

Received: 2006.03.15
Accepted: 2006.08.30
Published: 2006.10.06

Cytogenetyka i oporność *in vitro* na cytostatyki w ostrych białaczkach u dzieci i dorosłych

Cytogenetics and *in vitro* drug resistance of acute leukemia in children and adults

Jan Styczyński¹, Olga Haus^{2,3}

¹ Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika

² Katedra i Zakład Genetyki Klinicznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika

³ Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku, Akademia Medyczna we Wrocławiu

Streszczenie

Mimo stałego postępu w chemioterapii ostrych białaczek, nadal często występują nawroty choroby zarówno u dzieci jak i dorosłych. Obecność aberracji cytogenetycznych w komórkach białaczkowych jest uznanym czynnikiem rokowniczym u pacjentów z ostrymi białaczkami. Translokacja t(9;22) i rearanżacje 11q23/MLL są związane ze złym rokowaniem, natomiast hiperdiploidia ≥ 50 chromosomów i translokacja t(12;21) wiążą się z dobrym rokowaniem w ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL). W ostrej białaczce szpikowej (AML), t(8;21), t(15;17) i inv(16) wiążą się z korzystnym rokowaniem, natomiast monosomie i delecje 5/5q- i 7/7q- oraz kariotyp złożony – z niekorzystnym rokowaniem. Wydaje się, że znaczenie prognostyczne poszczególnych zmian chromosomowych jest związane z różnicami w oporności komórek białaczkowych na cytostatyki w ALL oraz w mniejszym stopniu w AML. Określanie profilu genetycznego metodami mikromacierzy potwierdza istnienie silnej zależności między zmianami cytogenetycznymi komórek nowotworowych a opornością na cytostatyki w ALL. Prawdopodobnie profil cytogenetyczny komórek białaczkowych determinuje ich oporność na cytostatyki i końcową odpowiedź na terapię. Znajomość zmian w kariotypie blastów białaczkowych oraz towarzyszącego mu profilu lekooporności może ułatwiać zastosowanie nowoczesnej terapii celowanej, zarówno u dzieci jak i u dorosłych.

Słowa kluczowe:

ostra białaczka limfoblastyczna • ostra białaczka mieloblastyczna • dzieci • dorośli • oporność na cytostatyki • cytogenetyka

Summary

In spite of continuous progress in the therapy of acute leukemia, relapses still occur frequently both in children and adults. The presence of cytogenetic aberrations in leukemic cells at presentation is an important prognostic factor in acute leukemia. The translocation t(9;22) and the 11q23/MLL rearrangement are related to poor prognosis, while hyperdiploidy ≥ 50 chromosomes and the translocation t(12;21) are indicators of good prognosis in acute lymphoblastic leukemia (ALL). In acute myeloid leukemia (AML), t(8;21), t(15;17), and inv(16) indicate good prognosis, whereas 5/5q-, 7/7q-, and complex karyotype indicate poor prognosis. It seems that the prognostic value of cytogenetic changes is related to differences in cellular drug resistance in ALL and, to lesser extent, in AML. Genetic profiling based on microarray analysis confirms the correlation between cytogenetic changes in leukemic cells and drug resistance in ALL. The cytogenetic profile possibly determines cellular drug resistance and final therapy outcome. Knowledge

on the karyotype-related drug resistance profile might enable the use of targeted therapy in resistant/refractory acute leukemia both in children and adults.

Key words: acute lymphoblastic leukemia • acute myeloblastic leukemia • children • adults • drug resistance • cytogenetics

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9736.pdf

Word count: 3974

Tables: 4

Figures: 1

References: 74

Adres autora/autorki: dr hab. n. med. Jan Styczyński, Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika, ul. Curie-Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz; e-mail: jstyczyński@cm.umk.pl

WSTĘP

Nowotwór jest uważany za nabytą chorobę genetyczną. W ostatnich latach postępy w dziedzinie cytogenetyki klasycznej i molekularnej przyczyniły się do określenia liczbowych i strukturalnych anomalii cytogenetycznych, mających znaczenie prognostyczne w wielu chorobach nowotworowych. Należą do nich ostre białaczki, nowotwory układu krwiotwórczego, których istotą jest obecność klonu transformowanych komórek wywodzących się z wczesnych stadiów rozwojowych hematopoezy. Jest to heterogenna grupa chorób nowotworowych układu białokrwinkowego, cechujących się zahamowaniem różnicowania i dojrzewania na wczesnych etapach rozwoju ontogenetycznego limfocytów, z następową niepohamowaną, klonalną ekspansją komórek blastycznych, doprowadzającą do supresji prawidłowego krwiotworzenia, a w rezultacie do trójukładowej niewydolności szpiku z klinicznymi tego konsekwencjami oraz do naciekania innych narządów.

Przyczyny niepowodzeń chemioterapii

Mimo stałego postępu w chemioterapii chorób nowotworowych nadal często występują nawroty choroby. Skuteczność leczenia pacjentów z wznową jest znacznie gorsza niż przy pierwszym rozpoznaniu. Niepowodzenia w chemioterapii zależą głównie od trzech czynników:

1. Obniżenia efektywnej ilości leku, która dociera do komórki nowotworowej, tj. oporności farmakokinetycznej.
2. Niewrażliwości komórek nowotworowych na lek, który do nich dociera, tj. oporności komórkowej.
3. Zwiększonego potencjału wzrostowego rezystualnych komórek nowotworowych, tj. choroby resztkowej.

W ostrej białaczce limfoblastycznej wykazano związek tych trzech czynników z wynikami leczenia. Innymi przyczynami niepowodzeń w leczeniu choroby rozrostowej mogą być również: brak optymalnej terapii, modyfikacje w programie leczenia, nadmierne objawy niepożądane powodujące opóźnienia lub zmniejszanie dawek leków, oporność kinetyczna nowotworu (czyli obecność komórek w fazie spoczynkowej G_0), poliklonalność nowotworu. Skuteczność chemioterapii jest więc wypadkową jakości i farmakokinetyki stosowanego leku, wrażliwości komór-

rek nowotworowych oraz podatności pacjenta i umiejętności zespołu leczącego.

OPORNOŚĆ NA CYTOSTATYKI

Jednym z głównych ograniczeń skuteczności chemioterapii jest zjawisko oporności na leki (drug resistance). Problem oporności na cytostatyki w ostrych białaczkach pojawił się wraz z zastosowaniem aminopteryny, pierwszego leku o działaniu cytostatycznym, a pierwsze ustratyzowanie tego zjawiska dokonano w 1979 r. [11]. Istnieje wiele mechanizmów oporności, a często występuje nakładanie się różnych zjawisk. Wyróżnia się mechanizmy komórkowe i biochemiczne (np. upośledzone gromadzenie leków w komórkach, ograniczenie ich aktywacji wewnątrzkomórkowej lub zwiększenie dezaktywacji, nasilenie procesów naprawy uszkodzeń wywołanych przez leki). Istnieje również grupa mechanizmów anatomicznych (np. istnienie naturalnych barier w ustroju, np. krew-mózg, krew-jądra).

Oporność komórkowa może być: zewnętrzna lub wewnętrzna, selektywna (prosta, wybiórcza) lub wielolekowa, wrodzona lub nabyta, czynna lub bierna. Oporność zewnętrzna (extrinsic resistance) odpowiada niezdolności leku do проникnięcia do komórki nowotworowej; to zjawisko występuje, gdy np. biodostępność leku w postaci doustnej różni się między pacjentami (np. merkaptopuryna). Oporność wewnętrzna (intrinsic resistance) zależy od właściwości komórki nowotworowej. Może być selektywna lub wielolekowa. Oporność selektywna dotyczy jednego leku lub jednego mechanizmu dla jednego leku. Najczęściej jest to związane z ekspresją swoistego enzymu, np. wzrost aktywności reduktazy dihydrofolianowej (DHFR), jako mechanizm wybiórczej oporności na metotreksat. Oporność wielolekowa (multidrug resistance) oznacza jednoczesną oporność na kilka grup leków. Oporność taka rozwija się najczęściej wskutek działania białek należących do rodziny ABC (ATP binding cassette), które usuwają lek z komórki, np. PGP (permeability glycoprotein), kodowana przez gen MDR1 (multidrug resistance gene), MRP 1-6 (multidrug resistance-related protein), BCRP (breast cancer resistance protein). Rzadziej taka oporność powstaje wskutek działania białek nienależących do ABC, np. LRP/

Tabela 1. Klasyfikacja mechanizmów oporności na cytostatyki (wg [28])

Przed dotarciem leku do celu działania	W miejscu docelowym lub poza nim
1. Zaburzenia farmakologiczne: a. Upośledzony metabolizm leku b. Utrudnione dotarcie leku do komórki nowotworowej	1. Zmiany w miejscu docelowym leku: a. Podwyższone lub obniżone stężenie lub aktywność celu (target) b. Zmiana funkcji celu
2. Zaburzenia transportu wewnątrzkomórkowego: a. Obniżony pobór leku przez komórkę b. Zwiększone usuwanie leku z komórki	2. Naprawa DNA: a. Zwiększona naprawa DNA b. Brak rozpoznania zmian w DNA
3. Metabolizm komórkowy: a. Obniżona aktywacja leku wewnątrz komórki b. Zwiększony katabolizm leku wewnątrz komórki	3. Apoptoza i cykl komórkowy: a. Zmiany w funkcji struktur komórkowych b. Zmiany w regulacji apoptozy

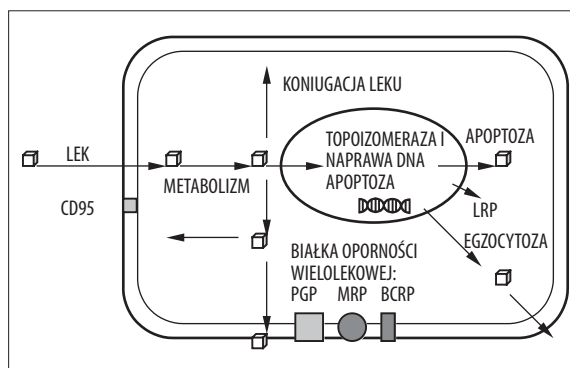
MVP (lung-resistance related protein/major vault protein). Oporność wrodzona (pierwotna) obejmuje nieindukowane lekami mechanizmy funkcjonujące w różnych komórkach, również zdrowych. Ten rodzaj oporności często występuje u pacjentów z nowo rozpoznaną chorobą rozrostową. Oporność nabyta (wtórna) rozwija się w komórkach pod wpływem działania chemioterapii lub radioterapii. Oporność komórkowa czynna jest związana ze wzrostem aktywności pewnych białek, np. DHFR, natomiast oporność bierna oznacza obniżenie aktywności enzymu docelowego np. topoizomerazy II [58]. Aktualną klasyfikację mechanizmów oporności na cytostatyki przedstawiono w tabeli 1.

Mechanizmy oporności komórkowej

Oporność na cytostatyki jest najczęściej zjawiskiem plejotropowym. Obejmuje różne mechanizmy na różnych poziomach działania leku. Do rozwoju oporności może dojść w stosunku do każdego leku i na każdym etapie jego działania. Najważniejsze mechanizmy oporności komórkowej obejmują: zaburzenia w transporcie leku do komórki i w jej obrębie, usuwanie leku z komórki (białka oporności wielolekowe PGP, MRP, LRP/MVP, BCRP i inne), zaburzenia w metabolizmie leku i jego detoksyfikacji, zaburzenia w przesyłaniu sygnału wywołanego przez lek wewnątrz komórki, zmiany aktywności docelowych układów enzymatycznych (np. topoizomeraza II), wzmocnienie mechanizmów naprawy komórkowej między cyklami chemioterapii, zmiany cytoogenetyczne, zaburzenia regulacji cyklu komórkowego oraz zaburzenia w procesie apoptozy, zarówno mitochondrialnej, jak i błonowej, przez receptor CD95 (ryc. 1) [5].

Kliniczne aspekty oporności komórkowej

Dotychczasowe badania dzieci z białaczkami wykazały, że wartość powszechnie znanych czynników ryzyka można wytłumaczyć opornością i wrażliwością komórek nowotworowych na pewne grupy cytostatyków. Oporność na leki cytostatyczne jest związana z wiekiem pacjentów z ALL: dzieci w wieku poniżej 18 miesięcy, a także dzieci powyżej 10 lat wykazywały większą oporność na cytostatyki niż pacjenci w wieku 2–10 lat. Obecność korzystnych immunofenotypów ALL, tj. common/pre-B, wiązała się z lepszą wrażliwością na cytostatyki niż fenotypów pre-pre-B lub T-komórkowych. Wśród pacjentów pre-B, dzieci w wieku poniżej 18 miesięcy miały limfoblasty bardziej odporne na daunorubicynę, mitoksantron i tenipozyd, natomiast dzieci w wieku powy-



Ryc.1. Schemat najważniejszych mechanizmów oporności komórkowej na cytostatyki

żej 10 lat miały limfoblasty bardziej odporne na prednizolon i merkaptopurynę. Dzieci ze wznową ALL miały limfoblasty bardziej odporne na glikokortykoidy, L-asparaginazę, antracykliny i tiopuryny niż dzieci z ALL *de novo*. Największą oporność stwierdzano dla prednizolonu (357-krotnie) i deksametazonu (ponad 24-krotnie). Limfoblasty pochodzące od pacjentów ze wznową ALL wykazywały stosunkowo dobrą wrażliwość na alkaloidy vinca, arabinozyd cytozyny, ifosfamid i epidodofilotoksyny [37].

Porównanie wrażliwości komórek ALL u dzieci i dorosłych wykazało większą oporność u dorosłych na wszystkie testowane cytostatyki. Najbardziej zaznaczoną oporność obserwowano dla L-asparaginazy, prednizolonu, tenipozydu, winkrystyny, etopozydu, daunorubicyny i arabinozydu cytozyny [55]. Być może różnice w oporności na cytostatyki mogą wyjaśnić różnice w rokowaniu między dziećmi i dorosłymi z ALL.

Anomalie cytoogenetyczne w ostrych białaczkach

Na lekooporność komórek nowotworowych mogą mieć wpływ określone właściwości genetyczne komórki nowotworowej, pierwotne lub wyselekcjonowane podczas rozwoju nowotworu. Zalicza się do nich ekspresję onkogenów, które aktywują przeżycie komórek (np. BCL-2, MYC, RAS), mutacje genów supresorowych nowotworzenia (np. gen TP53, kodujący białko p53), specyficzne zmiany cytoogenetyczne powodujące powstanie fuzji i rearanżacji genowych; BCR-ABL, MLL, TEL-AML1, PML-RARα,

Tabela 2. Rokownicze znaczenie zmian cytogenetycznych w ostrych białaczkach

Rokowanie	ALL	AML
Korzystne	hiperdiploidia ≥ 50 chromosomów, t(12;21)	t(8;21), t(15;17), inv(16), konstytucyjna trisomia 21
Niekorzystne	t(9;22), t(4;11) i inne anomalie 11q23, hipodiploidia	monosomie lub delecje długich ramion chromosomów 5 i 7, złożony kariotyp (≥ 3 aberracje), anomalie 11q23, z wyjątkiem t(9;11)
Pośrednie	pozostałe	pozostałe

Tabela 3. Zmiany cytogenetyczne w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci i u dorosłych (wg [39])

Podgrupy cytogenetyczne	Transkrypt fuzyjny	Dzieci (%)	Dorośli (%)
Prawidłowy kariotyp		22	23
B-liniowe ALL			
Hipodiploidia ≤ 45 chromosomów		1	2
Hiperdiploidia ≥ 50 chromosomów		25	7
t(12;21)	TEL-AML1	22	2
t(8;14), t(8;22), t(2;8)	MYC	2	4
t(1;19)	E2A-PBX1	5	3
t(9;22)	BCR-ABL	3	25–40
t(4;11), t(11;19), t(9;11)	rearanżacje MLL	8	10
T-liniowe ALL			
1p32	TAL1	7	12
5q35	HOX11L2	2,5	1
19p13	LYL1	1,5	2,5
10q24	HOX11	0,7	8
t(11;19)(q23;p13.1)	MLL-ENL	0,3	0,5

AML1-ETO, *CBF β -MYH11*) oraz poliklonalność i heterogenność komórek nowotworowych.

Anomalie cytogenetyczne komórek nowotworowych są uznanym niezależnym czynnikiem rokowniczym w ostrych białaczkach. U dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną translokacja t(9;22)(q34;q11) i rearanżacje 11q23/*MLL* są związane ze złym rokowaniem, natomiast hiperdiploidia ≥ 50 chromosomów i translokacja t(12;21)(p13;q22) wiążą się z dobrym rokowaniem (tab. 2). W ostrej białaczce szpikowej (AML) translokacje t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q21;q12) i inwersja inv(16)(p13q22) wiążą się z korzystnym rokowaniem, a monosomie i delecje chromosomów 5 i 7 oraz kariotyp złożony – z niekorzystnym rokowaniem.

ZMIANY CYTOGENETYCZNE A OPORNOŚĆ NA CYTOSTATYKI W OSTREJ BIAŁACZCE LIMFOBLASTYCZNEJ

U dorosłych zachorowalność na ALL wynosi 1/100 tysięcy osób/rok, co stanowi około 1,15–1,18% wszystkich nowotworów [7,70]. U dzieci ALL stanowi prawie 30% wszystkich nowotworów [39]. ALL obejmuje około 20% ostrych białaczek u dorosłych i 85% ostrych białaczek u dzieci [7,39,70].

Corocznie prawie 400 osób w Polsce zapada na ALL. Dwie trzecie pacjentów z ALL to dzieci [39]. Pomimo ciągłej poprawy wyników leczenia, u około 25% dzieci i 65–80% dorosłych z tą chorobą występują niepowodzenia.

Częstość występowania różnych aberracji chromosomów u dorosłych i dzieci jest różna. Różnice te mogą w części tłumaczyć różną biologię choroby, różny przebieg i odpowiedź na leczenie ALL u dorosłych i dzieci (tab. 3). Niektóre korzystne zmiany, np. hiperdiploidia ≥ 50 chromosomów i translokacja t(12;21) występują głównie u dzieci, a niektóre niekorzystne, np. t(9;22) głównie u dorosłych, ale nie dla wszystkich aberracji zachowane są takie proporcje częstości występowania (np. korzystnie rokujące aberracje genu *HOX11* występują głównie u dorosłych).

Genotyp a oporność na cytostatyki w ALL

Oporność na cytostatyki koreluje z wiekiem i immunofenotypem w podgrupach ALL i ma znaczenie prognostyczne. Aberracje cytogenetyczne definiują biologiczne podgrupy ALL, często również związane z linią rozwojową białaczki (stopniem zróżnicowania określanym przez immunofenotyp)

i wiekiem pacjenta. Powstaje pytanie, czy znaczenie prognostyczne poszczególnych anomalii chromosomowych w ALL jest związane z różnicami w oporności komórek białaczkowych na cytostatyki. Wiele danych przemawia za istnieniem takich zależności przynajmniej u części pacjentów.

Hiperdiploidia ≥ 50 chromosomów

Pacjenci z ALL z hiperdiploidalnymi ($DI \geq 1,16$) blastami wykazują wrażliwość na antymetabolity (merkaptopuryna, tioguanina i cytarabina) oraz na L-asparaginazę.

Metotreksat (MTX) jest efektywnie gromadzony w komórcie w postaci poliglutaminianów MTX i w tej postaci wywiera swoje działanie. MTG-PG jest postacią aktywną MTX [31]. Wykazano, że komórki hiperdiploidalne ALL gromadzą większe ilości MTX i MTX-PG, zwłaszcza MTX-PG długołańcuchowych, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [59,68]. Prawdopodobnym mechanizmem tego zjawiska jest zwiększona ekspresja zredukowanego nośnika folianów (reduced folate carrier) związana z dodatkowym chromosomem 21, często występującym w ALL z hiperdiploidią >50 chromosomów [2,41]. Natomiast trisomie 4 i 10, często występujące w przypadkach najkorzystniejszej rokujących hiperdiploidii ≥ 50 chromosomów, nie korelują ze zwiększoną akumulacją MTX-PG [68].

Komórki z hiperdiploidią ≥ 50 chromosomów łatwiej podlegają procesowi apoptozy. Mogłoby to być wynikiem ogólnie zwiększonej dawki genów [71], w tym głównie genów supresji nowotworów, z których dużo jest umiejscowionych w obrębie chromosomu 21. Apoptozie sprzyja również obecność dodatkowej kopii genu beta-syntazy cystationiny. Stosując test MTT wykazano, że komórki hiperdiploidalne (DI od 1,16 do 1,35) były *in vitro* bardziej wrażliwe na antymetabolity: 6-merkaptopurynę, 6-tioguaninę i cytarabinę oraz na L-asparaginazę w ALL u dzieci [20], co miało swe potwierdzenie w skutecznej terapii antymetabolitami pacjentów z hiperdiploidią [66].

Hipodiploidia

Mimo że hipodiploidia, zwłaszcza dużego stopnia, jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym w ALL u dzieci, to jednak w piśmiennictwie brakuje danych dotyczących wrażliwości i oporności komórek hipodiploidalnych na cytostatyki. Złe rokowanie związane z hipodiploidią może wynikać z obecności tylko pojedynczych kopii wielu genów supresorowych, bez związku z opornością na cytostatyki.

Pseudodiploidia

Wrażliwość albo oporność na cytostatyki komórek pseudodiploidalnych, czyli takich, które mają prawidłową liczbę chromosomów, ale obciążone są strukturalnymi aberracjami chromosomów, zależy od rodzaju tych aberracji.

TEL-AML1

Translokacja TEL-AML1 (określana też jako ETV-RUNX1), czyli t(12;21), jest związana z białaczką linii B-komórkowej, bez hiperdiploidii i z bardzo dobrym rokowaniem [60], zwłaszcza jeśli występuje w znacznym odsetku komórek szpiku i bez dodatkowych aberracji (obserwacje własne).

Translokacja t(12;21) w białaczkach z prekursorów komórek B wiąże się z dobrą wrażliwością na L-asparaginazę, etopozyd, dokсорubicynę i prawdopodobnie również na prednizolon, lecz nie na inne leki [9, 44].

Komórki z translokacją t(12;21) w stosunku do innych komórek (po wykluczeniu niemowląt, pacjentów z immunofenotypem pro-B, z chromosomem Ph oraz z hiperdiploidią) były 5,9-krotnie bardziej wrażliwe na L-asparaginazę. Nie stwierdzono istotnych różnic w stosunku do prednizolonu, deksametazonu, daunorubicyny, tiopuryn, ARA-C, epidodofilotoksyn i ifosfamid, natomiast wykazano większą oporność na winkrystynę i cytarabinę [44]. Protokoły St Jude, zakładające intensywne stosowanie L-asparaginazy, przynoszą bardzo dobre wyniki terapii w tej grupie pacjentów [51]. Natomiast w badaniach Frost i wsp. [9], w fluorymetrycznym teście cytotoxyczności FMCA, komórki TEL-AML1(+), po wykluczeniu pacjentów z dodatkowymi zmianami cytogenetycznymi; hiperdiploidią ≥ 50 chromosomów, translokacjami t(9;22), t(1;19) oraz rearanżacją 11q23, były *in vitro* bardziej wrażliwe niż komórki TEL-AML1(–) na dokсорubicynę ($p=0,001$) i etopozyd ($p=0,001$), przy czym w badaniach tych nie stosowano L-asparaginazy [9].

MLL

Limfoblasty z translokacją t(4;11), czyli jedną z rearanżacji genu MLL, są odporne na większość leków, a zwłaszcza na prednizolon i ifosfamid, lecz są bardziej wrażliwe na kladrybinę, cytarabinę i metotreksat. Niekorzystne aberracje chromosomowe, obejmujące translokacje 11q23, są związane z lepszą przeżywalnością komórek białaczkowych w warunkach *in vitro*, w stosunku do komórek bez tych translokacji [21,67].

W ALL u niemowląt z fenotypem pro-B w większości przypadków występuje rearanżacja MLL [60]. W porównaniu do dzieci starszych, z immunofenotypem common-ALL, limfoblasty niemowląt z fenotypem pro-B-ALL są bardziej odporne *in vitro* na glikokortykoidy (ponad 500 razy), L-asparaginazę (ponad 12 razy) [36, 42], tiopuryny, antracykliny, 4-HOO-ifosfamid oraz na tenipozyd [36]. Jednocześnie limfoblasty pro-B-ALL białaczek niemowlęcych są bardziej wrażliwe na cytarabinę [36] oraz na 2-chlorodezoksyadenozynę [35,42].

Komórki ALL z translokacją t(4;11)(q21;q23) są bardziej odporne na prednizolon ($>7,4$ -razy, $p=0,033$) i 4-HOO-ifosfamid (4,4-razy, $p=0,006$) niż komórki z innymi aberracjami 11q23. Ekspresja białek oporności wielolekowej PGP, MRP i LRP u niemowląt z immunofenotypem pro-B-ALL była porównywalna do odpowiednich wartości u starszych dzieci z common-preB-ALL, natomiast ekspresja LRP była większa u dzieci z pro-B-ALL i rearanżacją MLL niż w innych podtypach ALL niezależnie od wieku [42]. Wydaje się, że w stosunku do innych grup wiekowych, niemowlęta z ALL mają odmienny profil oporności *in vitro* na cytostatyki, wyraźnie związany z immunofenotypem pro-B, a zwłaszcza z obecnością rearanżacji MLL, szczególnie translokacji t(4;11). Wiek odgrywa prawdopodobnie mniejszą rolę.

Niemowlęta z ALL nie wykazują większej oporności na MTX [42, 45] w zakresie akumulacji MTX-PG, w stosun-

ku do starszych dzieci. Wyniki te potwierdzono w badaniach *in vivo* u niemowląt w St Jude [45]. W grupie niemowląt z pro-B-ALL odsetek złych odpowiedzi klinicznych na monoterapię prednizolonem jest wysoki [49]. Zarówno niemowlęta [52], jak i dorośli z ALL o fenotypie pro-B [25] mieli lepsze wyniki terapii z zastosowaniem cytarabiny. We wrodzonej pro-B-ALL o nawrotowym charakterze stwierdzano stosunkowo dobrą wrażliwość *in vitro* na cytarabinę i kladrybinę, ale efekt kliniczny po zastosowaniu chemioterapii opartej na tych lekach okazał się krótkotrwały [54].

BCR-ABL

Rearanżacja *BCR-ABL* nie jest związana ze swoistymi różnicami w oporności na cytostatyki u dzieci (prawdopodobnie z wyjątkiem większej oporności na L-asparaginazę), ale komórki Ph+ u pacjentów dorosłych są ponad 270-krotnie bardziej odporne na prednizolon.

Komórki ALL z obecnością chromosomu Ph wykazują na ogół lepszą przeżywalność w warunkach *in vitro*, w stosunku do innych komórek białaczkowych [21,67].

Produktem rearanżacji *BCR-ABL* jest białko znajdujące się w cytoplazmie i mające aktywność kinazy tyrozynowej, zapobiegające apoptozie komórek [1,8]. Funkcja tego białka sugeruje zwiększoną oporność komórek białaczkowych na cytostatyki. Nie stwierdzono jednak tego zjawiska w badaniach na dziecięcych ALL Ph(+) [18]. Dziecięce ALL Ph(+) częściej natomiast charakteryzują się kliniczną złą odpowiedzią na prednizolon, tak jak w ALL Ph(+) u dorosłych, chociaż większość dzieci z ALL Ph(+) dobrze odpowiada na początkową terapię [48].

W badaniach Hongo i wsp. [17], komórki ALL Ph(+) były bardziej odporne na melfalan, bleomycynę, etopozyd, mitoksantron, L-asparaginazę i winblastynę niż komórki ALL Ph(-). Stwierdzili oni istnienie 2 rodzajów wrażliwości komórek ALL Ph(+) na cytostatyki: 10/16 dzieci z ALL Ph(+) (62.5%) wykazywało oporność na co najmniej 2 z 3 leków (prednizolon, winkrystynę i asparaginazę, PAV score) już w chwili rozpoznania choroby. Ta grupa pacjentów miała znamienne gorsze rokowanie. Z kolei 6/16 pacjentów z ALL Ph(+) wykazywało przy rozpoznaniu wrażliwość na co najmniej 2 z tych leków (PAV). W stosunku do tej grupy pacjentów, komórki pacjentów grupy odpornej w skali PAV wykazywały od 2 do 58 razy większą oporność również na 12 innych leków [17].

Zarówno dzieci, jak i dorośli z ALL Ph(+) wykazują heterogeny profil oporności na cytostatyki, obejmujący zarówno przypadki bardzo odporne, jak również bardzo wrażliwe [43]. Wrażliwość na cytostatyki u dzieci z ALL Ph(+) nie różniła się istotnie od dzieci z ALL Ph(-), nawet przy wyodrębnieniu grup pacjentów charakteryzujących się dobrym i złym rokowaniem. Natomiast dorośli z ALL Ph(+), mają znacznie gorsze rokowanie niż dzieci z ALL Ph(+) i wykazują tendencję do większej oporności na wszystkie testowane leki, jednak jedynie dla prednizolonu wykazano znamienność statystyczną (ponad 270-krotnie większa oporność). W obrębie grupy pacjentów z ALL Ph(+) oporność *in vitro* na prednizolon zwiększa się wraz z wiekiem [43], co częściowo tłumaczy złe rokowanie u dorosłych

[55,56,57]. Jednocześnie ekspresja białka LRP, lecz nie PGP i MRP, jest znamienne większa u wszystkich pacjentów ALL Ph(+), w stosunku do pacjentów z ALL Ph(-), niezależnie od wieku [43].

Stosowany od kilku lat imatinib mesylate stanowi przykład terapii celowanej dla pacjentów z ALL Ph(+) i najczęściej jest używany w monoterapii, jednakże coraz częściej stwierdza się rozwój oporności i na ten lek. Mechanizmy oporności na imatinib są związane z mutacjami domen białka *BCR-ABL* lub z nadmierną amplifikacją tej kinazy [50].

t(1;19)

Translokacja t(1;19) koreluje z dobrą wrażliwością na wiele cytostatyków w ALL u dzieci [10], jednakże wyniki leczenia tej grupy pacjentów są podobne jak pacjentów z grupy ryzyka standardowego. Oznacza to, że wrażliwość na cytostatyki nie jest wystarczającym czynnikiem powodzenia terapii.

Charakterystyka cytogenetyczna oraz wiek stanowią istotne czynniki rokownicze u pacjentów z ALL. U dorosłych częściej występuje t(4;11) i t(9;22), rzadziej t(12;21) i hiperdiploidia. Częściej występuje immunofenotyp pro-B i T-ALL niż common-ALL. Jednakże rokowanie u dorosłych jest zawsze gorsze, nawet w grupach porównywalnych pod względem immunofenotypu i cytogenetyki [39,57]. Dorośli gorzej tolerują chemioterapię niż dzieci, z czym jest związana mniejsza intensywność chemioterapii w protokołach dla dorosłych, a jednocześnie komórki ALL u dorosłych mają większą wewnętrzną oporność [32, 36, 55].

ZMIANY CYTOGENETYCZNE A OPORNOŚĆ NA CYTOSTATYKI W OSTREJ BIAŁACZCE MIELOBLASTYCZNEJ

Zachorowalność na ostrą białaczkę mieloblastyczną (AML) w Polsce wynosi 2,4/100 tysięcy osób/rok. AML stanowi 80% ostrych białaczek u dorosłych oraz 15% u dzieci [7, 70].

Mimo ciągłej poprawy wyników terapii w ostatnich dekadach, ciągle zaledwie u około 50–60% dzieci i 20–30% dorosłych z AML udaje się osiągnąć długoletnie przeżycie [4,61,69]. Niepowodzenia w leczeniu tej choroby są spowodowane zarówno nawrotami, jak i powikłaniami intensywnej chemioterapii wielolekowej, związanymi z wczesną śmiertelnością u około 10–15% pacjentów oraz z niepożądanymi odległymi działaniami [46]. Konieczny jest dalszy postęp ukierunkowany na zwiększenie efektywności terapii z jednoczesnym zmniejszeniem toksyczności. Warunki te mogą być spełnione przez zastosowanie terapii ukierunkowanej dla wyodrębnionych grup pacjentów. Przykładem może być wyodrębnienie grupy dzieci z zespołem Downa w AML. Ta grupa pacjentów charakteryzuje się zwiększoną wrażliwością na toksyczność terapii, ale jednocześnie zwiększoną wrażliwością blastów na leki cytotoksyczne stosowane w terapii AML [73].

Rozkład częstości najczęstszych pierwotnych aberracji chromosomowych w AML u dzieci i dorosłych przedstawiono w tab. 4. Aberracje t(8;21), inv(16), t(15;17) i t(9;11) są uważane za dobrze rokujące u dzieci i dorosłych z AML, podczas gdy translokacje 11q23, anomalie chromosomów

Tabela 4. Rozkład częstości najczęstszych pierwotnych aberracji chromosomowych w AML u dzieci i dorosłych [12,13,14,33]

Zmiany cytogenetyczne	Transkrypt fuzyjny	Dzieci (%)	Dorośli (%)
brak	(–)	23	45
t(8;21)(q22;q22)	AML1-ETO	15	6
t(15;17)(q21;q12)	PML-RARα	8	8
inv(16)(p13q22) lub t(16;16)(p13;q22)	CBFβ-MYH11	10	5
t(9;11)(p21-22;q23)	MLL-AF9	6	2
trisomia 8	(–)	3	9
-5/5q-	(–)	1	7
-7/7q-	(–)	4	8
rearanżacje 11q23	MLL;v	6	5
t(6;9)(p23;q34)	DEK-CAN	1	1
inne		23	4

v = variable (zmienny partner MLL).

5 i 7 – za źle rokujące [23,29,30,34]. Korzystne rokowanie związane z t(8;21) pogarsza się, gdy towarzyszą jej delecje długich ramion chromosomu 9, pozaszpikowe nacieki komórek białaczkowych, albo gdy jest to białaczka bifenotypowa [30,40].

Pacjenci z zespołem Downa

W AML oporność na cytostatyki jest związana przede wszystkim z kariotypem komórek białaczkowych, w tym również konstytucyjnym. Pacjenci z zespołem Downa mają korzystne rokowanie i korzystny profil oporności na cytostatyki [73]. Pacjenci z DS-AML (Down syndrome AML) mają komórki bardziej wrażliwe na ARA-C (12 razy), antracykliny (2–7 razy), mitoksantron (9 razy), amsakrynę (16 razy), etopozyd (20 razy), 6TG (3 razy), busulfan (5 razy), VCR (23 razy) niż pozostali pacjenci. Pacjenci z zespołem Downa z AML mają komórki 21-krotnie bardziej wrażliwe na ARA-C niż pacjenci z zespołem Downa z ALL [73].

Po krótkotrwałej ekspozycji na metotreksat (MTX), pacjenci DS-AML mają komórki 21-krotnie bardziej odporne niż nie-DS-AML, ale różnica ta zanika po długotrwałej ekspozycji na MTX. Podobnych zależności nie można wykazać u pacjentów z zespołem Downa z ALL [73].

AML u pacjentów z zespołem Downa, czyli wrodzoną trisomią chromosomu 21, ma korzystne rokowanie, związane częściowo z dużą wrażliwością na ARA-C i daunorubicynę, w stosunku do innych pacjentów z AML. Nabyta trisomia 21, występująca bardzo rzadko w AML jako izolowana aberracja, również ma korzystne rokowanie. Wrażliwość komórek z trisomią 21 może być związana ze zwiększoną dawką i zwiększoną ekspresją genów znajdujących się na chromosomie 21 [62,63]. Należą do nich m.in. gen beta-syntazy cystationiny, częściowo odpowiedzialny za zwiększoną wrażliwość na ARA-C i zwiększoną podatność na apoptozę, geny metabolizmu folianów, odpowiedzialne za zwiększone wytwarzanie aktywnych postaci metotreksatu

w postaci poliglutaminianów (co również często się zdarza w hiperdiploidalnych ALL z trisomią chromosomu 21). Zwiększona wrażliwość jest również związana z somatyczną mutacją czynnika transkrypcyjnego GATA1, prowadzącą do zwiększonej ekspresji genów zależnych od GATA1, wpływających na metabolizm różnych leków, a zwłaszcza ARA-C [62,63].

t(9;11)

Pacjenci z AML z t(9;11) wykazują 2,9-krotnie większą wrażliwość na ARA-C, 13-krotnie na etopozyd, 3–8-krotnie na antracykliny (daunorubicynę, doksorubicynę i mitoksantron), 10-krotnie na kladrybinę, 5-krotnie na amsakrynę, 5-krotnie na winkrystynę i 6-krotnie na L-ASP [72], a także na etopozyd [19] i doksorubicynę [35]. Duża wrażliwość na ARA-C i doksorubicynę częściowo wyjaśnia dobre wyniki leczenia u pacjentów z AML z translokacją t(9;11). Wyniki te sugerują zastosowanie strategii terapeutycznej z uwzględnieniem dużych dawek ARA-C w terapii pacjentów z rearanżacją 11q23 zarówno w AML, jak i w ALL [35].

Delecje długich ramion lub monosomie chromosomów 5 i 7

Komórki pacjentów z AML przebiegającą z utratą całych lub fragmentów chromosomów 5 i 7 są bardziej odporne na ARA-C (3,9 razy) i na etopozyd (3,6-krotnie), a także prawdopodobnie również na inne leki, chociaż nie wykazano znamienności statystycznej (72). Delecja 5q jest związana z utratą wielu genów supresji nowotworów, genów czynników wzrostowych i interleukin oraz genów wpływających na przesyłanie sygnałów wewnątrzkomórkowych, aktywność oksydoredukcyjną, transport elektronów łańcucha oddechowego i biosyntezę steroidów, a delecja 7q również z utratą hipotetycznych genów supresorowych, oraz genów kinazy cyklu komórkowego, genów wpływających na aktywność oksydoredukcyjną, biosyntezę prostaglandyn i aktywność transferazy glutationu [6,24]. W przypadku

utraty całego chromosomu 7, skutki kliniczne mogą być związane również z utratą kompleksu genów homeoboksowych, umiejscowionych na krótkim ramieniu tego chromosomu [6].

t(8;21), t(15;17), inv(16)

Na razie brakuje badań jednoznacznie wykazujących związku tych aberracji z opornością komórek na cytostatyki, ale wydaje się, że korzystnie rokowniczo podtypy AML z t(8;21), t(15;17) oraz inv(16) nie wykazują istotnie lepszej wrażliwości na cytostatyki niż AML z prawidłowym kariotypem. Translokacja t(8;21) jest u dorosłych związana z dobrą wrażliwością na duże dawki ARA-C [3]. U dzieci stwierdza się 4-krotnie większą wrażliwość *in vitro* na idarubicynę [72]. Komórki z inwersją chromosomu 16 u dorosłych, w stosunku do innych podtypów AML, wykazują zwiększoną wrażliwość na ARA-C oraz dobrą inkorporację ARA-C do blastów [65], natomiast Zwaan i wsp. nie wykazali istotnych różnic u dzieci z tą aberracją [72]. Zwiększona wrażliwość AML z inv(16) może być częściowo związana ze zmniejszeniem aktywności białka oporności wielolekowej MRP, którego gen jest umiejscowiony w chromosomie 16 [22].

U dorosłych z t(15;17), będącej aberracją swoistą ostrą białaczką promielocytową, AML-M3 stwierdzono dobrą odpowiedź na ATRA (all-trans-retinoic acid) [26,27]. Rearanżacja PML-RAR α , powstająca w wyniku t(15;17), wiąże się z utratą wrażliwości na kwas retinowy, co jest następstwem zablokowania swojego receptora. ATRA przełamuje ten blok. Jednocześnie w komórkach białaczkowych AML-M3 stwierdza się małą ekspresję genu oporności wielolekowej MDR-1. Nie wykazano dotychczas związku przyczynowego między tymi obydwojma zjawiskami, a w badaniach Zwaana i wsp. [72] nie wykazano w ogóle różnic dotyczących wrażliwości na cytostatyki u dzieci z obecnością i bez t(15;17).

Inne aberracje

Translokacje i rearanżacje 11q23 wiążą się z opornością *in vitro* na etopozyd [72]. Z kolei liczne zmiany cytogenetyczne w blastach (złożony kariotyp, tj. ≥ 3 aberracje) są uważane za niekorzystne rokowniczo pod względem klinicznym w porównaniu z prawidłowym kariotypem lub z aberracjami rokującymi pośrednio lub korzystnie [53]. Charakterystyka ta jest wspólna dla pacjentów z ALL i AML.

ITD-FLT3

Wewnętrzna duplikacja tandemowa genu FLT3 (ITD-FLT3) występuje u prawie 11% dzieci i u około 20–30% dorosłych z AML [47,64,74]. Występowanie ITD-FLT3 jest zależne od wieku: nie spotyka się jej u niemowląt, natomiast wy-

stępuje u około 5% dzieci poniżej 10 lat i u prawie 20% w wieku 10–18 lat. Pacjenci z ITD-FLT3 rzadziej mają aberracje chromosomowe niż pacjenci bez ITD-FLT3 (22 vs 55%). Cechuje ich jednak niższy odsetek remisji (70 vs 88%) oraz gorsze 5-letnie prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od zdarzeń (29 vs 46%) w porównaniu z grupą pacjentów bez tej anomalii. Pacjenci z ITD-FLT3 mają prawie 2-krotnie wyższe ryzyko niepowodzenia terapii [74]. Nie wykazano jednak związku tej rearanżacji ze zwiększoną opornością *in vitro* na cytostatyki [74].

Niektóre prace kliniczne wskazują na możliwość związku ekspresji genów oporności wielolekowej z niekorzystnie lub pośrednio rokującymi aberracjami chromosomowymi w AML, jednak nie ustalono dotychczas bezpośrednich zależności między nimi [38].

Wydaje się, że w zależności od profilu oporności na cytostatyki i charakterystyki cytogenetycznej blastów, można wyodrębnić 3 grupy pacjentów z AML: pierwsza, wrażliwa, z t(9;11) i z zespołem Downa; druga oporna, z anomalią w obrębie chromosomów 5 i 7 oraz ze złożonym kariotypem; oraz trzecia, pośrednia, obejmująca pozostałe aberracje, w tym ogólnie korzystnie rokujące. Brak jest dowodów na to, aby rokowniczo korzystne zmiany: t(8;21), inv(16) i t(15;17) miały związek z „wrażliwym profilem” oporności na cytostatyki.

Wprowadzenie nowych technik, takich jak określanie profilu genetycznego metodami mikromacierzy, potwierdza istnienie zależności między zmianami cytogenetycznymi komórek nowotworowych a opornością na cytostatyki. We wspólnych badaniach grupy amerykańskiej i holendersko-niemieckiej wykazano, że oporność komórek białaczkowych na prednizolon, winkrystynę, daunorubicynę i L-asparaginazę w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci jest związana ze zmianami ekspresji 124 genów, różnych dla poszczególnych leków. Badania te, przeprowadzone na dwóch odrębnych grupach pacjentów, wykazały niezależne znaczenie prognostyczne skojarzonego profilu cytogenetycznego, związanego z opornością na cytostatyki. Oznacza to, że prawdopodobnie profil cytogenetyczny komórek białaczkowych determinuje ich oporność na cytostatyki i końcową odpowiedź na terapię [15,16].

Znajomość zmian w kariotypie blastów białaczkowych oraz towarzyszącego im profilu lekooporności może ułatwiać zastosowanie nowoczesnej terapii celowanej, ukierunkowanej na zniszczenie klonów komórek nowotworowych, bez wywierania toksycznego działania na inne tkanki (przeciwciała monoklonalne, inhibitory przesyłania sygnału wewnątrzkomórkowego i inhibitory kompleksów białkowych), co niewątpliwie przyczyni się do dalszych postępów terapeutycznych w hematologii, w każdej grupie wiekowej.

PIŚMIENICTWO

[1] Bedi A., Barber J.P., Bedi G.C., el-Deiry W.S., Sidransky D., Vala M.S., Akhtar A.J., Hilton J., Jones R.J.: BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood*, 1995; 86: 1148–1158

[2] Belkov V.M., Krynetski E.Y., Schuetz J.D., Yanishevski Y., Masson E., Mathew S., Raimondi S., Pui C.H., Relling M.V., Evans W.E.: Reduced folate carrier expression in acute lymphoblastic leukemia: a mechanism for ploidy but not lineage differences in methotrexate accumulation. *Blood*, 1999; 93: 1643–1650

- [3] Byrd J.C., Dodge R.K., Carroll A., Baer M.R., Edwards C., Stamberg J., Qumsiyeh M., Moore J.O., Mayer R.J., Davey F., Schiffer C.A., Bloomfield C.D.: Patients with t(8;21)(q22;q22) and acute myeloid leukemia have superior failure-free and overall survival when repetitive cycles of high-dose cytarabine are administered. *J. Clin. Oncol.*, 1999; 17: 3767–3775
- [4] Creutzig U., Ritter J., Zimmermann M., Reinhardt D., Hermann J., Berthold F., Henze G., Jurgens H., Kabisch H., Havers W., Reiter A., Kluba U., Niggli F., Gadner H.: Improved treatment results in high-risk pediatric acute myeloid leukemia patients after intensification with high-dose cytarabine and mitoxantrone: results of Study Acute Myeloid Leukemia-Berlin-Frankfurt-Munster 93. *J. Clin. Oncol.*, 2001; 19: 2705–2713
- [5] Den Boer M.L., Pieters R., Veerman A.J.: Mechanisms of cellular anthracycline resistance in childhood acute leukemia. *Leukemia*, 1998; 12: 1657–1670
- [6] Dessen P., Knuutila S., Huret J.L.: Chromosome 7. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology 2002. http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Indexbychrom/idxa_7.html (22.09.2006)
- [7] Dwilewicz-Trojaczek J.: Białaczki u dorosłych. W: Onkologia kliniczna (Red: Krzakowski M.) Warszawa: Borgis, 2001; 528–555
- [8] Evans C.A., Owen-Lynch P.J., Whetton A.D., Dive C.: Activation of the Abelson tyrosine kinase activity is associated with suppression of apoptosis in hemopoietic cells. *Cancer Res.*, 1993; 53: 1735–1738
- [9] Frost B.M., Forestier E., Gustafsson G., Nygren P., Hellebostad M., Jonsson O.G., Kanerva J., Schmiegelow K., Larsson R., Lonnerholm G.: Translocation t(12;21) is related to *in vitro* cellular drug sensitivity to doxorubicin and etoposide in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2004; 104: 2452–2457
- [10] Frost B.M., Forestier E., Gustafsson G., Nygren P., Hellebostad M., Jonmundsson G., Kanerva J., Schmiegelow K., Larsson R., Lonnerholm G., Nordic Society for Paediatric Haematology and Oncology: Translocation t(1;19) is related to low cellular drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*, 2005; 19: 165–169
- [11] Goldie J.H., Coldman A.J.: A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. *Cancer Treat. Rep.*, 1979; 63: 1727–1733
- [12] Grimwade D.: The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2001; 14: 497–529
- [13] Grimwade D., Walker H., Harrison G., Oliver F., Chatters S., Harrison C.J., Wheatley K., Burnett A.K., Goldstone A.H., Medical Research Council Adult Leukemia Working Party: The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*, 2001; 98: 1312–1320
- [14] Grimwade D., Walker H., Oliver F., Wheatley K., Harrison C., Harrison G., Rees J., Hann I., Stevens R., Burnett A., Goldstone A.: The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*, 1998; 92: 2322–2333
- [15] Holleman A., Cheok M.H., Den Boer M.L., Yang W., Veerman A.J., Kazemier K.M., Pei D., Cheng C., Pui C.H., Relling M.V., Janka-Schaub G.E., Pieters R., Evans W.E.: Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N. Engl. J. Med.*, 2004; 351: 533–542
- [16] Holleman A., Den Boer M.L., Kazemier K.M., Janka-Schaub G.E., Pieters R.: Resistance to different classes of drugs is associated with impaired apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2003; 102: 4541–4546
- [17] Hongo T., Okada S., Inoue N., Yamada S., Yajima S., Watanabe C., Fujii Y., Horikoshi Y.: Two groups of Philadelphia chromosome-positive childhood acute lymphoblastic leukemia classified by pretreatment multidrug sensitivity or resistance in *in vitro* testing. *Int. J. Hematol.*, 2002; 76: 251–259
- [18] Hongo T., Yamada S., Yajima S., Watanabe C., Fujii Y., Kawasaki H., Yazaki M., Hanada R., Horikoshi Y.: Biological characteristics and prognostic value of *in vitro* three-drug resistance to prednisolone, L-asparaginase, and vincristine in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int. J. Hematol.*, 1999; 70: 268–277
- [19] Kalwinsky D.K., Raimondi S.C., Schell M.J., Mirro J.Jr., Santana V.M., Behm F., Dahl G.V., Williams D.: Prognostic importance of cytogenetic subgroups in *de novo* pediatric acute nonlymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 1990; 8: 75–83
- [20] Kaspers G.J., Smets L.A., Pieters R., Van Zantwijk C.H., Van Wering E.R., Veerman A.J.: Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: results of an *in vitro* study. *Blood*, 1995; 85: 751–756
- [21] Kumagai M., Manabe A., Pui C.H., Behm F.G., Raimondi S.C., Hancock M.L., Mahmoud H., Crist W.M., Campana D.: Stroma-supported culture in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells predicts treatment outcome. *J. Clin. Invest.*, 1996; 97: 755–760
- [22] Kuss B.J., Deeley R.G., Cole S.P., Willman C.L., Kopecky K.J., Willman S.R., Eyre H.J., Lane S.A., Nancarrow J.K., Whitmore S.A.: Deletion of gene for multidrug resistance in acute myeloid leukaemia with inversion in chromosome 16: prognostic implications. *Lancet*, 1994; 343: 1531–1534
- [23] Leblanc T., Berger R.: Molecular cytogenetics of childhood acute myelogenous leukaemias. *Eur. J. Haematol.*, 1997; 59: 1–13
- [24] Lindvall C., Furge K., Bjorkholm M., Guo X., Haab B., Blennow E., Nordenskjold M., Teh B.T.: Combined genetic and transcriptional profiling of acute myeloid leukemia with normal and complex karyotypes. *Haematologica*, 2004; 89: 1072–1081
- [25] Ludwig W.D., Rieder H., Bartram C.R., Heinze B., Schwartz S., Gassmann W., Loffler H., Hossfeld D., Heil G., Handt S., Heyll A., Diedrich H., Fischer K., Weiss A., Volkers B., Aydemir U., Fonatsch C., Gokbuget N., Thiel E., Hoelzer D.: Immunophenotypic and genotypic features, clinical characteristics, and treatment outcome of adult pro-B acute lymphoblastic leukemia: results of the German multicenter trials GMALL 03/87 and 04/89. *Blood*, 1998; 92: 1898–1909
- [26] Mandelli F., Diverio D., Avvisati G., Luciano A., Barbui T., Bernasconi C., Broccia G., Cerri R., Falda M., Fioritoni G., Leoni F., Liso V., Petti M.C., Rodeghiero F., Saglio G., Vegna M.L., Visani G., Jehn U., Willemze R., Muus P., Pelicci P.G., Biondi A., Lo Coco F.: Molecular remission in PML/RAR alpha-positive acute promyelocytic leukemia by combined all-trans retinoic acid and idarubicin (AIDA) therapy. Gruppo Italiano-Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto and Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica Cooperative Groups. *Blood*, 1997; 90: 1014–1021
- [27] Mann G., Reinhardt D., Ritter J., Hermann J., Schmitt K., Gadner H., Creutzig U.: Treatment with all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia reduces early deaths in children. *Ann. Hematol.*, 2001; 80: 417–422
- [28] Marie J.P., Legrand O.: Drug resistance in acute leukemias. W: Treatment of acute leukemias. New directions for clinical research. (Red: Pui C.H.) Totowa: Humana Press, 2003: 497–505
- [29] Martinez-Climent J.A., Garcia-Conde J.: Chromosomal rearrangements in childhood acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 1999; 21: 91–102
- [30] Martinez-Climent J.A., Lane N.J., Rubin C.M., Morgan E., Johnstone H.S., Mick R., Murphy S.B., Vardiman J.W., Larson R.A., Le Beau M.M.: Clinical and prognostic significance of chromosomal abnormalities in childhood acute myeloid leukemia *de novo*. *Leukemia*, 1995; 9: 95–101
- [31] Matherly L.H., Taub J.W.: Methotrexate pharmacology and resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma*, 1996; 21: 359–368
- [32] Maung Z.T., Reid M.M., Matheson E., Taylor P.R., Proctor S.J., Hall A.G.: Corticosteroid resistance is increased in lymphoblasts from adults compared with children: preliminary results of *in vitro* drug sensitivity study in adults with acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 1995; 91: 93–100
- [33] Mrozek K., Heerema N.A., Bloomfield C.D.: Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev.*, 2004; 18: 115–136
- [34] Mrozek K., Heinonen K., Lawrence D., Carroll A.J., Koduru P.R., Rao K.W., Strout M.P., Hutchison R.E., Moore J.O., Mayer R.J., Schiffer C.A., Bloomfield C.D.: Adult patients with *de novo* acute myeloid leukemia and t(9; 11)(p22; q23) have a superior outcome to patients with other translocations involving band 11q23: a cancer and leukemia group B study. *Blood*, 1997; 90: 4532–4538
- [35] Palle J., Frost B.M., Forestier E., Gustafsson G., Nygren P., Hellebostad M., Jonsson O.G., Kanerva J., Schmiegelow K., Larsson R., Lonnerholm G.: Cellular drug sensitivity in MLL-rearranged childhood acute leukaemia is correlated to partner genes and cell lineage. *Br. J. Haematol.*, 2005; 129: 189–198
- [36] Pieters R., Den Boer M.L., Durian M., Janka G., Schmiegelow K., Kaspers G.J., van Wering E.R., Veerman A.J.: Relation between age, immunophenotype and *in vitro* drug resistance in 395 children with acute lymphoblastic leukemia-implications for treatment of infants. *Leukemia*, 1998; 12: 1344–1348

- [37] Pieters R., Klumper E., Kaspers G.J., Veerman A.J.: Everything you always wanted to know about cellular drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 1997; 25: 11–26
- [38] Podolak-Dawidziak M., Duś D., Kielbiński M., Paprocka M., Wojdat E., Lenart K., Szyda A., Haus O., Kuliszkievicz-Janus M., Prajs I., Kuliczowski K.: Clinical relevance of multidrug resistance proteins in patients with *de novo* acute myeloid leukemia. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2005; 14: 1151–1160
- [39] Pui C.H., Evans W.E.: Acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 1998; 339: 605–615
- [40] Raimondi S.C., Chang M.N., Ravindranath Y., Behm F.G., Gresik M.V., Steuber C.P., Weinstein H.J., Carroll A.J.: Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study-POG 8821. *Blood*, 1999; 94: 3707–3716
- [41] Raimondi S.C., Pui C.H., Hancock M.L., Behm F.G., Filatov L., Rivera G.K.: Heterogeneity of hyperdiploid (51–67) childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 1996; 10: 213–224
- [42] Ramakers-van Woerden N.L., Beverloo H.B., Veerman A.J., Camitta B.M., Loonen A.H., Van Wering E.R., Slater R.M., Harbott J., Den Boer M.L., Ludwig W.D., Haas O.A., Janka-Schaub G.E., Pieters R.: *In vitro* drug-resistance profile in infant acute lymphoblastic leukemia in relation to age, MLL rearrangements and immunophenotype. *Leukemia*, 2004; 18: 521–529
- [43] Ramakers-van Woerden N.L., Pieters R., Hoelzer D., Slater R.M., Den Boer M.L., Loonen A.H., Harbott J., Janka-Schaub G.E., Ludwig W.D., Ossenkoppele G.J., van Wering E.R., Veerman A.J., Dutch and German Leukemia Study Groups: *In vitro* drug resistance profile of Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia is heterogeneous and related to age: a report of the Dutch and German Leukemia Study Groups. *Med. Pediatr. Oncol.*, 2002; 38: 379–386
- [44] Ramakers-van Woerden N.L., Pieters R., Loonen A.H., Hubeek I., van Drunen E., Beverloo H.B., Slater R.M., Harbott J., Seyfarth J., van Wering E.R., Hahlen K., Schmiegelow K., Janka-Schaub G.E., Veerman A.J.: TEL/AML1 gene fusion is related to *in vitro* drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2000; 96: 1094–1099
- [45] Ramakers-van Woerden N.L., Pieters R., Rots M.G., van Zantwijk C.H., Noordhuis P., Beverloo H.B., Peters G.J., van Wering E.R., Camitta B.M., Pui C.H., Relling M.V., Evans W.E., Veerman A.J.: Infants with acute lymphoblastic leukemia: no evidence for high methotrexate resistance. *Leukemia*, 2002; 16: 949–951
- [46] Riley L.C., Hann I.M., Wheatley K., Stevens R.F.: Treatment-related deaths during induction and first remission of acute myeloid leukaemia in children treated on the Tenth Medical Research Council acute myeloid leukaemia trial (MRC AML10). The MCR Childhood Leukaemia Working Party. *Br. J. Haematol.*, 1999; 106: 436–444
- [47] Schnitter S., Schoch C., Dugas M., Kern W., Staib P., Wuchter C., Löffler H., Sauerland C.M., Serve H., Buchner T., Haferlach T., Hiddemann W.: Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*, 2002; 100: 59–66
- [48] Schrappe M., Arico M., Harbott J., Biondi A., Zimmermann M., Conter V., Reiter A., Valsecchi M.G., Gadner H., Basso G., Bartram C.R., Lampert F., Riehm H., Masera G.: Philadelphia chromosome-positive (Ph+) childhood acute lymphoblastic leukemia: good initial steroid response allows early prediction of a favorable treatment outcome. *Blood*, 1998; 92: 2730–2741
- [49] Schrappe M., Reiter A., Ludwig W.D., Harbott J., Zimmermann M., Hiddemann W., Niemeyer C., Henze G., Feldges A., Zintl F., Kornhuber B., Ritter J., Welte K., Gadner H., Riehm H.: Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood*, 2000; 95: 3310–3322
- [50] Shah N.P.: Loss of response to imatinib: mechanisms and management. *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program)*, 2005; 183–187
- [51] Shurtleff S.A., Bujijs A., Behm F.G., Rubnitz J.E., Raimondi S.C., Hancock M.L., Chan G.F., Pui C.H., Grosveld G., Downing J.R.: TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*, 1995; 9: 1985–1989
- [52] Silverman L.B., McLean T.W., Gelber R.D., Donnelly M.J., Gilliland D.G., Tarbell N.J., Sallan S.E.: Intensified therapy for infants with acute lymphoblastic leukemia: results from the Dana-Farber Cancer Institute Consortium. *Cancer*, 1997; 80: 2285–2295
- [53] Stevens R.F., Hann I.M., Wheatley K., Gray R.G.: Marked improvements in outcome with chemotherapy alone in paediatric acute myeloid leukemia: results of the United Kingdom Medical Research Council's 10th AML trial. MRC Childhood Leukaemia Working Party. *Br. J. Haematol.*, 1998; 101: 130–140
- [54] Styczynski J., Koltan A., Haus O., Wysocki M.: Differential chemosensitivity in a child with congenital relapsing acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Hematol. Oncol.*, 2002; 19: 355–360
- [55] Styczynski J., Pieters R., Huismans D.R., Schuurhuis G.J., Wysocki M., Veerman A.J.: *In vitro* drug resistance profiles of adult versus childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 2000; 110: 813–818
- [56] Styczynski J., Wysocki M.: Differences in significance of drug resistance mechanisms between adult and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologia*, 2002; 32: 313–325
- [57] Styczynski J., Wysocki M.: *In vitro* drug resistance profiles of adult acute lymphoblastic leukemia: possible explanation for difference in outcome to similar therapeutic regimens. *Leuk. Lymphoma*, 2002; 43: 301–307
- [58] Styczynski J., Wysocki M.: Mechanisms of drug resistance in acute leukemias: therapeutic problem. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2000; 9: 153–161
- [59] Synold T.W., Relling M.V., Boyett J.M., Rivera G.K., Sandlund J.T., Mahmoud H., Crist W.M., Pui C.H., Evans W.E.: Blast cell methotrexate-polyglutamate accumulation *in vivo* differs by lineage, ploidy, and methotrexate dose in acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Invest.*, 1994; 94: 1996–2001
- [60] Szczepanski T., van der Velden V.H., van Dongen J.J.: Classification systems for acute and chronic leukaemias. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2003; 16: 561–582
- [61] Tallman M.S., Gilliland D.G., Rowe J.M.: Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*, 2005; 106: 1154–1163
- [62] Taub J.W., Ge Y.: Down syndrome, drug metabolism and chromosome 21. *Pediatr. Blood Cancer*, 2005; 44: 33–39
- [63] Taub J.W., Huang X., Matherly L.H., Stout M.L., Buck S.A., Massey G.V., Becton D.L., Chang M.N., Weinstein H.J., Ravindranath Y.: Expression of chromosome 21-localized genes in acute myeloid leukemia: differences between Down syndrome and non-Down syndrome blast cells and relationship to *in vitro* sensitivity to cytosine arabinoside and daunorubicin. *Blood*, 1999; 94: 1393–1400
- [64] Thiede C., Steudel C., Mohr B., Schaich M., Schakel U., Platzbecker U., Wermke M., Bornhauser M., Ritter M., Neubauer A., Ehninger G., Illmer T.: Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, 2002; 99: 4326–4335
- [65] Tosi P., Visani G., Ottaviani E., Testoni N., Pellacani A., Tura S.: Inv(16) acute myeloid leukemia cells show an increased sensitivity to cytosine arabinoside *in vitro*. *Eur. J. Haematol.*, 1998; 60: 161–165
- [66] Trueworthy R., Shuster J., Look T., Crist W., Borowitz M., Carroll A., Frankel L., Harris M., Wagner H., Haggard M.: Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.*, 1992; 10: 606–613
- [67] Uckun F.M., Kersey J.H., Gajl-Peczalska K.J., Heerema N.A., Provisor A.J., Haag D., Gilchrist G., Song C.W., Arthur D.C., Roloff J.: Heterogeneity of cultured leukemic lymphoid progenitor cells from B cell precursor acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients. *J. Clin. Invest.*, 1987; 80: 639–646
- [68] Whitehead V.M., Vuchich M.J., Cooley L.D., Lauer S.J., Mahoney D.H., Shuster J.J., Payment C., Koch P.A., Akabutu J.J., Bowen T., Kamen B.A., Ravindranath Y., Emami A., Look A.T., Beardsley G.P., Pullen D.J., Camitta B.: Accumulation of methotrexate polyglutamates, ploidy and trisomies of both chromosomes 4 and 10 in lymphoblasts from children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *Leuk. Lymphoma*, 1998; 31: 507–519
- [69] Woods W.G., Neudorf S., Gold S., Sanders J., Buckley J.D., Barnard D.R., Dusenbery K., DeSwarte J., Arthur D.C., Lange B.J., Kobrinsky N.L., Children's Cancer Group: A comparison of allogeneic bone marrow transplantation, autologous bone marrow transplantation, and aggressive chemotherapy in children with acute myeloid leukemia in remission. *Blood*, 2001; 197: 56–62

-
- [70] Zatonski W., Didkowska J.: Epidemiologia nowotworów złośliwych. W: Onkologia kliniczna (Red: Krzakowski M.) Warszawa: Borgis, 2001; 22–50
 - [71] Zhang Y., Lu J., Van den Berghe J., Lee S.H.: Increased incidence of spontaneous apoptosis in the bone marrow of hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Exp. Hematol.*, 2002; 30: 333–339
 - [72] Zwaan C.M., Kaspers G.J., Pieters R., Hahlen K., Huismans D.R., Zimmermann M., Harbott J., Slater R.M., Creutzig U., Veerman A.J.: Cellular drug resistance in childhood acute myeloid leukemia is related to chromosomal abnormalities. *Blood*, 2002; 100: 3352–3360
 - [73] Zwaan C.M., Kaspers G.J., Pieters R., Hahlen K., Janka-Schaub G.E., van Zantwijk C.H., Huismans D.R., de Vries E., Rots M.G., Peters G.J., Jansen G., Creutzig U., Veerman A.J.: Different drug sensitivity profiles of acute myeloid and lymphoblastic leukemia and normal peripheral blood mononuclear cells in children with and without Down syndrome. *Blood*, 2002; 99: 245–251
 - [74] Zwaan C.M., Meshinchi S., Radich J.P., Veerman A.J., Huismans D.R., Munske L., Podleschny M., Hahlen K., Pieters R., Zimmermann M., Reinhardt D., Harbott J., Creutzig U., Kaspers G.J., Griesinger F.: FLT3 internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance. *Blood*, 2003; 102: 2387–2394
-