

Молекулярный мониторинг у пациентов с хроническим миелолейкозом: корреляция с цитогенетическим ответом, прогностическое значение, оценка ответа на терапию

Е.В. Аксенова, А.А. Крутов, И.Н. Солдатова, Е.Ю. Чельшева, А.Г. Туркина, Н.Д. Хорошко, А.В. Мисюрин

ГУ РАМН «Гематологический научный центр РАМН»

Реферат. Молекулярный мониторинг экспрессии *BCR-ABL* является обязательным атрибутом контроля лечения хронического миелолейкоза. Достижение большого молекулярного ответа признано важным прогностическим фактором и показателем успешной терапии ингибиторами тирозинкиназ. Целью исследования было дать оценку молекулярного мониторинга, проводимого в течение 5 лет в реальных клинических условиях в ГНЦ РАМН у пациентов на терапии иматинибом. Показана зависимость между уровнями цитогенетического и молекулярного ответов, неоднородность пациентов с полным цитогенетическим ответом (ПЦО) по уровню экспрессии *BCR-ABL*. Значение экспрессии 1% (IS) у пациентов с ПЦО является границей для сохранения цитогенетического ответа. Уровень экспрессии *BCR-ABL* на ранних сроках терапии иматинибом имеет прогностическое значение. Изменения экспрессии и цитогенетический ответ согласуются между собой, динамика экспрессии адекватно отражает динамику заболевания.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, молекулярный мониторинг, экспрессия *BCR-ABL*, иматиниб

Molecular monitoring in CML patients: correlation with cytogenetic response, prognostic significance, assessment of therapy response

E.V. Aksenova, A.A. Krutov, I.N. Soldatova, E.Yu. Chelysheva, A.G. Turkina, N.D. Khoroshko, A.V. Misyurin

Hematology Research Center of RAMS, Moscow

Summary. Modern treatment options for the chronic myeloid leukemia require the regular performance of molecular monitoring of the *BCR-ABL* expression level by means of the Real Time PCR. Achievement of the major molecular response (MMR) is considered to be a prominent hallmark of the successful therapy with the inhibitors of tyrosine kinase activity and a very important prognostic factor. Our aim was to report the data of molecular monitoring of *BCR-ABL* gene expression in CML patients treated with imatinib during the 5 years experience of this work in the real clinical conditions of the Research Center for Hematology (Moscow, Russia). The strict correlation between cytogenetic and molecular data was shown and unevenness of CML patients in complete cytogenetic response (CCR) when they were analyzed in the terms of molecular response. We found it out that 1% IS was a threshold that shouldn't be exceeded to keep cytogenetic response for a long time of observation. The level of *BCR-ABL* expression at the start of imatinib treatment had a great prognostic significance. All changes in cytogenetic and molecular data showed the same trend and their dynamics adequately reflected evolution of disease.

Keywords: CML, molecular monitoring, *BCR-ABL* expression, imatinib

e.aletris@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время основными методами мониторинга заболевания при хроническом миелолейкозе (ХМЛ) являются цитогенетическое определение содержания Ph-позитивных клеток в костном мозге и молекулярное измерение уровня транскрипта гена *BCR-ABL*. Цитогенетическое исследование применяется наиболее широко. Для определения цитогенетического ответа оценивается количество Ph-позитивных клеток по отношению к числу клеток, не несущих Ph хромосомы, количество исследуемых метафаз при этом должно быть не менее 20. Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) обладает более высокой чувствительностью, чем метод стандартной цитогенетики, и в нем анализируется большее количество клеток (более 200). Однако недостатком этого метода является наличие базового уровня ложно-положительных результатов, что ограничивает его применение. Наиболее чувствительным из всех применяемых методов мониторинга ХМЛ является количественное определение экспрессии гена *BCR-ABL* методом полимеразной цепной реакции в настоящем времени [1,2,3].

Молекулярный мониторинг приобрел особую значимость в связи с внедрением в клиническую практику ингибиторов тирозинкиназ, первым из которых явился иматиниб. При терапии ингибиторами тирозинкиназ большая часть пациентов в хронической фазе (ХФ) достигает полного цитогенетического ответа, и дальнейшее отслеживание динамики опухолевого клона цитогенетическими методами становится невозможным [4]. Огромную роль в доказательстве важности молекулярного мониторинга при терапии ХМЛ ингибиторами тирозинкиназ внесло исследование IRIS (International Randomized Study of Interferon versus STI571). В этом международном исследовании были определены основные параметры молекулярного ответа – базовая линия и большой молекулярный ответ. Базовая линия – это значение медианы экспрессии у первичных пациентов, а большой молекулярный ответ (БМО) – это уменьшение экспрессии *BCR-ABL* на три порядка от базовой линии. Было доказано, что БМО является важным прогностическим фактором и показателем успешной терапии иматинибом [5,6]. Сейчас понятия базовой линии и большого молекулярного ответа используются в координатах международной шкалы (International Scale, IS). В этой универсальной шкале результатам молекулярного мониторинга базовой линии соответствует значение 100%, а значению БМО соответствует показатель 0,1%, при этом экспрессия определяется как соотношение *BCR-ABL*/контрольный ген $\times 100\%$. Для представления результатов в формате международной шкалы для каждой лаборатории, использующей свой метод молекулярного мониторинга *BCR-ABL*, вычисляется фактор конверсии. Это коэффициент, умножение на который

переводит значение экспрессии *BCR-ABL*, полученное в лаборатории, в значение международной шкалы [7-9].

На основании результатов исследования IRIS группа европейских клиницистов определила современную концепцию лечения ХМЛ, включающую оценку молекулярного ответа [7,8,10]. На сегодняшний день молекулярный мониторинг экспрессии *BCR-ABL* является обязательным атрибутом контроля результатов лечения ХМЛ у пациентов, получающих терапию иматинибом и ингибиторами тирозинкиназ 2-й линии. Достижение БМО включено European Leukemia Net (ELN) в параметры оценки ответа на терапию. Достижение БМО к 18 месяцам терапии иматинибом в дозе 400 мг у пациентов в ранней ХФ является критерием оптимального ответа, пациенты, не достигшие БМО к этому сроку, относятся к категории имеющих субоптимальный ответ. Отсутствие БМО к 12 месяцам терапии или возрастание уровня транскрипта *BCR-ABL* рассматривается как предостережение. Для терапии дазатинибом и нилотинибом как препаратами второй линии после неудачи терапии иматинибом оптимальным ответом признано достижение БМО к 12 месяцам [11,12].

Было показано, что существует явная корреляция между молекулярным ответом по международной шкале и цитогенетическим ответом. Значение экспрессии *BCR-ABL* в периферической крови от 1% до 10% соответствует большому цитогенетическому ответу в 98% случаев, а значение экспрессии 1% и менее в 96% случаев соответствуют полному цитогенетическому ответу (ПЦО). Были продемонстрированы также значимые различия в медианах уровня транскрипта *BCR-ABL* у пациентов с разным уровнем ЦО [13].

Считается, что молекулярный мониторинг экспрессии *BCR-ABL* наиболее необходим после достижения ПЦО, в этом случае он является наиболее чувствительным и информативным методом для отслеживания статуса пациента и остаточной болезни [14].

Полагают также, что цитогенетический анализ имеет ограниченную значимость для пациентов с БМО, так, ни у одного из таких пациентов австралийские исследователи не обнаружили цитогенетических аномалий [13]. Некоторые исследователи считают, что мониторинг экспрессии *BCR-ABL* может заменить цитогенетический мониторинг с самого начала терапии, но эта точка зрения является предметом обсуждения [6,15]. Однако в случаях, когда цитогенетический анализ оказывается неэффективным из-за отсутствия достаточного количества метафаз или этот анализ недоступен, ПЦР в реальном времени необходим у пациентов на начальных этапах терапии, в том числе и для примерной оценки цитогенетического статуса [16].

Существует достаточно много данных о том, что достижение молекулярного ответа имеет прогностическое значение. Уровень транскрипта на ранних этапах терапии (1-3 месяца)

коррелирует с достижением БЦО на 6 месяцев терапии иматинибом [17,18]. Пациенты, достигшие БМО к 6 или 12 месяцам терапии или одновременно с достижением ПЦО, демонстрировали значительно более длительную продолжительность ПЦО, чем пациенты, не достигшие молекулярного ответа [19-21]. Достижение БМО к 18 месяцам терапии значительно уменьшает риск прогрессии заболевания, что отражается в значительно меньшей вероятности потери ПЦО [22,23].

Уровень молекулярного ответа на ранних стадиях терапии позволяет прогнозировать прогрессию заболевания. В рамках исследования IRIS было продемонстрировано, что если к 3 месяцам терапии иматинибом снижение уровня транскрипта *BCR-ABL* составило менее 1 порядка, то риск возникновения резистентности составляет 83%, а вероятность достижения БМО – 13% к 30 месяцам терапии. При снижении уровня транскрипта на величину от 1 до 2 порядков риск резистентности составляет 5%, вероятность достижения БМО – 69%, а при снижении более чем на 2 порядка риск резистентности составляет 0% и вероятность достижения БМО - 100% к 30 месяцам терапии [6].

Считается, что увеличение уровня транскрипта *BCR-ABL* может служить ранним индикатором последующей потери ответа на терапию. Было показано, что двукратное увеличение уровня транскрипта коррелирует с наличием мутаций в гене *BCR-ABL* и развитием вторичной резистентности [24,25]. Однако в различных исследованиях приводятся разные значения увеличения уровня транскрипта, которые ассоциируются с высокой вероятностью детекции мутаций или вероятностью возникновения рецидива – двукратное увеличение, увеличение на 0,5 log или на 1 log [26-29]. По данным исследователей из Техасского университета, пациентами с наибольшим риском потери ПЦО являются пациенты, потерявшие БМО или никогда его не достигавшие, у которых увеличение уровня транскрипта *BCR-ABL* составило более 1 log [30].

Таким образом, на настоящий момент в официальных рекомендациях по мониторингу молекулярного ответа признано только достижение БМО на 18 месяцев терапии иматинибом как критерий оптимального ответа. Значение молекулярного ответа на более ранних и более поздних сроках заболевания остается предметом обсуждения, несмотря на довольно большое количество публикаций по этому поводу. Не вполне понятной является и корреляция молекулярного и цитогенетического ответов, роль молекулярного мониторинга у пациентов без ПЦО, возможность принятия клинических решений на основании только данных молекулярной диагностики. Возможно, не существует прямой взаимосвязи между степенью цитогенетического ответа и уровнем экспрессии *BCR-ABL*, поскольку экспрессия в клетках регулируется на разных уровнях и может быть неодинаковой у разных пациентов. Остается актуальным и вопрос, какое увеличение

уровня транскрипта следует считать значимым для внепланового проведения уточняющего цитогенетического анализа, мутационного анализа или изменения терапии.

Целью нашего исследования было дать оценку молекулярного мониторинга, проводимого в реальных клинических условиях в ГНЦ РАМН у пациентов, получающих терапию иматинибом в течение 5 лет. Для многих врачей-гематологов информационная ценность результатов молекулярного анализа является ограниченной, остается не вполне понятным, что означает конкретный уровень экспрессии в данный момент терапии и какие шаги следует предпринимать. Мы хотели прояснить вопросы зависимости цитогенетического и молекулярного ответов между собой, определить возможную прогностическую роль молекулярной диагностики на разных этапах терапии, понять, какой уровень транскрипта может быть значимым для принятия клинических решений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 213 пациентов в ХФ ХМЛ при терапии иматинибом, которые наблюдались в ГНЦ РАМН. Медиана возраста на момент диагноза составила 40,5 года (9-68 лет). Срок наблюдения (время от даты установления диагноза до даты последнего молекулярного анализа) варьировал от 5 до 244 месяцев, медиана - 84 месяца. У 106 пациентов терапия иматинибом была начата в поздней хронической фазе после неудачи терапии интерфероном α . Время от установления диагноза до начала терапии иматинибом колебалось от 12 до 143 месяцев, медиана - 35,5 месяцев. В ранней хронической фазе начата терапия иматинибом 107 пациентам, у 78 из них время от установления диагноза до начала терапии не превышало 6 месяцев. Доза иматиниба составляла от 400 до 800 мг. Смена терапии иматинибом на терапию ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) 2 линии наблюдалась у 50 пациентов.

Молекулярная диагностика проводилась в 2005-2009 гг. Сроки проведения молекулярной диагностики определялись лечащим врачом пациента. Частота молекулярного мониторинга составляла 1-4 раза в год, в среднем 1,6 раза в год за 1-5 год лечения. У 39 пациентов молекулярный анализ на терапии иматинибом был проведен однократно, у 26 из них этот единственный анализ был сделан при смене терапии. Молекулярная диагностика начинала проводиться у пациентов в разные сроки терапии иматинибом. После 1.01.2005 начали терапию иматинибом 65 пациентов (30,5% от общего числа), т. е. только у этих пациентов молекулярный мониторинг мог осуществляться от начала терапии.

В качестве материала для анализа использовалась в основном периферическая кровь в объеме 10 мл. Выделение РНК, реакция обратной транскрипции и ПЦР в реальном

времени проводились по стандартной методике с использованием тест-систем производства ООО «Генотехнология», Россия. Тест-системы были разработаны на основе рекомендаций программы ЕАС по количественному мониторингу экспрессии химерных онкогенов [31]. ПЦР в реальном времени проводилась на приборе IQ-Cycler производства компании Bio-Rad с использованием технологии TaqMan. В реакции определялась экспрессия гена *BCR-ABL* типа p210 для обоих вариантов транскрипта (b2a2 и b3a2), в качестве контрольного гена использовались гены *β2 микроглобулина* (до апреля 2007 года) и *ABL*. Для каждого образца крови ПЦР в реальном времени проводилась в трех повторах для гена *BCR-ABL* и для контрольного гена.

Чувствительность метода по разведениям клеточных линий составила 0,01%, по разведениям РНК первичного пациента ХМЛ РНК здорового донора 10^{-4} , воспроизводимая чувствительность по контрольным плазмидам составила 10 копий/мкл (CV%=1,86). Метод стандартизован по международной шкале, все результаты представлены в формате международной шкалы (IS). Лаборатория является референсной по России [32].

Для статистического анализа использовались χ^2 критерий Пирсона для связанных таблиц, коэффициент ранговой корреляции Спирмена, критерии Манн-Уитни и Краскала-Уоллиса. Использовалась также описательная статистика: медиана, диапазон.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнение значений цитогенетического и молекулярного ответа

Сравнение данных молекулярного и цитогенетического ответов проводилось на 274 образцах крови пациентов, у которых оба анализа были выполнены одновременно. Образцы были разделены на группы, соответствующие уровню цитогенетического ответа (ЦО). Группа с отсутствием ЦО состояла из 29 образцов, с минимальным ЦО – 16, с малым ЦО – 18, с частичным ЦО – 43, с ПЦО – из 168 образцов.

Разброс значений экспрессии *BCR-ABL* в каждой группе был очень широким, но в целом он уменьшался по мере снижения процентного содержания Ph-позитивных клеток. Медиана экспрессии также уменьшалась, от 88,53 в группе с отсутствием ответа, до 0,07 в группе с ПЦО (табл. 1). Соотношение долей образцов с разным уровнем экспрессии *BCR-ABL* заметно отличалось в группах с разным ЦО. С уменьшением процентного содержания Ph-позитивных клеток, увеличивалась доля образцов с более слабым уровнем экспрессии. В группе с отсутствием ЦО 10,34% образцов (3 из 29) имели экспрессию от 1% до 10%, для остальных 89,66% (26 из 29) экспрессия была выше 10%. В группе с минимальным ЦО экспрессия от 1% до 10% наблюдалась в 18,75% случаев (3 из 16),

экспрессия выше 10% – в 81,25% (13 из 16). В группе с малым ЦО 5,56% образцов (1 из 18) имели экспрессию *BCR-ABL* от 0,1% до 1%, и столько же – 5,56% - экспрессию от 0 до 0,1%, в 11,1% (2 из 18) наблюдалась экспрессия от 1% до 10%, в остальных 77,78% образцов (14 из 18) – экспрессия выше 10%. В группе с частичным ЦО 9,3 % (4 из 43) образцов имели экспрессию, равную нулю, 2,33% (1 из 43) - экспрессию от 0 до 0,1%, 11,63% (5 из 43) - экспрессию от 0,1% до 1%, 41,86% (18 из 43) – экспрессию от 1% до 10%, и 34,88% (15 из 43) – экспрессию выше 10%. В группе с ПЦО 38,1% (64 из 168) образцов имели экспрессию, равную нулю, 16,1% (27 образцов) экспрессию от 0 до 0,1%, 24,4% (41 образец) экспрессию от 0,1% до 1%, 12,5% (21 образец) -экспрессию от 1% до 10%, 8,9% (15 образцов) экспрессию выше 10% (рис. 1).

Таким образом, образцы с высокими значениями экспрессии *BCR-ABL* (>10%) имеются во всех группах, в том числе и в группе пациентов с ПЦО, но их доля в этой группе не превышает 9%. Отдельные пациенты с низким уровнем экспрессии (БМО, IS<0,1%) имеются уже в группах с малым и частичным ЦО, в группе с частичным ЦО есть также пациенты с отсутствием экспрессии *BCR-ABL*. Доля образцов пациентов с БМО и ПМО значительно возрастает в группе с ПЦО, где составляет более 50%. Группа пациентов с ПЦО неоднородна по уровню экспрессии *BCR-ABL*.

Сравнительный анализ данных цитогенетического и молекулярного ответов подтвердил наличие положительной корреляции между процентным содержанием Ph-позитивных клеток и уровнем экспрессии *BCR-ABL*. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена для этих параметров составил 0,713 ($p<0,0001$). Мы проанализировали взаимосвязь между цитогенетическим ответом в трех группах (отсутствие большого цитогенетического ответа – Ph+ более 35%, частичный ЦО и ПЦО) и распределением по уровню экспрессии *BCR-ABL* в каждой из них. При попарном сравнении групп по критерию Манн-Уитни было показано, что существуют значимые различия по медиане и среднему между этими группами ($p<0,0001$), т.е. эти группы не относятся к одной генеральной совокупности. По критерию Краскала-Уоллиса эти три группы также отличались друг от друга с высоким уровнем значимости ($p<0,0001$).

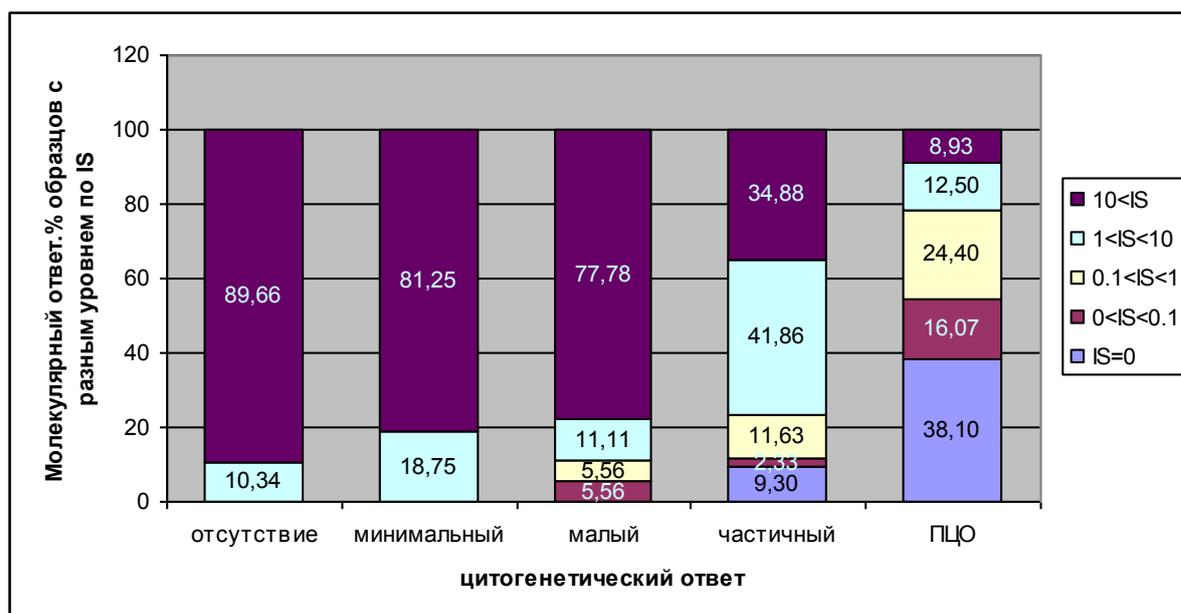
На основании этих же данных мы определили, что уровню экспрессии *BCR-ABL* $\leq 1\%$ в 91,4% случаев соответствует ПЦО, а уровню экспрессии от 1 до 10% в 82,4% случаев соответствует БЦО.

Таблица 1. Разброс и медиана экспрессии *BCR-ABL* в группах пациентов с разным цитогенетическим ответом

ЦО	Ph+	число	экспрессия <i>BCR-ABL</i> , IS
----	-----	-------	--------------------------------

		образцов		
		всего 274	диапазон(квартили 25 -75%)	медиана
отсутствие	96-100%	29	55,7-134,9	88,53
минимальный	66-95%	16	20,4-64,1	36,74
малый	36-65%	18	14,5-120,1	58,24
частичный	1-35%	43	1,3-21,2	6,10
полный	0%	168	0-0,8	0,07

Рис. 1. Распределение по уровню молекулярного ответа в группах с разным цитогенетическим ответом



Значение разного уровня экспрессии *BCR-ABL* у пациентов с ПЦО.

Поскольку у пациентов с ПЦО наблюдается разный уровень экспрессии *BCR-ABL*, мы попытались оценить, как влияет этот уровень в разных временных точках на дальнейшее течение заболевания. Пациенты после 12, 18 и 24 месяцев терапии иматинибом, достигшие к этому моменту ПЦО, были разделены на группы по уровню молекулярного ответа: 1) экспрессия $\leq 0,1\%$ (БМО); 2) экспрессия от 0,1% до 1%; 3) экспрессия выше 1%. В каждой группе оценивалась потеря ПЦО у пациентов при дальнейшей терапии. На 12 месяцев терапии иматинибом был исследован 21 пациент с ПЦО. Из 11 пациентов с экспрессией *BCR-ABL* $\leq 0,1\%$, 3 в дальнейшем потеряли ПЦО, у одного из этих пациентов потеря зафиксирована в течение года после исследования, у другого – в течение двух лет, у обоих этих пациентов зафиксированы перерывы в терапии. У третьего пациента потеря ПЦО произошла через 26 месяцев после исследования, сведений о перерывах в терапии для этого пациента нет. Из 6 пациентов с экспрессией от 0,1% до 1% потеря ПЦО

наблюдалась у 3, у одного потеря произошла через 13 месяцев после исследования, у двух пациентов – более чем через 3 года. Из 4 пациентов с экспрессией выше 1% 2 потеряли ПЦО, один через 5 месяцев, другой – через 4 года. У 1 пациента из этой группы, у которого не проводилось дальнейшее цитогенетическое исследование, наблюдалась потеря гематологического ответа. Между всеми тремя группами значимых различий обнаружено не было, но при объединении двух групп с экспрессией $>0,1\%$ в одну наблюдались достоверные различия между ней и группой с экспрессией $\leq 0,1\%$ ($p < 0,05$). Таким образом, на срок 12 месяцев терапии пациенты, достигшие БМО, значительно отличаются от пациентов, не достигших БМО, по параметру дальнейшей потери ПЦО.

После 18 месяцев терапии иматинибом было исследовано 29 пациентов с ПЦО. Из 18 пациентов с экспрессией *BCR-ABL* $\leq 0,1\%$ ПЦО в дальнейшем потеряли 5 пациентов, один – вскоре после исследования, двое – больше чем через год, двое – более чем через три года после исследования. Из 9 пациентов с экспрессией от 0,1% до 1% потеря ПЦО наблюдалась у 3, у всех в течение года после исследования. Экспрессия выше 1% наблюдалась у 2 пациентов, оба они в дальнейшем потеряли ПЦО. Не было найдено значимых различий между группами ни изначально, ни при каких-либо вариантах их объединения.

После 24 месяцев терапии иматинибом был исследован 31 пациент с ПЦО. Из 22 пациентов с экспрессией *BCR-ABL* $\leq 0,1\%$ ПЦО в дальнейшем потеряли 4 пациента, у всех потеря наблюдалась более чем через 2 года после исследования. Из 3 пациентов с экспрессией от 0,1% до 1%, потеря ПЦО наблюдалась у 2, у одного через 4 месяца после исследования, у второго – более чем через 4 года. Из 6 пациентов с экспрессией выше 1% ПЦО потеряли 2, оба в течение года после исследования, у одного пациента наблюдалась прогрессия заболевания, цитогенетическое исследование ему не проводилось. Значимых различий между группами обнаружено не было ни изначально, ни при каких-либо вариантах их объединения.

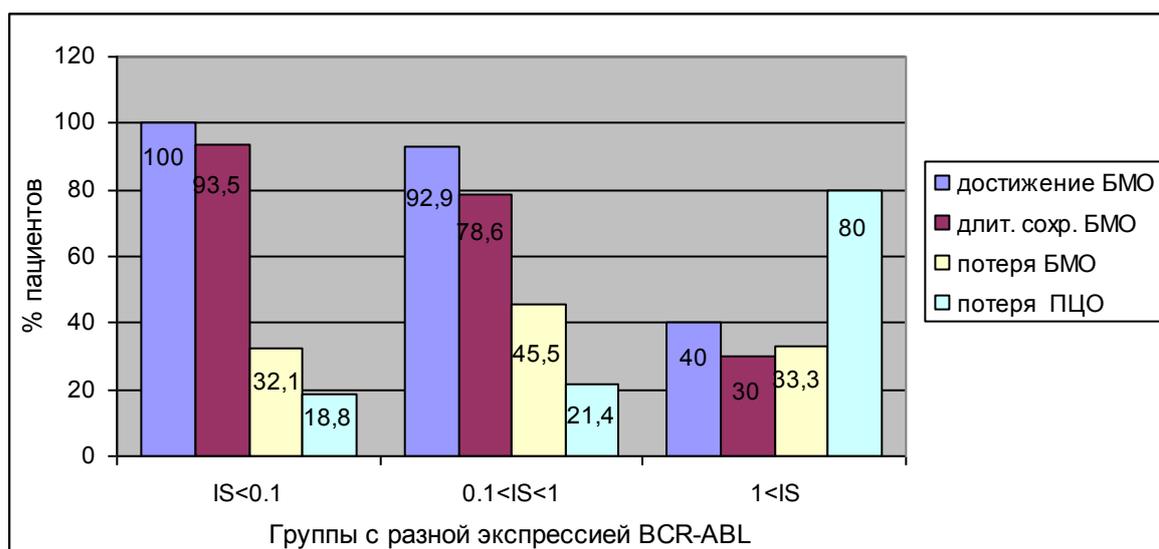
Чтобы полнее оценить значимость уровня молекулярного ответа у пациентов с ПЦО на более поздних сроках терапии иматинибом, мы исследовали пациентов с ПЦО в сроки терапии от 24 до 60 месяцев. От 56 пациентов 79 образцов были разделены на три группы по уровню экспрессии *BCR-ABL*. В каждой группе оценивалось достижение БМО на терапии иматинибом, длительное сохранение БМО, потеря БМО и потеря ПЦО. Достижение БМО учитывалось при любом сроке терапии иматинибом, под длительным сохранением БМО подразумевалось наличие БМО как минимум в двух последовательных анализах. Доля потерявших БМО определялось по отношению к числу пациентов,

достигших БМО в этой группе, пациенты, у которых не было сведений о потере БМО, не учитывались при подсчете.

В группе с экспрессией $\leq 0,1\%$, которая составила 32 пациента, все пациенты достигли БМО, 29 (93,5%) длительно сохраняли БМО, потеря БМО наблюдалась у 9 пациентов (32,1% от числа достигших БМО, у 4 нет данных о потере БМО). Потеря ПЦО в этой группе наблюдалась у 6 пациентов (18,8%), при этом только 1 потерял ПЦО в течение года после исследуемой временной точки, в течение 2 лет ПЦО потеряли 2 пациента. В группе с экспрессией *BCR-ABL* от 0,1% до 1% из 14 пациентов 13 (92,9%) достигли БМО, 11 (78,6%) длительно сохраняли БМО, потеря БМО наблюдалась у 5 пациентов (41,7% от числа достигших БМО, у 2 нет данных о потере БМО). Потеря ПЦО в этой группе наблюдалась у 3 пациентов (21,4%), в течение года никто не потерял ПЦО, в течение 2 лет ПЦО потеряли 2 пациента. В группе с экспрессией выше 1% из 10 пациентов БМО достигли 4 (40%), длительно сохраняли БМО 3 (30%), , потеря БМО наблюдалась у 1 пациента (33,3% от числа достигших БМО, у 1 нет данных о потере БМО). В этой группе ПЦО потеряли 8 пациентов (80%), 7 из них потеряли ПЦО в течение года (рис. 2).

Между первыми двумя группами различия в пропорциях достижения, длительного сохранения, потери БМО и потери ПЦО не являются статистически значимыми. Группа с уровнем экспрессии *BCR-ABL* выше 1% значимо отличается от двух других ($p < 0,0005$) по доле пациентов, достигших и длительно сохранявших БМО, и, что наиболее важно, по доле пациентов с потерей ПЦО. Если рассматривать потерю ПЦО в этих группах в течение года после исследования, разница будет еще более заметной – 2,2% (1 из 46) для объединенных первых двух групп и 70% для третьей группы.

Рис. 2. Параметры изменения молекулярного и цитогенетического ответов у пациентов с ПЦО и разным уровнем экспрессии *BCR-ABL* в сроки 24-60 месяцев терапии иматинибом



Время достижения ПЦО и молекулярный ответ.

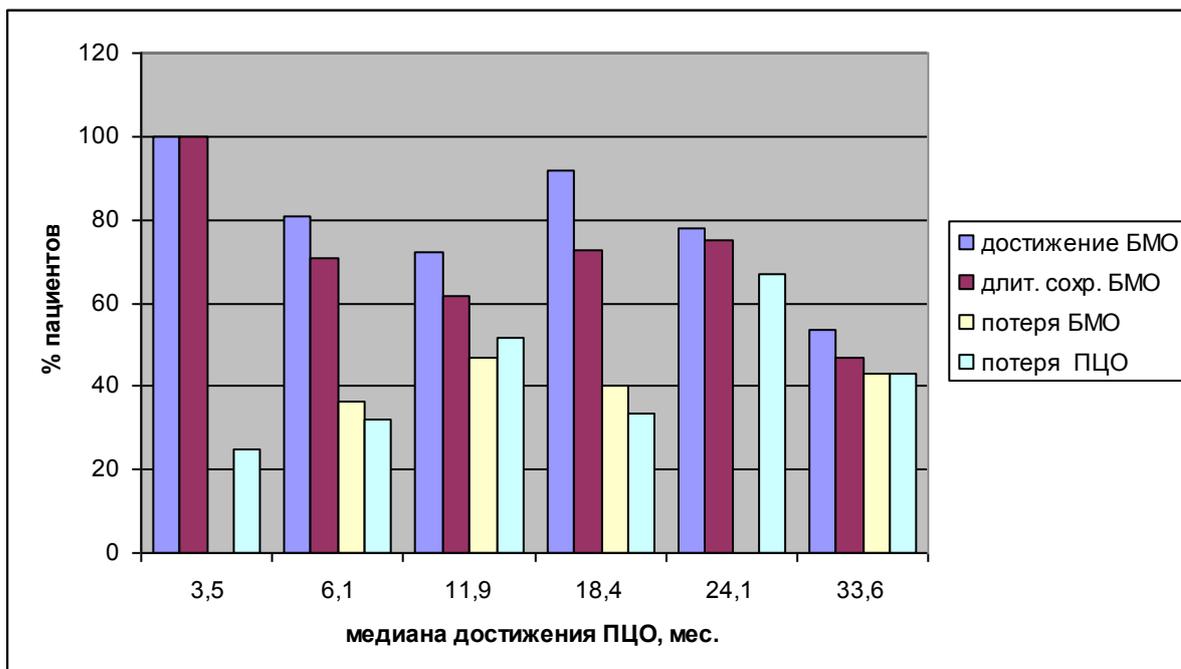
104 пациента были разделены на 6 групп по времени первого достижения ПЦО. Группа с временем достижения ПЦО от 3 до 4,8 месяцев (медиана 3,45 месяцев) составила 8 человек, группа с временем достижения от 5,3 до 8,9 месяцев (медиана 6,1) – 31 человек, группа с временем достижения от 9,5 до 14,9 (медиана 11,9) – 29 человек, группа с временем достижения от 15,4 до 20,5 (медиана 18,4) – 12 человек, группа с временем достижения от 22,1 до 25,4 (медиана 24,1) – 9 человек, группа с временем достижения от 26,9 до 61,3 месяцев (медиана 33,6) – 15 человек. В каждой группе оценивалось число пациентов, достигших БМО, длительно сохранявших БМО, число пациентов с потерей БМО и с потерей ПЦО. Подходы к определению этих параметров были те же, что и в предыдущем разделе.

В первой группе все пациенты достигли БМО, сохраняли БМО 6 из 6 пациентов (100%), никто не терял БМО, потеря ПЦО наблюдалась у 2 пациентов (25%). Во второй группе БМО достигли 25 пациентов (80,7%), длительно сохраняли БМО 22 пациента (71%), потеря БМО наблюдалась у 8 из 22 пациентов (36,4%), потеря ПЦО у 10 пациентов (32,3%). В третьей группе БМО достиг 21 пациент (72,41%), длительно сохраняли БМО 16 из 26 пациентов (61,54%), потеря БМО зафиксирована у 7 из 15 пациентов (46,7%), потеря ПЦО – у 15 из 29 (51,72%). В четвертой группе БМО достигли 11 из 12 пациентов (91,67%), длительно сохраняли БМО 8 из 11 (72,7%), потеря БМО – у 4 из 10 (40%), потеря ПЦО – у 4 из 12 пациентов (33,3%). В пятой группе БМО достигли 7 из 9 пациентов (77,8%), длительно сохраняли БМО 6 из 8 (75%), потеря БМО не зафиксирована ни у одного пациента, потеря ПЦО – у 6 из 9 (66,7%). В шестой группе

БМО достигли 8 из 15 пациентов (53,3%), длительно сохраняли БМО 7 из 15 (46,7%), потеря БМО – у 3 из 7 (42,9%), потеря ПЦО – у 6 из 14 (42,9%) (рис. 3).

Пропорция пациентов, достигших БМО, меняется волнообразно по мере увеличения срока достижения ПЦО, пики наблюдаются на сроках с медианой 3,5 и 18,4 месяцев. Доля пациентов, длительно сохраняющих БМО, максимальна на срок с медианой 3,5 месяцев, по мере увеличения срока достижения ПЦО, эта доля уменьшается. Однако значимые различия в пропорции достижения БМО наблюдаются только между группами с медианой срока 3,5 и 33,6 ($p < 0,05$), и между группами с медианой 18,4 и 33,6 месяцев ($p < 0,05$). Доля пациентов, длительно сохраняющих БМО, различается только между группами с медианой 3,5 и 33,6 месяцев ($p < 0,05$). Между группами не было обнаружено значимых различий по потере ПЦО. В двух группах (медиана 3,5 месяцев и 24,1 месяц) были отмечены пациенты с потерей ПЦО, но не было зафиксировано пациентов с потерей БМО. Это несоответствие вызвано нерегулярным обследованием пациентов и несовпадением сроков молекулярного и цитогенетического анализа – например, молекулярное исследование начало проводится уже после потери и последующего восстановления ПЦО или в молекулярном исследовании был длительный перерыв. Если не учитывать эти две группы, среди оставшихся не было отмечено значимых различий по потере БМО.

Рис. 3. Параметры молекулярного ответа у пациентов с разными сроками достижения ПЦО



Прогностическое значение уровня экспрессии BCR-ABL на ранних этапах терапии иматинибом.

Прогностическое значение уровня экспрессии *BCR-ABL* оценивалось в сроки 6 и 12 месяцев терапии иматинибом. У пациентов с разным уровнем экспрессии определялись следующие параметры: 1) ответ на терапию по критериям ELN; 2) достижение БМО на терапии иматинибом; 3) переход на терапию ИТК 2 линии.

На срок 6 месяцев терапии было исследовано 26 пациентов, на срок 12 месяцев – 50 пациентов. При представлении экспрессии *BCR-ABL* на графиках в логарифмической шкале, значения на каждом сроке распадались на три отдельных кластера с промежутками между ними. Исходя из этого, пациенты на каждом сроке терапии были разбиты на три группы по уровню экспрессии: 1) от 0 до 0,04%; 2) от 0,12% до 4,49%; 3) от 9,8% до 170%.

На срок 6 месяцев терапии в первую группу вошло 6 пациентов, во вторую – 9 пациентов, в третью – 11 пациентов (табл. 2). В группе с экспрессией до 0,04% все пациенты продемонстрировали в дальнейшем оптимальный ответ на терапию, все достигли БМО, и никто из них не был переведен на терапию 2 линии. В группе с экспрессией от 0,12% до 4,49% оптимальный ответ получен у одного пациента (11,1%), субоптимальный – у 6 (66,7%), резистентными оказались два пациента (22,2%). БМО на иматинибе был достигнут у одного пациента (11,1%), на терапию ИТК 2 линии были переведены 2 пациента (22,2%). В группе с экспрессией выше 9,8% оптимальный ответ не был получен ни у одного пациента, у одного получен субоптимальный ответ (9,1%), остальные 10 пациентов оказались резистентными к терапии иматинибом (90,9%). БМО не достиг ни один пациент, 8 пациентов (72,7%) были переведены на терапию 2 линии. Группы различаются между собой по всем трем параметрам с высоким уровнем значимости – по ответу ($p < 0,00001$, коэффициент сопряженности 91,3%), по доле пациентов, достигших БМО ($p < 0,0003$, коэффициент сопряженности 95,1%), по доле пациентов со сменой терапии ($p < 0,05$, коэффициент сопряженности 75,1%).

На срок 12 месяцев терапии в группу с экспрессией до 0,04% вошло 18 пациентов, в группу с экспрессией от 0,12% до 4,49% - 13 пациентов, в группу с экспрессией выше 9,8% - 19 пациентов (табл. 3). В первой группе оптимальный ответ на терапию иматинибом получен у 12 пациентов (66,7%), субоптимальный – у 5 (27,8%), в одном случае наблюдалась потеря ответа (вторичная резистентность – 5,6%). Все пациенты достигли БМО, на терапию второй линии был переведен 1 пациент (5,6%). Во второй группе оптимальный ответ получен у 9 пациентов (69,2%), субоптимальный – у 3 пациентов (23,1%), у одного пациента наблюдалась вторичная резистентность (7,7%). БМО был достигнут у 9 человек, из тех же, кто получил оптимальный ответ на терапию, 1

пациент переведен на терапию 2 –й линии (7,7%). В третьей группе оптимальный ответ получен у одного пациента (5,3%), субоптимальный- у 5 (26,3%), 13 пациентов оказались резистентными (68,4%). БМО был достигнут у 2 пациентов (10,5%), смена терапии отмечалась у 10 пациентов (52,6%). По ответу на терапию и доле пациентов со сменой терапии первая и вторая группа не различались. Наблюдаются значимые различия между двумя первыми и третьей группой по ответу ($p < 0,00001$, коэффициент сопряженности 82,2%), и по доле пациентов со сменой терапии ($p < 0,0005$, коэффициент сопряженности 65,72%). Три группы демонстрируют значимые различия по доле пациентов, достигших БМО ($p < 0,00001$, коэффициент сопряженности 93,5).

Таблица 2. Ответ на терапию, достижение БМО и смена терапии у пациентов с разным уровнем экспрессии *BCR-ABL* после 6 месяцев терапии иматинибом.

n	экспрессия <i>BCR-ABL</i> , IS	ответ на терапию иматинибом			БМО на иматинибе, %	переход на терапию ИТК 2 линии, %
		оптимальный, %	субоптимальный, %	резистентные, %		
6	$\leq 0,04$	100	0	0	100	0
9	0,12-4,49	11,1	66,7	22,2	11,1	22,2
11	≥ 10	0	9,1	90,9	0	72,7

Таблица 3. Ответ на терапию, достижение БМО и смена терапии у пациентов с разным уровнем экспрессии *BCR-ABL* на 12 месяцев терапии иматинибом.

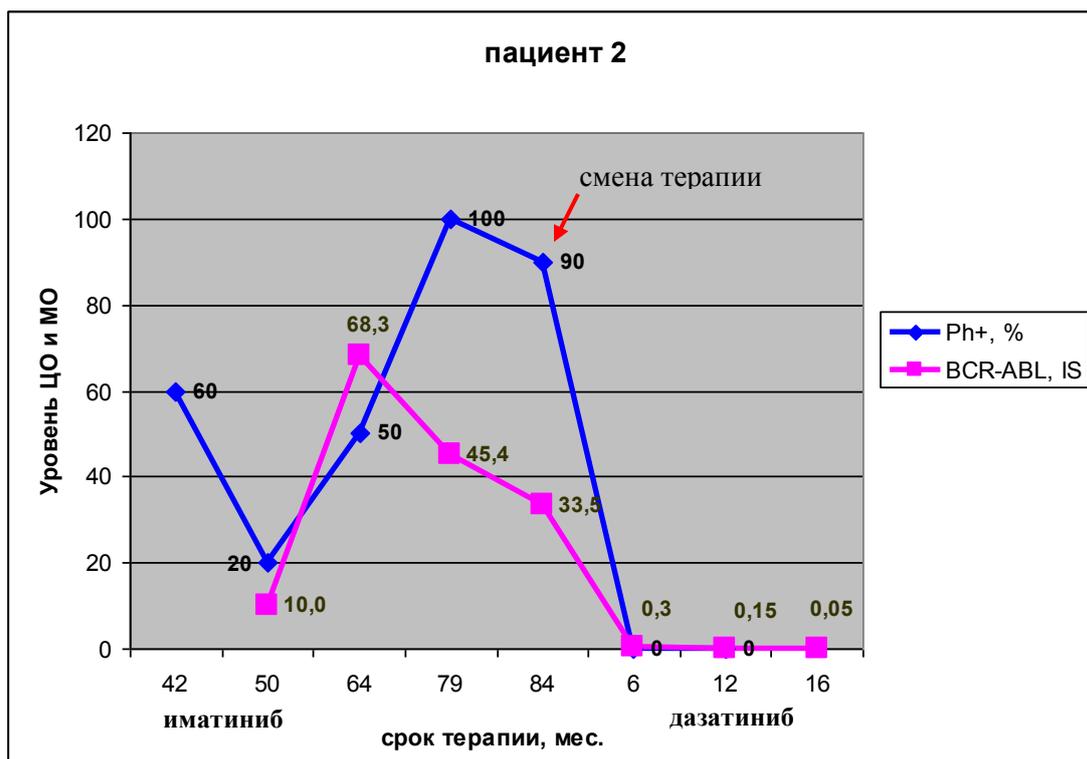
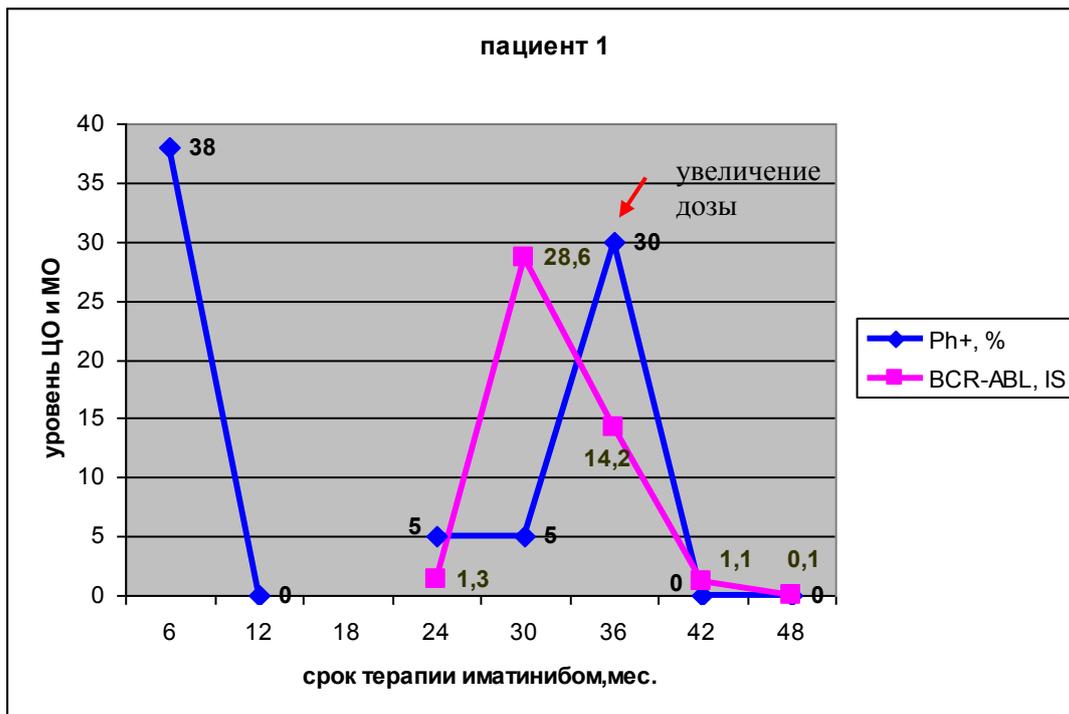
n	экспрессия <i>BCR-ABL</i> , IS	ответ на терапию иматинибом			БМО на иматинибе, %	переход на терапию ИТК 2 линии, %
		оптимальный, %	субоптимальный, %	резистентные, %		
18	$\leq 0,04$	66,7	27,8	5,6	100	5,6
13	0,12-4,49	69,2	23,1	7,7	69,2	7,7
19	≥ 10	5,3	26,3	68,4	10,5	52,6

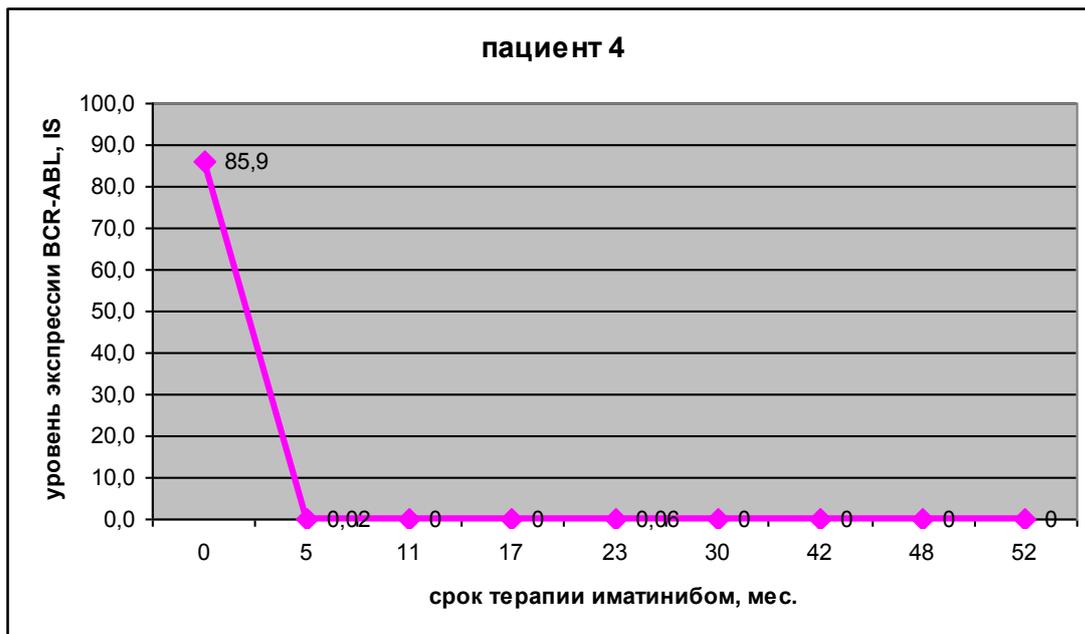
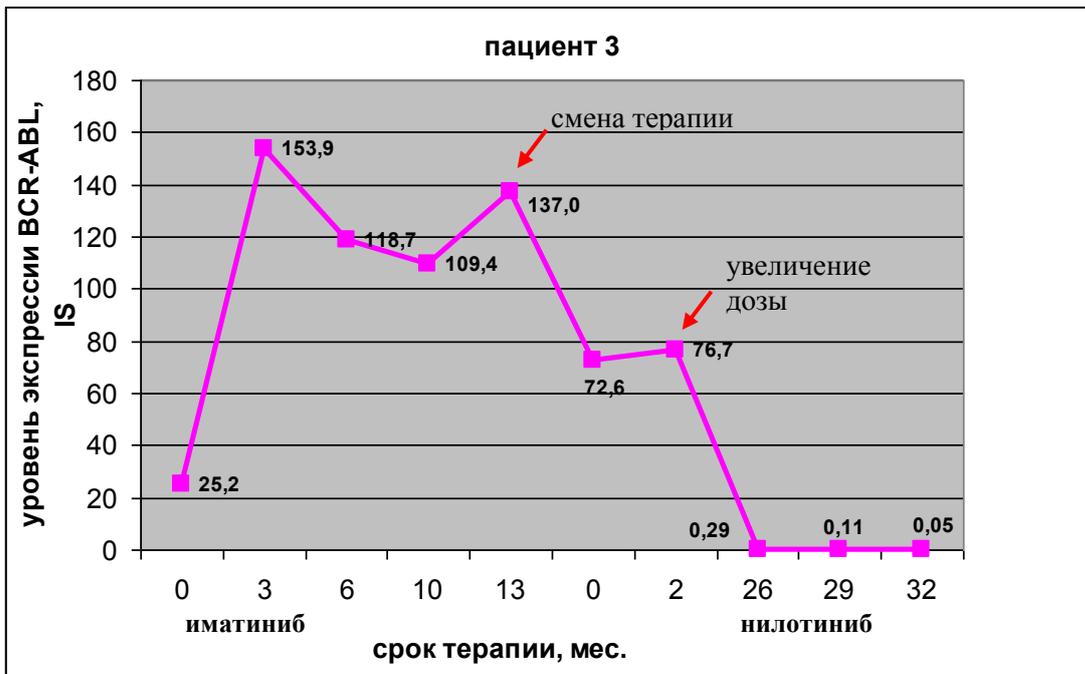
Динамика молекулярного и цитогенетического ответов у пациентов с разным ответом на терапию

Динамика молекулярного ответа у пациентов ХМЛ хорошо отражает динамику заболевания и в большинстве случаев коррелирует с динамикой цитогенетического ответа. К сожалению, молекулярные исследования в большинстве случаев проводятся нерегулярно и не всегда совпадают с цитогенетическими исследованиями по дате проведения, что затрудняет сравнение между двумя исследованиями.

На рисунке 4 приведены параметры молекулярного и цитогенетического ответов у нескольких пациентов ХМЛ. Пациент 1 первоначально хорошо ответил на терапию иматинибом и достиг ПЦО. На 24 месяце терапии пациент потерял ПЦО, в это же время был проведен первый молекулярный анализ, экспрессия *BCR-ABL* составила 1,3%. После 30 месяцев терапии наблюдалось резкое увеличение уровня экспрессии до 28,6% при том же уровне ЦО – 5%, а на 36 месяцев терапии ЦО составил уже 30%, уровень экспрессии несколько снизился, но был достаточно высок - 14,2%. Вскоре пациенту была увеличена доза иматиниба и к 42 месяцам терапии он достиг ПЦО и уровня экспрессии 1,1%. К 48 месяцам уровень экспрессии снизился до уровня БМО и составил 0,1%. У пациента 2 молекулярные исследования стали проводиться с 50 месяцев терапии иматинибом, на этот срок ЦО составил 20%, а экспрессия *BCR-ABL* 10%. На срок 64 месяца терапии наблюдается значительное увеличение цитогенетического и молекулярного ответов, этот высокий уровень сохранялся до 84 месяцев. После смены терапии на дазатиниб на сроке 84 месяца приема иматиниба, уровень ЦО и МО резко снизился и к 6 месяцам терапии 2 линии пациент достиг ПЦО и экспрессии *BCR-ABL* 0,3%. Далее, при сохраняющемся ПЦО, экспрессия продолжала уменьшаться. На примере этих двух пациентов со вторичной резистентностью к терапии иматинибом мы видим корреляцию молекулярного ответа с цитогенетическим, увеличение уровня экспрессии предшествует или совпадает с увеличением уровня ЦО. Пациент 3 является примером пациента с первичной резистентностью к терапии иматинибом. Экспрессия *BCR-ABL* от начала терапии до 13 месяцев была очень высокой, при этом она увеличилась от начального уровня и превышала 100%. После смены терапии на нилотиниб уровень экспрессии несколько снизился, а после увеличения дозы препарата снижение оказалось более значительным, в конечном итоге до уровня БМО. Здесь уровень молекулярного ответа вполне адекватно отражает динамику заболевания и ответ пациента на терапию. Пациент 4 – это пациент с оптимальным ответом на терапию иматинибом. Уровень экспрессии *BCR-ABL* уже к 5 месяцам терапии снизился до уровня БМО и в дальнейшем сохранялся.

Рис. 4. Показатели молекулярного и цитогенетического ответов у пациентов ХМЛ





ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При сравнительном анализе данных цитогенетического и молекулярного ответов мы показали, что существует корреляция между уровнями этих ответов. Чем лучше цитогенетический ответ, тем больше доля образцов с низкой экспрессией гена *BCR-ABL*. Каждая группа с определенным уровнем цитогенетического ответа неоднородна по структуре молекулярного ответа, в ней есть образцы с более высокой и более низкой экспрессией. В группах с отсутствием ЦО, с минимальным и малым ЦО преобладающими

являются образцы с высокой экспрессией *BCR-ABL* – более 10%, которые составляют в этих группах 88,7%, 81,2% и 77,8% соответственно. В группе с частичным ЦО доля образцов с высокой экспрессией уже не является преобладающей и составляет 34,9%, а среди пациентов с ПЦО эта доля снижается до 8,9%. Образцы с экспрессией *BCR-ABL* менее 1% и с БМО появляются уже в группе пациентов с малым ЦО, в группе с частичным ЦО доля таких образцов увеличивается. В группе с частичным ЦО появляются и образцы с ПМО, т.е. с недетектируемой экспрессией *BCR-ABL*. Таких пациентов было 4 из 43 в этой группе, у всех содержание Ph-позитивных клеток составляло 4-5%. Возможными объяснениями этого феномена является либо наличие другого типа транскрипта *BCR-ABL* (p190, p230), либо ингибирование экспрессии в клетках пациента. Группа пациентов с ПЦО наиболее неоднородна по составу образцов с разным уровнем МО. Более 50% в этой группе составляют образцы с БМО и еще около 25% - образцы с экспрессией от 0,1% до 1%. Образцы с экспрессией выше 1% составляют немногим более 20% образцов в этой группе.

Мы показали, что уровню экспрессия *BCR-ABL* $\leq 1\%$ в 91,4% случаев соответствует ПЦО, а уровню экспрессии от 1 до 10% в 82,4% случаев соответствует БЦО. Это вполне согласуется с данными, полученными DM Ross и соавторами в рамках исследования по сравнению параметров молекулярного и цитогенетического ответов [13].

Неоднородность группы пациентов с ПЦО по уровню МО и наличие в ней образцов с высокой экспрессией может вызывать закономерные вопросы о причинах такой неоднородности и о том, есть ли отличия в дальнейшем течении заболевания у пациентов с разной экспрессией. На группе пациентов с ПЦО и разным уровнем экспрессии на сроках от 24 до 60 месяцев терапии иматинибом мы продемонстрировали, что такие отличия действительно есть. В группе пациентов с уровнем экспрессии *BCR-ABL* более 1% доля пациентов с потерей ПЦО была значимо выше, чем в группах с экспрессией менее 1% и составила 80%, тогда как в группах с БМО и с экспрессией от 0,1% до 1% потеря ПЦО была 18,8% и 21,4%, соответственно. Примечательно, что потеря ПЦО в группе с экспрессией выше 1% в большинстве случаев происходила в течение года после исследования (в 7 из 8 случаев потери, 70% от числа пациентов в группе). В группах с низкой экспрессией *BCR-ABL* в течение года ПЦО потерял только 1 из 46 пациентов (2,2% от общего числа). Таким образом, две части нашего исследования привели к одному и тому же выводу – уровень экспрессии *BCR-ABL* 1% у пациентов с ПЦО является границей для сохранения ПЦО, при превышении этого уровня вероятность потери ПЦО значительно возрастает. Мы полагаем, что это может служить вполне определенным сигналом для врачей – если уровень экспрессии у пациента с ПЦО превысил 1%,

необходимо более частое и тщательное цитогенетическое и молекулярное мониторинговое для своевременного принятия клинических решений.

Пациенты в группе с экспрессией более 1% реже достигали БМО и реже длительно сохраняли его при продолжающейся терапии иматинибом, чем пациенты из групп с более низкой экспрессией. Это может говорить о том, что заболевание у них еще (или уже) не находится в стадии улучшения, а в лучшем случае в стадии неустойчивого равновесия, которое легко может сместиться в сторону потери ответа и рецидива.

Значение разного уровня экспрессии *BCR-ABL* у пациентов с ПЦО на сроках терапии 12, 18 и 24 месяца оказалось неодинаковым. Мы получили результаты, показывающие, что чем меньше срок терапии, тем разница в уровне экспрессии полнее отражает возможные изменения в течении заболевания. На срок 12 месяцев терапии граница проходит на уровне 0,1% - пациенты с уровнем экспрессии меньше и больше БМО значительно отличаются друг от друга по потере ПЦО. На сроках 18 и 24 месяца терапии нет никаких различий между группами – границу провести уже невозможно. Возможно, небольшая выборка пациентов в каждой группе и единичное число пациентов с экспрессией более 1% в этих группах не позволили нам обнаружить различия между ними.

Большая информативность уровня экспрессии *BCR-ABL* на ранних стадиях терапии подтвердилась и при оценке прогностического значения уровня экспрессии у пациентов в сроки 6 и 12 месяцев терапии. По уровню экспрессии после 6 месяцев терапии пациенты могли быть четко разделены на группы, продемонстрировавшие в дальнейшем разный ответ на терапию. Мы получили данные, что все пациенты, достигшие к 6 месяцам БМО, (в нашем исследовании уровня экспрессии менее 0,04%) оптимально отвечают на терапию. Если уровень экспрессии к 6 месяцам был более 10%, то в 90% случаев пациенты оказались резистентными к проводимой терапии, оставшиеся 10% приходились на долю субоптимального ответа. Группа пациентов с промежуточной экспрессией (0,12% - 4,49%) включила пациентов с оптимальным, субоптимальным ответом и резистентных пациентов, доля которых составила 11,15%, 66,7% и 22,2% соответственно. Параметры достижения БМО и смены терапии, как маркеры сохранения и потери ответа, тоже четко отражали деление пациентов на группы по уровню экспрессии. На срок 12 месяцев терапии иматинибом уровень экспрессии менее 0,04% уже не являлся однозначным показателем оптимального ответа, распределение по ответу не отличалось в этой группе и в группе с промежуточной экспрессией. Здесь граница, разделяющая группы по ответу на терапию, смещается на уровень 10%. Мы можем сказать, что с увеличением срока терапии становятся значимыми различия экспрессии на более высоком уровне. Интересно отметить, что по доле достижения БМО группы на этот срок по-прежнему значимо

различаются. По-видимому, по цитогенетическим критериям не всегда можно однозначно разделить пациентов по ответу на терапию, пациентов с субоптимальным ответом бывает трудно идентифицировать четко, и здесь критерии молекулярного ответа могут оказаться полезными. По результатам этой части исследования можно сказать, что уровень экспрессии более 10% на сроки 6 и 12 месяцев с высокой вероятностью служит показателем резистентности к проводимой терапии, а уровень менее 0,1% на срок 6 месяцев – показателем оптимального ответа в дальнейшем.

По нашим данным, срок достижения ПЦО слабо связан со степенью достижения и сохранения БМО и со степенью потери ПЦО. Значимые отличия по всем этим параметрам обнаружены только между группами, достигшими ПЦО очень рано (сроки достижения от 3 до 4,8 месяцев) и очень поздно (сроки достижения от 26,9 до 61,3 месяцев). Некоторый подъем доли пациентов с БМО наблюдался в группе с медианой срока достижения ПЦО 18,4 месяцев, между этой группой и группой с медианой срока достижения 33,6 месяцев есть значимые отличия.

Исследование динамики экспрессии *BCR-ABL* и динамики цитогенетического ответа показало, что эти два показателя хорошо согласуются между собой. Повышение уровня молекулярного ответа предшествует или совпадает с повышением уровня цитогенетического ответа, уровень экспрессии отражает динамику заболевания, при адекватной терапии происходит снижение уровня транскрипта. На примере двух пациентов с вторичной резистентностью к терапии иматинибом мы видим, что по повышению уровня экспрессии можно судить о последующей потере ответа. При сравнении молекулярного ответа у пациента с первичной резистентностью и пациента с оптимальным ответом разница в динамике экспрессии очевидна.

ЛИТЕРАТУРА:

1. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Clinical Practice Guidelines in Oncology: chronic myelogenous leukemia, version 2.2008. Fort Washington, PA: National Comprehensive Cancer Network, 2007. Available at: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/cml.pdf Accessed October 2007.
2. Lesser ML, Dewald GW, Sison CP, Silver RT. Correlation of 3 methods of measuring cytogenetic response in chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002;137:79–84.
3. Schoch C, Schnittger S, Bursch S, et al. Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. *Leukemia.* 2002;16:53–59.

4. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006;355:2404-2417.
5. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003 Oct 9;349(15):1423-32.
6. Hughes T, Branford S. Molecular monitoring of BCR-ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia. *Blood Rev*. 2006 Jan;20(1):29-41.
7. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2006 Jul 1;108(1):28-37.
8. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2006 Sep 15;108(6):1809-20
9. Branford S, Fletcher L, Cross NCP, et al. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* 2008 Oct 15;112(8):3330-8.
10. Branford S, Cross NCP, Hochhaus A, et al. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 2006 Nov;20(11):1925-30.
11. Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, et al. Response definitions and European LeukemiaNet Management recommendations. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009 Sep;22(3):331-4
12. Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 10;27(35):6041-51.
13. 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 Apr; 20(4):664-70.
14. Jabbour E, Cortes JE, Kantarjian HM. Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia: response to tyrosine kinase inhibitors and prognostic implications. *Cancer*. 2008 May 15; 112(10):2112-8

15. Lange T, Bumm T, Otto S, et al. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction should not replace conventional cytogenetics for monitoring patients with chronic myeloid leukemia during early phase of imatinib therapy. *Haematologica*. 2004; 89:49–57.
16. Hughes TP, Branford S. Monitoring disease response to tyrosine kinase inhibitor therapy in CML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:477-87
17. Merx K, Muller MC, Kreil S, et al. Early reduction of BCRABL mRNA transcript levels predicts cytogenetic response in chronic phase CML patients treated with imatinib after failure of interferon alpha. *Leukemia*. 2002; 16:1579–1583.
18. Wang L, Pearson K, Ferguson JE, Clark RE. The early molecular response to imatinib predicts cytogenetic and clinical outcome in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2003;120:990–999.
19. Cortes J, Talpaz M, O'Brien S, et al. Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res*. 2005;11:3425–3432.
20. Paschka P, Muller MC, Merx K, et al. Molecular monitoring of response to imatinib (Gleevec) in CML patients pretreated with interferon alpha. Low levels of residual disease are associated with continuous remission. *Leukemia*. 2003; 17: 1687–1694.
21. Iacobucci I, Saglio G, Rosti G, et al. Achieving a major molecular response at the time of a complete cytogenetic response (CCgR) predicts a better duration of CCgR in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res*. 2006;12:3037–3042.
22. Marin D, Milojkovic D, Olavarria E, et al. 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*. 2008; 112:4437-4444.
23. Palandri F, Iacobucci I, Soverini S, et al. Treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia with imatinib: importance of a stable molecular response. *Clin Cancer Res*. 2009;15:1059-1063.
24. Branford S, Rudzki Z, Parkinson I, et al. Real-time quantitative PCR analysis can be used as a primary screen to identify patients with CML treated with imatinib who have BCR-ABL kinase domain mutations. *Blood*. 2004; 104:2926–2932.
25. Wang L, Knight K, Lucas C, Clark RE. The role of serial BCR-ABL transcript monitoring in predicting the emergence of BCR-ABL kinase mutations in imatinib-treated patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2006; 91:235–239.
26. Branford S, Seymour J, Grigg A, et al: BCRABL messenger RNA levels continue to decline in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib for more than 5

years and approximately half of all first-line treated patients have stable undetectable BCR-ABL using strict sensitivity criteria. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:7080-7086.

27. Press R, Galderisi C, Yang R, et al: 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. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:6136-6144.

28. Press R, Love Z, Tronnes A, et al: BCR-ABL mRNA levels at and after the time of a complete cytogenetic response (CCR) predict the duration of CCR in imatinib mesylate-treated patients with CML. *Blood.*2006; 107:4250-4256.

29. Cortes J, Talpaz M, O'Brien S, et al: Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res.*2005; 11:3425-3432.

30. Kantarjian H, Shan J, Jones D, et al: Significance of Increasing Levels of Minimal Residual Disease in Patients With Philadelphia Chromosome–Positive Chronic Myelogenous Leukemia in Complete Cytogenetic Response. *J Clin Oncol.* 2009;27:3659-3663.

31. Gabert J, Beillard E, van dV, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003 Dec;17(12):2318–57.

32. Müller M, Cross N, Erben P, et al. Harmonization of molecular monitoring of CML in Europe. *Leukemia.* 2009 Nov;23(11):1957-63