak trisomia 8, izochromosom i(17), trisomia 19, dodatkowy chromosom *Ph'* mogących występować *de novo* lub pojawiać się w trakcie prowadzonego leczenia – tzw. ewolucji klonalnej będącej jedną z przyczyn powstawania oporności na Imatinib. Wadą badania cytogenetycznego jest jednak brak możliwości wykrycia *Ph'* u 10% chorych na CML - np. w przypadku gdy rearanżacja dotyczy małego regionu niewykrywalnego rutynową techniką badania cytogenetycznego lub gdy po powstaniu klasycznego chromosomu *Ph'* dochodzi do kolejnej translokacji prowadzącej do rekonstrukcji prawidłowo wyglądającego chromosomu 22. W metodzie tej istnieją także nieudane próby uzyskania odpowiedniego materiału spowodowane brakiem komórek dzielących się (przyczyną może być prowadzone leczenie, mała ilość pobranego materiału lub pobranie szpiku zawierającego dużą ilość krwi obwodowej). Problemy mogą być także spowodowane uzyskaniem małej liczby metafaz (optymalna liczba wynosi od 10-30). Badanie cytogenetyczne charakteryzuje się także niską czułością - nie jest w stanie wykryć resztkowej populacji komórek *Ph+* w szpiku która wynosi  $\leq 4-5\%$  dzielących się komórek, a także nie przedstawia zmian w ilości patologicznego klonu [24].

Do oceny MRD (minimalnej choroby resztkowej) stosuje się także różne inne zaawansowane techniki takie jak FISH (*Fluorescence in Situ Hybridisation* – miejscowa hybrydyzacja fluorescencyjna) – procedura ta jest jednak bardzo pracochłonna a i tak udaje się ocenić 20-25 % komórek. FISH pozwala na analizę komórek zarówno w metafazie jak i niedzielących się. Metoda jest szybka, pozwala na analizę większej ilości komórek niż w badaniu cytogenetycznym i cechuje się dużą wiarygodnością w ocenie odpowiedzi cytogenetycznej chorych na CML. Do wad tej techniki należy zaliczyć odsetek wyników

fałszywie pozytywnych sięgający prawie 10%. Badanie to nie jest przydatne w przypadku, gdy chromosom *Ph* występuje w mniej niż 10% dzielących się komórek [25].

Technika *Southern Blot* pozwala na dokładne określenie punktu pęknięcia produktu fuzyjnego DNA oraz technika *Nothern Blot* i RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*) pozwalające na wykrycie transkryptu *BCR-ABL* na poziomie RNA. Białko p210 można wykryć używając przeciwciał przeciwko N-końcowi BCR i C-końcowi ABL w analizie immunoprecypitacji lub *Western Blot*.

Jedną z technik biologii molekularnej wykorzystywanych w diagnostyce CML jest metoda RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polimerase Chain Reaction* – polimerazowa reakcja łańcuchowa oparta na odwrotnej transkrypcji) umożliwiająca wykrycie obecności lub braku aberracji *BCR-ABL* na poziomie RNA w jednej na  $10^4$  –  $10^6$  komórek prawidłowych i jest czulsza od innych technik co najmniej 4 razy. Jest to metoda oparta na amplifikacji kwasów nukleinowych. RT-PCR pozwala na szybką i specyficzną detekcję różnych translokacji oraz precyzyjne określenie jej typów. Jest to reakcja dwustopniowa co sprawia, że jest najczulszą metodą wykorzystywaną do monitorowania minimalnej choroby resztkowej (MRD – *Minimal Residual Disease*) w toku leczenia CML [26]. Jej dodatkową zaletą jest to, iż materiałem niezbędnym do uzyskania wyniku stanowi krew obwodowa pacjenta. RT-PCR jest jednak testem jakościowym i nie pozwala na dokładne ustalenie ilości transkryptu badanego genu. Przetrawanie komórek z translokacją *BCR-ABL* wykrywanych na tym poziomie czułości niekoniecznie świadczy o zagrażającej progresji choroby. Z tego powodu poszukiwano techniki dającej możliwość czułego i precyzyjnego określania ilości transkryptu m.in. genu *BCR-ABL*, co odzwierciedlałoby wielkość klonu komórek białaczkowych [27].

W ostatnich latach pojawiła się najnowocześniejsza technika RQ-PCR (*Real-time Quantitative PCR* - Ilościowa PCR w czasie rzeczywistym). Nowoczesne aparaty umożliwiają bardzo dokładny pomiar ilości powielanej matrycy w czasie rzeczywistym w ciągu kilkudziesięciu minut. Dokładna i szybka informacja o poziomie MRD pozwala na:

- szybką decyzję o modyfikacji leczenia (zwiększenie dawki stosowanego leku, przeszczep, terapie innowacyjne),
- możliwości zmniejszenia toksycznych efektów leczenia poprzez redukcję jego intensywności u pacjentów dobrze odpowiadających na terapię,
- monitorowanie leczenia pacjentów przed i po przeszczepie szpiku kostnego oraz ocenę czystości przeszczepu w przypadku przeszczepu autologicznego.

Monitorowanie MRD powinno być ujednolicone oraz odniesione do zastosowanego protokołu leczenia, źródła materiału, typu choroby białaczkowej jak również momentu terapii [28].

**Tabela 1.2.** Testy służące diagnozowaniu i monitorowaniu leczenia u pacjentów chorych na CML [29, 30]

Parametr	Cytogenetyka klasyczna	FISH	RQ-PCR	RT-PCR
Liczba analizowanych komórek	15 - 25	100-200	10 000 - 100 000	10 000 - 100 000
Czułość	$10^{-1} - 10^{-2}$	$10^{-1} - 10^{-2}$	$10^{-4} - 10^{-4}$	$10^{-6}$
Wyniki fałszywie pozytywne lub negatywne	tak	nie	nie	nie
Możliwość śledzenia zmian ilości transkryptu	nie	nie	tak	nie

### 1.5.1. Sposoby wyrażania odpowiedzi na terapię u chorych na CML

Odpowiedź na terapię wyraża się w trzech kategoriach: odpowiedź hematologiczna, cytogenetyczna oraz molekularna. Pełna remisja hematologiczna (*CHR – Complete Hematological Remission*) oznacza brak objawów przewlekłej białaczki szpikowej, powrót do prawidłowych parametrów morfologicznych krwi oraz prawidłowy rozmaz szpiku kostnego. Odpowiedź cytogenetyczna oznacza brak obecności chromosomu *Philadelphia* w 1-35% analizowanych metafaz.

Całkowita odpowiedź molekularna oznacza brak możliwości wykrycia transkryptu *BCR-ABL* techniką RT-PCR. Większa odpowiedź molekularna to  $\geq 3$  log redukcja transkryptu *BCR-ABL* w stosunku do poziomu referencyjnego ustalonego na podstawie badania techniką RQ-PCR materiału pobranego w chwili diagnozy.

**Tabela 1.3.** Kryteria remisji cytogenetycznej [4, 20]

Remisja cytogenetyczna	Odsetek Komórek <i>PH+</i> w szpiku kostnym
Całkowita	0
Większa	1-35
Mniejsza	36-95
Brak	>95

**Tabela 1.4.** Kryteria remisji molekularnej [4, 20]

CAŁKOWITA REMISJA MOLEKULARNA	BRAK TRANSKRYPTU <i>BCR-ABL</i> W TEŚCIE RT-PCR
Większa odpowiedź molekularna	$\geq 3$ log redukcja transkryptu <i>BCR-ABL</i> w stosunku do poziomu wyjściowego w teście RQ-PCR

### 1.5.2. Technika RQ-PCR

Monitorowanie minimalnej choroby resztkowej ma ogromne znaczenie kliniczne, ponieważ umożliwia szybką reakcję na pojawiające się sygnały mogące świadczyć o niepowodzeniu leczenia.

W ostatnich latach do oceny MRD zastosowano nowoczesną technikę **RQ-PCR (Real-time Quantitative PCR - ilościowa PCR w czasie rzeczywistym)**. RQ-PCR oparta o technologię TaqMan jest metodą służącą badaniu ekspresji genów. Technika ta pozwala niezwykle precyzyjnie określić poziom ekspresji genu lub innej badanej sekwencji oligonukleotydowej. Ze względu na zastosowanie sondy molekularnej, metodę tę cechuje bardzo wysoka specyficzność i czułość, a połączenie etapu amplifikacji i detekcji produktu pozwala nie tylko na oszczędność czasu, ale co ważniejsze wielokrotnie obniża ryzyko uzyskania wyniku fałszywie pozytywnego jako rezultatu kontaminacji. Ponadto, technika ta uważana jest za

niezwykle specyficzne, wiarygodne oraz wygodne narzędzie służące ilościowemu pomiarowi poziomowi MRD w schorzeniach hematologicznych [10].

RQ-PCR pozwala na porównywanie wyników wśród wielu laboratoriów a co za tym idzie na standaryzację metodologii [26].

Wzrost ekspresji badanego genu, a co za tym idzie wykrycie nawrotu molekularnego uzyskane tą techniką dzięki jej wysokiej czułości pozwala na wykrycie nawrotu choroby na wiele miesięcy (średnio 6 miesięcy) przed pojawieniem się proliferującego klonu białaczkowego w badaniu klasycznej cytogenetyki i badaniu cytologicznym szpiku oraz innych cech klinicznych nawrotu hematologicznego [29].

## Rozdział II

### CELE PRACY

- 2.1. Opracowanie i wdrożenie metody RQ-PCR dla analizy ilościowej ekspresji genu *BCR-ABL***
  
- 2.2. Przebadanie 60 pacjentów Kliniki Hematologii CMUJ chorujących na CML i monitorowanie choroby resztkowej przy pomocy techniki RQ-PCR u chorych poddanych leczeniu inhibitorem kinazy tyrozynowej (Imatinib, Glivec) lub transplantacji komórek hematopoetycznych**
  
- 2.3. Korelacja wyników badania techniką RQ-PCR z przebiegiem klinicznym CML**
  
- 2.4. Ocena przydatności metody RQ-PCR zastosowanej do oceny ilościowej ekspresji genu *BCR-ABL* dla prognozowania przebiegu CML**

Rozdział III

MATERIAŁY I METODY

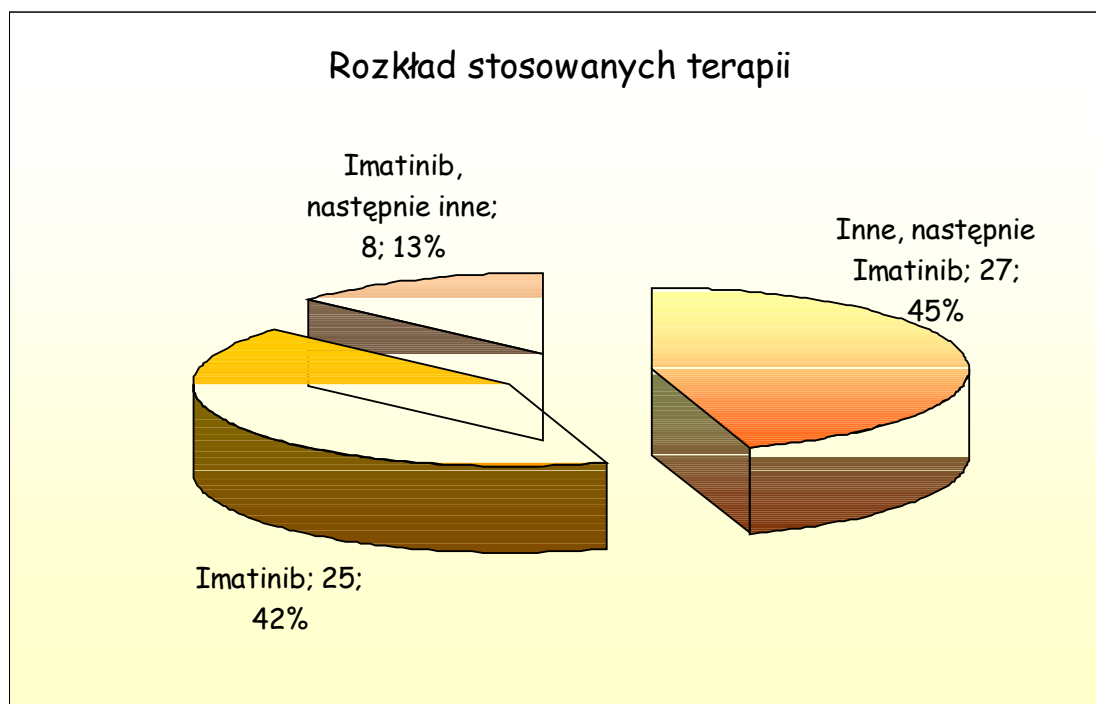


### 3. 1. Charakterystyka grupy badanej

Do badań zakwalifikowano pacjentów z rozpoznaniem przewlekłej białaczki szpikowej. Rozpoznanie CML ustalano na podstawie wyników badań klinicznych, cytologicznych, cytogenetycznych oraz molekularnych. Wszystkich pacjentów leczono w Katedrze i Klinice Hematologii *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w latach 1998 - 2007. W niniejszej pracy wykorzystano wyniki badań molekularnych wykonanych w Pracowni Diagnostyki Molekularnej Kliniki Hematologii CMUJ w Krakowie.

#### 3.1.1. Liczebność grupy i kryteria włączenia

Badaniami objęto 60 pacjentów Katedry i Kliniki Hematologii *Collegium Medicum* UJ chorujących na CML z obecną aberracją *BCR-ABL* stwierdzoną badaniem RT-PCR. Mediana wieku wynosiła 50 lat, średnia wieku wynosiła 51,1 lat, rozkład płci 39 K/21 M (Aneks -Tabela 3.1). Próbkę szpiku kostnego pobierano w chwili diagnozy oraz w odstępach średnio trzymiesięcznych w celu monitorowania kinetyki choroby resztkowej techniką RQ-PCR.



**Rycina 3.1.** Rozkład liczbowy (procentowy) stosowanych terapii w badanej grupie pacjentów

## 3.2. Narzędzia badawcze

### 3.2.1. Odczynniki

- PBS (Biomem, Lublin, Polska)
- Histopaque (1,077 g/cm<sup>3</sup>; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Chlorek amonu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- Chloroform (MB Biomedicals, Ohio, USA)
- Alkohol izopropylowy (MB Biomedicals, Ohio, USA)
- Alkohol etylowy (POCH, Gliwice, Polska)
- Woda wolna od RNaz (Promega, Madison, USA)
- Woda do iniekcji (*Aqua pro injectione*; B. Braun, Barcelona, Hiszpania)
- Zestaw do odwrotnej transkrypcji Superscript<sup>TM</sup> II (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- Inhibitor RNaz RNaseOUT<sup>TM</sup> (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- Startery – random heksametry (Promega, Madison, USA)
- Zestaw Polimeraza Fast Start Taq (Roche, Penzberg, Germany)
- Nukleotydy (dNTP) (Promega, Madison, USA)
- Startery (TIB Molbiol, Poznań, Polska)
- Sondy znakowane fluorescencyjnie (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- TaqMan Universal PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- Plazmid - FusionQuant Standards (*Control and Fusion Gene Standards for Real-Time Quantitative RQ-PCR Analysis of Fusion Gene Expression*; Ipsogen, Marseille, France).
- Agarozą MP (*multi purpose agarose*; Roche, Penzberg, Germany)
- Bufor obciążający GLB (*gel loading buffer*): 25% Ficoll 400, 10mM EDTA, 0,01% błękit bromofenolowy, 0,01% ksylenocyanol FF.
- Standard masowy wielkości DNA XIII (Roche, Penzberg, Germany)
- Standard masowy wielkości DNA 50 bp Ladder (Roche, Penzberg, Germany)
- Bromek etydyny (roztwór 1 mg/ml w PBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).
- Bufor TAE (0,9 m. TrisHCl pH 8,2; 0,9 M. kwas borowy, 25 mM EDTA)

### 3.2.2. Aparatura

- ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Foster City, USA)

- Termocykler PTC-220 DNA Engine DYAD (MJ Research, Ramsey, USA)
- Spektrofotometr GENESYS-2 (Thermospectronic, Chicago, USA)
- Wirówki (SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Germany)
- Aparat do elektroforezy (BIO-RAD, Hercules, USA)
- Kamera do dokumentacji żeli agarozowych (Kodak, Rochester, USA)
- Transluminator (Vilber Lourmat, Torcy, France)
- Termomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Germany)

### **3.3. Metodyka**

#### **3.3.1. Izolacja komórek jednojądrzastych ze szpiku kostnego**

Analizę przeprowadzano na komórkach jednojądrzastych izolowanych ze szpiku kostnego pobieranego od pacjentów chorych na CML leczonych w Katedrze i Klinice Hematologii CMUJ w Krakowie.

3-5 ml szpiku kostnego pobierano do probówek typu Monovette (Sarstedt) zawierających izocytrynian sodowy (stężenie 0,01M.). Szpik kostny rozcieńczano zbuforowaną solą fizjologiczną (PBS) w stosunku 1:1. Rozcieńczony szpik nawarstwiano na 2 ml Histopaque i wirowano (30 minut, 400 x g, 20°C). Zebrane komórki, które po wirowaniu znajdowały się na granicy faz i odpowiadały frakcji PBL (limfocyty i monocyty) płukano w PBS a następnie w przypadku obecności erytrocytów, komórki lizowano w roztworze chlorku amonu przez 10 minut w 4°C. Następnie komórki płukano dwukrotnie w PBS i liczone w komorze Burkera.  $1 \times 10^6$  wyizolowanych komórek zawieszano w 1 ml odczynnika do izolacji RNA (TRIzol) przepuszczając lizat wielokrotnie przez igłę strzykawkową w celu całkowitej solubilizacji komórek. Tak przygotowany materiał zamrażano w temp. -20°C.

#### **3.3.2. Izolacja RNA**

Całkowity RNA z komórek ( $1 \times 10^6$ ) izolowano z TRIzolu zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta. Suche osady rozpuszczano w 30 µl wody wolnej od RNaz.

#### **3.3.3. Spektrofotometryczny pomiar RNA**

Stężenie i czystość uzyskanych próbek oznaczano mierząc ich absorbancję w świetle ultrafioletowym przy długości fali 260, 280 i 320 nm.

4  $\mu$ l wyizolowanego RNA rozpuszczano w 1 ml wody a następnie przeprowadzano pomiar spektrofotometryczny uzyskując ilość ng RNA w jednym 1  $\mu$ l badanej próbki (wartość OD). Wartość R ( $A_{260}/A_{280}$ ) zawierała się pomiędzy 1,7 – 2,2. Tak przygotowane RNA przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.4. Reakcja odwrotnej transkrypcji (synteza cDNA)

Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono w objętości 10 $\mu$ l. Próbkę RNA zawierającą 500 ng całkowitego RNA przenoszono do probówek typu Biosphera 0,2 ml (Sarstedt) i ogrzewano z mieszaniną starterów w temp.  $70^{\circ}\text{C}$  przez 10 minut i natychmiast chłodzono w lodzie. Następnie dodawano 7,5 $\mu$ l mieszaniny RT-mix (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2.** Skład mieszaniny reakcji odwrotnej transkrypcji

Składnik	Stężenie	Objętość [ $\mu$ l]
Odwrotna transkryptaza SuperScript <sup>TM</sup> II	200 U/ $\mu$ l	1,0
Bufor FSB (First Strand Buffer; 250 mM TrisHCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15mM MgCl <sub>2</sub> )		4,0
Random heksamery (pdN6)	100 mM	5,0
Mieszanina nukleotydów	25 mM	0,8
Inhibitor rybonukleaz	20 U/ $\mu$ l	0,5
DTT	0,1 M	2,0
Woda wolna od RNaz		5,7

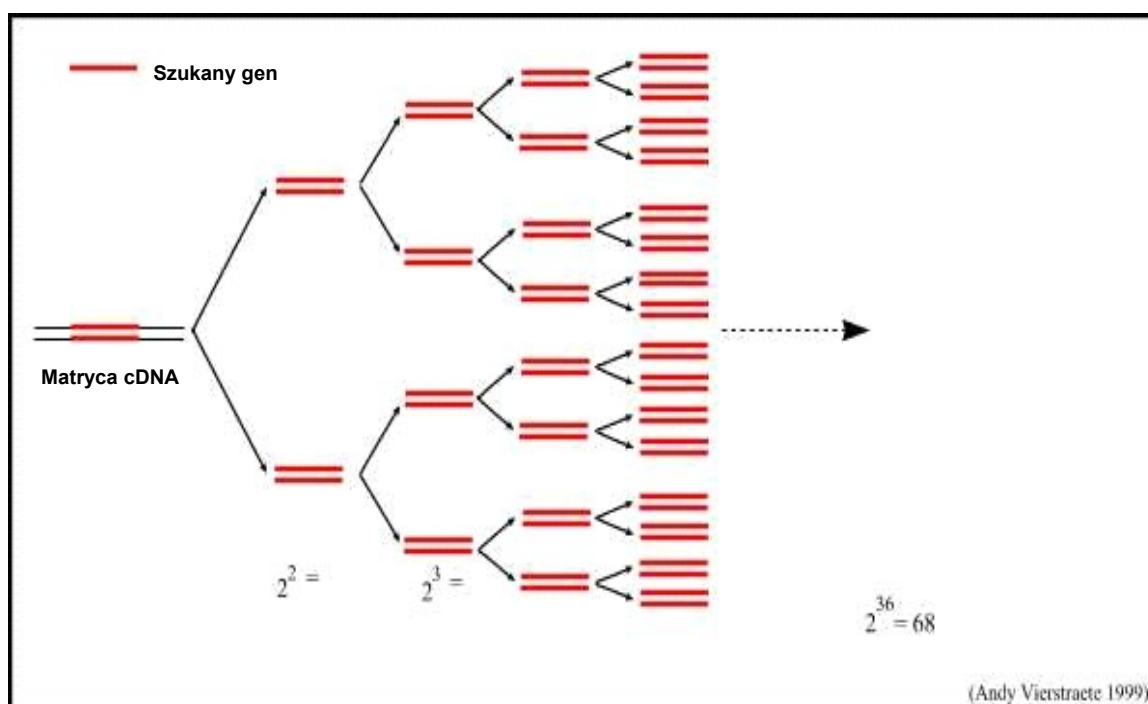
Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono w termocyklerze DYAD w temperaturze  $42^{\circ}\text{C}$  przez 45 minut. Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze  $99^{\circ}\text{C}$  przez 3 minuty w celu denaturacji odwrotnej transkryptazy i chłodzono w lodzie.

Każdą próbkę rozcieńczano wodą wolną od RNaz w stosunku 2:3, a następnie przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do dalszych analiz.

### 3.3.5. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) (analiza jakościowa)

Technika PCR pozwala na powielenie matrycy DNA podczas wielu cykli reakcji wykorzystującej startery flankujące określony badany odcinek DNA, oraz termostabilnej polimerazy. Warunkiem przeprowadzenia takiej syntezy jest znajomość sekwencji otaczającej powielany fragment, tak aby można było syntetyzować komplementarne startery o długości ok. 15-20 nukleotydów. Każdy cykl reakcji składa się z trzech etapów: termicznej denaturacji

powielonego DNA (ok. 90°C), przyłączania starterów do matrycy (40 - 60°C) i wydłużania zsyntetyzowanej nici (72°C). Do mieszaniny matrycy, starterów i termostabilnej polimerazy dodaje się także trifosforany nukleotydów. W pierwszym cyklu reakcji syntetyzowane są odcinki DNA o różnej długości. Stopniowo, w mieszaninie zaczynają przeważać fragmenty powielanego DNA, ograniczone starterami i w praktyce końcowy produkt reakcji jest niemal jednorodny. Liczba syntetyzowanych fragmentów narasta w sposób wykładniczy jak  $2^n$ , gdzie  $n$  oznacza liczbę cykli (Rycina 3.2).



**Rycina 3.2.** Zasada techniki PCR

Reakcję PCR prowadzono w końcowej objętości mieszaniny reakcyjnej 25  $\mu$ l. Z każdej próbki pobierano po 5 cDNA, przenoszono do probówek typu Biosphera (0,2 ml Sarstedt) a następnie dodawano po 20  $\mu$ l mieszaniny PCR-mix i prowadzono reakcję wg określonego profilu termicznego. Specyficzne startery opracowano na podstawie programu *BIOMED-1* [8]. Aby wykluczyć powstanie produktów na matrycy genomowej, wszystkie startery zostały zaprojektowane w różnych egzonach.

Wszystkie reakcje PCR prowadzono w termocyklerze DYAD. Po zakończonej reakcji, próbki rozdzielano elektroforetycznie w żelu agarozowym.

### 3.3.5.1. Warunki reakcji PCR multipleks

W momencie diagnozy u każdego pacjenta przeprowadzano reakcję multipleks PCR, która przy użyciu zestawu 5 starterów pozwalała na określenie czy i jaki rodzaj aberracji *BCR-ABL* występuje u danego chorego. Skład mieszaniny reakcyjnej, sekwencje starterów oraz profil termiczny przedstawiono w tabelach 3.3, 3.4, oraz 3.5.

**Tabela 3.3.** Skład mieszaniny reakcji PCR multipleks

Odczynnik	Stężenie	Objętość [ $\mu$ l]
Polimeraza Fast Start Taq (LC)	1 U/ $\mu$ l	2
Bufor 10x		5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5
Mieszanina nukleotydów	2,5 mM	0,8
Starter BCR b1a	10 $\mu$ M	1
Starter BCR e6s2	10 $\mu$ M	1
Starter BCR e1a	10 $\mu$ M	1
Starter BCR c3a	10 $\mu$ M	1
Starter ABL a3b	10 $\mu$ M	1
Woda wolna od RNaz		4,7

**Tabela 3.4.** Sekwencje stosowanych starterów w reakcji PCR multipleks

Nazwa	Sekwencja 5' - 3'	Oczekiwana wielkość produktu w zależności od podtypu (pz)
<b>BCR b1a</b>	GAA GTG TTT CAG AAG CTT CTC C	b3a2: 417
<b>BCR e6s2</b>	GAC TTA CCT GAG CCA CCT GGA G	b2a2: 342
<b>BCR e1a</b>	GAC TGC AGC TCC AAT GAG AAC	e1a2: 521
<b>BCR c3a</b>	ACG GCG AGA GCA CGG ACA	b3a3: 243
<b>ABL a3b</b>	GTT TGG GCT TCA CAC CAT TCC	b2a3: 168

**Tabela 3.5.** Profil termiczny stosowany w reakcji multipleks PCR

Temperatura, czas jednego cyklu	Liczba cykli
94°C, 30 sek.	1
denaturacja: 94°C, 30 sek. Wiązanie startera: temp.62°C , 60 sek. Synteza: 72°C, 120 sek.	35
Końcowe wydłużanie: 72°C, 7 min.	1

**3.3.5.2. Warunki reakcji PCR gniazdowej (*nested*)**

Co trzy miesiące, u każdego pacjenta przeprowadzano reakcję tzw. gniazdowej (*nested*) PCR z wykorzystaniem 2 par starterów wewnętrznych dla każdej aberracji. Skład mieszaniny reakcyjnej, sekwencje starterów oraz profil termiczny przedstawiono w tabelach 3.6, 3.7 oraz 3.8.

**Tabela 3.6.** Skład mieszaniny reakcji PCR gniazdowej

Odczynnik	Stężenie	Objętość [μl]
Polimeraza Fast Start Taq	1 U/μl	2
Bufor	10x	5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	w zależności od sekwencji startera
Mieszanina nukleotydów	2,5 mM	0,8
starter sensowny	10 μM	1
starter antysensowny	10 μM	1
Woda wolna od RNaz		do 20μl

**Tabela 3.7.** Sekwencje stosowanych starterów w reakcji PCR gniazdowej

Nazwa	Sekwencja 5' - 3'	Oczekiwana wielkość produktu w zależności od podtypu (pz)
I° ABL 3-	GGT ACC AGG AGT GTT TCT CCA GAC TG	b3a2: 530
I° NB1+	GAG CGT GCA GAG TGG AGG GAG AAC A	b2a2: 455

<b>II° CA3-</b>	TGT TGA CTG GCG TGA TGT AGT TGC TTG G	b3a2: 458
<b>II° B2A+</b>	TTC AGA AGC TTC TCC CTG ACA T	b2a2: 383

**Tabela 3.8.** Profil termiczny stosowany w reakcji PCR gniazdowej

Temperatura, czas jednego cyklu	Liczba cykli
94°C, 30 sek.	1
denaturacja: 94°C, 30 sek.	35
Wiązanie startera: temp.60°C , 60 sek.	
synteza: 72°C, 120 sek.	
72°C, 10 min.	1

### 3.3.5.3. Analiza produktów PCR

Produkty PCR rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym w buforze TAE zawierającym 0,5µg/ml bromku etydyny. Do studzienek nakładano po 12 µl każdej próbki zmieszanej z 2,5 µl buforu obciążającego. Do osobnej studzienki nakładano standard masowy wielkości cząsteczek DNA: XIII oraz w przypadku reakcji multipleks także marker 50 bp DNA Ladder. Rozdział prowadzono w buforze TAE przy napięciu 5 V/cm. Po zakończonym rozdziale żel fotografowano w świetle UV przy użyciu transluminatora.

### 3.3.6. RQ-PCR (analiza ilościowa w czasie rzeczywistym)

Technika PCR w czasie rzeczywistym zastosowana w niniejszej pracy opiera się na zasadach technologii TaqMan. W tego typu analizie zastosowano specyficzną sondę molekularną (oligonukleotydową) zawierającą tzw. fluorochrom (R - *Reporter*) zlokalizowany przy końcu 5' emitujący fluorescencję oraz tzw. wygaszacz (Q - *Quencher*) zlokalizowany przy końcu 3'. W niniejszej pracy jako fluorochromu użyto barwnika Fam, natomiast jako wygaszacza barwnika Tamra. Jeśli badany produkt jest obecny w mieszaninie reakcyjnej w czasie reakcji RQ-PCR, sonda przyłącza się tuż za jednym z starterów, a następnie jest przecinana dzięki 5'-3'- nukleolitycznej aktywności polimerazy AmpliTaq Gold DNA powodując oddzielenie R od Q i emisję fluorescencji (Rycina 3.3). Fluorescencja jest emitowana tylko wtedy gdy szukana sekwencja jest komplementarna do sondy molekularnej i jest amplifikowana podczas reakcji PCR. Fluorescencja ta stanowi ilościowy ekwiwalent powstającego produktu PCR i daje pewność, że amplifikacji podlega tylko i wyłącznie szukana sekwencja.



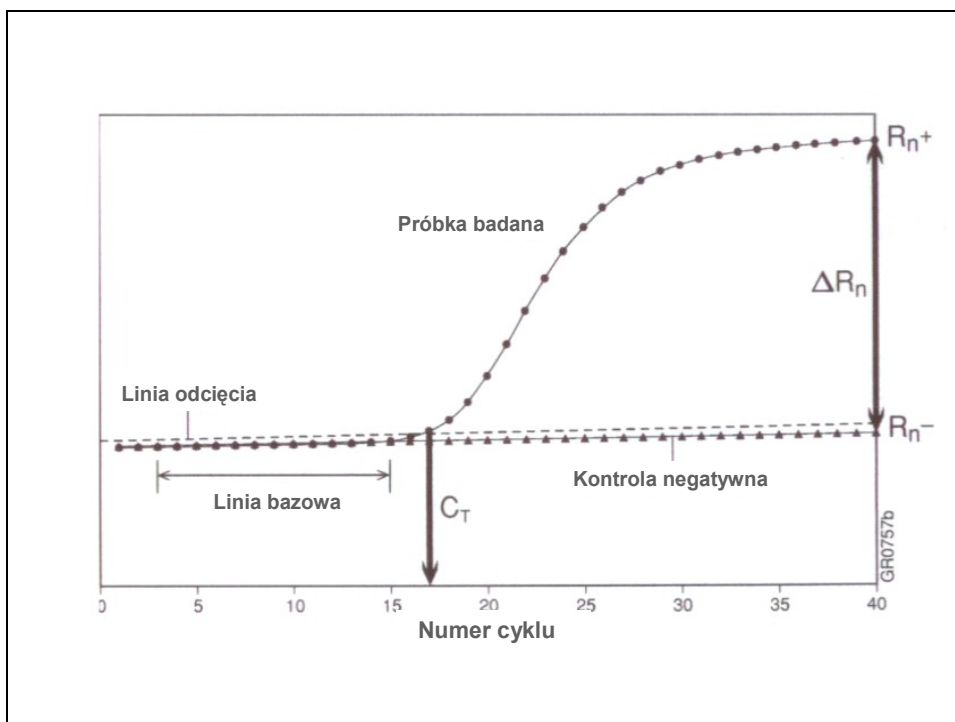




Wykres amplifikacji stanowi zależność pomiędzy pojawiającym się sygnałem fluorescencji w stosunku do odpowiadającemu mu numerowi cyklu reakcji. Podczas każdej przeprowadzanej reakcji RQ-PCR fluorescencja próbek badanych podlega tzw. normalizacji. Polega ona na oddzieleniu intensywności emisji fluorescencji fluorochromu od intensywności emisji tzw. odniesienia biernego (*Passive Reference*) prowadzącego do uzyskania stosunku definiowanego jako fluorescencja znormalizowana  $R_n$  (*Normalized Reporter*).  $R_{n+}$  stanowi wartość  $R_n$  reakcji zawierającej wszystkie składniki wraz z matrycą.  $R_{n-}$  stanowi wartość  $R_n$  próbki nie poddanej reakcji. Wartość ta może być uzyskana we wczesnych cyklach reakcji oraz w reakcji nie zawierającej matrycy.  $\Delta R_n$  jest różnicą pomiędzy wartościami  $R_{n+}$  oraz  $R_{n-}$ . Stanowi ona rzeczywisty sygnał generowany w reakcji PCR:

$$\Delta R_n = (R_{n+}) - (R_{n-})$$

W początkowej fazie PCR, zmiany fluorescencji  $\Delta R_n$  są niewielkie. Etap ten definiuje tzw. linię odcięcia (*threshold*). Zwiększający się sygnał fluorescencji ponad linię odcięcia wskazuje na detekcję badanego produktu PCR. Pomiar ilości produktu w badanej próbce przeprowadzany jest na podstawie wartości  $C_t$  (*Threshold Cycle* - definiowany jako numer cyklu, w którym dochodzi do przyrostu fluorescencji  $\Delta R_n$  ponad linię odcięcia) (Rycina 3.4).



**Rycina 3.4.** Schemat detekcji w reakcji RQ-PCR

Na osi x odłożona jest liczba cykli, na osi y poziom fluorescencji z poszczególnych cykli reakcji. Cykl progowy  $C_T$  (*threshold cycle*) definiowany jest jako cykl reakcji, w którym dochodzi do przekroczenia progu detekcji (znaczącego wzrostu  $\Delta R_n$ )

### 3.3.6.1. Wybór genu kontrolnego do analizy RQ-PCR

Jako gen kontrolny zastosowano gen *ABL* ze względu na co najmniej cztery cechy:

- Jego ekspresja nie różni się znacząco pomiędzy komórkami prawidłowymi pochodzącymi ze szpiku kostnego, krwi obwodowej oraz komórkami macierzystymi krwi obwodowej,
- Jego ekspresja nie różni się znacząco pomiędzy komórkami prawidłowymi i białaczkowymi,
- Liczba kopii transkryptu *ABL* nie różni się znacząco w różnych typach tkanek,
- Badania wskazują, że występuje wysoka znacząca korelacja pomiędzy wynikami uzyskanymi technikami cytogenetyki a wynikami uzyskanymi przy pomocy techniki RQ-PCR przy zastosowaniu genu *ABL*, pomimo, że primery i sonda dla genu *ABL* mogą amplifikować zarówno transkrypt *ABL* jak i *BCR-ABL* [31].

### 3.3.6.2. Warunki reakcji RQ-PCR

Sekwencje starterów i sond molekularnych do RQ-PCR zostały opracowane na podstawie programu *EAC* [10]. Amplifikację wszystkich próbek i odpowiednich kontroli prowadzono w dubletach na płytkach 96-dółkowych (MicroAmp optical 96-well reaction plates, Applied Biosystems). Skład mieszaniny reakcyjnej, sekwencje starterów i sond molekularnych oraz profil termiczny przedstawiono w tabelach 3.9, 3.10 oraz 3.11.

Badania przeprowadzono na aparacie ABI PRISM 7700 w Pracowni Diagnostyki Molekularnej Kliniki Hematologii CMUJ, a analizę prowadzono zgodnie z zasadami technologii TaqMan oraz wytycznymi zawartymi w programie *Europe Against Cancer (EAC)*.

**Tabela 3.9.** Skład mieszaniny reakcyjnej RQ-PCR

Odczynnik	Stężenie	Objętość [ $\mu$ l]
TaqMan Universal PCR Master Mix 2x		12,5
Starter sensowny	30 $\mu$ M	0,25
Starter antysensowny	30 $\mu$ M	0,25
Sonda molekularna TaqMan	20 $\mu$ M	0,25
Woda wolna od RNaz		6,25

TaqMan Universal PCR Master Mix zawiera w swoim składzie wszystkie odczynniki niezbędne do przeprowadzenia reakcji ilościowej PCR: polimerazę typu HotStartTaq - AmpliTaq Gold DNA polymerase, mieszaninę nukleotydów, jony magnezu. W celu zapobiegania powstania kontaminacji, w skład Master Mixu wchodzi także AmpErase uracyl-N-glycosylase (UNG) – jest to oczyszczony wolny od nukleaz enzym, pochodzący z bakterii *Escherichia coli* o wielkości 26 kDa kodowany przez gen uracyl-N-glycosylase. Działanie UNG polega na usuwaniu uracylu z powstałej podwójnej nici DNA co zapobiega ponownej amplifikacji powstałych produktów PCR.

Master Mix zawiera także w swoim składzie odniesienie bierne - barwnik Rox. Stanowi on wewnętrzną kontrolę, w której sygnał pochodzący od fluorochromu jest normalizowany podczas każdorazowo przeprowadzanej analizy. Normalizacja ta jest niezbędna w celu kontroli ewentualnych fluktuacji fluorescencji wynikających ze zmian w stężeniu lub objętości poszczególnych składników reakcji.

**Tabela 3.10.** Sekwencje oligonukleotydów (starterów i znakowanych sond molekularnych) stosowanych w analizie RQ-PCR

Analizowany gen	Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja 5' - 3'
-----------------	-----------------------	-------------------

<i>ABL</i>	Starter ENF1003	Tgg AgA TAA CAC TCT Aag CAT AAC TAA Agg T
	Starter ENR1063	gAT gTA gTT CTT ggg ACC CA
	Sonda molekularna ENP1043	Fam-CCA TTT TTg gTT Tgg gCT TCA CAC CAT T-Tamra
<i>BCR-ABL</i>	Starter ENF501	TCC gCT gAC CAT CAA YAA ggA
	Starter ENR561	CAC TCA gAC CCT gAg gCT CAA
	Sonda molekularna ENP541	Tamra-CCC TTC AgC ggC Cag Tag CAT CTg A-Fam

**Tabela 3.11.** Profil termiczny stosowany w reakcji RQ-PCR

Temperatura, czas jednego cyklu	Liczba cykli
50°C, 2 min.	1
94°C, 10 min.	1
Denaturacja: 94°C, 30 sek.	50
Wiązanie startera: 60°C sek.	
Synteza: 72°C, 120 sek.	
72°C, 15 min.	1

Temperatura 50°C przez okres 2 minut jest wymagana w celu optymalizacji aktywności enzymu AmpErase UNG, temp. 94°C przez 10 minut jest niezbędna w celu aktywacji polimerazy AmpliTaqGold.

Jako kontrolę jakości RNA oraz reakcji RT, każdorazowo przeprowadzano amplifikację genu referencyjnego *ABL*. Próbkę, których Ct było wyższe od wartości 32 odrzucano. W celu precyzyjnego oszacowania ilości mRNA w próbkach testowych, amplifikacji poddawano również próbki zawierające serie 5 rozcieńczeń plazmidu zawierającego inserty cDNA odpowiadającego znanej liczbie kopii genu *BCR-ABL* (*BCR-ABL* b3a2 M-bcr) ( $10^6$ – $10^1$ ) (1 000 000, 100 000, 1000, 100, 10 kopii genu fuzyjnego/5µl) oraz *ABL* ( $10^5$  -  $10^3$ ) (*ABL*) (100 000, 10 000, 1000 kopii genu fuzyjnego/5µl). Umożliwiło to wykreślenie tzw. krzywych standardowych. W każdej analizie przeprowadzano również reakcję stanowiącą kontrolę negatywną, w której zamiast materiału badanego znajdowała się woda wolna od RNaz.

### 3.4. Sposób wyrażania i analizy wyników

#### 3.4.1. RT-PCR

Wyniki testów jakościowych (RT-PCR multipleks oraz RT-PCR gniazdowy) wyrażano przy użyciu nomenklatury: pozytywny/negatywny. W przypadku testu gniazdowego

precyzowano także, czy prążek stanowiący produkt pozytywny pojawiał się w teście zewnętrznym czy wewnętrznym.

### 3.4.2. RQ-PCR

W celu określenia prawidłowości uzyskanej krzywej standardowej brano pod uwagę następujące parametry:

- współczynnik korelacji (*correlation coefficient*) – powinien on być wyższy od wartości 0,95
- współczynnik nachylenia krzywej (*slope*) ( $\Delta Ct$  pomiędzy rozcieńczeniami plazmidu) powinien wynosić ok.3,33
- punkt przecięcia z osią y (*intercept*) powinien wynosić ok. 40.

W odniesieniu do krzywej standardowej, liczbę kopii genu *BCR-ABL* normalizowano względem liczby kopii genu *ABL* - obliczano stosunek *BCR-ABL/ABL* i wyrażano go w % [32].

Istotą badania RQ-PCR jest pojęcie dużej odpowiedzi molekularnej (*MMR*) oznaczającej ustaloną, małą ilość transkryptu *BCR-ABL*. Wyjściową ilość transkryptu, określono stosunkiem liczby kopii *BCR-ABL* do liczby kopii genu *ABL* zawartą w szpiku kostnym 30 chorych na CML przed rozpoczęciem leczenia imatinibem. W Laboratorium Diagnostyki Molekularnej Kliniki Hematologii CMUJ stosunek ten wynosił 100%. Jeśli w trakcie leczenia obniżył się on do 0,01% to uznawano, że osiągnięto 3-krotną redukcję ilości transkryptu w skali logarytmicznej. Było to równoznaczne z osiągnięciem *MMR*. Dla celów praktyki klinicznej, w badaniu IRIS [33] ustalono aby wszystkie wyniki były wyrażane w jednolitej międzynarodowej skali numerycznej. Dlatego, każdy wynik mnożono przez tzw. międzynarodowy czynnik korygujący (*Conversion Factor - CF*) charakterystyczny i specyficzny dla każdego laboratorium oraz pozwalający na konwersję wartości *BCR-ABL/ABL* do skali międzynarodowej. Czynniki korygujący ustalono na podstawie poniższego wzoru:

$MMR_{sr} (\%)$	$0,1\%/MMR_{sr} (\%) = CF$	$BCR-ABL^L \times CF = BCR-ABL^{IS}$
0,1	$0,1/0,1 = 1$	$BCR-ABL^L \times 1$

gdzie:

$MMR_{sr}$  – *BCR-ABL* równy *MMR* ustalonej w badaniu IRIS

$BCR-ABL^L$  – stosunek *BCR-ABL/ABL* wyrażony jako odsetek w Laboratorium Diagnostyki Molekularnej Kliniki Hematologii CMUJ

$BCR-ABL^{IS}$  - stosunek  $BCR-ABL/ABL$  wyrażony w skali międzynarodowej [28]

Log redukcję mierzono od momentu rozpoczęcia terapii Imatinibem.

Każdorazowo, na podstawie wzoru matematycznego obliczano także poziom czułości pojedynczego testu RQ-PCR, która bezpośrednio zależy od jakości wyizolowanego materiału (Ct genu  $ABL$ ) oraz uzyskanych parametrów krzywej standardowej ( $Slope$  – współczynnik nachylenia krzywej,  $Intercept$  – punkt przecięcia krzywej z osią y – najwyższy nr cyklu wskazujący na wynik negatywny):

$$x = 10^{\left( \frac{40 - \text{ave } Ct_{CG}}{Y} \right)}$$

gdzie:

x- czułość testu RQ-PCR

$\text{ave } Ct_{CG}$  – średnie Ct genu kontrolnego dla badanej próbki

Y - punkt przecięcia krzywej z osią y

### 3.5. Zapobieganie kontaminacjom

W celu zapobiegania możliwości kontaminacji stosowano bardzo restrykcyjne działania na poszczególnych etapach wykonywanych analiz:

1. Rozdzielenie poszczególnych etapów analiz w czasie i miejscu wykonywania: izolacja komórek ze szpiku kostnego, izolacja RNA, przygotowanie reakcji odwrotnej transkrypcji, przygotowanie reakcji ilościowej, przygotowanie i dodawanie plazmidu.
2. Stosowanie osobnych fartuchów i rękawiczek ochronnych na poszczególnych etapach określonych analiz oraz osobnych zestawów pipet automatycznych.
3. Stosowanie końcówek z filtrami zapobiegającym rozprzestrzenianiu się tzw. mikroaerozoli, oraz osobnych pipet do odczynników, materiału pozytywnego oraz negatywnego.
4. Stosowanie lamp ultrafioletowych oraz środków niwelujących ewentualne pozostałe produkty mogące prowadzić do kontaminacji w kolejnych analizach.

### 3.6. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono stosując testy t-studenta przy użyciu programów Statistica 7.0 oraz Microsoft Excel.





## Rozdział IV

### WYNIKI

## 4.1. Wybór grupy badanej

W pierwszym etapie niniejszej pracy badawczej dokonano wyboru grupy pacjentów kwalifikujących się do monitorowania choroby resztkowej. Najważniejszym kryterium było potwierdzenie przewlekłej białaczki szpikowej u diagnozowanych pacjentów na podstawie wyników badań klinicznych, cytologicznych, cytogenetycznych oraz molekularnych przy pomocy testu multipleks RT-PCR. Do badania kwalifikowano chorych ze stwierdzoną translokacją *BCR-ABL* typu b2a2 lub b3a2. Materiał przeznaczony do badania zabezpieczano od pacjentów w różnych fazach choroby przez okres 8 lat (od 1999 do roku 2007). Analizie poddano przebieg choroby u pacjentów, u których materiał do badania molekularnego został pobrany co najmniej 3-krotnie.

## 4.2. Techniki RQ-PCR oraz RT-PCR

### 4.2.1. Opracowanie optymalnej metody izolacji RNA i kolejnych etapów polimerazowej reakcji łańcuchowej

#### 4.2.1.1. Izolacja materiału genetycznego (RNA)

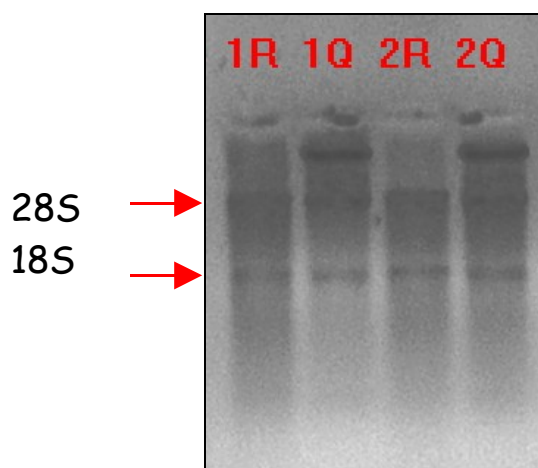
W celu wypracowania jak najwyższej jakości analiz, w pierwszej kolejności przeprowadzono testy odczynnikowe dla izolacji RNA oraz reakcji odwrotnej transkrypcji aby mieć pewność, że analizie jakościowej i ilościowej zostanie poddany najlepszy materiał.

Materiał badawczy przebadano dwoma metodami służącymi wyizolowaniu jak najlepszej jakości materiału genetycznego z użyciem odczynnika TRIzol (Invitrogen) oraz kolumnienek wraz z zestawem RNeasy® Mini Kit (Qiagen). RNA izolowano z próbek krwi pochodzących od tych samych pacjentów. Jedne z nich zabezpieczono do izolacji metodą TRizolową, a drugie zawieszano w buforze RLT służącym do izolacji w metodzie kolumnienkowej z użyciem odczynnika RNeasy® Mini Kit.

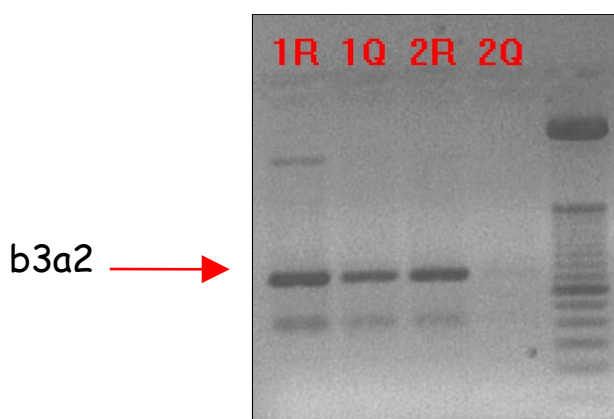
**Tabela 4.1.** Porównanie wyników izolacji RNA przy zastosowaniu odczynników: TRIzol vs RNasy Mini Kit

		TRIzol (Invitrogen)	RNeasy® Mini Kit (Qiagen)
Wartość OD (ng RNA/ $\mu$ l)	1	590 ng/ $\mu$ l	410 ng/ $\mu$ l
	2	600 ng/ $\mu$ l	190 ng/ $\mu$ l
Wartość współczynnika R (260/280 nm)	1	2,0	2,0
	2	2,0	1,9
Jakość RNA (Ct genu Abl)	1	22,8	25,9
	2	25,3	30,3

A)



B)



**Rycina 4.1.** Porównanie wyników izolacji RNA przy zastosowaniu odczynników: TRIzol vs RNasy Mini Kit. Literą R oznaczono izolację przeprowadzoną metodą TRIzolową, literą Q oznaczono izolację przeprowadzoną metodą kolumnienkową

A) Rozdział elektroforetyczny uzyskanego RNA w 2% żelu agarozowym (1,5µg)

B) Wynik reakcji RT-PCR

W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono lepszą jakość zarówno wyizolowanego RNA (wyższa wartość Ct genu *ABL*, brak zanieczyszczeń DNA genomowym) (Tabela 4.1, Rycina 4.1.A) jak również zdecydowanie lepszy wynik reakcji RT-PCR, w której prążki odpowiadające transkryptowi *BCR-ABL* b3a2 są zdecydowanie lepiej widoczne w materiale izolowanym metodą TRIzolową (Rycina 4.1.B).

W kolejnych etapach pracy do izolacji RNA stosowano technikę z użyciem odczynnika TRIzol.

#### 4.2.1.2. Sposób przeprowadzania reakcji odwrotnej transkrypcji

W sprawdzeniu poprawności przeprowadzania reakcji odwrotnej transkrypcji (RT) użyto trzech rodzajów zestawów enzymów służących do przeprowadzania reakcji RT: Expand Reverse Transcriptase (Roche), Superscript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) w ilości 100 oraz 200 jednostek/ $\mu$ l na reakcję, oraz MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems). Analizie poddano wyizolowany RNA pochodzący od czterech pacjentów z rozpoznaną CML. Odwrotną transkrypcję prowadzono w dubletach a następnie przeprowadzono ilościową amplifikację genu *ABL*.

**Tabela 4.2.** Porównanie wartości Ct genu *ABL* przy zastosowaniu czterech różnych zestawów do przeprowadzania reakcji odwrotnej transkrypcji

Pacjent	Średnia wartość Ct dla poszczególnych enzymów			
	Expand	Superscript II 100U/ $\mu$ l	Superscript II 200U/ $\mu$ l	MultiScribe
1	25,52	25,19	24,78	26,12
2	26,00	25,61	24,72	26,37
3	25,15	24,89	24,03	25,98
4	24,92	23,83	22,42	26,08
<b>Średnia</b>	<b>25,40</b>	<b>24,88</b>	<b>23,99</b>	<b>26,14</b>

W wyniku testów stwierdzono, iż najniższą wartość Ct (co oznacza najszybsze pojawienie się transkryptu *BCR-ABL*) po przeprowadzonej reakcji RQ-PCR pozwala osiągnąć zastosowanie odwrotnej transkryptazy Superscript II 200U 23,99 *versus* 24,88 dla Superscript II 100U oraz 25,40 dla Expand i 26,14 dla MuMLV (Tabela 4.2).

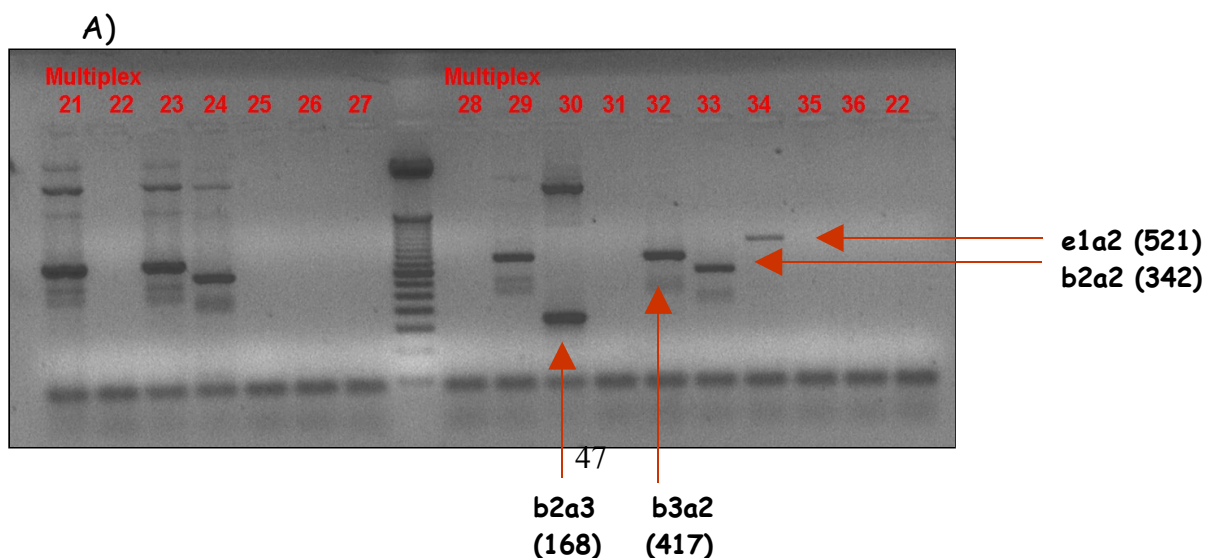
W dalszych etapach pracy w reakcji odwrotnej transkrypcji stosowano odwrotną transkryptazę Superscript II 200U ze względu na jej najwyższą czułość stwierdzoną doświadczalnie.

#### 4.2.1.3. Ustalenie czułości wykrywania transkryptu *BCR-ABL* techniką RT-PCR

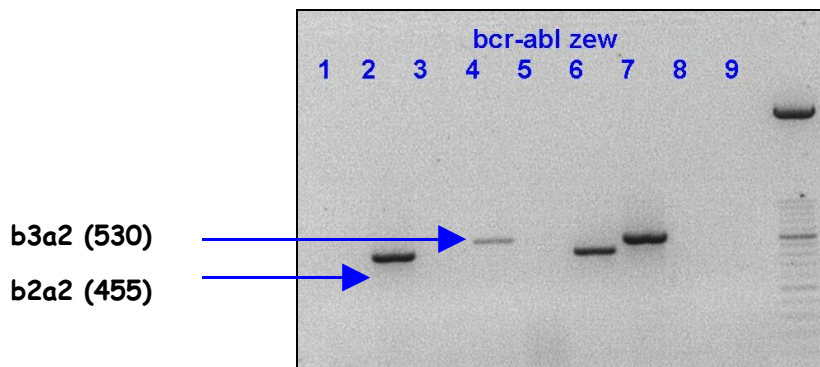
Czułość testów RT-PCR multipleks oraz gniazdowego przeprowadzono amplifikując serie 5 rozcieńczeń plazmidu zawierającego inserty cDNA odpowiadających znanej liczbie kopii genu *BCR-ABL*.

W wyniku przeprowadzonego testu stwierdzono czułość wykrywania transkryptu *BCR-ABL* metodą RT-PCR multipleks na  $10^5$ . W teście RT-PCR gniazdowym stwierdzono, iż w

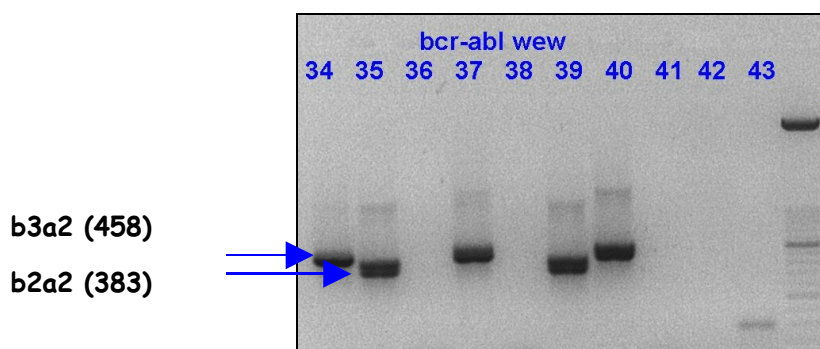
reakcji „zewnątrznej” można wykryć gen fuzyjny *BCR-ABL* z czułością  $10^3$  natomiast w reakcji „wewnętrznej” można wykryć gen fuzyjny *BCR-ABL* z czułością  $10^6$ . Tym samym potwierdzono zdolność reakcji do wykrycia pojedynczej kopii badanego transkryptu (Rycina 4.2).



B)



C)



**Rycina 4.2.** Przykładowe wyniki reakcji RT-PCR. W nawiasach prócz typu translokacji podano wielkość produktu – ilość par zasad

A) reakcja PCR Multipleks

B) reakcja PCR gniazdowa „zewnątrzna”

C) reakcja PCR gniazdowa „wewnętrzna”

Prążki nr 1- 9 w reakcji zewnętrznej odpowiadają odpowiednio prążkom nr 34 – 42

#### 4.2.2. Ustalenie parametrów krzywej standardowej

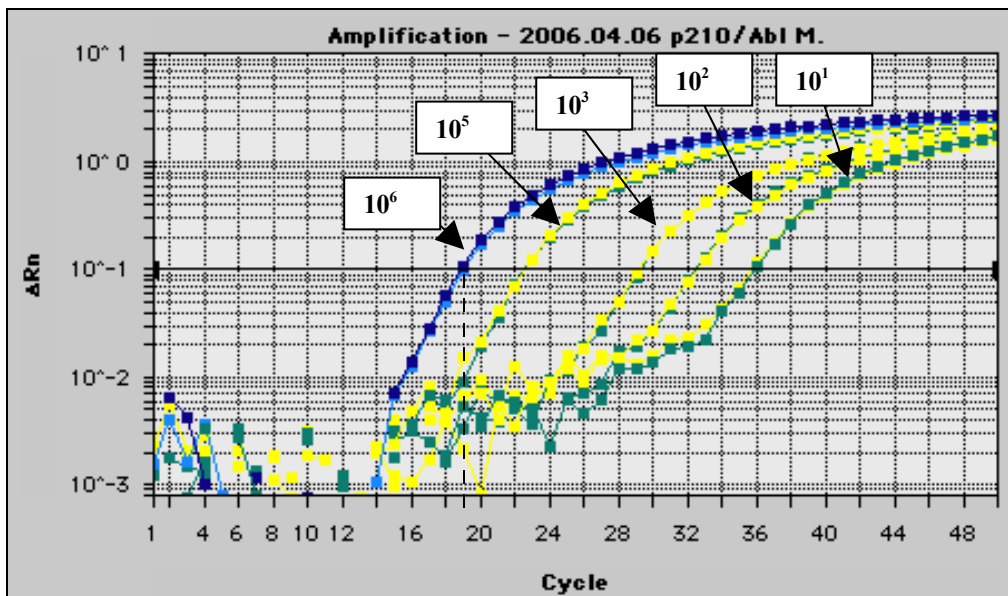
Ustalenie parametrów krzywej standardowej miało na celu wypracowanie powtarzalnej metodyki postępowania mającej zastosowanie do późniejszych testów RQ-PCR. We wszystkich przeprowadzonych analizach uzyskano wysokie i ogólnie zalecane parametry krzywej standardowej sporządzonej z wykorzystaniem plazmidu: wartość nachylenia krzywej (*Slope*)



wahała się pomiędzy -3,8 a -3,3; wartość *Intercept* wynosiła średnio 40,1 a najwyższy osiągnięty współczynnik korelacji wynosił 0,999 (Rycina 4.3).

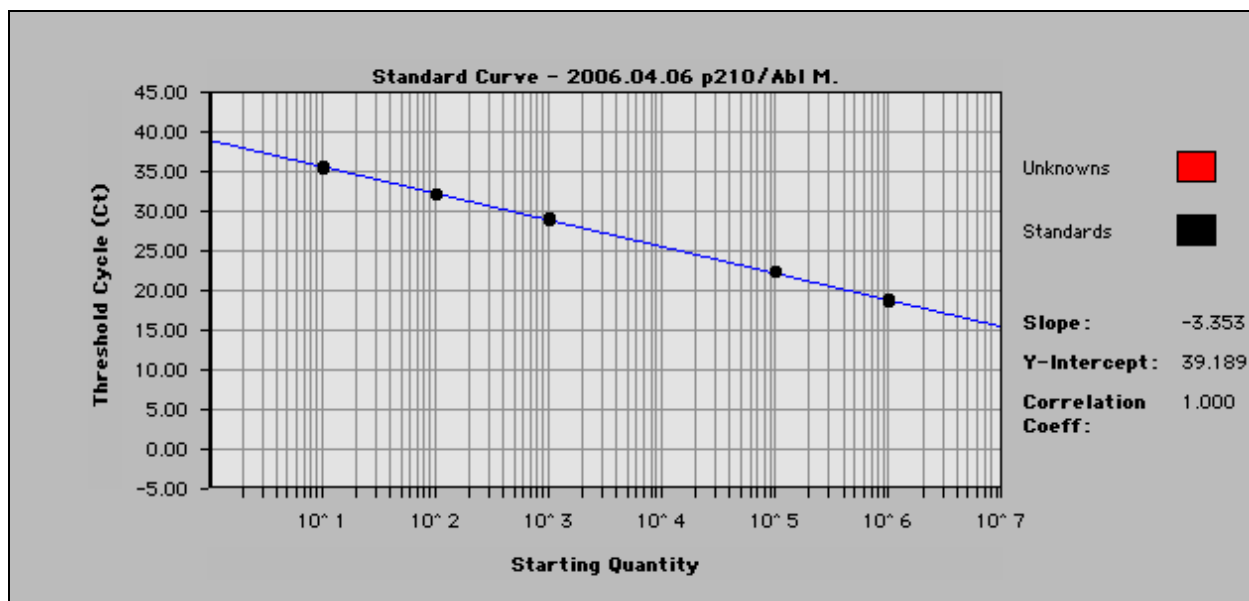
Uzyskane parametry krzywej standardowej pozwoliły na właściwą analizę próbek pochodzących od pacjentów.

A)



Ct:  $10^6$ : 20,21  
 $10^5$ : 23,15  
 $10^3$ : 29,98  
 $10^2$ : 33,66  
 $10^1$ : 36,23

B)



**Rycina 4.3.** Wynik analizy RQ-PCR z prawidłowym wykresem amplifikacji dla serii rozcieńczeń standardu dla genu *BCR-ABL*

A) Na osi x odłożona jest liczba cykli, na osi y poziom fluorescencji z poszczególnych cykli reakcji. Cykl progowy Ct (*threshold cycle*) definiowany jest jako cykl reakcji, w którym dochodzi do przekroczenia progu detekcji (rozpoczęcia logarytmicznego przyrostu produktu)

B) Przykład krzywej standardowej dla genu *BCR-ABL*. Czarne punkty oznaczają zastosowane rozcieńczenia standardu

#### 4.2.3. Czulość testu RQ-PCR

Każdy pojedynczy wynik badania otrzymany przy pomocy testu RQ-PCR analizowano pod względem czulości.

W przeprowadzonych badaniach, osiągnięto wysoką czulość testu ( $10^4$ - $10^6$ ) pozwalającą wykryć produkt genu fuzyjnego *BCR-ABL* w jednej komórce zmienionej chorobowo wśród 1:10 000 – 1:1 000 000 komórek prawidłowych.

Głównymi wartościami mającymi wpływ na ten parametr to wartość Ct genu kontrolnego (*ABL*), współczynnik nachylenia krzywej oraz wartość punktu przecięcia z osią y. Zaobserwowano, że najistotniejszy wpływ na czulość testów ma jakość genu *ABL*. W przypadkach wysokich wartości  $Ct_{Abi}$  (ok. 30 i powyżej 30) obserwowano duże spadki czulości pojedynczego testu, nawet do wartości  $10^{-3}$ .

Osiągnięte wartości czułości testu RQ-PCR były prawidłowe i wysokie – wskazywały na możliwość wykrywania badanego patologicznego klonu wśród 10 000 – 1 000 000 komórek zdrowych.

### 4.3. Ocena choroby resztkowej

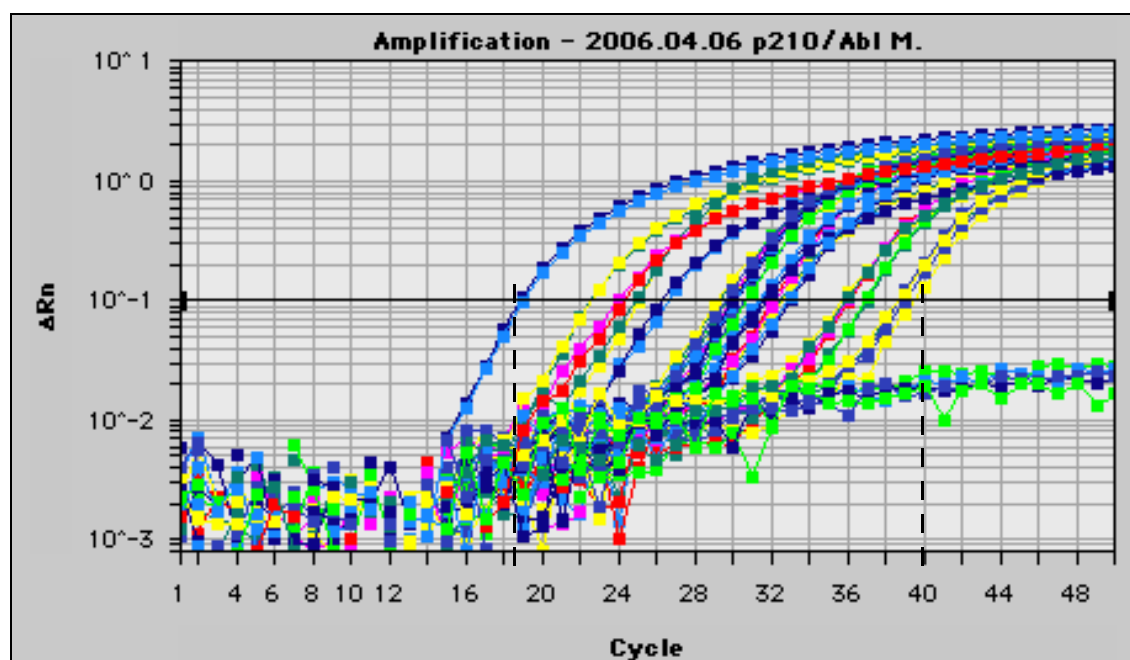
#### 4.3.1. Wyniki analiz RT-PCR

Analizowano próbki 60 pacjentów od momentu diagnozy, a następnie co trzy miesiące. Próbki, których Ct genu *ABL* było wyższe od wartości 32 nie analizowano. U wszystkich badanych pacjentów stwierdzono obecność genu fuzyjnego *BCR-ABL* (Aneks – Tabela 4.3). Stosunek transkryptów b3a2 do b2a2 wynosił odpowiednio 25/60 oraz 35/60 (41,7%/58,3%) (Aneks – Tabela 4.3). Ponadto u 2 badanych pacjentów stwierdzono dodatkowo obecność transkryptu e1a2 jednak jego ekspresja było dużo niższa od ekspresji transkryptu właściwego dla CML – w obu przypadkach pojawiał się on w teście wewnętrznym.

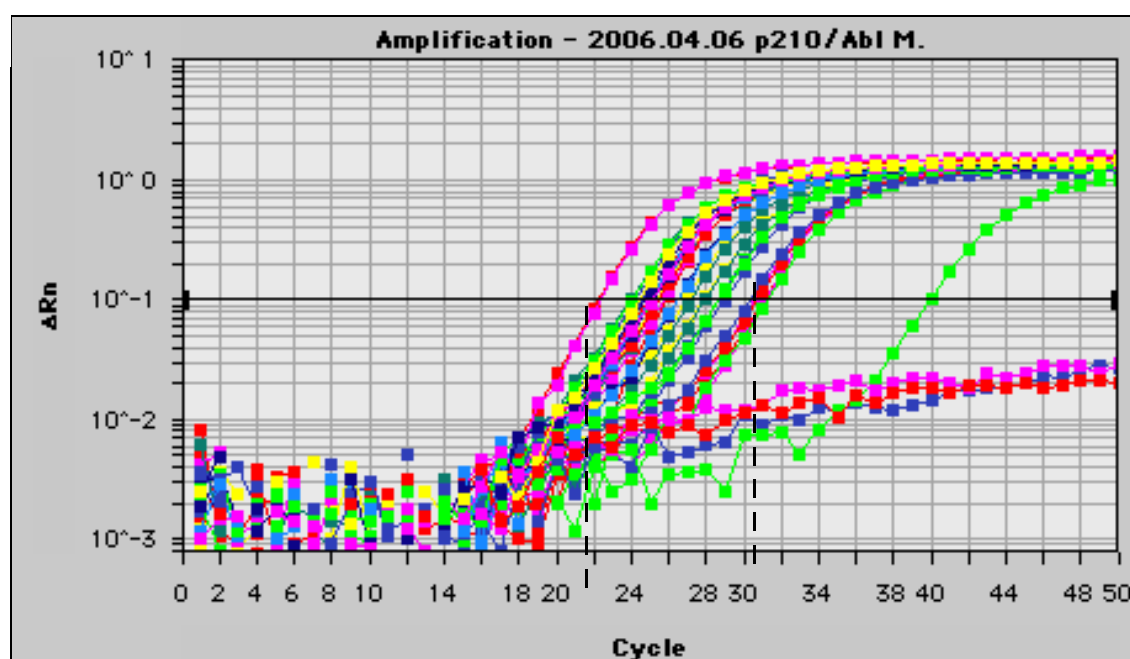
#### 4.3.2. Wyniki analiz RQ-PCR

Na wykresach amplifikacji dla transkryptu *BCR-ABL* (Rycina 4.4) przedstawiono przykładowy zakres wartości Ct – oscylują one w granicach 18,5 - odpowiadający bardzo wysokiej ekspresji genu *BCR-ABL*, a 38,5 – odpowiadający stosunkowo niskiej ekspresji tego genu. Wykresy amplifikacji dla transkryptu kontrolnego *ABL* mieszczą się w zdecydowanie węższym zakresie Ct: 23,8 a 30,5. Wskazuje to na stabilność i porównywalną ekspresję tego genu w różnych badanych próbkach. Wykresy amplifikacji nie przecinające linii odcięcia odpowiadają próbkom stanowiącym kontrolę odczynnikową (zamiast matrycy – woda wolna od RNAz) lub są to próbki negatywne (brak szukanego transkryptu) odpowiadająca im wartość Ct wynosi 50.

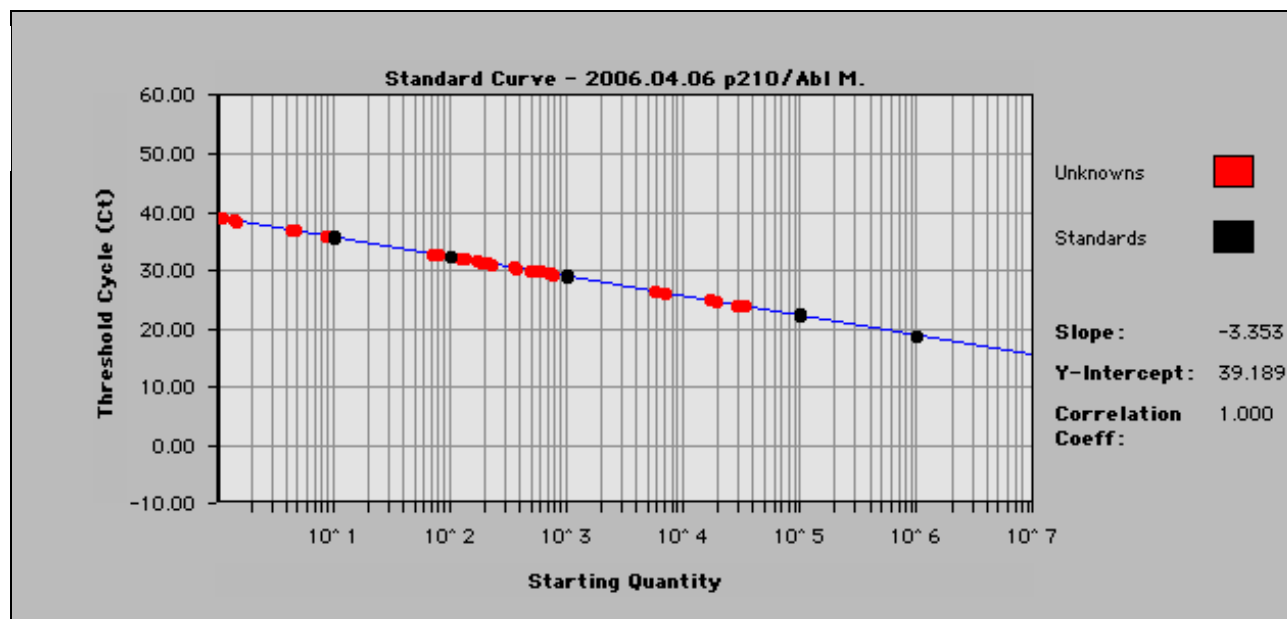
A)



B)



c)



**Rycina 4.4.** Wynik analizy RQ-PCR z prawidłowym wykresem amplifikacji

- A) dla genu *BCR-ABL* – wartości Ct rozkładają się pomiędzy wartościami 18,5 a 38,5
- B) dla genu *ABL* - wartości Ct rozkładają się pomiędzy wartościami 23,8 a 30,5
- C) Krzywa standardowa dla genu *BCR-ABL* – czarne punkty stanowią kolejne rozcieńczenia standardu, czerwone punkty to poszczególne analizowane próbki

Wartości odpowiadające bezwzględnej liczbie kopii transkryptów *BCR-ABL* oraz *ABL* obliczano w odniesieniu do krzywej standardowej po każdej przeprowadzonej reakcji PCR. Wynik każdej badanej próbki przedstawiano jako stosunek liczby kopii *BCR-ABL* do *ABL*. Wartości przedstawiano w jednostkach procentowych i korygowano o 1 (wartość współczynnika korygującego). Każdą wartość odnoszono do skali logarytmicznej. Uzyskany stosunek *BCR-ABL/ABL* dla każdego pacjenta przedstawiano na wykresie w odniesieniu do daty przyjęcia materiału – uzyskując wynik kinetyki transkryptu w czasie. Każdorazowo obliczano także czułość testu RQ-PCR.

Średni czas obserwacji wynosił 36 miesięcy.

Łącznie przebadano 60 pacjentów przeprowadzając 1440 analiz RQ-PCR. Średni wyjściowy poziom *BCR-ABL/ABL* u wszystkich pacjentów wynosił 105,67% (31,1% - 228,8%). Średni wyjściowy poziom *BCR-ABL/ABL* u pacjentów poddanych przeszczepowi komórek hematopoetycznych wynosił 47,5%. Średni wyjściowy poziom *BCR-ABL/ABL* u pacjentów leczonych leczeniem zachowawczemu a następnie Imatinibem wynosił 110%. Średni wyjściowy poziom *BCR-ABL/ABL* u pacjentów leczonych Imatinibem jako lekiem pierwszego rzutu wynosił 100%. Średni poziom *BCR-ABL/ABL* u pacjentów w fazie przewlekłej CML

*versus* w fazie akceleracji i kryzy blastycznej wynosił odpowiednio 97,1%; 107,1% oraz 136,6% (różnice nieistotne statystycznie).

Średni poziom *BCR-ABL/ABL* po roku stosowania Imatinibu wynosił średnio 41,52%.

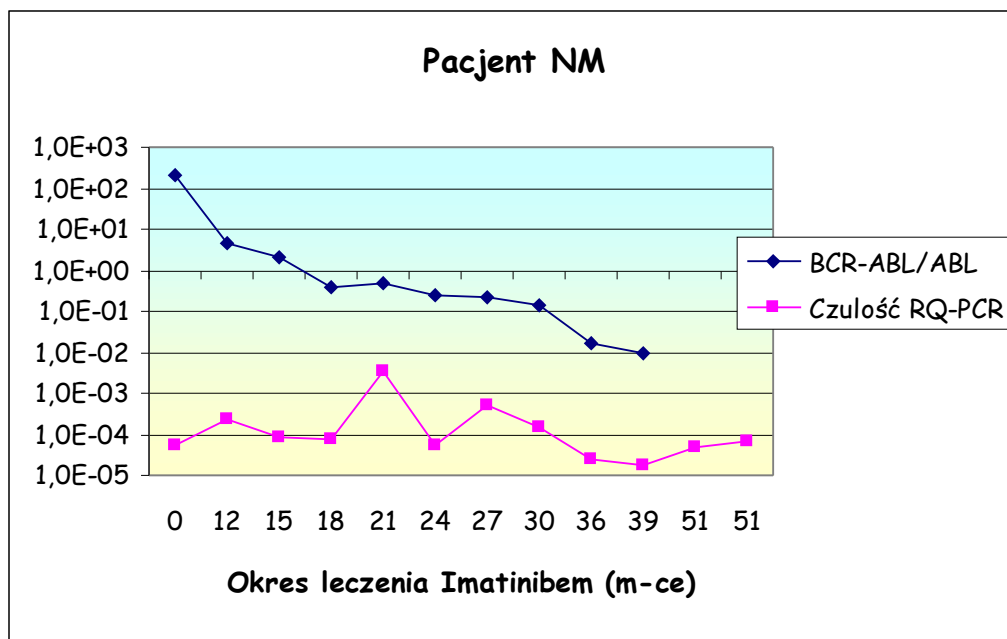
U większości pacjentów objętych badaniem, diagnostyka molekularna przebiegała systematycznie, zgodnie z zalecanymi standardami od momentu włączenia leku Imatinib. Imatinib jest obecnie stosowany jako terapia pierwszego rzutu u pacjentów z CML [34]. W związku z tym, analizę wyników uzyskanych techniką RQ-PCR prowadzono od momentu włączenia tego leku.

#### 4.3.3. Kinetyka zmian liczby kopii transkryptu *BCR-ABL* u badanych chorych

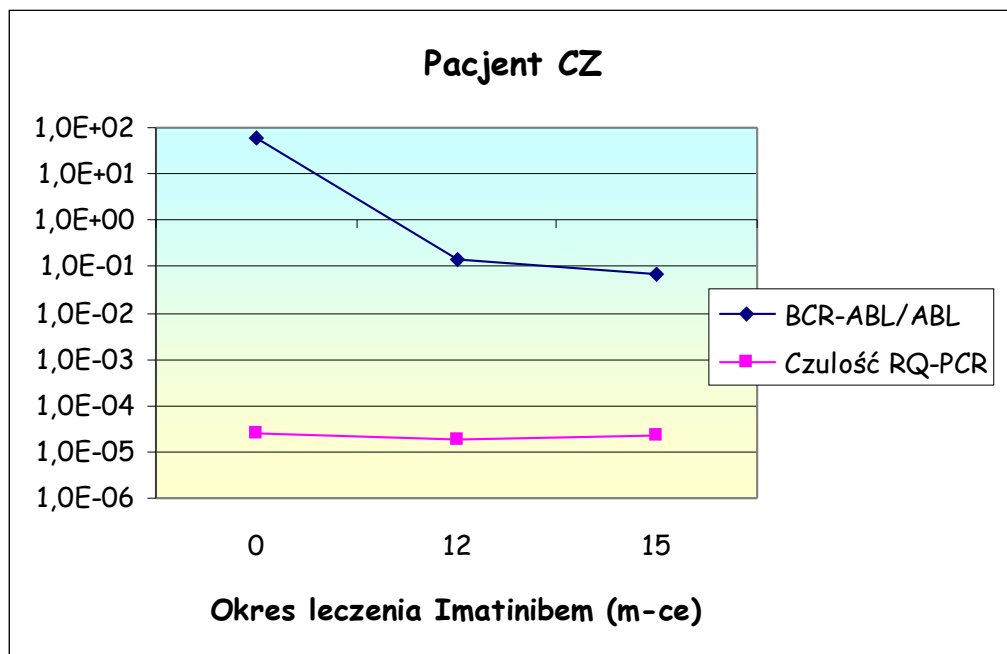
U pacjentów poddanych terapii Imatinibem, zaobserwowano stopniowy spadek ilości transkryptu *BCR-ABL* mierzony techniką RQ-PCR (>2 log redukcja). W tej grupie u 4/15 pacjentów, log redukcja wyniosła  $\geq 3$  log (Rycina 4.6), a u 2/15 pacjentów osiągnięto 4 krotną redukcję transkryptu w skali logarytmicznej (Rycina 4.5). U 7/15 pacjentów log redukcja oscylowała w granicach 2 log i utrzymywała się tendencja spadkowa badanego genu (Rycina 4.7).

**Tabela 4.4.** Wartość osiągniętej log redukcji w badanej grupie pacjentów, N=60

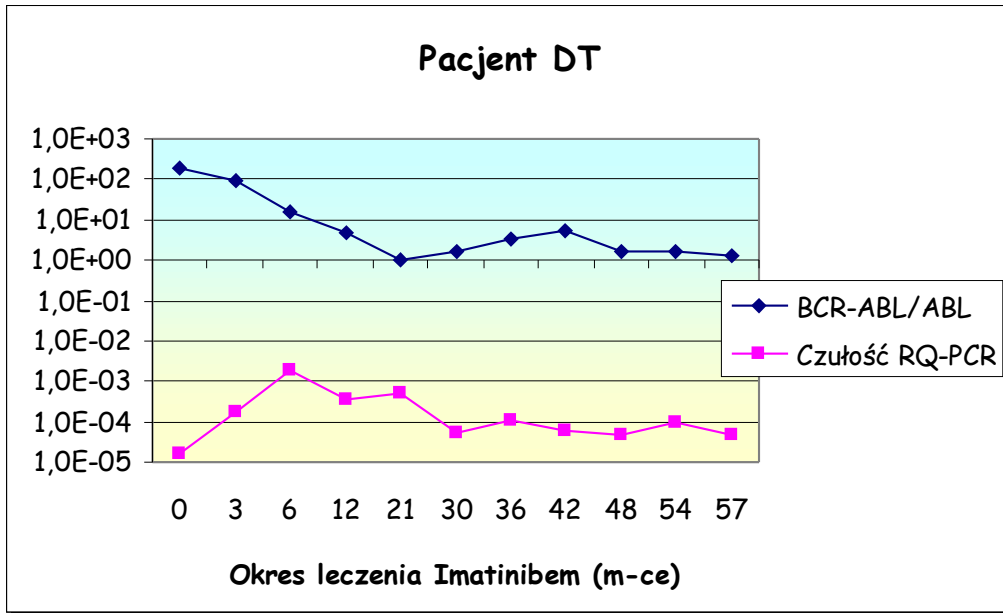
LOG REDUKCJA	% PACJENTÓW
0	19 (31,7%)
1	7 (11,7%)
2	10 (16,7%)
$\geq 3$	12 (20%)
4	12 (20%)



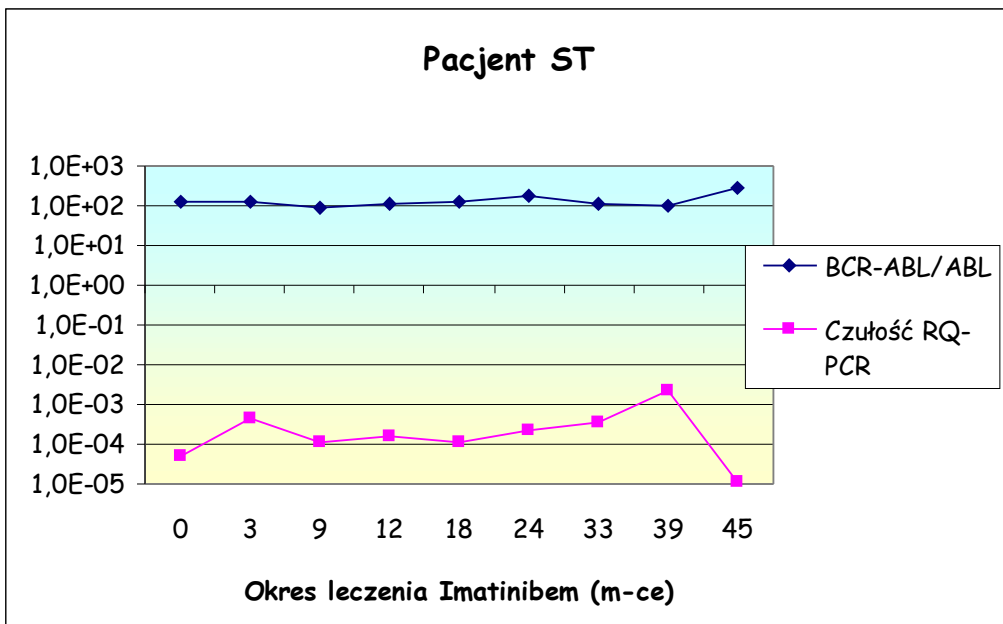
**Rycina 4.5.** Przykład kinetyki zmian ilości transkryptu u pacjenta z całkowitą odpowiedzią molekularną (4 log redukcja) (wykres niebieski). Poniżej czułość poszczególnych testów RQ-PCR (wykres różowy)



**Rycina 4.6.** Przykład kinetyki zmian ilości transkryptu u pacjenta i osiągnięta >3 log redukcja (wykres niebieski). Poniżej czułość poszczególnych testów RQ-PCR (wykres różowy)



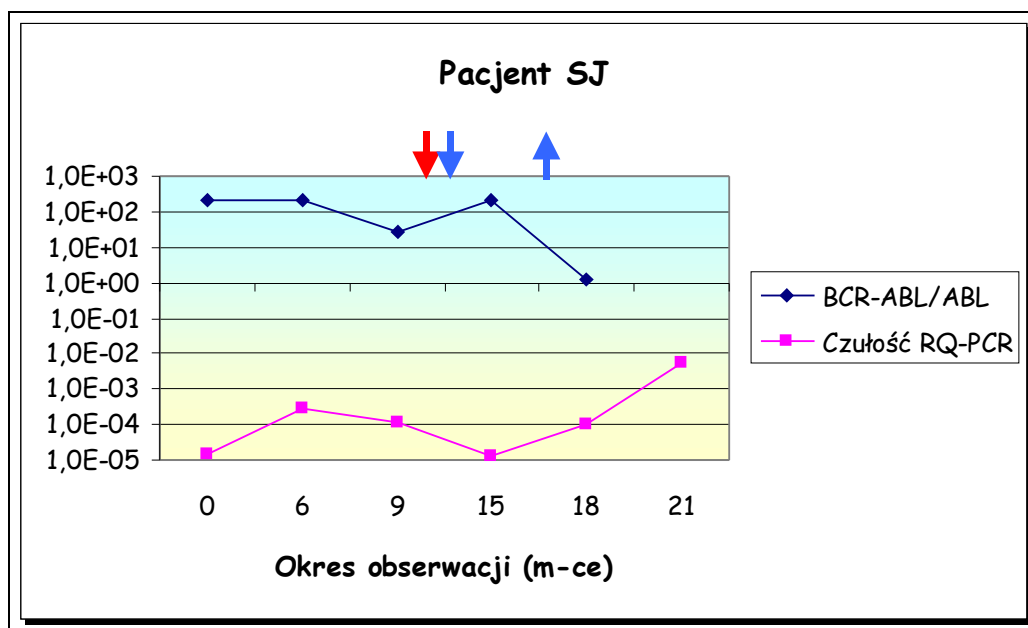
**Rycina 4.7.** Przykład kinetyki zmian ilości transkryptu u pacjenta z redukcją na poziomie 2 log (wykres niebieski). Poniżej czułość poszczególnych testów RQ-PCR (wykres różowy)



**Rycina 4.8.** Przykład kinetyki zmian ilości transkryptu u pacjenta z progresją do kryzy blastycznej (wykres niebieski). Poniżej czułość poszczególnych testów RQ-PCR (wykres różowy)



U jednego z pacjentów poddanego transplantacji szpiku kostnego, po okresie istotnej redukcji klonu białaczkowego, nastąpił nagły jego wzrost i nawrót choroby. Wraz z podaniem Imatinibu i późniejszym odstawieniem leczenia immunosupresyjnego, zaobserwowano spadek ilości komórek z genem *BCR-ABL* do poziomu niewykrywalnego techniką RQ-PCR (Rycina 4.9).



**Rycina 4.9.** Przykład kinetyki zmian ilości transkryptu u pacjenta po przeprowadzonej transplantacji szpiku kostnego i podaniu Imatinibu w okresie nawrotu choroby (wykres niebieski). Poniżej czułość poszczególnych testów RQ-PCR (wykres różowy). Czerwona strzałka wskazuje moment podania Imatinibu, niebieskie strzałki wskazują rozpoczęcie i zaprzestanie leczenia immunosupresyjnego

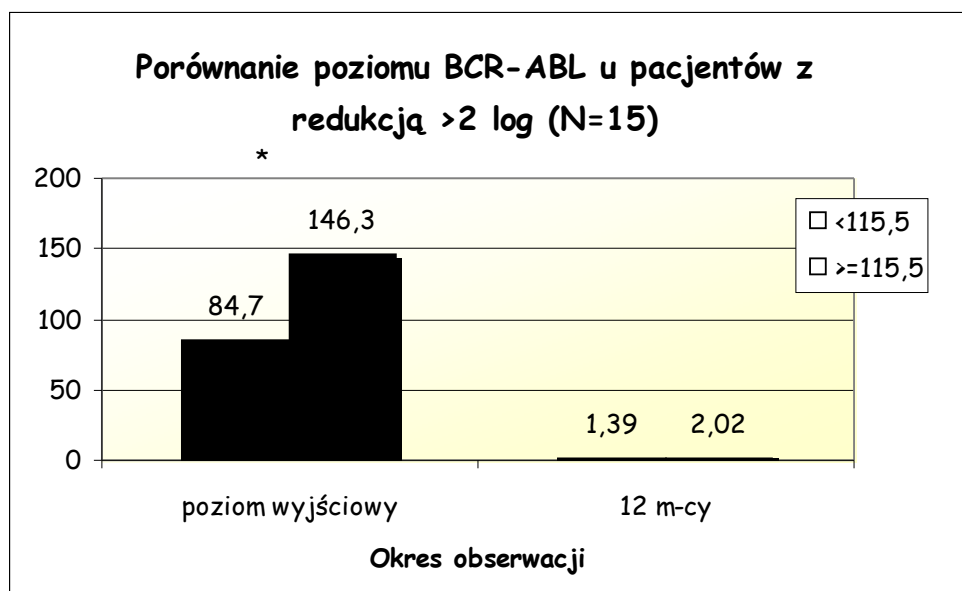
#### 4.3.4. Porównanie spadku ilości transkryptu po 12 miesiącach terapii Imatinibem

Porównano grupę pacjentów leczonych Imatinibem jako lekiem pierwszego rzutu, którzy osiągnęli  $>2$  log redukcję *BCR-ABL* z wysokim poziomem wyjściowym (N=12) i niskim poziomem wyjściowym (N=9). Średnia wartość wyjściowa *BCR-ABL/ABL* w tej grupie pacjentów wynosiła 115,5. Na tej podstawie pacjentów podzielono na dwie grupy: z wartością wyjściową  $<115,5$ , oraz z wartością wyjściową  $\geq 115,5$ . Dla obu grup pacjentów policzono średni poziom transkryptu *BCR-ABL* po 12 miesiącach stosowania Imatinibu. Po zastosowaniu testu statystycznego t-studenta stwierdzono wysoką różnicę w istotności w obrębie obu grup na początku badania ( $p=0,005$ ), natomiast nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych pomiędzy grupami po okresie 12 miesięcy ( $p=0,66$ ) (Tabela 4.5/Rycina 4.10).

Wyjściowa liczba kopii transkryptu *BCR-ABL* nie ma znaczenia jeśli chodzi o późniejszy spadek liczby kopii transkryptu.

**Tabela 4.5.** Porównanie średnich wartości *BCR-ABL* u pacjentów z wysokim poziomem wyjściowym i niskim poziomem wyjściowym, N=15

Okres terapii imatinibem (m-ce)	Niski poziom wyjściowy <i>BCR-ABL/ABL</i> (%)	Wysoki poziom wyjściowy <i>BCR-ABL/ABL</i> (%)	Istotność statystyczna (p-value)
Poziom wyjściowy	84,7	146,3	0,005*
12	1,39	2,02	0,66



**Rycina 4.10.** Porównanie średnich wartości *BCR-ABL* u pacjentów z wysokim poziomem wyjściowym i niskim poziomem wyjściowym, N=15

#### 4.3.5. Porównanie wyników RQ-PCR z wynikami RT-PCR

W tabeli 4.6 przedstawiono porównanie wyników otrzymanych przy użyciu testów RQ-PCR oraz RT-PCR na przykładzie jednego z pacjentów leczonych Imatinibem przez okres 30 miesięcy. Oba testy oparte są na badaniu ekspresji genów. Test RQ-PCR pozwala na dużo precyzyjniejsze określenie poziomu transkryptu *BCR-ABL*, podczas gdy testem RT-PCR jesteśmy w stanie określić tylko w przybliżeniu czy transkrypt występuje na określonym poziomie (Tabela 4.6).

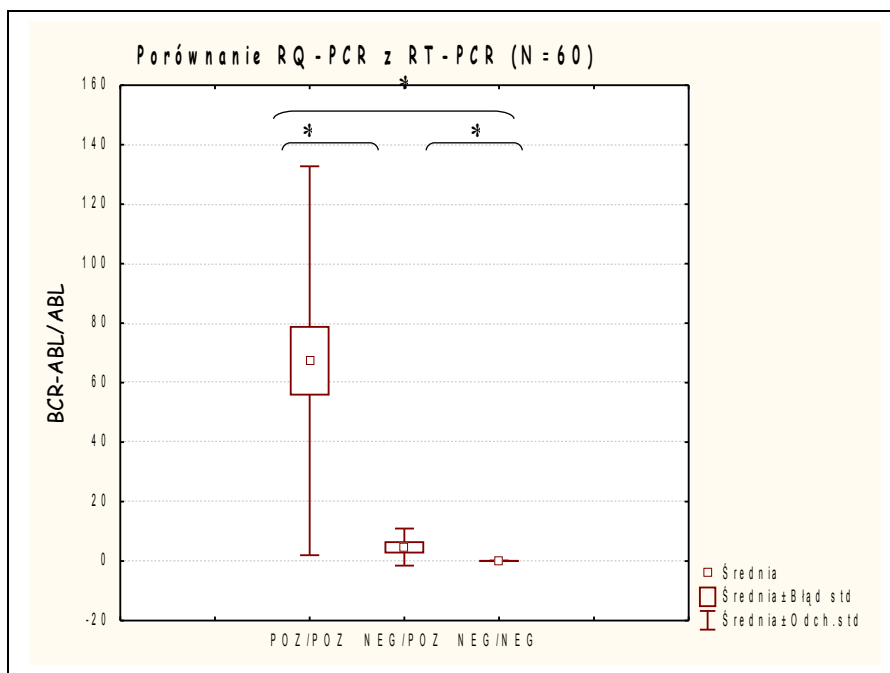
Test RQ-PCR pozwala na dokładne określenie wahań poziomu transkryptu *BCR-ABL* w porównaniu z testem RT-PCR.



**Tabela 4.6.** Porównanie wyników RQ-PCR z wynikami RT-PCR w okresie terapii Imatinibem na przykładzie pacjenta DK

OKRES TERAPII	0	+6	+12	+18	+24	+30
Wynik badania RQ-PCR (BCR-ABL/ABL)	94,02 %	56,80 %	0,06 %	0,04 %	0,02 %	0 %
Wynik badania RT-PCR	POZ/POZ	POZ/POZ	NEG/POZ	NEG/POZ	NEG/POZ	NEG/NEG

Porównano również wyniki testów RT-PCR z wynikami testów RQ-PCR po 12 miesiącach terapii. Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy testu t (Rycina 4.11).



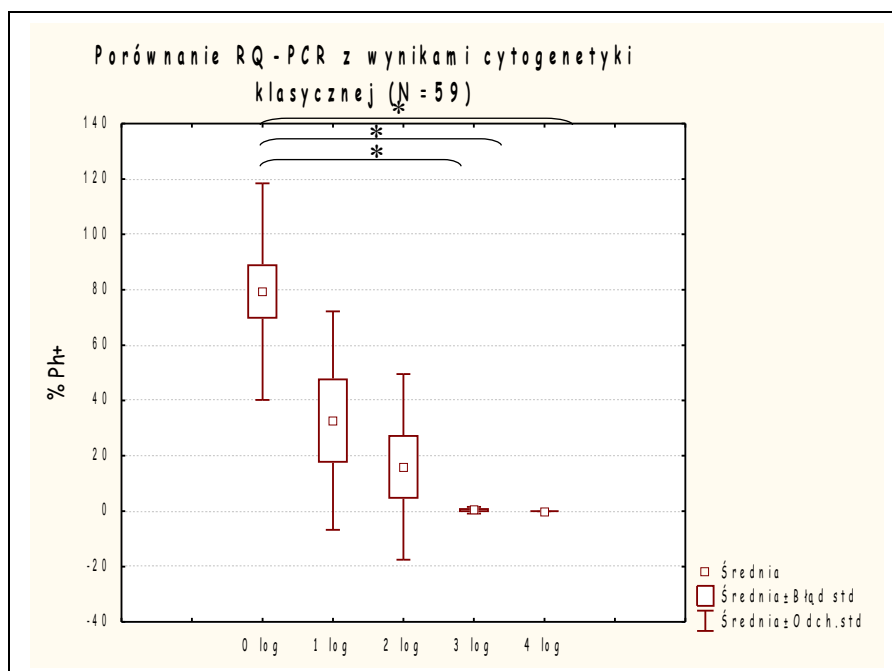
**Rycina 4.11.** Korelacja pomiędzy ilością transkryptu *BCR-ABL* i wynikami gniazdowego testu RT-PCR. Wynik pozytywny w teście zewnętrznym, wewnętrznym, wynik negatywny zaznaczono odpowiednio jako POZ/POZ, NEG/POZ, NEG/NEG

W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że średni stosunek *BCR-ABL/ABL* stwierdzony testem RQ-PCR wynosi odpowiednio 70,27 dla POZ/POZ, 4,64 dla NEG/POZ, oraz 0,04 dla NEG/NEG. Wyniki RQ-PCR różnią się istotnie pomiędzy POZ/POZ a NEG/POZ ( $p=0,005$ ) oraz POZ/POZ a NEG/NEG ( $p=0,003$ ). Porównując wyniki RQ-PCR pomiędzy NEG/POZ a NEG/NEG również stwierdzono, że wyniki te różnią się pomiędzy sobą istotnie na poziomie  $p=0,02$ .

Istnieje istotna zależność pomiędzy wynikami RQ-PCR a wynikami RT-PCR w badanej grupie pacjentów.

#### 4.3.6. Porównanie wyników RQ-PCR z wynikami uzyskanymi techniką cytogenetyki klasycznej

Celem porównania badania RQ-PCR z badaniem cytogenetycznym była odpowiedź na pytanie czy i w jakim stopniu metody mogą się uzupełniać i czy wynik otrzymany jedną z nich można w jakimkolwiek stopniu odnieść do drugiej. Do analizy wzięto pod uwagę wyniki pacjentów po okresie 12 miesięcy obserwacji. Porównano stosunek kopii *BCR-ABL/ABL* w skali logarytmicznej do ilości komórek Ph<sup>+</sup> wyrażonych procentowo. Istotność statystyczną badano przy pomocy testu t.



**Rycina 4.12.** Korelacja pomiędzy logarytmicznym spadkiem ilości transkryptu *BCR-ABL* i odpowiadającemu mu % komórek Ph-pozytywnych

W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że do pewnego stopnia wyniki RQ-PCR i cytogenetyki klasycznej są porównywalne. U pacjentów, u których nie stwierdzono spadku liczby kopii *BCR-ABL* o 2 lub więcej log można uznać że nie osiągnęli oni również remisji cytogenetycznej, a odsetek komórek *Philadelphia*-pozytywnych jest bardzo wysoki: 79,3% Ph+ u pacjentów, u których nie zaobserwowano spadku transkryptu *BCR-ABL* i 32,7% Ph+ u pacjentów u których wystąpił minimalny spadek *BCR-ABL* (1 log). W przypadku osób, którzy osiągnęli spadek *BCR-ABL* o około 2 log, stwierdzono, że tylko część z nich osiągnęła całkowitą remisję cytogenetyczną (średnio 16% Ph+). W badanej grupie, u pacjentów, którzy osiągnęli spadek transkryptu o 3 log tylko u jednej osoby zaobserwowano pozytywny wynik jeśli chodzi o odsetek komórek Ph+ i wynosił on 4% (średnio 0,4% Ph+). U osób którzy uzyskali całkowitą remisję molekularną a której odpowiada spadek *BCR-ABL* o 4 log, zawsze stwierdzano brak komórek Ph+ w badaniu cytogenetycznym (Rycina 4.12).

Testy statystyczne wykazały, że istotne różnice występują pomiędzy wynikami odpowiadającymi spadkowi o 0 log a 2 log ( $p=0,006$ ), 0 log a 3 log ( $p=0,00009$ ) oraz pomiędzy 0 log a 4 log ( $p=0,00005$ ). Pozostałe wyniki nie różnią się pomiędzy sobą w sposób istotny.

#### 4.3.7. Korelacja wyników badania techniką RQ-PCR z przebiegiem klinicznym CML

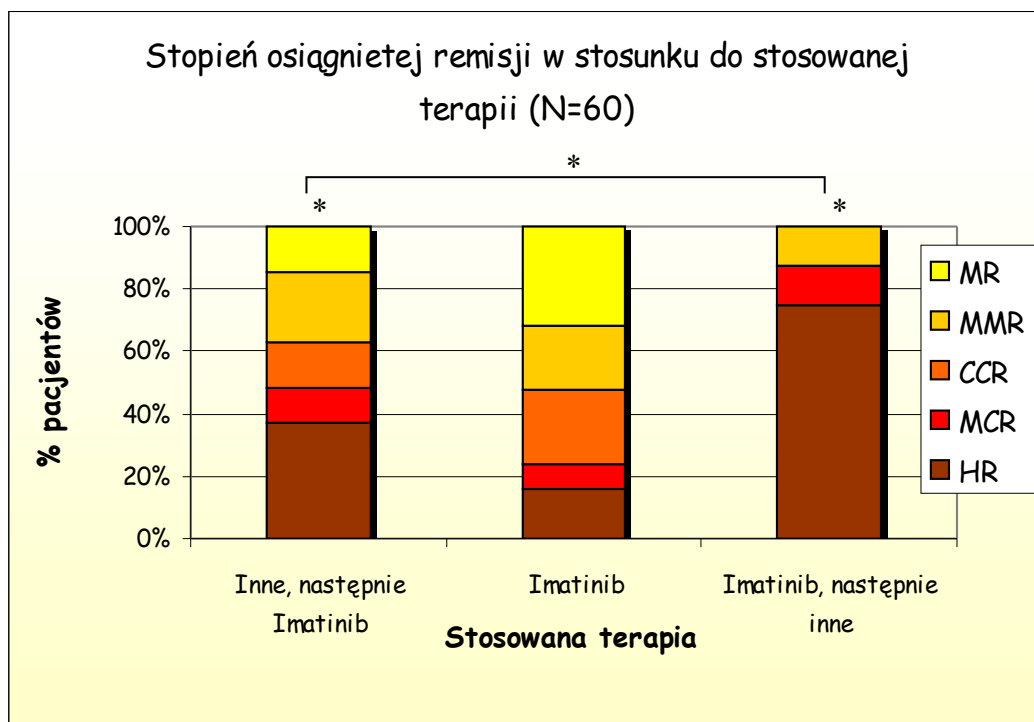
W grupie pacjentów leczonych innym rodzajem terapii a następnie Imatinibem zaobserwowano, że większość z nich nie osiągnęła remisji cytogenetycznej ani molekularnej. Najwyższy odsetek pacjentów osiągnął tylko remisję hematologiczną. W tej grupie pacjentów zaobserwowano również stosunkowo wysoki odsetek osób z osiągnięta większą odpowiedzią a także remisją molekularną (Rycina 4.13).

W grupie pacjentów leczonych Imatinibem połowa pacjentów osiągnęła większą odpowiedź molekularną (w tym 32% osiągnęło remisję molekularną). W tej grupie pacjentów wystąpiła również duża liczba osób z całkowitą odpowiedzią cytogenetyczną (24%) (Rycina 4.13).

W grupie pacjentów u których zastosowano terapię Imatinibem a następnie inny rodzaj terapii stwierdzono najniższy stopień odpowiedzi. Większość chorych w tej grupie osiągnęła tylko odpowiedź hematologiczną (6/8 chorych), u jednej osoby zaobserwowano całkowitą odpowiedź cytogenetyczną i u jednej większą odpowiedź molekularną (Rycina 4.13).

W przeprowadzonej analizie statystycznej stwierdzono istotne różnice w obrębie grup pacjentów leczonych terapią inną niż Imatinib a następnie Imatinibem ( $p=0,01$ ) oraz w grupie pacjentów leczonych tylko Imatinibem ( $p=0,007$ ). Nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych w obrębie grupy pacjentów leczonych Imatinibem a następnie innym rodzajem terapii ( $p=0,22$ ) (Rycina 4.13).

Analizując różnice występujące pomiędzy grupami pacjentów przyjmującymi trzy różne rodzaje terapii (inne niż Imatinib a następnie Imatinib, Imatinib, Imatinib a następnie inne) stwierdzono istotne różnice tylko pomiędzy grupami leczonymi terapią inną niż Imatinib, następnie Imatinibem oraz leczonymi Imatinibem a następnie innym rodzajem terapii ( $p=0,001$ ) (Rycina 4.13).



**Rycina 4.13.** Zestawienie stopnia osiągniętej remisji w stosunku do rodzaju stosowanej terapii w badanej grupie chorych na CML. HR – remisja hematologiczna, MCR – częściowa odpowiedź cytogenetyczna, CCR – całkowita odpowiedź cytogenetyczna, MMR – większa odpowiedź molekularna, MR- remisja molekularna

Rozdział V

DYSKUSJA



## 5.1. Wprowadzenie

W niniejszej pracy, przedstawiono czułą metodę śledzenia choroby resztkowej u pacjentów chorych na przewlekłą białaczkę szpikową. Celem pracy było opracowanie i wdrożenie metody ilościowej PCR (RQ-PCR) do analizy ekspresji genu fuzyjnego *BCR-ABL*.

Charakterystyczną cechą przewlekłej białaczki szpikowej jest występowanie w komórkach pacjentów chromosomu *Philadelphia* stwierdzanego w badaniu kariotypu oraz jego molekularnego odpowiednika: genu chimerowego *BCR-ABL*. Transformacja indukowana przez gen *BCR-ABL* prowadzi do zmian w proliferacji, przeżyciu oraz adhezji komórek CML. Białko fuzyjne bcr-abl posiada cytoplazmatyczną aktywność kinazy tyrozynowej. Dlatego, specyficzny inhibitor kinazy tyrozynowej jakim jest Imatinib, ma tak ogromne znaczenie terapeutyczne [35]. Jest to terapia stosunkowo nowa, celowana i bardzo obiecująca [36]. Pacjentów chorych na CML zakwalifikowanych do niniejszego badania leczono Imatinibem.

Możliwość śledzenia czułą metodą zmian ilości transkryptu na poziomie genomu ma ogromne znaczenie prognostyczne. Ponadto, stanowi cenne źródło informacji oraz stwarza szansę określania skuteczności prowadzonego leczenia. Informacja na temat minimalnej choroby resztkowej (MRD) u pacjentów cierpiących na nowotworowe choroby układu hematopoetycznego stanowi obecnie niezależny czynnik prognostyczny w tego typu schorzeniach. Monitorowanie MRD ma również ogromne znaczenie kliniczne, ponieważ umożliwia szybką reakcję na pojawiające się sygnały mogące świadczyć o niepowodzeniu leczenia.

## 5.2. Izolacja materiału od pacjentów

W niniejszej pracy materiałem wyjściowym do badania poziomu transkryptu *BCR-ABL* był szpik kostny. Obecne rekomendacje (opublikowane w 2006) wskazują że równie poprawne jest pobieranie do badań krwi obwodowej [28]. Zaleca się, aby źródło komórek było stale to samo oraz aby liczba wyizolowanych komórek nie była niższa niż  $1 \times 10^7$ . Pomimo występowania różnic w przypadku niskiego poziomu genu w materiale izolowanym z krwi obwodowej i ze szpiku kostnego, są one niewielkie [28]. Ponadto występuje dobra korelacja pomiędzy ilością komórek Ph<sup>+</sup> stwierdzonych badaniem cytogenetyki klasycznej, które wykorzystuje jako źródło komórek hemopoetycznych szpik kostny, a poziomem *BCR-ABL/ABL* stwierdzonym techniką RQ-PCR [37].

Równocześnie, w przypadku izolacji komórek nie zaleca się stosowania metody rozdziału w gradiencie gęstości jak to było wykonane w niniejszej pracy ze względu na to, że w

uzyskanej frakcji leukocytów (komórki jednojądrzaste) czułość wykrycia genu *BCR-ABL* może być niższa niż w przypadku wszystkich leukocytów po uprzedniej lizie erytrocytów [28]. Wykorzystując technikę RQ-PCR opracowaną w niniejszej pracy do kontynuacji monitorowania leczenia u chorych na CML należy rozważyć izolację komórek z krwi obwodowej a następnie izolację pełnej frakcji leukocytów.

### 5.3. Wybór odpowiedniego materiału do badań

Aby technika RQ-PCR była prawidłowo przeprowadzona a wyniki uzyskane przy jej pomocy wiarygodne, wszystkie etapy procedury muszą być zoptymalizowane: pobranie próbki do badania, izolacja RNA oraz sama reakcja ilościowa. Niezwykle ważna jest jakość uzyskanego materiału genetycznego [28, 37]. Metoda TRIzolowa jest uznana przez wielu autorów [28, 38] i rekomendowana przez autorów programu *Europe Against Cancer* oraz innych, służąca analizie monitorowania choroby resztkowej [28, 31, 39]. Podobnie, w przypadku reakcji odwrotnej transkrypcji, na podstawie przeprowadzonych eksperymentów do dalszych etapów pracy zastosowano odwrotną transkryptazę Superscript II™ jako najbardziej czułą. Polimeraza ta również jest jedną z dwu rekomendowanych przez program *EAC* [10]. Zgodna z założeniami programu *EAC* i BIOMED jest również ilość jednostek polimerazy dodawana do reakcji RT [8, 10]. Polimeraza ta ponadto należy do polimeraz typu AMV-RT (*avian myeloblastosis virus reverse transcriptase*) i eliminuje problemy związane z dwurzędową strukturą RNA w zestawieniu z polimerazami typu MMLV-RT (*Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*) [40]. Ostatnie rekomendacje opracowane przez Timothy Hughes'a i współpracowników wskazują, że Superscript II jest najlepszym enzymem stosowanym do reakcji RT poprzedzającej ilościową analizę genu *BCR-ABL* [28].

### 5.4. Jakościowa ocena choroby resztkowej na podstawie genu fuzyjnego

Specyficzny dla klonu białaczkowego marker stanowią geny fuzyjne będące wynikiem translokacji. Technika PCR poprzedzona odwrotną transkrypcją jest metodą pozwalającą określić i rozróżnić poszczególne typy genu chimerowego *BCR-ABL*. W badanej grupie, proporcja występowania translokacji *BCR/ABL* o typie b2a2/b3a2 wynosiła 25/35. Ponadto technika gniazdowa RT-PCR może służyć monitorowaniu postępów terapii ze względu na swą bardzo dużą czułość (możliwość wykrycia pojedynczej komórki białaczkowej wśród  $10^5$  -  $10^6$  komórek prawidłowych) [41]. U chorych na CML, transkrypt *BCR-ABL* najczęściej występuje w postaci izoform b2a2 oraz b3a2. Nie stwierdzono aby poszczególne typy ani ich równoczesne

występowanie u jednego pacjenta miało znaczenie prognostyczne [42, 43]. Metoda RT-PCR jest odpowiednia do wykrywania transkryptu *BCR-ABL* u ponad 95% przypadków CML [44].

W organizmie pacjenta w momencie rozpoznania CML istnieje około  $10^{12}$  komórek nowotworowych [45]. W kontekście analizy *MRD* test RT-PCR jest testem najczulszym mogącym wykryć nawet pojedynczą komórkę białaczkową na tle  $10^5$  -  $10^6$  komórek prawidłowych. Jednak pomimo tak wysokiej czułości metody i jej negatywnego wyniku, nadal możemy mieć do czynienia z niewielką populacją komórek resztkowych, które mogą stać się przyczyną pełnego nawrotu choroby [29, 46]. Czułość z którą choroba resztkowa jest mierzona zależy w tej technice głównie od liczby wyizolowanych komórek krwi obwodowej lub szpiku kostnego [29].

U pacjentów po przeprowadzonej transplantacji szpiku kostnego, wynik negatywny uzyskany tym testem daje duże prawdopodobieństwo na dobry dalszy przebieg, jednak wynik pozytywny jest trudny do interpretacji. Kiedy u większości pacjentów wynik badania RT-PCR jest dodatni, przy równoczesnym braku zaburzeń w obrazie klinicznym podczas pierwszych 6 miesięcy po transplantacji, wynik ten można uznać za dobrym marker ryzyka nawrotu w okresie 6-12 miesięcy po przeszczepie (20-40% pacjentów) [47]. Czasami nawet kilka lat po przeszczepie może wystąpić pozytywny wynik RT-PCR bez żadnych oznak progresji choroby. Może to świadczyć o występowaniu wzajemnej egzystencji komórek CML i układu immunologicznego [48]. Ponadto RT-PCR nie pozwala nam na przewidywania nawrotu choroby [29], a wyniki uzyskane przy pomocy techniki RT-PCR nie zawsze są do końca zgodne z obrazem klinicznym pacjentów, częściowo ze względu na fakt, że jest to technika trudna do standaryzacji [10, 46]. Technika RT-PCR może być stosowana do monitorowania stanu pacjentów po przeszczepie pod kilkoma warunkami:

- Transkrypt *BCR-ABL* może być wykryty u większości pacjentów kilka miesięcy po transplantacji co potwierdza przetrwanie komórek białaczkowych zastosowane kondycjonowanie
- Choroba stwierdzona testem RT-PCR koreluje z brakiem mniej groźnej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi
- Pacjenci u których nie stwierdzono obecności transkryptu *BCR-ABL* w okresie dłuższym niż 6 miesięcy po przeszczepie, występuje niższe ryzyko nawrotu choroby, jednak nie jest to gwarancją stabilnej remisji
- Pacjenci, u których stwierdza się nawrót wg kryteriów hematologicznych lub cytogenetycznych transkrypt wykrywany techniką RT-PCR jest wciąż obecny

- Jakościowa technika RT-PCT nie może być powszechnie stosowana do przewidywania ryzyka nawrotu u poszczególnych pacjentów [49].

Wobec ograniczeń metody RT-PCR powstała technika ilościowej PCR pozwalająca na monitorowanie kinetyki transkryptu *BCR-ABL* [50].

## 5.5. Ilościowa analiza kinetyki transkryptu *BCR-ABL*

Doświadczenia ostatnich lat wskazują, że aby badanie choroby resztkowej u chorych na CML było w pełni miarodajne musi spełniać kilka istotnych warunków:

- Reakcja RQ-PCR oparta na hydrolizie lub sondzie hybrydizacyjnej mierzy *MRD* w sposób ilościowy, jest równie prawidłowa i daje porównywalne wyniki
- Stosowanie plazmidu jako kontroli pozytywnej służącej wykreśleniu krzywej standardowej daje gwarancję stabilności a współczynnik korelacji charakteryzujący krzywą standardową powinien być nie niższy niż 0,98 aby zapewnić liniowość testu RQ-PCR
- Muszą istnieć bardzo restrykcyjne zasady zapobiegania kontaminacjom
- Zachowanie powtarzalnych wyników pomiędzy laboratoriami tak, aby można je było wzajemnie porównywać
- Każdorazowo należy określać czułość poszczególnych testów RQ-PCR [28].

### 5.5.1. Wybór genu kontrolnego

Bardzo wiele pracy poświęcono ustaleniu odpowiedniego genu kontrolnego do monitorowania *MRD* w CML. W programie *EAC* zalecane jest stosowanie trzech genów kontrolnych: *ABL*, *B2M* oraz *GUS*. Jednak na podstawie dalszych badań ustalono, że gen *ABL* będzie najodpowiedniejszy, a wyniki uzyskane wyniki najbardziej wiarygodne. *ABL* posiada podobną ekspresję w próbkach prawidłowych i białaczkowych, charakteryzuje się także podobną szybkością degradacji jak gen chimerowy *BCR-ABL*. Ponadto, korelacja pomiędzy genem *ABL* i różnymi genami fuzyjnymi była najwyższa w porównaniu z genami *GUS* i *B2M* [31]. Istnieje kilka wątpliwości co do wyboru genu *ABL* na gen kontrolny: przy zastosowaniu zestawu starterów i sondy rekomendowanych w programie *EAC*, istnieje prawdopodobieństwo amplifikacji genomowego DNA, ze względu na krótki fragment intronu 2. Ponadto, ze względu na lokalizację starterów i sondy pomiędzy egzonem 2 i 3 możliwa jest amplifikacja zarówno dzikiego typu genu *ABL* jak również transkryptu *BCR-ABL*. Okazuje się jednak, że ograniczenia te nie niosą za sobą poważnych konsekwencji. Zanieczyszczenie DNA

genomowym zwykle nie jest duże a wspólna amplifikacja genów *ABL* oraz *BCR-ABL* może prowadzić jedynie do niewielkich nieprawidłowości w komórkach z wysoką ekspresją *BCR-ABL* [31]. Najistotniejsze jednak jest to, że występuje wysoka znacząca korelacja pomiędzy wynikami uzyskanymi technikami cytogenetycznymi oraz wynikami RQ-PCR przy użyciu *ABL* jako genu kontrolnego [51]. Poza tym, ważniejsza wydaje się być prawidłowa ocena ilości transkryptu *BCR-ABL* w czasie monitorowania MRD niż precyzyjne ustalenie wyjściowej liczby kopii *BCR-ABL* [31, 46].

### 5.5.2. Sposoby wyrażania wyników RQ-PCR

Obecnie istnieje kilka różnych metod stosowanych do wyrażania wyników analiz RQ-PCR u pacjentów z CML. Jedną z nich jest przedstawianie liczby kopii genu *BCR-ABL* na 1 mikrogram RNA. Jest to jednak metoda niedoskonała ze względu na często niedoszacowaną wartość pomiaru stężenia RNA a także różnice w jakości RNA i wydajności etapu odwrotnej transkrypcji. Bardziej powszechnie stosuje się metodę wyrażania ilości *BCR-ABL* jako stosunek liczby kopii *BCR-ABL* do liczby kopii genu kontrolnego i wyrażanie tego stosunku procentowo. Wyjściowy stosunek *BCR-ABL* do genu kontrolnego musi stanowić 100%. Kolejnym sposobem jest przedstawianie redukcji ilości transkryptu w skali logarytmicznej w porównaniu z wystandaryzowaną linią bazową stanowiącą wyniki nieleczonych pacjentów, ustaloną indywidualnie w danym laboratorium [33, 52]. W praktyce, używanie sformułowania „log redukcja” może prowadzić do nieporządku ponieważ sugeruje, że wartość ta jest względna, pomimo że „3 log lub większa redukcja” ustala wartość absolutną, która teoretycznie może być definiowana jako konkretna ilość transkryptu *BCR-ABL*. Pomimo tego, sugerowane jest odejście od tej terminologii w rutynowej praktyce klinicznej i wyrażanie wyników wg standardowej międzynarodowej skali numerycznej, opartej na wartościach absolutnych. Proponuje się aby skala międzynarodowa była oparta na dwóch wartościach: wystandaryzowana linia bazowa na poziomie 100% ustalona w ramach programu *IRIS* oraz 3-log redukcja od linii bazowej (*MMR*) ustalona jako 0,10%. Metoda RQ-PCR różni się ze względu na rodzaj używanego aparatu, lokalizacji starterów i sond molekularnych, rodzaju stosowanej chemii oraz genu kontrolnego [33]. Dlatego w każdym laboratorium należy też ustalić współczynnik korygujący mający na celu konwersję uzyskanego wyniku do skali międzynarodowej [28, 53].

### 5.5.3. Analiza czułości RQ-PCR

Niezwykle ważnym zagadnieniem istotnym dla prawidłowej interpretacji wyników uzyskiwanych techniką RQ-PCR jest analiza czułości poszczególnych testów [31]. Wzrost ilości transkryptu stwierdzony w toku badania charakteryzującego się zwiększonym w porównaniu do testów uprzednio wykonanych poziomem czułości niekoniecznie musi świadczyć o realnym wzroście ilości komórek z produktem genu *BCR-ABL* i zagrażającej progresji choroby. W takich przypadkach zalecane jest powtórzenie całości oznaczenia z pobranego ponownie materiału. Wzrost ilości transkryptu może tylko świadczyć o jednorazowym wzroście czułości oznaczenia (lepsze parametry krzywej standardowej, lepsza jakość uzyskanego materiału) [54]. Dla próbki określanej jako „negatywna” – brak transkryptu *BCR-ABL* wszystkie reakcje RQ-PCR prowadzone jednocześnie na powinny mieć wynik negatywny. W przypadku otrzymania i wydawania takiego wyniku należy bezwzględnie określić i podać czułość reakcji przeprowadzonej w badanej próbce w celu uniknięcia błędów w interpretacji. Jeśli tylko jedna reakcja ma wynik pozytywny, test należy powtórzyć lub wykonać badanie RT-PCR. Należy ustalić wartość, powyżej której wynik uznawany będzie jako pozytywny – będzie on stanowił granicę wykrywalności. Jest to największe rozcieńczenie plazmidu, które umożliwia wiarygodną amplifikację transkryptu *BCR-ABL* (zwykle jest to 5-10 kopii). Czuość badania zależy więc od ilości wyizolowanych komórek, liczby kopii transkryptu genu kontrolnego oraz efektywności wykonanej PCR i powinna być określana dla każdego badania osobno [28].

### 5.5.4. Częstość wykonywania badania RQ-PCR

Obecnie najczęściej spotykanym schematem przeprowadzania badania RQ-PCR u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową leczonych imatinibem jest badanie w odstępach 3-miesięcznych [26] lub co 3 miesiące przez pierwsze 18 miesięcy terapii a następnie raz na 6 miesięcy [20]. U pacjentów po przeprowadzonej transplantacji RQ-PCR powinna być przeprowadzana co 4 miesiące do momentu uzyskania wyniku negatywnego. Jeśli poziom genu jest niewykrywalny test należy przeprowadzać co 3 miesiące lub co 6 miesięcy jeśli wynik testu RT-PCR pozostaje negatywny [26].

### 5.5.5. Rodzaje odpowiedzi na terapię

U pacjentów z CML w momencie rozpoznania, występuje pewien poziom komórek białaczkowych. Efekty leczenia należy monitorować poprzez obserwację redukcji poziomu leukocytozy, redukcji komórek *Ph+* w szpiku kostnym oraz redukcji poziomu transkryptu

*BCR-ABL* do poziomu niewykrywalnego [55]. W początkowej fazie monitorowania terapii najbardziej informatywne są techniki cytogenetyki klasycznej oraz *FISH*.

W ramach badania *IRIS* ustalono poziom genu *BCR-ABL* korelującego w przeżyciem wolnym od progresji choroby. 38% pacjentów leczonych imatinibem osiągnęło przynajmniej 3-krotną redukcję w skali logarytmicznej, u 4-10% z nich osiągnęło niewykrywalny poziom *BCR-ABL*. U 100% pacjentów ze stwierdzoną redukcją o 3 log obserwowano 2-letni okres przeżycia wolny od progresji choroby [52, 56]. Po 12 miesiącach terapii Imatinibem większość pacjentów osiągnęła całkowitą remisję cytogenetyczną. U tych pacjentów analizę odpowiedzi na terapię należy monitorować przy użyciu techniki RQ-PCR [57].

Poziom redukcji *BCR-ABL* osiągnięty w czasie początkowej terapii imatinibem jest uważany za dobry wskaźnik późniejszej odpowiedzi [57, 58]. W australijskich badaniach w ramach programu *IRIS*, pacjenci, którzy nie osiągnęli redukcji o 1 log w ciągu pierwszych trzech miesięcy mają bardzo niskie prawdopodobieństwo osiągnięcia większej odpowiedzi molekularnej. Natomiast u pacjentów, którzy osiągnęli redukcję o >2 log i o 1-2 log obserwowano odpowiednio 100% i 69% prawdopodobieństwo osiągnięcia *MMR*. Brak odpowiedzi u pacjentów w pierwszej grupie spowodowany był pierwotną lub wtórną opornością na podany lek. Ryzyko oporności w tej grupie, w porównaniu z grupą, która osiągnęła spadek transkryptu o > 2 log wynosiło 83%. W badaniu tym stwierdzono także, że wyjściowa wartość *BCR-ABL* nie ma znaczenia biologicznego w odniesieniu do późniejszej redukcji transkryptu [33]. U pacjentów leczonych imatinibem którzy osiągnęli spadek transkryptu o 3 lub więcej w skali logarytmicznej w ciągu 18 miesięcy, stwierdzono 100% przeżycie wolne od progresji choroby [52]. W badaniach Hughes stwierdzono, że poziom transkryptu *BCR-ABL* na poziomie 0,53% po 3 miesiącach terapii imatinibem pozwala przewidzieć uzyskanie całkowitej remisji cytogenetycznej (*CCR*) po 6 miesiącach w porównaniu z poziomem 27% po 3 miesiącach, gdzie po 6 miesiącach terapii żaden z pacjentów nie osiągnął *CCR* [33]. Podobnie, 50% redukcja *BCR-ABL* po 4 tygodniach terapii imatinibem pozwala przewidzieć *MCR* po 6 miesiącach i przeżycie wolne od progresji przez 16,5 miesiąca. Efekt ten był niezależny od fazy choroby i wieku pacjenta [59]. W badaniu Stenofta i współpracowników natomiast, u 10/11 pacjentów w fazie chronicznej zaobserwowano pełną odpowiedź na terapię imatinibem. Natomiast u 7/8 pacjentów w fazie akceleracji i u 1/11 pacjentów w *CP* nie stwierdzono odpowiedzi. Dodatkowym czynnikiem od którego zależy odpowiedź na terapię może być więc faza choroby w momencie podania imatinibu. [38].

W oparciu o powyższe obserwacje stwierdzono, że na podstawie poziomu redukcji genu *BCR-ABL* można w sposób prawidłowy i pewny przewidywać czas trwania przeżycia pacjentów z CML [46].

#### 5.5.6. Korelacja wyników uzyskanych metodami molekularnymi oraz cytogenetycznymi

Do monitorowania choroby resztkowej u pacjentów z CML stosuje się obecnie głównie techniki RT-PCR oraz RQ-PCR. Metoda RT-PCR jest bardzo pracochłonna, wymaga co najmniej kilku dni aby wydać wiarygodne wyniki. RQ-PCR natomiast, jest testem wykonywanym w stosunkowo krótkim czasie, wiarygodnym i łatwym do przeprowadzenia. Zaletą testu RT-PCR jest niewątpliwie jego większa czułość w stosunku do RQ-PCR. Generalnie istnieje bardzo wysoka zgodność pomiędzy wynikami osiągniętymi obiema metodami [60]. W badaniu Guo i współpracowników stwierdzono jednak, że metoda RQ-PCR może powodować niedoszacowanie poziomu transkryptu u pacjentów z równoczesną ekspresją transkryptu b2a2 oraz b3a2 w porównaniu z RT-PCR. Stwierdzono także, że wyniki RQ-PCR mogą być niedoszacowane w przypadku wysokiego poziomu transkryptu *BCR-ABL*, natomiast nie w przypadku gdy poziom genu sięga granicy detekcji [60]. W badaniach Kim i współpracowników stwierdzono, że wyniki pacjentów poddanych przeszczepieniu komórek hematopoetycznych, uzyskane przy pomocy testu RQ-PCR są porównywalne z wynikami uzyskanymi testem RT-PCR ale tylko w reakcji „zewnętrznej”. Nie ma natomiast korelacji pomiędzy wynikami RQ-PCR i RT-PCR gdy wyniki reakcji RT-PCR „zewnętrznej” są negatywne. W badaniach tych stwierdzono także wadę reakcji RT-PCR z powodu wysokiego odsetka wyników fałszywie pozytywnych. Do śledzenia choroby resztkowej autorzy ci rekomendują wykonywanie badań techniką RQ-PCR, natomiast jako uzupełnienie techniki FISH oraz RT-PCR [61]. Podobnie, Guo i współpracownicy sugerują wykonywanie testu RQ-PCR do śledzenia *MRD*, jednak w przypadku negatywnych wyników należy przeprowadzać gniazdowy test RT-PCR ze względu na jego większą czułość [60].

Wyniki poziomu *BCR-ABL* we krwi obwodowej uzyskane przy pomocy ilościowej analizy PCR w czasie rzeczywistym występują w wysokiej korelacji z wynikami szpiku kostnego uzyskanymi techniką cytogenetyki klasycznej [37, 57, 58, 62]. Na podstawie wczesniej redukcji *BCR-ABL* można przewidywać odpowiedź cytogenetyczną u pacjentów w fazie chronicznej leczonych imatinibem [57, 59]. W badaniu Ross i współpracowników stwierdzono, że wszyscy pacjenci którzy osiągnęli 2-krotną redukcję transkryptu *BCR-ABL* w skali logarytmicznej, 95,7% z nich osiągnęła również *CCR*. Niewielkie różnice występujące



w kilku punktach badania, zacierały się w czasie dłuższej obserwacji. Progresję cytogenetyczną obserwowano u 83% pacjentów, u których nastąpił wzrost stosunku *BCR-ABL/BCR*. Ponadto, u mniej niż 1% pacjentów z większą odpowiedzią molekularną (*MMR*) wykryto rearanżację chromosomu *Ph* w badaniu cytogenetycznym. Jednak u wszystkich tych pacjentów, wynik badania cytogenetycznego opierał się na analizie  $\leq 5\%$  metafaz. U wszystkich pacjentów, u których poziom *BCR-ABL* był niewykrywalny występował również *CCR*. Po gruntownej analizie stwierdzono, że u żadnego pacjenta, który osiągnął *MMR* nie występował znaczący wzrost metafaz *Ph+* w badaniu cytogenetycznym [63].

Obecnie nie jest znany powód niezgodności pomiędzy poziomem *BCR-ABL* a wynikami liczby *Ph+*. Pomimo różnic w komórkowości pomiędzy krwią obwodową i szpikiem kostnym, poziomy *BCR-ABL/BCR* badane w obu tkankach są porównywalne [57]. Jedną z przyczyn może być mała liczba analizowanych komórek w badaniu cytogenetycznym (20-30) i wysoki współczynnik zmienności kariotypowania. Istnieją także spekulacje, że różnice te zależą od selektywnej detekcji analizy cytogenetycznej resztkowych komórek ze zwiększoną zdolnością do podziałów mitotycznych. Możliwa jest też obniżona ekspresja mRNA dla *BCR-ABL* w komórkach *Ph+* poddanych działaniu imatinibu [63]. Różnice w korelacji pomiędzy wynikami RQ-PCR i cytogenetycznymi uzyskanymi w niniejszej pracy mogą wynikać również ze stosunkowo małej grupy badanej (60), wysokich odchyłeń standardowych a także krótkiego czasu obserwacji (1 rok).

W związku z powyższym stwierdzono, że do podjęcia decyzji klinicznych wystarczałoby badanie RQ-PCR przeprowadzane co 3 miesiące oraz okresowo wykonywane badanie kariotypu. Wnioski takie opracowano na podstawie 3 przesłanek:

- 1) Poziom redukcji *BCR-ABL* w skali logarytmicznej stwierdzony w badaniu RQ-PCR bardzo ściśle koreluje z osiągniętą *CCR* i *MCR* stwierdzoną w badaniu kariotypu
- 2) U żadnego pacjenta nie stwierdzono przypadku progresji na podstawie badania cytogenetycznego bez stwierdzenia tego ryzyka w badaniu RQ-PCR w czasie pierwszych 12 miesięcy terapii imatinibem
- 3) U żadnego pacjenta, u którego występowała *MMR* nie stwierdzono przypadku progresji cytogenetycznej

Autorzy sugerują również aby badanie cytogenetyczne ze szpiku kostnego wykonywać tak jak dotychczas u pacjentów, którzy nie osiągnęli *MMR*. [63].

Analiza cytogenetyczna jest niezbędna do identyfikacji nieprawidłowości klonalnych innych niż występowanie chromosomu *Philadelphia*. Na podstawie takich wyników możliwa jest identyfikacja progresji choroby i jest jednym z kryteriów rozpoznania fazy akceleracji [64].

Jednak pobranie szpiku kostnego do badania jest zabiegiem inwazyjnym. Jest dla pacjenta dużym dyskomfortem oraz niewygodą, w rzadkich przypadkach zdarzają się także bardziej poważne komplikacje [65]. W związku z tym istnieje pytanie na ile niezbędna jest rutynowa analiza kariotypu gdy istnieje wiarygodna i czuła metoda RQ-PCR. Wyniki RQ-PCR pozwalają na bardzo dokładny monitoring odpowiedzi na terapię imatinibem i na ich podstawie można przewidywać utratę tej odpowiedzi. Bardzo ważne jest jednak rygorystyczne podejście do procedur zapewniających kontrolę jakości w tego typu badaniach [63].

### 5.5.7. Leczenie przewlekłej białaczki szpikowej

Imatinib jest nowym lekiem (badania kliniczne I fazy rozpoczęto w 1998 roku) specyficznie hamującym proliferację komórek wykazujących ekspresję genu chimerowego *BCR-ABL* [66]. Wyniki badań wskazują na wysoki odsetek osób osiągających *MCR*, *CCR* oraz różny poziom odpowiedzi molekularnej po 12 miesiącach leczenia Imatinibem [67]. W badaniu *IRIS* stwierdzono skuteczną zdecydowaną odpowiedź cytogenetyczną i molekularną u pacjentów z CML w fazie chronicznej wcześniej nieleczonych na przyjmowaną dawkę 400 mg imatinibu w porównaniu z *INF $\alpha$*  i *ARA-C* [52]. W badaniu Lange i współpracowników porównano ryzyko nawrotu molekularnego u pacjentów leczonych imatinibem i po przeszczepie alogenicznym. Stwierdzono, że ryzyko nawrotu wynosi odpowiednio 83% *versus* 20%, co wskazywało by, że remisja molekularna jest stabilniejsza w grupie pacjentów po przeszczepie [68]. Jednak przyczyną tego może być fakt zwiększonej fluktuacji transkryptu *BCR-ABL* u chorych poddanych terapii imatinibem [69], oraz, że całkowita eradykacja komórek białaczkowych u pacjentów leczonych imatinibem nie jest możliwa. Prymitywne nieaktywne komórki macierzyste *Ph+* pozostają w uśpieniu i są niewrażliwe na imatinib w badaniach *in vitro* [70]. Ponadto istnieje wiele innych przyczyn oporności na leczenie imatinibem takie jak ewolucja klonalna i pojawiające się złożone zmiany w kariotypie i mutacje punktowe w domenie *ABL* kinazy *BCR-ABL* [36].

Istnieje zatem pytanie czy imatinib jest najlepszą opcją terapeutyczną u pacjentów z nowo-rozpoznaną CML. Generalnie uważa się że tacy pacjenci powinni w pierwszej kolejności otrzymać imatinib, należy jednak starać się zidentyfikować pacjentów, u których istnieje wysokie prawdopodobieństwo oporności na ten lek i rozważyć możliwość przeszczepu alogenicznego [70]. W ostatnich latach, pojawiły się kolejne, nowe możliwości lecznicze pacjentów z CML – inhibitory kinazy tyrozynowej II generacji. Są to inhibitor kinazy *BCR-ABL* AMN107 [71, 72] o 25-krotnie większej sile działania od imatinibu: nilotinib. W przeciwieństwie do imatinibu, lek ten jest skuteczny w leczeniu chorych

z mutacjami opornymi na imatinib jednak nie jest skuteczny w przypadku wystąpienia mutacji T315I [73] oraz dasatinib (BMS-354825), którego potencjał jako inhibitora kinazy *SRC/ABL* w badaniach *in vitro* jest 300 razy większy niż imatinibu. Poza tym, badania wskazują na możliwości leczenia pacjentów z nietolerancją lub opornych na leczenie imatinibem [74] oraz u pacjentów ze stwierdzoną mutacją w genie *BCR-ABL* [75].

Obecnie jedyną metodą pozwalającą na całkowite wyleczenie CML jest allogeniczna transplantacja szpiku kostnego [76, 77, 78]. Długie okresy obserwacji (10 i 15 lat) wskazują na przeżycie odpowiednio 50% i 47% chorych poddanych transplantacji od dawcy rodzinnego [79].

#### **5.5.8. Standard w badaniach diagnostycznych i monitorujących leczenie chorych na CML**

Polska grupa zajmująca się leczeniem przewlekłej białaczki szpikowej opracowała obecne zalecenia dotyczące postępowania diagnostycznego i monitorującego terapię u chorych na tę chorobę. W tabeli 5.1 przedstawiono panel niezbędnych badań wykonywanych u pacjentów z CML.

**Tabela 5.1.** Badania diagnostyczne i monitorujące leczenie chorych na przewlekłą białaczkę szpikową [80]

ETAP	BADANIA		
	BADANIA NIEZBĘDNE	BADANIA ZALECANE	BADANIA POMOCNICZE
<b>Rozpoznanie</b>	Morfologia krwi z rozmazem. Badanie cytogenetyczne (w przypadku negatywnej cytogenetyki RT-PCR)	RQ-PCR RT-PCR FISH	FAG
<b>Okres do uzyskania remisji hematologicznej</b>	Morfologia krwi z rozmazem co 2 tygodnie aż do uzyskania remisji hematologicznej, a następnie co 8-12 tygodni, kwas moczowy	BUN kreatynina, ALAT, ASPAT, bilirubina	W przypadku braku odpowiedzi badania molekularne w kierunku mutacji <i>BCR-ABL</i>
<b>Okres do uzyskania całkowitej odpowiedzi cytogenetycznej</b>	Morfologia krwi z rozmazem co 2-3 miesiące. Badanie cytogenetyczne w 6 i 12 miesiącu leczenia	Badanie cytogenetyczne w 3 miesiącu leczenia. FISH. RQ-PCR co 3 miesiące	W przypadku braku odpowiedzi badania molekularne w kierunku mutacji <i>BCR-ABL</i>
<b>Po uzyskaniu całkowitej odpowiedzi cytogenetycznej</b>	Badanie cytogenetyczne co 12 miesięcy	RQ-PCR co 3-6 miesięcy; w przypadku negatywnego RQ-PCR: RT-PCR	W przypadku braku odpowiedzi badania molekularne w kierunku mutacji <i>BCR-ABL</i>

## 5.6. Podsumowanie

Uzyskanie przez pacjenta całkowitej remisji cytogenetycznej (*CCR*) po pierwszych 12 miesiącach leczenia uznawane jest obecnie za duże prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od zdarzeń. Uznaje się także, że prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od progresji choroby jest proporcjonalne do stopnia remisji molekularnej uzyskanej po 12 miesiącach. Duży procent pacjentów uzyskujących *CCR* po terapii Imatinibem wskazuje na konieczność monitorowania leczenia metodami molekularnymi. Negatywny wynik przynajmniej dwóch kolejnych oznaczeń RT-PCR, który nastąpił po przynajmniej jednym wyniku pozytywnym uważany jest obecnie za całkowitą remisję molekularną. Najczęściej badanie wykonuje się w odstępach 3 miesięcznych przez pierwsze 18 miesięcy leczenia a następnie, co 6 miesięcy. W monitorowaniu odpowiedzi molekularnej niezbędne jest badanie RQ-PCR, pozwala ono

bowiem na ocenę stopnia uzyskanej remisji. RT-PCR natomiast pozwala stwierdzić brak lub obecność *MMR*.

U pacjentów, u których stwierdzono wzrost ilości transkryptu  $>2$  log, znacząco częściej wykrywano mutacje genu *ABL*, odpowiedzialne za powstanie oporności na Imatinib. W części z tych przypadków oporność można przełamać stosując większe dawki Imatinibu. Na tej podstawie powstało zalecenie zwiększenia dawki tego leku w obliczu dwukrotnego wzrostu ilości transkryptu *BCR-ABL* w skali logarytmicznej.

Zaobserwowano dobrą korelację wyników badania RQ-PCR z wynikami uzyskanymi techniką cytogenetyki klasycznej oraz RT-PCR. Wyniki uzyskane przy pomocy techniki ilościowego PCR, dobrze korelowały z przebiegiem klinicznym chorych na CML. Wyniki uzyskane techniką RQ-PCR pozwoliły na podjęcie kroków terapeutycznych, w postaci zwiększenia dawki Imatinibu lub podania alternatywnego leczenia inhibitorem kinazy tyrozynowej II generacji.

Technika RQ-PCR jest metoda czułą, dobrze korelującą z obrazem klinicznym, służącą monitorowaniu poziomu transkryptu *BCR-ABL*. Daje ona możliwość wczesnej interwencji leczniczej, dlatego jest rekomendowana jako metoda odpowiednia do monitorowania choroby resztkowej u pacjentów chorych na CML leczonych Imatinibem lub poddanych transplantacji.

## Rozdział VI

### WNIOSKI

**6.1. Zgodnie z najnowszymi wytycznymi programów *EAC* i *IRIS* opracowano szybką, czułą i pewną technikę ilościowej PCR w czasie rzeczywistym (RQ-PCR). Uzyskano wysokie parametry krzywych standardowych, na podstawie których określano ekspresję genu *BCR-ABL***

- 6.2. Opracowana technika RQ-PCR może służyć do monitorowania choroby resztkowej u pacjentów chorych na przewlekłą białaczkę szpikową**
- 6.3. Stwierdzono występowanie dobrej korelacji pomiędzy wynikami badań uzyskanymi przy pomocy techniki RQ-PCR i RT-PCR w grupie 60 pacjentów chorych na CML leczonych w Katedrze i Klinice Hematologii CMUJ w Krakowie**
- 6.4. Stwierdzono występowanie dobrej korelacji pomiędzy wynikami badań uzyskanymi przy pomocy techniki RQ-PCR i cytogenetyki klasycznej w grupie 60 pacjentów chorych na CML leczonych w Katedrze i Klinice Hematologii CMUJ w Krakowie**
- 6.5. U pacjentów ze stwierdzonym genem fuzyjnym *BCR-ABL* w komórkach układu hematopoetycznego, można przewidywać przebieg choroby CML na podstawie wyników ilościowej PCR w czasie rzeczywistym**

## ANEKS – Tabele

Tabela 3.1. Charakterystyka badanych chorych

L.P.	PACJENT	WIEK	PŁEĆ	ROK ROZPOZNANIA CML	STOSOWANE LECZENIE (W NAWIASACH DATY ROZPOCZĘCIA)	DŁUGOŚĆ LECZENIA IMATINIBEM, STOSOWANA DAWKA (MG/D)	FAZA CML PRZY PODANIU IMATINIBU
1	AR	45	M	1991	Auto-BMT – nawrót 2001, Imatinib (06.2002), Dasatinib (03.2006)	39 m-cy, 300/400	CP
2	BK	45	K	1999	HU, IFN $\alpha$ , Imatinib (09.2002)	54 m-cy, 400	CP
3	BB	72	K	2003	HU, Imatinib (01.2004)	30 m-cy, 400	CP
4	BC	47	K	2000	HU, IFN $\alpha$ , Imatinib (09.2001)	40 m-cy, 300	CP
5	BJ	56	M	1998	HU, IFN $\alpha$ , Imatinib (04.2002)	57 m-cy, 400/600	ACC
6	CZ	62	K	2005	HU, Imatinib (05.2005)	15 m-cy, 400	CP
7	CW	67	K	2001	HU, Lanvis, Imatinib (04.2006)	15 m-cy, 400	CP
8	DH	50	M	2002	IFN $\alpha$ , IFN $\alpha$ +HU, ARA-C, Imatinib (12.2002)	15 m-cy, 400/700	BC
9	DŁ	33	M	2003	HU, Imatinib (05.2005)	45 m-cy, 400	CP
10	DT	59	K	1998	HU, IFN $\alpha$ , Imatinib (10.2001)	38 m-cy, 400	CP
11	DR	53	M	2001	HU, Imatinib (10.2001)	63 m-cy, 400	CP
12	DD	62	K	2005	HU, Imatinib (09.2005)	18 m-cy, 400	CP
13	DL	26	K	2003	HU, Imatinib (03.2004)	27 m-cy, 400	CP
14	DK	49	K	2005	HU, Imatinib (09.2005)	15 m-cy, 400	CP
15	DS	72	M	2004	HU, Imatinib (05.2005)	21 m-cy	
16	GW	60	K	2002	HU, Imatinib (03.2004)	33 m-cy, 400	CP
17	GC	71	K	2002	IFN $\alpha$ , Imatinib (2002)	33 m-ce, 300/400	CP
18	GG	67	K	2004	HU, Imatinib (05.2005)	27 m-cy, 400	CP
19	HJ	32	K	1999	IFN $\alpha$ , IFN $\alpha$ +HU, mini-ICE, ARA-C, Imatinib (08.2004)	36 m-cy, 300/400	CP
20	JS	63	M	2005	HU, Imatinib (05.2005)	18 m-cy, 400	CP
21	JO	73	K	2005	Imatinib (07.2005)	21 m-cy, 400	CP
22	JI	42	M	1997	HU, mini-ICE, IFN $\alpha$ ,	21 m-cy, 600/800	CP



					Imatinib (10.2001)		
23	JM	56	M	1995	BU, HU, IFN $\alpha$ , Imatinib (10.2001)	68 m-cy, 400/600	ACC
24	KM	33	K	2005	HU, Imatinib (05.2005)	15 m-cy, 400	CP
25	KM	42	M	2005	HU, Imatinib (06.2005)	21 m-cy, 400	CP
26	KH	68	K	2004	HU, Imatinib (06.2005)	24 m-ce, 400	CP
27	KB	39	K	2003	Imatinib (01.2004)	27 m-cy, 300	CP
28	KE	50	K	2003	HU, Imatinib (02.2004)	14 m-cy, 400	CP
29	KA	62	M	2000	HU, IFN $\alpha$ , Lanvis, Imatinib (09.2003), Dasatinib	18 m-cy, 300/400	CP
30	KE	33	K	1999	HU, IFN $\alpha$ , Imatinib (01.2001)	45 m-cy, 400	CP
31	LM	41	M	2004	HU, Imatinib (05.2005)	30 m-cy, 400	CP
32	MA	47	M	2001	HU, IFN $\alpha$ , Imatinib (04.2004)	8 m-cy, 300	CP
33	ML	47	K	2003	HU, Imatinib (05.2004), Dasatinib (07.2005)	8 m-cy, 400/600	CP
34	MA	32	K	2000	HU, IFN $\alpha$ , ARA-C, Lanvis, Imatinib(06.2001)	46 m-cy, 400/500/600	ACC
35	MM	41	M		HU, Imatinib (10.2005)	400	CP
36	MR	44	M	1993	HU, IFN $\alpha$ , ARA-C, Imatinib (10.2001)	57 m-cy, 600	BC
37	NM	67	K	2002	HU, IFN $\alpha$ , ARA-C, Imatinib (09.2002))	51 m-cy, 400 mg	CP
38	NK	61	K	2004	HU, Imatinib (04.2005)	24 m-ce, 400	CP
39	PD	51	K	1996	IFN $\alpha$ , Imatinib (01.2004)	400	CP
40	PS	42	M	1997	HU, mini-ICE, IFN $\alpha$ , Imatinib (10.2001)	42 m-ce, 400 mg	CP
41	PB	34	M	2003	HU, allo-MUD, Imatinib (09.2004)	30 m-cy, 400 mg	CP
42	PE	57	K	1998	HU, IFN $\alpha$ , mini-ICE, ARA-C, Imatinib (04.2001)	54 m-ce, 400/600	ACC
43	PT	68	K	1996	HU, IFN $\alpha$ , Imatinib (04.2002)	16 m-cy, 400	CP
44	PM	43	K	1997	HU, IFN $\alpha$ , Imatinib (07.2002)	27 m-cy, 400/500/600	CP
45	RA	36	K	2002	IFN $\alpha$ , Imatinib (05.2005)	400	
46	RW		M	2000	HU, Lanvis, Imatinib (09.2005), Dasatinib	400	CP
47	SW	43	K	1999	HU, mini-ICE, IFN $\alpha$ ,	51 m-ce, 400	CP

					Imatinib (10.2001), Dasatinib (07.2005)		
48	SA	50	K	2001	Imatinib (10.2003)	57 m-cy, 400	CP
49	ST	56	K		BU, Lanvis+ARA-C, HU, Imatinib (06.2001)	400/600	BC
50	SE	38	K	2005	HU, Imatinib (12.2005)	12 m-cy, 400	CP
51	SJ	47	K	1998	BU, HU, IFN $\alpha$ , ARA-C, auto-PBSCT, Lanvis, Imatinib (09.2002), Dasatinib (07.2005)	54 m-ce, 600/400	ACC
52	SJ	41	M	2000	Allo-BMT, Imatinib (06.2003)	4 m-ce, 400/600	BC
53	SB	55	K	1996	HU, IFN $\alpha$ , ARA-C, Imatinib (07.2001)	400/500/600	CP
54	SA	48	M	2003	HU, Imatinib (02.2004)	30 m-cy, 400	CP
55	TE	59	K	2005	HU, IFN $\alpha$ , ARA-C, Imatinib (09.2001), Dasatinib (12.2005)	600	ACC
56	TM	65	M	2001	HU, Imatinib (07.2005)	18 m-cy, 400	
57	WB	41	K	1996	HU, IFN $\alpha$ , ARA-C, Imatinib (07.2001), Dasatinib (10.2005)	45 m-cy, 400/600/800	CP
58	WB	61	K	2006	HU, Imatinib (04.2006)	12 m-cy	CP
59	WH	55	K	2001	HU, IFN $\alpha$ , Imatinib (05.2003)	400	ACC
60	ZB	52	K	1998	IFN $\alpha$ , Imatinib (07.2001)	60 m-cy, 400	CP

**Tabela 4.3.** Zestawienie wyników badań metodą RT-PCR i RQ-PCR oraz cytogenetyki klasycznej z materiału pobranego od pacjentów w tym samym okresie czasu (po roku od rozpoczęcia terapii Imatinibem). Wynik badania RQ-PCR przedstawiono jako stosunek liczby kopii *BCR-ABL* do liczby kopii genu *ABL* (w nawiasach czułość testu). Log redukcję mierzono od momentu rozpoczęcia terapii Imatinibem. Stopień osiągniętej remisji określono na podstawie wyników badań cytogenetycznych i molekularnych (RQ-PCR)

L.p.	Pacjent	Typ transkryptu	Wynik badania cytogenetycznego	Log redukcja stwierdzona przy pomocy RQ-PCR	Wynik badania RT-PCR	Stopień osiągniętej remisji
1	AR	b2a2	50% Ph+	1 log	POZ/POZ	HR
2	BK	b3a2	0% Ph+	3 log	NEG/POZ	MMR
3	BB	b2a2	0% Ph+	>3 log	NEG/NEG	MR
4	BC	b3a2	0% Ph+	4 log	NEG/POZ	MMR
5	BJ	b3a2	0% Ph+, tri(1)	2 log	NEG/POZ	MMR
6	CZ	b3a2	0% Ph+	3 log	POZ/POZ	MMR
7	CW	b3a2	0% Ph+	0 log	POZ/POZ	CCR
8	DH	b3a2, e1a2	100% Ph+	0 log	POZ/POZ	HR
9	DŁ	b3a2	0% Ph+	4 log	NEG/NEG	MR
10	DT	b2a2	0% Ph+	2 log	NEG/POZ	CCR
11	DR	b2a2	100% Ph+	2	POZ/POZ	HR
12	DD	b2a2	0% Ph+	2	POZ/POZ	CCR
13	DL	b3a2	0% Ph+	>3	NEG/POZ	MMR
14	DK	b3a2	0% Ph+	>3	NEG/POZ	MMR
15	DS	b3a2	15% Ph+	1	POZ/POZ	MCR
16	GW	b3a2	0% Ph+	4	NEG/NEG	MR
17	GC	b3a2	0% Ph+	4	NEG/POZ	MMR
18	GG	b3a2	100 Ph+	0	POZ/POZ	HR
19	HJ	b3a2	100% Ph+	0	POZ/POZ	HR
20	JS	b2a2	100% Ph+	0	POZ/POZ	HR

21	JO	b2a2	0% Ph+	2	POZ/POZ	CCR
22	JI	b3a2	50% Ph+	0	POZ/POZ	HR
23	JM	b2a2	0% Ph+	3	NEG/POZ	MMR
24	KM	b3a2	0% Ph+	4	NEG/NEG	MR
25	KM	b2a2	0% Ph+	1	POZ/POZ	CCR
26	KH	b2a2	0% Ph+	>3	NEG/NEG	MR
27	KB	b3a2	0% Ph+	4	NEG/NEG	MR
28	KE	b2a2	0% Ph+	2	POZ/POZ	CCR
29	KA	b2a2	46 XY t(1,9,22); 47 XY +der 9 t(1,9,22)	0	POZ/POZ	HR
30	KE	b3a2	0% Ph+	>3	NEG/NEG	MR
31	ŁM	b3a2	9% Ph+	2	NEG/POZ	MCR
32	MA	b3a2	100% Ph+	0	POZ/POZ	HR
33	ML	b3a2	95% Ph+	0	POZ/POZ	HR
34	MA	b3a2	35% Ph+	2	POZ/POZ	MCR
35	MM	b3a2	0% Ph+	1	POZ/POZ	CCR
36	MR	b2a2	0% Ph+	0	POZ/POZ	CCR
37	NM	b2a2	0% Ph+	4	NEG/NEG	MR
38	NK	b2a2	0% Ph+	>3	NEG/NEG	MR
39	PD	b3a2	0% Ph+	4	NEG/NEG	MR
40	PS	b3a2	100% Ph+	0	POZ/POZ	HR
41	PB	b2a2	Obecność chromosomu Ph wyłącznie w komórkach o męskim kariotypie 46, XY, t(9;22)(q34;q11) [4]	2	POZ/POZ	HR
42	PE	b3a2	100% Ph+	1	POZ/POZ	HR
43	PT	b2a2, e1a2	4% Ph+	3	NEG/POZ	MCR
44	PM	b2a2	100% Ph+	0	POZ/POZ	HR
45	RA	b3a2	64% Ph+	1	POZ/POZ	HR
46	RW	b3a2	0% Ph+	4	NEG/POZ	MMR
47	SW	b3a2	4% Ph+	0	NEG/POZ	MCR
48	SA	b2a2	0% Ph+	>3	POZ/POZ	MMR
49	ST	b3a2	100% Ph+	0	POZ/POZ	HR
50	SE	b3a2	0% Ph+	4	NEG/POZ	MMR
51	SJ	b3a2	100 Ph+	0	POZ/POZ	HR
52	SJ	b2a2	0% Ph+	4	NEG/NEG	MR
53	SB	b2a2	0% Ph+	4	NEG/NEG	MR
54	ŚA	b3a2	0% Ph+	2	POZ/POZ	CCR
55	TE	b3a2	100 Ph+	0	POZ/POZ	HR
56	TM	b2a2	100 Ph+	0	POZ/POZ	HR
57	WB	b2a2	100 Ph+	0	POZ/POZ	HR
58	WB	b3a2	0% Ph+	4	NEG/NEG	MR
59	WH	b2a2	0 Ph+	1	POZ/POZ	CCR
60	ZB	b2a2	Brak podziałów metafazowych	0	POZ/POZ	HR



**SPIS TABEL**

<b>Tabela 1.1.</b> Białka substratowe dla kinazy <i>BCR-ABL</i> .....	13
<b>Tabela 1.2.</b> Testy służące diagnozowaniu i monitorowaniu leczenia u pacjentów chorych na CML .....	20
<b>Tabela 1.3.</b> Kryteria remisji cytogenetycznej .....	21
<b>Tabela 1.4.</b> Kryteria remisji molekularnej .....	21
<b>Tabela 3.1.</b> Charakterystyka badanych chorych .....	81
<b>Tabela 3.2.</b> Skład mieszaniny reakcji odwrotnej transkrypcji .....	29
<b>Tabela 3.3.</b> Skład mieszaniny reakcji PCR multipleks .....	30
<b>Tabela 3.4.</b> Sekwencje stosowanych starterów w reakcji PCR multipleks .....	32
<b>Tabela 3.5.</b> Profil termiczny stosowany w reakcji multipleks PCR .....	32
<b>Tabela 3.6.</b> Skład mieszaniny reakcji PCR gniazdowej .....	33
<b>Tabela 3.7.</b> Sekwencje stosowanych starterów w reakcji PCR gniazdowej .....	33
<b>Tabela 3.8.</b> Profil termiczny stosowany w reakcji PCR gniazdowej .....	33
<b>Tabela 3.9.</b> Skład mieszaniny reakcyjnej RQ-PCR .....	38
<b>Tabela 3.10.</b> Sekwencje oligonukleotydów (starterów i znakowanych sond molekularnych) stosowanych w analizie RQ-PCR .....	39
<b>Tabela 3.11.</b> Profil termiczny stosowany w reakcji RQ-PCR .....	39
<b>Tabela 4.1.</b> Porównanie wyników izolacji RNA przy zastosowaniu odczynników: TRIzol vs RNasy Mini Kit .....	45
<b>Tabela 4.2.</b> Porównanie wartości Ct genu <i>ABL</i> przy zastosowaniu czterech różnych zestawów do przeprowadzania reakcji odwrotnej transkrypcji .....	47
<b>Tabela 4.3.</b> Zestawienie wyników badań metodą RT-PCR i RQ-PCR oraz cytogenetyki klasycznej z materiału pobranego od pacjentów w tym samym okresie czasu (po roku od rozpoczęcia terapii Imatinibem) .....	85
<b>Tabela 4.4.</b> Wartość osiągniętej log redukcji w badanej grupie pacjentów, N=60 .....	55
<b>Tabela 4.5.</b> Porównanie średnich wartości <i>BCR-ABL</i> u pacjentów z wysokim poziomem wyjściowym i niskim poziomem wyjściowym, N=15 .....	59
<b>Tabela 4.6.</b> Porównanie wyników RQ-PCR z wynikami RT-PCR w okresie terapii Imatinibem na przykładzie pacjenta DK .....	60
<b>Tabela 5.1.</b> Badania diagnostyczne i monitorujące leczenie chorych na przewlekłą białaczkę szpikową .....	77

## SPIS RYCIN

<b>Rycina 1.1.</b> Schemat przedstawiający powstawanie genu <i>BCR-ABL</i> .....	11
<b>Rycina 1.2.</b> Szlaki transdukcji sygnału poprzez kinazę <i>BCR-ABL</i> .....	14
<b>Rycina 1.3.</b> Schemat działania Imatinibu .....	17
<b>Rycina 3.1.</b> Rozkład liczbowy (procentowy) stosowanych terapii w badanej grupie pacjentów .....	26
<b>Rycina 3.2.</b> Zasada techniki PCR .....	30
<b>Rycina 3.3.</b> Zasada technologii TaqMan opartej na zastosowaniu sondy molekularnej .....	35
<b>Rycina 3.4.</b> Schemat detekcji w reakcji RQ-PCR .....	37
<b>Rycina 4.1.</b> Porównanie wyników izolacji RNA przy zastosowaniu odczynników: TRIzol vs RNasy Mini Kit .....	46
<b>Rycina 4.2.</b> Przykładowe wyniki reakcji RT-PCR .....	49
<b>Rycina 4.3.</b> Wynik analizy RQ-PCR z prawidłowym wykresem amplifikacji dla serii rozcieńczeń standardu dla genu <i>BCR-ABL</i> .....	51
<b>Rycina 4.4.</b> Wynik analizy RQ-PCR z prawidłowym wykresem amplifikacji .....	54
<b>Rycina 4.5.</b> Przykład kinetyki zmian ilości transkryptu u pacjenta z całkowitą odpowiedzią molekularną (4 log redukcja) (wykres niebieski). Poniżej czułość poszczególnych testów RQ-PCR (wykres różowy) .....	56
<b>Rycina 4.6.</b> Przykład kinetyki zmian ilości transkryptu u pacjenta i osiągnięta >3 log redukcja (wykres niebieski). Poniżej czułość poszczególnych testów RQ-PCR (wykres różowy) .....	56
<b>Rycina 4.7.</b> Przykład kinetyki zmian ilości transkryptu u pacjenta z redukcją na poziomie 2 log (wykres niebieski). Poniżej czułość poszczególnych testów RQ-PCR (wykres różowy) .....	57
<b>Rycina 4.8.</b> Przykład kinetyki zmian ilości transkryptu u pacjenta z progresją do kryzy blastycznej (wykres niebieski). Poniżej czułość poszczególnych testów RQ-PCR (wykres różowy) .....	57
<b>Rycina 4.9.</b> Przykład kinetyki zmian ilości transkryptu u pacjenta po przeprowadzonej transplantacji szpiku kostnego i podaniu Imatinibu w okresie nawrotu choroby (wykres niebieski). Poniżej czułość poszczególnych testów RQ-PCR (wykres różowy) .....	58
<b>Rycina 4.10.</b> Porównanie średnich wartości <i>BCR-ABL</i> u pacjentów z wysokim poziomem wyjściowym i niskim poziomem wyjściowym, N=15 .....	59
<b>Rycina 4.11.</b> Korelacja pomiędzy ilością transkryptu <i>BCR-ABL</i> i wynikami gniazdowego testu RT-PCR .....	61



**Rycina 4.12.** Korelacja pomiędzy logarytmicznym spadkiem ilości transkryptu *BCR-ABL* i odpowiadającym mu % komórek Ph-pozytywnych ..... 62

**Rycina 4.13.** Zestawienie stopnia osiągniętej remisji w stosunku do rodzaju stosowanej terapii w badanej grupie chorych na CML ..... 64



## STRESZCZENIE

U chorych na przewlekłą białaczkę szpikową - CML (*Chronic Myeloid Leukemia*) występuje charakterystyczna anomalia chromosomowa w komórkach macierzystych układu hematopoetycznego: tzw. chromosom *Philadelphia (Ph)*. Powstaje on w wyniku wzajemnej translokacji pomiędzy długimi ramionami chromosomu 9 oraz 22. Molekularnym odpowiednikiem chromosomu *Ph* jest gen fuzyjny *BCR-ABL*. Jego podwyższona ekspresja prowadzi do niekontrolowanej proliferacji komórek hematopoetycznych oraz zahamowania procesu apoptozy i różnicowania.

Obecność chromosomu *Ph* można stwierdzić kilkoma metodami m.in. cytogenetyka klasyczna, FISH (*Fluorescence In situ Hybridization*) oraz RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*). Jedną z technik biologii molekularnej wykorzystywanych w diagnostyce CML jest również metoda RQ-PCR (*Real-time Quantitative PCR* - polimerazowa reakcja łańcuchowa w czasie rzeczywistym). Pozwala ona niezwykle precyzyjnie określić poziom ekspresji genu, a ze względu na zastosowanie sondy molekularnej, metodę tę cechuje bardzo wysoka specyficzność i czułość. Pozwala ona na sprawne monitorowanie postępów leczenia i choroby resztkowej m.in. w grupie chorych cierpiących na przewlekłą białaczkę szpikową. Wzrost ekspresji genu *BCR-ABL* stwierdzony tą techniką, pozwala na wykrycie nawrotu choroby na wiele miesięcy przed pełnoobjawową wznową białaczki i modyfikację leczenia. Możliwość śledzenia zmian ilości transkryptu na poziomie genomu w trakcie leczenia CML, ma więc ogromne znaczenie prognostyczne.

Do grupy badanej zakwalifikowano 60 pacjentów Kliniki Hematologii CMUJ w Krakowie chorych na CML. Ekspresję genu *BCR-ABL* mierzono średnio co trzy miesiące.

W wyniku analiz przeprowadzonych testem RQ-PCR u większości pacjentów zaobserwowano stopniowy wyraźny spadek poziomu transkryptu *BCR-ABL* w trakcie terapii Imatinibem. U części chorych spośród badanej grupy poziom transkryptu utrzymywał się na stałym poziomie, natomiast u niektórych pacjentów mimo podawania leku, poziom badanego genu wzrastał. Czułość testów RQ-PCR wynosiła  $10^{-4}$  –  $10^{-5}$ .

Analizę RQ-PCR przeprowadzano na aparacie ABIPRISM 7700 przy użyciu technologii TaqMan. Jako kontrolę pozytywną zastosowano rozcieńczenia plazmidu. Wahania krzywych obrazujących przebieg transkryptu w czasie leczenia, wyrażony stosunkiem liczby kopii transkryptu *BCR-ABL* do liczby kopii genu *ABL*, w sposób istotny korelowały z obrazem klinicznym u badanych chorych. U pacjentów, u których zaobserwowano stopniowy spadek transkryptu w teście RQ-PCR wystąpiła całkowita remisja hematologiczna oraz remisja

cytogenetyczna. U pacjentów, u których nie zaobserwowano spadku transkryptu lecz jego stałe utrzymywanie się na podobnym wysokim poziomie doszło do progresji choroby do kryzy blastycznej.

Technika RQ-PCR jest bardzo dobrą metodą służącą monitorowaniu poziomu transkryptu *BCR-ABL*. Jest ona także czułą i niezawodną metodą odpowiednią do monitorowania choroby resztkowej u pacjentów chorych na CML leczonych Imatinibem i innymi inhibitorami kinaz tyrozynowych.

## SUMMARY

*Philadelphia* chromosome (*Ph*) - the characteristic chromosomal abnormality in hematopoietic stem cells causes chronic myeloid leukemia (CML). It develops during reciprocal translocation between long arms chromosomes 9 and 22. The translocation results in a fusion gene *BCR-ABL* which is responsible for synthesis of a constitutively activated tyrosine kinase.

Cells carrying the translocations can be identified by several methods: cytogenetic analysis, FISH (*Fluorescence In situ Hybridization*) and RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*). One of the molecular methods uses to CML diagnostics there is also RQ-PCR (*Real-time Quantitative PCR*). It allows estimating very accurately the expression of the genes and application of molecular probe causes this method very specific and sensitive. Thanks to this technique there is the possibility to monitoring the therapy advance and minimal residual disease in CML patients. Up regulation of *BCR-ABL* gene, helps to detect the relapse even a few months before clinical signs of leukemia and modification of treatment.

60 patients with CML were qualified to the study group. All of them were cured in Hematology Department CMUJ in Krakow. Expression of *BCR-ABL* gene was measured for about three months.

RQ-PCR method was performed by ABI PRISM 7700 using TaqMan technology. As a positive control uses to generate the standard curve plasmid dilutions were used. Differences between transcripts level during therapy were presented as a ratio of *BCR-ABL* to *ABL* copy number, and correlates to clinical image of the patients. The sensitivities of the tests were oscillated about  $10^4 - 10^5$ . RQ-PCR method is very efficient and accurate assay to monitor *BCR-ABL* expression in CML patients treated with Imatinib and another tyrosine kinase inhibitors.

RQ-PCR is reliable and sensitive method for monitoring CML patients after therapy. This is also convenient, robust and routine method for monitoring of minimal residual disease in CML patients. Quantifications of the level of residual disease using RQ-PCR has also therapeutic implications for the follow-up of therapeutic interventions for relapse.

Rozdział VII  
BIBLIOGRAFIA

1. Cortes J: „Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia” *Hematology and Oncology Clinics of North America* 2004;18(3):569-584
2. Skotnicki AB, Nowak WS: “Podstawy hematologii dla studentów i lekarzy.” Wyd. 1 *Wydawnictwo Medycyna Praktyczna* 1998
3. Dmoszyńska A, Robak T: “Podstawy hematologii” *Lublin* 2003; wyd. CZELEJ
4. Hellmann A, Prejzner W: „Leczenie i monitorowanie leczenia przewlekłej białaczki szpikowej.” *MEDIPRESS ONKOLOGIA* 2005; 6:3-14
5. Nowell PC, Hungerford DA: „A minute chromosome in human granulocytic leukemia” *Science* 1960; 132: 1497-1452
6. Rowley JD: „A new consistent chromosomal abnormality In chronic myelogenous leukemia identifies by quinacrine fluorescence and Giemsa staining.” *Nature* 1973; 243: 290-293
7. Chopra R, Pu QQ, Elefanty AG: “Biology of BCR-ABL” *Blood Reviews* 1999;13(4): 211-229
8. van Dongen J, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Gonzalez Diaz M, malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A: „Standardised RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukaemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukaemia.” *Leukemia* 1999;13(12):1901-1928
9. Rozman C, Urbano Ispizua A, Cervantes F, Rozman M, Colomer D, Feliz P, [Pujades A](#), [Vives Corrons JL](#): ”Analysis of the clinical relevance of the breakpoint location within M-bcr and the type of chimeric mRNA in chronic myelogenous leukemia.” *Leukemia* 1995;9(6):1104
10. Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela JM, Cave H, Pane F, Aerts JLE, de Micheli D, Thirion X, Pradel V, Gonzalez M, Viehmann S, Malec M, Saglio G, van Dongen JM: „Standardisation and quality control studies of ‘real-time’ quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukaemia – a Europe against cancer Program.” *Leukemia* 2003; 17(12): 2318-2357
11. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O’Brien S, Kurzrock R, Kantarjian M: “The biology of Chronic Myeloid Leukemia” *New England Journal of Medicine* 1999;341(3), 164-17
12. Goldman JM, Melo JV: “Chronic Myeloid Leukemia – Advances in Biology and New Approaches to Treatment” *New England Journal of Medicine* 2003; 349(15):1451-1464

13. Horita BM, Andreu EJ, Benito A, Arbona C, Sanz C, Benet I, Prosper F, Fernandez-Luna JL: „Blockade of the Bcr-Abl Kinase Activity Induces Apoptosis of Chronic Myelogenous Leukemia Cells by Suppressing Signal Transducer and Activator of Transcription 5-dependent Expression of Bcl-x<sub>L</sub>.” *Journal of Experimental Medicine* 2000; 191(6):977-984
14. Kabarowski JH, Witte ON: “Consequences of BCR-ABL Expression within the Hematopoietic Stem Cell in Chronic Myeloid Leukemia” *Stem Cells* 2000; 18(6):399-408
15. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, Trotta R, Wlodarski P, Perrotti D, Chan TO, Wasik MA, Tsichlis PN, Calabretta B: „Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of PI-3k/Akt-dependent pathway” *EMBO Journal* 1997; 16(20):6151-6161
16. Reuther JY, Reuther GW, Cortez D, Pendergast AM, Baldwin AS Jr: “A requirement for NFκB activation in Bcr-Abl-mediated transformation” *Genes&Development* 1998; 12(7):966-981
17. Słupianek A, Schmutte C, Tomblin G, Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Nowicki MO, Pierce AJ, Fishel R, Skorski T: „BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance.” *Molecular Cell* 2001;8(4):795-806
18. Skorski T: “BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability.” *Oncogene* 2002;21:8591-8604
19. Hellmann A, Prejzner W: Przeszczepianie komórek krwiotwórczych w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej” *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 2001; 105:395-397
20. Prejzner W, Zaucha JM, Sacha T, Salamanczuk Z, Pieńkowska-Grela B, Haus O, Hellmann A: “Standard postępowania diagnostycznego i monitorowania leczenia chorych z przewlekłą białaczką szpikową.” *Acta Haematologica Polonica* 2005; 36(1) 113-127
21. Robak T: “Interferon α in the treatment of chronic myelogenous leukemia.” *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 1998;46(6):347-353
22. [de Castro FA](#), [Palma PV](#), [Morais FR](#), [Simoes BP](#), [Carvalho PV](#), [Ismael SJ](#), [Lima CP](#), [VOLTARELLI JC](#): “Immunological effects of interferon-alpha on chronic myelogenous leukaemia.” *Leukemia and Lymphoma* 2003;44(12):2061-2067
23. Goldman JM, Melo JV: Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia.” *New England Journal of Medicine* 2001;344(14):1084-1086
24. Sacha T, Dulak J, Skotnicki AB, Dembińska-Kieć A: „Molecular basis of chronic myelogenous leukemia and significance of diagnostic methods based on BCR-ABL gene amplification.” *Przegląd Lekarski* 1999;56 Suppl 1:57-61

25. Kantarjian HM, Talpaz M, Cortes J, O'Brien S, Faderl S, Thomas D, Giles F, Rios MB, Shan J, Arlinghaus R: "Quantitative Polymerase Chain Reaction Monitoring of BCR-ABL during Therapy with Imatinib Mesylate (STI571; Gleevec) in Chronic-Phase Chronic Myelogenous Leukemia." *Clinical Cancer Research* 2003;9(1):160-166
26. Faderl S, Hochhaus A, Hughes T: "Monitoring of minimal residual disease in chronic myeloid leukaemia." *Hematology and Oncology Clinics of North America* 2004; 18(3): 657-670
27. Bagg A: "Chronic myeloid leukemia: a minimalistic view of post-therapeutic monitoring." *The Journal of molecular diagnostics* 2002;4(1):1-10
28. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, Baccarani M, Cortes J, Cross NCP, Drucker BJ, Gabert J, Grimwade D, Hellmann R, Kamel-Reid S, Lipton JH, Longtine J, Martinelli G, Saglio G, Soverini S, Stock W, Goldman J: „Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing correct methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and expressing results." *Blood* 2006; 108(1):28-37
29. Hochhaus A: "Minimal residual disease in chronic myeloid leukaemia patients." *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2002; 15(1):159-178
30. Wang YL, Bagg A, [Pear W](#), [Nowell PC](#), [Hess JL](#): "Chronic myelogenous leukaemia: laboratory diagnosis and monitoring." *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 32:97-111
31. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VHJ, Bi W, Dee R, van der Shoot E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen JJM, Hokland P, Gabert J: "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* 2003;17(12): 2474-2486
32. Hochhaus A, Lin F, Reiter A, Skladny H, van Rhee F, Shepherd PC, Allan NC, Hehlmann R, Goldman JM, Cross NC: „Variable numbers of BCR-ABL transcripts persist in CML patients who achieve complete cytogenetic remission with interferon-alpha." *British Journal of Haematology* 1995; 91(1):126-131
33. Hughes T, Branford S: „Molecular monitoring of BCR-ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia." *Blood Reviews* 2006;20(1):29-41
34. Hehlmann R, Berger U, Pfirrmann M, Heimpel H, Hochhaus A, Hasford J, Kolb HJ, Lahaye T, Maywald O, Reiter A, Hossfeld DK, Huber C, Löffler H, Pralle H, Queisser W, Tobler A, Nerl C, Solenthaler M, Goebeler ME, Griesshammer M, Fischer T, Kremers S,

- Eimermacher H, Pfreundschuh M, Hirschmann WD, Lechner K, Wassmann B, Falge C, Kirchner HH, Gratwohl A: "Drug treatment is superior to allografting as first-line therapy in chronic myeloid leukemia." *Blood* 2007; 109(11):4686-92
35. O'Dwyer ME, Druker BJ: "STI571: an inhibitor of BCR-ABL tyrosine kinase for the treatment of chronic myelogenous leukaemia." *THE LANCET Oncology* 2000; 12(1): 207-211
36. Sacha T, Hochhaus A, Hanfstein B, Müller MC, Rudzki Z, Czopek J, Wolska-Smoleń T, Czekalska S, Salamanchuk Z, Jakóbczyk M, Skotnicki AB: „ABL-kinase domain point mutation as a cause of imatinib (STI571) resistance in CML patient who progress to myeloid blast crisis." *Leukemia Research* 2003;27(12):1163-1166
37. Hughes T, Branford S: „Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia." *Seminars in Hematology* 2003; 40(2 Supplement):62-68
38. Stentoft J, Pallisgaard N, Kjeldsen E, Holm MS, Nielsen JL, Hokland P: „Kinetics of BCR-ABL fusion transcript levels in chronic myeloid leukaemia patients treated with STI measured by quantitative real- time polymerase chain reaction." *European Journal of Hematology* 2001; 67(5-6): 302-308
39. Thorn I, Olsson-Stromberg U, Ohlson C, Jonsson A-M, Simonsson B, Barbany G: "The impact of RNA stabilisation on minimal residual disease assessment in chronic myeloid leukaemia." *Haematologica* 2005;90(11):1471-1476
40. Bustin SA: "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.: *Journal of Molecular Endocrinology* 2000; 25,169-193
41. Hughes TP, Morgan GJ, Martiat P, Goldman JM: „Detection of residual leukemia after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: role of polymerase chain reaction in predicting relapse." *Blood* 1991; 77(4):874
42. Shepherd P, Suffolk R, Halsey J, Allan N: „Analysis of molecular brakpoint and mRNA transcripts in a prospective randomized trial of interferon in chronic myeloid leukemia: no correlation with clinical features, cytogenetic response, duration of chronic phase, or survival." *British Journal of Haematology* 1995; 89(3):546-554
43. Otazu IB, Zalcborg I, Tabak DG, Dobbin J, Seuánez HN: „ Detection of BCR-ABL transcripts by multiplex and nested PCR in different haematological disorders." *Leukemia and Lymphoma* 2000;37(1-2):2-5-211
44. Costello R, Lafage M, Toyron Y, Brunel V, Sainty D, Amoulet C, Mozziconacci MJ, Bouabdallah R, Gastaut JA, Maraninchi D, Gabert J: "Philadelphia chromosome-negative



- chronic myeloid leukaemia: a report of 14 cases." *British Journal of Haematology* 1995; 90(2):346-352
45. Clarkson B, Strife A: "Linkage of proliferative and maturational abnormalities in chronic myelogenous leukaemia and relevance to treatment." *Leukemia* 1993; 7(11):1683-1721
46. Goldman J: "Monitoring minimal residual disease in *BCR-ABL*-positive chronic myeloid leukaemia in the imatinib era." *Current Opinion in Hematology* 2005, 12:33-39
47. Radich JP, Gehly G, Gooley T, Bryant E, Lift RA, Collins S, Edmands S, Kirk, Lee A, Kessler P, Schoch G, Buckner CD, Sullivan KM, Appelbaum FR: "Polymerase chain reaction detection of the *BCR-ABL* fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: result and implications in 346 patients." *Blood* 1995; 85(9):2632-2638
48. Costello R, Kirk J, Gabert J: Value of PCR analysis for long term survivors after allogeneic bone marrow transplant for chronic myelogenous leukaemia: a comparative study." *Leukemia and Lymphoma* 1996; 20(3-4):239-243
49. Zhang JG, Lin F, Chase A, [Goldman JM](#), [Cross NC](#): "Comparison of genomic DNA and cDNA for detection of residual disease after treatment of chronic myeloid leukaemia with allogeneic bone marrow transplantation." *Blood* 1996; 87(6):2588-2593
50. Lion T, Henn T, Gaiger A, Kahls P, Gadner H: "Early detection of relapse after bone marrow transplantation in patients with chronic myelogenous leukaemia." *Lancet* 1993; 341: 275-276
51. Schoch C, Schnittger S, Bursch S, Gerstner D, Hochhaus A, Berger U, [Hehlmann R](#), [Hiddemann W](#), [Haferlach T](#): "Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, quantitative PCR for diagnosis and follow-up in chronic myeloid leukaemia: a study on 350 cases." *Leukemia* 2002; 16(1):53-59
52. Hughes TP, Kaeda J, Branford S [Rudzki Z](#), [Hochhaus A](#), [Hensley ML](#), [Gathmann I](#), [Bolton AE](#), [van Hoomissen IC](#), [Goldman JM](#), [Radich JP](#); [International Randomised Study of Interferon versus STI571 \(IRIS\) Study Group](#): "Frequency of major molecular response to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia." *New England Journal of Medicine* 2003; 349(15):1423-1232
53. [Branford S](#), [Cross NC](#), [Hochhaus A](#), [Radich J](#), [Saglio G](#), [Kaeda J](#), [Goldman J](#), [Hughes T](#): "Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting *BCR-ABL* transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia." *Leukemia* 2006;20(11): 1925-1930

54. Sacha T, Florek I, Czekalska S, Zawada M, Skotnicki AB: "Bcr/abl monitoring by Real-Time PCR in CML patients" *Acta Angiologica*, 2003 vol. 9 suppl. abstract p. 20
55. Kaeda J, Chase A, Goldman JM: "Cytogenetic and molecular monitoring of residual disease in chronic myeloid leukemia." *Acta Haematologica* 2002; 107(2):64-75
56. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA [Gathmann I](#), [Baccarani M](#), [Cervantes F](#), [Cornelissen JJ](#), [Fischer T](#), [Hochhaus A](#), [Hughes T](#), [Lechner K](#), [Nielsen JL](#), [Rousselot P](#), [Reiffers J](#), [Saglio G](#), [Shepherd J](#), [Simonsson B](#), [Gratwohl A](#), [Goldman JM](#), [Kantarjian H](#), [Taylor K](#), [Verhoef G](#), [Bolton AE](#), [Capdeville R](#), [Druker BJ](#); [IRIS Investigators](#): "Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia." *New England Journal of Medicine* 2003; 348:994-1004
57. Branford S, Rudzki Z, Harper A, Grigg A, Taylor K, Durrant S, Arthur C, Browett P, Schwarzer AP, Ma D, Seymour JF, Bradstock K, Joske D, Lynch K, Gathmann I, Hughes TP: "Imatinib produces significantly superior molecular responses compared to interferon alfa plus cytarabine in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukaemia in chronic phase." *Leukemia* 2003;17(12):2401-2409
58. Merx K, Muller MC, Kreil S [Lahaye T](#), [Paschka P](#), [Schoch C](#), [Weisser A](#), [Kuhn C](#), [Berger U](#), [Gschaidmeier H](#), [Hehlmann R](#), [Hochhaus A](#): "Early reduction of BCR-ABL mRNA transcript levels predicts cytogenetic response in chronic phase CML patients treated with imatinib after failure of interferon alpha." *Leukemia* 2002; 16:1579-1583
59. Wang L, Pearson K, Ferguson JE, Clark RE: "The early molecular response to imatinib predicts cytogenetics and clinical outcome in chronic myeloid leukaemia." *British Journal of Haematology* 2003; 120(6):990-999
60. Guo JQ, Lin H, Kantarjian H, Talpaz M, Champlin R, Andreeff M, Glassman A, Arlinghaus RB: "Comparison of competitive-nested PCR and real-time PCR in detecting BCR-ABL fusion transcripts in Chronic myeloid leukemia patients." *Leukemia* 2002;16:2447-2453
61. Kim YJ, Kim DW, Lee S, Kim HJ, Kim YL, Hwang JY, Oh JH, Park YH, Lee YK, Min CK, Kim TG, Han TH, Min WS, Kim CC: "Comprehensive comparison of FISH, RT-PCR, and RQ-PCR for monitoring the BCR-ABL gene after hematopoietic stem cell transplantation in CML." *European Journal of Hematology* 2002;68: 272-280
62. Branford S, Hughes TP, Rudzki Z: "Monitoring chronic myeloid leukemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is reliable alternative to bone marrow cytogenetics." *British Journal of Haematology* 1999; 107:587-599

63. Ross DM, Branford S, Moore S, Hughes TP: "Limited clinical value of regular bone marrow cytogenetic analysis in imatinib-treated chronic phase CML patients monitored by RQ-PCR for *BCR-ABL*." *Leukemia* 2006; 20:664-670
64. Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, Goldman JM, Gambacorti-Passerini C, Guilhot F [Schiffer CA](#), [Fischer T](#), [Deininger MW](#), [Lennard AL](#), [Hochhaus A](#), [Ottmann OG](#), [Gratwohl A](#), [Baccarani M](#), [Stone R](#), [Tura S](#), [Mahon FX](#), [Fernandes-Reese S](#), [Gathmann I](#), [Capdeville R](#), [Kantarjian HM](#), [Sawyers CL](#): "Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study." *Blood* 2002; 99(6):1928-1937
65. Bain BJ: "Bone marrow biopsy morbidity and mortality: 2002 data." *Clinical Laboratory and Haematology* 2004; 26:315-318
66. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB: "Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells." *Nature Medicine* 1996; 2:561-566
67. Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, Garcia-Manero G, Verstovsek S, Giles F, Mary Rios B, Shan J, Letvak L, Thomas D, Faderl S, Ferrajoli A, Cortes J: "High-dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukaemia." *Blood* 2004; 103:2873-2878
68. Lange T, Bumm T, Mueller M [Otto S](#), [Al-Ali HK](#), [Grommisch L](#), [Musiol S](#), [Franke C](#), [Krahl R](#), [Niederwieser D](#), [Deininger MW](#): "Durability of molecular remission in chronic myeloid leukaemia patients treated with imatinib vs allogeneic stem cell transplantation." *Leukemia* 2005; 19:1262-1265
69. Grigg A, Hughes T: "Role of Allogeneic Stem Cell Transplantation for Adult Chronic Myeloid Leukemia in the Imatinib Era." *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2006; 12:795-807
70. Holtz MS, Bhatia R: "Effect of imatinib mesylate on chronic myelogenous leukaemia hematopoietic progenitor cells." *Leukemia and Lymphoma* 2004; 45:319-325
71. Kantarjian HM, Ottman O, Cortes J: "AMN107, a novel aminopyrimidine inhibitor of bcr-abl, has significant activity in imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia (CML) or Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoid leukaemia (Ph+ ALL)." *Blood* 2005; 106:37
72. [Jabbour E](#), [Cortes J](#), [O'Brien S](#), [Giles F](#), [Kantarjian H](#): "New targeted therapies for chronic myelogenous leukemia: opportunities to overcome imatinib resistance." *Seminars in Hematology* 2007; 44(Suppl 1):25-31

73. Kantarjian HM, Giles F, Wunderle L, Bhalla K, O'Brien S, Wassman B, Tanaka C, Manley P, Rae P, Mietlowski W, Bochiński K, Hochhaus A, Griffin JD, Hoelzer D, Albitar M, Dugan M, Cortes J, Alland L, Ottmann OG: "Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL." *New England Journal of Medicine* 2006;354(24): 2542-2551
74. Sawyers CL, Kantarjian H, Shah N: "Dasatinib (BMS-354825) in patients with chronic myeloid leukemia (CML) and Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoid leukaemia (PH+ ALL) who are resistant or intolerant to imatinib: update of phase I study. (abstract). *Blood* 2005; 106:38
75. Shah N, Tran C, Lee FY, [Chen P](#), [Norris D](#), [Sawyers CL](#): "Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor." *Science* 2004; 305:399-401
76. Kim YJ, Kim DW, Lee Schung NG, Hwang, JY, Kim YI, Min CK, Kim CC: "Preemptive treatment of minimal residual disease post transplant in CML using real-time quantitative RT-PCR: a prospective, randomised trial." *Bone Marrow Transplantation* 2004; 33(5): 535-542
77. Barbany G, Hagberg A, Olsson-Stromberg U, Simonsson B, Syvanen A-C, Landegren U: "Manifold-assisted Reverse transcription-PCR with Real-Time Detection for measurement of the *BCR-ABL* Fusion Transcript in Chronic Myeloid leukaemia patients." *Clinical Chemistry* 2000; 46(7): 913-920
78. Olavarria E, Kanfer E, Szydło R, Kaeda J, Rezvani K, Cwynarski K, Pocock C, Dazzi F, Craddock C, Apperley JF, Cross NC, Goldman JM: „Early detection of BCR-ABL transcripts by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction predicts outcome after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukaemia." *Blood* 2001; 97(6):1560-1565
79. Simonsson B, Oberg G, Bjoreman M, Bjorkholm M, Carneskog J, Karlsson K, Gahrton G, Grimfors G, Hast R, Karle H, Linder O, Ljungman P, Nielsen JL, Nilsson J, Lofvenberg E, Malm C, Olsson K, Olsson-Stromberg U, Paul C, Stenke L, Stentoft J, Turesson I, Uden AM, Wahlin A, Vilen L, Weis-Bjerrum O: "Intensive treatment and stem cell transplantation in chronic myelogenous leukaemia: long-term follow-up." *Acta Haematologica* 2005;113(3):155-162
80. Prejzner W, Sacha T, Salamanczuk Z, Pieńkowska-Grela B, Haus O, Hellmann A: „Standard postępowania diagnostycznego i terapeutycznego u chorych na przewlekłą białaczkę szpikową w Polsce w roku 2007." *Acta Haematologica Polonica* 2007; 38(1): 107-122



Niniejsza Praca Doktorska powstała w ramach Grantu Promotorskiego nr 2 P05A 088 29 realizowanego dzięki finansowaniu KBN w roku 2005/2006.