Minimalna ostatna bolest kronične mijeloične leukemije kroz mjerenje transkripta BCR-ABL onkogena

Sorić, Ena

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:414465

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Ena Sorić

Minimalna ostatna bolest kronične mijeloične leukemije kroz mjerenje transkripta *BCR-ABL* onkogena

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Dubrava pod vodstvom prof. dr. sc. Rajka Kušeca i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2016./2017.

POPIS KRATICA

AP akutna faza

BP blastična faza

CBA *chromosome banding analysis*

CCA klonalne kromosomske abnormalnosti, *clonal chromosomal abnormalities*

CgR citogenetički odgovor, *cytogenetic response*

CP kronična faza

DKS diferencijalna krvna slika

ELN European LeukemiaNet

FISH fluorescencijska in-situ hibridizacija

HR hematološki odgovor, *hematologic response*

KKS kompletna krvna slika

KML kronična mijeloična leukemija

MMR značajni molekularni odgovor, *major molecular response*

MR molekularni odgovor, *molecular response*

MRD minimalna ostatna bolest, *minimal residual disease*

Ph Philadelphia

qRT-PCR kvantitativni real-time PCR (*quantitative real-time PCR*)

TFR remisija bez terapije, *treatment free remission*

TKI inhbitori tirozin kinaze, *tyrosine kinase inhibitors*

SADRŽAJ

1. Sažetak.....I

2. Summary.....II

3. Uvod.....1

3.1. Kronična mijeloična leukemija.....1

3.1.1. Definicija.....1

3.1.2. Epidemiologija i etiologija.....1

3.1.3. Klinička slika.....2

3.1.4. Dijagnostika.....2

3.1.5. Liječenje.....3

3.1.5.1. Definicije odgovora na TKI.....3

3.1.6. Prognoza.....6

3.2. *BCR-ABL*.....6

3.2.1. Philadelphia kromosom.....6

3.2.2. Uloga *BCR-ABL* u patofiziologiji kronične mijeloične leukemije..6

3.2.3. Terapijska važnost.....7

3.3. Minimalna ostatna bolest kronične mijeloične leukemije.....9

4. Hipoteza.....10

5. Ciljevi rada.....11

6. Ispitanici i metode.....12

6.1. Ispitanici.....12

6.2. Metode.....12

7. Rezultati.....14

8. Rasprava.....24

9. Zaključci.....26

10. Zahvale.....27

11. Literatura.....28

12. Životopis.....34

1. Sažetak

Minimalna ostatna bolest kronične mijeloične leukemije kroz praćenje transkripta *BCR-ABL* onkogena

Ena Sorić

Sveučilište u Zagrebu

Medicinski fakultet

Kronična mijeloična leukemija mijeloproliferativni je poremećaj obilježen translokacijom između 9. i 22. kromosoma zvanom Philadelphia (Ph) kromosom. Pri tome nastaje fuzijski gen *BCR-ABL* čiji je konačni učinak trajna aktivacija tirozin kinaze, čime se remeti niz staničnih funkcija. Kako bi se pratio tijek bolesti, analizirala minimalna ostatna bolest te procijenio odgovor na liječenje, pacijentima se kvantificira razina *BCR-ABL* transkripata te se izražava kao postotak na internacionalnoj skali. U našem istraživanju analizirano je 65 pacijenata dijagnosticiranih u KB Dubrava, Zagreb, u razdoblju između 1997. i 2016. godine, kojima je pomoću qRT-PCR mjerena razina *BCR-ABL* transkripata i ocijenjen odgovor na liječenje inhibitorima tirozin kinaze. MMR postignut je u 91,1% pacijenata, MR4 u 76,9% pacijenata, a nemjerljivost u 63,1% pacijenata. Fluktuacija za više od 0,5 log povezana je s kraćim vremenom do postizanja nemjerljivosti. Zaključno, mjerenje transkripata *BCR-ABL* onkogena adekvatna je metoda za praćenje minimalne ostatne bolesti kronične mijeloične leukemije.

Ključne riječi: mijeloproliferativni poremećaj, *BCR-ABL*, kvantitiativni PCR u realnom vremenu, minimalna ostatna bolest, značajni molekulani odgovor, fluktuacije *BCR-ABL* transkripata

2. Summary

Minimal residual disease of chronic myeloid leukemia through *BCR-ABL* fusion gene monitoring

Ena Sorić

University of Zagreb

School of Medicine

Chronic myeloid leukemia is a myeloproliferative disorder characterized by translocation between chromosome 9 and 22 called Philadelphia (Ph) chromosome. This generates a fusion *BCR-ABL* gene whose ultimate effect is the continuous activation of tyrosine kinase, thereby disrupting cellular functions. To monitor the course of the disease, analyze the minimal residual disease, and evaluate the response to the treatment, the *BCR-ABL* transcript level is quantified and expressed as a percentage on an international scale (IS). In our study, 65 patients diagnosed in KB Dubrava, Zagreb in the period between 1997 and 2016 were analyzed by using qRT-PCR to measure levels of *BCR-ABL* transcripts and the response to the treatment of tyrosine kinase inhibitors was evaluated. MMR was achieved in 91.1% of patients, MR4 in 76.9% of patients, and undetecable disease in 63.1% of patients. The fluctuation of more than 0.5 logs is associated with a shorter time to reach undetectable disease. To conclude, measurement of transcripts of *BCR-ABL* oncogene is an adequate method for monitoring the minimal residual disease of chronic myeloid leukemia.

Keywords: myeloproliferative disorder, *BCR-ABL*, quantitative PCR in real-time, minimal residual disease, major molecular response, *BCR-ABL* transcript fluctuation

3. Uvod

3.1. Kronična mijeloična leukemija

3.1.1. Definicija

Kronična mijeloična leukemija mijeloproliferativni je poremećaj krvotvorne matične stanice karakteriziran translokacijom između 9. i 22. kromosoma, poznatom pod nazivom Philadelphia (Ph) kromosom. Kao posljedica translokacije nastaje *BCR-ABL* fuzijski gen, koji se ponaša kao onkogen tako što kodira za protein mase 210 kDa (p210 kDa) koji konstitutivno potiče aktivnost tirozin kinaze. Na taj način aktivira se cijela signalna kaskada koja remeti osnovne stanične funkcije – proliferaciju, transkripciju, preživljenje. Bolest u svojem prirodnim obliku ima tri faze: kroničnu, akceleriranu i blastičnu, a vrijeme kad dolazi do prijelaza iz jedne u drugu fazu ne može se predvidjeti. Većina pacijenata dijagnosticira se u kroničnoj, indolentnoj fazi, te uz pomoć terapije inhibitorima tirozin kinaze (TKI), danas sve kasnije dolazi do prijelaza u uznapredovale faze. Ipak, nastup blastične faze, koja se očituje kao akutna leukemija (u 70% mijeloična, u 30% limfoblastična), obilježen je s refrakternošću na TKI (Walker i sur.).

3.1.2. Epidemiologija i etiologija

Kronična mijeloična leukemija čini između 7 i 20% svih leukemija, a incidencija iznosi 1-2: 100 000 osoba godišnje. Pojavljuje se u bilo kojoj dobi, ali indicencija raste s dobi, te se najčešće javlja između 40. i 60. godine života. U muškaraca je 1,3-1,4 puta češća nego kod žena. Dobno prilagođena stopa mortaliteta iznosi 0,9: 100 000 osoba, pri čemu je smrtni ishod nešto češći kod muškaraca nego kod žena (Redaelli i sur., 2004).

Sama etiologija bolesti nije poznata, ali poznato je da incidencija KML-a raste nakon izlaganja većim dozama zračenja (Hsu i sur., 2013). Dokazano je i da kemijski spojevi kao benzen i alkilirajući agensi ne dovode do nastanka *BCR-ABL* mutacije (Lichtman, 2008).

3.1.3. Klinička slika

Prirodan tijek bolesti ima tri faze: kroničnu, akceleriranu i blastičnu fazu. Većina pacijenata (90-95%) prezentira se u kroničnoj fazi. Simptomi su nespecifični te se oko 40% pacijenata dijagnosticira analizom kompletne i diferencijalne krvne slike, u kojoj se nađu leukocitoza s bazofilijom te nezreli oblici granulocita, pretežno metamijelociti, mijelociti i promijelociti, a ponekad i mijeloblasti. Simptomi uključuju umor, gubitak na tjelesnoj težini, noćno znojenje i asteniju (M. Baccarani i sur., 2012), a mogući su i rjeđi simptomi kao prijapizam, retinalna krvarenja te ulceracije i krvarenja u gornjem probavnom sustavu. Kliničkim pregledom u 40% pacijenata nađe se splenomegalija, a u 10% pacijenata i hepatomegalija. Kronična faza obično prelazi u akcleriranu, ali u 20% slučajeva može prijeći izravno u blastičnu fazu. Akcelerirana faza se prezentira kao anemija u pogoršanju, splenomegalija ili infiltracija organa, a blastična faza kao akutna leukemija (Elias Jabbour & Kantarjian, 2016).

3.1.4. Dijagnostika

Osnovna dijagnostika sastoji se od kompletne krvne slike (KKS) i diferencijalne krvne slike (DKS), citogenetske analize i kariotipizacije koštane srži i kvalitativne RT-PCR analize krvi. Nalaz KKS i DKS ovisi o fazi u kojoj je bolest dijagnosticirana. S obzirom da se većina pacijenata dijagnosticira u kroničnoj fazi bolesti, tipični nalaz u krvnoj slici je leukocitoza s bazofilijom te nezreli oblici granulocita, pretežno metamijelociti, mijelociti i promijelociti, a ponekad i mijeloblasti. Osim toga, u KKS-u se uočava anemija i trombocitoza. (M. Baccarani i sur., 2012). Kriteriji koji obilježavaju prijelaz bolesti u akceleriranu fazu je 15-29% blasta u krvi ili koštanoj srži ili >30% blasta i promijelocita u krvi ili koštanoj srži (s >30% blasta). Uz to su kriteriji i ≥20% bazofila u krvi te perzistentna trombocitopenija ($<100 \times 10^9$/L), nevezana uz terapiju. Prijelaz u blastičnu fazu obilježen je s ≥30% blasta u krvi ili koštanoj srži te s ekstramedularnom proliferacijom blasta (izuzev u slezeni) (Michele Baccarani i sur., 2013).

Citogenetska analiza dokazuje postojanje translokacije t(9;22)(q34;q11), odnosno postojanje Ph kromosoma. Osnovna metoda je banding kromosoma (chromosome banding analysis), a vrši se na stanicama koštane srži u metafazi. Ukoliko se stanice

koštane srži ne mogu dobiti, radi se FISH na stanicama periferne krvi u interfazi. Za razliku od FISH metode, CBA dokazuje i dodatne mutacije na Ph kromosomu. Pogotovo su bitne klonalne kromosomske abnormalnosti na Ph kromosomu (CCA/Ph+) koje su jedan od kriterija za akceleriranu fazu bolesti.

Temeljna molekularna metoda jest RT-PCR. Na početku dijagnostike radi se kvalitativna RT-PCR, koja detektira postojanje *BCR-ABL* transkripata u perifernoj krvi. Za razliku od toga, kvantitativna RT-PCR analiza krvi nije obavezna na početku dijagnostike, ali je pogodna za praćenje tijeka bolesti i utvrđivanje postojanja minimalne ostatne bolesti te se obavlja svaka tri mjeseca dok se ne postigne značajan molekularni odgovor (MMR). Nakon postizanja MMR-a, qRT-PCR vrši se svakih šest mjeseci. Analiza specifičnih mutacija obavlja se jedino u slučaju da se razvije akutna (AP) ili blastična (BP) faza te u slučaju da je liječenje nedjelotvorno (M. Baccarani i sur., 2012).

3.1.5. Liječenje

Osnovu terapije predstavlja skupina lijekova nazvana inhibitori tirozin kinaze (TKI). Prema ELN smjernicama (Michele Baccarani i sur., 2013), prva linija terapije može bit imatinib (400 mg/d), nilotinib (300 dva puta dnevno) ili dasatinib (100 mg/d). Kao druga linija terapije koriste se gore navedeni TKI, u istim ili većim dozama. Ukoliko je pacijent rezistentan ili ne tolerira terapiju, prepoučuje se bosutinib (500 mg/d). Ponatinib, kao zadnja linija TKI koja se koristi u terapiji CP-CML, prema indikacijama Ariad Pharmaceuticalsa, koristi se samo kod rezistenicije na ostale TKI ili ukoliko postoji T315I mutacija.

Transplantacija alogene koštane srži vrši se u kroničnoj fazi ukoliko je pacijent rezistentan ili ne tolerira barem jedan od TKI druge generacije (nilotinib, dasatinib, bosutinib) (Michele Baccarani i sur., 2013).

3.1.5.1. Definicije odgovora na TKI

Unčikovitost TKI može se opisati kao hematološki (HR), citogenetski (CgR) i molekularni odgovor (MR). Kompletni hematološki odgovor (CHR) opisuje se kao broj trombocita <450 x 10^9/L; broj leukocita <10 x 10^9/L, diferencijalna krvna slika

(DKS) bez nezrelih granulocita i <5% bazofila i nepalpabilna slezena. Za procjenu CgR vrši se CBA (chromosome banding analysis) stanica koštane srži u metafazi. Rezultat analize može biti kompletni (CCgR) (Ph+ 0%), parcijalni (PCgR) (Ph 1-35%), minor (mCgR) (Ph+ 36-56%), minimalni (minCgR) (Ph+ 66-95%) odgovor i bez odgovora (noCgR) (Ph+ >95%). Ako nismo u mogućnosti dobiti stanice koštane srži, radi se fluorescencijska in-situ hibridizacija (FISH) na stanicama u interfazi iz periferne krvi, pri čemu se detektiraju *BCR-ABL* pozitivne jezgre, a CCgR se definira kao <1% *BCR-ABL* pozitivnih jezgara na minimalno 200 analiziranih jezgara stanica u interfazi. Nakon postizanja CCgR, molekularnim metodama (kvantitativni RT-PCR, qRT-PCR) analizira se koštana srž ili periferna krv da bi se utvrdio MR, a procjenjuje se na temelju internacionalne skale (IS) kao omjer *BCR-ABL* transkripata i *ABL* transkripata te se izražava kao *BCR-ABL* na logaritamskoj skali, pri čemu 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,0032% i 0,001% odgovaraju padu za 1, 2, 3, 4, 4.5 odnosno 5 logaritama. Prema tome, značajni molekularni odgovor (MMR, major molecular response) označava ≤0,1 % *BCR-ABL* transkripata te se izražava kao MR3. Duboki molekularni odgovori se opisuju kao MR4 i MR4,5 i MR5 (M. Baccarani, 2006; M. Baccarani i sur., 2012; Michele Baccarani i sur., 2013), a povezani su sa većim preživljenjem bez progresije (progression free survival, PFS), ukupnim preživljenjem (overall survival, OS) te manjom vjerojatnošću da će doći do progresije bolesti (Francois Xavier Mahon & Etienne, 2014).

Tablica 1. Definicija odgovora na bilo koji TKI kao prvu liniju terapije

	Optimalni odgovor	**Upozorenje**	**Neuspjeh terapije**
Baseline	/	Visoki rizik ili CCA/Ph+, major route	/
3 mo	*BCR-ABL*≤10% i/ili Ph+ ≤35%	*BCR-ABL* >10% i/ili Ph+ 36%-95%	Non-CHR i/ili Ph>95%
6 mo	*BCR-ABL* <1% i/ili Ph+ 0	*BCR-ABL* 1%-10% i/ili Ph+ 1%-35%	*BCR-ABL*>10% i/ili Ph1 >35%
12 mo	*BCR-ABL*≤0,1%	*BCR-ABL* >0,1%-1%	*BCR-ABL* >1% i/ili Ph+ >0

Bilo kad	*BCR-ABL* ≤0,1%	CCA/Ph- (-7 ili 7q-)	Gubitak CHR Gubutak CcyR Potvrđeni gubitak MMR CCA/Ph+ mutacije

Tablica 2. Definicija odgovora na drugu liniju terapije (nilotinib ili dasatinib)

	Optimalni odgovor	**Upozorenje**	**Neuspjeh terapije**
Baseline	/	Nema CHR ili gubitak CHR na imatinibu ili nepostizanje CyR na bilo kojem TKI prve linije ili visoki rizik	/
3 mo	*BCR-ABL* ≤10% i/ili Ph+ <65%	*BCR-ABL* >10% i/ili Ph+ 65-95%	Nema CHR ili Ph+ >95% ili nove mutacije
6 mo	*BCR-ABL* ≤10% i/ili Ph+ <35%	Ph+ 35-65%	*BCR-ABL* >10% i/ili Ph+ >65% i/ili nove mutacjie
12 mo	*BCR-ABL* <1% i/ili Ph+ 0	*BCR-ABL* 1-10% i/ili Ph+ 1-35%	*BCR-ABL* >10% i/ili Ph+ >35% i/ili nove mutacije
Bilo kad	*BCR-ABL* ≤10%	CCA/Ph- (-7, 7q-) ili *BCR-ABL* >0,1%	Gubitak CHR ili gubitak CCyR ili PCyR Nove mutacije Potvrđeni gubutak MMR* CCA/Ph+

*u dva testa zaredom , pri čemu u jednome je razina BCR-ABL1 transkripata >1%

(Michele Baccarani i sur., 2013)

3.1.6. Prognoza

Prema smjernicama European LeukemiaNeta, prije početka TKI terapije potrebno je izračunati relativni rizik, tj. prognostički faktor. ELN preporučuje korištenje 4 tipa scorea: Sokal, EURO (Hasford), EUTOS i ELTS. Sokal (Sokal i sur., 1984) i EURO (Hasford i sur. 1998.) uzimaju u obzir dob (u godinama), veličinu slezene (maksimalna udaljenost od lijevog rebrenog luka u cm), broj trombocita te postotak bazofila, eozinofila i mijeloblasta u krvi. EUTOS score služi za prognozu kompletnog citogenetskog odgovora (CCgR) unutar 18 mjeseci, a uzima u obzir veličinu slezene (maksimalnu udaljenost od lijevog rebrenog luka u centimetrima) i postotak bazofila u krvi (Hasford i sur. 2011). ELTS računa prognostički rizik na temelju dobi (u navršenim godinama), veličine slezene (maksimalna udaljenost od lijevog rebrenog luka u centimetrima), postotka blasta u perifernoj krvi i broja trombocita (Pfirrmann i sur., 2016).

3.2. *BCR-ABL*

3.2.1. Philadelphia kromosom

Philadelphia (Ph) kromosom nastaje recipročnom translokacijom dugih krakova 9. i 22. kromosoma (t(9;22)(q34;q11)). Takvom mutacijom 5' kraj *BCR* gena i 3' kraj *ABL* (Abelson) gena oblikuju fuzijski *BCR-ABL* gen, čiji je konačni proizvod protein molekularne težine 210 kDa ($p210^{BCR-ABL}$) (Chereda & Melo, 2015). Philadelphia kromosom nije samo obilježje KML-a, pronađen je i u akutnoj mijeloičnoj leukemiji (Soupir i sur., 2007) i u akutnoj limfoblastičnoj leukemiji (Druker i sur., 2001)

3.2.3. Uloga *BCR-ABL* u patofiziologiji kronične mijeloične leukemije

Prilikom translokacije, točka loma može varirati. Tri su glavne točke loma (breakpoint cluster region, bcr): major (M-bcr), minor (m-bcr) i mikro (μ-bcr). U najvećem broju slučajeva lom se događa na području M-bcr te messenger RNA (mRNA) ima ili e13a2 (nekad b2a2) ili e14a2 (nekad b3a2) spoj, čijom translacijom nastaje onkoprotein $p210^{BCR-ABL}$. Njegova uloga postaje trajna aktivacija tirozin kinaze, čiji je krajnji rezultat inhibicija stanične apoptoze. Rjeđe u KML-u, ali zato u dvije trećine Ph+ akutnih limfatičnih leukemija (ALL) lom se dogodi u m-bcr, što naposlijetku

rezultira nastankom $p190^{BCR\text{-}ABL}$. (Goldman & Melo, 2003;. Melo & Deininger, 2004) Treća točka loma, µ-bcr, rezultira nastankom $p230^{BCR\text{-}ABL}$ proteina koji je povezan s neutrofilnom KML, bolesti indolentnog tijeka. (Verstovsek i sur., 2002)

BCR-ABL ima utjecaj na niz signalnih molekula čime uzrokuje poremećaj glavnih staničnih procesa. Djelovanjem na Ras-mitogen-aktiviranu protein kinazu (MAPK) inducira staničnu proliferaciju, djelovanjem na JAK-STAT put uzrokuje poremećaj transkripcije, a remeti i PI3K/AKT i tako povećava apoptozu (Cilloni & Saglio, 2012).

Zanimljivo je da iako je *BCR-ABL* mutacija ključna za održavanje bolesti, ona sama po sebi nije dovoljna da bolest nastane nego su potrebne su i dodatne mutacije (T. S. Ross & Mgbemena, 2014). Osim toga, prevalencija $p210^{BCR\text{-}ABL}$ transkripata iznosi između 10-30% u zdravih pojedinaca. Transkripti su češći u starijih nego u djece, vjerojatno jer se starenjem nakupljaju mutacije (Ismail, Naffa, Yousef, & Ghanim, 2014; T. S. Ross & Mgbemena, 2014).

3.2.3. Terapijska važnost

Današnje liječenje KML-a temelji se blokiranju tirozin kinaze koja je konstitutivno aktivirana *BCR-ABL* mutacijom. Kad razine *BCR-ABL* porastu, bolest prelazi iz kronične u akceleriranu i blastičnu fazu (Barnes, Schultheis, Adedeji, & Melo, 2005). Inhibitori tirozin kinaze nisu unčikoviti u liječenju uznapredovalih faza što se objašnjava time da TKI ne djeluju pri visoim razinama *BCR-ABL*, ili da je progresija ili održavanje tih faza neovisno o *BCR-ABL* (T. S. Ross & Mgbemena, 2014). Rezistencija na TKI može biti i posljedica mutacije samog *BCR-ABL*, odnosno njegove tirozin kinazne domene (KD) što je uzrok rezistencije na imatinib i može biti prediktor progresije bolesti u akceleriranu fazu (Khorashad i sur., 2008). Posebna među njima je T315I mutacija koja dovodi do rezistencije na TKI druge generacije te zahtjeva liječenje ponatinibom (O'Hare, Deininger, Eide, Clackson, & Druker, 2011). Mutacije KD javljaju se u oko 40% primarnih i sekundarnih rezistencija na imatinib, a uglavnom se radi o mutacijama fosfatne petlje (P-loop). (E Jabbour i sur., 2006; Soverini i sur., 2006)

Neuspjeh terapije može također biti rezultat nastanka dodatnih klonalnih kromosomskih abnormalnosti u Ph+ stanicama (clonal chromosomal abnormalities,

CCA/Ph+) Ta pojava se zove klonalna citogenetska evolucija i povezana je s lošijim OS.(Cortes i sur., 2003). Klonalne kromosomske abnormalnosti moguće su i u Ph- stanicama (CCA/Ph-), ali one ne utječu na ukupno preživljenje, osim potencijalno abnormalnosti na 7. kromosomu. (Deininger i sur., 2007)

Mjerenje *BCR-ABL* transkripata važno je i za određivanje prognoze bolesti. Više puta je dokazano kako je nemogućnost postizanja CCgR unutar 12 mjeseci od početka liječenja imatinibom povezano s većom vjerojatnošću progresije bolesti (H. Kantarjian i sur., 2009; H. M. Kantarjian i sur., 2006; Marin i sur., 2008). Sve se više naglašava važnost postizanja ranog molekularnog odgovora (EMR) tijekom liječenja, a on se definira kao razine BCR-ABL< 10% nakon 3 mjeseca. Postizanje EMR povezano je sa značajno boljim OS (Hanfstein i sur., 2012; Marin i sur., 2012) Povećanje razine *BCR-ABL* transkripata za više od pola logaritma je značajan prediktor relapsa bolesti kod pacijenata koji su s imatinibom postigli CCgR, čak i ako je taj porast manji od MMR. (Press i sur., 2007). Postoji i utjecaj tipa transkripata – pacijenti koji eksprimiraju e14a2 tip transkripata brže postižu dublji molekularni odgovor nego oni koji eksprimiraju e13a2 tip. Također, taj odgovor i traje dulje, ali nema utjecaja na ukupno preživljenje. (Jain i sur., 2016)

Napravljene su i studije koje su pokazale postoje li razlike u postizanju ranog molekularnog odgovora između različitih TKI. Prva među njima bila je DASISION studija koja je usporedila dasatinib i imatinib te je pokazala kako pacijenti na dasatinibu značajno ranije postižu *BCR-ABL* <10% unutar 3 mjeseca, ali OS i PFS nisu bili značajno veći. (Cortes i sur., 2016). Druga je bila ENESTnd studija, koja je usporedila nilotinib i imatinib te je dala slične rezultate – s nilotinibom se brže postiže duboki molekularni odgovor, ali ukupno preživljenje je jednako kao kod imatiniba. (Hughes i sur., 2014). Bosutinib s imatinibom uspoređuje BELA studija koja je pokazala da u prve dvije godine studije rezultati slični, ali da bosutinib ima više nuspojava.(Brümmendorf i sur., 2015). Ponatinib je uspoređivan s imatinibom u EPIC studiji te su preliminarni rezultati pokazali da, iako je studija prekinuta zbog novonastalih arterijskih okluzija u skupini liječenoj ponatinibom, ponatinib je ipak učikovitiji od imatiniba (Lipton i sur., 2016).

3.3. Minimalna ostatna bolest kronične mijeloične leukemije

Minimalna ostatna bolest podrazumijeva postojanje niskog broja leukemijskih stanica u tijelu za vrijeme ili nakon liječenja, pri čemu se pacijent nalazi u remisiji. U KML-u MRD se prati mjerenjem *BCR-ABL* transkripata u perifernoj krvi koristeći qRT-PCR, a relaps se definira kao gubitak značajnog molekulanog odgovora ili dva pozitivna uzorka zaredom (D. M. Ross i sur., 2013). Sama definicija MRD nije u potpunosti jasna, ali većina studija pod tim podrazumjeva MMR 4,5 (*BCR-ABL* ≤0,003) i dublje u trajanju od minimalno dvije godine (Branford, 2016).

Trenutačne ELN smjernice preporučuju doživotno uzimanje TKI terapije (Michele Baccarani i sur., 2013). Ipak, francuska STIM studija tvrdi kako je u 40% pacijenata moguća remisija bez terapije (treatment-free remision, TFR) nakon što je postignuta nedetektibilna minimalna ostatna bolest (minimal residual disease, MRD) barem dvije godine (François Xavier Mahon i sur., 2010). Slični rezultati prezentirani su u TWISTER studiji; nakon 2 godine od prestanka uzimanja imatiniba, 47,1% pacijenata je bilo u TFR. Većina relapsa su se događala unutar 4 mjeseca od prestanka uzimanja imatiniba, a nakon 27 mjeseci više nije bilo pojave relapsa (D. M. Ross i sur., 2013) .

4. Hipoteza

U ovom istraživanju polazimo od hipoteze da je mjerenje *BCR-ABL* transkripata adekvatna metoda za praćenje minimalne ostatne bolesti kronične mijeloične leukemije i odgovora na TKI.

5. Ciljevi rada

1. Ispitati dinamiku kretanja fuzijskih transkripata *BCR-ABL* onkogena uz terapiju inhibitorima tirozin kinaze.

2. Utvrditi proporciju i dinamiku postizanja nemjerljivosti transkripata *BCR-ABL* onkogena.

3. Ocijeniti fluktuaciju mjerljivih transkripata u dubokom molekularnom odgovoru.

4. Usporediti molekularne odgovore s obzirom na izbor TKI.

6. Ispitanici i metode

6.1. Ispitanici

U istraživanje je bilo uključeno 65 ispitanika, 36 (55.4%) muškaraca i 29 (44.6%) žena, kojima je u razdoblju od 1997. god. do 2016. god. postavljena dijagnoza kronične mijeloične leukemije. Prosječna dob ispitanika bila je 53.4 ±13.7 godina. Prilikom postavljanja dijagnoze 12 od 65 pacijenata (40%) imalo je palpabilnu slezenu. Određeni su i prognostički indeksi (Sokal score, Hasford, EUTOS i ELTS). (tablica 3.).

Tablica 3. Prognostički indeksi za KML

	niski rizik	**srednji rizik**	**visoki rizik**
Sokal score	20/28 (71.4%)	5/28 (17.9%)	3/28 (10.7%)
Hasford score	26/28 (92.9%)	0/28 (0%)	2/28 (7.1%)
EUTOS	27/29 (93.1%)	/	2/29 (6.9%)
ELTS	16/28 (57.1%)	8/28 (28.6%)	4/28 (14.3%)

6.2. Metode

Za mjerenje razine *BCR-ABL* transkripata korištena je metoda kvantitativnog real-time PCR (qRT-PCR). Pri tome se koristila RNA izolirana iz mononukleara periferne krvi. Metoda se temelji na prijepisu RNA u komplementarnu DNA (cDNA) koja se umnaža pomoću PCR s fluorescentno obilježenim oligonukleotidnim probama. Razina fluorescencije proporcionalna je količini nastalog produkta te se na taj način određuje broj kopija *BCR-ABL*.

Volumen reakcijske smjese bio je ukupno 20 µL, a sastojao se od po 0,5 µL početnica za *M-BCR* i po 0,5 µL početnica za *ABL* (navedeno u tablicama 4. i 5.), 12,5 µL TaqMan universal PCR Master Mixa i 6 µL destilirane vode. Korišten je aparat 7300 Real Time PCR System. Program umnažanja sastojao se od 2 minute aktivacije AmpErase UNG na temperaturi od 50ºC, 10 minuta aktivacije AmpliTaq Gold na 95ºC, ciklusa taljenja tijekom 15 min na temperaturi od 95ºC i 50 ciklusa

ekstenzija na temperaturi od 60ºC. Svaki ciklus ekstenzije trajao je 1 minutu te se pri tome mjerila fluorescencija.

Tablica 4: Početnice za *M-BCR*

ENF501	5' TCC GCT GAC CAT CAA (C ili T)AA GGA 3'
ENP541	5' CCC TTC AGC GGC CAG TAG CAT CTG A 3'
ENR561	5' CAC TCA GAC CCT GAG GCT CAA 3'

Tablica 5: Početnice za *ABL*

ENF1003	5' TCG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC TAA AGG T 3'
ENPr1043	5' CCA TTT TTG GTT TGG GCT TCA CAC CAT T 3'
ENR1063	5' GAT GTA GTT GCT TGG GAC CCA 3'

Dobiveni rezultati se izravaju kao postotak prijepisa *BCR-ABL* na kontrolni gen *ABL* (*BCR-ABL/ABL*).

Statističke metode

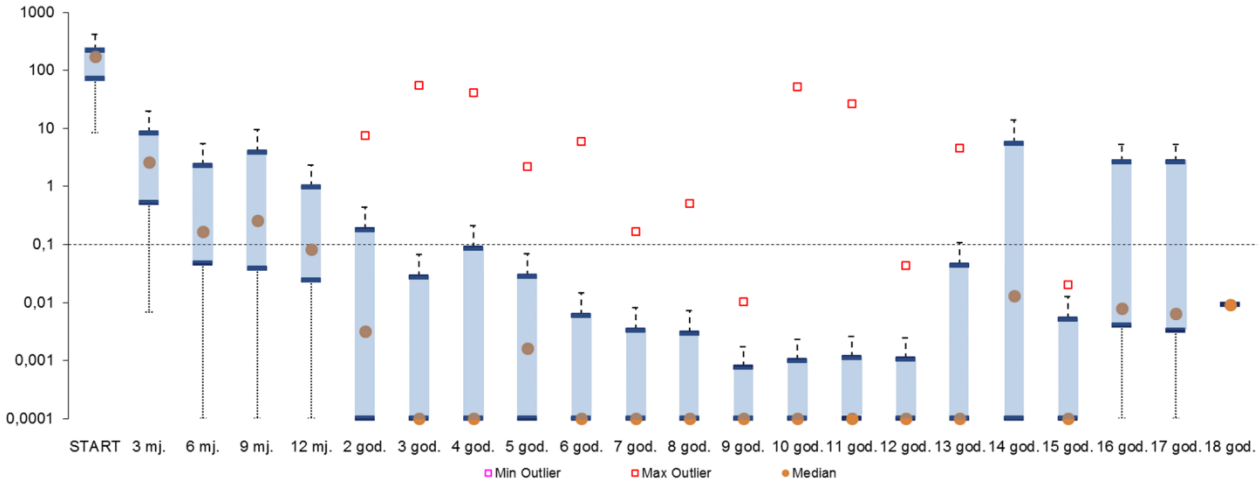
Normalnost distribucije numeričkih varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Numeričke varijable prikazane su kao aritmetička sredina ±standardna devijacija ili kao medijan i interkvartilni raspon (IQR prema eng. Interquartile range) ovisno o normalnosti distribucije. Za usporedbu numeričkih varijabli između grupa bolesnika korišteni su T-test ili Mann Whitney U test gdje je to bilo prikladno. Kategorijske varijable prikazane su kao postoci. Za usporedbu kategorijskih varijabli korišteni su Fisherov test ili X2 test gdje je to bilo prikladno. Vrijeme do postizanja odgovora i vrijeme do promjene terapije analizirani su analizom preživljenja baziranoj na metodi prema Kaplan-Meieru, korišten je log-rank test. Granične vrijednosti za podjelu numeričkih varijabli u kategorije za potrebe analize preživljenja određene su koristeći analizu ROC krivulje. P vrijednosti manje od 0.05 smatrane su statistički značajnima. Za analize su korišteni posebno prilagođena MS Excel radna knjiga te MedCalc statistički program (MedCalc Statistical Software version 17.5.5 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium)).

7. Rezultati

Medijan vremena od postavljanja dijagnoze do početka terapije TKI bio je 1 mjesec, IQR (0.8 - 2). Ukupno 8/56 (14.3%) bolesnika je više od godinu dana čekalo dok započne terapiju s TKI jer je dijagnoza postavljena prije nego su TKI postali dostupni.

Otprilike polovica bolesnika imala je fluktuacije u razini *BCR-ABL* transkripta veće od 0.5 log-a (32/65 (49.2%)). Otprilike trećina bolesnika (35.7%) zahtijevala je promjenu TKI terapije iz prve u drugu generaciju lijekova, i to uglavnom zbog gubitka odgovora (13/20 (65%)).

Na slici 1. prikazana je promjena u razini *BCR-ABL* transkripata, pri čemu start predstavlja vrijeme postavljene dijagnoze KML-a. Većina pacijenata postigla je MMR 12 mjeseci od početka praćenja te MR4 2 godine od početka praćenja. Unutar 3 godine od postavljene dijagnoze većina pacijenata bila je nemjerljiva. Jedna pacijentica nikad nije postigla adekvatan odgovor na liječenje nijednim lijekom iz skupine inhibitora tirozin kinaze. Nakon 13. godine praćenja dolazi do gubitka nemjerljivosti, a kod nekih pacijenata i gubitka MMR.

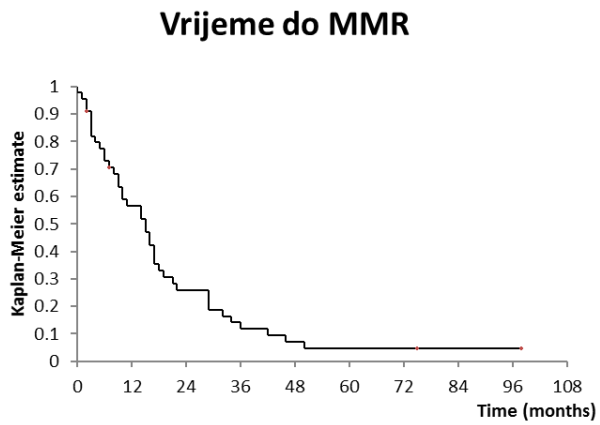


Slika 1.: Razina *BCR-ABL* transkripata

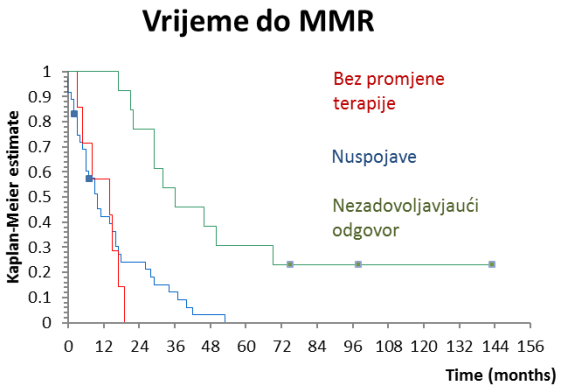
MMR postignut je u 41/45 (91.1%) ispitanika. Medijan vremena do postizanja MMR bio je 15 mjeseci. Prikaz vremena do postizanja MMR dan je na slici 2.

Promjene terapije tijekom liječenja bile su povezane s vremenom do MMR (P<0.001) što je prikazano na slici 3. Bolesnici koji su mijenjali generaciju lijeka zbog nuspojava nisu imali statistički značajnu razliku u vremenu do MMR u odnosu na one koji nisu mijenjali lijek, dok su se oboje statistički značajno razlikovali u odnosu na bolesnike koji su mijenjali generaciju lijeka zbog neadekvatnog odgovora (P<0.001 za obje usporedbe).

Dob, Spol, veličina slezene, broj trombocita, postotak bazofila, eozinofila ili mijeloblasta, fluktuacije mjerenja >0.5 log-a, vrijeme od dijagnoze do početka terapije s TKI, Sokal, Hasford, Eutos i ELTS prognostički sustavi nisu bili značajno povezani s vremenom do postizanja MMR u našoj kohorti bolesnika.



Slika 2. Vrijeme do postizanja MMR



Slika 3. Povezanost promjene terapije tijekom liječenja i vremena do postizanja MMR

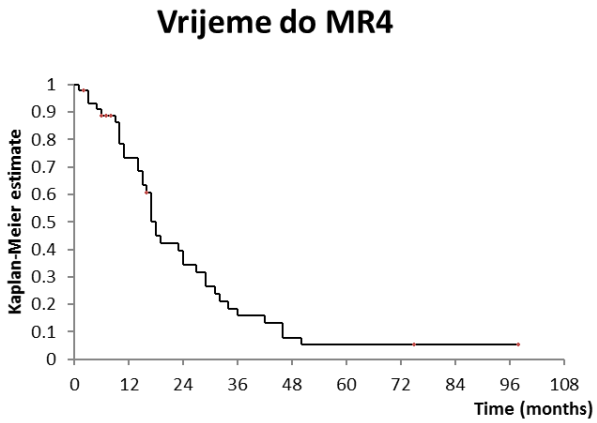
MR4 postignut je u 50/65 (76.9%) ispitanika. Medijan vremena do postizanja MR4 bio je 19 mjeseci. Prikaz vremena do postizanja MR4 dan je na slici 4.

Promjena terapije tijekom liječenja bila je povezana s vremenom do MMR (P<0.001) što je prikazano na slici 5. Bolesnici koji su mijenjali generaciju lijeka zbog nuspojava nisu imali statistički značajnu razliku u vremenu do MMR u odnosu na one koji nisu mijenjali lijek, dok su se oboje statistički značajno razlikovali u odnosu na bolesnike

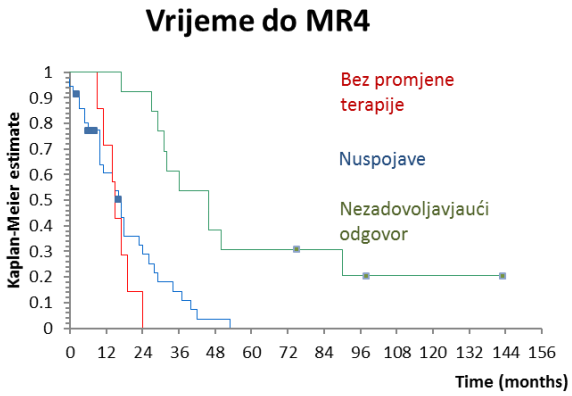
koji su mijenjali generaciju lijeka zbog neadekvatnog odgovora (P<0.001 za obje usporedbe), bolesnici s neadekvatnim odgovorom imali su dulje vrijeme do postizanja MR4.

Veći broj trombocita (P=0.010, HR 2.86) bio je povezan kraćim vremenom do postizanja MR4, što je prikazano na slici 6.

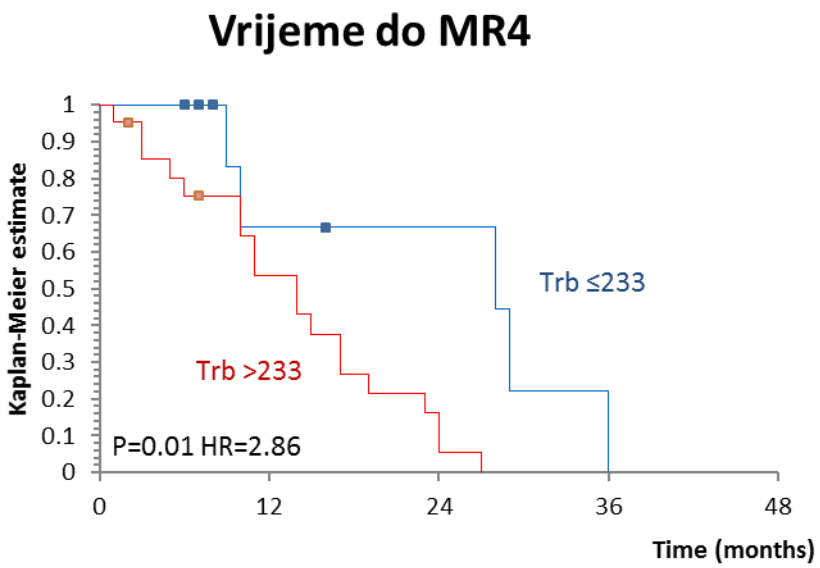
Ostali parametri nisu značajno utjecali na vrijeme do postizanja MR4.



Slika 4. Vrijeme do postizanja MR4



Slika 5. Povezanost promjene terapije tijekom liječenja i vremena do postizanja MMR



Slika 6. Broj trombocita utjecao je na vrijeme do MR4 (P=0.010)

Negativizacija mjerenja postignuta je u 41/65 (63.1%) ispitanika. Medijan vremena do postizanja negativizacije mjerenja bio je 29 mjeseci. Prikaz vremena do postizanja negativizacije dan je na slici 7.

Razlog promjene terapije tijekom liječenja bio je značajno povezan s vremenom do negativizacije (P=0.006) što je prikazano na slici 8, ali za razliku od prethodnih analiza, razlika između podgrupa bolesnika bila je značajna samo za usporedbu između bolesnika koji nisu mijenjali terapiju i onih s nezadovoljavajućim odgovorom (P=0.001, HR 3.0).

Fluktuacija mjerenja <0.5 log-a bila je značajno povezana s duljim vremenom do postizanja negativizacije mjerenja (P<0.001, HR 3.3) što je prikazano na slici 9.

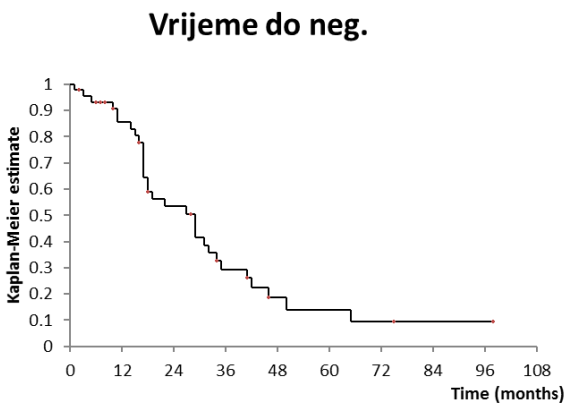
Odgođeno započinjanje TKI bilo je povezano s kraćim vremenom do negativizacije mjerenja (P=0.034, HR 2.43) što je prikazano na slici 10..

Veći broj trombocita bio je povezan kraćim vremenom do negativizacije mjerenja (P=0.021, HR 2.8) što je prikazano na slici 11.

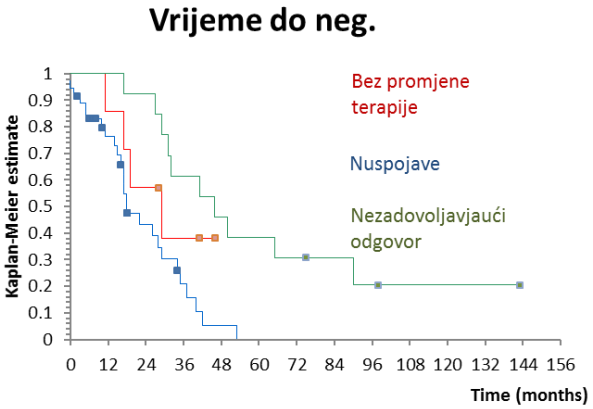
Manji postotak eozinofila bio je povezan s kraćim vremenom do negativizacije mjerenja (P=0.047, HR 3.2) što je prikazano na slici 12.

Iznenađujuće, u našoj kohorti bolesnika niski rizik po Sokal prognostičkom sustavu bio je povezan s duljim vremenom do postizanja negativizacije odgovora u odnosu na visoki rizik (P=0.012, HR 4.25) što je prikazano na slici 13. Slično tome, niski rizik po Hasford prognostičkom sustavu bio je povezan s duljim vremenom do postizanja negativizacije mjerenja (P=0.014, HR 4.94) što je prikazano na slici 14.

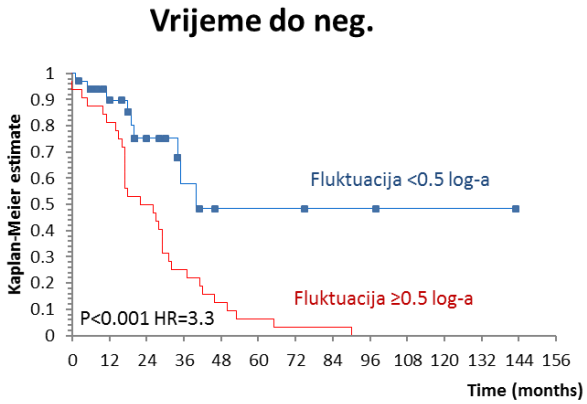
Ostali mjereni parametri nisu značajno utjecali na vrijeme do negativizacije mjerenja.



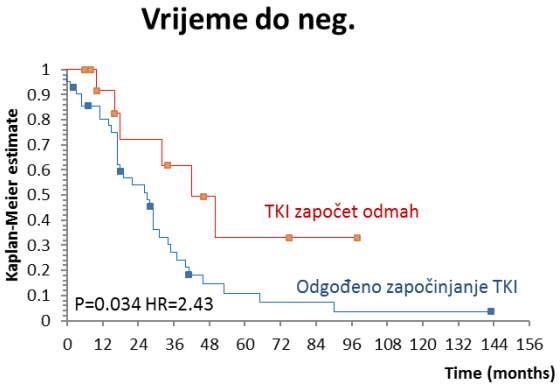
Slika 7. Vrijeme do postizanja nemjerljivosti transkripata



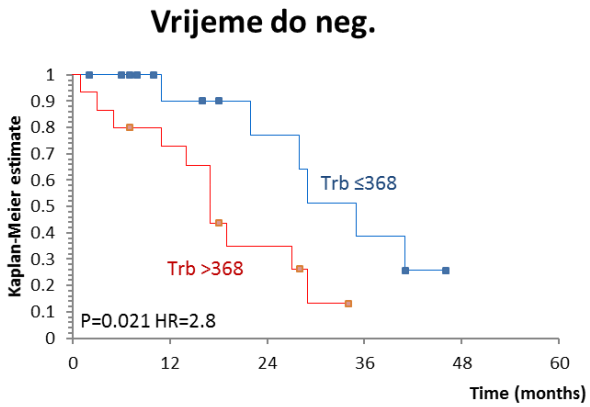
Slika 8. Povezanost promjene terapije tijekom liječenja i vremena do postizanja nemjerljivosti transkripata



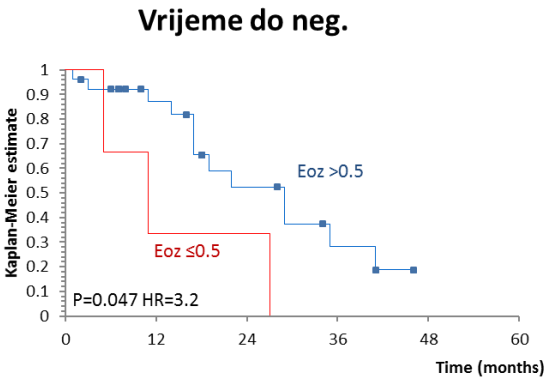
Slika 9. Fluktuacija mjerenja <0.5 log-a bila je povezana s duljim vremenom do postizanja negativizacije mjerenja.



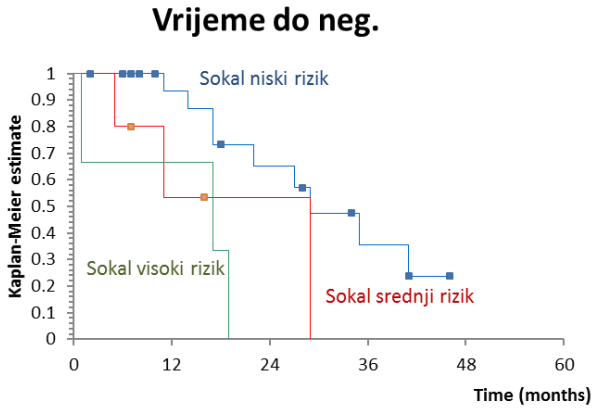
Slika 10. Odgođeno započinjanje TKI povezano je s kraćim vremenom do negativizacije mjerenja.



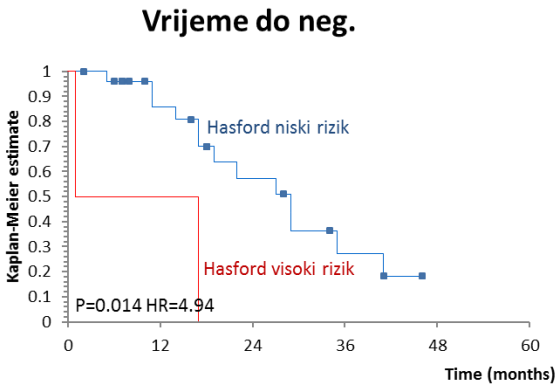
Slika 11. Veći broj trombocita bio je povezan s kraćim vremenom do negativizacije mjerenja.



Slika 12. Manji postotak eozinofila bio je povezan s kraćim vremenom do negativizacije mjerenja.



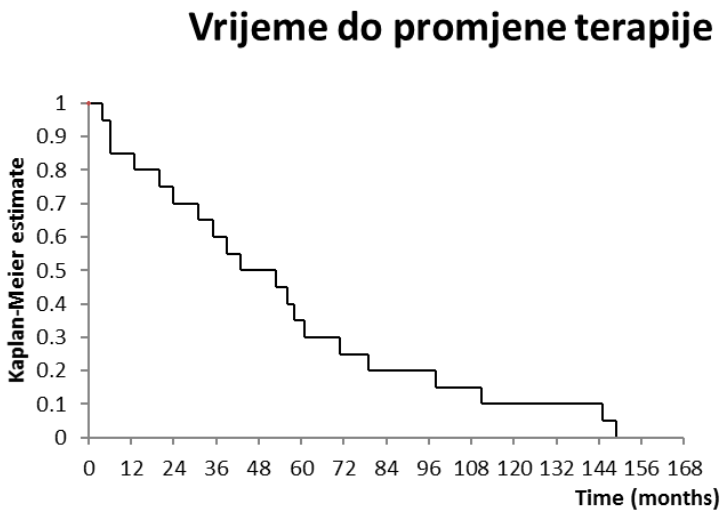
Slika 13. Niski rizik po Sokal prognostičkom sustavu bio je povezan s duljim vremenom do postizanja negativizacije mjerenja u odnosu na visoki rizik.



Slika 14.Niski rizik po Hasford prognostičkom sustavu bio je povezan s duljim vremenom do postizanja negativizacije mjerenja.

Ukupno 20/56 (35.7%) bolesnika promijenilo je generaciju TKI. Medijan vremena do promjene terapije bio je 43 mjeseca. Vrijeme do promjene terapije prikazano je na slici 15.

Ni jedan od mjerenih parametara nije bio statistički značajno povezan s vremenom do promjene terapije.



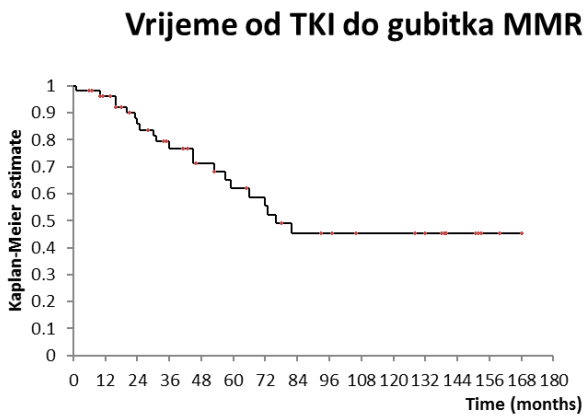
Slika 15. Vrijeme do promjene terapije.

U bolesnika koji su postigli MMR, njih ukupno 55, 21/55 (38.2%) bolesnik je izgubio odgovor tijekom praćenja. Medijan vremena od početka terapije TKI do gubitka MMR bio je 76 mjeseci. Vrijeme od početka TKI do gubitka MMR prikazano je slici 16. Medijan vremena od postizanja MMR do gubitka MMR bio je također 76 mjeseci, vrijeme od postizanja do gubitka MMR prikazano je na slici 17.

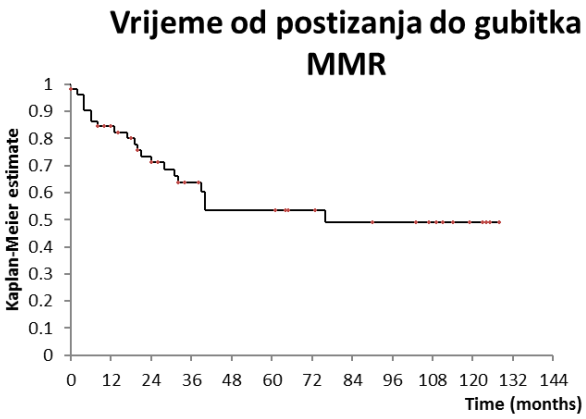
Viša dob je značajno utjecala na kraće vrijeme od TKI do gubitka MMR (P=0.044, HR 2.42) što je prikazano na slici 18, ali ne i na vrijeme od postizanja do gubitka MMR.

Razlog promjene terapije očekivano je utjecao na vrijeme od postizanja do gubitka MMR (bolesnici koji su mijenjali terapiju zbog neadekvatnog odgovora imali su kraće vrijeme do gubitka MMR u odnosnu na one koji nisu mijenjali terapiju P=0.002, HR 4.06, dok nije bilo razlike između onih koji nisu mijenjali terapiju i mijenjali je zbog nuspojava) što je prikazano na slici 19. Isto nije bilo značajno utjecalo na vrijeme od TKI do gubitka MMR.

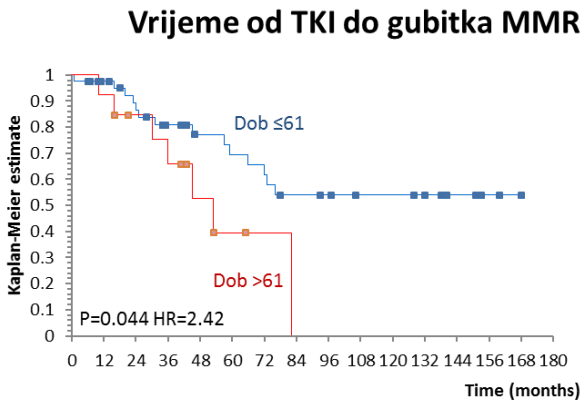
Ostali mjereni parametri nisu značajno utjecali na vrijeme od TKI ili vrijeme od postizanja do gubitka MMR.



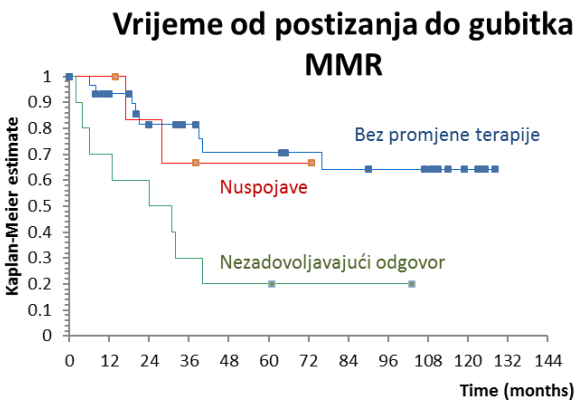
Slika 16. Vrijeme od početka terapije TKI do gubitka MMR.



Slika 17. Vrijeme od postizanja do gubitka MMR.



Slika 18. Dob je utjecala na vrijeme od TKI do gubitka MMR.



Slika 19. Razlog promjene terapije utjecao je na vrijeme od postizanja do gubitka MMR.

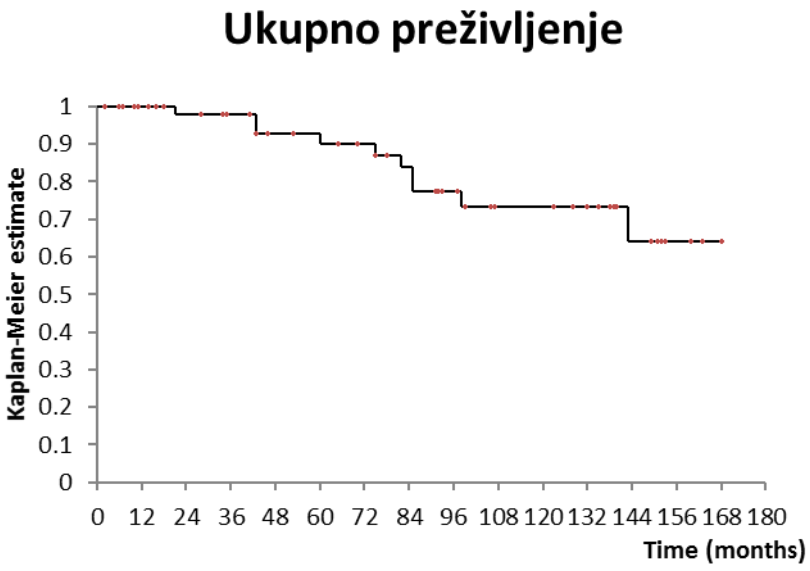
Tijekom praćenja umrlo je 10 bolesnika. Uzroci smrti bili su maligniteti (feokromocitom, karcinom baze jezika, karcinom dojke, karcinom želuca i meningeom), komplikacije šećerne bolesti, srčano zatajenje, sideropenična anemija i tuberkuloza pluća.

Medijan ukupnog preživljenja (OS prema eng. overall survival) nije postignut. OS je prikazan na slici 20.

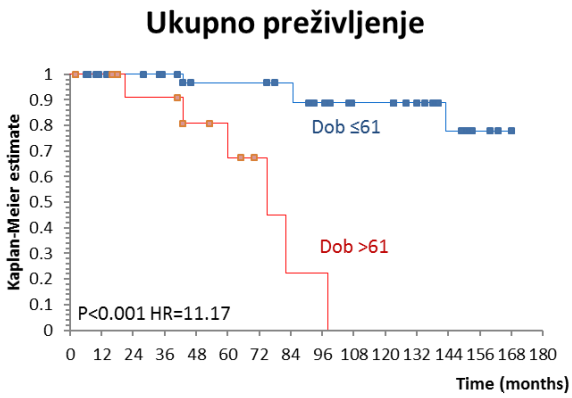
Viša dob (P<0.001, HR 11.17) i viši broj trombocita (P<0.001, HR 31.91) utjecali su na lošije ukupno preživljenje što je prikazano na slici 21 i slici 22.

Sokal (slika 23) i Hasford (slika 24) prognostički sustavi mogli su statistički značajno diskriminirati ukupno preživljenje u našoj kohorti bolesnika.

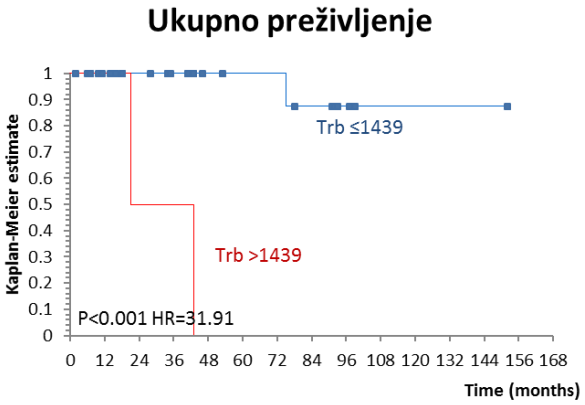
Drugi prognostički skorovi, kao ni postizanje MMR, MR4, negativizacije mjerenja, gubitak MMR, postotak bazofila, eozinofila i mijeloblasta, veličina slezene, kao ni promjena terapije ili fluktuiranje u mjerenjima ≥0.5 log-a nisu utjecali na ukupno preživljenje bolesnika.



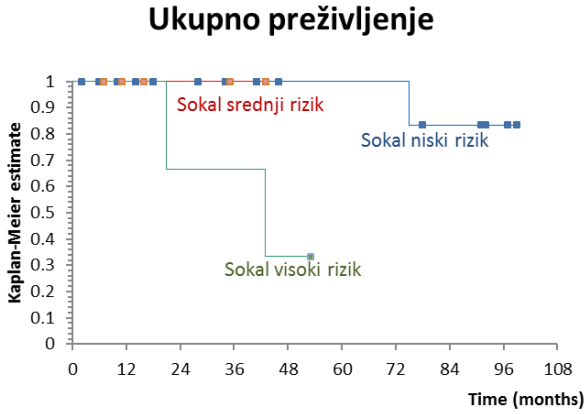
Slika 20. Ukupno preživljenje.



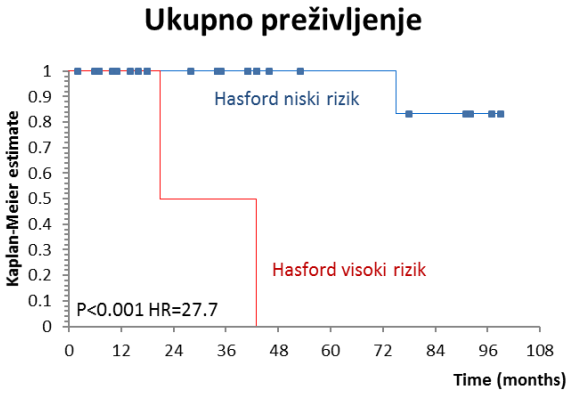
Slika 21. Dob je utjecala na ukupno preživljenje.



Slika 22. Broj trombocita je utjecao na ukupno preživljenje.



Slika 23. Sokal prognostički sustav mogao je diskriminirati grupe rizika u našoj kohorti bolesnika.



Slika 24. Hasford prognostički sustav mogao je diskriminirati grupe rizika u našoj kohorti bolesnika.

8. Rasprava

Mjerenje razine transkripata *BCR-ABL* onkogena temelj je praćenja minimalne ostatne bolesti kronične mijeloične leukemije te odgovora na liječenje s TKI. Danas se postavlja pitanje koliko nisko treba biti postavljena ciljna razina te može li se naposlijetku prestati s terapijom. (Branford, 2016; François Xavier Mahon i sur., 2010; D. M. Ross i sur., 2013).

Naši su rezultati pokazali kako je medijan postizanja MMR 16 mjeseci, medijan postizanja MR4 19 mjeseci, a medijan postizanja nemjerljivosti je 29 mjeseci. Jedna pacijentica nikad nije ni postigla adekvatan odgovor na terapiju nijednim od inhibitora tirozin kinaze te je naposlijetku umrla od kolorektalnog karcinoma. Gubitak MMR u našoj kohorti bio je povezan s većom dobi i s nezadovoljavajućim odgovorom na terapiju. Također nije jasno zašto nakon 13. godine praćenja dolazi do gubitka nemjerljivosti, a kod nekih i gubitka MMR. Utjecaj vjerojatno ima mali broj pacijenata koji se prati toliko dugo.

U našem istraživanju veći broj trombocita bio je povezan s kraćim vremenom do MR4 i negativizacije mjerenja, što se može objasniti time da je kod takvih pacijenata hematopoeza bolja i da imaju bolji odgovor na TKI liječenje. Granice za visoki broj trombocita pri tome nisu granice za trombocitozu, već se su to vrijednosti trombocita u granicama normale. Ipak, izrazito visoki broj trombocita koji je bio zabilježen kod 3 pacijenta povezan je s lošijim ukupnim preživljenjem.

Niži postotak eozinofila povezan je s bržim postizanjem negativizacije, što se također može objasniti time da je bolest manje agresivna, da je hematopoeza bolja te da je bolji odgovor na TKI, a on također doprinosi i nižem riziku po Sokalu i Hasfordu i boljem ukupnom preživljenju.

Odgođeno započinjanje TKI bilo je povezano s kraćim vremenom do negativizacije mjerenja. Ta pojava može biti povezana s liječenjem prije TKI. Naime, imatinib se kao prvi TKI pojavio se na tržištu 2001. godine, a do tad je bolest liječena interferonom. Kako je dio naših pacijenata (8/56, 14,3%) čekao više od jedne godine na početak terapije imatinibom, moguće da je dotad korišteni interferon već uveo pacijente u nemjerljivost.

Veće preživljenje imale su mlađe osobe, na što su utjecali i komorbiditeti kod starijih pacijenata u našoj kohorti. Također smo potvrdili da pacijenti s nižim rizikom po Sokalu i Hasfordu imaju veće ukupno preživljenje, što se slaže s literaturom (Sokal i sur, 1984; Hasford i sur., 1998.)

Fluktuacija razine *BCR-ABL* transkripata za više od 0,5 log prema dosadašnjim istraživanjima povezana je s većim rizikom od relapsa čak i ako je taj porast niži od MMR (Press i sur., 2007). Rezultati našeg istraživanja pokazali su kako fluktuacija za više od 0,5 log nema utjecaja na ukupno preživljenje, a razlog za to može mala kohorta. Ipak, rezultati su pokazali kako je fluktuacija za više od 0,5 log povezana s bržim postizanjem negativizacije.

Zaključno, novi izazov u liječenju i praćenju KML-a pitanje je postizanja nemjerljivosti, tj. koliko dubok treba biti molekularni odgovor. Danas se radi na razvijanju modifikacija qRT-PCR kako bi se sa što većom osjetljivošću pratila minimalna ostatna bolest (Marum & Branford, 2016).

9. Zaključci

1. Fluktuacija za više od 0,5 log povezana je s bržim postizanjem nemjerljivosti razine *BCR-ABL* transkripata.
2. Pacijenti koji po Sokal i Hasford prognostičkim indeksima spadaju u rizičnije kategorije imaju lošije ukupno preživljenje, ali i dulje vrijeme do postizanja nemjerljivosti.
3. Pacijenti koji su mijenjali TKI zbog nezadovoljavajućeg odgovora imali su dulje vrijeme do postizanja MMR, MR4 i nemjerljivosti transkripata, dok oni pacijenti koji su promijenili TKI zbog nuspojava nisu imali statističku značajnu razliku u postizanju MMR, MR4 i nemjerljivosti od onih koji nisu mijenjali terapiju.

10. Zahvale

Zahvaljujem se mom mentoru prof. dr. sc. Rajku Kušecu na uvodu u znanstveni rad i podršci i usmjeravanju tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se i članovima komisije, prof. dr. sc. Vlatku Pejši i prof. dr. sc. Nikoli Đakoviću.

Veliko hvala i dr. Marku Lucijaniću na pomoći i savjetima tijekom izrade ovog rada.

Hvala obitelji i prijateljima na iznimnom strpljenju i podršci.

11. Literatura

1. Baccarani, M. (2006). Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, *108*(6), 1809–1820. https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-005686
2. Baccarani, M., Deininger, M. W., Rosti, G., Hochhaus, A., Soverini, S., Apperley, J. F., … Hehlmann, R. (2013). Review Article European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia : 2013. *Blood*, *122*(6), 872–884. https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-501569.The
3. Baccarani, M., Pileri, S., Steegmann, J. L., Muller, M., Soverini, S., & Dreyling, M. (2012). Chronic myeloid leukemia: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, *23*(SUPPL. 7). https://doi.org/10.1093/annonc/mds228
4. Barnes, D. J., Schultheis, B., Adedeji, S., & Melo, J. V. (2005). Dose-dependent effects of Bcr-Abl in cell line models of different stages of chronic myeloid leukemia. *Oncogene*, 6432–6440. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208796
5. Branford, S. (2016). Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia—how low can you go? *ASH Education Program Book*, *2016*(1), 156–163. https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.156
6. Brümmendorf, T. H., Cortes, J. E., de Souza, C. A., Guilhot, F., Duvillié, L., Pavlov, D., … Gambacorti-Passerini, C. (2015). Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukaemia: Results from the 24-month follow-up of the BELA trial. *British Journal of Haematology*, *168*(1), 69–81. https://doi.org/10.1111/bjh.13108
7. Chereda, B., & Melo, J. V. (2015). Natural course and biology of CML. *Annals of Hematology*, *94*(2), 107–121. https://doi.org/10.1007/s00277-015-2325-z
8. Cilloni, D., & Saglio, G. (2012). Molecular pathways: BCR-ABL. *Clinical Cancer Research*, *18*(4), 930–937. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1613
9. Cortes, J. E., Saglio, G., Kantarjian, H. M., Baccarani, M., Mayer, J., Boqué,

C., … Hochhaus, A. (2016). Final 5-year study results of DASISION: The dasatinib versus imatinib study in treatment-Naïve chronic myeloid leukemia patients trial. *Journal of Clinical Oncology*, *34*(20), 2333–2340. https://doi.org/10.1200/JCO.2015.64.8899

10. Cortes, J. E., Talpaz, M., Giles, F., O'Brien, S., Rios, M. B., Shan, J., … Kantarjian, H. M. (2003). Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood*, *101*(10), 3794–3800. https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2790
11. Deininger, M. W. N., Cortes, J., Paquette, R., Park, B., Hochhaus, A., Baccarani, M., … Guilhot, F. (2007). The prognosis for patients with chronic myeloid leukemia who have clonal cytogenetic abnormalities in Philadelphia chromosome-negative cells. *Cancer*, *110*(7), 1509–1519. https://doi.org/10.1002/cncr.22936
12. Druker, B. J., Sawyers, C. L., Kantarjian, H. M., Resta, D. J., Reese, S. F., Ford, J. M., … Mos. (2001). ACTIVITY OF A SPECIFIC INHIBITOR OF THE BCR-ABL TYROSINE KINASE IN THE BLAST CRISIS OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA AND ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA WITH THE PHILADELPHIA CHROMOSOME, *344*(14), 1038–1042.
13. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. N Engl J Med. 2003 Oct 9;349(15):1451-64. DOI: 10.1056/NEJMra020777
14. Hanfstein, B., Müller, M. C., Hehlmann, R., Erben, P., Lauseker, M., Fabarius, A., … Hochhaus, A. (2012). Early molecular and cytogenetic response is predictive for long-term progression-free and overall survival in chronic myeloid leukemia (CML). *Leukemia*, *26*(9), 2096–2102. https://doi.org/10.1038/leu.2012.85
15. Hasford J, Pfirrmann M, Hehlmann R, Allan NC, Baccarani M, Kluin-Nelemans JC, Alimena G, Steegmann JL, Ansari H. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. J Natl Cancer Inst. 1998 Jun 3;90(11):850-8.

16. Hsu, W. L., Preston, D. L., Soda, M., Sugiyama, H., Funamoto, S., Kodama, K., … Mabuchi, K. (2013). The incidence of leukemia, lymphoma and multiple myeloma among atomic bomb survivors: 1950-2001. *Radiat Res*, *179*(3), 361–382. https://doi.org/10.1667/RR2892.1
17. Hughes, T. P., Saglio, G., Kantarjian, H. M., Guilhot, F., Niederwieser, D., Rosti, G., … Kantarjian, H. M. (2014). Early molecular response predicts outcomes in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase treated with frontline nilotinib or imatinib Early molecular response predicts outcomes in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase treate. *Blood*, *123*(9), 1353–1360. https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-510396
18. Iclusig indication. Retrieved from http://www.iclusig.com/
19. Ismail, S. I., Naffa, R. G., Yousef, A. M. F., & Ghanim, M. T. (2014). Incidence of bcr-abl fusion transcripts in healthy individuals. *Molecular Medicine Reports*, *9*(4), 1271–1276. https://doi.org/10.3892/mmr.2014.1951
20. Jabbour, E., & Kantarjian, H. (2016). Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *American Journal of Hematology*, *91*(2), 252–265. https://doi.org/10.1002/ajh.24275
21. Jabbour, E., Kantarjian, H., Jones, D., Talpaz, M., Bekele, N., O'Brien, S., … Cortes, J. (2006). Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia*, *20*(10), 1767–1773. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404318
22. Jain, P., Kantarjian, H., Patel, K. P., Nogueras Gonzalez, G., Luthra, R., Kanagal Shamanna, R., … Cortes, J. (2016). Impact of BCR-ABL transcript type on response and survival in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *Blood*, *127*(36), 1269–1276. https://doi.org/10.1182/blood-2015-10-674242
23. Kantarjian, H., Jones, D., Shan, J., Borthakur, G., Thomas, D., Kornblau, S., … Cortes, J. (2009). Delayed achievement of cytogenetic and molecular response is associated with increased risk of progression among patients with chronic myeloid leukemia in early chronic phase receiving high-dose or standard-dose imatinib therapy. *Leukemia*, *113*(25), 6315–6321. https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-166694.The

24. Kantarjian, H. M., Talpaz, M., Brien, S. O., Jones, D., Giles, F., Garcia-manero, G., … Cortes, J. (2006). Survival benefit with imatinib mesylate versus interferon- ␣ – based regimens in newly diagnosed chronic-phase chronic myelogenous leukemia. *Survival*, *108*(6), 1835–1840. https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-004325.Supported
25. Khorashad, J. S., De Lavallade, H., Apperley, J. F., Milojkovic, D., Reid, A. G., Bua, M., … Marin, D. (2008). Finding of kinase domain mutations in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia responding to imatinib may identify those at high risk of disease progression. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(29), 4806–4813. https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.9953
26. Lichtman, M. A. (2008). Is There an Entity of Chemically Induced BCR-ABL-Positive Chronic Myelogenous Leukemia? *The Oncologist*, *13*(6), 645–654. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2008-0057
27. Lipton, J. H., Chuah, C., Guerci-Bresler, A., Rosti, G., Simpson, D., Assouline, S., … Deininger, M. W. (2016). Ponatinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukaemia: An international, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, *17*(5), 612–621. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)00080-2
28. Mahon, F. X., & Etienne, G. (2014). Deep molecular response in chronic myeloid leukemia: The new goal of therapy? *Clinical Cancer Research*, *20*(2), 310–322. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1988
29. Mahon, F. X., Réa, D., Guilhot, J., Guilhot, F., Huguet, F., Nicolini, F., … Rousselot, P. (2010). Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *The Lancet Oncology*, *11*(11), 1029–1035. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70233-3
30. Marin, D., Ibrahim, A. R., Lucas, C., Gerrard, G., Wang, L., Szydlo, R. M., … Foroni, L. (2012). Assessment of BCR-ABL1 transcript levels at 3 months is the only requirement for predicting outcome for patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *Journal of Clinical Oncology*, *30*(3), 232–238. https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.6565

31. Marin, D., Milojkovic, D., Olavarria, E., Khorashad, J. S., De Lavallade, H., Reid, A. G., … Apperley, J. F. (2008). European LeukemiaNet criteria for failure or suboptimal response reliably identify patients with CML in early chronic phase treated with imatinib whose eventual outcome is poor. *Blood*, *112*(12), 4437–4444. https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-162388
32. Marum, J. E., & Branford, S. (2016). Current developments in molecular monitoring in chronic myeloid leukemia. *Therapeutic Advances in Hematology*, *7*(5), 237–251. https://doi.org/10.1177/2040620716657994
33. Melo, J. V., & Deininger, M. W. N. (2004). Biology of chronic myelogenous leukemia - Signaling pathways of initiation and transformation. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *18*(3), 545–568. https://doi.org/10.1016/j.hoc.2004.03.008
34. O'Hare, T., Deininger, M. W. N., Eide, C. A., Clackson, T., & Druker, B. J. (2011). Targeting the BCR-ABL signaling pathway in therapy-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Clinical Cancer Research*, *17*(2), 212–221. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-3314
35. Pfirrmann, M., Baccarani, M., Saussele, S., Guilhot, J., Cervantes, F., Ossenkoppele, G., … Simonsson, B. (2016). *Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia*. *Leukemia* (Vol. 30). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/leu.2015.261
36. Press, R. D., Galderisi, C., Yang, R., Rempfer, C., Willis, S. G., Mauro, M. J., … Deininger, M. W. N. (2007). A half-log increase in BCR-ABL RNA predicts a higher risk of relapse in patients with chronic myeloid leukemia with an imatinib-induced complete cytogenetic response. *Clinical Cancer Research*, *13*(20), 6136–6143. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1112
37. Redaelli, A., Bell, C., Casagrande, J., Stephens, J., Botteman, M., Laskin, B., & Pashos, C. (2004). Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous leukemia. *Expert Review of Anticancer Therapy*, *4*(1), 85–96. https://doi.org/10.1586/14737140.4.1.85
38. Ross, D. M., Branford, S., Seymour, J. F., Schwarer, A. P., Arthur, C., Yeung, D. T., … Hughes, T. P. (2013). Safety and ef fi cacy of imatinib cessation for

CML patients with stable undetectable minimal residual disease : results from the TWISTER study. *Blood*, *122*(4), 515–523. https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-483750.The

39. Ross, T. S., & Mgbemena, V. E. (2014). Re-evaluating the role of BCR/ABL in chronic myelogenous leukemia. *Molecular & Cellular Oncology*, *1*(3), e963450. https://doi.org/10.4161/23723548.2014.963450
40. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE, Tso CY, Braun TJ, Clarkson BD, Cervantes F, i sur. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. Blood. 1984 Apr;63(4):789-99.
41. Soupir, C. P., Vergilio, J. A., Dal Cin, P., Muzikansky, A., Kantarjian, H., Jones, D., & Hasserjian, R. P. (2007). Philadelphia chromosome-positive acute myeloid leukemia: A rare aggressive leukemia with clinicopathologic features distinct from chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis. *American Journal of Clinical Pathology*, *127*(4), 642–650. https://doi.org/10.1309/B4NVER1AJJ84CTUU
42. Soverini, S., Colarossi, S., Gnani, A., Rosti, G., Castagnetti, F., Poerio, A., … Martinelli, G. (2006). Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: By the GIMEMA working party on chronic myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research*, *12*(24), 7374–7379. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1516
43. Verstovsek, S., Lin, H., Kantarjian, H., Saglio, G., De Micheli, D., Pane, F., … Arlinghaus, R. B. (2002). Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: Low levels of p230 BCR/ABL mRNA and undetectable p230 BCR/ABL protein may predict an indolent course. *Cancer*, *94*(9), 2416–2425. https://doi.org/10.1002/cncr.10490
44. Walker B.R, Colledge N.R., Ralston S.H., Penman I.D. Davidson Principles and Practice of Medicine, 22nd edition, Elsevier, 1039-1040. ISBN-13: 978-0-7020-5047-3

12. Životopis

Rođena sam u Splitu 9.2.1993. godine. Osnovnu školu i opću gimnaziju završila sam u Trogiru te sam upisala Medicinski fakultet u Zagrebu 2011. godine. Za vrijeme fakulteta bila sam demonstrator iz kolegija Klinička propedeutika pri Zavodu za bolesti srca i krvnih žila KB Dubrava i demonstrator iz kolegija Pedijatrija pri Zavodu za intezivnu medicinu KBC Zagreb. Član sam Studentske sekcije za pedijatriju. Služim se engleskim i talijanskim jezikom.