

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ



Petra Bělohlávková

Disertační práce doktorandského studijního programu vnitřní nemoci

HRADEC KRÁLOVÉ

2016

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Doktorský studijní program
Vnitřní nemoci

**Možnosti optimalizace léčby pacientů
s chronickou myeloidní leukemií**

**Optimizing treatment options for patients
with chronic myeloid leukemia**

MUDr. Petra Bělohlávková

Školitel: doc. MUDr. Pavel Žák, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Obhajoba dne : 14.11.2016

MUDr. Petra Bělohávková

Školitel: doc. MUDr. Pavel Žák, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou dizertační práci zpracovala samostatně a že jsou uvedeny všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze své práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

V Hradci Králové dne 20.6. 2016

MUDr. Petra Bělohávková

Poděkování

Děkuji svému školiteli doc. MUDr. Pavlu Žákovi, Ph.D. ze IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové za odborné vedení, cenné připomínky při realizaci své práce a za podporu v průběhu celého postgraduálního studia. Zvláštní poděkování patří MUDr. Jaroslavě Voglové, která mne na pracoviště IV. interní hematologické kliniky přivedla a zasvětila mne do problematiky chronické myeloidní leukemie. Pomohla mi s výběrem tématu mojí práce a k její kvalitě přispěla odbornými připomínkami. Děkuji kolegovi Mgr. Filipu Vrbackému za obětavou pomoc při realizaci laboratorního vyšetřování polymorfismů a spolupráci při statistickém hodnocení výsledků.

Dále děkuji za spolupráci kolegům z Interní hematologické a onkologické kliniky FN Brno pod vedením prof. MUDr. Jiřího Mayera, CSc., kteří mi poskytli vzorky pacientů k naší analýze. Tento kolektiv odborníků představuje rovněž velkou inspiraci a motivaci k odborné práci v oblasti chronické myeloidní leukemie.

Petra Bělohlávková

Obsah

POUŽITÉ ZKRATKY	6
1.1 CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE - ETIOLOGIE A PATOGENEZE	9
1.2 EPIDEMIOLOGIE CHRONICKÉ MYELOIDNÍ LEUKEMIE	11
1.3 KLINICKÝ OBRAZ A DIAGNOSTIKA CML	11
1.4 DIAGNOSTIKA CML	12
1.5 PRŮBĚH A PROGNÓZA CML	14
1.5.1 Určení fáze CML.....	14
1.5.2 Stanovení prognostických indexů.....	16
1.6. LÉČBA CHRONICKÉ MYELOIDNÍ LEUKEMIE	18
1.6.1 Vývoj léčby CML.....	18
1.6.2 Indikace leukaferézy u CML.....	19
1.6.3 Léčba cytoredukční.....	19
1.6.3.1 Busulfan.....	19
1.6.3.2 Hydroxyurea	20
1.6.4 Léčba interferonem	20
1.6.5 Léčba tyrozinkinázovými inhibitory.....	21
1.6.5.1 Imatinib	22
1.6.5.2 Dasatinib.....	25
1.6.5.3 Nilotinib	26
1.6.5.3 Bosutinib	27
1.6.5.5. Ponatinib	28
1.6.6 Možnosti vysazování TKI	29
1.7 LÉČBA CML V TĚHOTENSTVÍ	30
1.8 MECHANISMY ROZVOJE REZISTENCE	30
1.9 FARMAKOKINETIKA IMATINIBU	34
1.10 GENETICKÉ POLYMORFISMY	36
1.11 VÝZNAM TRANSPLANTACE KRVETVORNÝCH BUNĚK	38
1.12 DEFINICE OPTIMÁLNÍ LÉČEBNÉ ODPOVĚDI A JEJÍ MONITORACE	40
1.12.1 Definice léčebné odpovědi	40
1.12.2 Doporučení léčby pacientů s chronickou myeloidní leukemií.....	43
1.12.3 Predikce léčebné odpovědi	44

2.1. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	45
2.2 PRACOVNÍ HYPOTÉZY	45
3. POUŽITÉ METODY A SOUBOR NEMOCNÝCH	46
3.1. SOUBOR NEMOCNÝCH	46
3.2 METODIKA HODNOCENÍ LÉČEBNÉ ODPOVĚDI	49
3.3 POUŽITÉ METODY.....	50
3.4 STATISTICKÉ HODNOCENÍ	54
4. VÝSLEDKY	55
4.1 DOSAŽENÉ LÉČEBNÉ ODPOVĚDI A TOXICITA LÉČBY	55
4.2 VLIV BMI A RENÁLNÍCH FUNKCÍ NA PLAZMATICKOU HLADINU	59
IMATINIBU	59
4.3 VLIV PLAZMATICKÝCH HLADIN IMATINIBU NA LÉČEBNOU ODPOVĚĎ	62
4.4 VLIV POLYMORFISMŮ NA DOSAŽENÉ PLAZMATICKÉ HLADINY.....	66
IMATINIBU	66
4.5 VLIV POLYMORFISMŮ NA DOSAŽENÍ LÉČEBNÉ ODPOVĚDI	69
5. DISKUSE.....	75
5.1 VLIV PLAZMATICKÝCH HLADIN IMATINIBU NA LÉČEBNOU ODPOVĚĎ	75
5.2 VLIV GENETICKÝCH POLYMORFISMŮ NA DOSAŽENÉ PLAZMATICKÉ	77
HLADINY IMATINIBU	77
5.3 VLIV GENETICKÝCH POLYMORFISMŮ NA LÉČEBNOU ODPOVĚĎ	78
6. HODNOCENÍ SPLNĚNÍ CÍLŮ PRÁCE	80
7. ZÁVĚRY K PRACOVNÍM HYPOTÉZÁM	81
8. DOPORUČENÍ PRO PRAXI.....	82
9. LITERATURA.....	83

Použité zkratky

AA - homozygotní genotyp, dvě alely A a A

AGP - alpha -1 kyselý glykoprotein

AIHA - autoimunitní hemolytická anemie

ALL - akutní lymfoblastická leukemie

AP - akcelerovaná fáze

ATP - kyselina adenosintrifosforečná

ABCB1- transportní glykoprotein

ABCG2 - transportní glykoprotein

ABL - Abelsenův onkogen na 9. chromozomu

ANC - absolutní počet neutrofilů

BCR - místo zlomu na 22. chromozomu (breakpoint cluster region)

BP - blastická fáze

BMI - body mass index

CC, CT - označení genotypu, homozygot (alely C a C), heterozygot (alely C a T)

CCA - klonální chromozomální abnormality

CML - chronická myeloidní leukemie

c-KIT- protoonkogen s tyrozinkinázovou aktivitou

CCyR - kompletní cytogenetická odpověď

CHR - kompletní hematologická odpověď

CP- chronická fáze

CRKL - protein kódovaný CRKL genem

CYP3A4 - označení enzymu v játrech, součást cytochromu P450

CYP3A5 - označení enzymu v játrech, součást cytochromu P450

CYP2C9 - označení enzymu v játrech, součást cytochromu P450

DNA - deoxyribonukleová kyselina

EBMT - European Group for Blood and Marrow Transplantation

EKG - elektrokardiogram

ELN - European Leukemia Net

EUTOS - The European Treatment and Outcome Study for CML

Hb - hemoglobin

hOCT1 - human organic cation transporter-1

HSCT - transplantace hematopoetickými buňkami

FISH - změň fluorescenční in situ hybridizace

FDA - Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)

GG - homozygotní genotyp, dvě alely G a G

GF - glomerulární filtrace

GvHD - reakce štěpu proti hostiteli

GT - heterozygotní genotyp, alely G a T

IS - mezinárodní index užívaný pro standardizaci měření BCR/ABL1 kvantity

JAK - Janusova kináza

KD - kostní dřeň

MMR - velká molekulární odpověď

NA - nestanoveno

NCCN - National Comprehensive Cancer Network

NF- κ B - nukleární faktor κ B

NK - „natural killer“, subpopulace lymfocytů

OS - celkové přežití

PCyR - parciální cytogenetická remise

PRCA - čistá aplazie červené řady

Ph - filadelfský chromozom

PK - periferní krev

rs – referenční číslo polymorfismu v SNP „mapě“, vždy jedinečné

RT - PCR - kvalitativní polymerázová řetězcová reakce s využitím reverzní transkriptázy

PDGR - receptor pro destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor receptor)

PI3K - 3- fosfatidylinozitol-3-kináza

RAS - rodina genů ze skupiny protoonkogenů, které kódují proteiny vázající GTP

SNP - jedno-nukleotidový polymorfismus

QT - vzdálenost mezi začátkem kmitu Q a koncem vlny T na EKG záznamu

WHO - Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

wt - nemutovaný, běžně se vyskytující gen („wild“)

Tc - cytotoxické lymfocyty

TKI - tyrozinkinázový inhibitor

TT - homozygotní genotyp (alely T a T)

1.1 Chronická myeloidní leukemie - etiologie a patogeneze

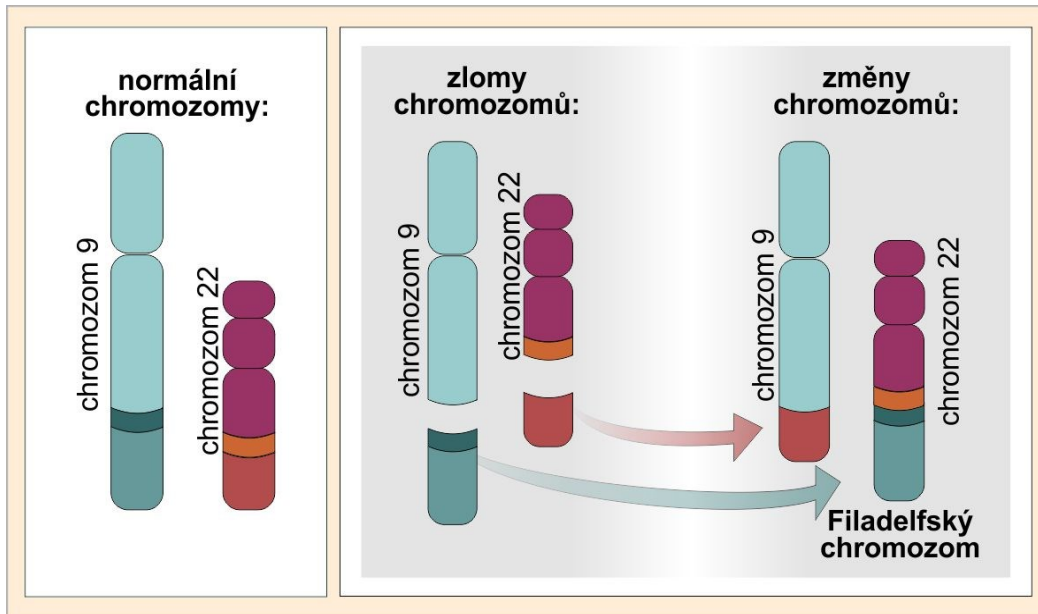
Chronická myeloidní leukemie patří do skupiny myeloproliferativních chorob a vzniká transformací kmenové pluripotentní buňky. Molekulární podstatou choroby je reciproká translokace mezi chromozomy 9 a 22 (t(9;22)(q34;q11) v jejímž důsledku dojde ke vzniku **filadelfského chromozomu (Ph+)** (obrázek č.1). První zmínka o průkazu tohoto chromozomu pochází z roku 1960, kdy Peter Nowell a David Hungerford ve Philadelphii (USA) popsali tento malý chromozom u sedmi nemocných s CML. ^{1,2} Následně v roce 1973 Janet Rowley vyslovila domněnku, že se jedná právě o translokaci mezi 9. a 22. chromozomem. ³ Dalším důležitým mezníkem byla 80. léta minulého století, kdy na základě molekulárních analýz byl popsán nejprve gen ABL a o něco později gen BCR. ^{4,5}

Bylo prokázáno, že u pacientů s CML se jedná o **fúzní transkript dvou genů, BCR a ABL1**. Místo zlomu na chromozomu 9 není jednotné, protože podle umístění v exonu mohou být přítomny tři možnosti zlomu. Nejčastěji se jedná o M-BCR (major), méně často o zlom m-BCR (minor) a vzácně dojde ke zlomu typu μ -BCR (mikro). Výsledkem je pak vznik fúzních leukemických genů BCR-ABL1, které jsou označovány jako b2a2, b3a2, e1a2 a e19a2, kterým na proteinové úrovni odpovídají tyrozinové kinázy o molekulární hmotnosti p210, p190 a p230. ⁵ Vzácně byly popsány i další fúze e2a2, b3a3, které vznikají inzercí DNA mezi exony ABL1 a BCR.

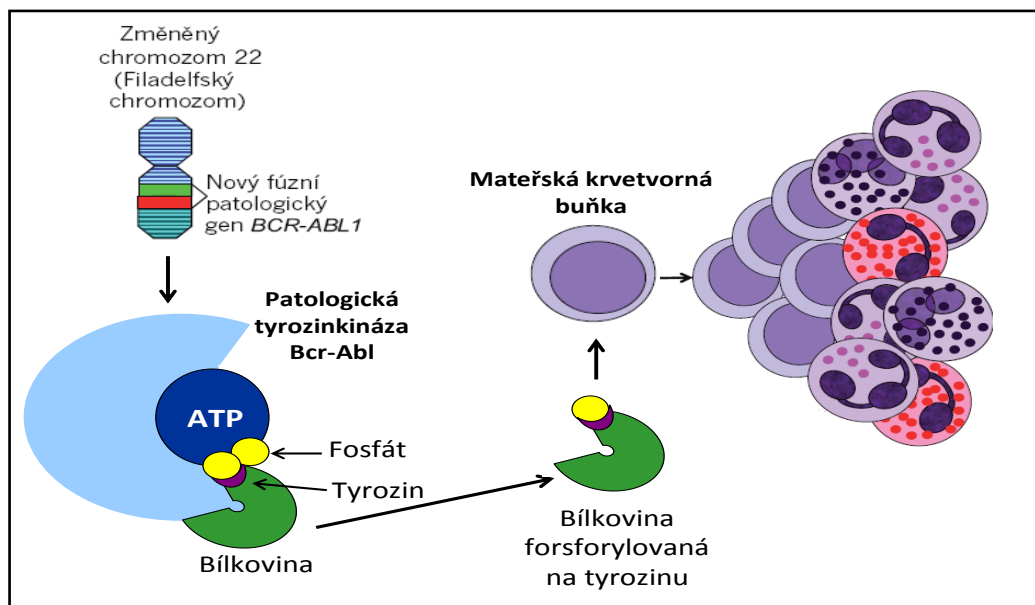
Aktivace BCR-ABL1 způsobí nekontrolovatelnou fosforylaci celé řady proteinů signálních drah v hematopoetické kmenové buňce a dochází tak k rozvoji choroby. Tento proces významně ovlivní adhezivní vlastnosti buněk ke stromatu dřeně, současně dojde ke zvýšené proliferaci buněk v kostní dřeni a snížené apoptóze (obrázek č. 2). K důležitým drahám, které BCR-ABL1 aktivují, patří např. RAS, JAK/STAT, PI3K/Akt a NF- κ B. ⁶

Celý proces rozvoje CML je však velmi složitý, protože dochází k ovlivnění dalších proteinů, které nemají přímo kinázovou aktivitu. Jedná se např. o fosforylaci proteinu CRKL, který ovlivňuje buněčnou motilitu a adhezi a dává leukemickým buňkám růstovou výhodu. Některé z výše zmíněných mechanismů vzniku časných fází CML jsou již prozkoumány, progresse choroby do pokročilejších fází včetně vzniku přídatných cytogenetických změn, je zatím objasněna pouze částečně. Klíčovou roli zřejmě hraje zvýšená citlivost k oxidativnímu stresu a na procesu progresse se dále podílí porucha diferenciací, genomová nestabilita, zkracování telomer a ztráta funkce tumor - supresorových genů. Je již potvrzeno, že

transkripční faktor C/EBP α , který je odpovědný za kontrolu diferenciace a proliferace granulocytů, je v blastické fázi zcela potlačen.⁶⁻¹¹



Obrázek č. 1: Vznik filadelfského chromozomu (upraveno podle www.webmd.com)



Obrázek č. 2: Mechanismus vzniku CML (zdroj D. Žáčková, Dizertační práce, 2014)

1.2 Epidemiologie chronické myeloidní leukemie

Chronická myeloidní leukemie představuje 15 – 20 % leukemií dospělých a medián prvního záchytu CML byl uváděn mezi 50 – 55 lety. Choroba se může však objevit v každém věku, včetně výskytu u dětí. Incidence onemocnění se pohybuje od 1 - 1,5 nového případu na 100 000 obyvatel za rok s mírně vyšším výskytem u mužů v poměru 1,4:1 až 2,2:1. V České republice je každý rok diagnostikována CML nově u 150 – 200 pacientů.^{12, 13}

Podle dat Amerického onkologického úřadu za rok 2014 se posouvá věk prvního záchytu CML do vyšších věkových kategorií, protože průměrný věk v době diagnózy v roce 2014 byl 64 let a téměř polovina pacientů byla starších 65 let. Posouvání mediánu prvního záchytu CML na 60 – 65 let potvrzují i další onkologické a klinické registry.

Za jediný rizikový faktor rozvoje CML, je považováno radioaktivní záření, další vlivy jako např. chemikálie, kouření nebyly přesvědčivě potvrzeny. Familiární výskyt byl popsán raritně a nebyly prokázány ani rasové nebo geografické vlivy na výskyt CML.

1.3 Klinický obraz a diagnostika CML

CML je až u 30 – 50 % pacientů diagnostikována náhodně, na základě abnormalit v krevním obraze a pacienti v době diagnózy neudávají žádné symptomy choroby. Pro CML je typická různě vyjádřená leukocytóza od mírně zvýšených hodnot až po velmi vysoké hodnoty leukocytů v krevním obraze ($12 - 500 \cdot 10^9/l$) a zpravidla bývá přítomen typický posun v diferenciálním rozpočtu, tzn. přítomnost myelocytů, metamyelocytů, promyelocytů a blastů. Hodnoty hemoglobinu mohou být normální, ale může být přítomna i mírná normocytární anémie. Hodnoty trombocytů bývají rovněž variabilní od nízkých hodnot až po hodnoty zvýšené. Přítomnost anizocytózy a poikilocytózy v periferním nátěru nás může upozornit na možnou fibrózu kostní dřeně.¹⁴⁻¹⁶

Mezi **nejčastější symptomy** choroby řadíme únavu, slabost a nevykonnost, zvýšené teploty. Tyto nespecifické příznaky se vyskytují u 30 % pacientů. Asi 20 % pacientů přivedou k lékaři potíže vyplývající ze splenomegalie jako je nechutenství, časný pocit sytosti po jídle, tlaky v levém podžebří. V případě velmi vysokých hodnot leukocytů se u 15 % pacientů mohou objevit potíže způsobené leukostázou a např. u starších nemocných s přidruženými chorobami se s tímto projevem setkáváme častěji. K typickým projevům leukostázy patří

kašel, dušnost, poruchy zraku, priapismus, hučení v uších, závratě a výjimečně poruchy vědomí. K méně častým prvním klinickým příznakům CML patří trombo - hemoragické projevy, kde se 3x častěji objevují krvácivé komplikace. Méně často se vstupně u nemocných objevují bolesti svalů, kostí a kloubů nebo kožní projevy. K velmi raritním prvním projevům choroby, které byly popsány v minulosti, patří ruptura zvětšené sleziny, autoimunitní hemolytická anemie (AIHA) nebo čistá aplazie červené řady (PRCA).

Fyzikální vyšetření pacienta může být zcela bez abnormálního nálezu nebo může být přítomna mírná splenomegalie, která se zpravidla u pacientů objevuje až při hodnotách leukocytů nad $100 \cdot 10^9/l$. U pokročilejších fází choroby může být přítomna již výrazná splenomegalie s hepatomegalií, anemický vzhled pacientů nebo kožní krvácivé projevy. U pokročilejších fází CML můžeme rovněž zjistit přítomnost periferní lymfadenopatie.¹⁴⁻¹⁶

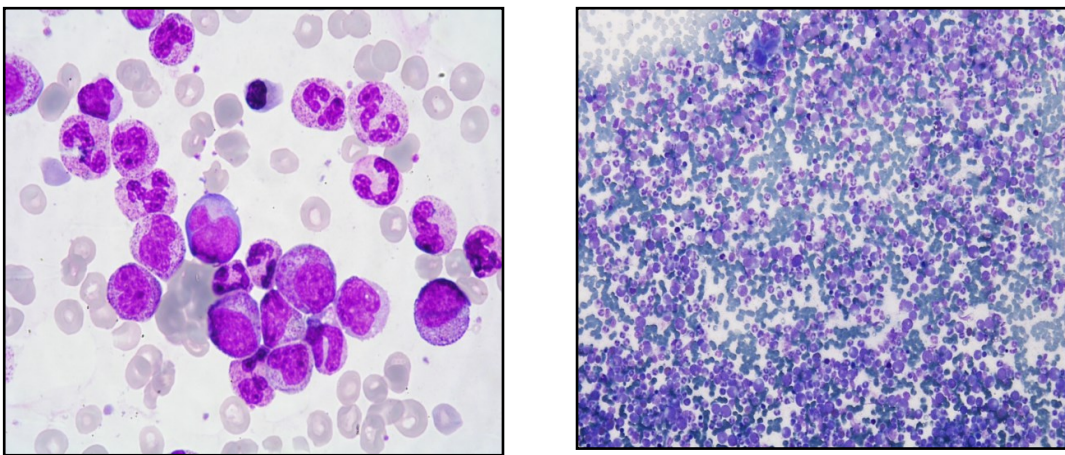
1.4 Diagnostika CML

Hlavní úlohu při stanovení této diagnózy má vyšetření kostní dřeně. Cytologicky zjistíme v chronické fázi výrazně buněčné nátěry s hyperplazií bílé řady, kdy poměr myeloidní a eryteroidní řady je 10:1 až 25:1 (obrázek č. 3). V akcelerované a blastické fázi se ve dřeni objevují vyšší počty bazofilů a blastů. K určení klonality blastů nám pomohou cytochemické metody, ale v současné době je toto vyšetření nahrazováno vyšetřením imunofenotypizačním. Rozhodujícím vyšetřením pro stanovení diagnózy CML je **klasické cytogenetické vyšetření dřeně**, které prokáže přítomnost filadelfského chromozomu (obrázek č. 4). U každého nemocného by mělo být hodnoceno nejméně 20 mitóz. Touto metodou můžeme rovněž zjistit přídatné cytogenetické změny. K nejčastějším přídatným cytogenetickým změnám patří přítomnost dalšího Ph chromozomu, trizomie chromozomu 8 nebo výskyt izochromozomu 17. V chronické fázi CML jsou tyto změny přítomny u 5 – 30 % pacientů, ale jejich výskyt výrazně narůstá s pokročilostí choroby. U blastické fáze CML se vyskytují až v 60 – 80 % případů.¹⁴

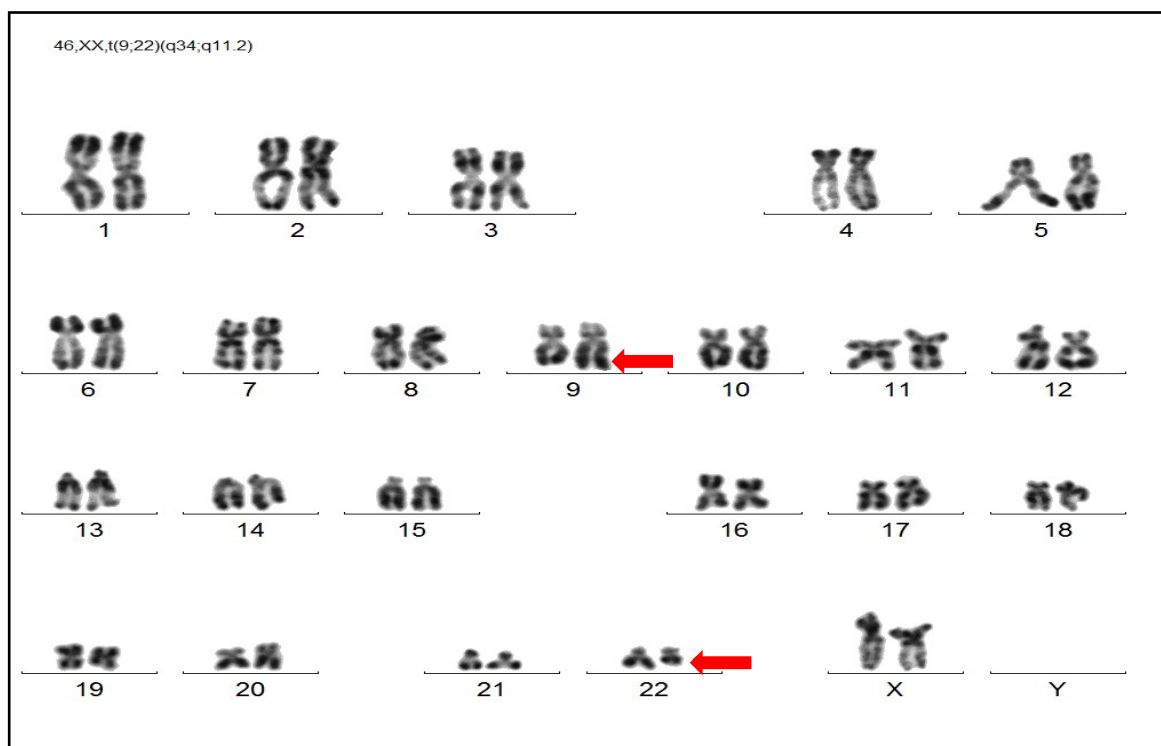
Typický Ph chromozom se vyskytuje asi u 90 % pacientů. U 5 % pacientů se vyskytují jeho variantní translokace, kdy kromě chromozomů 9 a 22 jsou do translokace zahrnuty i jiné chromozomy. Pacienti s variantními formami Ph chromozomu reagují na léčbu stejně a nebylo zjištěno, že by se jejich prognóza lišila. Na základě monitorování cytogenetických změn léčených pacientů bylo zjištěno, že se u pacientů mohou objevit chromozomové změny v Ph negativních buňkách. Incidence těchto změn se pohybuje mezi 2 – 10 %. Může se jednat

o rozvoj dysplastických změn ve dřeni, ale může se zřejmě jednat i o změny primární, které předcházely Ph klonu a při jeho potlačení dostává tento Ph negativní klon růstovou výhodu.
16, 17

V případě, že se filadelfský chromozom nedaří klasickou cytogenetikou detekovat, používá se ke stanovení přítomnosti genu BCR-ABL1 nebo jiných změn **fluorescenční in situ hybridizace** (FISH). Molekulárně genetickou metodou stanovení genu BCR-ABL1 je **kvalitativní polymerázová řetězová reakce s využitím reverzní transkriptázy** (RT-PCR). Zde jako materiálu můžeme využít kostní dřeně, ale i periferní krve. Stanovení genu má zásadní význam nejen v diagnostice CML, ale především následně v možnosti jeho kvantitativního sledování v čase a hodnocení molekulární odpovědi u nemocných. Tyto jednotlivé metody se liší svojí citlivostí. Citlivost metod cytogenetických je kolem 1 % (detekce 1 leukemické buňky mezi 100 normálními buňkami), ale citlivost molekulárních metod se pohybuje kolem 0,0001% (detekce 1 leukemické buňky v milionu leukocytů). Vyšetření histologie kostní dřeně se u pacientů s CML provádí jen v individuálních případech, např. při nemožnosti aspirovat kostní dřeň, kdy je nutné posouzení fibrózy nebo blastické transformace choroby.¹⁴



Obrázek č. 3: Nátěry periferní krve a kostní dřeně u CML (zdroj. P. Bělohlávková, I. Fatorová)



Obrázek č. 4: Karyotyp s průkazem Ph chromozomu (t9;22)(q34;q;11) (zdroj J. Rabasová)

1.5 Průběh a prognóza CML

1.5.1 Určení fáze CML

Chronickou myeloidní leukemii můžeme rozdělit do tří klinických fází choroby, které se liší svými projevy, ale především se významně liší prognózou nemocných. Naštěstí u 90 % pacientů je stanovena CML v její **chronické fázi (CML - CP)**, která má i nejlepší prognózu a velmi dobré léčebné výsledky. V současné době se domníváme, že očekávaná střední doba přežití nemocných léčených TKI je kolem 25 – 30 let. Dále může u nemocných být diagnostikována **akcelerovaná (AP) nebo blastická (BP) fáze choroby**, která svým agresivním průběhem odpovídá akutní leukemii. Tato nejagresivnější fáze se u části nemocných může objevit náhle jako první projev CML nebo se rozvine z již dříve zjištěné CML. K rozlišení těchto fází užíváme standardní kritéria podle ELN (European Leukemia Net) nebo WHO (World Health Organization) – viz tabulky č. 1 a č. 2.^{17, 18} V éře před užíváním TKI činilo riziko progresu z chronické fáze do blastické až 20 % případů ročně.

V současné době při léčbě TKI se riziko progresu pohybuje kolem 1 - 1,5 % ročně, a to především v prvních třech letech od diagnózy. Následně riziko progresu výrazně klesá. Častější je výskyt myeloidní transformace choroby (70 % případů) než lymfoidní transformace CML. Bohužel léčebné výsledky u blastické fáze stále nejsou dobré a medián přežití pacientů se pohybuje mezi 7 – 11 měsíci. V době před TKI byl medián přežití 3 - 4 měsíce.¹⁴ Vzhledem k těmto léčebným výsledkům je důležité včas odhalit rizikové pacienty a rozvoji obtížně léčitelné transformace zabránit.

Tabulka č. 1: Definice klinických fází CML (chronické, akcelerované a blastické fáze) podle European Leukemia Net doporučení¹⁷

Chronická fáze (CP)
<ul style="list-style-type: none"> • Blastů < 15 % v KD nebo PK • Blastů + promyelocytů ≤ 30% v KD nebo PK • Bazofilů ≤ 20% v PK • Trombocytů ≥ 100 x 10⁹/l
Akcelerovaná fáze (AP)
<ul style="list-style-type: none"> • Blastů 15 % - 29 % v KD nebo PK • Blastů + promyelocytů > 30 % v KD nebo PK • Bazofilů > 20 % v PK • Perzistující trombocytopenie (<100 x 10⁹/l) nezpůsobená léčbou
Blastická krize (BC)
<ul style="list-style-type: none"> • Blastů ≥ 30 % v KD nebo PK • Extramedulární blastická infiltrace

Tabulka č. 2: Definice klinických fází CML (akcelerované a blastické) dle World Health Organization (WHO) kritérií¹⁸

Akcelerovaná fáze (AP) – jedno či více z následujících kritérií je přítomno:
<ul style="list-style-type: none">• Blastů 10% - 19 % v KD nebo PK• Bazofilů ≥ 20 % v PK• Perzistující trombocytopenie ($<100 \times 10^9/l$) nezpůsobená léčbou nebo• Perzistující trombocytóza ($> 1000 \times 10^9/l$) nereagující na terapii• Zvětšující se slezina a narůstající počet leukocytů při léčbě• Klonální evoluce (tj. přídatné cytogenetické změny)
Blastická krize (BC) – jedno či více z následujících kritérií je přítomno:
<ul style="list-style-type: none">• Blastů $> 20\%$ v KD nebo PK• Extramedulární blastická infiltrace• Velká ložiska nebo shluky blastů v biopsii KD

1.5.2 Stanovení prognostických indexů

U všech pacientů v chronické fázi CML při stanovení diagnózy je nutné stanovení **prognostických indexů**, které nám určí riziko onemocnění u pacienta. V současné době jsou užívány tyto následující tři indexy. **Sokalovo a Hasfordovo skóre** na základě klinických a laboratorních parametrů rozděluje pacienty do skupin nízkého, středního a vysokého rizika. Sokalovo skóre bylo kalkulováno na skupině 800 CML pacientů léčených hydroxyureou nebo busulfanem v roce 1984 na základě multivariantní analýzy.¹⁹ Hasfordův index, nazývaný rovněž Euro index, byl kalkulován na metaanalýze 1303 pacientů léčených interferonem.²⁰ Ačkoliv éra TKI změnila především význam věku, jako negativního prognostického markeru, tyto indexy jsou stále v praxi užívány. Vzhledem k velmi složitým vzorcům pro výpočet těchto prognostických indexů jsou v praxi dostupné on-line kalkulátory:

- http://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/cml_score/

V nové éře léčby CML byl na skupině 2060 pacientů léčených imatinibem v první linii testován nový prognostický tzv. **EUTOS skóre** (The European Treatment and Outcome Study for CML), do kterého jsou zahrnuty pouze dva znaky, a to počet bazofilů v periférii a velikost sleziny.²¹ Význam tohoto indexu je v předpovědi dosažení cytogenetické odpovědi a přežití bez progresu a výpočet je rovněž dostupný on-line na adrese:

- http://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/eutos_score/

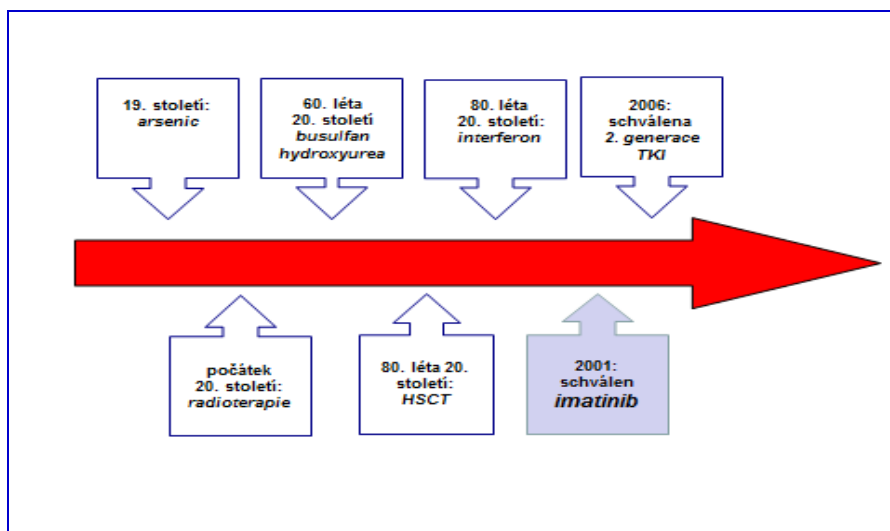
Tabulka č. 3: Výpočet rizikových skóre dle Sokala, Hasforda a EUTOS^{19, 21}

	Sokalovo skóre	Hasfordovo skóre	EUTOS skóre
Výpočet	$\text{Exp}[0.0116 (\text{věk} - 43,4) + 0,0345 (\text{velikost sleziny} - 7,51) + 0,188 ([\text{trombocyty}:700]^2 - 0,563) + 0,0887 (\text{blasty} - 2,1)]$	$(0,666 \times \text{věk} [0 \text{ pokud je věk} < 50 \text{ let, jinak } 1] + 0,042 \times \text{velikost sleziny (cm pod žeberní oblouk)} + 0,0584 \times \text{blasty} [\%] + 0,0413 \times \text{eozinofily} [\%] + 0,2039 \times \text{bazofily} [0 \text{ pokud jsou bazofily} < 3\%, \text{ jinak } 1] + 1,0956 \times \text{trombocyty} [0 \text{ pokud jsou trombocyty} < 1500 \times 10^9/\text{l, jinak } 1]) \times 1000$	$\text{Velikost sleziny} \times 4 + \text{bazofily} \times 7$
Nízké riziko	< 0,8	≤ 780	≤ 87
Střední riziko	0,8 – 1,2	781 – 1480	> 1480
Vysoké riziko	> 1,2	> 1480	> 87

1.6. Léčba chronické myeloidní leukemie

1.6.1 Vývoj léčby CML

V roce 1845 byl v Edinburghu patologem Johnem Bennettem popsán zřejmě první případ pacienta s CML. Velmi podobný případ jen o něco málo později popsal Rudolf Virchow, který rovněž poprvé užil termín leukemie („bílá krev“). Koncem 19. století se dospělo k rozlišení leukemií na akutní a chronickou a např. v roce 1876 byla do praxe zavedeno vyšetření kostní dřeně sternální punkcí. Do 60. let minulého století však léčba CML byla pouze paliativní. Z dalších metod se používalo například symptomatické ozáření sleziny. Lepší kontrolu nad chorobou přineslo užití perorálních cytostatik, nejprve to byl v roce 1959 busulfan a o 10 let později hydroxyurea. Při léčbě těmito preparáty není dosahováno žádných cytogenetických odpovědí, léky pouze umožňují částečnou kontrolu nad symptomy choroby a přežití pacientů se při této léčbě pohybovalo kolem 4 let. O něco lepší léčebné výsledky byly v 80. a 90. letech minulého století dosahovány při léčbě intereferonem. Doslova převratem pro CML pacienty se stalo na počátku tohoto století zavedení tyrozinkinázových inhibitorů do léčby CML (obrázek č. 5).²²



Obrázek č. 5: Vývoj léčby CML (zdroj P. Bělohávková)

1.6.2 Indikace leukaferézy u CML

Leukocytferéza a trombocytferéza patří mezi depleční metody, kdy centrifugací krve s nastavením příslušných parametrů na přístroji - separátoru, jsou nemocnému rychle odstraňovány leukocyty či trombocyty. U nemocných s CML se častěji setkáváme s nutností provedení leukocytferézy než trombocytferézy. Není určena žádná hranice počtu leukocytů, neboť vše záleží vždy na symptomech hyperviskózního syndromu u pacienta. U starších pacientů s přidruženými chorobami její provedení bude nutné jistě při nižších hodnotách leukocytů než u pacienta mladšího bez komorbidit. Podle doporučení ASFA (American Society for Apheresis) by se tato metoda ale měla vždy provést u hodnot leukocytů nad $400 \cdot 10^9/l$.²³ Deplece trombocytů se provádí při přítomnosti extrémně vysokých hodnot trombocytů $> 1500 - 2000 \cdot 10^9/l$, protože je nemocný v tuto chvíli ohrožen krvácivou komplikací shodně jako u ostatních Ph negativních myeloproliferativních chorob.

1.6.3 Léčba cytoredukční

Léčba cytoredukční nyní již ztratila svůj hlavní léčebný význam, ale v současné době je užívána v období velmi vysokých hodnot leukocytů u nově diagnostikované CML s cílem rychlejšího snížení hodnot leukocytů a zabránění rozvoji nebo zhoršování projevů hyperviskózního syndromu.

1.6.3.1 Busulfan

Busulfan se řadí mezi alkylační cytostatika a je derivátem sulfonových kyselin. Je podáván perorálně a obvyklá denní dávka se pohybuje mezi 4 - 8mg/den, respektive 0,1mg/kg/den. Busulfan pro léčbu CML byl k dispozici od 50. let minulého století. První skromné výsledky ze studie, kde bylo porovnáváno ozařování sleziny a léčba busulfanem, byly publikovány v roce 1968. Tyto výsledky prokázaly prodloužení přežití nemocných na 35 - 45 měsíců oproti 28 měsícům při ozařování sleziny. K nežádoucím účinkům patří cytopenie až ireverzibilní aplazie kostní dřeně, zhoršení jaterních testů a po dlouhodobé medikaci může dojít k rozvoji fibrózy dřeně. V současné době v hematologii má busulfan svoje místo jako

součást přípravných režimů před HSCT např. v kombinaci s cyklofosfamidem nebo fludarabinem (BUCY, BUFLU).^{14, 24}

1.6.3.2 Hydroxyurea

Hydroxyurea postupně vytěsnila v léčbě CML busulfan pro menší výskyt toxicity. Počátkem 90. let rovněž byly publikovány výsledky randomizovaných studií, které prokázaly lepší medián přežití u hydroxyurey oproti větvi s busulfanem. Hydroxyurea mechanismem účinku patří do skupiny antimetabolitů, je inhibitorem ribonukleotidreduktázy a způsobuje selektivní inhibici buněčného cyklu. Úvodní dávka hydroxyurey se pohybuje mezi 1,5 – 3g/denně, respektive 40 - 50 mg/kg/den. Účinek nastupuje rychle, proto je využívána i v současné době k rychlejší redukci počtu leukocytů po stanovení diagnózy CML. Nežádoucí účinky nejsou tak závažné jako u busulfanu. Pouze u malého počtu pacientů může náhle dojít k rozvoji cytopenie, dále se setkáváme s kožními reakcemi a dyspeptickými potížemi. Při léčbě hydroxyureou dosahovalo kolem 80 % pacientů parciální či kompletní hematologické remise, ale cytogenetická odpověď byla potvrzena velmi vzácně. Udávané přežití pacientů léčených hydroxyureou se pohybuje mezi 48 - 69 měsíci.^{14, 24}

1.6.4 Léčba interferonem

Interferon alpha (IFN α) byl objeven v roce 1957 a do léčby pacientů s CML by zaveden od roku 1981. Před objevem TKI u CML tato léčba byla metodou volby u pacientů, kteří nebyli indikováni k alogenní transplantaci. Přesný mechanismus účinku není znám, jistě se však jedná o imunomodulační efekt na více úrovních. Bylo např. prokázáno, že interferon alfa inhibuje růst progenitorových buněk v kostní dřeni, redukuje počet leukocytů a zřejmě způsobuje i snížení exprese BCR-ABL1. K dalším mechanismům patří zvýšení aktivity NK - buněk a Tc lymfocytů, suprese cytokinu IL-8 a ovlivnění dalších imunitních pochodů. V dávkování interferonu byly zastávány dva směry: podávání vysokých dávek (9 - 10 MIU s. c. denně) nebo princip nízkého dávkování interferonu (3 MIU s. c. denně či ob den).^{25 - 27} Výsledky jednotlivých studií prokázaly, že léčebný efekt není závislý na dávce, ale na určité individuální citlivosti nemocných, proto bylo následně nejčastěji užíváno dávkování 3 MIU

3x týdně. Dle výsledků několika studií léčba intereferonem byla schopna navodit u 22 – 80 % hematologickou remisi a dosažení kompletní cytogenetické odpovědi bylo pozorováno u 2 – 26 % pacientů. Na léčbu zpravidla lépe odpovídali mladší nemocní s nižším rizikem dle Sokala. Bohužel asi 20 – 30 % nemocných bylo na léčbu interferonem rezistentních, a tak se přežití pacientů pohybovalo kolem 6 let. V roce 1997 byly publikovány výsledky francouzské studie, kdy zlepšení léčebného efektu interferonu přineslo přidání nízkých dávek cytosinarabinosidu. Avšak i v této studii se objevila rezistence na léčbu u 17 % pacientů při kombinované léčbě a u 25 % pacientů léčených pouze interferonem.²⁸

Léčba interferonem je provázena relativně vysokou toxicitou. Při zahájení léčby se vyskytují asi u 1/3 pacientů projevy označované jako „flu-like“ syndrom (teplota, zimnice, třesavka, bolesti hlavy a svalů). Z dalších nežádoucích účinků jsou to lokální reakce na injekci, nevolnost, bolest břicha či emoční labilita až deprese. Vzhledem k mechanismu účinku interferonu se rovněž často jako vedlejší projev objevují autoimunitní projevy – imunitní hemolytická anemie a trombocytopenie, revmatoidní artritida, glomerulonefritida.

1.6.5 Léčba tyrozinkinázovými inhibitory

Objev tyrozinkinázových inhibitorů znamenal doslova převrat ve výsledcích léčby CML pacientů a rovněž se jednalo o první cílenou léčbu v hematologii. Prvním preparátem byl imatinib mesylát, který se na základě výsledků studie fáze I a II z konce 90. let minulého století stal v roce 2001 nejrychleji schváleným preparátem do klinické praxe. Vývoj na poli CML však pokračoval a v současnosti jsou již k dispozici další účinnější tyrozinkinázové inhibitory 2. generace – dasatinib, nilotinib, bosutinib a zástupce 3. generace TKI – ponatinib. V současné době jsou ve fázi studií i další inhibitory jako např. radotinib a bafetinib. Tyto jednotlivé TKI inhibitory se liší svojí vazbou na BCR-ABL1 včetně rozdílné citlivosti k mutacím, dále mají různé spektrum inhibice dalších tyrozinkináz. Toto vysvětluje i výskyt rozdílných nežádoucích účinků během léčby TKI.

1.6.5.1 Imatinib

Imatinib mesylát je účinný perorální inhibitor tyrozinkinázy a jeho mechanismus účinku je nejlépe prozkoumán na BCR-ABL1 pozitivních buňkách. Imatinib **inhibuje BCR-ABL1** aktivovanou tyrozinkinázu obsazením místa, kde se váže kyselina adenosintrifosforečná (ATP) a tímto dochází k zablokování fosforylace bílkovin a je zastavena aktivace celé řady signálních drah, které se podílejí na vzniku leukemického klonu. Podle dnešních poznatků imatinib nezabrání vzniku leukemického genu BCR-ABL1, ale inhibuje rozvoj účinků tohoto genu na proteinové úrovni. Imatinib svým působením rovněž vede k apoptóze leukemických buněk a inhibuje proliferaci patologického klonu.

Po perorálním užití se imatinib vstřebává rychle a maximálních koncentrací dosahuje za 1-3 hodiny bez závislosti na jídle. Biologická dostupnost dosahuje 97 % a poločas působení je mezi 15 – 20 hodinami. V plazmě se imatinib váže na bílkoviny, především na albumin a dále na α -1 kyselý glykoprotein (AGP). K vyváženému stavu hladin dochází asi po měsíci léčby preparátem. Imatinib je dále metabolizován v játrech cytochromatickým systémem P450, a to zejména enzymem CYP3A4. Metabolity imatinibu jsou eliminovány ze 70 % stolicí a 10 % je vylučováno močí. Asi kolem 20 % je vylučováno stolicí v jeho nezměněné formě.^{29, 30}

V roce 1998 byla zahájena iniciální studie fáze I s imatinibem, která hledala vhodnou dávku léku. Následně byla v roce 1999 zahájena studie fáze II s dávkou imatinibu 400 mg denně perorálně u 532 CML pacientů rezistentních nebo netolerujících interferon- α . Výsledky byly velmi nadějně, protože 95 % pacientů dosáhlo kompletní hematologickou odpověď, 41 % kompletní cytogenetickou odpověď a 60 % velkou cytogenetickou odpověď. Při dalším 60 - měsíčním sledování se četnost dosažených kompletních odpovědí ještě zvýšila na 60 %.

Nejdelší pozorování léčby imatinibem nám dává **studie fáze III s názvem IRIS**, do které byli od června 2000 zařazováni pacienti s nově diagnostikovanou CML. Cílem této studie bylo porovnat léčbu imatinibem s předchozím léčebným standardem, tedy léčbou kombinací interferonu- α s cytosinarabinosidem. Již po 18 M léčby byl patrný výrazný rozdíl v léčebné odpovědi, protože ve větvi s imatinibem dosáhlo CCyR 76 % pacientů oproti pouhým 15 % CCyR ve větvi pacientů léčených interferonem.^{31 - 40}

Výsledky 8- letého sledování této studie ukazují, že 55 % zařazených pacientů nadále pokračuje v léčbě imatinibem se stabilní molekulární odpovědí. U 45 % pacientů však nebylo v léčbě imatinibem pokračováno, ale pouze u 25 % pacientů byla nutnost změny léčby z důvodu neuspokojivé odpovědi nebo léčebné toxicity. V 17 % případů se jednalo o ztrátu

nemocného ze sledování. Celkové přežití nemocných je 85 % a v případě, že bychom nehodnotili úmrtí nesouvisející s CML, tak 8- leté celkové přežití činí dokonce 93 %. Progrese do pokročilejších fází CML (AP, BC) se vyskytla pouze u 3 % pacientů a neobjevila se u žádného pacienta, kde byla ve 12 měsíci byla přítomna velká molekulární odpověď. ^{41 - 43}

Léčba imatinibem je zpravidla dobře snášena a výskyt nehematologické toxicity vyššího stupně, tedy stupně 3 a 4 je velmi nízký. Z nehematologické toxicity se nejčastěji setkáváme s retencí tekutin, nevolností a zvracením, bolestmi břicha, průjmem, bolestmi či křečemi svalů. Z hematologické toxicity se nejčastěji setkáváme s rozvojem neutropenie stupně 3 a 4 u

35 – 45 % případů, rozvoj trombocytopenie stupně 3 a 4 dle různých studií je pozorováno u 20 – 25 % pacientů, rozvoj anemie stupně 3 a 4 se pohybuje kolem 4 - 5 %. Výskyt této toxicity je dán pokročilostí CML, přítomností fibrózy či dysplázie ve dřeni. Je důležité zmínit, že výskyt nehematologické a hematologické toxicity významně po 1 – 2 letech po zahájení léčby imatinibem klesá. Vždy je potřeba individuální přístup k řešení polékové toxicity, aby přerušování léčby CML bylo na co možná nejkratší dobu, především v prvních měsících od diagnózy to významně ovlivní výsledný léčebný efekt. ^{44 - 46}

Tabulka č. 4: Výskyt nehematologické toxicity imatinibu ve studii IRIS po 5 letech ⁴¹

Nejčastější NÚ	Všechny stupně NÚ, %	Stupeň NÚ 3 /4, %
• Periferní otoky	60	2
• Nevolnost	50	1
• Svalové křeče	49	2
• Bolesti svalů a kostí	47	5
• Průjem	45	3
• Vyrážka / kožní problémy	40	3
• Únava	39	2
• Bolest břicha	37	4
• Bolest kloubů	31	3
• Bolest hlavy	37	< 1

Tabulka č. 5: Výskyt hematologické toxicity imatinibu ve studii IRIS po 5 letech ⁴¹

Nežádoucí účinek	Případů celkem (%) (n = 551)
• Neutropenie	17
• Trombocytopenie	9
• Anemie	4

Anemie: stupeň-1 Hb > 100 g/l, stupeň-2 80 – 99 g/l, stupeň-3 65 – 79 g/l, stupeň-4 < 65 g/l, Absolutní počet neutrofilů (ANC): stupeň-1 < N – 1,5 x 10⁹ /l, stupeň-2 < 1,5 – 1,0.10⁹ /l, stupeň-3 < 1,0 – 0,5 10⁹ /l, stupeň-4 < 0,5.10⁹ /l, Tromboocyty: stupeň-1 < norma – 75.10⁹ /l, stupeň-2 < 75 – 50.10⁹ /l, stupeň-3 < 50 – 25.10⁹ /l, stupeň- 4 < 25.10⁹ /l.

1.6.5.2 Dasatinib

Dasatinib řadíme do skupiny TKI 2. generace a jedná se o látku odlišné chemické struktury než imatinib. Ve studiích in vitro byla u dasatinibu prokázána 325 -krát výraznější inhibiční aktivita ve srovnání s imatinibem. Dasatinib je selektivním kompetitivní inhibitorem tyrozinové kinázy ABL, BCR-ABL1, c-KIT, PDGFR α a dalších kináz rodiny SRC. Pro výsledný efekt dasatinibu je důležitá jeho schopnost vazby s BCR-ABL kinázou jak v její inaktivní, tak i v aktivní konformaci. Vzhledem k těmto jiným vazbám dasatinibu oproti imatinibu je také účinný u celé řady mutací, avšak rezistence byla zjištěna u mutací T315, F317 a V299. Další výhodou dasatinibu je skutečnost, že do buněk je transportován pasivně nebo jinými na h-OCT (human organic cation transporter) nezávislými mechanismy. Tímto se rovněž výrazně odlišuje od imatinibu. Farmakokinetika dasatinibu navíc není ovlivněna činností transportního efluxního proteinu MDR1 (multidrug resistance). Od roku 2003 proběhly první studie START (Src/Abl Tyrosine kinase inhibition Activity Research Trial), které sledovaly účinnost a bezpečnost léčby dasatinibem v akcelerované fázi CML (START-A), v blastické fázi CML (START-B), u Ph⁺ akutní lymfoblastické leukemie (START-L) a v chronické fázi CML (START-C, START-R) u pacientů rezistentních na imatinib či imatinib netolerovali. Další důležitou studií byla studie CA 180-034, jejímž cílem bylo porovnání účinnosti různého dávkování dasatinibu.^{47 - 51} Na základě těchto výsledků bylo pro léčbu CML-CP ve druhé linii doporučeno a schváleno dávkování 100 mg jednou denně a bylo zjištěno, že i tato intermitentní inhibice dasatinibem BCR-ABL přináší plný terapeutický účinek s nejlepší tolerancí léčby.

V dnešní době jsou rovněž známy výsledky z multicentrické randomizované studie DASISION, která porovnávala u nově diagnostikovaných CML pacientů efekt léčby imatinibem 400 mg denně vs. dasatinib 100 mg denně. Ve studii bylo zjištěno, že při léčbě dasatinibem je dosaženo rychlejšího navození cytogenetické a molekulární odpovědi. Ve větvi s dasatinibem po 12 M léčby dosáhlo CCyR 77 % pacientů oproti CCyR u 66 % pacientů ve větvi s imatinibem.⁴⁸ V současné době máme k dispozici 3- letá data, kde ve větvi s dasatininem CCyR 83 % a MMR 76 % a ve větvi s imatinibem je CCyR 78 % a MMR 64 %.^{52 -55} Celkové přežití a přežití bez události jsou v obou ramenech shodné. FDA byl dasatinib schválen jak pro užití ve 2. linii, ale i pro léčbu CML v 1. linii. V ČR zatím není úhrada pro užití dasatinibu v 1. linii schválena.

Dasatinib je poměrně dobře tolerován a z nehematologické toxicity je třeba zmínit výskyt nevolnosti a průjmu, kožní vyrážku, bolesti kostí, svalů, periferní otoky, horečku nebo zhoršení jaterních funkcí. Ojedinele dochází k prodloužení QT intervalu. K nejzávažnější toxicitě při léčbě dasatinibem patří rozvoj pleurálního výpotku, se kterým se setkáváme asi u 20 % - 25 % pacientů. Naštěstí se ve většině případů jedná o stupeň 1 a 2. Příčina vzniku výpotků není jednoznačná, ale spekuluje se o imunitních vlivech dasatinibu. Tuto teorii by potvrzovala i skutečnost, že se vyskytuje častěji u nemocných se současnou anamnézou autoimunitního onemocnění. Hematologickou toxicitu u pacientů léčených imatinibem vidáme častěji než při léčbě imatinibem. Neutropenie stupně 3 a 4 se vyskytuje u 45 %, anémie stupně 3 - 4 u 20 % a trombocytopenie stupně 3 - 4 u 35 – 45 % nemocných léčených v chronické fázi. U pokročilejších fází je výskyt opět častější a pohybuje se kolem 50 – 70 %.

1.6.5.3 Nilotinib

Nilotinib je analogem imatinibu a byl vyvinut na základě zkoumání krystalické struktury imatinibu, ve kterých bylo zjištěno, že účinnost lze zvýšit vložím alternativních vazebných skupin. Jeho vyvinutí předpokládalo skutečnost, že je nutno udržet jeho vazbu i inaktivně konformované ABL kinázové doméně. Dle in vitro studií je tato vazba asi 30- krát silnější oproti imatinibu. Studie fáze I a II posuzovaly bezpečnost léku a hledaly vhodnou dávku. Během tohoto zkoušení se prokázalo, že při zvýšení denní dávky nad 600 mg, nedochází ke zvýšení plasmatických hladin (plateau bylo dosaženo při 400 mg denně). V dalším testování se přešlo na rozdělení denní dávky na 2x denně, kdy se až o 3 % zvýšila expozice léku, ale v případě užití léku s jídlem by expozice dosáhla až 80 %. Z tohoto důvodu musí nemocní dodržovat lačnění 2 hodiny před a po užití léku. Podobně jako u dasatinibu byla nejprve ve studiích prověřována účinnost nilotinibu u pacientů, kteří selhali na léčbě imatinem nebo ji z důvodu toxicity netolerovali.^{56 - 59} V těchto studiích byla prokázána vysoká účinnost preparátu při dávkování 400 mg 2x denně, a proto byl v roce 2007 schválen pro léčbu 2. linie.

Dalším cílem bylo prokázat účinnost nilotinibu v 1. linii, tedy u nově diagnostikovaných pacientů ve studii ENESTth.^{60, 61} V této studii byli nemocní randomizováni do třech větví: imatinib 400 mg denně, nilotinib 300 mg a 400 mg 2x denně. Dle výsledků MMR po 12 M léčby byly prokázány vyšší počty dosažené MMR v obou

větvích s nilotinibem (MMR 44 a 43 % vs. 22 % imatinib). Po šesti letech sledování činí rozdíl v dosažené MMR ve skupinách s nilotinibem oproti skupině léčené imatinibem 16 – 18 %. Při hodnocení celkového přežití a přežití bez události musíme konstatovat, že v jednotlivých skupinách jsou pouze minimální rozdíly (OS 92,2 – 97,8 %), ale při léčbě nilotinibem bylo sníženo riziko progresu do pokročilejších fází CML oproti léčbě imatinibem (1,1 % a 1,8 % ve větvích s nilotinibem vs. 6 % ve větvi s imatinibem). Na základě těchto výsledků byl v roce 2010 nilotinib FDA schválen pro použití v léčbě 1. linie v dávce 300 mg 2 x denně a v těchto obou indikacích je rovněž dostupný k léčbě CML v ČR.

Spektrum nežádoucích účinků se u tohoto TKI mírně liší oproti ostatním TKI. V porovnání s ostatními TKI je zde přítomen nejnížší výskyt hematologické toxicity, ze které je nejčastější rozvoj trombocytopenie. Rozvoj trombocytopenie stupně 3 a 4 se vyskytuje asi u 25 % pacientů. Rozvoj neutropenie je přítomen asi u 9 % a k rozvoji anémie u 5 % pacientů. K častějším projevům nehematologické toxicity patří nevolnost, únava, svědění kůže a vyrážka, průjem a biochemické abnormality (hyperglykémie, porucha glukózové tolerance, zvýšení jaterních testů, zvýšení amylázy a lipázy). U nilotinibu může dojít k prodloužení QT intervalu, proto kontroly EKG patří do nutných vyšetření po nasazení nilotinibu. Rovněž je léčba nilotinibem kontraindikována při současné léčbě léky, které QT interval prodlužují. Přestože je nilotinib analogem imatinibu, existuje jen minimální zkřížená intolerance mezi těmito dvěma léky.

1.6.5.3 Bosutinib

Bosutinib je podobně jako dasatinib duálním inhibitorem kináz ABL a SRC a ve studiích byla potvrzena vysoká účinnost u rezistentních pacientů, ale mimo mutaci T315I. Narozdíl od předcházejících TKI bosutinib neaktivuje c-KIT a PDGR, proto má jiný profil toxicity. Na základě výsledků studie BELA u pacientů rezistentních nebo netolerujících předchozí dva druhy TKI byl bosutinib rovněž v roce 2012 schválen FDA do klinické praxe. Bosutinib v této studii dosáhl u 40 % pacientů CCyR a doporučená denní dávka byla 500 mg jednou denně. Po 2 letech léčby na léčbě bosutinibem zůstává 29 % nemocných. K nejčastěji přítomným nežádoucím účinkům patřily zažívací potíže, a to především průjem, který byl přítomen až u 80 % pacientů. U velké většiny pacientů ale v čase ustupoval za současné podpůrné léčby. Další vedlejší účinky zahrnovaly nevolnost, zvracení a některé laboratorní

odchyly (zvýšení glykemie, zvýšení jaterních testů, amylasy).^{66 - 68} Trombocytopenie stupně 3 a 4 se objevila u 30 % pacientů, anemie u 14 %, neutropenie u 14 % léčených pacientů. V roce 2014 byla zahájena multicentrická studie BFORE, která je určena pro nově diagnostikované pacienty s chronickou fází CML, kteří jsou randomizováni do větve s imatinibem 400 mg 1x denně a bosutinibem 400 mg 1x denně, ale na výsledky této studie si budeme muset ještě počkat.

1.6.5.5. Ponatinib

Ponatinib představuje dalšího zástupce TKI a v in vitro studiích byla potvrzena inhibice nemutované BCR-ABL kinázy, ale především rovněž jejích mutovaných variant. Velmi důležitá je také účinnost ponatinibu vůči polyrezistentní **mutaci T315I**. V současné době máme již k dispozici výsledky studie fáze II PACE, kam byli zařazeni nemocní s CML a Ph pozitivní ALL výrazně předléčení, respektive nemocní byli rezistentní nebo netolerovali dasatinib či nilotinib. U pacientů s CML - CP bylo po 12 M léčby v 56 % dosaženo MCyR a v této skupině byla u 70 % nemocných přítomna rezistentní mutace T315I. Na základě těchto výsledků byl ponatinib v roce 2012 schválen FDA k léčbě Ph+ALL či CML ve všech fázích choroby v případě rezistence či intolerance předchozí léčby výše uvedenými TKI. Důležitá je rovněž skutečnost, že 57 % pacientů zůstalo na léčbě ponatinibem déle než 2 roky.⁶² K nejčastěji se vyskytujícím vedlejším účinkům ponatinibu patří vyrážka a svědění kůže, bolesti břicha, hlavy, bolesti svalů a abnormality jaterních testů, amylasy, lipázy. Z hematologické toxicity stupně 3 - 4 se nejčastěji vyskytuje trombocytopenie (28 %), neutropenie (14 %) a nejméně anemie (2 %).

V roce 2012 byla zahájena studie EPIC, která měla posoudit léčebnou odpověď a bezpečnost v 1. linii léčby CML.^{63 - 65} Nově diagnostikovaní CML nemocní byli randomizováni mezi imatinib 400 mg denně a ponatinib 45 mg denně. V této studii se však rychle objevil vyšší výskyt závažných cévních příhod (rameno ponatinib 7% vs. rameno imatinib 0 %), proto tato studie byla zastavena. Cévní komplikace se objevila u 12 pacientů, ale je známo že 11/12 těchto nemocných mělo minimálně 1 či více rizikových faktorů pro rozvoj kardiovaskulární příhody (diabetes mellitus, arteriální hypertenze, kouření atd). Přesný mechanismus negativního rychlého ovlivnění endotelu ponatinibem není dosud znám, spekuluje se i o přímém vlivu preparátu na endotel. Z důvodu vysokého rizika cévní toxicity

je tedy ponatinib od 1/2014 povolen v klinické praxi pouze v omezené indikaci rezistentních forem CML. V ČR nemá ponatinib úhradu a byl by k dispozici pouze v individuálních případech pacientů po schválení pojišťovnou po vyčerpání všech ostatních léčebných možností.

1.6.6 Možnosti vysazování TKI

Užívání TKI u CML pacientů se zatím považuje za trvalé a vysazení medikace se podle současných doporučení doporučuje pouze ve studiích za velmi častých kontrol kvantity BCR-ABL 1. V roce 2007 byla zahájena ve Francii první studie STIM, do které bylo zařazeno 100 pacientů s CML s hlubokou molekulární odpovědí trvající déle než 2 roky. Po vysazení imatinibu během 7 M došlo k molekulárním relapsu u 61 % pacientů, ale opětovné nasazení imatinibu navodilo u všech nemocných MMR.⁶⁹⁻⁷¹ Další podobně velkou studií je studie EUROSKI, do které bylo od roku 2012 zařazeno 498 pacientů z 10 zemí včetně ČR.⁷² Podmínkou zařazení pacienta bylo užívání TKI minimálně 3 roky a hluboká MR trvající déle než 12 M. V této studii došlo ke ztrátě MMR u 47 % pacientů s CML, kteří byli léčeni TKI méně než 8 let a naopak pouze u 26 % pacientů, kteří bylo léčeni TKI déle než 8 let. Na základě těchto výsledků se zdá, že zatím jediným prognostickým faktorem ztráty MR je délka předchozí léčby CML.

1.7 Léčba CML v těhotenství

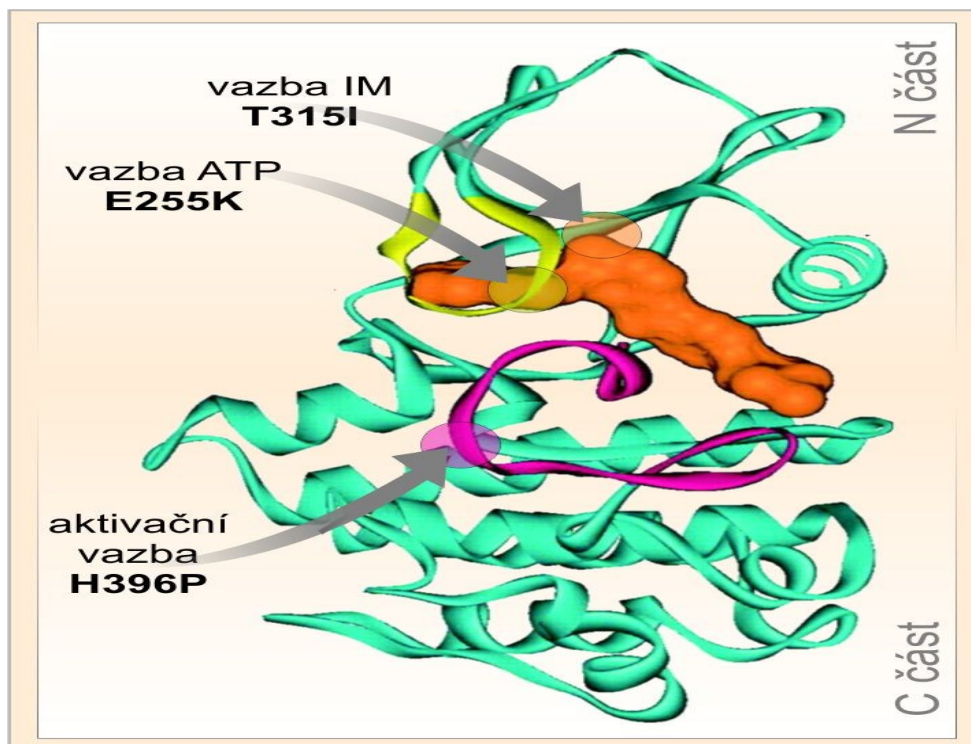
U všech tyrozinkinázových inhibitorů byl prokázán možný teratogenní a embryotoxický efekt, proto všechny ženy v reprodukčním věku musí být o této skutečnosti informovány. Byly však již publikovány kazuistiky žen, které přes medikaci imatinibem porodily zdravé dítě. ⁶⁴ Nejsložitější situaci představuje nově diagnostikovaná pacientka s CML v časném stadiu gravidity. Dlouhodobé přežití nemocných s CML je závislé na co nejrychlejším potlačení choroby, kterého bez užití TKI však nedosáhneme. V případě, že si nemocná přeje pokračovat v graviditě i přes všechna rizika, metodou volby léčby CML jsou aferetické metody ke snížení počtu leukocytů a od II. trimestru je pak možné podávání interferonu. Při plánovaném početí záleží na aktuálním stavu choroby, respektive na hloubce molekulární odpovědi. V ideálním případě by nemocná měla mít alespoň 2 roky trvající MMR. V optimálním případě by bylo vhodné na 1- 3 měsíce před početím léčbu TKI přerušit. Současně je nezbytná spolupráce s gynekologem, aby šance na početí byly u pacientky co nejvyšší. U pacientek je pravidelně v měsíčních intervalech kontrolována molekulární odpověď a při zvýšení hodnoty transkriptu je zahájena léčba interferonem- α . Vzhledem k vylučování imatinibu i dalších TKI do mateřského mléka není kojení doporučováno. ^{73 - 75}

1.8 Mechanismy rozvoje rezistence

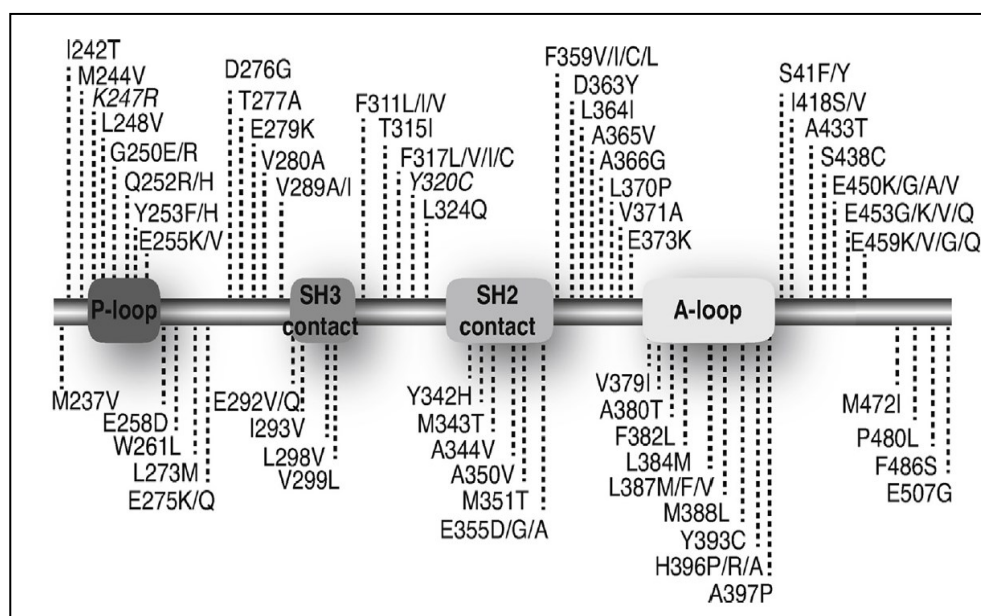
Rezistenci na TKI můžeme rozdělit na rezistenci primární a sekundární. Z hlediska mechanismů rezistence je dělíme na BCR-ABL1 závislé a na rezistence BCR-ABL1 nezávislé s výskytem 50 - 60 % vs. 40 - 50 % případů. **Primární rezistence** znamená, že pacient je k dané léčbě refrakterní a nedosahuje optimální léčebné hematologické, cytogenetické nebo molekulární odpovědi v daném časovém období. Vyskytuje se asi u 25 % pacientů. O příčinách jejího rozvoje máme pouze částečné informace. Za možné dva mechanismy se považuje nedostatečná inhibice BCR-ABL kinázy (nedostatečná hladina TKI) a nedostatečný počet normálních hematopoetických buněk určených k obnově zdravé krvetvorby ve dřeni pacienta. ^{76 - 79}

V případě, že pacient již během léčby CML některý druh optimální odpovědi získal a dojde ke ztrátě této optimální odpovědi, mluvíme o rozvoji **sekundární rezistence**. K příčinám na BCR-ABL1 závislých rezistencí patří vznik **mutací v kinázové doméně, amplifikace genu a overexprese transkriptu BCR-ABL1**. S rozvojem této sekundární rezistence se setkáváme asi u 20 % pacientů v chronické fázi, u 50 % v akcerelované fázi a u 80 % pacientů v blastické fázi CML. Rozvoj mutací v BCR-ABL1 kinázové doméně představuje v současné době nejčastější mechanismus vzniku sekundární rezistence na TKI. Poprvé byla mutace popsána v roce 2001 u 11 pacientů s CMP - BP a Ph pozitivní ALL. Jednalo se o mutaci T-315 (obrázek č. 6). Do dnešní doby bylo popsáno již kolem 100 mutací a mutace jsou děleny podle místa výskytu v kinázovém komplexu (obrázek č. 7). Poloha mutace také předurčuje citlivost k jednotlivým TKI a liší se rovněž i klinická závažnost mutací. Na základě klinických data ze studií u rezistentních pacientů a ověřením in vitro testováním máme k dispozici přehled nejčastějších mutací a jejich citlivost k jednotlivým TKI (viz tabulka č. 6). Tato skutečnost nám pomůže při výběru vhodného TKI u rezistentní choroby.^{80–84}

Mechanismy rezistence na BCR-ABL1 nezávislé zahrnují neochotu pacienta spolupracovat (non-compliance), poruchu vstřebávání léku z trávicího traktu, sníženou dostupnost léku v plazmě, změny na úrovni transportních mechanismů a vznik klonální evoluce. Užívání léku pacientem je zcela klíčovým momentem a přes všechnu edukaci dle různých prací se adherence k léku u pacientů pohybuje kolem 70 %. Navíc je známo, že adherence je vyšší v prvním roce léčby a následně ještě klesá. V některých případech neužívání preparátu může být způsobeno přítomností nežádoucích účinků, které pacienta obtěžují. Je nutné tedy správné vedení léčby a řešení případné toxicity léčby.



Obrázek č. 6: Umístění mutace T315 v kinázovém komplexu
(upraveno podle J. M. Goldmana, Blood, 2007) ⁸⁵



Obrázek č. 7: Jednotlivé typy mutací podle umístění v kinázovém komplexu
(zdroj K. Machová Poláková)

Tabulka č. 6: In vitro citlivost nemutované BCR-ABL1 kinázové domény a jejích nejčastějších mutací na imatinib, nilotinib a dasatinib ⁹²

Typ mutace	Rozmezí IC 50 (ng/ml)		
	Imatinib	Nilotinib	Dasatinib
Nemutovaný BCR-ABL	153-400	< 5-13	0,4-0,9
M244V	944-1829	20,1-20,6	0,7
L248V	1101-5900	26-486	4,7
G250E	796 - > 11800	25-116	0,9-4,1
Q252H	433-1841	8-37	1,7-2,8
Y253F	1114-5274	30-66	0,7-1,5
Y253H	> 3800-10442	238-698	1,3-10
E255K	1873 - > 5900	63-299	2,8-6,6
E255V	3605-5282	96-384	3,2-5,6
D276G	677	19	1,3
E279K	1104	19-40	1,5
V299L	319-480	13	8-9,1
F311L	283-767	12	0,7
T315I	> 3800- > 11800	369 - > 5300	69,3- > 500
T315A	448	NA	63
F317L	620-4425	21-48	3,7-9,1
F317V	207-295	185	27
F317C	708	NA	NA
M351T	519-2891	4,1-20,1	0,6-0,8
E355G	1404	NA	NA
F359V	826-1077	48-93	1,1-1,4
F359C	708	NA	NA
V379I	590-962	27	0,4
L384M	398-1652	21-22	2
L387M	590-649	26	1
H396R	1032-3186	22-29	0,7-1,5
H396P	850-2537	22-23	0,3-1
F486S	1609-5369	17-46	2,8

Vysvětlivky: IC 50, 50% inhibiční koncentrace, tj. koncentrace léku, která inhibuje 50% růstu buněk transfekovaných s nemutovaným genem BCR-ABL a jeho nejčastějšími mutantními variantami v buněčných kulturách BaF3; NA, not applicable

K dalšímu důležitému faktoru nezávislému BCR-ABL1 patří výskyt klonální evoluce, která znamená objevení se nových cytogenetických změn v Ph pozitivních buňkách. Protože tento jev je spjat s genomovou nestabilitou, nejčastěji se s ním setkáme u pokročilejších fází CML (blastická fáze 80 %). K nejčastěji zastiženým novým změnám patří trizomie chromozomu 8 (34 %), izochromozom 17 (20 %) a duplikace Ph chromozomu (20 %) a méně často trizomie chromozomu 17,19, 21 nebo delece 7. chromozomu.⁷⁶⁻⁷⁹

Ačkoliv přítomnost mutací velmi často vysvětluje rezistenci na TKI, zatím není jednoznačně vysvětleno, proč imatinib a ostatní TKI nedokáží eradikovat všechny kmenové buňky. Na vysvětlení této problematiky pracuje mnoho vědeckých skupin. Jednou z hypotéz je např. přítomnost overexprese BCR-ABL1, ale jiné práce prokázaly, že není rozdíl mezi dosaženou hladinou v těchto kmenových buňkách a buňkách více vyzrálých. Nalezení možnosti ovlivnění těchto buněk by jistě přineslo další pokrok do léčby CML.⁸³

1.9 Farmakokinetika imatinibu

V současné době je nejvíce z TKI prostudovaná **farmakokinetika imatinibu**. Je prokázáno, že u pacientů existuje velká variabilita dosažených hladin imatinibu jak v plazmě, tak intracelulárně. Příčinou těchto rozdílů může být *variabilita vstřebávání z trávicího traktu, zvýšená vazba na bílkoviny* (albumin 90 %, kyselý α - 1 glykoprotein 10 %), *variabilita transportních mechanismů imatinibu, variabilita metabolismu v játrech*. V játrech je imatinib dominantně metabolizován na aktivní metabolit prostřednictvím cytochromu **CYP3A4** a **CYP3A5**. Ostatní cytochromy hrají v metabolismu imatinibu velmi malou roli (CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19). Imatinib má rovněž výrazné interakce s preparáty, které jsou inhibitory, induktory a substráty pro CYP3A4 a CYP3A5 (dexametazon, fenytoin, fenobarbital, klaritromycin atd). Na tento fakt je třeba pomýšlet při léčbě CML pacientů a volbě vhodného léku. Vliv na aktivitu CYP3A4 mají kromě léků i potraviny. Mezi silné inhibitory CYP3A4 patří látky v graperfruitu, naopak třezalka tečkovaná je induktorem cytochromu CYP3A4 a může tedy výrazně snížit efekt léčby imatinibem.

Mezi jednotlivými etniky existují významné rozdíly v zastoupení jednotlivých alelických variant CYP3A5, které jsou vysvětlením i rozdílné farmakokinetiky preparátů včetně TKI. Pro kavkazskou populaci je dominantní přítomnost G alely (95 %), naopak v africké populaci se dominantně vyskytuje alela A (82 %). Zastoupení jednotlivých alel a genotypů všech polymorfismů ze všech dosud dostupných prací je možné nalézt zde:

www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/index.html.

Velký rozdíl mezi etniky je také v zastoupení alel v cytochromu CYP3A4, kdy v kavkazské populaci je dominantní 95 - 98 % přítomnost alely A a její 100 % zastoupení se vyskytuje dle literatury v asijské populaci. Naopak v africké populaci tato alela A tvoří pouze 20 – 30 % zastoupení a převažuje zde výskyt alely G.

CYP2C9 hraje v metabolismu imatinibu zřejmě velmi malou roli, ale naopak je dominantní v metabolismu např. warfarinu, nesteroidních antirevmatik, sartanů a celé řady dalších preparátů. V současné době je známo rovněž již kolem 50 typů jeho polymorfismů. Výskyt mezi etniky je u tohoto genu opět mírně rozdílný, kdy v evropské populaci u polymorfismu rs 1057910 se vyskytuje alela u 93 - 94 %, v americké populaci je její zastoupení 97 % a v asijské populaci 96 %.

Transportní mechanismy pro TKI můžeme rozdělit na skupinu proteinů, které zajišťují **transport do buňky** nebo **z buňky**. Pro inhibici BCR-ABL kinázy je důležitý human organic cation transporter -1 (**hOCT1**), což je membránový transporter imatinibu do buňky, který je kódovaný na **SLC22A** genu. Tento gen je lokalizován na 6. chromozomu a je tvořen 11 exony. V současné době je již popsáno kolem 25 jeho polymorfismů a je transportérem nejen TKI (imatinib, sorafenib), ale i např. ciprofloxacinu, metforminu, levodopy. Jsou dokumentovány výrazné rozdíly ve frekvenci výskytu jednotlivých genotypů polymorfismů napříč různými etniky. Frekvence výskytu dominantní alely C v kavkazské populaci je kolem 75 – 78 %, ale v asijské a africké populaci činí výskyt 89 – 98 %.

K důležitým transportérům, které naopak odčerpávají imatinib z buňky, patří proteiny **ABCB1 (MDR-1)** a **ABCG2 (BCRP)**. ABCB1 je lokalizován na 7. chromozomu a obsahuje 29 exonů. Dosud bylo popsáno více než 50 různých polymorfismů. Zatím u 10 z nich můžeme najít práce hodnotící vztah k léčbě digoxinem, cyklosporinem, cytostatiky či právě imatinibem. Tento membránový glykoprotein svojí ATP - dependentní vazbou ovlivňuje vylučování mnoha léků z buňky včetně celé řady cytostatik a takto chrání intracelulární prostředí organismu před toxickými vlivy. Prvním popsáním polymorfismem u ABCB1 byl polymorfismus rs 1045642 na exonu 26 q. Výskyt genotypů je opět rozdílný v jednotlivých etnických skupinách. V Evropě je četnost výskytu alely C 46 – 48 % a alely T 52 – 54 %, naopak všude v Africe dominuje zastoupení alely C (85 - 89 %).

ABCG2 gen je lokalizován na 4. chromozomu a kóduje transportní protein ABCG2, který je rovněž nazýván breast cancer resistance protein (BCRP). Dle literatury je známo již 180 genetických variant tohoto proteinu. Zatím byly publikovány analýzy zkoumající 13 variant polymorfismů ve vztahu k cytostatické léčbě. Nejvíce prací je věnováno polymorfismu rs 2231142. V některých studiích byl prokázán význam tohoto transportéru na

farmakokinetiku imatinibu. Je zde opět přítomen etnický rozdíl, neboť v kavkazské populaci se dominantně vyskytuje s 90 % frekvencí alela C, v asijské populaci se její zastoupení pohybuje kolem 70 %.

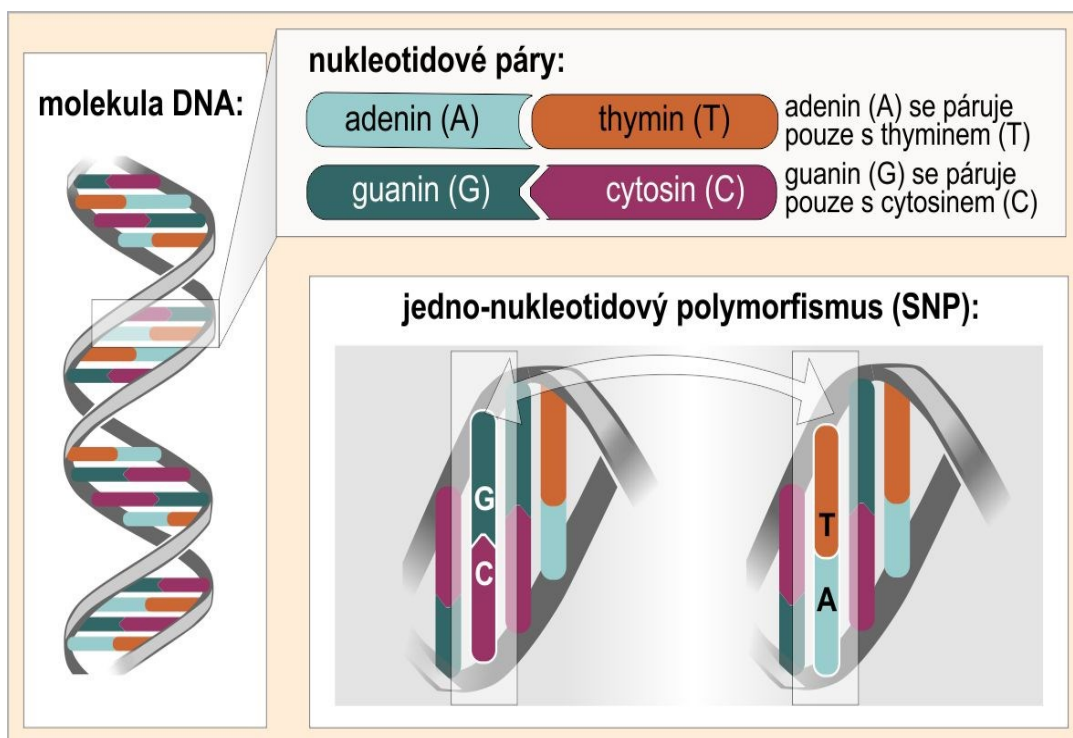
ABCC2 gen je lokalizován na 10. chromozomu a obsahuje 32 exonů. ABCC2 protein je protein ze skupiny **MRP**. Nejvíce prostudovaným polymorfismem u tohoto transportního proteinu je polymorfismus rs 717620, ale výsledky analýz nejsou jednoznačné. V kavkazské populaci je u tohoto polymorfismu 80 % výskyt alely G a četnost výskytu je obdobná i u asijské populace, avšak zastoupení této dominantní alely v africké populaci je až 96 %.⁸⁶

1.10 Genetické polymorfismy

Genotyp jedince představuje jeho veškerou genetickou charakteristiku a genotypy jedinců téhož druhu jsou jedinečné. Genetická výbava jedince (s výjimkou gamet) je diploidní. Genotyp v užším pojetí je tedy dvojice alel téhož genu, kdy jedna alela z dvojice je maternálního původu a druhá původu paternálního. Alely se mohou vyskytovat v populaci ve formě **dominantní (A) a recesivní (a)**. V lidské populaci se tedy mohou vyskytovat tři možné genotypy – **AA (dominantní homozygoti), Aa (heterozygoti) a aa (recesivní homozygoti)**. Alelu, která se vyskytuje běžně v populaci a podmiňuje normální (zdravý) fenotypový znak, nazýváme **alelou divokou (wt - wild type)**. Alelu, jejíž sekvence nukleotidů byla změněna mutací, označujeme jako **alelu mutovanou**. **Fenotyp** je soubor všech pozorovatelných vlastností a znaků živého organismu a představuje výsledek spolupůsobení genotypu a prostředí.

Rozdílná genetická výbava jedince přispívá k výrazné variabilitě farmakoterapeutické odpovědi na léčbu. Tímto se zabývá rychle se rozvíjející vědní obor - farmakogenetika. Jako **geneticky polymorfní znak** označujeme znak s nejméně dvěma geneticky podmíněnými variantami v jedné populaci. Mohou se vyskytovat alespoň 2 varianty a četnost výskytu řídkého znaku v populaci představuje více než 1 %. Pokud je výskyt variantních alel v odlišných populacích různý, může být také znak (např. enzym) v jedné populaci polymorfní a ve druhé nikoli. Ke genetickým polymorfismům tedy nepatří znaky, kde má zřídka varianta frekvenci menší než 1% (tj. např. geneticky podmíněné choroby), dále znaky, jejichž variabilita není podmíněná geneticky (infekční choroby), znaky s kontinuální variabilitou (tělesná hmotnost, výška) a znaky, kde se v rámci druhu vyskytují různé varianty, avšak v různých navzájem oddělených populacích (barva kůže aj.).

Všechny typy genetického polymorfismu mají svůj podklad v polymorfismu v kódujících sekvencích DNA a jsou způsobeny změnou v sekvenci bází, nejčastěji **bodovou mutací** (záměna nukleotidu nebo delece několika bází) v určitém místě DNA. **SNP (single nucleotide polymorphism)** je zkratka pro jednonukleotidový, neboli bodový polymorfismus (obrázek č. 8). Změna báze v kódující sekvenci může vést ke změně aminokyseliny a tím k projevu ve fenotypu a následně k projevům ve smyslu polymorfismu biochemického, imunologického nebo morfologického.



Obrázek č. 8: Vznik SNP záměnou jednoho nukleotidu (A, T, C, G) v DNA sekvenci
(upraveno podle [www. mygenetree.com](http://www.mygenetree.com))

1.11 Význam transplantace krvetvorných buněk

Během posledních třiceti let se postavení transplantace hematopoetickými buňkami u CML zcela změnilo. Zatímco v 80. a 90. letech byla transplantace jedinou nadějí pro vyléčení pacientů s CML, v současné době TKI je HCST indikována výrazně méně. Výsledky velké studie zahrnující 2444 pacientů s CML v chronické fázi ještě z období před TKI prokázaly celkové přežití v 15 letech 87 - 88 %. Zajímavostí je, že pozdní relaps choroby se dokonce objevil až po 18 letech od provedení HSCT.⁸⁷

Přežití nemocných po HSCT je ovlivněno několika faktory, a proto již EGBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation) v roce 1998 kalkulovala skórovací systém pro výpočet pravděpodobnosti přežití – tzv. **Gratwohlův skóre** (tabulka č. 7).⁸⁹ Je pochopitelné, že na výsledek transplantace má rozhodující vliv fáze choroby, protože 5 leté přežití chronické fáze se pohybuje kolem 90 %, akcelerované fáze kolem 40 - 50 % a přežití u blastické fáze se pohybuje kolem 10 – 25 %. Na výsledku transplantace se rovněž podílí i celkový stav nemocného, který nejčastěji vyjadřujeme jako komorbiditní index (HCT-I).^{89,91}

Předchozí léčba TKI před transplantací výsledky rozhodně nezhoršuje a ani nezvyšuje peritransplantační mortalitu. Naopak stabilizací CML spíše výsledky transplantace může zlepšit.^{90,91} Po HSCT je doporučováno pravidelné testování hloubky molekulární odpovědi, protože v 1. roce je nejvyšší riziko relapsů choroby. Dle některých prací MMR ve 3. měsíci po transplantaci je prediktorem dlouhodobé odpovědi této léčby. Zatím nejsou zcela jednotné názory na preventivní podávání imatinibu po HCST, někteří autoři zahájení léčby doporučují až dle vývoje transkriptu (zahájit při rostoucí kvantitě BCR-ABL1), jiní však doporučují podávat imatinib ihned preventivně po dobu 1 roku od provedení HSCT. Podle některých autorů by imatinib mohl snížit výskyt GvHD svým imunomodulačním efektem prostřednictvím inhibice T lymfocytů a snížením produkce PDGFR. K definitivnímu hodnocení budou jistě zapotřebí prospektivní studie. Současné indikace k HSCT budou rozebrány v kapitole o léčbě CML.⁹³

Tabulka č. 7: Výpočet Gratwohlova (EBMT) skóre pro odhad rizika alogenní transplantace krvetvorných buněk a pravděpodobnost 5-ti letého přežití pacientů dle jeho hodnoty⁸⁹

Parametr	Specifikace					Body	
• Věk pacienta	Pod 20 let					0 bodů	
	20-40 let					1 bod	
	Nad 40 let					2 body	
• Doba od diagnózy k alo-SCT	Do 1 roku					0 bodů	
	Nad 1 rok					1 bod	
• Fáze choroby	CP					0 bodů	
	AP					1 bod	
	BC nebo 2. CP					2 body	
• Dárce	HLA identický sourozenec					0 bodů	
	HLA kompatibilní příbuzný dárce					1 bod	
• Kombinace pohlaví dárce/příjemce	Žena/muž					1 bod	
	Jiná kombinace					0 bodů	
• Skóre:	0	1	2	3	4	5	6-7
Pravděpodobnost 5-ti letého přežití	76 %	73 %	59 %	49 %	38 %	39 %	19 %

1.12 Definice optimální léčebné odpovědi a její monitorace

Hodnocení léčebné odpovědi probíhá na **úrovni hematologické** dle nálezů v krevním obraze s diferenciálním rozpočtem. **Cytogenetická** odpověď je dána dle počtu zachycených Ph+ mitoz ve dřeni hodnocených klasickou cytogenetickou metodou.

Molekulární odpověď je hodnocena podle výsledku hladiny transkriptu BCR-ABL metodou RQ RT-PCR a odběr se provádí z periferní krve. Výsledek je vyjádřen jako poměr BCR-ABL ku ABL (či jinému kontrolnímu genu) x 100 % a je převeden na mezinárodní škálu (IS). Tato standardizace metody umožnila porovnávat výsledky mezi jednotlivými laboratořemi. Pro průkaz mutace v tyrozinkinázové doméně se nejčastěji používá metoda přímé sekvenace s citlivostí 10 a 25 %.^{94 - 97}

1.12.1 Definice léčebné odpovědi

U nemocných s CML v pravidelných intervalech po zahájení léčby TKI hodnotíme hematologickou, cytogenetickou a molekulární odpověď. Na základě výsledků se pak jedná o dosažení optimální odpovědi, varovné příznaky nebo selhání léčby. V současné době používáme doporučení ELN z roku 2013 – viz tabulka č. 7.⁹⁶ Na základě dosažené léčebné odpovědi provádíme léčebné rozhodnutí, při dosažení optimální odpovědi se pokračuje v zavedené léčbě a při selhání léčby je nutná změna léčebné strategie. Při ztrátě velké molekulární odpovědi je nutné ověření této skutečnosti kontrolním odběrem hladiny transkriptu.

Tabulka č. 8: Definice léčebných odpovědí a doporučení pro jejich monitorování během léčby pacientů s CP-CML imatinibem v první linii ⁹⁶

Léčebná odpověď	Definice	Monitorování
Kompletní hematologická odpověď (CHR)	<ul style="list-style-type: none"> • Leukocyty < 10 x 10⁹/l • Trombocyty < 450 x 10⁹/l • Diff: nepřítomny myelocyty, promyelocyty či myeloblasty • Basofily < 5 % • Nehmatná slezina 	Při dg., a pak minimálně á 2 týdny či častěji do dosažení CHR, dále minimálně po 3 M není - li nutné jinak.
Cytogenetická odpověď (CyR)	<ul style="list-style-type: none"> • Kompletní (CCyR): 0 Ph+ buněk • Parciální (PCyR): 1-35 % Ph+ bb. • Malá: 36-65 % Ph+ bb. • Minimální: 66-95 % Ph+ bb. • Žádná: > 95 % Ph+ bb. 	Při dg., ve 3 a 6 M; dále po 6 M do dosažení CCyR, dále alespoň á 12 M, v případě že nemůže být prováděno pravidelné sledování molekulární; dále je nutné vždy při selhání léčby nebo nejasné cytopenii.
Molekulární odpověď (MR)	<ul style="list-style-type: none"> • Kompletní (CMolR): nedetekovatelné transkripty <i>BCR-ABL1</i> pomocí RQ RT-PCR a/nebo NestedPCR • Velká (MMR): poměr BCR-ABL/ABL (či jiný kontrolní gen) ≤ 0,1 % IS 	Po 3 M do potvrzení MMR, pak minimálně á 6 M ; mutační analýza v případě selhání či varovných příznaků; dále vždy před změnou terapie.

Tabulka č. 9: Definice optimální, varovné léčebné odpovědi a selhání léčby na 1. linii TKI⁹⁶

Doba hodnocení	Optimální odpověď	Varování	Selhání
V době diagnózy	NA	Vysoké riziko (Sokal, Hasford), CCA/Ph+	NA
3 měsíce	CHR, PCyR (Ph+ ≤ 35 %) BCR/ABL ≤ 10 %	BCR/ABL >10 % a/nebo Ph+ 36-95%	Není CHR a/nebo Ph+ > 95 %
6 měsíců	BCR/ABL <1 % a/nebo Ph+ 0	BCR-ABL 1-10 % a/nebo Ph+ 1-35 %	BCR-ABL >10 % a/nebo Ph+ > 35 % NA
12 měsíců	BCR/ABL ≤ 0,1 %	BCR/ABL >0,1 %-1 %	BCR/ABL >1% a/nebo Ph+ > 0
Kdykoliv	BCR/ABL ≤ 0,1 %	CCA/Ph-, vzestup hladiny transkriptů	Ztráta CHR, CCyR, MMR, mutace, CCA/Ph+

Tabulka č. 10: Definice optimální, varovné léčebné odpovědi a selhání léčby 2. linie TKI v případě selhání imatinibu⁹⁶

Doba hodnocení	Optimální odpověď	Varování	Selhání
V době diagnózy	NA	Žádná CHR nebo její ztráta na IMA, ztráta CCyR na 1. linii	NA
3 měsíce	BCR/ABL ≤ 10 % a/nebo Ph+ ≤ 65 %	BCR/ABL >10 % a/nebo Ph+ 65-95 %	Není CHR a/nebo Ph+ > 95 % Nové mutace
6 měsíců	BCR/ABL ≤ 10 % a/nebo Ph+ < 35 %	Ph+ 35 -65%	BCR-ABL >10 % a/nebo Ph+ > 65 %, Nové mutace
12 měsíců	BCR/ABL < 1 % a/nebo Ph+ 0 %	BCR/ABL 1%-10 % a/nebo Ph+ 1- 35 %	BCR/ABL >10 % a/nebo Ph+ > 35 %, Nové mutace
Kdykoliv	BCR/ABL ≤ 0,1 %	CCA/Ph-, vzestup hladiny transkriptů BCR/ABL >0,1 %	Ztráta CHR nebo CCyR nebo MMR Nové mutace, CCA/Ph+

1.12.2 Doporučení léčby pacientů s chronickou myeloidní leukemií

Doporučení pro léčbu CML zaznamenalo s novými léčebnými možnostmi významný pokrok. První ELN doporučení, které zahrnovalo novou léčbu TKI, bylo publikováno v roce 2009 a následně bylo v roce 2013 aktualizováno.^{95, 96} V současné době je platné i NCCN doporučení z roku 2016. Tato doporučení se zásadněji neliší a v ČR při léčbě CML je z nich vycházeno. Podle výše uvedených doporučení v 1. linii léčby CML-CP lze použít imatinib 100 mg 1x denně nebo nilotinib 300 mg 2x denně nebo dasatinib 100 mg 1x denně, který však v ČR nemá pro tuto indikaci zatím úhradu. Na odborném poli se vedou stále diskuse, zda rychlejší navození optimální léčebné odpovědi při užití TKI 2. generace (dasatinib, nilotinib) v 1. linii léčby bude mít z dlouhodobého hlediska pro pacienty význam než užití „zlatého“ standardu, kterým je léčba imatinibem.

Výsledky studií s dasatinibem a nilotinibem prokázaly vyšší a rychlejší navození CCyR a MMR, ale celkové přežití je zatím shodné (po 5 – 6 letém sledování). Lze však předpokládat, že toto rychlejší navození hluboké molekulární odpovědi z dlouhodobého hlediska sníží riziko možné progrese choroby a není vyloučeno, že se časem bude lišit i celkové přežití. Při volbě preparátu pro 1. linii léčby je rovněž přihlíženo k věku pacienta, celkovému stavu, komorbiditám a užívané medikaci.

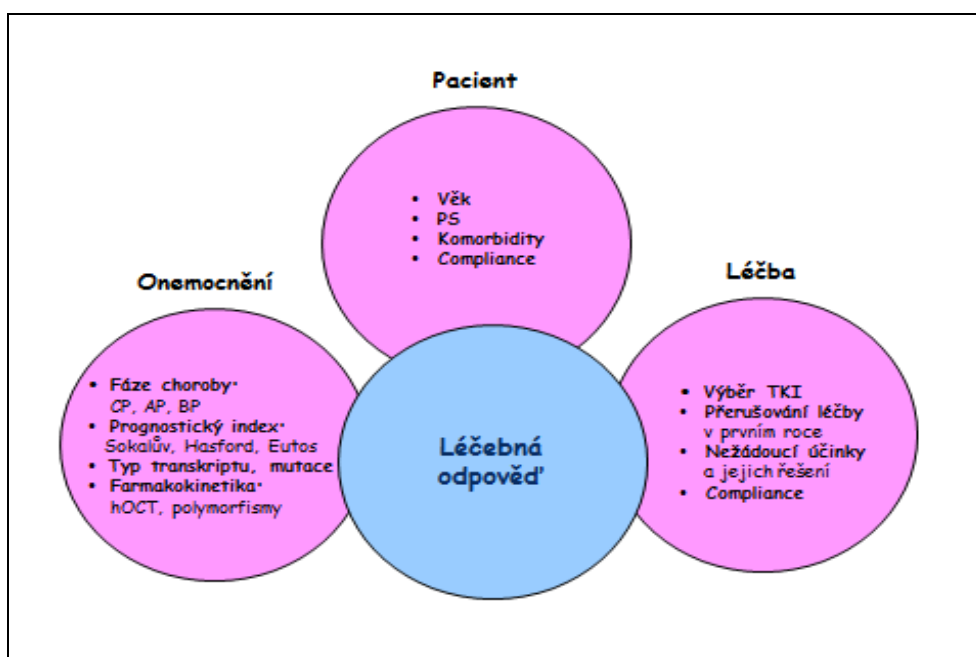
V případě intolerance nasazeného preparátu se provádí změna za jiný TKI s ohledem na charakter nežádoucích účinků a komorbidity pacienta – dasatinib 100mg 1x denně nebo nilotinib 400 mg 2x denně. Jak již bylo uvedeno výše, změna léčby u pacienta vychází z hodnocení dosažené odpovědi. V případě selhání léčby před její změnou se snažíme nejprve posoudit, zda nemocný lék pravidelně užíval, protože compliance nemocného je velmi důležitá. Tomu nám může pomoci např. vyšetření plazmatických hladin imatinibu. Další nutností při selhání léčby je posoudit, zda nedošlo k rozvoji mutace v TK doméně. Na základě výsledku vyšetření mutací, komorbidit pacienta je provedena změna léčby na TKI 2. generace nebo 3. generace. V případě, že nemocný patří do kategorie choroby s varovnými signály, je možné pokračovat ve stávající léčbě za pečlivých kontrol výsledků nebo můžeme přistoupit i ke změně léčby. Toto záleží na individuálním posouzení situace lékařem.^{95 – 101}

V případě léčby CML - AP a CML - BP je zahájena léčba imatinibem ve vyšších dávkách (600 – 800 mg denně) a v případě jeho intolerance či rezistence je indikována léčba dasatinibem v dávce 140 mg 1x denně nebo nilotinibem 400 mg 2x denně. V případě mladšího věku pacienta (do 65 let) je však ihned indikováno zahájení vyhledávání dárce

k provedení transplantace kostní dřeně. V současné době HSCT není volbou léčby v 1. linii pro pacienty s CML - CP, ale je indikována při selhání TKI. Měla by být u mladších pacientů zvažována, pokud je nedostatečná odpověď na dva či více tyrozinkinázové inhibitory a rovněž při průkazu rezistentní mutace T315I. V tomto případě by mohl být použita léčba ponatinibem jako překlenující léčba do vyhledání vhodného dárce.^{95 - 97}

1.12.3 Predikce léčebné odpovědi

Na výslednou léčebnou odpověď u pacientů s CML má vliv mnoho faktorů, které bychom mohli však rozdělit do tří základních skupin. První skupinu zahrnují faktory, které se týkají pacienta. Patří k nim věk, celkový stav, přidružené choroby pacienta a jeho spolupráce při léčbě.^{100 - 104} Druhá skupina je dána samotným onemocněním, respektive fází CML, prognostickým rizikovým skórem, cytogenetickým nálezem, typem transkriptu a mutacemi v TKI doméně, ale i farmakokinetikou TKI, které vykazují významnou variabilitu. Poslední skupinu tvoří léčba CML, na které se podílí i vliv lékaře, respektive výběr TKI, řešení nežádoucích účinků preparátů, což bývá současně příčinou, proč že nemocní léky neužívají. Samozřejmě všechny tyto faktory se vzájemně prolínají, jak nám dokumentuje obrázek č. 9.



Obrázek č. 9: Faktory ovlivňující výslednou léčebnou odpověď (zdroj P. Bělohávková)

2.1. Cíle dizertační práce

a) Primárním cílem této práce bylo nalézt nové biologické parametry, které by objasnily u pacientů s CML případy nejasného selhání léčby imatinibem. Vyšetření polymorfismů, které zasahují do farmakokinetiky imatinibu, by tak umožnilo včas predikovat riziko selhání léčby imatinibem.

Vyšetřené polymorfismy:

- CYP3A5*3 (6986A>G) (rs 776746)
- CYP3A4*1 (-392A>G) (rs 2740574)
- CYP2C9*3 (1075A> C) (rs 1057910)
- SLC22A1 (480 C>G) (rs 683369)
- ABCB1 (3435 C>T) (rs 1045642)
- ABCB1 (1236 C>T) (rs 1128503)
- ABCG2 (421 C>A) (rs 2231142)
- ABCC2 (-24 C>T) (rs 717620)

b) Sekundárním cílem bylo prokázat, zda standartně užívaná dávka imatinibu 400 mg vede u pacientů k dosažení optimální léčebné odpovědi a zda navozuje dostatečnou plazmatickou hladinu imatinibu. Dále nalézt další biologické faktory, které mají vliv na plazmatickou hladinu imatinibu.

2.2 Pracovní hypotézy

- 1) Dosažená plazmatická hladina imatinibu ovlivňuje léčebnou odpověď nemocných.
- 2) Typ genetického polymorfismu ovlivňuje plazmatickou hladinu imatinibu.
- 3) Typ genetického polymorfismu ovlivňuje výslednou léčebnou odpověď nemocných.

3. Použité metody a soubor nemocných

3.1. Soubor nemocných

Do našeho souboru bylo zahrnuto 112 pacientů s CML - CP (97 %) a CML - AP, kteří byli diagnostikováni a léčeni ve FN Hradec Králové (71 pacientů) a FN Brno (41 pacientů). Skupinu tvoří 53 mužů (47 %) a 59 žen (53 %) s mediánem věku v době diagnózy 56 let (rozpětí 19 - 84 let). Diagnóza CML byla stanovena na obou pracovištích v období od 5/1997 do 11/2012. Hodnocení aktuálního stavu pacientů a přežití nemocných bylo provedeno k 31. srpnu 2015. U 97 % pacientů našeho souboru se jednalo o CML - CP v době diagnózy. U 97 % případů byl cytogenetickým vyšetřením zjištěn klasický Ph chromozom. Pouze u 3 pacientů (3 %) byly vstupně zachyceny přídatné cytogenetické změny, které však neměly vliv na prognózu pacientů. Bližší charakteristiku celého souboru dokumentuje tabulka č. 9. Rozložení nemocných v souboru podle rizikového skóre dle Hasforda a Sokala nám dokumentují grafy na obrázcích č. 10 a 11.

Podmínkou pro zařazení pacienta do našeho hodnocení byla léčba imatinibem trvající minimálně 18 měsíců z důvodu možnosti hodnocení cytogenetické a molekulární odpovědi. Do hodnocení nebyli zařazeni nemocní, kteří byli vstupně léčeni jiným TKI (dasatinib, nilotinib) nebo pro rizikovost onemocnění byli primárně směřováni k alogenní transplantaci kostní dřeně. Dále do analýzy nebyli zahrnuti pacienti, u nichž pro primární rezistenci na imatinib nebo léčebnou toxicitu, byla provedena léčebná změna imatinibu před 18 M.

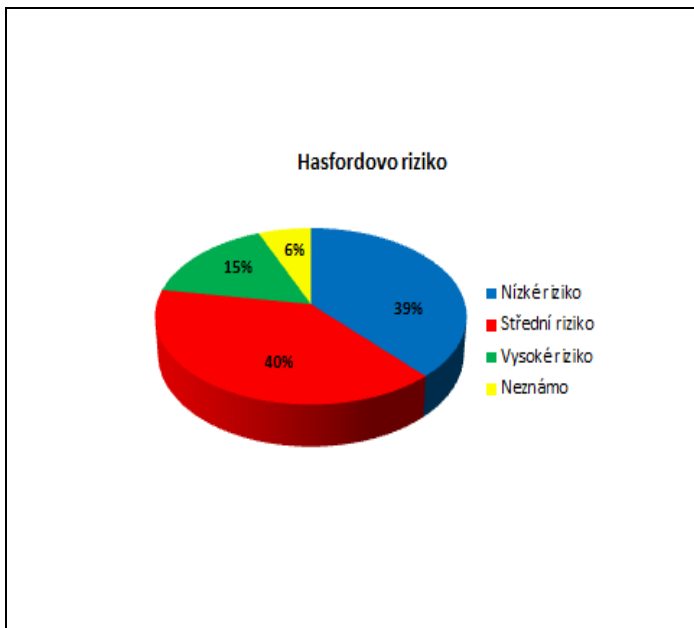
V našem souboru bylo před dostupností imatinibu léčeno 11 pacientů (10 %) interferonem s mediánem trvání této léčby 14 M (rozpětí 5 – 132 M). Z těchto nemocných pouze u 6 pacientů bylo dosaženo CHR a pouze v 1 případě nemocný dosáhl CCyR. Všichni nemocní zahájili léčbu imatinibem v dávce 400 mg/den, ale podle léčebné odpovědi a toxicity léčby byla dávka imatinibu u 20 (18 %) pacientů upravena: 2 nemocní užívají 600 mg/den, 11 nemocných 300 mg/den a 7 nemocných 200 mg/den. Medián léčebné dávky imatinibu celého souboru je 400 mg (rozpětí 200 – 600 mg/den).

Medián doby sledování v souboru je 92 měsíců (M) (rozpětí 29 – 230 M). Z hodnoceného souboru zemřelo 5 (5 %) pacientů. Ve dvou případech se jednalo o souvislost s CML, kdy došlo k progresi choroby do blastického zvratu. V jednom případě se jednalo o kardiální příčinu úmrtí při současné progresi CML. Dvě nemocné zemřely na karcinom prsu.

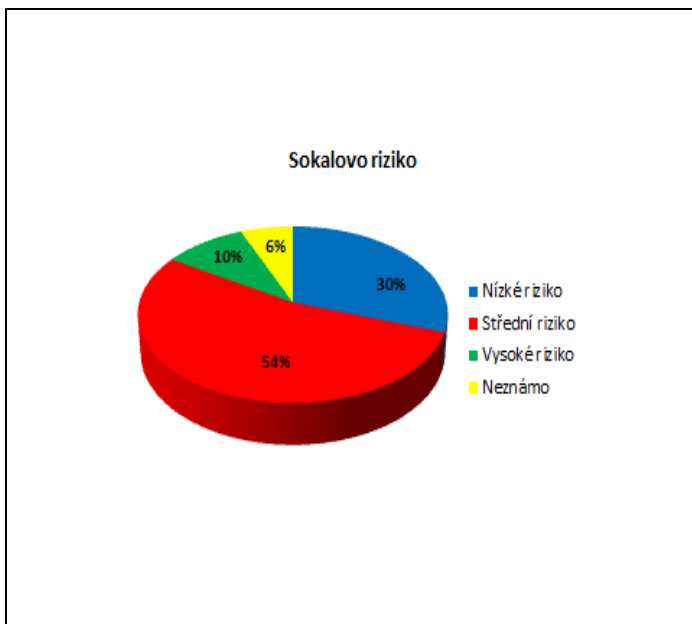
Tabulka č. 11: Charakteristika vyšetřovaného souboru (N=112)

Věk v době diagnózy	56 let (rozpětí 19 – 84 let)
Fáze CML • chronická • akcelerovaná • blastická	109 (97 %) 3 (3 %) 0
Pohlaví • muži/• ženy	53 (47 %)/59 (53 %)
Hasfordovo riziko • nízké • střední • vysoké • neurčeno	43 (39 %) 44 (40 %) 18 (15 %) 7 (6 %)
Sokalovo riziko • nízké • střední • vysoké • neurčeno	34 (30 %) 60 (54 %) 11 (10 %) 7 (6 %)
Cytogenetika • klasický Ph+ chromozom • přídatné změny	109 (97 %) 3 (3 %)
Medián doby sledování (měsíce)	92 (29 – 230 měsíců)
Předchozí léčba • interferon • hydroxyurea > 1měsíc	11 (10 %) 3 (3 %)
Medián dávky imatinibu mg/den	400 mg (200 – 600 mg/den)
Současný stav • žije/• nežije	107 (95,5 %)/5 (4,5 %)
Příčina úmrtí • v souvislosti s CML • jiná příčina	3 (3 %) 2 (2 %)

Obrázek č. 10: Rozložení pacientů v souboru podle Hasfordova rizika



Obrázek č. 11: Rozložení pacientů v souboru podle Sokalova rizika



3.2 Metodika hodnocení léčebné odpovědi

Pacienti hodnoceného souboru byli diagnostikováni a léčeni na IV. interní hematologické klinice FN Hradec Králové a na Interní hematologické a onkologické klinice FN Brno. Na obou pracovištích byla léčba pacientů vedena podle platných doporučení. Hodnocení optimálních léčebných odpovědí je na obou pracovištích prováděno na základě doporučení Evropské leukemické skupiny (ELN) z roku 2009 a následně aktualizovaného doporučení z roku 2013. Ve 3 M léčby je hodnoceno dosažení kompletní hematologické odpovědi (CHR), které je definováno počtem trombocytů $< 450 \times 10^9/l$, počtem leukocytů $< 10 \times 10^9/l$, chyběním mladších forem leukocytů a počtem bazofilů $< 5\%$ v krevním obraze a periferním nátěru. Současně při klinickém vyšetření není u pacienta hmatná slezina. Cytogenetická odpověď je hodnocena na základě počtu zachycených Ph+ mitóz ve dřeni při hodnocení klasickou cytogenetickou metodou. Kompletní cytogenetická odpověď (CCyR) je definována jako nepřítomnost Ph+ mitóz ve dřeni a dle ELN kritérií 2013 by u nemocných s CML měla být dosažena v 6 M léčby. Molekulární odpověď a její hloubka je posouzena podle výsledku hladiny transkriptu BCR-ABL1, k jehož stanovení se používá kvantitativní polymerázová řetězová reakce s využitím reverzní transkriptázy (RT-PCR). Výsledek je vyjádřen jako poměr BCR-ABL1 k ABL (či jinému kontrolnímu genu) $\times 100 \%$ a je převeden na mezinárodní škálu (IS). Velká molekulární odpověď (MMR) je stanovena jako hodnota BCR-ABL1/kontrolní gen $\leq 0,1 \%$ a měla by být dosažena ve 12 M léčby.

Na základě základní podmínky (léčba imatinibem minimálně 18 M) byli pacienti do hodnoceného souboru vybráni retrospektivně. Tito nemocní podepsali informovaný souhlas s odběrem krve k vyšetření polymorfismů. K získání klinických a laboratorních dat u pacientů léčených na obou centerch přispěla společná databáze INFINITY (český registr CML pacientů).

3.3 Použité metody

• Stanovení hladiny imatinibu

Stanovení plazmatické hladiny imatinibu bylo na obou pracovištích provedeno metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie a analýza je validována na detekční limit 10 ng/ml. Odběr periferní krve u nemocných byl proveden 24 \pm 2 hodiny před další dávkou imatinibu a bylo nutné předchozí poučení pacientů. Stanovení plazmatické hladiny imatinibu bylo provedeno po minimálně 12 měsících od zahájení užívání imatinibu. Vzhledem k tomu, že naše práce nebyla prospektivní, není odběr plazmatické hladiny imatinibu proveden ve zcela shodné době od zahájení léčby imatinibem. Avšak po delší době užívání imatinibu by dle literatury měla být již u pacienta ustálená plazmatická hladina imatinibu. Především je při odběru nutné dodržení času od poslední užití dávky imatinibu.

Vyšetření plazmatických hladin imatinibu ve FNHK bylo provedeno v Ústavu klinické biochemie a diagnostiky, ve FN Brno na Oddělení klinické biochemie.

• Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena pomocí soupravy QIAamp® DNA mini Kit (QIAGEN) podle doporučení výrobce následujícím postupem:

Jeden aliquot každého vzorku byl vytemperován na laboratorní teplotu. Do mikrozkušavky s rozmraženou krví bylo přidáno 20 μ l QIAGEN proteázy a 200 μ l pufru AL. Celá směs byla zamíchána pomocí vortexu (2500 otáček/min, 15 s) a inkubována 10 minut při teplotě 56 °C v suchém termobloku. Následně bylo ke vzorku přidáno 200 μ l 96% etanolu a obsah zkumavky byl opět promíchán pomocí vortexu (2500 otáček/min po dobu 15 s). Po promíchání byl celý obsah zkumavky přenesen do kolonky se sběrnou zkumavkou a kolonka s buněčným lyzátem byla centrifugována (8 000 otáček/min. po dobu 1 min.). Kolonka byla přemístěna do nové čisté 2ml sběrné zkumavky, bylo do ní přidáno 500 μ l pufru AW 1 a kolonka byla opět centrifugována (8 000 otáček/min., 1 min.). Kolonka byla opět přemístěna do nové 2ml sběrné zkumavky, bylo do ní přidáno 500 μ l pufru AW2 a kolonka byla centrifugována (14 000 otáček/min., 3 min.). Následně byla kolonka přemístěna do čisté 1,5 ml mikrozkušavky a DNA navázaná na kolonce byla eluována přidáním 150 μ l pufru AE

přímo na silikovou náplň, po němž následovala inkubace po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě a centrifugace (8 000 otáček/min., 1 min.). Izolovaná DNA byla uchována při teplotě -20 °C do další analýzy.

• Detekce SNP pomocí PCR v reálném čase

Detekce jednonukleotidových polymorfismů byla provedena PCR v reálném čase pomocí reakčních směsí TaqMan® SNP Genotyping Assay (Life Technologies) a TaqMan® Genotyping Master Mix (Life Technologies) dle doporučení výrobce. Všechny potřebné reagensy a analyzovaná DNA byly rozmrazeny při laboratorní teplotě a podle tabulky č. 12 byla připravena reakční směs pro analýzu daného SNP. Seznam detekčních směsí použitých pro jednotlivé SNP je uveden v tabulce č. 13. Reakční směs byla napipetována do 0,2 ml mikrozkušavek pro PCR cykly Rotor-Gene 6000 v počtu odpovídajícím počtu analyzovaných DNA + 3 zkumavky pro pozitivní kontroly (všechny 3 genotypy) + negativní kontrola bez templátové DNA pro ověření čistoty reakční směsi. Do každé zkumavky byly přidány 2 µl templátové DNA (H₂O pro kontrolu bez templátu). PCR reakce probíhala dle programu uvedeného v tabulce č. 14. Zastoupení jednotlivých genotypů v našem souboru je uvedeno v tabulce č. 15.

Tabulka č. 12: Složení reakční směsi

Reagencie	Objem [µl/reakce]
Voda pro PCR	7
Detekční směs - TaqMan® SNP Genotyping Assay (20x)	1
TaqMan® SNP Genotyping Master Mix (2x)	10

Tabulka č. 13: Seznam detekčních směsí

Název genu	Referenční číslo SNP	Kód detekční směsi
• CYP3A5	rs 776746	C_26201809_30
• CYP3A4	rs 2740574	C_1837671_50
• CYP2C9	rs 1057910	C_27104892_10
• SLC22A1	rs 683369	C_928536_30
• ABCB1	rs 1045642	C_7586657_20
• ABCB1	rs 1128503	C_7586662_10
• ABCG2	rs 2231142	C_15854163_70
• ABCC2	rs 717620	C_2814642_10

Tabulka č. 14: Program použitý pro analýzu SNP pomocí PCR v reálném čase

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Aktivace DNA polymeazăy	95 °C	10 min	1
Denaturace	92 °C	15 s	50
Nasednutí primerů / elongace	60 °C	90 s	

Tabulka č. 15: Zastoupení jednotlivých polymorfismů v souboru

Stanovený polymorfismus, genotypy	Počet pacientů	Frekvence výskytu v souboru, %	Frekvence výskytu v kavkazské populaci, %
CYP3A5*3 (rs 776746) • C - C • T - C • T - T	98 13 1	87 12 1	80 - 85 15 5
CYP3A4*1 (rs 2740574) • C - C • T - C	104 8	93 7	94 - 98 5
CYP2C9*3 (rs 1057910) • A - A • A - C	95 17	85 15	88 12
SLC22A1 (rs 683369) • C - C • C - G • G - G	78 27 7	70 24 6	57 - 60 30 - 33 5 - 8
ABCB1 (rs 1045642) • A - A • A - G • G - G	58 32 22	51 29 20	55 - 62 13 - 20 29 - 37
ABCB1 (rs 1128503) • A - A • A - G • G - G	18 62 32	16 55 29	20 - 32 40 - 56 28 - 34
ABCG2 (rs 2231142) • G - G • T - G • T - T	87 23 2	80 19 1	78 - 79 20 - 22 0 - 2
ABCC2 (rs 717620) • C - C • C - T • T - T	70 37 5	63 33 4	60 - 64 34 - 40 0 - 2

rs: referenční číslo daného polymorfismu; **C, T, A, G** – alely daného genu; **CC, CT, AA, AG, GG, TG, CT:** jednotlivé genotypy

3.4 Statistické hodnocení

Analýza získaných dat byla provedena v ovládacím a analytickém software cyklu Rotor-Gene 6000 v módu „Allelic discrimination“. Hranice odlišující pozitivní a negativní signál jednotlivých alel byla nastavena podle výsledků kontrol se známým genotypem. Statistická analýza Statistické a grafické analýzy byly provedeny v programovacím jazyku R s grafickým rozhraním RStudio. Pro vyhodnocení statisticky významné závislosti kvalitativních znaků byl použit test Chí-kvadrát. Kvantitativní znaky byly porovnány pomocí Mann-Whitneyova testu a u části analýz byl použit test ANOVA. Použitá hladina statistické významnosti (hodnota p) byla 0,05.

V případě krabčkového grafu (box chartu), představuje horní okraj krabčičky 75. percentil, dolní okraj pak 25. percentil distribuce dat. Medián je zobrazen linií uprostřed krabčičky.

Použité programy:

- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing (Version 3.1.3) [Computer software]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from: <http://www.R-project.org/>.
- RStudio (2012). RStudio: Integrated development environment for R (Version 0.98.1103) [Computer software]. Boston, USA. Available from: <http://www.rstudio.org/>

4. Výsledky

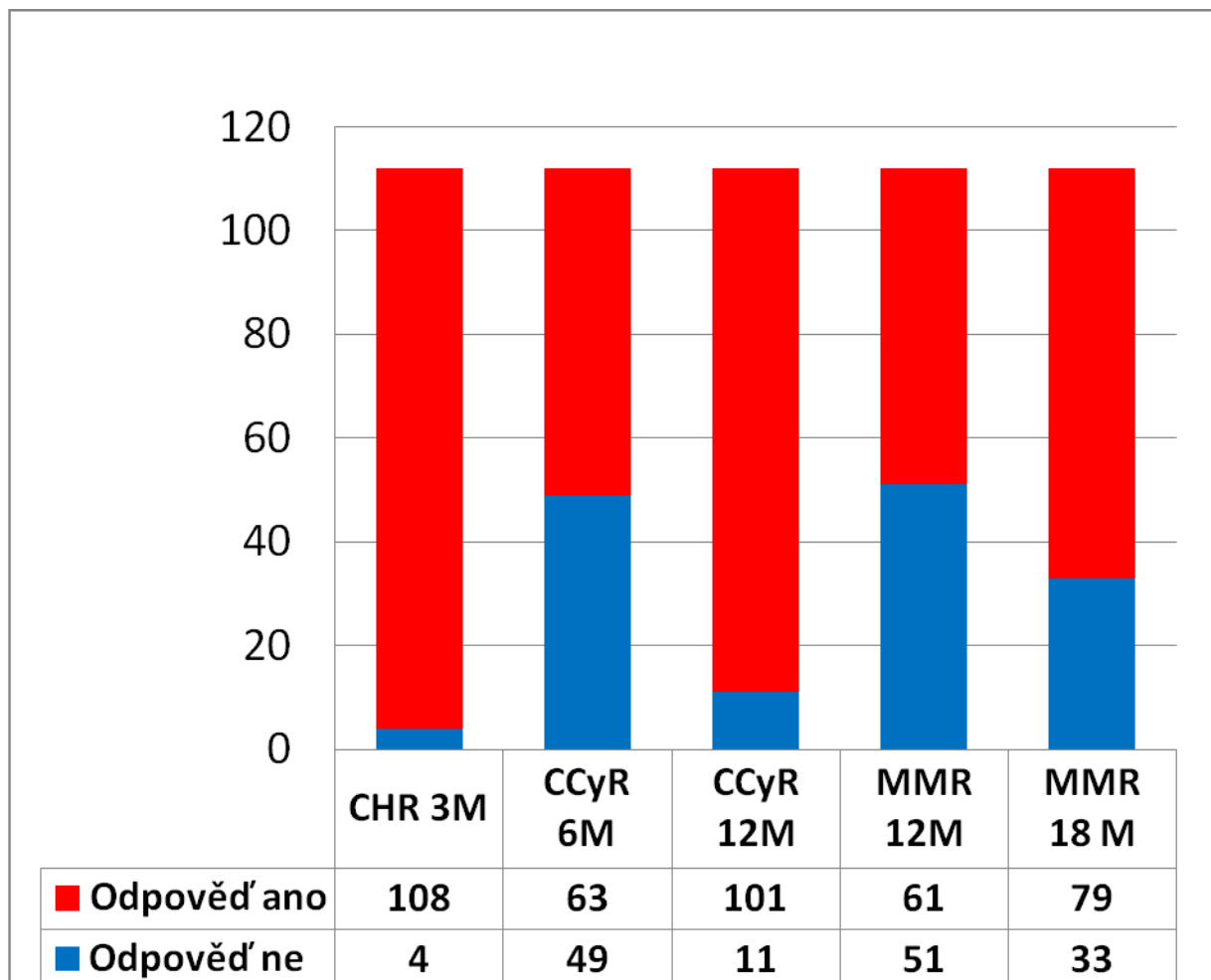
4.1 Dosažené léčebné odpovědi a toxicita léčby

V našem souboru před standardní dostupností imatinibu byla u 11 pacientů (10 %) zahájena iniciálně léčba interferonem s mediánem trvání této léčby 14 M (rozpětí 5 – 132 M). Z těchto nemocných pouze u 6 pacientů bylo dosaženo CHR a pouze v 1 případě nemocný dosáhl CCyR. Následně byla u těchto pacientů zahájena léčba imatinibem v dávce 400 mg/den. U ostatních nemocných byla zahájena léčba imatinibem v dávce 400 mg/den, ale podle léčebné odpovědi a toxicity léčby byla dávka imatinibu u 20 (18 %) pacientů upravena: 2 nemocní užívají 600 mg/den, 11 nemocných 300 mg/den a 7 nemocných 200 mg/den. Medián léčebné dávky imatinibu celého souboru je 400 mg (rozpětí 200 – 600 mg/den). Medián doby sledování v souboru je 92 M (rozpětí 29 – 230 M). Z hodnoceného souboru zemřelo 5 (5 %) pacientů. Ve dvou případech se jednalo o souvislost s CML (blastický zvrát), v jednom případě se jednalo o kombinaci progresu CML spolu s kardiální příčinou úmrtí. Dvě nemocné zemřely na karcinom prsu.

Hodnocení léčebné odpovědi u všech pacientů v souboru bylo provedeno na základě doporučení ELN kritérií z roku 2013 v pravidelných intervalech. V našem souboru bylo dosažení jednotlivých odpovědí následující: CHR po 3 M léčby dosáhlo 108 pacientů (96 %), CCyR v 6 M léčby 63 pacientů (56 %), CCyR po 12 M léčby 101 pacientů (90 %), MMR ve 12 M léčby 61 (54 %) a MMR po 18 M léčby imatinibem dosáhlo 79 (70 %) pacientů. Jednotlivé dosažené odpovědi dokumentuje tabulka č. 16.

Během léčby imatinibem byla zaznamenána u 35,5 % případů hematologická toxicita, ale pouze v 9 % případů se jednalo o stupeň 3 a 4 – viz tabulka č. 17. Z nehematologické toxicity byla nejčastěji pozorována retence tekutin (otoky dolních končetin, periorbitální otoky), a to u 24 % pacientů. Častěji tento nežádoucí projev byl přítomen u žen. Z dalších častěji se vyskytujících vedlejších projevů to byly dyspeptické potíže (nevolnost, zvracení) a svalové bolesti s křečemi svalů - viz tabulka č. 18.

Tabulka č. 16: Počet zastoupení jednotlivých odpovědí u pacientů (N=112) v souboru



CHR: kompletní hematologická odpověď, **CCyR:** kompletní cytogenetická odpověď,
MMR: velká molekulární odpověď

Tabulka č. 17: Hematologická léčebná toxicita v souboru

Toxicita hematologická	Celý soubor (N 112)	Muži (N 53)	Ženy (N 59)
• Anemie st. 1+2	3 (2,5 %)	1 (2 %)	2 (3 %)
• Anemie st. 3+4	1 (1 %)	0	1 (1,5 %)
• Neutropenie st. 1+2	17 (15 %)	7 (13 %)	10 (17 %)
• Neutropenie st. 3+4	3 (3 %)	1 (2%)	2 (3 %)
• Trombocytopenie st. 1+2	10 (9 %)	4 (7,5 %)	6 (10 %)
• Trombocytopenie st. 3+4	5 (5 %)	2 (4 %)	3 (5 %)

Anemie: stupeň-1 Hb > 100 g/l, stupeň -2 80 – 99 g/l, stupeň -3 65 – 79 g/l, stupeň -4 < 65 g/l, **Absolutní počet neutrofilů (ANC):** stupeň -1 < N – 1,5 x 10⁹ /l, stupeň -2 < 1,5 – 1,0.10⁹ /l, stupeň -3 < 1,0 – 0,5 10⁹ /l, stupeň-4 < 0,5.10⁹ /l, **Trombocyty:** stupeň -1 < norma – 75.10⁹ /l, stupeň -2 < 75 – 50.10⁹ /l, stupeň -3 < 50 – 25.10⁹ /l, stupeň – 4 < 25.10⁹ /l.

Tabulka č. 18: Nehematologická léčebná toxicita v souboru

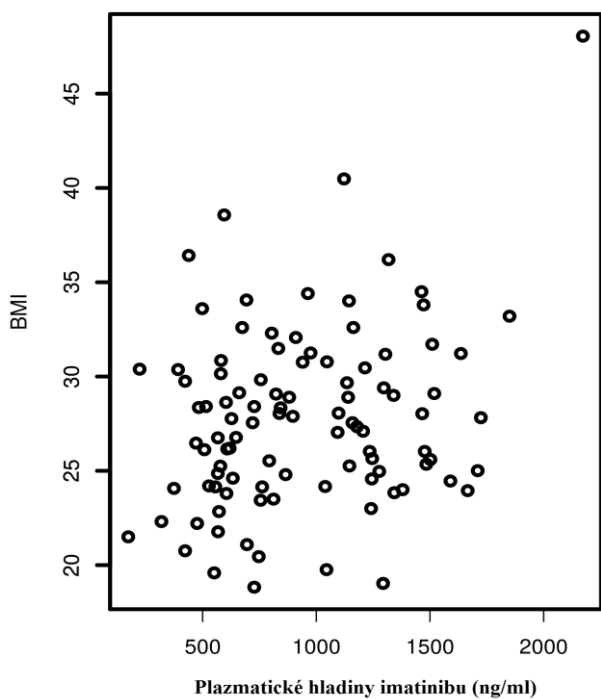
Toxicita nehematologická	Celý soubor (N 112)	Muži (N 53)	Ženy (N 59)
• Nevolnost, zvracení	21 (19 %)	9 (17 %)	12 (20 %)
• Průjem	12 (11 %)	4 (7,5 %)	8 (13,5 %)
• Vyrážka	8 (7 %)	3 (2,5 %)	5 (8,5 %)
• Retence tekutin	27 (24 %)	9 (9,5 %)	18 (30 %)
• Hepatotoxicita	2 (2 %)	2 (4%)	0
• Svalové bolesti, křeče	23 (20,5 %)	10 (19 %)	13 (22 %)
• Hypofosfatemie	8 (7 %)	5 (9,5%)	3 (5 %)
• Teplota	2 (2 %)	1 (2 %)	1 (1,5 %)
• Konjunktivitida	6 (6 %)	2 (4 %)	4 (7 %)
• Alopecie	1 (1 %)	0 (0 %)	1 (1,5 %)

4.2 Vliv BMI a renálních funkcí na plazmatickou hladinu imatinibu

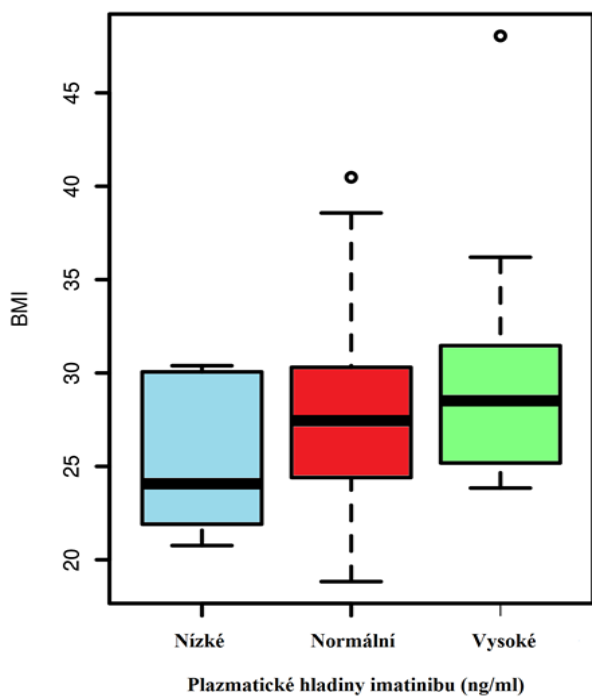
Farmakokinetika imatinibu vykazuje u pacientů velkou variabilitu, což potvrzují i námi zjištěné plazmatické hladiny imatinibu. Léčebně se u pacientů používá standardní dávka imatinibu 400 mg/denně bez ohledu na hmotnost pacienta nebo jeho jaterní či ledvinné funkce. V našem souboru byla provedena analýza závislosti plazmatických hladin imatinibu na BMI (body mass index) a GF (glomerulární filtraci), jejímž ukazatelem je clearance kreatininu stanovená podle vypočtené hodnoty podle rovnice Cockcroft – Gaulta.¹⁰⁶

Medián BMI v souboru byl 26,2 (rozpětí 18,9 – 48,0) a medián vypočítané clearance kreatininu byl 82,1 ml/min (rozpětí 39,7 – 226,9 ml/min). Medián naměřené plazmatické hladiny imatinibu byl v celém souboru 843 ng/ml (SD \pm 408, rozpětí 173 – 2173 ng/ml). Nemocní byli podle dosažených hladin rozdělení pro hodnocení do tří skupin: do skupiny s nízkými hladinami imatinibu (\leq 432 ng/ml), normálními (433 - 1247 ng/ml) a vysokými hladinami imatinibu (\geq 1248 ng/ml).

Nebyla prokázána statistická závislost plazmatických hladin imatinibu na BMI a renálních funkcích. Pro závislost hladin imatinibu a BMI je $p = 0,136$ (viz obr. 12 a 13), při hodnocení závislosti hladiny imatinibu a GF je $p = 0,71$ (viz obr. 14 a 15).

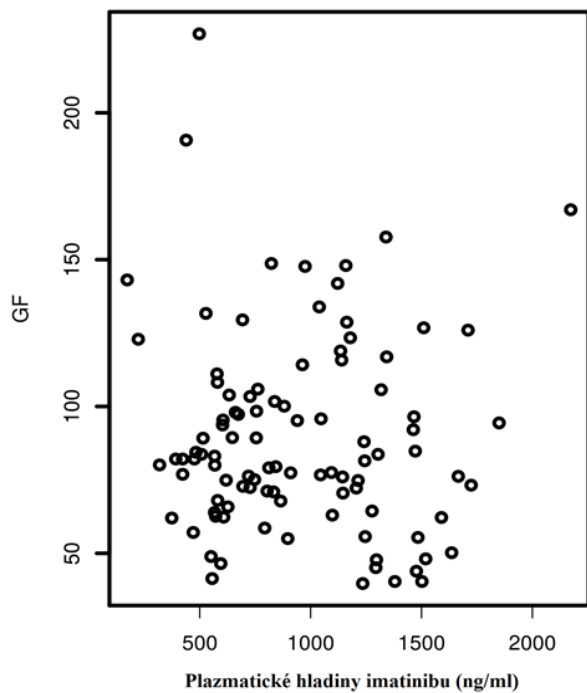


Obr. č. 12: Vztah plazmatických hladin imatinibu a BMI

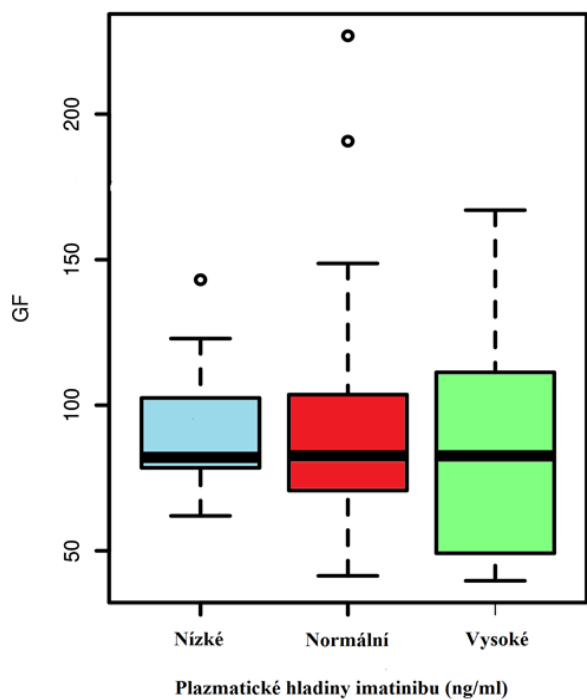


Obr. č. 13: Vztah naměřených plazmatických hladin imatinibu a BMI:

Pacienti byli rozděleni do tří skupin: nízké hladiny (≤ 432 ng/ml), normální (433 - 1247 ng/ml) a vysoké hladiny imatinibu (≥ 1248 ng/ml). Nebyla zjištěna závislost plazmatických hladin imatinibu a BMI ($p = 0,136$).



Obr. č. 14: Vztah plazmatických hladin imatinibu a GF



Obr. č. 15: Vztah naměřených plazmatických hladin imatinibu a GF:

Pacienti byli rozděleni do tří skupin: nízké hladiny (≤ 432 ng/ml), normální (433 - 1247 ng/ml) a vysoké hladiny imatinibu (≥ 1248 ng/ml). Nebyla zjištěna závislost plazmatických hladin imatinibu a BMI ($p = 0,71$).

4.3 Vliv plazmatických hladin imatinibu na léčebnou odpověď

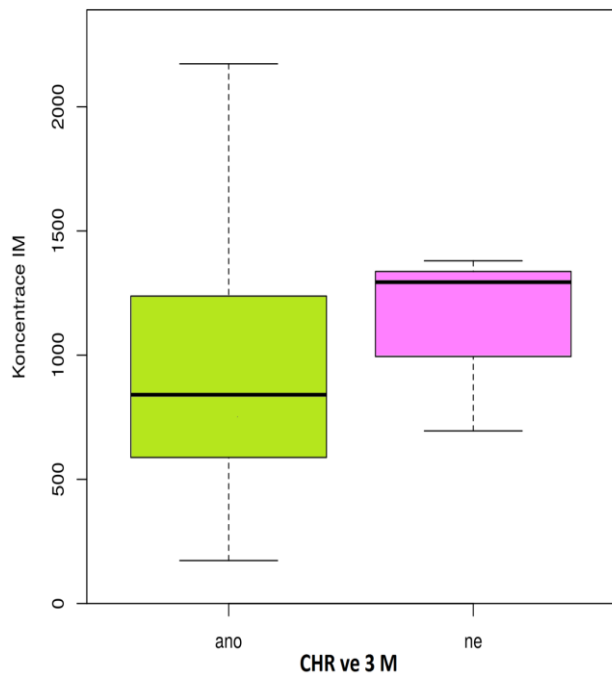
V minulosti byly publikovány práce se závěry, že dosažená plazmatická hladina imatinibu může mít vliv na dosaženou léčebnou odpověď, avšak jiní autoři tuto teorii zpochybňují. Z důvodu nejednoznačných výsledků prací jsme provedli analýzu i našeho souboru.

V našem hodnoceném souboru neměla dosažená plazmatická hladina imatinibu u pacientů statistický význam na dosažení CHR ve 3 M léčby, CCyR ve 12 M léčby a MMR ve 12. a 18. M léčby. V našem souboru jsme prokázali pouze trend **vlivu plazmatické hladiny imatinibu na dosažení CCyR v 6. měsíci** léčby imatinibem ($p = 0,05$) - blíže viz tabulka č. 19. Rozložení plazmatických hladin imatinibu u pacientů podle dosažené odpovědi v jednotlivých měsících léčby dokumentují obrázky č. 16 – 23.

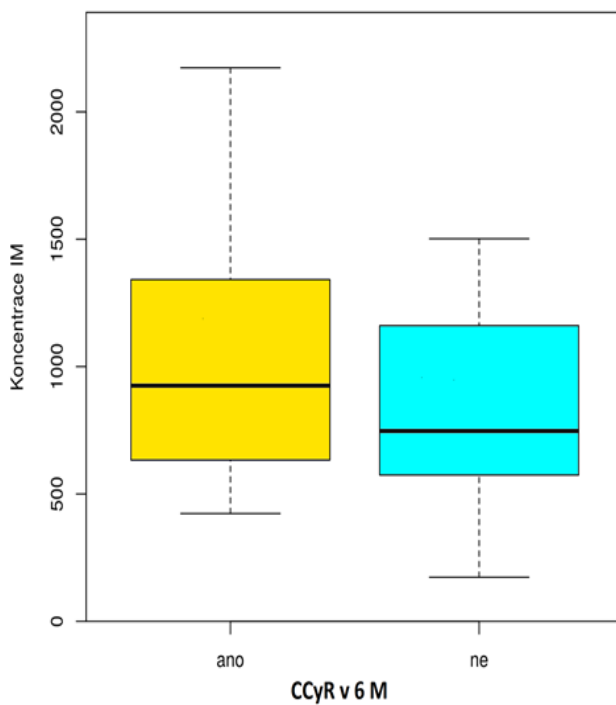
Tabulka č. 19: Vztah plazmatických hladin imatinibu a dosažené léčebné odpovědi

Odpověď	Počet pacientů (%)	Medián hladiny imatinibu (ng/ml)	Rozpětí hladiny imatinibu (ng/ml)	p-hodnota
CHR ve 3M				
• Ano	108 (96 %)	840	173 - 2173	0,33
• Ne	4 (4 %)	1294	223 - 1380	
CCyR v 6M				
• Ano	63 (56 %)	925	173 - 2173	0,05
• Ne	49 (34 %)	747	210 - 1464	
CCyR ve 12M				
• Ano	101 (90 %)	873	173 - 2173	0,65
• Ne	11 (10 %)	720	605 - 1382	
MMR ve 12M				
• Ano	61 (54 %)	854	173 - 2173	0,79
• Ne	51 (36 %)	838	568 - 1382	
MMR v 18M				
• Ano	79 (70 %)	889	173 - 2173	0,08
• Ne	33 (30 %)	693	224 - 1382	

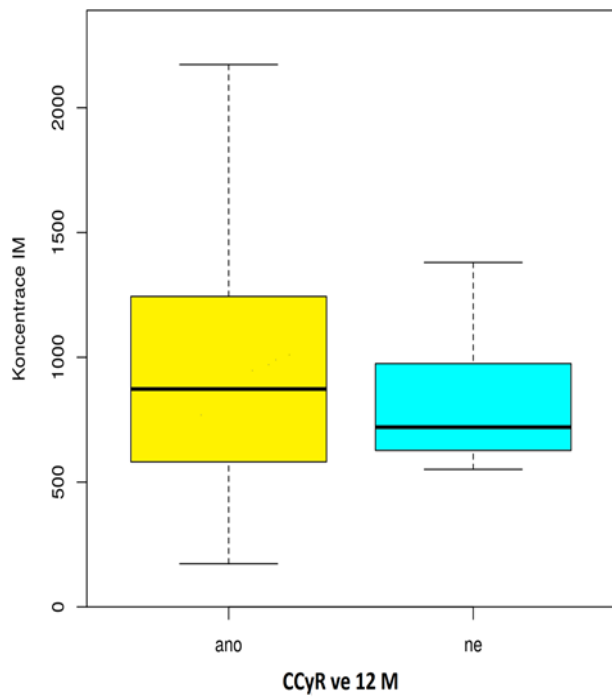
hodnoceno Mann-Whitney testem



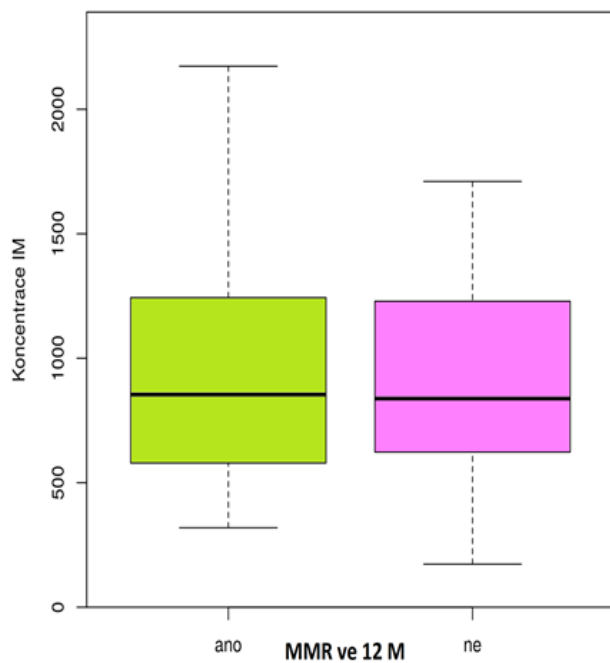
Obrázek č. 16: Rozložení plazmatických hladin imatinibu (ng/ml) u pacientů ve 3 M léčby podle dosažení CHR (hodnoceno Mann-Whitney testem $p = 0,33$)



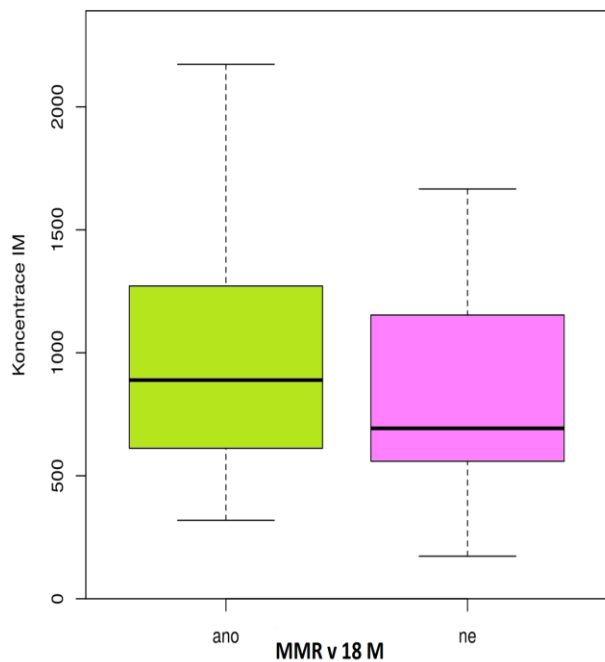
Obrázek č. 17: Rozložení plazmatických hladin imatinibu (ng/ml) u pacientů v 6 M léčby podle dosažení CCyR (hodnoceno Mann-Whitney testem $p = 0,05$)



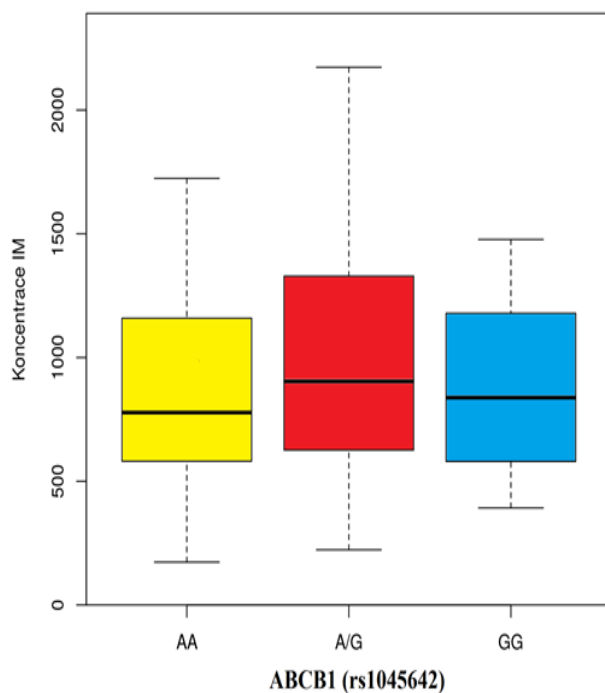
Obrázek č. 18: Rozložení plazmatických hladin imatinibu (ng/ml) u pacientů ve 12 M léčby podle dosažení CCyR (hodnoceno Mann-Whitney testem $p = 0,65$)



Obrázek č. 19: Rozložení plazmatických hladin imatinibu (ng/ml) u pacientů ve 12 M léčby podle dosažení MMR (hodnoceno Mann-Whitney testem $p = 0,79$)



Obrázek č. 20: Rozložení plazmatických hladin imatinibu (ng/ml) u pacientů v 18 M léčby podle dosažení MMR (hodnoceno Mann-Whitney testem $p = 0,08$)



Obrázek č. 21: Vliv kvantitativní míry exprese genotypů AA, AG, GG v genu ABCB1 rs 1045642 na plazmatickou hladinu imatinibu (ng/ml) (hodnoceno ANOVA $p = 0,43$)

4.4 Vliv polymorfismů na dosažené plazmatické hladiny imatinibu

Farmakokinetika imatinibu vykazuje u pacientů velkou variabilitu a na výsledné hladině imatinibu se podílí mnoho faktorů. Snažili jsme se prokázat, zda vyšetřené genetické polymorfismy ovlivňující metabolismus imatinibu mají vliv na výslednou plazmatickou hladinu. Mediány zjištěných plazmatických hladin imatinibu u jednotlivých genotypů polymorfismů nám dokumentuje tabulka č. 20.

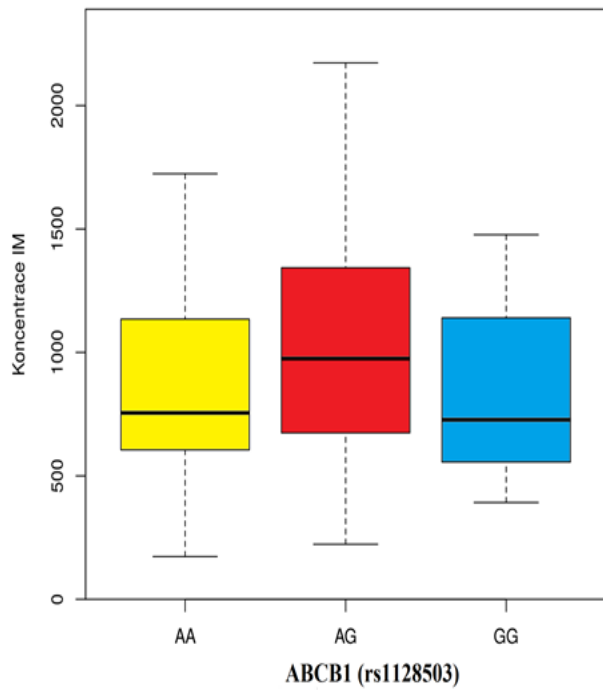
Vztah mezi jednotlivými genotypy polymorfismů rs 1045642 v genu CYP3A5*3, rs 2740574 genu CYP3A4*1, rs776746 v genu CYP2C9*3, rs 683369 SLCO1, rs 1045642 a rs 1128503 v genu ABCB1, rs 2231142 v genu ABCG2 a rs 717620 v genu ABCC2 a dosaženou plazmatickou hladinou imatinibu **nebyl prokázán**. Rovněž nebyl prokázán vztah mezi genotypy CC oproti ostatním genotypům u CYP3A5, vztah genotypu GG a CC oproti ostatním genotypům u SLC22A1, vztah genotypu GG nebo AA oproti ostatnímu u ABCB1(3435 C>T) a u ABCB1 (1236 C>T), vztah genotypu GG nebo TT oproti ostatním u ABCG2 či vztah genotypu TT a CC oproti ostatním u ABCG2. Ani při tomto hodnocení nebyla zjištěna statistická významnost.

Vzhledem k počtu výskytu jednotlivých genotypů v genech bylo možné u tří genů provést hodnocení kvantitativní míry exprese polymorfismu rs 683369 SLC22A1, rs 1045642 a rs 1128503 v genu ABCB1 na hladinu imatinibu pomocí ANOVA testu - viz obrázky č. 21 až 23. Ani při tomto hodnocení nebyl prokázán statistický význam polymorfismů na dosaženou plazmatickou hladinu imatinibu.

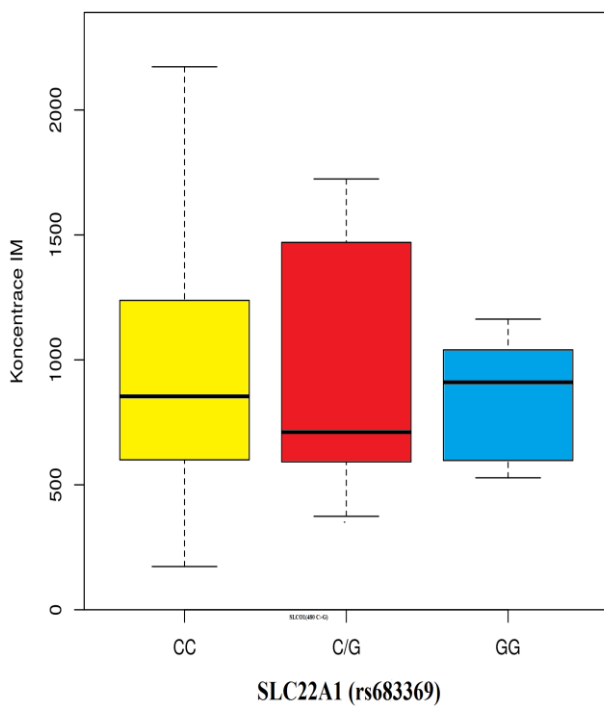
Tabulka č. 20 : Vliv polymorfismů na plazmatické hladiny imatinibu

Genotyp	N	%	Medián hladiny imatinibu (ng/ml)	Rozpětí hladiny imatinibu (ng/ml)	p - hodnota
CYP3A5*3 (rs 776746) • C - C • T - C • T - T • CC vs. TC+TT	98 13 1	87 12 1	841 621 975*	173 - 2173 423 - 1472	0,72 0,39
CYP3A4*1 (rs 2740574) • T - T • T - C	104 8	93 7	881 605	173 - 2173 423 - 1094	0,99
CYP2C9*3 (rs 1057910) • A - A • A - C	95 17	85 15	823 1045	210 - 2173 223 - 1502	0,99
SLC22A1 (rs 683369) • C - C • C - G • G - G • GG vs. CG+CC • CC vs. CG +GG	78 27 7	70 24 6	838 727 925	173 - 2173 374 - 1724 627 - 1163	0,20 0,17 0,50
ABCB1 (rs 1045642) • A - G • A - A • G - G • GG vs. AA+AG • AA vs. AG+GG	58 32 22	51 29 20	881 793 825	223 - 2173 319 - 1724 173 - 1477	0,84 0,76 0,79
ABCB1 (rs 1128503) • A - A • A - G • G - G • GG vs. AA+AG • AA vs. AG+GG	18 62 32	16 55 29	1039 838 727	173 - 1304 210 - 2173 392 - 1477	0,80 0,65 0,74
ABCG2 (rs 2231142) • G - G • T - G • T - T • GG vs. TG+TT • TT vs. GT+GG	87 23 2	80 19 1	804 910 647*	439 - 2173 173 - 1710	0,47 0,27 0,79
ABCC2 (rs 717620) • C - C • C - T • T - T • TT vs. CC+ CT • CC vs. TT + CT	70 37 5	63 33 4	889 910 763	210 - 2173 319 - 1519 661 - 1484	0,70 0,85 0,46

hodnoceno Chí – kvadrát testem ; *nehodnoceno pro velmi nízký počet výskytu



Obrázek č. 22: Vliv kvantitativní míry exprese genotypů AA, AG, GG v genu ABCB1 rs 1128503 na plazmatickou hladinu imatinibu (ng/ml) (hodnoceno ANOVA $p = 0,08$)



Obrázek č. 23: Vliv kvantitativní míry exprese genotypů CC,CG, GG v genu SLC22A1 rs 683369 na plazmatickou hladinu imatinibu (ng/ml) (hodnoceno ANOVA $p = 0,76$)

4.5 Vliv polymorfismů na dosažení léčebné odpovědi

V naší analýze jsme hodnotili, zda lze prokázat souvislost mezi dosaženou optimální léčebnou odpovědí u pacienta v hodnoceném období dle ELN kritérií a typem genotypu polymorfismu zasahujícího do metabolismu a transportu imatinibu. Zjištěné výsledky shrnují tabulky č. 21 až 25.

Ve 3 M léčby neměl žádný vyšetřený polymorfismus vliv na dosažení CHR (viz tabulka č. 21). V 6 M při **hodnocení CCyR** byla zjištěna tendence vlivu na dosažení této odpovědi u polymorfismu rs 1045642 v genu **CYP3A5*3** ($p = 0,06$) a byl prokázán statistický rozdíl při hodnocení významu genotypu CC proti ostatním genotypům ($p = 0,05$). U ostatních genotypů nebyla prokázána asociace polymorfismů na dosaženou CCyR v 6. měsíci (tabulka č. 22). Vliv přítomného polymorfismu v genu **CYP3A5*3** měl také vliv na dosažení **CCyR ve 12. M** léčby ($p = 0,01$). U ostatních vyšetřených polymorfismů vliv jednotlivých genotypů prokázán nebyl (tabulka č. 23).

Při hodnocení MMR ve 12. měsíci léčby byl naznačen pouze trend vlivu přítomného polymorfismu rs 2231142 v genu ABCG2, neboť zjištěná hodnota statistické významnosti byla $p = 0,06$ a při hodnocení vztahu genotypu GG proti ostatnímu TG a TT byla rovněž zjištěna statistická významnost $p = 0,06$. U všech ostatních genotypů jednotlivých polymorfismů nebyl zjištěn vliv na dosaženou odpověď ve smyslu MMR ve 12. M léčby (tabulka č. 24). Při hodnocení vztahu polymorfismů rs 1045642 v genu CYP3A5*3, rs 776746 v genu CYP2C9*3, rs 683369 SLCO1, rs 1045642 a rs 1128503 v genu ABCB1, rs 2231142 v genu ABCG2, rs 717620 v genu ABCC2 a dosažení MMR v 18. M léčby nebyl zjištěn žádný statistický význam (tabulka č. 25) různých genotypů.

U polymorfismu rs 2740574 v genu CYP3A4*1 z důvodu nízkého výskytu heterozygotní formy genotypu TC (3 %) a nepřítomnosti žádné variantní formy v souboru vs. zastoupení homozygotního genotypu CC (97 %) nebyla provedena statistická analýza. Z výsledků je však patrné, že dosažení optimální odpovědi ve smyslu CCyR v 6 M léčby a MMR ve 12 M léčby je daleko častější u pacientů s genotypem TT (40 % vs. 88 % u CCyR; 44 % vs. 63 % u MMR) než u nosičů genotypu TC.

Tabulka č. 21 : Vliv polymorfismů na dosažení CHR ve 3. měsíci léčby imatinibem

Genotyp	N	%	CHR ve 3M ano	CHR ve 3M ne	p - hodnota
CYP3A5*3 (rs 776746) • C - C • T - C • T - T • CC vs. TC+TT	98 13 1	87 12 1	95 12 1	3 1 0	0,68 1
CYP3A4*1 (rs 2740574) • T - T • T - C	104 8	93 7	101 6	3 1	±
CYP2C9*3 (rs 1057910) • A - A • A - C	95 17	85 15	90 14	2 2	0,19
SLC22A1 (rs 683369) • C - C • C - G • G - G • GG vs. CG+CC • CC vs. CG +GG	78 27 7	70 24 6	76 25 6	1 2 1	0,12 0,67 0,17
ABCB1 (rs 1045642) • A - G • A - A • G - G • GG vs. AA+AG • AA vs. AG+GG	58 32 22	51 29 20	57 30 21	1 2 1	0,52 1 0,69
ABCB1 (rs 1128503) • A - A • A - G • G - G • GG vs. AA+AG • AA vs. AG+GG	18 62 32	16 55 29	16 56 32	1 3 0	0,41 0,44 1
ABCG2 (rs 2231142) • G - G • T - G • T - T • GG vs. TG+TT • TT vs. GT+GG	87 23 2	80 19 1	85 21 2	2 2 0	0,33 0,45 1
ABCC2 (rs 717620) • C - C • C - T • T - T • TT vs. CC+ CT • CC vs. TT + CT	70 37 5	63 33 4	65 35 4	3 1 0	0,84 1 1

hodnoceno χ^2 – kvadrát testem, ± statisticky nehodnoceno

Tabulka č. 22: Vliv polymorfismů na dosažení CCyR v 6. měsíci léčby imatinibem

Genotyp	N	%	CCyR v 6M ano	CCyR v 6M ne	p - hodnota
CYP3A5*3 (rs 776746) • C - C • T - C • T - T • CC vs. TC+TT	98 13 1	87 12 1	59 4 0	39 9 1	0,06 0,05
CYP3A4*1 (rs 2740574) • T - T • T - C	104 8	93 7	62 1	42 7	±
CYP2C9*3 (rs 1057910) • A - A • A - C	95 17	85 15	48 11	44 5	0,33
SLC22A1 (rs 683369) • C - C • C - G • G - G • GG vs. CG+CC • CC vs. CG +GG	78 27 7	70 24 6	45 15 3	33 12 4	0,92 1 0,93
ABCB1 (rs 1045642) • A - G • A - A • G - G • GG vs. AA+AG • AA vs. AG+GG	58 32 22	51 29 20	35 19 9	23 13 13	0,23 0,17 1
ABCB1 (rs 1128503) • A - A • A - G • G - G • GG vs. AA+AG • AA vs. AG+GG	18 62 32	16 55 29	10 30 19	7 29 13	0,69 0,67 0,91
ABCG2 (rs 2231142) • G - G • T - G • T - T • GG vs. TG+TT • TT vs. GT+GG	87 23 2	80 19 1	49 13 1	38 10 1	0,98 1 1
ABCC2 (rs 717620) • C - C • C - T • T - T • TT vs. CC+ CT • CC vs. TT + CT	70 37 5	63 33 4	36 20 3	32 16 1	0,68 0,74 0,79

hodnoceno χ^2 – kvadrát testem, ± statisticky nehodnoceno

Tabulka č. 23: Vliv polymorfismů na dosažení CCyR ve 12. měsíci léčby imatinibem

Genotyp	N	%	CCyR ve 12M ano	CCyR ve 12M ne	p - hodnota
CYP3A5*3 (rs 776746) • C - C • T - C • T - T • CC vs. TC+TT	98 13 1	87 12 1	89 12 0	9 1 1	0,01 0,90
CYP3A4*1(rs 2740574) • T - T • T - C	104 8	93 7	94 7	10 1	±
CYP2C9*3 (rs1057910) • A - A • A - C	95 17	85 15	94 7	10 1	0,34
SLC22A1 (rs 683369) • C - C • C - G • G - G • GG vs. CG+CC • CC vs. CG +GG	78 27 7	70 24 6	70 25 6	8 2 1	0,87 1 1
ABCB1 (rs 1045642) • A - G • A - A • G - G • GG vs. AA+AG • AA vs. AG+GG	58 32 22	51 29 20	55 27 19	3 5 3	0,22 0,78 1
ABCB1 (rs 1128503) • A - A • A - G • G - G • GG vs. AA+AG • AA vs. AG+GG	18 62 32	16 55 29	13 54 30	4 5 2	0,13 0,59 0,12
ABCG2 (rs 2231142) • G - G • T - G • T - T • GG vs. TG+TT • TT vs. GT+GG	87 23 2	80 19 1	78 21 2	9 2 0	0,87 1 0,34
ABCC2 (rs 717620) • C - C • C - T • T - T • TT vs. CC+ CT • CC vs. TT + CT	70 37 5	63 33 4	61 32 4	7 4 0	0,78 1 1

hodnoceno χ^2 – kvadrát testem, ± statisticky nehodnoceno

Tabulka č. 24 : Vliv polymorfismů na dosažení MMR ve 12. měsíci léčby imatinibem

Genotyp	N	%	MMR ve 12M ano	MMR ve 12M ne	p - hodnota
CYP3A5*3 (rs 776746) • C - C • T - C • T - T • CC vs. TC+TT	98 13 1	87 12 1	54 7 0	44 6 1	0,54 0,94
CYP3A4*1 (rs 2740574) • T - T • T - C	104 8	93 7	58 3	46 5	±
CYP2C9*3 (rs 1057910) • A - A • A - C	95 17	85 15	52 8	40 8	0,83
SLC22A1 (rs 683369) • C - C • C - G • G - G • GG vs. CG+CC • CC vs. CG +GG	78 27 7	70 24 6	43 14 4	35 13 3	0,87 0,92 1
ABCB1 (rs 1045642) • A - G • A - A • G - G • GG vs. AA+AG • AA vs. AG+GG	58 32 22	51 29 20	35 15 11	23 17 11	0,42 0,82 0,42
ABCB1 (rs 1128503) • A - A • A - G • G - G • GG vs. AA+AG • AA vs. AG+GG	18 62 32	16 55 29	8 32 20	9 27 12	0,56 0,46 0,61
ABCG2 (rs 2231142) • G - G • T - G • T - T • GG vs. TG+TT • TT vs. GT+GG	87 23 2	80 19 1	52 9 0	35 14 2	0,06 0,06 0,39
ABCC2 (rs 717620) • C - C • C - T • T - T • TT vs. CC+ CT • CC vs. TT + CT	70 37 5	63 33 4	38 19 3	30 17 1	0,69 0,77 1

hodnoceno Chí – kvadrát testem, ± statisticky nehodnoceno

Tabulka č. 25: Vliv polymorfismů na dosažení MMR v 18. měsíci léčby imatinibem

Genotyp	N	%	MMR v 18M ano	MMR v 18M ne	p - hodnota
CYP3A5*3 (rs 776746) • C - C • T - C • T - T • CC vs. TC+TT	98 13 1	87 12 1	70 9 0	28 4 1	0,31 0,87
CYP3A4*1 (rs 2740574) • T - T • T - C	104 8	93 7	75 4	29 4	±
CYP2C9*3 (rs 1057910) • A - A • A - C	95 17	85 15	67 10	25 6	0,59
SLC22A1 (rs 683369) • C - C • C - G • G - G • GG vs. CG+CC • CC vs. CG +GG	78 27 7	70 24 6	54 20 5	24 7 2	0,93 1 0,95
ABCB1 (rs 1045642) • A - G • A - A • G - G • GG vs. AA+AG • AA vs. AG+GG	58 32 22	51 29 20	40 21 18	18 11 4	0,31 0,26 0,42
ABCB1 (rs 1128503) • A - A • A - G • G - G • GG vs. AA+AG • AA vs. AG+GG	18 62 32	16 55 29	9 43 25	8 16 7	0,16 0,43 0,13
ABCG2 (rs 2231142) • G - G • T - G • T - T • GG vs. TG+TT • TT vs. GT+GG	87 23 2	80 19 1	64 14 1	23 9 1	0,23 0,15 1
ABCC2 (rs 717620) • C - C • C - T • T - T • TT vs. CC+ CT • CC vs. TT + CT	70 37 5	63 33 4	50 24 3	18 12 1	0,75 1 0,65

hodnoceno χ^2 – kvadrát testem, ± statisticky nehodnoceno

5. Diskuse

5.1 Vliv plazmatických hladin imatinibu na léčebnou odpověď

Na základě výsledků studie IRIS jsou pacienti s CML - CP léčeni standardní dávkou imatinibu 400 mg/denně bez ohledu na jejich věk, hmotnost, povrch těla, jaterní či renální funkce. Úprava dávky imatinibu se provádí nejčastěji ve smyslu snížení dávky při rozvoji hematologické nebo nehematologické toxicity. Naopak zvýšení dávky imatinibu je možné provést při suboptimální léčebné odpovědi, i když v současné době je spíše preferována změna na jiný preparát. V případě, že u nemocného s CML není dosaženo optimální léčebné odpovědi v daném časovém období podle ELN kritérií, patří kromě vyšetření mutací v tyrozinkinázové doméně, stanovení plazmatické hladiny imatinibu k základním vyšetřením. Tímto vyšetřením si zároveň ověříme skutečnost, zda nemocný lék užívá, protože adherence k léčbě je významným faktorem, který má rozhodující vliv na dosažení optimální léčebné odpovědi.

Mnoho studií se zabývalo významem stanovení plazmatických hladin imatinibu na výslednou léčebnou odpověď. Prvními studiemi, které se touto otázkou zabývaly a potvrdily význam plazmatické hladiny imatinibu, byly studie Picarda a Larsona z let 2007 a 2008.^{107,108} Ve studii Picarda bylo hodnoceno 68 pacientů a byla zjištěna korelace mezi plazmatickými hladinami imatinibu a dosažením CCyR a MMR ($p = 0,03$; $p = 0,01$). Za dostatečnou plazmatickou hladinu k dosažení správné léčebné odpovědi byla stanovena hladina 1002 ng/ml, kdy dosažení MMR je očekáváno se 77 % senzitivitou a 71% specifitou. Larson publikoval retrospektivní analýzu ze studie IRIS, která hodnotila 351 pacientů CML - CP užívajících 400 mg imatinibu denně. Byla zde měřena plazmatická hladina imatinibu v den 29 a zjištěno, že se hodnoty u pacientů se CCyR pohybují kolem 1009 ± 544 ng/ml vs. hodnoty 812 ± 409 ng/ml u pacientů bez CCyR ve 12. M léčby. Další subanalýza významu plazmatických hladin u CML pacientů byla provedena ve studii TOPS u 423 pacientů, kteří byli randomizováni 1:2 do ramene 400 mg imatinibu denně vs. 800 mg imatinibu denně.¹⁰⁹ Naměřené plazmatické hladiny imatinibu byly rozděleny do čtyř kvartilů: $Q1 < 1165$ ng/ml, $Q2+3 \geq 1165 - 3180$ ng/ml, $Q4 \geq 3180$ ng/ml. Bylo zjištěno, že dosažení CCyR a MMR ve 12. M léčby koreluje s hladinami, respektive dosažení těchto odpovědí bylo nejnižší u pacientů s plazmatickými hladinami imatinibu, které odpovídají hodnotám z $Q1$ ($p = 0,014$; $p = 0,04$). V této studii byl rovněž analyzován vliv plazmatických hladin na léčebnou toxicitu.

U pacientů s vysokými plazmatickými ≥ 3180 ng/ml byl jasně vyšší výskyt neutropenie stupně 3/4, ale současně i vyšší výskyt nehematologické toxicity všech stupňů ve smyslu vyrážky, průjmu, bolestí svalů nebo kloubů a retence tekutin.

Od roku 2009 bylo následně publikováno několik prací, které význam plazmatické hladiny imatinibu a dosažené léčebné odpovědi neprokázaly.^{111 - 116} Mezi první práce patřila analýza Forresta z roku 2009, která hodnotila 78 pacientů.¹¹⁰ Medián plazmatické hladiny imatinibu zde byl 1065 ng/ml (rozpětí 203 – 2910 ng/ml). V této analýze nebyla prokázána korelace zjištěné hladiny a CCyR či MMR po 12 M léčby. Z dalších prací, které se věnovaly této otázce, je nutné zmínit i práci Fabera z roku 2012, která analyzovala vliv plazmatických hladin na léčebnou odpověď u 131 pacientů s CML, který opět nebyl potvrzen.¹¹²

Námi zjištěné výsledky jsou v souladu s těmito nejednoznačnými závěry studií, neboť v naší analýze 112 pacientů byl prokázán naznačený vliv plazmatické hladiny imatinibu na dosažení CCyR v 6. M léčby, která je na hranici statistické významnosti ($p = 0,05$), ale již jsme neprokázali korelaci mezi plazmatickou hladinou imatinibu a CCyR ve 12. M léčby či vliv zjištěných plazmatických hladin na MMR ve 12. a 18. M léčby.

V publikaci z roku 2013 Ráčil et. al na souboru 228 pacientů neprokázal vliv plazmatické hladiny imatinibu na optimální léčebnou odpověď ve 12. M a 18. M ($p = 0,724$; $p = 0,135$). V této práci autoři zároveň u 26 pacientů provedli stanovení intracelulární hladiny imatinibu.¹¹³ Podobně jako v práci Widmera byla i zde zjištěna korelace mezi intracelulární a plazmatickou hladinou imatinibu, ale stejně jako u plazmatických hladin imatinibu nebyl prokázán vliv na dosažení optimální odpovědi.¹¹⁵

V práci Zhonga z roku 2012, byl hodnocen vliv plazmatických hladin imatinibu, kde byla hladina statisticky vyšší u pacientů se CCyR než u pacienta s PCyR ($p = 0,027$).¹¹⁶ Plazmatická koncentrace imatinibu rovněž pozitivně korelovala s α -1 kyselým glykoproteinem. Autoři rovněž zjišťovali intracelulární hladinu imatinibu v buňkách kostní dřene, která však nekorelovala s hladinami plazmatickými. Tato intracelulární hladina byla ale opět signifikantně vyšší u pacientů s optimální odpovědí než u pacientů rezistentních či s PCyR ($p = 0,013$).

Problém všech zmíněných studií je nutné vidět v tom, že bývá hodnocena pouze jedna hodnota hladiny imatinibu v různém časovém období a současně je velká různorodost v definici optimální léčebné odpovědi. Ze všech analýz zároveň vyplývá, že dosahované plazmatické hladiny imatinibu u pacientů vykazují velkou interindividuální variabilitu. Bylo zjištěno, že faktory jako pohlaví, váha, věk, jaterní či renální parametry pacienta ovlivňují hladiny imatinibu jen velmi málo.^{86, 116 - 119} Tuto skutečnost jsme rovněž ověřili na našem

souboru, kdy dosažená plazmatická hladina imatinibu nebyla ovlivněna body mass indexem pacienta ani vypočtenou glomerulární filtrací ($p = 0,136$; $p = 0,71$). Práce, ve kterých byl pozorován vliv hmotnosti či povrchu těla na hladinu imatinibu byly provedeny na asijské populaci a domnívám se, že zde bude mít důležitější význam odlišný metabolismus imatinibu než vlastní hmotnost pacienta.^{120, 121}

Rozhodující význam na udržení stabilní plazmatické hladiny imatinibu má správné užívání léku, lékové interakce a individuální farmakokinetika léčiva. Tato zahrnuje vstřebávání imatinibu v zažívacím traktu, vazbu na bílkoviny v plazmě, transportní mechanismy a metabolismus imatinibu v játrech. Výsledným ideálním stavem by měla být přítomnost léčiva v cílových buňkách, aby léčba CML mohla být efektivní.^{117–119}

5.2 Vliv genetických polymorfismů na dosažené plazmatické hladiny imatinibu

První prací, která se zabývala vlivem genetických polymorfismů na plazmatickou hladinu imatinibu byla práce z roku 2010 Takahashiho.¹²¹ V této práci byly analyzovány polymorfismy CYP3A5*3 (6986A>G), SLC22A1 (156T>C, 480G>C, 1022C>T a 1222A>G), ABCB1 (1236T>C, 2677G>T, 3435T>C), ABCC2 (-24C>T) a v genu ABCG2 (421C>A). Byla zjištěna pouze korelace mezi hladinou imatinibu a polymorfismem v genu ABCG2. Zjištěná plazmatická hladina imatinibu byla statisticky vyšší u non-CC alel v ABCG2 polymorfismu ($p = 0,015$). Tato analýza byla provedena na 67 pacientech, ale je nutné zmínit, že u asijské populace tyto vzácnější varianty jsou zastoupeny daleko častěji než v populaci kavkazské. Další prací, která hodnotila některé polymorfismy a jejich vliv na plazmatickou hladinu imatinibu je práce Seonga z roku 2012, ve které byly hodnoceny následující genotypy jaterních enzymů: CYP3A4*18 (878T>C), CYP3A5*3 (6986A>G), CYP2C9*3 (1075A>C), CYP2C19*2 (681G>A), CYP2C19*3 (636G>A) a CYP2D6*10B (100C>T).¹²³ Z transportních genotypů zde byly hodnoceny ABCB1 (1236T>C, 3435T>C), ABCG2 (421C>A), SLC22A1 (1022C>T) a SLC22A2 (808G>T). U žádného analyzovaného polymorfismu nebyla zjištěna korelace mezi stanoveným genotypem a plazmatickou hladinou imatinibu u pacienta. Toto pozorování odpovídá i našim závěrům, kdy jsme rovněž

v souboru u žádného z osmi analyzovaných polymorfismů neprokázali vliv genotypu na dosaženou plazmatickou hladinu imatinibu.

5.3 Vliv genetických polymorfismů na léčebnou odpověď

Více prací bylo publikováno s analýzami, zda některé z polymorfismů mohou ovlivnit u pacientů dosaženou léčebnou odpověď. První publikovanou prací je práce Kima z roku 2009, kde bylo vyšetřeno 16 nukleotidových polymorfismů v pěti kandidátních genech CYP3A5*3, SLC22A1, ABCB1, ABCC2 a genu AGP u 229 pacientů. Tato práce představuje dosud největší publikovaný soubor věnující se této problematice.¹²⁴ Ze studie vyplynulo, že nosiči GG genotypu u ABCG2 (rs 2231142) měl negativní vliv na dosažení CCyR ($p = 0,03$), zatímco AC nebo CC genotyp měl negativní vliv na dosažení MMR. Z další práce Seonga vyplývá, že jednotlivé genotypy ABCG2 neměly vliv na dosažení cytogenetické odpovědi, ale významně se lišily dosažené molekulární odpovědi mezi jednotlivými genotypy ($p = 0,02$), kdy opět u AC nebo CC genotypu byl nižší počet pacientů s dosaženou MMR. V roce 2013 Au publikoval analýzu 215 pacientů, kde byl opět prokázán význam jednotlivých variant genotypu ABCG2 na dosažení MMR ($p = 0,004$).¹²⁵ Tato pozorování jsou v souladu s naším závěrem, kdy jsme rovněž prokázali naznačený trend významu polymorfismu ABCG2 na dosažení MMR ve 12. M ($p = 0,06$). Naše závěry oproti výše uvedeným výsledkům nejsou však tak jednoznačné.

Ve stejných pracích je věnována pozornost i polymorfismům ABCB1, kdy v práci Kima, Takahashi a Seonga nebyl prokázán vliv tohoto polymorfismu na výslednou odpověď a tyto závěry jsou v souladu i s naším pozorováním. Naopak v dalších pracích autorů Au a Salimazandové bylo prokázáno, že u CC genotypu v ABCB1 3435 je C alela spojena s horší odpovědí na imatinib.^{125, 126} V roce 2015 byla Wangem publikována metanalýza všech dosud publikovaných 186 studií, ve kterých u 987 pacientů s CML byl hodnocen význam polymorfismů rs 1045642, rs 1128503 a rs 2032582 v genu ABCB1 (MDR1). Nebyl prokázán vztah dosažení optimální odpovědi a genotypů daného polymorfismu.¹²⁸

V naší analýze jsme neprokázali žádný vliv varianty polymorfismu genu SLC22A1 (rs 683369) a toto odpovídá i závěrům prací Seonga či Takashiho, kde optimální léčebná odpověď či selhání léčby nebylo spojeno s polymorfismy tohoto genu.^{122, 123} V již zmíněné analýze Kima však GG genotyp u SLC22A1 (rs 683369) neměl vliv na dosažení CCyR či MMR, ale byl významně spojen se selháním léčby ($p = 0,02$).¹²⁴ Práce z roku 2013 Koren-Michowitz analyzovala u 167 pacientů 4 varianty polymorfismů v genu SLC22A1 (rs

41267797, rs 683369, rs 12208357, rs 628031). V této práci na výslednou léčebnou odpověď měl vliv pouze polymorfismus rs 628031, kdy genotypy AA a GA měly vyšší riziko selhání léčby než genotyp GG (47 % vs. 29 %; $p = 0,06$). Byl přítomen i signifikantní rozdíl v 5 - letém OS (88 % vs. 97%; $p = 0,03$).¹²⁷

Výsledky o významu polymorfismů jaterních enzymů CYP3A5 a CYP3A4 jsou opět kontroverzní. Z práce Kima vyplývá, že genotyp AA u CYP3A5 (rs 776746) je spojen s nižší pravděpodobností dosažení MMR ($p = 0,01$). Toto pozorování odpovídá i našim závěrům, kdy jsme prokázali trend významu polymorfismu CYP3A5*3 na dosažení CCyR v 6. M léčby ($p = 0,06$) a tento vliv byl více patrný na dosažení CCyR ve 12. M léčby ($p = 0,01$), kdy non-CC genotyp měl negativní vliv na dosažení optimální léčebné odpovědi. Poslední menší analýza, která byla publikována v roce 2013 Bedewym, hodnotila 78 CML pacientů a prokázala rovněž vliv polymorfismů v CYP3A5 na dosažení optimální odpovědi.¹³² Naopak v analýze Seonga při vyšetření šesti různých polymorfismů v genech CYP3A4*18, CYP3A5*3, CYP2C9*3, CYP2C19*2, CYP2C19*3 a CYP2D6*10B nebyl ani v jednom případě.

V souboru 189 pacientů publikovaném v roce 2012 Angelini bylo hodnoceno 20 polymorfismů v různých genech. Z jaterních enzymů byl hodnocen pouze polymorfismus v genu CYP3A4, u kterého nosiči genotypu TT dosáhli vyššího počtu MMR oproti nosičům genotypu TC, což je ve shodě i s našimi závěry.¹³³ V této studii dále byl naznačen vliv polymorfismu v ABCB1 (MDR1; rs 60023214) na dosaženou MMR ($p = 0,06$). Pokud tato analýza byla provedena pouze na kavkazské subpopulaci souboru, tento vliv na MMR byl statisticky významnější ($p = 0,005$). Náš soubor tvořili pouze pacienti kavkazské populace a nebyl prokázán vztah polymorfismu rs 1045642 a rs 1128503 v genu ABCB1 na dosažení optimální odpovědi (CCyR v 6. M, MMR ve 12. M).

Velmi rozdílné závěry prací, které hodnotí význam polymorfismů genů účastnících se metabolismu a transportu imatinibu, jsou dány především odlišnou frekvencí výskytu jednotlivých genotypových variant podle etnických skupin.

V našem souboru bylo analyzováno dosažení optimální léčebné odpovědi v daném časovém úseku podle kritérií ELN z let 2009 a 2013, tedy dosažení CHR ve 3. M léčby, CCyR v 6. a 12. M léčby a MMR ve 12. a 18. M léčby a jednotlivých polymorfismů v genech CYP3A5*3, CYP3A4*1, CYP2C9*3, SLC22A1, ABCB1, ABCG2 a ABCC2. Byl prokázán trend významu polymorfismu CYP3A5*3 na dosažení CCyR v 6. měsíci léčby ($p = 0,06$), současně pacienti s genotypem CC oproti ostatním genotypům (TC/TT) měli vyšší počet optimálních odpovědí ($p = 0,06$). Dále byl prokázán vliv polymorfismu CYP3A5*3 na CCyR ve 12. měsíci léčby ($p = 0,01$).

Z ostatních genetických polymorfismů byl prokázán naznačený trend vlivu ABCG2 na dosažení MMR ve 12. M léčby včetně výhody genotypu GG oproti TG/TT ($p = 0,06$). Avšak již nebyl přítomen vliv na MMR v 18. M léčby.

U polymorfismů v genech CYP2C9*3, CYP3A4*1, SLC22A1, ABCB1 (34345C>T; 1236C>A) a ABCC2 žádný vliv na dosažené léčebné odpovědi nebyl prokázán.

6. Hodnocení splnění cílů práce

Zavedením vyšetření polymorfismů v genech CYP3A5*3, CYP3A4*1, CYP2C9*3, SLC22A1, ABCB1, ABCG2 a ABCC2, které zasahují do farmakokinetiky imatinibu, byl splněn náš primární cíl. Na základě prvních výsledků však na podkladě typu polymorfismu u pacienta s CML nelze zatím predikovat dosažení optimální léčebné odpovědi a tedy nelze vést ani strategii léčby CML.

Potvrdili jsme, že standartně užívaná dávka imatinibu 400 mg denně vede u pacientů k dosažení optimálních léčebných odpovědí, které v našem souboru odpovídají publikovaným datům. Neprokáali jsme vliv BMI ani renálních funkcí pacienta na dosaženou plazmatickou hladinu imatinibu, která by nás opravňovala individualizovat léčebnou dávku imatinibu. Neprokáali jsme, že námi vyšetřované polymorfismy mají vliv u jednotlivých pacientů na dosaženou plazmatickou hladinu imatinibu.

7. Závěry k pracovním hypotézám

ad 1)

Prokázali jsme vliv *plazmatické hladiny imatinibu na dosažení CCyR v 6. měsíci léčby*.

U pacientů s dosaženou CCyR byl medián hladiny imatinibu 925 ng/ml (173 – 2173 ng/ml) vs. medián hladiny 747 ng/ml (210 – 1464 ng/ml) u pacientů, kteří CCyR nedosáhli ($p = 0,05$). Tento vliv již nebyl patrný na dosažení CCyR ve 12. měsíci léčby. Vliv plazmatických hladin imatinibu na dosažení MMR ve 12. a 18. měsíci léčby nebyl prokázán.

ad 2)

Vztah mezi *genotypy polymorfismů* rs 1045642 v genu CYP3A5*3, rs 2740574 genu CYP3A4*1, rs776746 v genu CYP2C9*3, rs 683369 SLCO1, rs 1045642 a rs 1128503 v genu ABCB1, rs 2231142 v genu ABCG2 a rs 717620 v genu ABCC2 *a dosaženou plazmatickou hladinou imatinibu* u pacienta *nebyl prokázán*.

ad 3)

Bylo analyzováno dosažení optimální léčebné odpovědi v daném časovém úseku podle kritérií ELN z let 2009 a 2013 a jednotlivých polymorfismů. Byl zjištěn pouze *trend významu polymorfismu CYP3A5*3 na dosažení CCyR v 6. a 12. měsíci léčby* ($p = 0,06$; $p = 0,01$). Současně pacienti s genotypem CC oproti ostatním genotypům (TC/TT) měli vyšší počet optimálních odpovědí ve smyslu CCyR v 6. měsíci ($p = 0,06$). Z ostatních genetických polymorfismů byl prokázán naznačený trend vlivu ABCG2 na dosažení MMR ve 12. měsíci léčby včetně výhody genotypu GG oproti TG/TT ($p = 0,06$), avšak již nebyl přítomen vliv na MMR v 18. měsíci léčby. U polymorfismů v genech CYP2C9*3, CYP3A4*1, SLC22A1, ABCB1 (34345C>T; 1236C>A) a ABCC2 žádný vliv na dosažené léčebné odpovědi nebyl prokázán.

8. Doporučení pro praxi

- Vyšetření plazmatické hladiny imatinibu je nezbytným vyšetřením při objasňování příčiny selhání léčby u pacienta s CML včetně posouzení u pacienta jeho adherence k léčbě.
- V případě výskytu léčebné toxicity je vhodná kontrola plazmatických hladin imatinibu. Při stanovení velmi vysokých plazmatické hladiny imatinibu je možné snížení léčebné dávky imatinibu.
- Výsledky vyšetření polymorfismů genů účastnících se farmakokinetiky imatinibu nejsou natolik jednoznačné, aby v běžné praxi bylo možné na jejich základě predikovat léčebnou odpověď, vybírat vhodný TKI či měnit léčbu u pacientů rezistentních na TKI.

9. Literatura

1. NOVELL, P. C., HUNGERFORD, D. A. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science*, 1960, vol. 132, s. 1479.
2. NOWELL, P. C., HUNGERFORD, D. A. Chromosome studies in human leukemia. II. Chronic granulocytic leukemia. *J. Natl. Cancer Inst*, 1961, vol. 27, s. 1013–1035.
3. ROWLEY JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 1973, vol 1, no. 243, s. 290-3.
4. HEISTERKAMP, N., STAM, K., GROFFEN, J., DE KLEIN, A., GROSVELD, G., Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. *Nature*, 1985, vol. 3, no. 315, s. 758-61.
5. DALEY, G. Q., VAN ETTEN, R. A., BALTIMORE, D., Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*, 1990, vol. 16, no. 247, s. 824-30.
6. DEININGER, M. W., GOLDMAN, J. M., MELO, J. V. The molecular biology of chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 2000, vol. 15, no. 10, s. 3343-56.
7. HEHLMANN, R., HOCHHAUS, A., BACCARANI, M. European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*, 2007, vol. 370, no. 9584, s. 342-350.
8. CHEREDA, B., MELO, J. V. Natural course and biology of CML. *Ann Hematol*, 2015, vol. 94, no. 2, s. 107 – 121.
9. O'DWYER, M. E., MAURO, M.J., KURILIK, G., MORI, M., BALLEISEN, S., OLSON, S., MAGENIS, E., CAPDEVILLE, R., DRUKER, BJ. The impact of clonal evolution on response to imatinib mesylate (STI571) in accelerated phase CML. *Blood*, 2002, vol. 100, no 5, s. 1628-1633.
10. CORTES, J. E., TALPAZ, M., GILES, F., O'BRIEN, S., RIOS, M. B., SHAN, J., GARCIA-MANERO, G., FADERL, S., THOMAS, D.A., WIERDA, W., FERRAJOLI, A., JEHA, S., KANTARJIAN, H.M. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood*, 2003, vol. 101, no. 10, s. 3794-3800.
11. DEININGER, M. W., CORTES, J., PAQUETTE, R., PARK, B., HOCHHAUS, A., BACCARANI, M., STONE, R., FISCHER, T., KANTARJIAN, H. M, NIEDERWIESER, D., GAMBACORTI-PASSERINI, C., GATHMANN, I., GOLDMAN, J. M., SMITH, D., DRUKER, B.J., GUILHOT, F., The prognosis for patients with chronic myeloid leukemia who have clonal

- cytogenetic abnormalities in philadelphia chromosome-negative cells. *Cancer*, 2007, vol. 110, no. 7, s. 1509 - 1519.
12. ROHRBACHER, M., BERGER, U., HOCHHAUS, A., METZGEROTH, G., ADAM, K., LAHAYE, T., SAUSSELE, S., MÜLLER, M. C., HASFORD, J., HEIMPEL, H., HEHLMANN, R. Clinical trials underestimate the age of chronic myeloid leukemia (CML) patients. Incidence and median age of Ph/BCR-ABL- positive CML and other chronic myeloproliferative disorders in a representative area in Germany. *Leukemia*, 2009, vol. 23, no. 3, s. 602-4.
 13. SEITER, K. Considerations in the Management of Elderly Patients With Chronic Myeloid Leukemia. *Clin. Lymph. Myeloma Leukemia* 2012, vol. 12, no. 1, s. 12 -19.
 14. FABER, E., INDRÁK, K., DIVOKÝ, V., JAROŠOVÁ, M., KAŠPAROVÁ, P., KLAMOVIČ, H., KOZA, V., MACHOVÁ POLÁKOVÁ, K., MAYER, J., MICHÁLEK, J., MUŽÍK, J., PELOUCHOVÁ J., ROHOŇ, P., SEDLÁČEK, P., ŠKROBÁNKOVÁ, A., VESELOVSKÁ, J., VOGLOVÁ, J., VRBACKÝ, F. Chronická myeloidní leukemie - *monografie*, Galén, 2010, s. 1- 234.
 15. KLAMOVIČ, H., VOGLOVÁ, J. Doporučení pro diagnostiku, monitorování a léčbu chronické myeloidní leukemie u dospělých. *Transfúze Hematol Dnes*. 2011, vol. 17, s. 1 - 4.
 16. HOCHHAUS, A., DREYLING, M. ESMO Guidelines Working Group. Chronic myelogenous leukemia: ESMO clinical recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 2008, vol. 19, suppl. 2, s. 63-64.
 17. BACCARANI, M., SAGLIO, G., GOLDMAN, J., HOCHHAUS, A., SIMONSSON, B., APPELBAUM, F., APPERLEY, J., CERVANTES, F., CORTES, J., DEININGER, M., GRATWOHL, A., GUILHOT, F., HOROWITZ, M., HUGHES, T., KANTARJIAN, H., LARSON, R., NIEDERWIESER, D., SILVER, R., HEHLMANN R. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 2006, vol. 108, no. 15, s. 1809-1820.
 18. VARDIMAN, J. W., HARTUS, N. L., BRUNNING, R. D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002, vol. 100, s 2292 - 2302.
 19. SOKAL, J. E., COX, E. B., BACCARANI, M., TURA, S., GOMEZ, G. A., ROBERTSON, J. E., TSO, C. Y., BRAUN, T. J., CLARKSON, B. D., CERVANTES, F. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood*, 1984, vol. 63, no. 4, s. 789-799.
 20. HASFORD, J., PFIRRMANN, M., HEHLMANN, R., ALLAN, N. C., BACCARANI, M., KLUIN-NELEMANS, J. C., ALIMENA, G., STEEGMANN, J. L., ANSARIM H. A new prognostic

- score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. *J Natl Cancer Inst*, 1998, vol. 90, no. 11, s. 850-858.
21. HASFORD, J., BACCARANI, M., HOFFMANN, V., GUILHOT, J., SAUSSELE, S., ROSTI, G., GUILHOT, F., PORKKA, K., OSSENKOPPELE, G., LINDOERFERM D., SIMONSSON, B., PFIRRMANN, M., HEHLMANN, R. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood*, 2011, vol. 118, no. 3, s. 686-692.
 22. KLAMOŤOVÁ, H. Inhibitory tyrozinových kináz - zásadní změna v prognóze. *Vnitř Léč*, 2013, vol. 59, s. 624-26.
 23. SCHWARTZ, J., WINTERS, J. L., PADMANABHAN, A., BALOGUN, R. A., DELANEY, M., LINENBERGER, M. L., SZCZEPIORKOWSKI, Z. M., WILLIAMS, M. E., WU, Y., SHAZ, B. H. Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice-evidence-based approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: the sixth special issue. *J Clin Apher*, 2013, vol. 28, no. 3, s. 145-284.
 24. HEHLMANN, R., HEIMPEL, H., HASFORD, J., KOLB, H. J., PRALLE, H., HOSSFELD, D. K., QUEISSER, W., LÖFFLER, H., HEINZE, B., GEORGII, A. Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: Prolongation of survival by hydroxyurea. *Blood*, 1993, vol. 82, no. 2, s. 398–407.
 25. HOCHHAUS, A., LIN, F., REITER, A. Quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients on interferon- α therapy by competitive polymerase chain reaction. *Blood*, 1996; vol. 87, s. 1549–1555.
 26. KANTARJIAN, H. M., O'BRIEN, S., SMITH, T. L. Treatment of Philadelphia chromosome - positive early chronic phase chronic myelogenous leukemia with daily doses of interferon alpha and low - dose cytarabine. *J Clin Oncol*, 1999, vol. 17, no. 1, s. 284-92.
 27. HEHLMANN, R., BERGER, U., PFIRRMANN, M., HOCHHAUS, A., METZGEROTH, G., MAYWALD, O., HASFORD, J., REITER, A., HOSSFELD, D. K., KOLB, H. J., LÖFFLER, H., PRALLE, H., QUEISSER, W., GRIESSHAMMER, M., NERL, C., KUSE, R., TOBLER, A., EIMERMACHER, H., TICHELLI, A., AUL, C., WILHELM, M., FISCHER, J. T., PERKER, M., SCHEID, C., SCHENK, M., WEISS, J., MEIER, C. R., KREMERS, S., LABEDZKI, L., SCHMEISER, T., LOHRMANN, H. P., HEIMPEL, H., GERMAN CML-STUDY GROUP. Randomized comparison of interferon alpha and hydroxyurea with hydroxyurea monotherapy in chronic myeloid leukemia (CML-study II): prolongation of survival by the combination of interferon alpha and hydroxyurea. *Leukemia*, 2003, vol. 17,

- no. 8, s. 1529-37.
26. CHEN, R., MA, B., YANG, K., TIAN, J., LIU, Y. Interferon alfa versus interferon alfa plus cytarabine combination therapy for chronic myeloid leukemia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Curr Ther Res Clin Ex*, 2011, vol. 72, no. 4, s. 150-63.
 29. DULUCQ, S., KRAJINOVIC, M. The pharmacogenetics of imanitib. *Genome Med*, 2010, vol. 30, no. 1, s. 1-8.
 30. VAN ERP, N. P., GELDERBLOM, H., GUCHELAAR, H. J. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev*, 2009, vol. 35, no 8, s. 692-706.
 31. KANTARJIAN, H., SAWYERS, C., HOCHHAUS, A., GUILHOT, F., SCHIFFER, C., GAMBACORTI-PASSERINI, C., NIEDERWIESER, D., RESTA, D., CAPDEVILLE, R., ZOELLNER, U., TALPAZ, M., DRUKER, B., GOLDMAN, J., O'BRIEN, S.G., RUSSELL, N., FISCHER, T., OTTMANN, O., CONY-MAKHOUL, P., FACON, T., STONE, R., MILLER, C., TALLMAN, M., BROWN, R., SCHUSTER, M., LOUGHRAN, T., GRATWOHL, A., MANDELLI, F., SAGLIO, G., LAZZARINO, M., RUSSO, D., BACCARANI, M., MORRA, E. INTERNATIONAL STI571 CML STUDY GROUP. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med*, 2002, vol. 346, no. 9, s. 645-652.
 32. TALPAZ, M., SILVER, R. T., DRUKER, B. J., GOLDMAN, J. M., GAMBACORTI-PASSERINI, C., GUILHOT, F., SCHIFFER, C. A., FISCHER, T., DEININGER, M. W., LENNARD, A. L., HOCHHAUS, A., OTTMANN, O. G., GRATWOHL, A., BACCARANI, M., STONE, R., TURA, S., MAHON, F. X., FERNANDES-REESE, S., GATHMANN, I., CAPDEVILLE, R., KANTARJIAN, H. M., SAWYERS, C.L. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood*, 2002, vol. 15, no. 6, s. 1928-36.
 33. O'BRIEN, S. G., GUILHOT, F., LARSON, R. A., GATHMANN, I., BACCARANI, M., CERVANTES, F., CORNELISSEN, J. J., FISCHER, T., HOCHHAUS, A., HUGHES, T., LECHNER, K., NIELSEN, J. L., ROUSSELOT, P., REIFFERS, J., SAGLIO, G., SHEPHERD, J., SIMONSSON, B., GRATWOHL, A., GOLDMAN, J. M., KANTARJIAN, H. M, TAYLOR, K., VERHOEF, G., BOLTON, A. E., CAPDEVILLE, R., DRUKER, B. J.; IRIS INVESTIGATORS. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 2003, vol. 348, no. 11, s. 994-1004.

34. MARIN, D., MARKTEL, S., SZYDLO, R., BUA, M., FOOT, N., OLAVARRIA, E., SHEPHERD, P., KANFER, E., GOLDMAN, J. M., APPERLEY, J.F. Survival of patients with chronic-phase chronic myeloid leukaemia on imatinib after failure on interferon alfa. *Lancet*, 2003, vol. 362, no. 9384, s. 617-619.
35. MARIN, D., MARKTEL, S., BUA, M., SZYDLO, R. M., FRANCESCHINOM A., NATHAN, I., FOOT, N., CRAWLEY, C., NA NAKORN, T., OLAVARRIA, E., LENNARD, A., NEYLON, A., O'BRIEN, S. G., GOLDMAN, J. M., APPERLEY, J. F. Prognostic factors for patients with chronic myeloid leukaemia in chronic phase treated with imatinib mesylate after failure of interferon alfa. *Leukemia*. 2003, vol. 17, no. 8, s. 1448-53.
36. KANTARJIAN, H., O'BRIEN, S., CORTES, J., GILES, F., SHAN, J., RIOS, M.B., FADERL, S., VERSTOVSEK, S., GARCIA-MANERO, G., WIERDA, W., KORNBLAU, S., FERRAJOLI, A., KEATING, M., TALPAZ, M. Survival advantage with imatinib mesylate therapy in chronic-phase chronic myelogenous leukemia (CML-CP) after IFN- alpha failure and in late CML-CP: comparison with historical controls. *Clin Cancer Res*, 2004, vol. 10, no. 12, s. 68-75.
37. KANTARJIAN H. M., O'BRIEN S., CORTES J., GILES F. J., RIOS M. B., SHAN J., FADERL S., GARCIA-MANERO G., FERRAJOLI A., VERSTOVSEK S., WIERDA W., KEATING M., TALPAZ M. Imatinib mesylate therapy improves survival in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in the chronic phase: comparison with historic data. *Cancer*, 2003, vol. 98, no. 12, s. 2636-2642.
38. DE LAVALLADE, H., APPERLEY, J. F., KHORASHAD, J. S., MILOJKOVIC, D., REID, A. G., BUA, M., SZYDLO, R., OLAVARRIA, E., KAEDA, J., GOLDMAN, J. M., MARIN, D. Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis. *J Clin Oncol*, 2008, vol. 26, no. 20, s. 3358- 3363.
39. HUGHES, T. P., HOCHHAUS, A., BRANFORD, S., MÜLLER, M. C., KAEDA, J. S., FORONI, L., DRUKER, B. J., GUILHOT, F., LARSON, R. A., O'BRIEN, S. G., RUDOLTZ, M. S., MONE, M., WEHRLE, E., MODUR, V., GOLDMAN, J. M., RADICH, J. P.; IRIS investigators Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). *Blood*, 2010, vol. 116, no. 19, s. 3758-3765.

40. KANTARJIAN, H. M., TALPAZ, M., O'BRIEN, S., JONES, D., GILES, F., GARCIA-MANERO, G., FADERL, S., RAVANDI, F., RIOS, M. B., SHAN, J., CORTES, J. Survival benefit with imatinib mesylate versus interferon-alpha-based regimens in newly diagnosed chronic-phase chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 2006, vol. 108, no. 6, s. 1835-1840.
41. HOCHHAUS, A., O'BRIEN, S. G., GUILHOT, F., DRUKER, B. J., BRANFORD, S., FORONI, L., GOLDMAN, J. M., MÜLLER, M. C., RADICH, J. P., RUDOLTZ, M., MONE, M., GATHMANN, I., HUGHES, T. P., LARSON, R. A.; IRIS Investigators Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 2009, vol. 23, no. 6, s. 1054-1061.
42. DEININGER, M., O'BRIEN, S. G., GUILHOT, F., GOLDMAN, J. M., HOCHHAUS, A., GOLDMAN, J. M., HOCHHAUS A., HUGHES, T. P., RADICH, J. P., HATFIELD, A. K., MONE, M., FILIAN, J., REYNOLDS, J., GATHMANN, I., LARSON, R. A., DRUKER, B.J. IRIS 8-year follow up: Sustained survival and low risk for progression of events in patients with newly diagnosed CML treated with imatinib. *Blood*, 2009, vol. 114, abstract 1126.
43. KALMANTI, L., SAUSSELE, S., LAUSEKER, M., MÜLLER, M. C., DIETZ, C. T., HEINRICH, L., HANFSTEIN, B., PROETEL, U., FABARIUS, A., KRAUSE, S. W., RINALDETTI, S., DENGLER, J., FALGE, C., OPPLIGER-LEIBUNDGUT, E., BURCHERT, A., NEUBAUER, A., KANZ, L., STEGELMANN, F., PFREUNDSCHUH, M., SPIEKERMANN, K., SCHEID, C., PFIRRMANN, M., HOCHHAUS, A., HASFORD, J., HEHLMANN, R. Safety and efficacy of imatinib in CML over a period of 10 years: data from the randomized CML-study IV. *Leukemia*, 2015, vol. 29, no. 5, s. 1123-32.
44. MAURO, M. J., DEININGER, M. W. Management of drug toxicities in chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.*, 2009, vol. 22, no. 3, s. 409-429.
45. PINILLA-IBARZ J., CORTES J., MAURO M. J. Intolerance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia: Definitions and clinical implications. *Cancer*, 2011, vol. 117, no 4, s. 688-697.
46. IRVINE E., WILLIAMS C. Treatment-, patient-, and disease-related factors and the emergence of adverse events with tyrosine kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukemia. *C. Pharmacotherapy*, 2013 vol. 33, no. 8, s. 868-881.
47. HOCHHAUS, A., KANTARJIAN, H. M., BACCARANI, M., LIPTON, J. H., APPERLEY, J. F., DRUKER, B. J., FACON, T., GOLDBERG, S. L., CERVANTES, F., NIEDERWIESER, D., SILVER, R. T., STONE, R. M., HUGHES, T. P., MULLER, M. C., EZZEDDINE, R.,

- COUNTOURIOTIS, A. M., SHAH, N. P. Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy. *Blood*, 2007, vol. 109, no. 6, s. 2303-2309.
48. HOCHHAUS, A., BACCARANI, M., DEININGER, M., APPERLEY, J. F., LIPTON, J. H., GOLDBERG, S. L., CORM, S., SHAH, N. P., CERVANTES, F., SILVER, R. T., NIEDERWIESER, D., STONE, R. M., DOMBRET, H., LARSON, R. A., ROY, L., HUGHES, T., MÜLLER, M. C., EZZEDDINE, R., COUNTOURIOTIS, A. M., KANTARJIAN, H. M. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia*, 2008, vol. 22, no. 6, s. 1200-6.
49. GUILHOT, F., APPERLEY, J., KIM, D. W., BULLORSKY, E. O., BACCARANI, M., ROBOZ, G. J., AMADORI, S., DE SOUZA, C. A., LIPTON, J. H., HOCHHAUS, A., HEIM, D., LARSON, R. A., BRANFORD, S., MULLER, M. C., AGARWAL, P., GOLLERKERI, A., TALPAZ, M. Dasatinib induces significant hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in accelerated phase. *Blood*, 2007, vol. 109, no. 10, s. 4143-4150.
50. CORTES, J., ROUSSELOT, P., KIM, D. W., RITCHIE, E., HAMERSCHLAK, N., COUTRE, S., HOCHHAUS, A., GUILHOT, F., SAGLIO, G., APPERLEY, J., OTTMANN, O., SHAH, N., ERBEN, P., BRANFORD, S., AGARWAL, P., GOLLERKERI, A., BACCARANI, M. Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Blood*, 2007, vol. 109, no. 8, s. 3207-3213.
51. KANTARJIAN, H., PASQUINI, R., LEVY, V. Dasatinib or high-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloid leukemia resistant to imatinib at a dose of 400 to 600 milligrams daily: two-year follow-up of a randomized phase 2 study (START-R). *Cancer*, 2009, vol. 115, no. 18, s. 4136-4147.
52. KANTARJIAN, H., SHAH, N. P., HOCHHAUS, A., CORTES, J., SHAH S., AYALA, M., MOIRAGHI, B., SHEN, Z., MAYER, J., PASQUINI, R., NAKAMAE, H., HUGUET, F., BOQUÉ, C., CHUAH C., BLEICKARDT, E., BRADLEY-GARELIK, M. B., ZHU, C., SZATROWSKI, T., SHAPIRO, D., BACCARANI, M. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 2010, vol. 362, no. 24, s. 2260-2270.
53. SHAH, N. P., KANTARJIAN, H. M., KIM, D. W., DORLHIAC-LLACER, P. E., MILONE, J. H., VELA-OJEDA, J., SILVER, R. T., KHOURY, H. J., CHARBONNIER, A., KHOROSHKO, N., PAQUETTE, R. L., DEININGER, M., COLLINS, R. H., OTERO, I., HUGHES, T., BLEICKARDT,

- E., STRAUSS, L., FRANCIS, S., HOCHHAUS, A. Intermittent target inhibition with dasatinib 100 mg once daily preserves efficacy and improves tolerability in imatinib-resistant and -intolerant chronic-phase chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 2008, vol. 26, no. 19, s. 3204-3212.
54. SHAH, N. P., KIM, D. W., KANTARJIAN, H., ROUSSELOT, P., LLACER, P. E., ENRICO, A., VELA-OJEDA, J., SILVER, R. T., KHOURY, H. J., MÜLLER, M. C., LAMBERT, A., MATLOUB, Y., HOCHHAUS, A. Potent, transient inhibition of BCR-ABL with dasatinib 100 mg daily achieves rapid and durable cytogenetic responses and high transformation-free survival rates in chronic phase chronic myeloid leukemia patients with resistance, suboptimal response or intolerance to imatinib. *Haematologica*, 2010 vol. 95, no. 2, s. 232-40.
55. JABBOUR, E., KANTARJIAN, H. M., SAGLIO, G., STEEGMANN, J. L., SHAH, N. P., BOQUÉ, C., CHUAH, C., PAVLOVSKY, C., MAYER, J., CORTES, J., BACCARANI, M., KIM, D. W., BRADLEY-GARELIK, M. B., MOHAMED, H., WILDGUST, M., HOCHHAUS, A. Early response with dasatinib or imatinib in chronic myeloid leukemia: 3-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood*, 2014, vol. 123, no.4, s. 494-500.
56. Kantarjian, H. M., GILES, F., GATTERMANN, N., BHALLA, K., ALIMENA, G., PALANDRI, F., OSSENKOPPELE, G. J., NICOLINI, F. E., O'BRIEN, S. G., LITZOW, M., BHATIA, R., CERVANTES, F., HAQUE, A., SHOU, Y., RESTA, D. J., WEITZMAN, A., HOCHHAUS, A., LE COUTRE, P. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood*, 2007, vol. 110, no. 10, s. 3540-3546.
57. LE COUTRE, P., OTTMANN, O. G., GILES, F., KIM, D. W., CORTES, J., GATTERMANN, N., APPERLEY, J. F., LARSON, R. A., ABRUZZESE, E., O'BRIEN, S.G., KULICZKOWSKI, K., HOCHHAUS, A., MAHON, F. X., SAGLIO, G., GOBBI, M., KWONG, Y. L., BACCARANI, M., HUGHES, T., MARTINELLI, G., RADICH, J. P., ZHENG, M., SHOU, Y., KANTARJIAN, H. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is active in patients with imatinib-resistant or -intolerant accelerated-phase chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 2008, vol. 111, no. 4, s 1834-1839.
58. KANTARJIAN, H. M., GILES, F. J., BHALLA, K. N., PINILLA-IBARZ, J., LARSON, R. A., GATTERMANN, N., OTTMANN, O. G., HOCHHAUS, A., RADICH, J. P., SAGLIO, G., HUGHES, T. P., MARTINELLI, G., KIM, D. W., SHOU, Y., GALLAGHER, N. J., BLAKESLEY, R., BACCARANI, M., CORTES, J., LE COUTRE, PD. Nilotinib is effective in patients with

- chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib resistance or intolerance: 24-month follow-up results. *Blood*, 2011, vol. 117, no. 4, s. 1141-5.
59. HUGHES, T. P., HOCHHAUS, A., KANTARJIAN, H. M., CERVANTES, F., GUILHOT, F., NIEDERWIESER, D., LE COUTRE, P. D., ROSTI, G., OSSENKOPPELE, G., LOBO, C., SHIBAYAMA, H., FAN, X., MENSSSEN, H. D., KEMP, C., LARSON, R. A., SAGLIO, G. Safety and efficacy of switching to nilotinib 400 mg twice daily for patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase with suboptimal response or failure on front-line imatinib or nilotinib 300 mg twice daily. *Haematologica*, 2014, vol. 99, no. 7, s. 1204-11.
 60. LARSON, R. A., HOCHHAUS, A., HUGHES, T. P., CLARK, R. E., ETIENNE, G., KIM, D. W., FLINN, I. W., KUROKAWA, M., MOIRAGHI, B., YU, R., BLAKESLEY, R. E., GALLAGHER, N. J., SAGLIO, G., KANTARJIAN, H. M. Nilotinib vs imatinib in patients with newly diagnosed philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTnd 3-year follow-up. *Leukemia*, 2012, vol. 26, no. 10, s. 2197–203.
 61. YEUNG, D. T., OSBORN, M. P., WHITE, D. L., BRANFORD, S., BRALEY, J., HERSCHTAL, A., KORNSHAUSER, M., ISSA, S., HIWASE, D. K., HERTZBERG, M., SCHWARER, A. P., FILSHIE, R., ARTHUR, C. K., KWAN, Y. L., TROTMAN, J., FORSYTH, C. J., TAPER, J., ROSS, D. M., BERESFORD, J., TAM, C., MILLS, A. K., GRIGG, A. P., HUGHES, T.P., AUSTRALASIAN LEUKAEMIA AND LYMPHOMA GROUP. TIDEL-II: first-line use of imatinib in CML with early switch to nilotinib for failure to achieve time-dependent molecular targets. *Blood*, 2015, vol. 125, no. 6, s. 915-23.
 62. CORTES, J. E., KIM, D. W., PINILLA-IBARZ, J., LE COUTRE, P., PAQUETTE, R., CHUAH, C., NICOLINI, F. E., APPERLEY, J. F., KHOURY, H. J., TALPAZ, M., DIPERSIO, J., DEANGELO, D. J., ABRUZZESE, E., REA, D., BACCARANI, M., MÜLLER, M. C., GAMBACORTI-PASSERINI, C., WONG, S., LUSTGARTEN, S., RIVERA, V. M., CLACKSON, T., TURNER, C. D., HALUSKA, F. G., GUILHOT, F., DEININGER, M. W., HOCHHAUS, A., HUGHES, T., GOLDMAN, J. M., SHAH, N. P., KANTARJIAN, H., PACE INVESTIGATORS. et al. A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*, 2013, vol. 369, no. 19, s. 1783-1796.
 63. LIPTON, J., CHUAH, C. H., GUERCI-BRESLER, A. A Phase 3 Trial of Ponatinib Compared with Imatinib in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CP-CML), *Blood*, 2014, vol. 121, no. 21, abstract 519.
 64. CORTES, J. E., TALPAZ, M., KANTARJIAN, H. Ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*, 2014, vol. 370, no. 6, s. 577.

65. JAIN, P., KANTARJIAN, H., JABBOUR, E., GONZALEZ, G. N., BORTHAKUR, G., PEMMARAJU, N., DAVER, N., GACHIMOVA, E., FERRAJOLI, A., KORNBLOU, S., RAVANDI, F., O' BRIEN, S., CORTES, J. Ponatinib as first-line treatment for patients with chronic myeloid leukaemia in chronic phase: a phase 2 study. *Lancet Haematol*, 2015, vol. 2, no. 9, s. 376-383.
66. CORTES, J. E., KANTARJIAN, H. M., BRÜMMENDORF, T. H. KIM, D. W., TURKINA, A. G., SHEN, Z. X., PASQUINI, R., KHOURY, H. J., ARKIN, S., VOLKERT, A., BESSON, N., ABBAS, R., WANG, J., LEIP, E., GAMBACORTI-PASSERINI, C. Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib. *Blood*, 2011, vol. 118, no. 17, s. 4567-4576.
67. KHOURY, H. J., CORTES, J. E., KANTARJIAN, H. M., GAMBACORTI - PASSERINI, C., BACCARANI, M., KIM, D. W., ZARITSKEY, A., COUNTOURIOTIS, A., BESSON, N., LEIP, E., KELLY, V., BRÜMMENDORF, T.H. Bosutinib is active in chronic phase chronic myeloid leukemia after imatinib and dasatinib and/or nilotinib therapy failure. *Blood*, 2012, vol. 119, no. 15, s. 3403-3412.
68. GAMBACORTI - PASSERINI, C., BRÜMMENDORF, T. H., KIM, D. W., TURKINA, A. G., MASSZI, T., ASSOULINE, S., DURRANT, S., KANTARJIAN, H. M., KHOURY, H. J., ZARITSKEY, A., SHEN, Z. X., JIN, J., VELLENGA, E., PASQUINI, R., MATHEWS, V., CERVANTES, F., BESSON, N., TURNBULL, K., LEIP, E., KELLY, V., CORTES, J.E. Bosutinib efficacy and safety in chronic phase chronic myeloid leukemia after imatinib resistance or intolerance: Minimum 24- month follow-up. *Am J Hematol*, 2014, vol. 89, no. 7, s. 732-42.
69. MAHON, F., X., RÉA, D., GUILHOT, J., GUILHOT, F., HUGUET, F., NICOLINI, F., LEGROS, L., CHARBONNIER, A., GUERCI, A., VARET, B., ETIENNE, G., REIFFERS, J., ROUSSELOT, P, INTERGROUPE FRANÇAIS DES LEUCÉMIES MYÉLOÏDES CHRONIQUES 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. *Lancet Oncol*, 2010, vol. 11, no. 11, s. 1029-35.
70. ROSS, D. M., BRANFORD, S., SEYMOUR, J. F. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood*, 2013, vol. 122, no. 4, s. 515-22.

71. ROUSSELOT, P., CHARBONNIER, A., CONY - MAKHOUL, P., AGAPE, P., NICOLINI, F. E., VARET, B., GARDEMBAS, M., ETIENNE, G., RÉA, D., ROY, L., ESCOFFRE-BARBE, M., GUERCI-BRESLER, A., TULLIEZ, M., PROST, S., SPENTCHIAN, M., CAYUELA, J. M., REIFFERS, J., CHOMEL, J. C., TURHAN, A., GUILHOT, J., GUILHOT, F., MAHON, F. X. Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease. *J Clin Oncol*, 2014, vol. 32, no. 5, s. 424-30.
72. MAHON, F. X., RICHTER, J., GUILHOT, J., MULLER, M., DIETZ, C. H., PORKKA, K., HJORTH-HANSEN, H., GRUBER, F., PANAGOITIDIS, P., OSSENKOPPELE, G. J., MAYER, J., ALMEIDA, A., MACHOVA POLAKOVA, K., EHRENCRONA, H., KAIRISTO, V., BERGER, M. G., OLSSON STROMBERG, U., MUSTJOKI, S., HOCHHAUS, A., PFIRRMANN, M., SAUSSELE, S. Interim Analysis of a Pan European Stop Tyrosine Kinase Inhibitor Trial in Chronic Myeloid Leukemia: The EURO- SKI study, *Blood*, 2014, vol. 121, no. 21, abstract 151.
73. PYE, S. M., CORTES, J., AULT, P., HATFIELD, A., HATFIELD, A., KANTARJIAN, H., PILOT, R., ROSTI, G., APPERLEY, J. F. The effects of imatinib on pregnancy outcome. *Blood*, 2008, vol. 111, no. 12, s. 5505-5508.
74. AULT, P., KANTARJIAN, H., O'BRIEN, S., FADERL, S., BERAN, M., RIOS, M. B., KOLLER, C., GILES, F., KEATING, M., TALPAZ, M., CORTES, J. Pregnancy among patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *J Clin Oncol*, 2006, vol. 24, no. 7, s. 1204-8.
75. PALANI, R., MILOJKOVIC, D., APPERLEY, J. F. Managing pregnancy in chronic myeloid leukaemia. *Ann Hematol*, 2015, vol. 94, suppl. 2, s. 167-76.
76. APPERLEY, J. F. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*, 2007, vol. 8, no. 11, s. 1018-1029.
77. APPERLEY, J. F. Part II: management of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*, 2007, vol. 8, no. 12, s. 1116-1128.
78. BIXBY, D., TALPAZ, M. Seeking the causes and solutions to imatinib-resistance in chronic myeloid leukemia, *Leukemia*, 2011, vol. 25, no. 1, s. 7-22.
79. JABBOUR, E. J., CORTES, J. E., KANTARJIAN, H. M. Resistance to tyrosine kinase inhibition therapy for chronic myelogenous leukemia: a clinical perspective and emerging treatment options. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2013, vol. 13, no. 5, s. 515-29.

80. SOVERINI, S., COLAROSSO, S., GNANI, A., ROSTI, G., CASTAGNETTI, F., POERIO, A., IACOBUCCI, I., AMABILE, M., ABRUZZESE, E., ORLANDI, E., RADAELLI, F., CICCONE, F., TIRIBELLI, M., DI LORENZO, R., CARACCILO, C., IZZO, B., PANE, F., SAGLIO, G., BACCARANI, M., MARTINELLI, G; GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia et al. 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. *Clin Cancer Res*, 2006, vol. 12, no. 24, s. 7374-7379.
81. SOVERINI, S., HOCHHAUS, A., NICOLINI, F. E., GRUBER, F., LANGE, T., SAGLIO, G., PANE, F., MÜLLER, M. C., ERNST, T., ROSTI, G., PORKKA, K., BACCARANI, M., CROSS, N. C., MARTINELLI, G. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood*, 2011, vol. 118, no. 5, s. 1208-15.
82. VAJPAI, N., STRAUSS, A., FENDRICH, G., COWAN-JACOB, S. W., MANLEY, P. W., GRZESIEK, S., JAHNKE, W. Solution conformations and dynamics of ABL kinase-inhibitor complexes determined by NMR substantiate the different binding modes of imatinib/nilotinib and dasatinib. *J Biol Chem*, 2008, vol. 283, no. 26, s. 18292-18302.
83. BRANFORD, S., MELO, J. V., HUGHES, T. P. Selecting optimal second-line tyrosine kinase inhibitor therapy for chronic myeloid leukemia patients after imatinib failure: does the BCR-ABL mutation status really matter? *Blood*, 2009, vol. 114, no. 27, s. 5426-5435.
84. HUGHES, T., DEININGER, M., HOCHHAUS, A., BRANFORD, S., RADICH, J., KAEDA, J., BACCARANI, M., CORTES, J., CROSS, N. C., DRUKER, B. J., GABERT, J., GRIMWADE, D., HEHLMANN, R., KAMEL-REID, S., LIPTON, J. H., LONGTINE, J., MARTINELLI, G., SAGLIO, G., SOVERINI, S., STOCK, W., GOLDMAN, J. M. 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, vol. 108, no. 6, s. 28-37.
85. GOLDMAN, J. M. How I treat chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Blood*. 2007 vol. 110, no. 8, s. 2828-37.
86. TAKAHASHI, N., MIURA, M. Therapeutic drug monitoring of imatinib for chronic myeloid leukemia patients in the chronic phase *Pharmacology*. 2011, vol. 87, no. 6, s. 241-8.

87. BRUHN, O., CASCORBI, I., Polymorphisms of the drug transporters ABCB1, ABCG2, ABCC2 and ABCC3 and their impact on drug bioavailability and clinical relevance. *Expert Opinion*, 2014, vol. 10, no. 10, s. 1337-54.
88. JABBOUR, E. J., HUGHES, T. P., CORTÉS, J. E., KANTARJIAN, H. M., HOCHHAUS, A. Potential mechanisms of disease progression and management of advanced-phase chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2014, vol. 55, no. 7, s. 1451-62.
89. GRATWOHL, A., HERMANS, J., GOLDMAN, J. M., ARCESE, W., CARRERAS, E., DEVERGIE, A., FRASSONI, F., GAHRTON, G., KOLB, H. J., NIEDERWIESER, D., RUUTU, T., VERNANT, J. P., DE WITTE, T., APPERLEY, J. Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet*, 1998, vol. 352, no. 2, s. 1087-1092.
90. MARIN, D., IBRAHIM, A. R., LUCAS, C., GERRARD, G., WANG, L., SZYDLO, R. M., CLARK, R. E., APPERLEY, J. F., MILOJKOVIC, D., BUA, M., PAVLU, J., PALIOMPEIS, C., REID, A., REZVANI, K., GOLDMAN, J. M., FORONI, L. 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. *J Clin Oncol*, 2012, vol. 30, no. 3, s. 232-238.
91. HANFSTEIN, B., MÜLLER, M. C., HEHLMANN, R., ERBEN, P., LAUSEKER, M., FABARIUS, A., SCHNITTGER, S., HAFERLACH, C., GÖHRING, G., PROETEL, U., KOLB, H. J., KRAUSE, S. W., HOFMANN, W. K., SCHUBERT, J., EINSELE, H., DENGLER, J., HÄNEL, M., FALGE, C., KANZ, L., NEUBAUER, A., KNEBA, M., STEGELMANN, F., PFREUNDSCHUH, M., WALLER, C. F., BRANFORD, S., HUGHES, T. P., SPIEKERMANN, K., BAERLOCHER, G. M., PFIRRMANN, M., HASFORD, J., SAUBELE, S., HOCHHAUS, A. German CML Study Group. Early molecular and cytogenetic response is predictive for long-term progression-free and overall survival in chronic myeloid leukemia (CML). *Leukemia*, 2012, vol. 26, no. 9, s. 2096-2102.
92. OEHLER V. G., GOOLEY T., SNYDER D. S., JOHNSTON L., LIN A., CUMMINGS C. C., CHU S., BHATIA R., FORMAN S. J., NEGRIN R. S., APPELBAUM F. R., RADICH J. P. The effects of imatinib mesylate treatment before allogeneic transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood*, 2007, vol. 109, no. 4, s. 1782-1789.
93. BRECCIA, M., PALANDRI, F., IORI, A. P., COLACI, E., LATAGLIATA, R., CASTAGNETTI, F., TORELLI, G. F., USAI, S., VALLE, V., MARTINELLI, G., ROSTI, G., FOÀ, R., BACCARANI,

- M., ALIMENA, G. Second-generation tyrosine kinase inhibitors before allogeneic stem cell transplantation in patients with chronic myeloid leukemia resistant to imatinib. *Leuk Res*, 2010, vol. 34, no. 2, s. 143-7.
94. GRATWOHL, A., PFIRRMANN, M., ZANDER, A., KRÖGER, N., BEELEN, D., NOVOTNY, J., NERL, C., SCHEID, C., SPIEKERMANN, K., MAYER, J., SAYER, H. G., FALGE, C., BUNJES, D., DÖHNER, H., GANSER, A., SCHMIDT-WOLF, I., SCHWERDTFEGER, R., BAURMANN, H., KUSE, R., SCHMITZ, N., WEHMEIER, A., FISCHER, J. T., HO, A. D., WILHELM, M., GOEBELER, M. E., LINDEMANN, H. W., BORMANN, M., HERTENSTEIN, B., SCHLIMOK, G., BAERLOCHER, G. M., AUL, C., PFREUNDSCHUH, M., FABIAN, M., STAIB, P., EDINGER, M., SCHATZ, M., FAUSER, A., ARNOLD, R., KINDLER, T., WULF, G., ROSSELET, A., HELLMANN, A., SCHÄFER, E., PRÜMMER, O., SCHENK, M., HASFORD, J., HEIMPEL, H., HOSSFELD, D. K., KOLB, H. J., BÜSCHE, G., HAFERLACH, C., SCHNITTGER, S., MÜLLER, M. C., REITER, A., BERGER, U., SAUBELE, S., HOCHHAUS, A., HEHLMANN, R. Long-term outcome of patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia-A randomized comparison of stem cell transplantation with drug treatment. *Leukemia*, 2015, doi: 10.1038/leu.2015.281. [Epub ahead of print]
95. BACCARANI, M., CORTES, J., PANE, F., NIEDERWIESER, D., SAGLIO, G., APPERLEY, J., CERVANTES, F., DEININGER, M., GRATWOHL, A., GUILHOT, F., HOCHHAUS, A., HOROWITZ, M., HUGHES, T., KANTARJIAN, H., LARSON, R., RADICH, J., SIMONSSON, B., SILVER, R. T., GOLDMAN, J., HEHLMANN, R; European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*, 2009, vol. 27, no. 35, s. 6041-6051
96. BACCARANI, M., DEININGER, M. W., ROSTI, G., HOCHHAUS, A., SOVERINI, S., APPERLEY, J. F., CERVANTES, F., CLARK, R. E., CORTES, J. E., GUILHOT, F., HJORTH-HANSEN, H., HUGHES, T. P., KANTARJIAN, H. M., KIM, D. W., LARSON, R. A., LIPTON, J. H., MAHON, F. X., MARTINELLI, G., MAYER, J., MÜLLER, M. C., NIEDERWIESER, D., PANE, F., RADICH, J. P., ROUSSELOT, P., SAGLIO, G., SAUBELE, S., SCHIFFER, C., SILVER, R., SIMONSSON, B., STEEGMANN, J. L., GOLDMAN, J. M., HEHLMANN, R. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*, 2013, vol. 122, no. 6, s. 872-884
97. BACCARANI, M., CASTAGNETTI, F., GUGLIOTTA, G., ROSTI, G. A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. *Ann Hematol*, 2015 vol. 94, suppl. 2, s. 141-7.

98. JABBOUR, E., KANTARJIAN, H., CORTES, J. Use of second- and third-generation tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia: an evolving treatment paradigm. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2015, vol. 15, no. 6, s. 323-324.
99. CORTES, J., QUINTAS – CARDAMA, A., JABBOUR, E., O'BRIEN, S., VERSTOVSEK, S., BORTHAKUR, G., RAVANDI, F., GARCIA-MANERO, G., BURTON, E., SHAN, J., KANTARJIAN, H. The clinical significance of achieving different levels of cytogenetic response in patients with chronic myeloid leukemia after failure to front-line therapy: Is complete cytogenetic response the only desirable endpoint? *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2011, vol. 11, no. 5, s. 421-426.
100. JABBOUR, E., HOCHHAUS, A., CORTES, L. A., ROSÉE, P., KANTARJIAN, H. M. Choosing the best treatment strategy for chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib: weighing the efficacy and safety of individual drugs with BCR-ABL mutations and patient history. *Leukemia*, 2010, vol. 24, no. 1, s. 6-12.
101. JABBOUR, E., KANTARJIAN, H. M., JONES, D., SHAN, J., O' BRIEN, S., REDDY, N., WIERDA, W. G., FADERL, S., GARCIA-MANERO, G., VERSTOVSEK, S., RIOS, M. B., CORTES, J. Imatinib mesylate dose escalation is associated with durable responses in patients with chronic myeloid leukemia after cytogenetic failure on standard-dose imatinib therapy. *Blood*, 2009, vol. 113, no. 10, s. 2154-2160.
102. BACCARANI, M., ROSTI, G., CASTAGNETTI, F., HAZNEDAROGLU, I., PORKKA, K., ALIMENA, G., ABRUZZESE, E., EHRENCRONA, H., HJORTH-HANSEN, H., KAIRISTO, V., LEVATO, L., MARTINELLI, G., NAGLER, A., LANNG NIELSEN, J., OZBEK, U., PALANDRI, F., PALMIERI, F., PANE, F., REGE-CAMBRIN, G., RUSSO, D., SPECCHIA, G., TESTONI, N., WEISS-BJERRUM, O., SAGLIO, G., SIMONSSON, B. Comparison of imatinib 400 mg and 800 mg daily in the front-line treatment of high-risk, Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia: a European LeukemiaNet Study. *Blood*, 2009, vol. 113, no. 19, s. 4497-4504.
103. IBRAHIM, A. R., ELIASSON, L., APPERLEY, J. F., MILOJKOVIC, D., BUA, M., SZYDLO, R., MAHON, F. X., KOZLOWSKI, K., PALIOMPEIS, C., FORONI, L., KHORASHAD, J. S., BAZEOS, A., MOLIMARD, M., REID, A., REZVANI, K., GERRARD, G., GOLDMAN, J., MARIN, D. Poor adherence is the main reason for loss of CCyR and imatinib failure for chronic myeloid leukemia patients on long-term therapy. *Blood*, 2011, vol. 117, no. 14, s. 3733-3736.

104. MARIN, D., BAZEOS, A., MAHON, F. X., ELIASSON, L., MILOJKOVIC, D., BUA, M., APPERLEY, J. F., SZYDLO, R., DESAI, R., KOZLOWSKI, K., PALIOMPEIS, C., LATHAM, V., FORONI, L., MOLIMARD, M., REID, A., REZVANI, K., DE LAVALLADE, H., GUALLAR, C., GOLDMAN, J., KHORASHAD, J. S. Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib. *J Clin Oncol*, 2010, vol. 28, no. 14, s. 2381-2388.
105. BĚLOHLÁVKOVÁ, P., VOGLOVÁ, J., RADOCHA, J., ŽÁK, P. Má věk nemocných s chronickou myeloidní leukemií při léčbě imatinibem vliv na dosaženou léčebnou odpověď? *Vnitř Lék* 2015; vol. 61, no. 9, s. 785-791.
106. COCKCROFT, D.W., GAULT, M.H. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*, 1976, vol. 16, s. 31-41.
107. PICARD, S., TITIER, K., ETIENNE, G., TEILHET, E., DUCINT, D., BERNARD, M. A., LASSALLE, R., MARIT, G., REIFFERS, J., BEGAUD, B., MOORE, N., MOLIMARD, M., MAHON, F.X. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *BLOOD*, 2007, VOL. 109, NO. 8, s. 3496-3499
108. LARSON, R. A., DRUKER, B. J., GUILHOT, F., O'BRIEN, S. G., RIVIERE, G. J., KRAHNKE, T., GATHMANN, I., WANG, Y; IRIS (International Randomized Interferon vs STI571) Study Group. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood*, 2008, vol. 111, no. 8, s. 4022-4028.
109. GUILHOT, F., HUGHES, T. P., CORTES, J., DRUKER, B. J., BACCARANI, M., GATHMANN, I., HAYES, M., GRANVIL, C., WANG, Y. Plasma exposure of imatinib and its correlation with clinical response in the Tyrosine Kinase Inhibitor Optimization and Selectivity Trial. *Haematologica*, 2012, vol. 97, no. 5, s. 731-8.
110. FORREST, D. L., TRAINOR, S., BRINKMAN, R. R., BARNETT, M. J., HOGGE, D. E., NEVILL, T. J., SHEPHERD, J. D., NANTEL, S. H., TOZE, C. L., SUTHERLAND, H. J., SONG, K.W., LAVOIE, J. C., POWER, M. M., ABOU-MOURAD, Y., SMITH, C. A. Cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia are correlated with Sokal risk scores and duration of therapy but not trough imatinib plasma levels. *Leuk Res*, 2009, vol. 33, no. 2, s. 271-5.
111. MAHON, F. X., MOLIMARD, M. Correlation between trough imatinib plasma concentration and clinical response in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res*, 2009, vol. 33, no. 8, s. 1147-8.

112. FABER, E., FRIEDECKÝ, D., MIČOVÁ, K., ROŽMANOVÁ, S., DIVOKÁ, M., JAROŠOVÁ, M., INDRÁK, K., ADAM, T. Imatinib trough plasma levels do not correlate with the response to therapy in patients with chronic myeloid leukemia in routine clinical setting. *Ann Hematol*, 2012, vol. 91, no. 6, s. 923-9.
113. RACIL, Z., RAZGA, F., KLAMOVA, H., VOGLOVA, J., BELOHLAVKOVA, P., MALASKOVA, L., POTESIL, D., MUZIK, J., ZACKOVA, D., POLAKOVA, K. M., ZDRAHAL, Z., MALAKOVA, J., SUTTNAR, J., DYR, J., MAYER, J. No clinical evidence for performing trough plasma and intracellular imatinib concentrations monitoring in patients with chronic myelogenous leukaemia. *Hematol Oncol*, 2014, vol. 32, no. 2, s. 87-93.
114. TAKAHASHI, N., WAKITA, H., MIURA, M., SCOTT, S. A., NISHII, K., MASUKO, M., SAKAI, M., MAEDA, Y., ISHIGE, K., KASHIMURA, M., FUJIKAWA, K., FUKAZAWA, M., KATAYAMA, T., MONMA, F., NARITA, M., URASE, F., FURUKAWA, T., MIYAZAKI, Y., KATAYAMA, N., SAWADA, K. Correlation between imatinib pharmacokinetics and clinical response in Japanese patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther*, 2010, vol. 88, no. 6, s. 809–13.
115. WIDMER, N., DECOSTERD, L. A., LEYVRAZ, S., DUCHOSAL, M. A., ROSSELET, A., DEBIEC- RYCHTER, M., ET CSAJKA, C., BIOLLAZ, J., BUCLIN, T. Relationship of imatinib-free plasma levels and target genotype with efficacy and tolerability. *Br J Cancer*, 2008, vol. 98, no. 10, s. 1633–40.
116. ZHONG, J. S., MENG, F. Y., XU, D., ZHOU, H. S., DAI, M. Correlation between imatinib trough concentration and efficacy in Chinese chronic myelocytic leukemia patients. *Acta Haematol*, 2012, vol. 127, no. 4, s. 221-7.
117. PENG, B., HAYES, M., RESTA, D., RACINE-POON, A., DRUKER, B. J., TALPAZ, M., SAWYERS, C. L., ROSAMILIA, M., FORD, J., LLOYD, P., CAPDEVILLE, R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *J Clin Oncol*, 2004, vol. 22, no. 5, s. 935–42.
118. PENG, B., LLOYD, P., SCHRAN, H. Clinical pharmacokinetics of imatinib. *Clin Pharmacokinet*, 2005, vol. 44, no. 9, s. 879–94.
119. CORTES, J. E., EGORIN, M. J., GUILHOT, F., MOLIMARD, M., MAHON, F. X. Pharmacokinetic/pharmacodynamic correlation and blood-level testing in imatinib therapy for chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 2009, vol. 23, no. 9, s. 1537–44.
120. PAPPAS, P., KARAVASILIS, V., BRIASOULIS, E., PAVLIDIS, N., MARSELOS, M. Pharmacokinetics of imatinib mesylate in end stage renal disease. A case study. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005, vol. 56, no. 4, s. 358-60.

121. SUNG, H. J., LEE, S. R., CHOI, I. K., PARK, Y., CHOI, C. W., KIM, H. J. , YHIM, H. Y., KIM, B. S. Imatinib Mesylate Dose Adjustment Based on Body Surface Area for CML Chronic Phase Patients Intolerant to Standard Dosage. *Acta Haematol.* 2015, vol. 134, no. 1, s. 59 - 68.
122. TAKAHASHI, N., MIURA, M., SCOTT, S. A., KAGAYA, H., KAMEOKA, Y., TAGAWA, H., SAITOH, H., FUJISHIMA, N., YOSHIOKA, T., HIROKAWA, M., SAWADA K..Influence of CYP3A5 and drug transporter polymorphisms on imatinib trough concentration and clinical response among patients with chronic phase chronic myeloid leukemia. *J Hum Gene*, 2010, vol. 55, no. 11, s. 731-7.
123. SEONG, S. J. , LIM, M., SOHN, S. K. , MOON, J. H. , OH, S. J. , KIM, B. S. , RYOO, H. M. , CHUNG, J. S. , JOO, Y. D., BANG, S. M., JUNG, C. W., KIM, D. H., PARK, S.Y., YOON, S. S., KIM, I., LEE, H.G., WON, J. H. , MIN, Y. H. , CHEONG, J.W., PARK, J.S., EOM, K.S., HYUN, M.S., KIM, M.K., KIM, H., PARK, M.R., PARK, J., KIM, C.S., KIM, H.J., KIM, Y.K., PARK, E.K., ZANG, D.Y., JO, D.Y., LEE, H.W., YOON, Y.R. Influence of enzyme and transporter polymorphisms on trough imatinib concentration and clinical response in chronic myeloid leukemia patients. *Ann Oncol*, 2013, vol. 24, no. 3, s. 756-60.
124. KIM, D. H., SRIHARSHA, L., XU, W., KAMEL- REID, S., LIU, X., SIMINOVITCH, K., MESSNER, H. A., LIPTON, J. H. Clinical relevance of a pharmacogenetic approach using multiple candidate genes to predict response and resistance to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*, 2009, vol. 15, no. 14, s. 4750-8.
125. AU, A., AZIZ BABA, A., GOH, A. S., WAHID FADILAH, S. A., TEH, A., ROSLINE, H., ANKATHIL, R. Association of genotypes and haplotypes of multi-drug transporter genes ABCB1 and ABCG2 with clinical response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients. *Biomed Pharmacother*, 2014, vol. 68, no. 3, s. 343-9.
126. SALIMIZAND, H., AMINI, S., ABDI, M., GHADERI, B., AZADI, N. A. Concurrent effects of ABCB1 C3435T, ABCG2 C421A, and XRCC1 Arg194Trp genetic polymorphisms with risk of cancer, clinical output, and response to treatment with imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. *Tumor Biology*, vol. 8, no. 15, s. 3874-4.
126. KOREN-MICHOWITZ, M., BUZAGLO, Z., RIBAKOVSKY, E., SCHWARZ, M., PESSACH, I., SHIMONI, A., BEIDER, K., AMARIGLIO, N., LE COUTRE, P., NAGLER, A. OCT1 genetic variants are associated with long term outcomes in imatinib treated chronic myeloid leukemia patients. *Eur J Haematol*, 2014, vol. 92, no. 4, s. 283-8.

127. WANG, J. L., LIU, H. J., LI, F., YANG, W.Y., WANG, J.M., TAN, S. F., WANG, Q. Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms may not be directly associated with response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Genet Mol Res*, 2015, vol. 14; no. 4, s. 14967-78.
128. YAMAKAWA, Y., HAMADA, A., NAKASHIMA, R., YUKI, M., HIRAYAMA, C., KAWAGUCHI, T., SAITO H. Association of genetic polymorphisms in the influx transporter SLCO1B3 and the efflux transporter ABCB1 with imatinib pharmacokinetics in patients with chronic myeloid leukemia. *Ther Drug Monit*, 2011, vol. 33, no. 2, s. 244-50.
130. ENGLER, J. R., HUGHES, T. P., WHITE, D. L. OCT-1 as a determinant of response to antileukemic treatment. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, vol. 89, no. 4, s. 608-11.
131. WHITE, D. L., DANG, P., ENGLER, J., FREDE, A., ZRIM, S., OSBORN, M., SAUNDERS, V. A., MANLEY, P. W., HUGHES, T. P. Functional activity of the OCT-1 protein is predictive of long-term outcome in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *J Clin Oncol*. 2010; vol. 28, no. 16, s. 2761-2767.
132. BEDEWY, A. M., EL-MAGHRABY, S. M. Do SLCO1B3 (T334G) and CYP3A5*3 polymorphisms affect response in Egyptian chronic myeloid leukemia patients receiving imatinib therapy? *Hematology*, 2013, vol. 18, no. 4, s. 211-6.
133. ANGELINI, S., SOVERINI, S., RAVEGNINI, G., BARNETT, M., TURRINI, E., THORNQUIST, M., PANE, F., HUGHES, T. P., WHITE, D. L., RADICH, J., KIM, D. W., SAGLIO, G., CILLONI, D., IACOBUCCI, I., PERINI, G., WOODMAN, R., CANTELLI-FORTI, G., BACCARANI, M., HRELIA, P., MARTINELLI, G. Association between imatinib transporters and metabolizing enzymes genotype and response in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients receiving imatinib therapy. *Haematologica*, 2013, vol. 98, no. 2, s. 193-200.