

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Vojin M. Vuković

UTICAJ EKSPRESIJE GENA ZA HUMANI
KONCENTRATIVNI NUKLEOZIDNI
TRANSPORTER 3 I PRISUSTVA ALELA
*CYP2B6**6 NA ODGOVOR NA TERAPIJU
FLUDARABINOM I CIKLOFOSFAMIDOM
KOD BOLESNIKA SA HRONIČNOM
LIMFOCITNOM LEUKEMIJOM

doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE

MEDICAL FACULTY

Vojin M. Vuković

ASSOCIATION OF HUMAN
CONCENTRATIVE NUCLEOSIDE
TRANSPORTER 3 GENE EXPRESSION
AND *CYP2B6*6* ALLELE WITH THE
RESPONSE TO FLUDARABINE PLUS
CYCLOPHOSPHAMIDE IN CHRONIC
LYMPHOCYTIC LEUKEMIA PATIENTS

doctoral dissertation

Belgrade, 2019.

MENTOR:

Prof. dr Biljana Mihaljević, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. dr Jelena Bila, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu – predsednik Komisije
2. Doc. dr Darko Antić, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Predrag Đurđević, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu

Datum odbrane teze: _____

Zahvaljujem se

Prof. dr Biljani Mihaljević, mom mentoru, direktorki i načelnici, zahvaljujući kojoj sam dobio priliku da se bavim ovim pozivom na najvišem nivou, na pomoći u odabiru teme, podršci, savjetima i toplom odnosu tokom svih godina mog rada na Klinici za hematologiju

Doc. dr Darko Antiću, kolegi i prijatelju, članu Komisije, sa kojim dijelim hematološku svakodnevnicu već 8 godina, na svemu što me je naučio i na slobodi koju mi je dao u svakodnevnom kliničkom radu; na korisnim savjetima u izradi teze

Dipl. molek. biologu, dr Teodori Karan-Đurašević na nesebičnoj pomoći koju mi je pružila u svim fazama izrade doktorata, od prijave teze, preko pisanja radova, do izrade teze, kao i u sprovođenju molekularno-genetičkih analiza ključnih za temu doktorata

Članovima Komisije, predsjedniku prof. dr Jeleni Bili i prof. dr Predragu Đurđeviću

Prof. dr Ivu Elezoviću, prof. dr Mileni Todorović-Balint i prof. dr Jeleni Bili u čijim sam organizacionim jedinicama radio i sticao neprocjenjivo iskustvo

Odjeljenju hematologije KBC "Bežanijska kosa" na čelu sa doc. dr Oliverom Marković gdje sam se prvi put susreo sa hematologijom

Laboratoriji za molekularnu biomedicinu Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo na čelu sa naučnim savjetnikom, dr Sonjom Pavlović, na sprovođenju eksperimentalnog dijela istraživanja

Dipl. biologu, dr Mariji Denčić-Fekete na pomoći u citogenetičkoj analizi uzoraka

Laboratoriji za imunofenotipizaciju Klinike za hematologiju na čelu sa dr Nadom Kraguljac-Kurtović i Laboratoriji za patohistologiju na čelu sa dr Majom Peruničić-Jovanović za neophodnu dijagnostiku

Doc.dr Nataši Milić sa Instituta za statistiku i informatiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na pomoći u statističkoj obradi podataka i korisnim savjetima

Kolegama i osoblju sa mog odjeljenja, kao i sa cijele Klinike na prijateljskom odnosu i podršci

Mojoj sestri, dipl. molek. biologu, dr Mileni Ugrin, na pomoći u završnoj obradi teksta

Mojoj porodici, na nepresušnoj podršci i ljubavi

**UTICAJ EKSPRESIJE GENA ZA HUMANI KONCENTRATIVNI
NUKLEOZIDNI TRANSPORTER 3 I PRISUSTVA ALELA *CYP2B6**6
NA ODGOVOR NA TERAPIJU FLUDARABINOM I
CIKLOFOSFAMIDOM KOD BOLESNIKA SA HRONIČNOM
LIMFOCITNOM LEUKEMIJOM**

REZIME

Uvod: Hemioterapija na bazi fludarabina i ciklofosfamida predstavlja osnov lečenja pacijenata sa hroničnom limfocitnom leukemijom (HLL) mlađe životne dobi i bez značajnih komorbiditeta. Kod nekih pacijenata efekat terapije može biti uslovljen aberantnom ekspresijom i/ili mutacijama gena koji utiču na farmakodinamiku i farmakokinetiku antileukemijskih lekova. Sa druge strane, ustanovljeni su brojni kliničko-laboratorijski i molekularno-genetički markeri prognoze koji su značajni u predikciji kliničkog toka, prvenstveno vremena do prve terapije (*time to first treatment*, TTFT) i ukupnog preživljavanja (*overall survival*, OS). Oni se poslednjih godina u cilju jačanja prognostičke vrednosti kombinuju unutar različitih prognostičkih modela, među kojima su za predikciju TTFT naročito relevantni Skor rizika od progresije (*Progression.Risk Score*, PRS) i Skor MD Anderson centra za kancer iz 2011 (*MD Anderson Cancer Center 2011 score*, MDACC 2011), dok je za predviđanje OS najznačajniji Internacionalni prognostički indeks za HLL (*The International Prognostic Index for CLL*, CLL-IPI). Cilj rada je da se ispita uticaj farmakogenetike, tačnije ekspresije gena *SLC28A3* koji kodira hCNT3 protein, jedan od transportera za fludarabin, i varijantnog alela *CYP2B6**6 gena za citohrom P450 2B6, koji učestvuje u metabolizmu ciklofosfamida, na ishod lečenja FC protokolom kod pacijenata sa HLL-om. Takođe, cilj je da se u grupi ovih pacijenata utvrdi vrednost skorova CLL-IPI, PRS i MDACC 2011 u predikciji TTFT, OS, vremena bez progresije (*progression free survival*, PFS) i odgovora na terapiju. Konačno, ispitaće se veza farmakogenetičkih karakteristika i skorova.

Metodologija: U studiju je uključeno 57 pacijenata sa HLL-om koji su lečeni FC protokolom, većinom u prvoj liniji. Pacijenti su stratifikovani prema skorovima CLL-IPI, PRS i MDACC 2011, nakon čega je ispitana njihova prognostička vrednost u pogledu TTFT, odgovora na terapiju, PFS i OS. Imajući u vidu da je gubitak funkcije *TP53* gena jedan od

glavnih uzroka rezistencije na konvencionalnu hemioterapiju, za potrebe farmakogenetičke analize iz kohorte su isključeni pacijenti sa mutacijom i/ili delecijom *TP53*, čime otklonjena je mogućnost da su ove aberacije uticale na ishod lečenja pacijenata. Detekcija *CYP2B6*6* varijantnog alela je izvršena reakcijom lančanog umnožavanja DNK (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) i direktnim sekvenciranjem. Ekspresija *SLC28A3* je merena u mononuklearnim ćelijama izolovanim iz uzoraka periferne krvi HLL pacijenata uzetih pre započinjanja terapije FC protokolom, metodom kvantitativnog PCR na matrici dobijenoj reverznom transkripcijom (*Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*, qRT-PCR).

Rezultati: Kod pacijenata koji nisu reagovali na terapiju FC protokolom (ishod lečenja stabilna bolest ili progresija) detektovani su značajno viši nivoi iRNK *SLC28A3* gena u odnosu na pacijente koji su postigli parcijalnu ili kompletnu remisiju ($p=0.01$). Pacijenti koji su visoko ekspimirali *SLC28A3* imali su skoro 10 puta veću šansu da ne odgovore na terapiju FC u odnosu na pacijente sa niskom ekspresijom ($OR=9.8$, $p=0.046$). Nije pokazano da postoji povezanost nivoa ekspresije *SLC28A3* sa PFS i OS. Prisustvo alela *CYP2B6*6*, detektovano kod 24 pacijenta (54.6%), nije bilo značajno povezano sa odgovorom na FC, kao ni PFS i OS. Pacijenti sa višim vrednostima skorova CLL-IPI, PRS i MDACC 2011 su imali značajno kraće vreme do prve terapije u odnosu na pacijente koji su imali niže vrednosti skorova ($p=0.002$, $p=0.019$ i $p<0.001$, redom). U multivarijantnoj analizi, MDACC 2011 i CLL-IPI su zadržali značajnost u pogledu predikcije TTFT ($p=0.001$ i $p=0.018$, redom), dok PRS nije bio značajan. CLL-IPI je jedini pokazao značajnost u predikciji OS ($p=0.005$ u univarijantnoj i $p=0.013$ u multivarijantnoj analizi) i PFS ($p=0.036$), dok je PRS bio samo granično značajan u predikciji OS ($p=0.052$). MDACC 2011 nije pokazao statističku značajnost u pogledu predikcije OS i PFS, dok nijedan od ispitivanih prognostičkih modela nije imao prediktivnu vrednost u pogledu odgovora na terapiju. Takođe, nije utvrđeno da postoji veza između vrednosti ispitivanih skorova i ekspresije *SLC28A3*.

Zaključak: Rezultati ovog rada su pokazali da je nivo ekspresije *SLC28A3* značajan prediktor odgovora na FC kod pacijenata sa funkcionalnim *TP53* genom. Varijantni alel *CYP2B6*6* u ovoj studiji nije ispoljio značaj u terapijskom ishodu. Sa druge strane, prognostički modeli CLL-IPI, PRS i MDACC 2011 pokazali su značajan potencijal u predviđanju TTFT, uprkos tome što su pacijenti iz naše kohorte imali više pokazatelja agresivnije bolesti u odnosu na opštu HLL populaciju. CLL-IPI je pokazao prognostičku vrednost i u slučaju predikcije PFS i OS. Povezanost između ispitivanih prognostičkih skorova i ekspresije *SLC28A3* u ovoj studiji nije detektovana, što ukazuje na to da ovi

rizikofaktori odražavaju potpuno različite aspekte bolesti i njenog lečenja. U našoj studiji, ekspresija *SLC28A3* se pokazala kao striktno prediktivni marker, čiji je efekat bio ograničen na terapijski odgovor i nije se dalje odrazio na preživljavanje. Validacija na većim kohortama i standardizacija metoda merenja ekspresije *SLC28A3* su neophodne kako bi se potvrdila prediktivna moć ovog molekularnog markera i njegova primenljivost za stratifikaciju pacijenata u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

KLJUČNE REČI: hronična limfocitna leukemija, ekspresija *SLC28A3*, *CYP2B6**6, fludarabin, ciklofosamid, odgovor na terapiju, CLL-IPI, PRS, MDACC 2011

NAUČNA OBLAST: MEDICINA

UŽA NAUČNA OBLAST: MOLEKULARNA MEDICINA

UDK broj: _____

**ASSOCIATION OF HUMAN CONCENTRATIVE NUCLEOSIDE
TRANSPORTER 3 GENE EXPRESSION AND *CYP2B6**6 ALLELE
WITH THE RESPONSE TO FLUDARABINE PLUS
CYCLOPHOSPHAMIDE IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA
PATIENTS**

ABSTRACT

Background: Fludarabine plus cyclophosphamide (FC) chemotherapy is the basis of treatment protocols used in management of chronic lymphocytic leukemia (CLL). In some patients, response to therapy may be affected by aberrant function of genes involved in pharmacokinetics and pharmacodynamics of the drugs. On the other hand, numerous clinical, biological and genetic prognostic markers which predict the clinical course of CLL, primarily time to first treatment (TTFT) and overall survival (OS) have been established. In recent times, they have been combined to make different prognostic models in order to enhance their prognostic value. The most relevant prognostic models used for prediction of TTFT are the Progression-Risk Score (PRS), and the MD Anderson Cancer Center Score 2011 (MDACC 2011), while CLL-International Prognostic Index (CLL-IPI), although the most powerful for prediction of OS, is also being used to estimate TTFT. The aim of this research was to assess the impact of pharmacogenetic variability, namely expression of *SLC28A3* gene and the presence of *CYP2B6**6 variant allele, on the FC treatment efficacy. Also, one of the objectives was to investigate CLL-IPI, PRS, and MDACC 2011 prognostic values regarding TTFT, first line treatment response, progression-free survival (PFS) and OS. Finally, the association of pharmacogenetics and prognostic models was investigated.

Methods: Fifty-seven CLL patients treated with FC, most of them in the first treatment line, were enrolled in this study. Patients were stratified according to the prognostic models CLL-IPI, PRS and MDACC 2011 and their prognostic significance regarding TTFT, treatment response, PFS and OS was examined. Considering the fact that the loss of *TP53* gene function is one of the main causes of chemoresistance, patients with mutated and/or deleted *TP53* were excluded from pharmacogenetic analyses, thus eliminating the possibility of its influence on the treatment outcome. *CYP2B6* genotyping was performed by polymerase chain

reaction (PCR) and direct sequencing. *SLC28A3* expression was measured by quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR).

Results: Significantly higher pretreatment levels of *SLC28A3* mRNA were detected in patients who failed to respond to FC in comparison to patients who achieved complete and partial response ($p=0.01$). *SLC28A3* high-expressing cases were almost ten times more likely not to respond to FC than low-expressing cases ($OR=9.8$; $p=0.046$). However, association of *SLC28A3* expression with PFS and OS was not observed. *CYP2B6*6* allele, detected in 24 (54.6%) of patients, exerted no association with the attainment of response to FC, as well with PFS and OS. Patients with higher risk scores according to CLL-IPI, PRS, and MDACC 2011 underwent treatment significantly earlier than patients with lower risk scores ($p=0.002$, $p=0.019$, and $p<0.001$, respectively). In multivariate analysis, MDACC 2011 and CLL-IPI retained their significance regarding TTFT ($p=0.001$ and $p=0.018$, respectively), while PRS did not. CLL-IPI was the only significant predictor of OS both at the univariate ($p=0.005$) and multivariate ($p=0.013$) levels, as well as of PFS ($p=0.036$). PRS exhibited borderline significance only in prediction of OS ($p=0.052$), while MDACC 2011 was not able to predict either PFS or OS. All three examined prognostic models failed to predict treatment response. In addition, the association between the level of risk and *SLC28A3* expression was not detected.

Conclusion: The results of this study demonstrate that *SLC28A3* expression is a significant predictor of FC efficacy in CLL patients with intact *TP53*. *CYP2B6*6* variant allele did not exhibit association with response to FC. On the other hand, CLL-IPI, PRS, and particularly MDACC 2011 were able to predict TTFT, despite the fact that the patients in our cohort exhibited features of more aggressive disease than expected in general CLL population. In addition, CLL-IPI was also predictive of PFS and OS. No association between *SLC28A3* expression and prognostic scores was detected in this study, implying that they reflect completely different aspects of CLL and its treatment. In our study, *SLC28A3* expression emerged as a strictly predictive marker, whose effect was restricted to the treatment period, without further impact on survival. Validation on larger cohorts and standardization of expression measurement methods are warranted in order to confirm predictive value and applicability of this molecular marker for pretreatment stratification of CLL patients in daily clinical practice.

KEYWORDS: chronic lymphocytic leukemia, *SLC28A3* expression, *CYP2B6*6*, fludarabine, cyclophosphamide, treatment response, CLL-IPI, PRS, MDACC 2011

SCIENTIFIC FIELD: MEDICINE

SCIENTIFIC DISCIPLINE: MOLECULAR MEDICINE

UDC number: _____

SADRŽAJ

1 UVOD	1
1.1 EPIDEMIOLOGIJA I ETIOPATOGENEZA HRONIČNE LIMFOCITNE LEUKEMIJE	1
1.2 DIJAGNOZA	3
1.3 KLINIČKA SLIKA.....	4
1.3.1 KOMPLIKACIJE TOKA HRONIČNE LIMFOCITNE LEUKEMIJE	5
AUTOIMUNA HEMOLIZNA ANEMIJA	5
RIHTEROV SINDROM	5
1.4 PROGNOZA I PROGNOСТИČKI BIOMARKERI	6
1.4.1 KLINIČKI BIOMARKERI	8
1.4.2 KRVNA SLIKA I SERUMSKI BIOMARKERI	8
1.4.3 IMUNOFENOTIPSKI BIOMARKERI	9
1.4.4 CITOGENETIČKI BIOMARKERI I <i>IGHV</i> MUTACIONI STATUS	9
DELECIJA 13q.....	10
TRIZOMIJA 12.....	10
DELECIJA 11q.....	11
DELECIJA 17p.....	11
<i>IGHV</i> MUTACIONI STATUS	12
1.4.5 NOVE MUTACIJE I KONVENCIONALNA CITOGENETIKA.....	12
1.4.6 KOMBINOVANI PROGNOСТИČKI SKOROVIM.....	13
MDACC 2007	13
MDACC 2011	14
PRS.....	14
CLL-IPI	15
MOLEKULARNO-GENETIČKI PROGNOСТИČKI MODELI.....	16
1.5 LEČENJE.....	16
1.6 PREDIKTIVNI BIOMARKERI	17
1.6.1 <i>TP53</i>	18
1.6.2 PREDIKTIVNI ZNAČAJ <i>IGHV</i> MUTACIONOG STATUSA.....	18
1.6.3 ULOGA KLINIČKIH BIOMARKERA U IZBORU TERAPIJE.....	19
1.6.4 PRETHODNA TERAPIJA KAO PREDIKTIVNI MARKER	19

1.7 POTRAGA ZA NOVIM PREDIKTIVNIM BIOMARKERIMA: FARMAKOGENOMIKA	
I NJEN ZNAČAJ U HRONIČNOJ LIMFOCITNOJ LEUKEMIJI	20
1.7.1 ZNAČAJ FARMAKOGENOMIKE	20
1.7.2 FARMAKOGENOMIKA U HRONIČNOJ LIMFOCITNOJ LEUKEMIJI.....	20
1.7.3 FLUDARABIN: MEHANIZAM DEJSTVA I UTICAJ FARMAKOGENETIKE NA	
ISHOD LEČENJA	21
hENT	22
hCNT.....	23
1.7.4 CIKLOFOSFAMID: MEHANIZAM DEJSTVA I UTICAJ FARMAKOGENETIKE	
NA ISHOD LEČENJA.....	25
CITOHROM P450	26
CYP2B6	27
2 CILJ RADA	29
3 METODOLOGIJA	30
3.1 PACIJENTI	30
3.1.1 DIJAGNOZA	30
3.1.2 OSNOVNA KOHORTA.....	30
3.1.3 KOHORTA ZA FARMAKOGENETIČKU ANALIZU.....	30
3.1.4 VARIJABLE.....	31
3.1.5 ETIČKE NORME	32
3.2 PROCENA ODGOVORA NA FC	32
3.3 PREŽIVLJAVANJE	33
3.4 ODREĐIVANJE LABORATORIJSKIH PARAMETARA	33
3.4.1 KRVNA SLIKA SA APSOLUTNIM BROJEM LIMFOCITA.....	33
3.4.2 ODREĐIVANJE NIVOVA β 2 MIKROGLOBULINA.....	34
3.4.3 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SERUMSKE LAKTAT DEHIDROGENAZE	
(LDH)	34
3.5 IMUNOFENOTIPIZACIJA PROTOČNOM CITOMETRIJOM	34
3.5.1 ISPITANICI	34
3.5.2 MONOKLONSKA ANTITELA.....	35
3.5.3 METOD VIŠEKOLORNE DIREKTNE IMUNOFLUORESCENCIJE.....	35
3.5.4 MERENJE I ANALIZA UZORAKA METODOM MULTIPARAMETARSKE	
PROTOČNE CITOMETRIJE	36

3.6 IZOLACIJA MATERIJALA ZA ANALIZU	37
3.6.1 IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRVI.....	37
3.6.2 IZOLACIJA MONONUKLEARNIH ČELIJA IZ PERIFERNE KRVI.....	38
3.6.3 IZOLACIJA RNK IZ MONONUKLEARNIH ČELIJA.....	38
3.7 REVERZNA TRANSKRIPCIJA (RT)	39
3.8 DETEKCIJA <i>CYP2B6*6</i> VARIJANTNOG ALELA	39
3.9 ODREĐIVANJE MUTACIONOG STATUSA <i>TP53</i> GENA	41
3.10 ODREĐIVANJE <i>IGHV</i> MUTACIONOG STATUSA	42
3.11 ANALIZA DNK NA AGAROZNOM GELU	45
3.12 PREČIŠĆAVANJE PCR PRODUKATA	45
3.13 SEKVENCIRANJE PCR PRODUKATA	46
3.14 ANALIZA EKSPRESIJE <i>SLC28A3</i> GENA	47
3.15 INTERFAZNA FLUORESCENTNA <i>IN SITU</i> HIBRIDIZACIJA (iFISH)	48
3.15.1 PRIPREMA PREPARATA.....	49
3.15.2 ANALIZA INTERFAZNE FLUORESCENTNE <i>IN SITU</i> HIBRIDIZACIJE (iFISH).....	49
3.16 SKORIRANJE PACIJENATA PREMA PROGNOŠTIČKIM MODELIMA CLL-IPI, PRS I MDACC 2011	50
3.16.1 CLL-IPI.....	50
3.16.2 PRS.....	50
3.16.3 MDACC 2011	51
3.17 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	51
4 REZULTATI	53
4.1 ASOCIJACIJA IZMEĐU EKSPRESIJE <i>SLC28A3</i> GENA I PRISUSTVA <i>CYP2B6*6</i> ALELA SA ISHODOM LEČENJA PACIJENATA FC PROTOKOLOM.....	53
4.1.1 OPŠTI PODACI O KOHORTI, LEČENJU I ISHODU LEČENJA.....	53
4.1.2 POVEZANOST PRISUSTVA ALELA <i>CYP2B6*6</i> I ISHODA LEČENJA.....	56
4.1.3 POVEZANOST EKSPRESIJE <i>SLC28A3</i> I ISHODA LEČENJA	57
4.1.4 PREDIKTORI ODGOVORA NA FC.....	59
4.1.5 RIZIK OD NASTANKA AUTOIMUNE HEMOLIZNE ANEMIJE (AIHA) I RIHTEROVOG SINDROMA (RS) U ODNOSU NA NIVO EKSPRESIJE <i>SLC28A3</i> GENA.....	62
4.2 ZNAČAJ PROGNOŠTIČKIH MODELA INTERNACIONALNOG PROGNOŠTIČKOG INDEKSA ZA HRONIČNU LIMFOCITNU LEUKEMIJU (CLL-IPI), SKORA RIZIKA OD	

PROGRESIJE (PRS) I SKORA MD ANDERSON CENTRA ZA KANCER 2011 (MDACC 2011) U PREDIKCIJI TTFT, PFS I OS.....	64
4.2.1 DESKRIPCIIJA KOHORTE.....	64
4.2.2 STRATIFIKACIIJA PACIJENATA PREMA PROGNOŠTIČKIM MODELIMA.....	66
4.2.3 PREDIKCIJA TTFT POMOĆU SKOROVA CLL-IPI, PRS I MDACC 2011	67
4.2.4. PREDIKCIJA OS POMOĆU SKOROVA CLL-IPI, PRS I MDACC 2011	70
4.2.5 PREDIKCIJA PFS POMOĆU SKOROVA CLL-IPI, PRS I MDACC 2011	71
4.3 POVEZANOST PROGNOŠTIČKIH MODELA CLL-IPI, PRS I MDACC2011 SA TERAPIJSKIM ODGOVOROM I NIVOOM EKSPRESIJE <i>SLC28A3</i> GENA	71
5 DISKUSIJA	73
6 ZAKLJUČCI	85
7 LITERATURA	87

1 UVOD

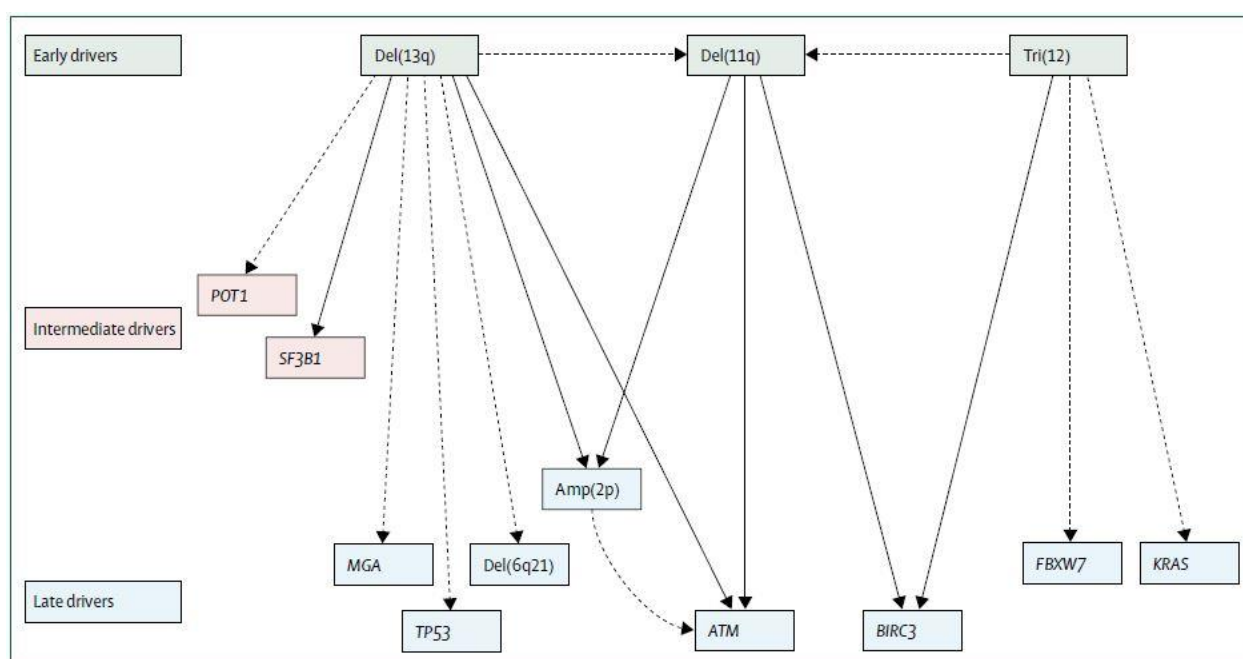
1.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOPATOGENEZA HRONIČNE LIMFOCITNE LEUKEMIJE

Hronična limfocitna leukemija (HLL) predstavlja klonalnu proliferaciju zrelih, CD5 pozitivnih B limfocita koji se nakupljaju prevashodno u koštanoj srži, perifernoj krvi, limfnim čvorovima i slezini (1). Najčešća je leukemija odraslih u Evropi i Severnoj Americi. Obuhvata oko 25% svih leukemija u adultnoj populaciji, kao i 25% svih hroničnih limfoproliferacija (1, 2). Medijana starosne dobi bolesnika sa HLL-om pri postavljanju dijagnoze je 67-72 godine, pri čemu češće obolevaju muškarci nego žene (1.7:1) (2). Incidenca ovog oboljenja izjednačena za starosnu dob, prema poslednjim obrađenim podacima, u Sjedinjenim Američkim Državama iznosi 4.7 obolelih na 100 000 stanovnika (3). Incidenca obolevanja od HLL-a je najveća među belcima, a najmanja među Azijatskom populacijom (4).

Faktori rizika za nastanak hronične limfocitne leukemije su nedovoljno rasvetljeni. Smatra se da 10% pacijenata ima pozitivnu porodičnu anamnezu za HLL, što je čini jednim od hematoloških maligniteta sa najvećim naslednim potencijalom (5). Među faktorima koji se povezuju sa povećanom incidencom HLL-a prepoznatljivi su još i izloženost herbicidima i pesticidima, smanjeno izlaganje sunčevoj svetlosti, istorija atopijskih zdravstvenih poremećaja, izloženost virusu hepatitisa C, kao i učestale infekcije (5). Nije dokazana sigurna veza između nastanka HLL i izlaganja jonizujućem zračenju (6, 7).

Pretpostavlja se da se primarni događaj u leukemogenezi odvija na nivou multipotentne samoobnavljajuće hematopoetske matične ćelije. Sveobuhvatne analize genoma HLL ćelija dovele su do razvoja modela postepene genske evolucije u kome se kao inicijalni događaj u leukemogenezi kod većine pacijenata navodi gubitak ili sticanje hromozomskog materijala (*early drivers*). Kasnije u toku bolesti dolazi do pojave novih mutacija i hromozomskih aberacija (*intermediate drivers, late drivers*) koje usmeravaju

bolest u nepovoljnom pravcu, što podrazumeva agresivniji tok i rezistentnost na lečenje (Slika 1). Inicijatorske hromozomske aberacije u razvoju HLL podrazumevaju deleciju hromozoma 13q (del13q) u 55% slučajeva i, u manjem procentu, sticanje hromozoma 12 (trizomija 12) da bi, najčešće u kasnijim fazama bolesti, došlo do delecija hromozoma 11q (del11q) i 17p (del17p) koje dovode do gubitka gena ključnih za reagovanje ćelije u slučaju oštećenja genoma (*ataxia-teleangiectasia mutated*, *ATM* i *TP53*). Delecija 13q uzrokuje gubitak mikroRNK molekula (miRNK), konkretno miR-15a i miR-16-1, što se smatra događajem koji inicira leukemogenezu (8).



Slika 1. Shematski prikaz promena u genomu HLL ćelije u njenom nastanku i u kasnijim fazama bolesti (preuzeto i adaptirano iz Lendou i sar, *Nature* 2015)

1.2 DIJAGNOZA

Dijagnoza hronične limfocitne leukemije se postavlja na osnovu prisustva iznad 5000/ μ L B limfocita u perifernoj krvi tokom najmanje tri meseca (9).

Neophodno je metodom protočne citometrije dokazati specifičan imunofenotip ćelija koji podrazumeva koekspresiju CD5 i B-ćelijskih površinskih antigena CD19, CD20 i CD23, nizak nivo ekspresije površinskih imunoglobulina (sIg), CD20 i CD79b u odnosu na normalne B-ćelije i restrikciju *kappa* ili *lambda* lakih lanaca (10). Snažna ekspresija CD200 može pomoći prilikom diferencijalne dijagnoze u odnosu na limfome (11). Tipičan imunofenotip HLL ćelija je određen vrednostima Matutes/Moro HLL skora ≥ 4 . Ovaj skor obuhvata 5 karakteristika na protočnoj citometriji: visoku ekspresiju CD5 i CD23 i nisku ekspresiju sIg, FMC7 i CD79b ili CD22 (9, 12-14).

Ukoliko postoji limfadenopatija sa manje od 5000 monoklonskih B-limfocita po μ L periferne krvi u odsustvu citopenija koje su posledica klonalne limfocitne infiltracije koštane srži, radi se o limfomu malih limfocita (*small lymphocytic lymphoma*, SLL) koji ima iste morfološke i fenotipske karakteristike i isti terapijski pristup kao kod HLL (2).

Morfološki, ćelije hronične limfocitne leukemije imaju izgled malih, zrelih limfocita, sa visokim nukleo-citoplazmatskim odnosom, delimično kondenzovanim hromatinom i odsustvom vidljivih nukleolusa (9). Neretko se sreću i ćelije atipične morfologije sa većom količinom citoplazme i usećenim jedrima, ili ćelije limfoplazmocitoidnog izgleda. Ukoliko ovakvu morfologiju ima preko 15% ćelija u perifernom razmazu, a imunofenotipizacija protočnom citometrijom registruje atipičnu ekspresiju markera sa Matutes/Moro skorom nižim od 4, nalazi ukazuju na atipičnu ili varijantnu HLL (4). Prisustvo $> 55\%$ prolimfocita u razmazu definiše dijagnozu B-prolimfocitne leukemije (15).

Diferencijalno-dijagnostički u obzir najčešće dolaze mantl-ćelijski limfom u leukemijskoj fazi, splenični limfom marginalne zone i B-prolimfocitna leukemija. Iako svi ovi entiteti imaju svoje specifičnosti, nekada je teško razgraničiti o kom se entitetu radi, što je posledica preklapanja u morfološkim i fenotipskim karakteristikama. U Tabeli 1 date su imunofenotipske karakteristike različitih hroničnih limfoproliferativnih bolesti koje nam pomažu u diferenciranju ovih oboljenja (4).

Tabela 1. Imunofenotipske karakteristike hroničnih limfoproliferativnih oboljenja

	sIg	CD5	CD23	CD79b	FMC7	CD20	CD22	CD103	CD200	CD25	CD11c	CD10	CD43	ROR1
Normalni B ly	++	-	-	++	++	++	++	-	-	+	+	-	-	-
HLL	+	++	++	+	+	+	+	-	+++	+	+	-	+++	++
MČL	++	++	-	++	+++	+++	++	-	+	-	-	-	+++	++
LPL	+++	+	+	++	+	++	++	-	-	+	+	-	+	N/O
FL	+++	-	-	++	+	++	+	-	-	-	-	+	-	+
HCL	+++	-	-	+	++	++	+++	++	-	+++	+++	-	-	++
LMZ	++	-	-	++	++	++	++	-	-	++	++	-	+	+

Skraćenice: ly, limfociti; HLL, hronična limfocitna leukemija; MČL, mantl ćelijski limfom; LPL, limfoplazmocitni limfom; FL, folikularni limfom; HCL, *hairy cell* leukemija; LMZ, limfom marginalne zone

Oznake: - nema ekspresije, + niska ekspresija, ++ visoka ekspresija, +++ vrlo visoka ekspresija, N/O neodređeno

1.3 KLINIČKA SLIKA

Glavna odlika hronične limfocitne leukemije je heterogenost koja se sa biološkog i molekularnog terena preslikava i na njen klinički tok. On se kreće u rasponu od dugogodišnjeg, pa čak i višedecenijskog indolentnog toka, bez potrebe za lečenjem, do agresivnog ispoljavanja bolesti sa rezistencijom na lečenje i smrtnim ishodom unutar par godina od postavljanja dijagnoze. Dijagnoza se najčešće postavlja rutinskim pregledom krvne slike u kojoj se registruje leukocitoza različitog stepena sa predominantnom limfocitozom. Često pacijenti imaju i uvećanje limfnih čvorova na karakterističnim mestima na periferiji (vrat, aksile, ingvinumi), neretko uvećanje slezine, dok je ređa pojava uvećanje jetre. Kod manjeg broja pacijenata su prisutni simptomi koji nastaju kao posledica anemije i trombocitopenije ili konstitutivni (B) simptomi, odnosno gubitak od preko 10% ukupne telesne mase za manje od 6 meseci, povišena telesna temperatura u odsustvu dokazane infekcije i noćno znojenje. Umor je često prisutan simptom bolesti, dok su simptomi koji nastaju kao posledica kompresivnog efekta uvećanih limfnih čvorova i/ili slezine retki, kao i simptomi koji se javljaju usled infiltracije drugih tkiva i organa ćelijama hronične limfocitne leukemije (koža, pluća, centralni nervni sistem, gastrointestinalni trakt i dr.) (5).

1.3.1 Komplikacije toka hronične limfocitne leukemije

Komplikacije prirodnog toka HLL su brojne. Među onima koje najznačajnije utiču na morbiditet i mortalitet pacijenata sa HLL-om su infekcije, autoimmune komplikacije i transformacija HLL u agresivni limfom (Rihterov sindrom, RS). U ovom radu ćemo se kratko osvrnuti na najčešći autoimuni fenomen vezan za HLL - autoimunu hemoliznu anemiju (AIHA) i RS.

Autoimuna hemolizna anemija

Autoimuna hemolizna anemija (AIHA) predstavlja najčešći autoimuni fenomen koji se javlja u okviru HLL-a. Različiti izvori pominju učestalost od 5% do 37%, s tim da većina autora navodi da 5-10% pacijenata sa HLL-om razvije AIHA-u u nekom trenutku tokom bolesti (16, 17). AIHA se češće javlja u uznapredovaloj bolesti i povezana je sa nemutiranim *IGHV* genima (*immunoglobulin heavy-variable genes; IGHV*) u rearanžmanima teških lanaca imunoglobulina, povećanom ekspresijom zeta-udruženog proteina 70 (*zeta-associated protein 70, ZAP-70*) i povišenim vrednostima beta2-mikroglobulina ($\beta 2m$) (17). Primećeno je da kod pacijenata koji su tretirani fludarabinom može doći do pogoršanja već postojeće ili *de novo* nastanka AIHA-e (18-20). Smatra se da je razlog provociranja AIHA-e tokom lečenja fludarabinom deplecija regulatornih T-ćelija čijoj kontroli izmiču subsetovi autoreaktivnih T limfocita, i u složenoj interakciji sa malignim i preostalim funkcionalnim B-ćelijama dovode do pojave ove komplikacije (21). AIHA se češće javlja po primeni monoterapije fludarabinom, pa čak i hlorambucilom, u odnosu na kombinaciju fludarabina i ciklofosfamida (FC), moguće kao posledica protektivnog efekta ciklofosfamida koji je snažan imunosupresiv (22, 23). O samom lečenju će biti više reči u jednom od narednih odeljaka.

Rihterov sindrom

Rihterov sindrom (RS) predstavlja transformaciju HLL u agresivni limfom, najčešće difuzni B krupnoćelijski limfom, znatno ređe Hočkinov limfom. Javlja se u 2-

8% pacijenata sa HLL-om. Ova komplikacija se odlikuje agresivnim kliničkim tokom i farmakorezistencijom, sa medijanom preživljavanja od trenutka postavljanja dijagnoze RS koja ne prelazi godinu dana (24). Nastanak RS se povezuje sa nemutiranim *IGHV*, visokorizičnim hromozomskim abnormalnostima (*del11q* i *del17p*), kao i povećanom ekspresijom CD38, CD49d i ZAP-70 (25). Takođe je utvrđeno da prisustvo trizomije 12 i mutacije *NOTCH1* gena povećavaju rizik od razvoja RS (26). U prospektivnoj studiji Parika i saradnika je utvrđeno da lečenje kombinacijom purinskih analoga i alkilirajućih agenasa 3 puta povećava rizik od nastanka RS u odnosu na terapiju samo purinskim analogima, alkilirajućim agensima ili monoklonskim antitelima (27). Podatke o mogućoj povezanosti primene fludarabina, naročito u kombinaciji sa alkilirajućim lekovima, sa nastankom RS potrebno je potkrepiti čvršćim dokazima, naročito zbog činjenice da nisu svi autori potvrdili ovu vezu (22, 28)

1.4 PROGNOZA I PROGNOŠTIČKI BIOMARKERI

Predviđanje kliničkog toka hronične limfocitne leukemije na osnovu parametara definisanih na dijagnozi i u periodu pre započinjanja lečenja predstavlja izazov sa kojim su kliničari suočeni tokom poslednjih nekoliko decenija. Pre oko 40 godina ustanovljeni su kliničko-laboratorijski parametri koji su do danas u upotrebi kao jednostavno merilo aktivnosti bolesti. Oni podrazumevaju palpabilno uvećanje limfnih žlezda u regijama vrata, pazuha i prepona, uvećanje slezine i jetre, kao i hematološke parametre koji indirektno ukazuju na fenomen potiskivanja u koštanoj srži (anemija i/ili trombocitopenija u odsustvu imunološkog uzroka). Na osnovu ovih parametara bolesnici sa HLL-om se svrstavaju u kliničke stadijume koje su na sličan način tada definisali Rai i Bine. Ova dva *staging* sistema (Rai i Bine) definišu stadijum niskog rizika (Rai 0, Binet A), stadijum srednjeg rizika (Rai I/II, Binet B) i stadijum visokog rizika (Rai III/IV, Binet C) (29, 30). Iako su navedeni sistemi zbog svoje jednostavne primene i danas u upotrebi u svakodnevnoj kliničkoj praksi, primećeno je da postoji značajan broj pacijenata u ranim stadijumima bolesti koji ispoljavaju agresivan klinički tok i rezistenciju na primenjeno lečenje dok, sa druge strane, ima pacijenata u višim stadijumima koji dobro reaguju na terapiju i postižu dugotrajne remisije. Ova činjenica

je otvorila mogućnost da se u protekle dve decenije pojavi značajan broj novih biomarkera koji su unapredili prognostiku u HLL-u. Vremenom su se diferencirale dve grupe biomarkera u zavisnosti od informacije koju u pogledu bolesti obezbeđuju, a to su prognostički i prediktivni biomarkeri (31). Prognostički biomarkeri odražavaju biologiju i prirodu bolesti i, nezavisno od vrste terapije, određuju verovatnoću trajanja perioda bez terapije (*time to first treatment*, TTFT), ukupnog preživljavanja (*overall survival*, OS) ili transformacije bolesti. Sa druge strane, prediktivni biomarkeri imaju sposobnost da predvide odgovor na specifične modalitete lečenja i predstavljaju osnovu za personalizovani terapijski pristup. Ove dve vrste biomarkera se međusobno preklapaju na način da većina prediktivnih biomarkera istovremeno imaju i prognostičku vrednost, a samo neki prognostički su ujedno i prediktivni (Slika 2) (31-33).

	Prognostički	Prediktivni
Starost	●	●
CIRS	●	●
Stadijum	●	●
B2-mikroglobulin	●	●
CD49d	●	●
CD49d	●	●
ZAP70	●	●
<i>IGHV</i> mutacioni status	●	●
Delecija 17p	●	●
Delecija 11q	●	●
Trizomija 12	●	●
Delecija 13q	●	●
<i>TP53</i> mutacija	●	●
<i>SF3B1</i> mutacija	●	●
<i>NOTCH1</i> mutacija	●	●

Slika 2. Prognostički i prediktivni markeri koji se koriste u kliničkoj praksi (preuzeto i adaptirano iz Rosi i Gaidano, *Hematology* 2017)

Objašnjenje: zeleni krug označava DA, crveni krug označava NE, narandžasti krug označava NIJE VALIDIRANO

Skraćenice: CIRS, komorbiditetni indeks *Cummulative Illness Rating Scale*

Postoje još dva načina podele prognostičkih faktora u HLL-u koji se zasnivaju na poreklu varijable. Jedna je na kliničke, serumske, imunofenotipske, citogenetičke i molekularne biomarkere, a druga na faktore vezane za pacijenta, za terapiju i za bolest.

1.4.1 Klinički biomarkeri

Među kliničkim varijablama u hroničnoj limfocitnoj leukemiji u prognostičke svrhe se u literaturi pominju starosna dob, pol, komorbiditeti, opšte stanje pacijenta kvantifikovano skalom Istočne kooperativne onkološke grupe (*Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status*, ECOG PS), vrednost klirensa kreatinina, učestale infekcije, te status limfnih čvorova, jetre i slezine koji se koristi u standardnim *staging* sistemima. Većina ovih varijabli (starosna dob, pol, ECOG PS, status limfnih čvorova, jetre i slezine u okviru Rai i Binet staging sistema) deo su različitih prognostičkih skorova o kojima će kasnije biti reči (34-38).

1.4.2 Krvna slika i serumski biomarkeri

O parametrima krvne slike kao delu Rai i Bine staging sistema delimično je već bilo reči. Nivo hemoglobin (Hb) ispod 110g/L kod Rai sistema ili ispod 100g/L po Bine-u predstavljaju kriterijum za klasifikaciju pacijenata u viši stadijum bolesti, kao što to predstavlja i nivo trombocita $<100 \times 10^9/L$ za oba sistema. Međutim, kada govorimo o serumskim biomarkerima, najpre mislimo na apsolutni broj limfocita (*absolute lymphocyte count*, ALC), te nivo serumske laktat dehidrogenaze (LDH) i β 2-mikroglobulina (β 2m). Postoje i drugi serumski markeri povezani sa hroničnom limfocitnom leukemijom, ali ovde neće biti opisivani jer nisu predmet interesovanja ovog rada (39, 40).

ALC predstavlja nezavisan prognostički marker vremena do prve terapije i ukupnog preživljavanja, i deo je nekoliko prognostičkih modela koji su razvijeni u prethodnoj deceniji (34, 37, 41). LDH je, isto kao i prethodni biomarker, deo određenih prognostičkih skorova (35, 42). Povišene vrednosti LDH, zajedno sa B simptomima, progresivnom limfadenopatijom, hiperkalcemijom i pancitopenijom predstavljaju obeležja transformacije HLL u agresivni limfom (Rihterov sindrom) (43, 44). Beta2-mikroglobulin je deo molekula MHC klase I i često je povišen u limfoproliferativnim i imunoproliferativnim bolestima. U HLL-u ga proizvode aktivne HLL ćelije, zbog čega direktno odražava veličinu tumorske mase i korelira sa stadijumom bolesti (45). U velikom broju studija potvrđena je njegova prognostička vrednost, kako u pogledu

vremena do prve terapije, tako i njegova veza sa odgovorom na terapiju baziranu na purinskim analogima, trajanjem vremena bez progresije (*progression-free survival*, PFS) i ukupnim preživljavanjem (36, 38, 46-48).

1.4.3 Imunofenotipski biomarkeri

Metodom protočne citometrije određuje se ekspresija različitih markera na površini B ćelija u hroničnoj limfocitnoj leukemiji. Marker koji su najviše proučavani u svjetlu prognostičke vrednosti u HLL su CD38, ZAP-70 i, u skorije vreme, CD49d. Sva tri navedena markera pokazali su nezavisnu prognostičku snagu u različitim studijama (49-51). CD38 i ZAP-70 su na osnovu udruženosti njihove visoke ekspresije sa prisustvom nemutiranog *IGHV*, ispitivani kao mogući surogat markeri mutacionog statusa *IGHV*, međutim, od toga se odustalo jer se dubljom analizom utvrdilo da ova konkordantnost nije na zadovoljavajućem nivou, naročito u određenim subpopulacijama HLL pacijenata (52, 53). Za prognostički nepovoljnu smatra se ekspresija CD38 na površini preko 30% ćelija u ispitivanom uzorku periferne krvi, dok *cut-off* vrednost u slučaju ZAP-70 u većini studija iznosi 20% (50). Nedostaci korišćenja CD38 u prognozi pacijenata sa HLL-om su varijacija ekspresije tokom bolesti, heterogenost ekspresije na različitim HLL ćelijama unutar istog uzorka i variranje *cut-off* vrednosti u različitim studijama (54-57). CD49d je relativno nov biomarker u HLL-u. Pokazano je da pacijenti koji ekspresiraju ovaj marker na površini $\geq 30\%$ HLL ćelija imaju kraće vreme bez terapije i ukupno preživljavanje u odnosu na one sa nižom ekspresijom. U jednoj studiji na oko 3000 pacijenata sa HLL-om utvrđeno je da CD49d ima prognostičku vrednost nezavisno od *IGHV* mutacionog statusa i citogenetičkog profila (51).

1.4.4 Citogenetički biomarkeri i *IGHV* mutacioni status

Suštinski napredak u predviđanju kliničkog toka i identifikovanju biološke heterogenosti hronične limfocitne leukemije napravljen je nakon detaljnijeg uvida u molekularn-genetičke karakteristike bolesti. Pre tačno 20 godina, dve nezavisne grupe su utvrdile da pacijenti sa prisustvom somatskih hipermutacija u *IGHV* genima (*immunoglobulin heavy-variable genes*, *IGHV*) u rearanžmanima teških lanaca

imunoglobulina (*IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmani), imaju duže preživljavanje bez progresije i duže ukupno preživljavanje u odnosu na pacijente sa nemutiranim *IGHV* (58, 59). Godinu dana kasnije, Doner sa saradnicima je definisao 5 prognostičkih grupa koje je bazirao isključivo na prisustvu neke od 4 najčešće hromozomske aberacije: delecija dugog kraka hromozoma 13 (del13q), normalan kariotip, trizomija hromozoma 12 (trizomija 12), delecija dugog kraka hromozoma 11 (del11q) i delecija kratkog kraka hromozoma 17 (del17p). Navedenim redom određena je prognoza, i to od najbolje, uslovljene prisustvom del13q (medijana ukupnog preživljavanja 133 meseca) ka najslabijoj, kod nosilaca del17p (medijana ukupnog preživljavanja 32 meseca). Bar jednu hromozomsku aberaciju ima oko 80% pacijenata sa HLL-om (60).

Delecija 13q

Del 13q se detektuje kod oko 55% pacijenata sa HLL-om (8, 60, 61). Prisustvo izolovane del13q je marker odlične prognoze, imajući u vidu da je preživljavanje ovih pacijanata veoma slično preživljavanju u opštoj populaciji u istom starosnom i polnom rangu. Ovo je posledica nekoliko faktora: dugog vremena do prve terapije, s tim da značajan deo ovih pacijenata nikad ne ispolji aktivnu bolest i potrebu za lečenjem; dugotrajne remisije nakon prve linije terapije; i vrlo niskog rizika od transformacije (62).

Trizomija 12

Trizomija 12 se javlja u oko 10-20% slučajeva i nosilac je intermedijerne prognoze. Pacijenti sa trizomijom 12 imaju češće atipičnu morfološku i imunofenotipsku prezentaciju (veći procenat atipičnih ćelija, HLL skor < 4), učestalije se prezentuju trombocitopenijom, a poznato je i da kod njih u većem procentu dolazi do pojave Rihterovog sindroma ili sekundarnih maligniteta, što je i vodeći uzrok njihove smrti (63).

Delecija 11q

Kod oko 10% nelečenih pacijenata u ranom stadijumu i do 25% u uznapređovalom stadijumu prisutna je delecija 11q (2). Delecija zahvata region 11q22-q23 i uvek rezultuje gubitkom ataksija-teleangiektazija mutiranog (*ATM*) gena koji kodira protein kinazu, važnu u procesu reparacije DNK. Ova hromozomska aberacija se klinički vezuje za masivnu limfadenopatiju i kraće preživljavanje i kod različitih autora nosilac je intermedijerne, odnosno loše prognoze (2, 31). Loš prognostički potencijal u eri hemioterapije izgleda da je prevazišla primena intenzivne imunohemioterapije rituksimab-FC (RFC), te novih lekova kao što je ibrutinib, mada je za definitivnu ocenu ove tvrdnje potrebno sačekati duži period praćenja nakon terapije (64-66). Delecija oba alela *ATM* gena prognostički je nepovoljnija od izolovane del11q, i po pitanju preživljavanja se ne razlikuje značajno od mutacije *TP53* gena (67).

Delecija 17p

Prognostički najnepovoljnija hromozomska aberacija u hroničnoj limfocitnoj leukemiji je delecija 17p kojom dolazi do gubitka gena *TP53*, čiji se proteinski produkt (p53) kolokvijalno naziva čuvarem genoma jer ključno utiče na reakciju ćelije na oštećenje DNK u pravcu reparacije nastalog oštećenja ili usmeravanja ćelije ka apoptozi (68). Kod asimptomatskih pacijenata disfunkcija p53, bilo kao posledica del17p ili mutacija *TP53* gena, prisutna je u 4-8% slučajeva, a u simptomatskoj fazi pre terapije u do 10%. U relapsu bolesti ili kod refraktarnih pacijenata ovaj procenat se penje na 30-40%, dok je u Rihterovom sindromu mutacija/delecija *TP53* prisutna kod 50-60% slučajeva (31). Kod preko 80% pacijenata sa del17p dolazi do mutacije preostalog *TP53* alela, dok svega 4-5% pacijenata imaju mutaciju *TP53* u odsustvu del17p. Sa aspekta prognoze ova dva načina inaktivacije *TP53* gena su ekvivalentna (69). Nefunkcionalan *TP53* glavni je prediktor agresivne, farmakorezistentne bolesti, sa brzom evolucijom bolesti i kratkim preživljavanjem (70).

IGHV mutacioni status

B limfociti hronične limfocitne leukemije, kao i normalne B ćelije, na svojoj površini eksprimiraju B-ćelijski receptor (*B-cell receptor*, BCR) koji se sastoji od dve komponente: imunoglobulinske, koja prepoznaje i vezuje antigen, i signalne, koja se sastoji od heterodimernog koreceptora CD79A/CD79B i odgovorna je za transmisiju signala sa aktiviranog BCR u unutrašnjost ćelije. Mogućnost prepoznavanja širokog repertoara antigena od strane imunoglobulina BCR posledica je dva procesa: 1) rearanžiranja gena za varijabilni region imunoglobulina BCR koje se događa u antigen-nezavisnoj fazi sazrevanja u koštanoj srži i jetri i 2) procesa somatskih hipermutacija (SHM) koji se odvija nakon kontakta B-ćelije sa određenim antigenom.

Praktično sve studije slažu se u tvrdnji da prisustvo somatskih hipermutacija (SHM) u rearanžiranim *IGHV* genima, odnosno *IGHV* mutacioni status, predstavlja jedan od najsnažnijih prognostičkih faktora u HLL-u (71). Nekoliko osobina čine ovaj biomarker jedinstvenim klonalnim markerom: 1) može se odrediti na dijagnozi; 2) ostaje nepromenjen celim tokom bolesti i 3) nezavisan je od drugih kliničkih i bioloških parametara (72). U zavisnosti od statusa SHM u *IGHV* genima, mogu se razlikovati *IGHV*-nemutirani slučajevi (N-HLL) i *IGHV*-mutirani slučajevi (M-HLL). Kao *cut-off* vrednost izabrana je identičnost sekvence rearanžiranog *IGHV* gena sa odgovarajućom *germline* sekvencom od 98%, pa tako N-HLL ćelije imaju $\geq 98\%$, a M-HLL ćelije $< 98\%$ istovetnosti sekvence, drugim rečima, veće opterećenje somatskim hipermutacijama. Pokazalo se da N-HLL pacijenti imaju znatno kraće vreme do prve terapije, slabiji odgovor na (imuno)hemioterapiju, kao i kraće ukupno preživljavanje. Sa druge strane, M-HLL pacijenti imaju indolentnu bolest i postižu dugotrajne remisije na imunohemioterapiju RFC protokolom, naročito u odsustvu visokorizičnih citogenetskih abnormalnosti kada se čak govori i o eradikaciji bolesti (73, 74).

1.4.5 Nove mutacije i konvencionalna citogenetika

U potrazi za novim prognostičkim markerima, poslednjih godina se sprovode istraživanja u dva pravca: 1) sveobuhvatno ispitivanje genoma HLL različitim novim tehnikama kao što su sekvenciranje nove generacije (*next generation sequencing*, NGS)

i 2) konvencionalna citogenetika sa novim mitogenima koja identifikuje hromozomske aberacije koje se ne mogu utvrditi metodom fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH). Pored uloge gena *ATM* i *TP53* o kojima je prethodno diskutovano, najznačajnije novootkrivene mutacije u pogledu učestalosti i nepovoljnog uticaja na klinički tok HLL-a su mutacije u genima *NOTCH1*, *SF3B1* i *BIRC3*, međutim njih ovde nećemo opisivati s obzirom da prevazilaze temu ovog rada (8). Konvencionalna citogenetika se upotrebom novih mitogena vraća na velika vrata u hroničnu limfocitnu leukemiju. Sve je više dokaza da je kompleksan kariotip (≥ 3 hromozomske aberacije u konvencionalnoj citogenetici) prediktor kraćeg vremena do terapije i kraćeg ukupnog preživljavanja, nezavisno od prisustva visokorizičnih citogenetskih abnormalnosti detektovanih FISH-om (75).

1.4.6 Kombinovani prognostički skorovi

Veliki broj biomarkera prognoze u hroničnoj limfocitnoj leukemiji koji su identifikovani tokom prethodnih nekoliko decenija našli su svoje mesto u različitim kombinacijama u okviru brojnih prognostičkih modela. Temelj multifaktorijskom pristupu u prognostici u HLL-u prepoznatljiv je u opšte poznatim, prethodno navedenim, Rai i Bine *staging* sistemima. Međutim, uočeno je da pacijenti u ranom kliničkom stadijumu pokazuju heterogen klinički tok sa različitom brzinom progresije bolesti do simptomatske faze, kao i da pacijenti imaju različit odgovor na lečenje nezavisno od kliničkog stadijuma u kom se nalaze prilikom postavljanja dijagnoze. Sa ciljem prevazilaženja nepreciznosti standardnih *staging* sistema u pogledu prognoze, različiti autori ispitivali su gore opisane biomarkere prognoze i, kombinovanjem onih koji su se pokazali najznačajnijim, razvili multivarijabilne prognostičke modele sa ciljem predikcije vremena do prve terapije i/ili ukupnog preživljavanja (34-38, 62, 76).

MDACC 2007

Važan iskorak u ovom pravcu napravili su Virda i saradnici 2007. godine razvivši skor sastavljen od 6 varijabli koje su mahom reflektovale aktivnost osnovne bolesti, pre nego njenu biologiju, a to su: starost, pol, Rai stadijum, $\beta 2m$, apsolutni broj

limfocita i broj zahvaćenih limfonodalnih regija. Ovaj prognostički model je ispitan na 1674 pacijenta MD Anderson Kancer Centra (*MD Anderson Cancer Center*, MDACC), pokazavši zavidnu moć diskriminacije pacijenata po pitanju ukupnog preživljavanja (34).

Međutim, kako su primat u prognostici vrlo brzo zauzimali različiti citogenetički i molekularni biomarkeri, u narednim godinama došlo je do razvoja drugih prognostičkih modela koji su sadržali kombinaciju kliničkih, laboratorijskih i genetičkih markera (35-38). Drugim rečima, razvijeni su modeli koji su odražavali ne samo aktivnost bolesti, već i njenu biologiju, dok je nekolicina autora predložila prognostičke modele koji u sebi sadrže samo molekularno-genetičke markere prebacujući loptu u prognostici HLL-a potpuno na teren genetike, odnosno biologije bolesti (62, 76). U daljem tekstu ćemo se detaljnije osvrnuti samo na prognostičke modele koji su, između ostalog, predmet interesovanja ovog rada (35, 37, 38).

MDACC 2011

Jedan od navedenih prognostičkih modela predstavlja praktično unapređenje prethodno opisanog MDACC 2007 skora od strane iste grupe autora 2011. godine, i razvijen je na 930 nelečenih pacijenata, uglavnom u ranom kliničkom stadijumu bolesti. Skor ima za cilj predviđanje vremena do prve terapije. U sastav skora ušli su sledeći parametri: najveći limfni čvor (ln) na vratu, broj zahvaćenih limfonodalnih regije, nivo LDH, prisustvo del11q, del17p i *IGHV* mutacioni status. Za izračunavanje vrednosti skora za svakog individualnog pacijenta koristi se složena matematička formula data u odeljku 3.16.3. Medijana vrednosti skora u razvojnoj i validacionim kohortama kretala se oko 20. Niže vrednosti skora povezuju se sa dužim vremenom do prve terapije i obrnuto (35).

PRS

Još jedan prognostički model, Skor rizika od progresije (*Progression-Risk Score*, PRS), predstavljen je 2015. godine od strane Dentilea i saradnika imao je za cilj da predvidi kada će pacijenti koji se nalaze u ranom kliničkom stadijumu postati kandidati

za specifično hematološko lečenje. Razvojna kohorta je bila sastavljena od 480 pacijenata u kojoj su testirani brojni standardni klinički, biohumoralni i genetički markeri, i u multivarijabilnoj analizi identifikovana su 4 faktora: Rai stadijum, apsolutni broj limfocita, nivo serumskog $\beta 2m$ i mutacioni status *IGHV*, na osnovu kojih su pacijenti stratifikovani u 3 grupe rizika sa različitom verovatnoćom da ne budu lečeni nakon tri godine praćenja: 95,3% za nizak, 74,5% za srednji i 28,6% za visok rizik (37).

CLL-IPI

Problemu prognoze kliničkog toka hronične limfocitne leukemije do sada je najpsežniji pristup imala međunarodna kooperativna grupa eksperata iz ove oblasti, koja je sprovela istraživanje u vidu meta-analize koje je obuhvatilo 3472 pacijenta sa HLL-om iz devet kliničkih studija sprovedenih u Francuskoj, Nemačkoj, Poljskoj, Velikoj Britaniji i Sjedinjenim Američkim Državama (38). Analizirano je 27 prognostičkih faktora, od kojih je multivarijantnom analizom potvrđen nezavisan nepovoljan prognostički značaj 5 biomarkera: starost > 65 godina, stadijum (Rai \geq I ili Binet \geq B), $\beta 2m > 3.5\text{mg/L}$, nemutiran *IGHV* i aberantan *TP53* (prisustvo del17p i/ili mutacije *TP53*), i konstruisan je prognostički model, nazvan Internacionalni prognostički indeks za hroničnu limfocitnu leukemiju (*The International Prognostic Index for CLL*, CLL-IPI). Na osnovu vrednosti skora diferencirane su grupa niskog, srednjeg, visokog i vrlo visokog rizika u kojima je verovatnoća preživljavanja na petogodišnjem nivou, redom, 93.2%, 79.3%, 63.3% i 23.3%, a na desetogodišnjem 71.0%, 39.2%, 21.9% i 3.5%. Navedeni rezultati iz razvojne kohorte potvrđeni su u internoj validacionoj kohorti, kao i u eksternim kohortama pacijenata “MAYO” sa Mejo klinike i “SCAN” skandinavske kooperativne grupe. Takođe, CLL-IPI je ispitan i na kohorti pacijenata u ranom stadijumu pokazavši snagu i u pogledu predviđanja TTFT. Prognostički značaj CLL-IPI skora je potvrđen u različitim validacionim studijama, kako u pogledu predikcije ukupnog preživljavanja, tako i vremena do prve terapije (76-79).

Molekularno-genetički prognostički modeli

Kao što smo već naveli, neki autori su posmatrali izdvojeno molekularno-genetičke, odnosno markere biologije bolesti i njihov izolovan uticaj na preživljavanje pacijenata sa HLL-om. Rosi sa saradnicima je opisao različite grupe rizika na osnovu citogenetičkog profila određenog FISH metodom i prisustva novih mutacija *NOTCH1*, *SF3B1* i *BIRC3* gena, dok je španska grupa autora na čelu sa Delgadam osmislila prognostički model Barcelona-Brno samo biomarkeri (*Barcelona-Brno biomarkers-only score*) koji zahteva samo podatak o prisustvu/odsustvu del11q i del17p, kao i o *IGHV* mutacionom status (62, 76).

1.5 LEČENJE

Lečenje bolesnika sa HLL-om značajno je evoluiralo tokom vremena. Nakon dugotrajnog oslanjanja na alkilirajuće agense (hlorambucil), veliki preokret u lečenju bolesnika sa hroničnom limfocitnom leukemijom donelo je uvođenje purinskih analoga, odnosno fludarabina, u terapiju ovih bolesnika, kako u vidu monoterapije, tako i u kombinaciji, najčešće sa ciklofosfamidom (80). Imajući to u vidu, krajem XX i početkom XXI veka standard lečenja bolesnika sa HLL-om postaje kombinacija fludarabina i ciklofosfamida (FC) koja značajno povećava stope ukupnog odgovora na terapiju na preko 90% od čega preko 40% bolesnika postiže kompletnu remisiju, međutim, uz komplikacije u vidu značajne mijelosupresije i infekcija (81, 82). Tokom prve decenije XXI veka ovoj kombinaciji citostatika se pridružuje i anti-CD20 monoklonsko antitelo rituksimab u okviru protokola RFC kojim se leče bolesnici u dobrom opštem stanju i bez značajnijih komorbiditeta (64). Od tada je u ovoj oblasti bilo mnogo noviteta u pogledu lečenja (nove generacije anti-CD20 lekova, inhibitori signalnog puta B-ćelijskog receptora i inhibitori BCL2), ali za bolesnike mlađe od 65-70 godina, u dobrom opštem stanju, bez značajnih pridruženih bolesti i bez afekcije *TP53*, terapija izbora ostaje kombinacija zasnovana na fludarabinu, ciklofosfamidu i rituksimabu (83-85).

1.6 PREDIKTIVNI BIOMARKERI

Kao što smo videli, postoji veliki broj prognostičkih markera i kombinovanih prognostičkih modela. Međutim, ukoliko se radi o striktno prognostičkim markerima, prema datoj definiciji, pomoću njih možemo da procenimo preživljavanje bez terapije, ukupno preživljavanje i rizik od transformacije, nezavisno od modaliteta lečenja koji se primenjuje. Dakle, upotrebljivost ovakvih markera je ograničena u praksi, s obzirom da nam oni pomažu u odluci koliko često da pratimo pacijente koji su u mirnoj fazi bolesti, kao i o eventualnom uključivanju visokorizičnih pacijenata u rane intervencione studije, ali nam ne daju informacije na osnovu kojih bi mogli da se odlučimo koju terapiju da primenimo u konkretnom slučaju (31). Ovu vrstu informacije nam obezbeđuju prediktivni biomarkeri. Oni predstavljaju varijable na osnovu kojih je moguće predvideti odgovor na tačno definisane terapijske modalitete. Za definisanje prediktivne vrednosti neke varijable i njeno uvođenje u algoritam terapijskog odlučivanja, potrebna je njena validacija kroz randomizovane prospektivne studije. Prediktivna vrednost ovakve varijable određuje se na bazi statističke analize. Sa druge strane postoje prediktivni biomarkeri koji su bazirani na biološkoj ulozi same varijable. Primer za ovu vrstu prediktivnog biomarkera je rearanžman bcr-abl u hroničnoj granulocitnoj leukemiji ili akutnoj limfoblastnoj leukemiji. Ukoliko se detektuje njegovo prisustvo u malignim ćelijama moguće je direktno farmakološki targetirati ovaj biomarker (inhibitorom tirozin-kinaze) i dobiti željeni terapijski odgovor (31). Nažalost, primer ovakvog markera nemamo u HLL-u, te se za sada ograničavamo na prediktivne faktore koji su proizvod statističke analize.

Prediktivni markeri u hroničnoj limfocitnoj leukemiji mogu biti vezani za pacijenta, za biologiju bolesti i za terapiju. U ovom trenutku jedini validiran prediktivni biomarker koji ključno utiče na izbor modaliteta lečenja u hroničnoj limfocitnoj leukemiji je status gena *TP53* (70). Rezultati najnovijih studija pokazuju da bi se u algoritmu donošenja terapijskih odluka mogao naći i *IGHV* mutacioni status (86). Ostali biomarkeri koji slove za prediktivne, uglavnom odražavaju opšte stanje i biološku rezervu pacijenta i utiču na odluku o intezitetu lečenja, pre nego o vrsti terapije koja će se primeniti (87). Jedan vid prediktivnog faktora je i kvalitet, odnosno trajanje odgovora

na prethodnu liniju terapije što je važna informacija na osnovu koje se, između ostalog, donosi odluka o načinu lečenja u relapsu bolesti (85).

1.6.1 TP53

Opšti podaci o *TP53* genu već su izneseni u odeljku o prognostičkim faktorima. Medijana preživljavanja pacijenata sa nefunkcionalnim *TP53* u eri (imuno)hemioterapije iznosi između 2 i 3 godine, što je posledica rezistencije na navedeni modalitet lečenja (88, 89). Razlog refraktarnosti ovih pacijenata na standardnu hemioterapiju purinskim analogima i alkilirajućim agensima leži u činjenici da ovi citostatici svoje genotoksično dejstvo ispoljavaju preko p53 signalnog puta (68). Imajući ovo u vidu, status *TP53* je identifikovan kao najznačajniji prediktivni marker na osnovu koga se planira lečenje. Stoga bi određivanje statusa *TP53* (detekcija mutacija i del17p) prema svim važećim preporukama trebalo obavezno da se radi pre započinjanja svake runde terapije (9). Pacijenti sa nefunkcionalnim *TP53* nisu kandidati za imunohemioterapiju, već se u prvoj liniji leče novim ciljanim lekovima, kao što su inhibitori signalnog puta B-ćelijskog receptora (BCR), ibrutinib i idelalisib, i BCL2 inhibitor, venetoklaks (90). Ovi lekovi su donekle prevazišli nepovoljni uticaj delecije/mutacije *TP53* na odgovor na terapiju (91-93).

1.6.2 Prediktivni značaj *IGHV* mutacionog statusa

O *IGHV* mutacionom statusu i njegovom prognostičkom značaju već je bilo reči u odeljku o prognostičkim biomarkerima. U poslednje vreme sve je više dokaza da *IGHV* mutacioni status može biti važan marker odgovora na specifično hematološko lečenje. Iako je u registracionim studijama jasno pokazano da N-HLL pacijenti imaju značajno bolji odgovor na RFC u odnosu na FC, nakon dugogodišnjeg praćenja zaključeno je da su praktično svi pacijenti koji imaju nemutirani *IGHV* osuđeni na relaps bolesti u nekom trenutku. Nasuprot njima, M-HLL slučajevi u odsustvu visokorizičnih citogenetskih abnormalnosti dostižu plato na krivoj preživljavanja, što implicira mogućnost dugotrajne kontrole bolesti, čak do njene eradikacije (73, 74, 94). Sa druge strane, u studiji sa petogodišnjim praćenjem pokazano je da se nepovoljan

prediktivni značaj nemutiranog *IGHV* statusa prevazilazi primenom ibrutiniba (95). Na osnovu navedenih rezultata pojedini autori preporučuju da se kod N-HLL pacijenata u prvoj liniji primenjuju novi ciljani lekovi (31). U svim aktuelnim međunarodnim preporukama savetuje se određivanje *IGHV* mutacionog statusa u periodu od dijagnoze do prve terapije, s obzirom na njegov krucijalni prediktivni i prognostički značaj (9, 96).

1.6.3 Uloga kliničkih biomarkera u izboru terapije

Klinički biomarkeri, kao što su starosna dob, opterećenje komorbiditetima i stanje bubrežne funkcije odražavaju biološki potencijal pacijenta i time, njegov kapacitet za tolerisanje određene vrste terapije. Tako ćemo kod pacijenata sa intaktnim *TP53* koji su stariji od 65 godina i/ili imaju visok komorbiditetni indeks i/ili snižen klirens kreatinina radije primeniti imunohemioterapiju sa povoljnijim bezbednosnim profilom (rituksimab-bendamustin ili kombinacija anti-CD20 antitela sa hlorambucilom) u odnosu na mlađe, prethodno zdrave pacijente sa očuvanom bubrežnom funkcijom koji su kandidati za intenzivno lečenje (kombinacije zasnovane na fludarabinu). Krajnji cilj je smanjenje učestalosti neželjenih efekata, u prvom redu mijelosupresije i infekcija, koji bi značajno kompromitovali lečenje (87, 97, 98).

1.6.4 Prethodna terapija kao prediktivni marker

Postoji populacija pacijenata koji imaju funkcionalan *TP53* pa ipak njihov odgovor na imunohemioterapiju nije adekvatan, što je takođe važan podatak u odlučivanju o njihovom daljem lečenju i implicira prediktivnu vrednost same činjenice da terapijski odgovor nije bio adekvatan. Prema aktuelnim međunarodnim smernicama, pacijenti koji su refraktorni na imunohemioterapiju ili su relapsirali u okviru 2-3 godine nakon njene primene, u relapsu bolesti treba da se leče novim ciljanim lekovima (inhibitori BCR signalnog puta ili BCL2 antagonisti) (85).

1.7 POTRAGA ZA NOVIM PREDIKTIVNIM BIOMARKERIMA: FARMAKOGENOMIKA I NJEN ZNAČAJ U HRONIČNOJ LIMFOCITNOJ LEUKEMIJI

1.7.1 Značaj farmakogenomike

Farmakogenomika je oblast koja se bavi identifikovanjem promena u genomu koje utiču na farmakološke efekte lekova. Ove promene se mogu ispoljiti bilo putem farmakokinetike, odnosno procesa apsorpcije, distribucije, metabolizma i eliminacije leka, ili preko njegove farmakodinamike, što podrazumeva alteraciju ciljnih molekula ili biološkog puta preko kojih inkriminisan lek ispoljava svoje farmakološko dejstvo (99). Jedan od najstarijih primera koji oslikava važnost farmakogenomike vodi poreklo iz 510. godine pre Nove ere kada je Pitagora zabeležio da postoje osobe koje nakon ingestije boba mogu umreti od poremećaja za koji se mnogo kasnije saznalo da predstavlja fatalnu hemolitičku anemiju usled urođenog nedostatka enzima glukozo-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD) (favizam). Ovakav sled događaja kod G6PD deficijentnih osoba dokazan je i u slučaju uzimanja određenih lekova, kao što su razburikaza ili antimalarik primakin (100). Kod osoba sa malignitetom, poremećaj u očekivanom efektu leka može biti posledica kako aberantne ekspresije, tako i postojanja germinativnih ili somatskih mutacija u farmakogenima. S obzirom da je farmakogenomika relativno mlada naučna oblast, nije iznenađujuće da za tek 7% svih lekova koji su u upotrebi postoje informacije o farmakogenetici koja utiče na njihovo farmakološko dejstvo, na osnovu kojih je moguće promeniti način lečenja i izbeći komplikacije i/ili nedostatak efekta (101). Nedavno otkriće i sve šira upotreba metoda ispitivanja celog genoma ubrzala je put ka većem uticaju farmakogenomike na konkretne odluke o lečenju kako maligniteta, tako i infektivnih i drugih oboljenja (99).

1.7.2 Farmakogenomika u hroničnoj limfocitnoj leukemiji

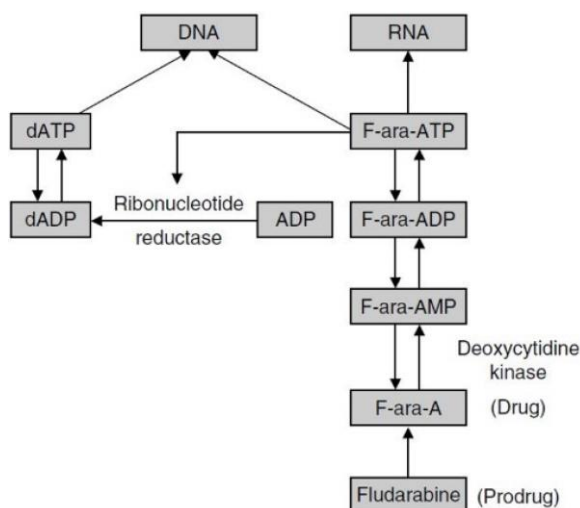
Značaj farmakogenomike za lečenje pacijenata sa hroničnom limfocitnom leukemijom do danas nije dovoljno ispitan. Najdetaljnije je opisana uloga aberantnog *TP53* gena, za koji je jasno utvrđeno da značajno smanjuje šansu za postizanje odgovora

na (imuno)hemioterapiju, naročito onu zasnovanu na purinskim analogima (70). Ovakav efekat nefunkcionalnog *TP53* objašnjen je činjenicom da standardni hemioterapeutici svoje dejstvo ispoljavaju indukcijom apoptoze u leukemijskim ćelijama preko p53 signalnog puta (102). Međutim, ovaj mehanizam je vezan za osobine same tumorske ćelije koja je prirodno u fokusu ispitivanja, dok su informacije o genima koji kodiraju proteine od kojih zavisi farmakokinetika i farmakodinamika anti-HLL agenasa oskudne. Farmakogenetika naročito postaje zanimljiva kada imamo na umu da postoji jedan broj pacijenata sa intaktnim *TP53* koji ne reaguju na standardnu (imuno)hemioterapiju, a nema čvrstih dokaza i utvrđenih uzročno-posledičnih veza između prisustva drugih nepovoljnih molekularno-genetičkih karakteristika tumorskih ćelija i odgovora na navedeni tip lečenja (102). S obzirom da protokol RFC predstavlja praktično sinonim za imunoheemioterapiju u hroničnoj limfocitnoj leukemiji, u fokusu malobrojnih istraživanja o uticaju farmakogenetike na lečenje HLL-a su upravo konstituenti RFC protokola: fludarabin, ciklofosfamid i, u manjoj meri, rituksimab (103).

1.7.3 Fludarabin: mehanizam dejstva i uticaj farmakogenetike na ishod lečenja

Fludarabin je analog adenzozina i ispoljava svoj citotoksični efekat preko svog 5' trifosfatnog metabolita koji nastaje nizom defosforilacija i fosforilacija, pri čemu je ključna reakcija prevođenje prethodno defosforilisanog fludarabina (F-ara-A) u 5'-monofosfat pomoću enzima deoksicitidin kinaza (dCK) po ulasku u ćeliju (Slika 3) (104). Fludarabin deluje kako na ćelije koje se dele, tako i na one u stanju mirovanja (G0 faza ćelijskog ciklusa). U prvom slučaju fludarabin ispoljava svoj efekat putem kompetitivne ugradnje u rastući lanac dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) tokom procesa njene replikacije, dovodeći do terminacije lanca i programirane ćelijske smrti. Takođe, on inhibira enzim ribonukleotid reduktazu (RR), onemogućavajući tako pretvaranje ribonukleotid difosfata (NDP) u dezoksiribonukleotid difosfat (dNDP) (Slika 3). Time se smanjuje pul dezoksinukleotid trifosfata (dNTP), osnovnog gradivnog elementa DNK, i favorizuje ugrađivanje F-ara-ATP u nosintetišuću DNK, što opet dovodi do prekida u elongaciji lanca i apoptoze. U slučaju kada su ćelije u mirnoj fazi ćelijskog ciklusa (G0), fludarabin svoj citotoksični efekat ispoljava tokom

procesa reparacije DNK, kao i inhibicijom transkripcije i sinteze informacione ribonukleinske kiseline (iRNK). Ovo je verovatno ključni mehanizam citotoksičnog dejstva fludarabina u indolentnim limfoproliferativnim oboljenjima kao što je HLL (104).



Slika 3. Shematski prikaz metabolizma fludarabina (preuzeto i adaptirano iz Gandi i Planket, *Clinical Pharmacokinetics* 2002)

Dakle, da bi fludarabin ispoljio svoje citotoksično dejstvo, potrebno je da njegov aktivni, trifosfatni oblik, bude prisutan u ćeliji u dovoljnoj koncentraciji, što podrazumeva da svi činioci uključeni u lanac produkcije F-ara-ATP, kao finalnog, kompetitivnog oblika fludarabina, budu intaktni i u ekvilibrijumu. U prisustvu funkcionalnog *TP53*, jedan od predloženih mehanizama rezistencije na fludarabin je njegova smanjena intracelularna akumulacija (105). S obzirom da je fludarabin hidrofilni molekul, on ne može ući u ćeliju procesom proste difuzije, već za to zahteva aktivan transport posredstvom funkcionalnih nukleozidnih transportera (106).

Poznate su dve vrste transportera preko kojih se vrši transport purinskih i pirimidinskih derivata kroz plazmamembranu, a to su humani ekvilibrativni nukleozidni transporteri (hENT) i humani koncentrativni nukleozidni transporteri (hCNT) (106).

hENT

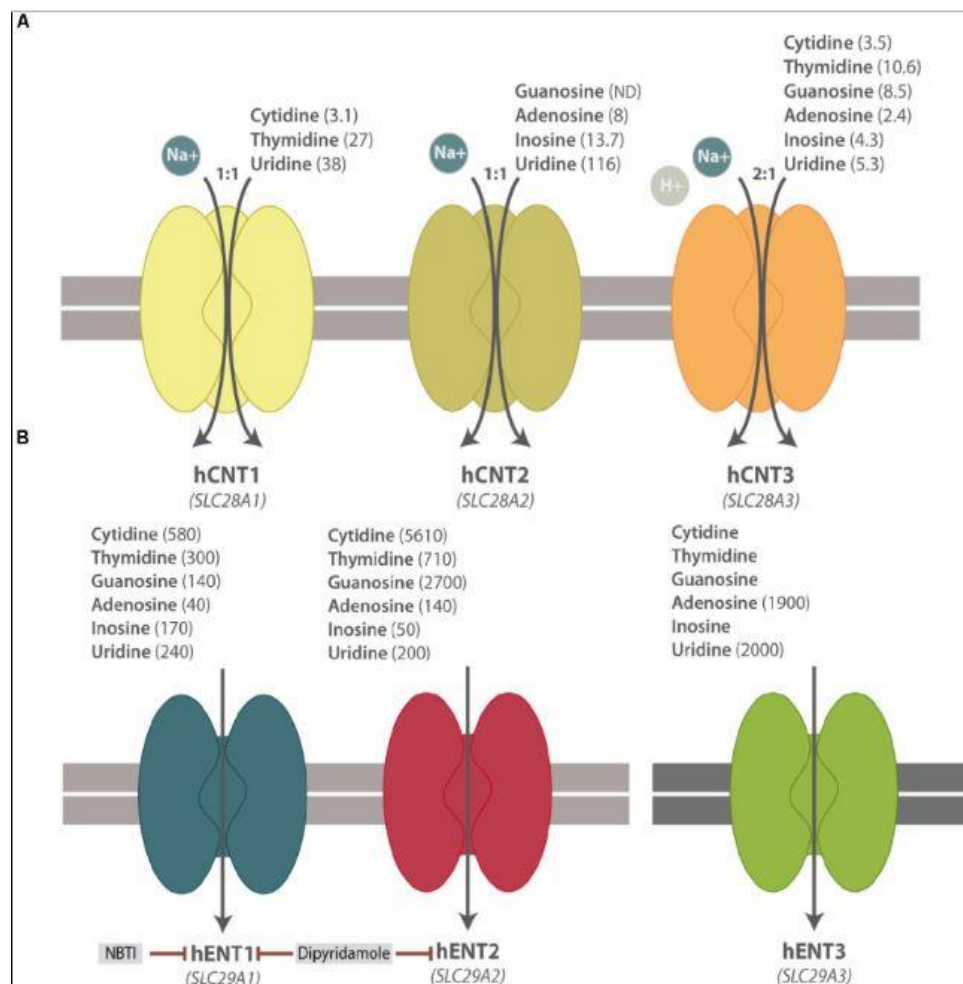
Humani ekvilibrativni nukleozidni transporteri (hENT) su kodirani od strane genske familije *SLC29A* (*solute carrier 29A*), i do sada su identifikovana četiri hENT

molekula (hENT1, hENT2, hENT3 i hENT4) kodiranih genima *SLC29A1*, *SLC29A2*, *SLC29A3* i *SLC29A4* (107). Zna se da su hENT1 i hENT2 ubikvitarni u tkivima sisara, te da imaju sličan supstratni spektar purinskih i pirimidinskih nukleozida, s tim da hENT2 ima sposobnost da transportuje i nukleobaze kroz plazmamembranu (Slika 4). hENT2 je naročito prisutan u skeletnim mišićima, dok oba transportera (hENT 1 i 2) u polarizovanim ćelijama kao što su enterociti sa pozicije bazolateralnog dela plazmamembrane igraju važnu ulogu u transepitelijalnom nukleozidnom transportu, u saradnji sa koncentrativnim transporterima koji su smešteni na suprotnom polu ovih ćelija (107, 108). Osim u transportu nukleozida i nukleobaza u svrhu sinteze nukleinskih kiselina, hENT učestvuju i u transportu nukleozidnih analoga koji se koriste u lečenju velikog broja maligniteta i virusnih infekcija (109). Takođe, važnu ulogu imaju u regulisanju koncentracije adenozina, važnog za kontrolu koronarnog protoka, rada sinoatrijalnog čvora, u procesima neurotransmisije i brojnim drugim funkcijama u organizmu (110, 111).

hCNT

Humani koncentrativni nukleozidni transporteri (hCNT) su proteini kodirani članovima genske familije *SLC28A* (*solute carrier 28A*). Do danas su identifikovani hCNT1 (kodiran genom *SLC28A1*), hCNT2 (kodiran genom *SLC28A2*) i hCNT3 (kodiran genom *SLC28A3*) (108). hCNT1 je prisutan uglavnom u epitelnim ćelijama tankog creva, jetre i bubrega, dok hCNT2 i hCNT3 imaju širu distribuciju, pa se osim u epitelnim ćelijama nalaze i u srcu, mozgu, placenti, pankreasu, skeletnim mišićima i debelom crevu (hCNT2), odnosno u pankrasu, traheji, koštanoj srži i mlečnim žlezdama i, u manjoj meri, u drugim tkivima (hCNT3) (112). hCNT1 ima afinitet pretežno ka pirimidinskim nukleozidima i adenzinu, hCNT2 prema purinskim derivatima i uridinu, dok hCNT3 pokriva obe grupe nukleozidnih derivata (Slika 4) (112). Pored prirodnih nukleozida, hCNT1 i 2 imaju ulogu transporta antivirusnih nukleozidnih analoga, vrlo retko antikancerskih lekova. Sa druge strane, glavni transporter za antineoplastične nukleozidne analoge je upravo hCNT3, koji sa visokim afinitetom učestvuje u prenosu citostatika poput kladribina, gemcitabina, fluorodeoksiuridina, 5-fluorouridina, fludarabina i zebularina (113). Manjim kapacitetom ovaj transporter može da učestvuje i

u kinetici antivirusnih nukleozidnih analoga (113). hCNT3 svoju funkciju obavlja kao aktivni transporter zavisan od natrijuma, pri čemu za prenos jednog nukleozidnog molekula u ćeliju, hCNT3 koristi energiju dobijenu influsom dva natrijumska katjona (114).



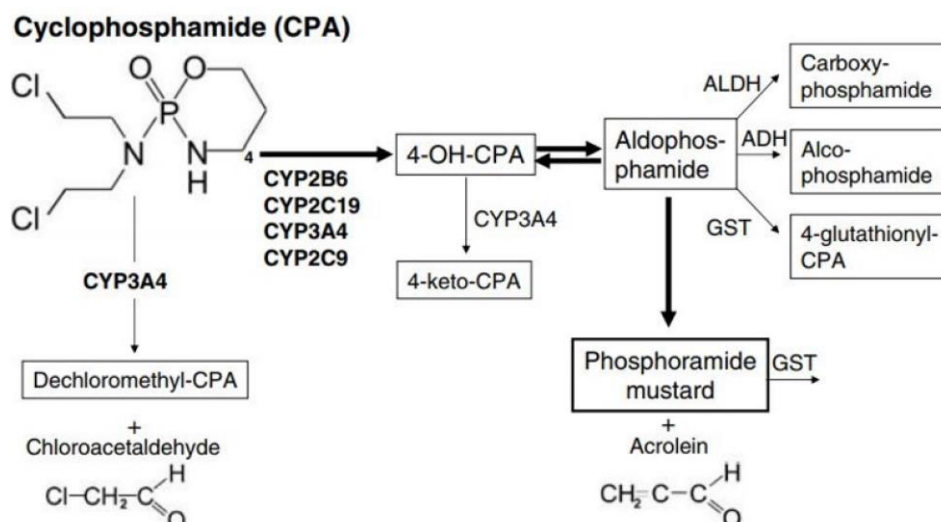
Slika 4. Humani koncentrativni nukleozidni transporteri (hCNT1-3) (A) i humani ekvilibrativni nukleozidni transporteri (hENT1-3) (B) i spektri prirodnih nukleozida koje prenose (Preuzeto iz Pastor-Anglada i Perez-Toras, *Frontiers in Pharmacology* 2018)

U transportu fludarabina glavnu ulogu igraju hENT1, hENT2 i hCNT3. S obzirom da aberantna ekspresija i/ili aktivnost proteina koji učestvuju u intracelularnoj akumulaciji i metabolizmu fludarabina može dovesti do njegovog nedovoljnog unosa i aktivacije, Meki i saradnici su sprovedli istraživanje sa ciljem da se utvrdi da li to može

uticati na ishod lečenja (105). U navedenoj studiji je meren nivo ekspresije 7 gena koji kodiraju proteine uključene u ove procese, i to: nukleozidne transportere hENT1, hENT2 i hCNT3; 5'-nukleotidaze dNT1, CN-II i CD73, kao i deoksicitidin-kinazu (dCK). Utvrđeno je da kod bolesnika sa HLL-om koji su tretirani monoterapijom fludarabinom povećana ekspresija gena koji kodira hCNT3 (*SLC28A3*) značajno korelira sa slabijim odgovorom na terapiju, odnosno da je stopa potpunih remisija kod ovih bolesnika značajno manja (105).

1.7.4 Ciklofosfamid: mehanizam dejstva i uticaj farmakogenetike na ishod lečenja

Ciklofosfamid je alkilirajući agens koji se nepunih 60 godina koristi u lečenju maligniteta. Odobren je u ovu svrhu davne 1959. godine od strane Američke agencije za hranu i lekove kao osmi antikancerski lek u to vreme. Citotoksični efekat, zapravo, ispoljavaju njegovi aktivni metaboliti, u prvom redu fosforamid mustard. Prethodno se u jetri, posredstvom enzimskog sistema citohroma P450, vrši hidroksilacija ciklofosfamida u 4-hidroksiciklofosfamid koji je u ekvilibrijumu sa svojim tautomerom aldofosfamidom. Aldofosfamid se metaboliše u dva pravca: prvi je oksidacija u karboksifosfamid putem aldehidne dehidrogenaze (ALDH), a drugi dekompozicija na fosforamid mustard, koji je glavni aktivni metabolit, i akrolein (Slika 5) (115). Visok nivo ALDH u ćeliji dovodi do povećanog stvaranja neaktivnog karboksifosfamida i smanjenja koncentracije aktivnih metabolita ciklofosfamida u ćelijama, što smanjuje njegov citotoksični efekat.



Slika 5. Shematski prikaz metabolizma ciklofosfamida (preuzeto i adaptirano iz Antona i Sundberg, *Oncogene* 2006)

Poznato je da se visok nivo ovog enzima nalazi u hematopoeznim matičnim ćelijama, dok je u zrelih progenitorima hematopoeze i svim subsetovima limfocita njegov nivo nizak. To je razlog što ni kod primene visokih doza ciklofosfamida nikada ne dolazi do ireverzibilne aplazije koštane srži, dok su leukopenija i trombocitopenija uobičajeni neželjeni efekti ove terapije (115, 116). Sa druge strane, time se objašnjava terapijski efekat ciklofosfamida na limfoproliferativne bolesti. Mehanizam delovanja ciklofosfamida zasniva se na stvaranju veza njegovog aktivnog metabolita sa guaninskim reziduama unutar i između lanaca DNK, što kompromituje njenu replikaciju i utiče na pokretanje programirane ćelijske smrti (115).

Citohrom P450

Kao što je prethodno rečeno, konverzija ciklofosfamida u 4-hidroksiciklofosfamid posredstvom enzima citohrom P450 u jetri je primarni korak u aktivaciji ovog agensa. Radi šire slike, potrebno je napomenuti da citohromi P450 (CYP) predstavljaju superfamiliju enzima koji su pretežno smešteni u glatkom endoplazmatskom retikulumu hepatocita i epitela tankog creva, i imaju funkciju

katalizatora oksidacije u metabolizmu različitih endogenih i egzogenih supstanci (117, 118). Od skoro 60 funkcionalnih humanih CYP enzima, tek nešto više od desetak, koji pripadaju familijama CYP1, 2 i 3, odgovorni su za biotransformaciju ksenobiotika, uključujući i 70-80% svih lekova u kliničkoj upotrebi. Ekspresija svakog CYP-a uslovljena je jedinstvenom kombinacijom različitih mehanizama i faktora, od kojih su najznačajniji genetički polimorfizmi i indukcija od strane ksenobiotika. Multialelni genetički polimorfizmi, čije prisustvo zavisi od etničke i rasne pripadnosti, igraju značajnu ulogu u funkciji CYP enzima 2D6, 2C19, 2C9, 2B6, 3A5 i 2A6, određujući njihov fenotip koji determiniše brzinu metabolisanja supstrata (117). Utvrđeno je da visoko-polimorfni geni za CYP sa svojim varijantama značajno utiču na rizik za nastanak određenih malignih bolesti, a da kod nekih igraju važnu ulogu u njihovom lečenju (118).

CYP2B6

U procesu aktivacije ciklofosfamida učestvuje nekoliko izoformi CYP od kojih najvažniju ulogu ima CYP2B6 (119). Gen *CYP2B6* je visoko polimorfan i do danas je identifikovano preko 100 polimorfizama nukleotidne sekvence (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) i više od 38 alela (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2B6>). Većina varijantnih alela je veoma retka, sa izuzetkom alela *CYP2B6**6 čija frekvencija se kreće od 25% kod belaca do čak 60% kod Azijata (120). *CYP2B6**6 alel je definisan prisustvom 2 SNP, c.516G>T u egzonu 4 (Q172H; rs3745274) i c.785A>G u egzonu 5 (K262R; rs2279343). Pokazano je da je *CYP2B6**6 povezan sa smanjenom *in vitro* i *in vivo* ekspresijom u odnosu na *wild-type* *CYP2B6**1. Pored toga, pokazano je i da c.516G>T varijanta utiče na “splajsing” pre-iRNK, dovodeći do smanjenja nivoa *CYP2B6* proteina za 50-75% (121-124). Studije *in vitro* i *in vivo* su takođe pokazale da amino-kiselinske zamene Q172H i K262R menjaju katalitičku aktivnost *CYP2B6* u zavisnosti od primenjenog leka, kao i da je *6 alel povezan sa višom stopom 4-hidroksilacije ciklofosfamida (125-128). Stoga, postoji dilema da li na citotoksični efekat ciklofosfamida značajnije utiče snižena ekspresija *CYP2B6**6 ili njegova povišena enzimska aktivnost. U studiji Džonsona i saradnika je pokazano da su HLL pacijenti lečeni FC protokolom slabije odgovarali na terapiju ukoliko su bili nosioci

makar jednog *6 alela, čime je on označen kao nezavisan prediktivni marker ishoda lečenja (129). Ne postoje literaturni podaci da se ovom temom bavio još neko pored navedenih autora.

Osim uticaja na metabolizam ciklofosfamida, ovaj i drugi aleli *CYP2B6* gena učestvuju i u metabolisanju drugih lekova, kao što su inhibitor reverzne transkriptaze efavirenz, artemisinin, bupropion, ketamin i metadon te, shodno tome, teoretski mogu da utiču na tok lečenja različitih bolesti (120).

2 CILJEVI

1. Analiza povezanosti prisustva varijantnog alela *CYP2B6**6 sa odgovorom na terapiju FC, preživljavanjem bez progresije i ukupnim preživljavanjem.
2. Analiza povezanosti nivoa ekspresije gena *SLC28A3* sa odgovorom na terapiju FC, preživljavanjem bez progresije i ukupnim preživljavanjem.
3. Analiza povezanosti nivoa ekspresije gena *SLC28A3* sa rizikom od nastanka autoimune hemolizne anemije nakon započinjanja lečenja fludarabinom i ciklofosamidom.
4. Analiza povezanosti nivoa ekspresije gena *SLC28A3* sa rizikom od nastanka Rihterovog sindroma nakon započinjanja lečenja fludarabinom i ciklofosamidom.
5. Analiza prognostičke vrednosti skorova CLL-IPI, PRS i MDACC 2011 u pogledu vremena do prve terapije i ukupnog preživljavanja.
6. Analiza prediktivne vrednosti prognostičkih modela CLL-IPI, PRS i MDACC 2011 u pogledu odgovora na terapiju i preživljavanja bez progresije nakon prve terapijske linije.
7. Analiza povezanosti nivoa rizika prema prognostičkim modelima CLL-IPI, PRS i MDACC 2011 i nivoa ekspresije gena *SLC28A3*.

3 METODOLOGIJA

3.1 PACIJENTI

3.1.1 Dijagnoza

Dijagnoza hronične limfocitne leukemije postavljena je na osnovu kriterijuma radne grupe Nacionalnog instituta za kancer iz Betezde, Merilend, Sjedinjene Američke Države (*National Cancer Institute Working Group*, NCI-WG) i vodiča Međunarodne radne grupe za HLL (*International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia*, IwCCL) iz 2008. godine. Pacijenti su imali tipični imunofenotip sa HLL (Matutes/Moro) skorom ≥ 4 , manje od 55% prolimfocita ili prolimfocit-like ćelija u razmazu periferne krvi (10, 130). Izuzetak od navedenih kriterijuma su bila dva pacijenta koji su ispoljili sliku limfoma malih ćelija (*small lymphocytic lymphoma*, SLL), s obzirom da su imali manje od 5000 limfocita po μL krvi, dok je jedan od ova dva pacijenta na protočnoj citometriji imao HLL skor 3 (12, 13). Analizirani uzorci svih pacijenata u studiji skupljani su tokom perioda od dijagnoze do primene FC.

3.1.2 Osnovna kohorta

Kohorta koja je bila predmet ispitivanja uticaja prognostičkih modela na TTFT, PFS i OS sadržala je 57 pacijenata sa hroničnom limfocitnom leukemijom koji su dijagnostikovani, praćeni i lećeni na Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije, Beograd, Srbija, od 2003. do 2018 godine.

3.1.3 Kohorta za farmakogenetičku analizu

Za potrebe farmakogenetičke analize, odnosno analize uticaja nivoa ekspresije gena *SLC28A3* i prisustva alela *CYP2B6*6* na odgovor na terapiju FC, iz navedene, osnovne kohorte isključeno je 13 pacijenata. Jedanaest pacijenata je isključeno jer je

utvrđeno da imaju nefunkcionalan *TP53*, bilo kao posledicu mutacije ovog gena (9 pacijenata), bilo zbog detektovane del17p (3 pacijenta). Jedan od ovih pacijenata je imao obe abnormalnosti. Kod dva pacijenta nije mogao biti određen kvalitet odgovora nakon primene FC, s obzirom na razvoj hemolizne anemije, odnosno PRCA (*pure red cell aplasia*), neposredno po započinjanju lečenja, zbog čega je isto obustavljeno. Finalna kohorta za farmakogenomsku analizu brojala je 44 pacijenta.

3.1.4 Varijable

Kod svih pacijenata su pri postavljanju dijagnoze određivani:

1. Standardni demografski podaci: pol i starosna dob
2. Klinički parametri: broj zahvaćenih limfonodalnih regija, maksimalni promer cervikalnog limfnog čvora, procena veličine slezine i jetre u sklopu definisanja kliničkog stadijuma po Raiju i Bineu
3. Laboratorijski parametri: kompletna krvna slika sa apsolutnim brojem limfocita koji je određen analizom razmaza periferne krvi; nivo LDH i serumskog β 2m
4. Nivo ekspresije CD38 metodom protočne citometrije i procenat i tip infiltracije histopatološkom analizom bioptata koštane srži
5. Iz uzoraka periferne krvi koji su prospektivno skupljani tokom perioda od dijagoze do prve terapije određen je:
 - a. citogenetički profil FISH metodom kojom je određivano prisustvo del13q, trizomije 12, del11q i del17p
 - b. mutacioni status *TP53* gena
 - c. mutacioni status *IGHV* gena
 - d. nivo ekspresije gena *SLC28A3*, izražen relativnom ekspresijom iRNK *SLC28A3* u mononuklearnim ćelijama
 - e. analiza prisustva *CYP2B6**6 alela

Podaci o starosnoj dobi, kliničkom stadijumu po Raiju i Bineu, kompletna krvna slika sa apsolutnim brojem limfocita, nivo LDH i serumskog β 2m određeni su i neposredno pre početka terapije, kao i na dijagnozi.

Metode skupljanja uzoraka, izolacije materijala od interesa, protočne citometrije, FISH, PCR i sekvenciranje detaljno su opisani u daljem tekstu.

3.1.5 Etičke norme

Istraživanje je sprovedeno uz dozvolu Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i u skladu sa Helsinškom deklaracijom iz 1964. i njenim kasnijim amandmanima.

3.2 PROCENA ODGOVORA NA FC

Odgovor na lečenje je procenjen na osnovu kriterijuma NCI-WG i IwCLL 2008, koji definišu 4 vrste odgovora na terapiju: kompletna remisija (*complete response*, CR), parcijalna remisija (*partial response*, PR), stabilna bolest (*stable disease*, SD) i progresivna bolest (*progressive disease*, PD) (12, 13). Kompletna remisija je definisana kod pacijenata sa odsustvom klinički značajne limfadenopatije (>1,5cm) i organomegalije, normalizacijom krvne slike tako da bude >1500 neutrofilnih granulocita po μL krvi, <4000 limfocita (Ly) po μL , nivo Hb >110 g/L i >100000 trombocita (Tr) po μL , prisustvom <30% Ly u koštanoj srži bez B limfoidnih nodusa i odsustvom konstitucionalnih simptoma. Parcijalna remisija je podrazumevala smanjenje dimenzija limfnih čvorova, slezine i jetre za $\geq 50\%$ u odnosu na dimenzije pre početka lečenja ukoliko su bili klinički značajno uvećani, zatim broj neutrofilnih granulocita >1500/ μL ili porast za $\geq 50\%$ u odnosu na nivo pre lečenja, Ly <4000/ μL ili pad $\leq 50\%$ u odnosu na nivo pre započinjanja lečenja, Hb >110 g/L, Tr >100000/ μL , odnosno njihov porast $\geq 50\%$ u poređenju sa vrednostima pre lečenja, kao i infiltraciju koštane srži ćelijama HLL koja zauzima $\geq 30\%$ njene ćelijske populacije ili prisustvo B-limfoidnih nodulusa. Progresivna bolest definisana je nekim od sledećih parametara: uvećanje limfnog čvora, slezine ili jetre za $\geq 50\%$ u odnosu na dimenzije pre početka lečenja, $\geq 50\%$ uvećanje broja Ly (s tim da ALC bude >5000/ μL), pad nivoa Hb >2 g/L i/ili pad u broju Tr $\geq 50\%$ kao posledica infiltracije koštane srži. Stabilna bolest je podrazumevala odgovor koji je bio slabiji od PR i bolji od SD (13). Pacijenti kod kojih

je nakon primene FC protokola verifikovana SD ili PD označeni su kao FC-rezistentni, a pacijenti koji su postigli PR ili CR, FC-senzitivni.

3.3 PREŽIVLJAVANJE

Trajanje odgovora na terapiju definisano je preživljavanjem bez progresije (*progression-free survival*, PFS) koje je podrazumevalo vreme od započinjanja primene FC do PD, odnosno do smrti usled osnovne bolesti. Ukupno preživljavanje (*overall survival*, OS) mereno je kao vreme od postavljanja dijagnoze HLL do smrti iz bilo kog razloga, odnosno do poslednjeg kontakta sa pacijentom tokom praćenja. Vreme do prve terapije (*time to first treatment*, TTFT) mereno je od dijagoze do prve terapije (13).

3.4 ODREĐIVANJE LABORATORIJSKIH PARAMETARA

3.4.1 Krvna slika sa apsolutnim brojem limfocita

Merenje koncentracije hemoglobina i krvnih elemenata vrši se u Kaulterovom brojaču koji funkcioniše na principu merenja provodljivosti. U laboratoriji Klinke za hematologiju Kliničkog centra Srbije date su sledeće referentne vrednosti: hemoglobin (Hb): 120-170 g/L; leukociti (Le): $3.6-10 \times 10^9/L$; trombociti (Tr): $150-450 \times 10^9/L$ (131).

Procenat limfocita u leukocitarnoj formuli se određuje na sledeći način: napravi se krvni razmaz tako što se na predmetnom staklu kapljica venske ili kapilarne krvi razvuče brušenim staklom; potom se razmaz suši na vazduhu i boji Mej Grinvald Gimza tehnikom, nakon čega se broji 100 leukocita na 2-4 mesta od periferije prema sredini i opet prema periferiji i među njima određuje relativni i apsolutni broj limfocita (132).

3.4.2 Određivanje nivoa β 2 mikroglobulina

Nivo β 2m se meri turbidimetrijskom metodom. Uzorak seruma se pomeša sa lateks reagensom, nakon čega dolazi do aglutinacije obloženih lateks čestica. Step en aglutinacije je direktno proporcionalan koncentraciji β 2m u uzroku i određuje se metodom zasnovanom na promeni apsorpcije svetlosti. Referentne vrednosti iznose od 0.97-2.64 mg/l.

3.4.3 Određivanje koncentracije serumske laktat dehidrogenaze (LDH)

Koncentracija LDH se određuje standardnom fotometrijskom metodom po Monarhu Referentne vrednosti iznose od 220-460 U/L (133).

3.5 IMUNOFENOTIPIZACIJA PROTOČNOM CITOMETRIJOM

3.5.1 Ispitanici

Imunofenotipizacija metodom multiparametarske protočne citometrije (MPC) sprovedena je na uzorcima periferne krvi 57 novootkrivenih ispitanika sa dijagnozom HLL, pre primene hemioterapije. Kao kontrolne vrednosti, korišćene su laboratorijske referentne vrednosti, dobijene testiranjem populacije B-limfocita periferne krvi zdravih odraslih osoba (n=20) za obrasce ekspresije humanih leukocitnih antigena (Ag).

Uzorci ispitanika su prikupljeni i obrađivani prema standardnim preporukama i protokolima (134, 135). Limfocitne populacije i subpopulacije su analizirane u svežim uzorcima periferne krvi ispitanika, neposredno nakon uzimanja uzorka.

Obrađivani su nativni uzorci periferne krvi, koji su prikupljeni venepunkcijom u standardnim epruvetama sa antikoagulansom K_3 EDTA ili K_2 EDTA (BD Vacutainer, K_3 EDTA ili K_2 EDTA). Broj leukocita i diferencijalna formula u nativnim uzorcima periferne krvi su određivani na hematološkom brojaču (ABX Pentra DX₁₂₀). U slučaju kada je koncentracija ćelija bila u opsegu od $1-10 \times 10^6$ /ml, obeležavani su alikvoti od 100 μ l nerazblaženih uzoraka, a u slučaju kada je koncentracija uzorka bila $>10 \times 10^6$ /ml,

pravljena su razblaženja osnovnog uzorka sa medijumom (2% FCS/ 0.01% NaN₃/ PBS, pH 7.2), u koncentraciji od 10-20x10⁶/ml, i obeležavani su alikvoti koji su sadržavali 1x10⁶ ćelija.

3.5.2 Monoklonska antitela

Alikvoti uzoraka su obeležavani primenom komercijalnih monoklonskih antitela (MoAt), poreklom od miša sa specifičnošću za humane leukocitne Ag, organizovanih u standardni višekolorni panel (Tabela 2) (136-138). Većina MoAt, direktno konjugovanih jednom od četiri fluorescentne boje (FITC, PE, PerCP, APC), bila su proizvod firme Becton Dickinson Biosciences. Za detekciju Ag B-loze korišćena su sledeća MoAt: CD19-PerCP (klon SJ25C1), CD20-APC (klon L27), CD20-APC (klon L27), CD22-PE (klon S-HCL-1), CD23-PE (klon EBVCS-5), CD24-FITC (klon ML5), CD79b-PE (klon CB3.1), CD79b-APC (klon CB3.1), CD138-PE (klon MI15; klon DL-101), FMC7-FITC (klon FMC7). Detekcija membranskih lakih lanaca imunoglobulina (Ig) je vršena primenom MoAt: anti-Igλ-FITC (klon 1-155-2) i anti-Igκ-PE (klon TB 28-2). Za detekciju teških lanaca Ig su korišćena MoAt: anti-IgD-FITC (klon IA6-2), anti-IgM-PE (klon G20-127), anti-IgG-APC (klon G18-145), i poliklonsko antitelo anti-IgA-FITC. Za detekciju Ag T-limfoidne loze korišćena su sledeća MoAt: CD3-FITC (klon UCHT1), CD5-PE (klon UCHT2). Za detekciju linijski nespecifičnih Ag korišćena su sledeća MoAt: CD10-PE (klon HI10a), CD10-APC (klon HI10a), CD11c-PE (klon B-ly6), CD25-FITC (klon 2A3), CD38-APC (klon HIT2), CD43-FITC (klon 1G10), CD49d-APC (klon 9F10), CD123-APC (klon 7G3), CD138-PE (klon B-B4), CD200-PE (klon OX-104). Kao mera nespecifične reakcije MoAt i ćelija ispitivanog uzorka, korišćene su izotipske kontrole: msIgG1-FITC (klon X40), msIgG1-PE (klon X40), i msIgG1-APC (klon MOPC-21).

3.5.3 Metod višekolorne direktne imunofluorescencije

Primenjivan je metod višekolorne direktne imunofluorescencije na uzorcima MNC periferne krvi ili uzorcima pune periferne krvi (*Whole Blood Lyse Wash*, WBLyW) (134). Alikvoti uzoraka periferne krvi su obeležavani MoAt direktno

konjugovanim sa fluorohromom, prema standardnom četvorokolornom panelu za B-HLL/B-NHL (Tabela 2). Na dno epruveta su prvo sipana MoAt u optimalnoj količini i kombinaciji koja je predviđena panelom, a zatim je sipan alikvot od 100 μ l uzorka i 10 μ l pulovanog humanog AB seruma (Sigma), u cilju smanjenja nespecifičnog vezivanja MoAt za ćelije. Nakon mešanja na vorteksu, alikvoti su inkubirani 15min/20°C u mraku, a zatim su eritrociti lizirani primenom 2ml hipotoničnog rastvora amonijum hlorida, pH 7.2 u trajanju od 10min/20°C/ u mraku. Posle centrifugiranja na 260g/5min/20°C i odbacivanja supernatanta, talog ćelija je ispiran medijumom (2% FCS/ 0.01% NaN₃/ PBS, pH 7.2), centrifugiran na 260g/5min/20°C i fiksiran primenom komercijalnog rastvora na bazi formaldehida (BD CelFIX, BD Biosciences). Obeleženi alikvoti uzoraka su čuvani na +4°C do analize, najduže 24h.

3.5.4 Merenje i analiza uzoraka metodom multiparametarske protočne citometrije

Metodom MPC (BD FACSCalibur, Becton Dickinson) mereni su i analizirani fizički ćelijski parametri, relativna veličina (*Forward Light Scatter*, FLS) i ćelijska granulacija (*Side Scatter*, SSC), kao i fluorescentni signali (FL1 – FITC, FL2 – PE, FL3 – PerCP) koji odražavaju obrasce ekspresije leukocitnih Ag na populaciji leukemijskih ćelija (135). Ukupne B-ćelije u ispitivanom uzorku periferne krvi su selekcionisane u cilju precizne analize, na osnovu kombinacije svojstava, relativno male i slabo granularane ćelije sa ekspresijom CD19 Ag (FSC^{low}/SCC^{low}/CD19⁺). Merenje i analiza fluorescentnih signala reflektovanih ili emitovanih sa populacije B-ćelija vršena je primenom analitičkog softvera CELLQuestPro ver. 4.0.1. (Becton Dickinson). Rezultati su izražavani u relativnim vrednostima, kao procenat B-ćelija koje ekspresiraju dati Ag, a kriterijum prema kome je populacija B-ćelija definisana kao pozitivna za neki Ag, bilo je prisustvo proporcije od $\geq 30\%$ obeleženih ćelija za ispitivani Ag (134). Obrazac ekspresije Ag je definisan na osnovu pozicije pika fluorescentne emisije za dati Ag na logaritamskoj skali intenziteta (x osa) i apsolutnog broja ćelija (y osa): niska ekspresija Ag (Ag^{low}) – pozicija $10^0 - 10^2$; srednja ekspresija Ag (Ag^{medium}) – pozicija $10^1 - 10^3$; visoka ekspresija Ag - pozicija $10^2 - 10^4$.

Imunološka dijagnoza je postavljena na osnovu preporuka WHO (*World Health Organization*) (139), što je uključivalo primenu Skor sistema za diferencijalnu dijagnozu HLL u odnosu na B-NHL u leukemijskoj fazi (10, 130). Dijagnoza HLL je postavljena u slučaju visokih vrednosti Skora (4-5 poena).

Tabela 2. Standardni četvorokolorni panel MoAt za imunofenotipizaciju HLL/B-NHL

	FITC	PE	PerCP	APC
epruveta 1.	CD3	CD5	CD19	CD20
epruveta 2.	CD43	CD23	CD19	CD79b
epruveta 3.	FMC7	CD22	CD19	CD38
epruveta 4.	CD24	CD103	CD19	CD10
epruveta 5.	CD24	CD138	CD19	CD38
epruveta 6.	CD25	CD11c	CD19	CD123
epruveta 7.	mIgkappa	mIglambda	CD19	CD49d
epruveta 8.	mIgD	mIgM	CD19	CD20
epruveta 9.	mIgA	CD200	CD19	mIgG
epruveta 10.	msIgG1	msIgG1	CD19	msIgG1

Skraćenice: FITC, fluoresceinizotiocijanat; PE, fikoeritrin; PerCP, peridinhlorofil proteina; msIg, mišji Ig

3.6 IZOLACIJA MATERIJALA ZA ANALIZU

3.6.1 Izolacija DNK iz periferne krvi

Izolacija DNK iz periferne krvi je vršena pomoću QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) prema uputstvu proizvođača: na dno tube sipati 20 µl Qiagen proteaze, dodati 200 µl uzorka, i 200 µl pufera AL; smešu promešati vorteksovanjem i inkubirati u vodenom kupatilu 10 min na 56°C, kako bi se obezbedilo liziranje ćelija i oslobađanje DNK od proteina; nakon inkubacije smeši dodati 200 µl 96-100% etanola, promešati vorteksovanjem i ovako pripremljen uzorak naneti na QIAamp Mini spin kolonicu; kolonicu staviti u tubu i centrifugirati 1 min na 6000 g (8000 rpm) (vezivanje DNK za kolonicu); tubu sa filtratom odbaciti, kolonicu premestiti u novu tubu, naneti 500 µl

pufera AW1 i centrifugirati 1 min na 6000 g (8000 rpm) (ispiranje DNK vezane za kolonicu od nečistoća); tubu sa filtratom odbaciti, kolonicu premestiti u novu tubu, naneti 500 µl pufera AW2 i centrifugirati 3 min na 20000 g (14000 rpm) (ispiranje DNK vezane za kolonicu od nečistoća); kolonicu prebaciti u čistu tubu, dodati 200 µl pufera AE i inkubirati 1 min na sobnoj temperaturi; centrifugiranjem 1 min na 6000 g (8000 rpm) dobija se eluat u kome je rastvorena DNK.

Koncentracija i čistoća DNK određivane su merenjem na spektrofotometru. DNK je čuvana na -20°C do korišćenja.

3.6.2 Izolacija mononuklearnih ćelija iz periferne krvi

Mononuklearne ćelije su izolovane iz uzoraka periferne krvi centrifugiranjem na gradijentu gustine fikola (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare), prema uputstvu proizvođača: uzorak krvi razblažiti fiziološkim rastvorom u odnosu 1:1; na dno sterilne epruvete zapremine 10 ml sipati 3 ml Ficoll-Paque Plus, a zatim 4 ml razblaženog uzorka pažljivo naneti na površinu fikola, pazeći da se slojevi ne pomešaju; smešu centrifugirati 25 min na sobnoj temperaturi u kliničkoj centrifugi na 1500 rpm bez kočenja; nakon centrifugiranja, u novu sterilnu epruvetu pipetom prebaciti interfazu (*buffy coat*) koja sadrži mononuklearne ćelije; interfazu dva puta isprati 1 x PBS puferom pH=7.4 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄); nakon svakog ispiranja centrifugirati 15 min na 1500 rpm.

Dobijeni talozi mononuklearnih ćelija resuspendovani su u TRI Reagent (Invitrogen) i čuvani na -80°C do korišćenja.

3.6.3 Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija

Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija je vršena pomoću TRI Reagent (Invitrogen), prema uputstvu proizvođača: u 1 ml TRI Reagent resuspendovati maksimalno 1 x 10⁷ ćelija; ćelije lizirati provlačenjem kroz iglu promera 0.7 mm i liziran uzorak ostaviti da stoji na sobnoj temperaturi 5-10 min; dodati 200 µl hloroforma, snažno promućkati, a zatim uzorak ostaviti da stoji 5-15 min na sobnoj temperaturi; nakon centrifugiranja 15 min na 12000 rcf na +4°C pojavljuju se jasno

odvojene faze: gornja, vodena faza u kojoj se nalazi RNK, interfaza i donja, organska faza u kojoj se nalaze DNK i proteini; vodenu fazu prebaciti u novu tubu, dodati 0.5 ml izopropanola, promešati invertovanjem tube i ostaviti da stoji 10-15 min na sobnoj temperaturi (precipitacija RNK); nakon centrifugiranja 15 min na 12000 rcf na +4°C dekantovati supernatant i talog oprati sa 1 ml hladnog 70% etanola; zatim centrifugirati 10 min na 12000 rcf na +4°C, pažljivo ukloniti etanol i talog osušiti na sobnoj temperaturi; talog RNK rastvoriti u *RNase-free* vodi.

Koncentracija i čistoća RNK određivane su merenjem na spektrofotometru. RNK je čuvana na -80°C do korišćenja.

3.7 REVERZNA TRANSKRIPCija (RT)

Sinteza cDNK je vršena reakcijom reverzne transkripcije korišćenjem RevertAid M-MuLV reverzne transkriptaze (Thermo Scientific), prema uputstvu proizvođača: smešu finalnog volumena 11 µl koja sadrži 0.1 ng – 5 µg RNK i 0.2 µg (100 pmol) *random-hexamer* prajmera (Thermo Scientific) inkubirati 5 min na 70°C, a zatim ohladiti na ledu; dodati smešu finalnog volumena 9 µl koja sadrži 4 µl 5 x RT pufera (Thermo Scientific), 0.5 µl (20 U) RiboLock RNaznog inhibitora (Thermo Scientific), 2 µl dNTP (10 mM) i 1 µl (40 U) RevertAid M-MuLV reverzne transkriptaze (Thermo Scientific); inkubirati 10 min na 25°C, a zatim 1 h na 42°C; reakciju zaustaviti inkubacijom 10 min na 70°C.

Dobijena cDNK je čuvana na -20°C do korišćenja.

3.8 DETEKCIJA *CYP2B6*6* VARIJANTNOG ALELA

U cilju detekcije polimorfizama c.516G>T (rs3745274) i c.785A>G (rs2279343) koji definišu *CYP2B6*6* varijantni alel, egzon 4 i egzon 5 *CYP2B6* gena su prvo amplifikovani reakcijom lančanog umnožavanja DNK (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). U ovim eksperimentima su korišćeni prajmeri dizajnirani od strane Lang *et al.*

koji, zahvaljujući svojoj visokoj specifičnosti, onemogućavaju koamplifikaciju homologog *CYP2B7* gena (Tabela 3) (124).

Tabela 3. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju i sekvenciranje egzona 4 i egzona 5 *CYP2B6* gena

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Dužina PCR produkta
CYP2B6-ex4F	5' - GGTCTGCCCCATCTATAAAC - 3'	526 bp
CYP2B6-ex4R	5' - CTGATTCTTCACATGTCTGCG - 3'	
CYP2B6-ex5F	5' - GACAGAAGGATGAGGGAGGAA - 3'	640 bp
CYP2B6-ex5R	5' - CTCCTCTGTCTTTCATTCTGT - 3'	

Reakciona smeša finalnog volumena 25 μ l je sadržala sledeće komponente: 20ng DNK, 1 x reakcioni pufer (Qiagen), 1 x Q solution (Qiagen), MgCl₂ finalne koncentracije 1.5 mM, dNTP finalne koncentracije 200 μ M, 5 pmol *forward* (F) prajmera, 5 pmol *reverse* (R) prajmera i 1 U HotStarTaq polimeraze (Qiagen).

Temperaturni profil PCR reakcija je bio:

1. 15 min/95°C – aktivacija HotStarTaq polimeraze
2. 45 ciklusa:
 - 30 sek/94°C – denaturacija
 - 1 min/58°C – aniling
 - 1 min/72°C – elongacija
3. 10 min/72°C – finalna elongacija

Provera dobijenih PCR produkata je vršena elektroforezom na 2% agaroznom gelu i vizuelizacijom pod UV svetlom.

Dobijeni PCR produkti su prečišćavani na koloni, a koncentracija i čistoća su merene na spektrofotometru.

Oba lanca na ovaj način umnoženih egzona 4 i egzona 5 *CYP2B6* gena su zatim sekvencirana upotrebom istih prajmera koji su korišćeni za njihovu PCR amplifikaciju.

3.9 ODREĐIVANJE MUTACIONOG STATUSA *TP53* GENA

Detekcija mutacija u *TP53* genu je vršena prema smernicama grupe ERIC (*European Research Initiative on CLL*), kojima je preporučena amplifikacija kodirajućih egzona 4 – 10 i okolnih intronskih regiona PCR metodom i direktno sekvenciranje amplifikovanih regiona (140, 141). Prajmeri korišćeni u ovim eksperimentima su prikazani u Tabeli 4.

Tabela 4. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju i sekvenciranje *TP53* gena

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Amplifikovani region	Dužina PCR produkta
P-329 (F)	5' - TGCTCTTTTCACCCATCTAC - 3'	Egzon 4	353 bp
P-330 (R)	5' - ATACGGCCAGGCATTGAAGT - 3'		
P-236 (F)	5' - TGTTCACTTGTGCCCTGACT - 3'	Egzon 5 - 6	467 bp
P-240 (R)	5' - TTAACCCCTCCTCCCAGAGA - 3'		
P-237 (F)	5' - AGGCGCACTGGCCTCATCTT - 3'	Egzon 7	177 bp
P-238 (R)	5' - TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC - 3'		
P-314 (F)	5' - TTGGGAGTAGATGGAGCCT - 3'	Egzon 8 - 9	445 bp
P-315 (R)	5' - AGTGTTAGACTGGAACTTT - 3'		
P-E10Li (F)	5' - CAATTGTA ACTTGAACCATC - 3'	Egzon 10	260 bp
P-562 (R)	5' - GGATGAGAATGGAATCCTAT - 3'		

Reakciona smeša finalnog volumena 50 μ l je sadržala sledeće komponente: 100 ng DNK, 1 x reakcioni pufer (Qiagen), 1 x Q solution (Qiagen), dNTP finalne koncentracije 200 μ M, 25 pmol *forward* (F) prajmera, 25 pmol *reverse* (R) prajmera i 1U HotStarTaq polimeraze (Qiagen).

Temperaturni profil PCR reakcija je bio:

1. 15 min/95°C – aktivacija HotStarTaq polimeraze
2. 35 ciklusa:
 - 1 min/94°C – denaturacija
 - 1 min/60°C (egzon 4, egzon 5-6, egzon 7) ili 1 min/50°C (egzon 8-9, egzon 10) – aniling
 - 1 min/72°C – elongacija
3. 10 min/72°C – finalna elongacija

Provera dobijenih PCR produkata je vršena elektroforezom na 2% agaroznom gelu i vizuelizacijom pod UV svetlom. Dobijeni PCR produkti su prečišćavani na koloni, a koncentracija i čistoća su merene na spektrofotometru.

Oba lanca na ovaj način umnoženih regiona *TP53* gena su zatim sekvencirana upotrebom istih prajmera koji su korišćeni za njihovu PCR amplifikaciju.

Za analizu i interpretaciju rezultata sekvenciranja korišćen je GLASS softver (<http://bat.infspire.org/genomepd/glass>) i lokus-specifična IARC baza podataka (<http://p53.iarc.fr/TP53GeneVariations.aspx>).

3.10 ODREĐIVANJE *IGHV* MUTACIONOG STATUSA

Određivanje *IGHV* mutacionog statusa je vršeno prema smernicama grupe ERIC, kojima je preporučena amplifikacija klonalnih rearanžmana teških lanaca imunoglobulina (*IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana) metodom lančane reakcije polimeraze na matrici dobijenoj reverznom transkripcijom (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR) i njihovo direktno sekvenciranje (142, 143). Prajmeri korišćeni u ovim eksperimentima su prikazani u Tabeli 5.

Tabela 5. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju i sekvenciranje *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
VH1aL	5' - AAATCGATACCACCATGGACTGGACCTGGAGG - 3'
VH1bL	5' - AAATCGATACCACCATGGACTGGACCTGGAG(C/A) - 3'
VH2aL	5' - AAATCGATACCACCATGGACACACTTTGCT(A/C)AC - 3'
VH2bL	5' - AAATCGATACCACCATGGACATACTTTGTTCCAC - 3'
VH3aL	5' - AAATCGATACCACCATGGAGTTTGGGCTGAGC - 3'
VH3bL	5' - AAATCGATACCACCATGGA(A/G)(C/T)T(G/T)(G/T)G(G/A)CT(G/C/T)(A/C/T)GC - 3'
VH4L	5' - AAATCGATACCACCATGAAACACCTGTGGTTCTT - 3'
VH5L	5' - AAATCGATACCACCATGGGGTCAACCGCCATC - 3'
VH6L	5' - AAATCGATACCACCATGTCTGTCTCCTTCCTC - 3'
JH1-2	5' - TGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC - 3'
JH3	5' - TGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC - 3'
JH4-5	5' - TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC - 3'
JH6	5' - TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC - 3'
VLJH	5' - GTGACCAGGGTNCCTTGGCCCCAG - 3'

Napomena:

- VH1-6L prajmeri su oligonukleotidi komplementarni *leader* sekvencama specifičnim za pojedinačne *IGHV* genske familije; u slučaju *IGHV1*, *IGHV2* i *IGHV3*, za amplifikaciju se koriste 2 VH prajmera (aL i bL) u ekvimolarnim koncentracijama.
- JH1-6 prajmeri su oligonukleotidi komplementarni *IGHJ* genima
- VLJH prajmer je oligonukleotid komplementaran konzervisanom regionu na 3' kraju *IGHJ* gena, koji pokazuje visok stepen homologije kod svih 6 *IGHJ* gena; korišćen je za sekvenciranje produkata multipleks RT-PCR reakcija

Amplifikaciju klonalnih *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana je vršena multipleks RT-PCR metodom ili RT-PCR reakcijama specifičnim za pojedinačne *IGHV* genske familije (*family-specific* RT-PCR).

Reakciona smeša multipleks RT-PCR reakcija finalnog volumena 100 µl je sadržala sledeće komponente: 200 ng cDNK, 1 x reakcioni pufer (Qiagen), 1 x Q pufer

(Qiagen), dNTP finalne koncentracije 200 μ M, 60 pmol VHL prajmera, 60 pmol JH prajmera i 2.5 U HotStarTaq polimeraze (Qiagen). VHL prajmer je oligonukleotidni miks dobijen mešanjem *leader* prajmera specifičnih za svaku *IGHV* gensku familiju u ekvimolarnom odnosu; JH prajmer je oligonukleotidni miks dobijen mešanjem prajmera specifičnih za svaki *IGHJ* gen u ekvimolarnom odnosu.

Reakciona smeša *IGHV1 / IGHV2 / IGHV3 family-specific* RT-PCR reakcija finalnog volumena 100 μ l je sadržala sledeće komponente: 200 ng cDNK, 1 x reakcioni pufer (Qiagen), 1 x Q pufer (Qiagen), dNTP finalne koncentracije 200 μ M, 15 pmol VH1aL / VH2aL / VH3aL prajmera, 15 pmol VH1bL / VH2bL / VH3bL prajmera, 30 pmol JH prajmera i 2.5 U HotStarTaq polimeraze (Qiagen).

Reakciona smeša *IGHV4 / IGHV5 / IGHV6 family-specific* RT-PCR reakcija finalnog volumena 100 μ l je sadržala sledeće komponente: 200 ng cDNK, 1 x reakcioni pufer (Qiagen), 1 x Q pufer (Qiagen), dNTP finalne koncentracije 200 μ M, 30 pmol VH4L / VH5L / VH6L prajmera, 30 pmol JH prajmera i 2.5 U HotStarTaq polimeraze (Qiagen).

Temperaturni profil multipleks i *family-specific* RT-PCR reakcija je bio:

1. 15 min/95°C – aktivacija HotStarTaq polimeraze
2. 40 ciklusa:
 - 1 min/94°C – denaturacija
 - 1 min/59°C – aniling
 - 1.5 min/72°C – elongacija
3. 7 min/72°C – finalna elongacija

Dobijeni produkti RT-PCR reakcija su analizirani elektroforezom na 3% agaroznom gelu. Klonalni RT-PCR produkti su prečišćavani na koloni, a koncentracija i čistoća su merene na spektrofotometru.

Oba lanca na ovaj način umnoženih *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana su zatim sekvencirana upotrebom odgovarajućih prajmera. Dobijene sekvence su analizirane u IMGT/V-QUEST softveru (<http://www.imgt.org>), čime je određena kompozicija i *IGHV* mutacioni status klonalnih rearanžmana.

3.11 ANALIZA DNK NA AGAROZNOM GELU

Analiza produkata PCR i RT-PCR reakcija je vršena elektroforezom na horizontalnom agaroznom gelu (144). Za pripremanje gelova korišćen je 1 x TAE pufer (40 mM Tris-acetat, 1mM EDTA pH=8). U gelove je pre polimerizacije dodavana fluorescentna boja etidijum-bromid (u finalnoj koncentraciji 0.5 µg/ml) koja se interkalira u DNK i omogućava njenu vizuelizaciju pod UV svetlom.

Elektroforeza je tekla u 1 x TAE puferu, pri naponu od 4-7 V/cm. DNK je vizuelizovana osvetljavanjem gela UV svetlom, a trajni zapis rezultata je dobijen fotografisanjem gela CCD kamerom integrisanom u sistem za automatsku digitalnu akviziciju slike (BioDocAnalyze System). Za određivanje veličine fragmenata DNK su korišćeni adekvatni komercijalni markeri (Thermo Scientific).

3.12 PREČIŠĆAVANJE PCR PRODUKATA

Produkti PCR i RT-PCR reakcija su prečišćavani pomoću QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), prema uputstvu proizvođača: pomešati PCR reakcionu smešu i pufer PB u odnosu 1:5; dodati 10 µl 3M Na-acetata pH=5; naneti uzorak na QIAquick kolonicu, staviti je u tubu i centrifugirati 1 min na 17900 g (13000 rpm) (adsorpcija DNK); odbaciti filtrat, naneti 750 µl pufera PE na kolonicu i centrifugirati 1 min na 17900 g (13000 rpm) (ispiranje DNK od nečistoća); odbaciti filtrat i ponoviti centrifugiranje 1 min na 17900 g (13000 rpm); prebaciti kolonicu u novu tubu, naneti 30 µl pufera EB i inkubirati 1 min na sobnoj temperaturi; centrifugiranjem 1 min na 17900 g (13000 rpm) dobija se eluat u kome je rastvoren prečišćeni PCR produkt.

Koncentracija i čistoća prečišćenih PCR i RT-PCR produkata su merene na spektrofotometru.

3.13 SEKVENCIRANJE PCR PRODUKATA

Sekvenciranje produkata PCR i RT-PCR reakcija je rađeno BigDye™ Terminator v.3.1 Ready Reaction Kit-om (Applied Biosystems) i kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

Reakciona smeša za sekvenciranje finalne zapremine 8 µl je sadržala sledeće komponente: 1-20 ng prečišćenog PCR produkta koji treba da se sekvencira (1-3 ng za dužine 100-200 bp; 3-10 ng za dužine 200-500 bp; 5-20 ng za dužine 500-1000 bp), 3.2 pmol prajmera i 3 µl Ready Reaction Mix (Applied Biosystems).

Temperaturni profil PCR reakcija za sekvenciranje je bio:

1. 1 min/96⁰C
2. 25 ciklusa:
 - 10 sek/96⁰C
 - 5 sek/50⁰C
 - 4 min/60⁰C

Produkti PCR reakcija za sekvenciranje su prečišćavani Na-acetatnom precipitacijom po sledećem protokolu: u uzorke dodati 40 µl rastvora Na-acetata (37.5 mM Na-acetat, 78% etanol) promućkati i centrifugirati 20 min na 17900 g (13000 rpm); ukloniti supernatant i talogu dodati 200 µl 70% etanola; centrifugirati 10 min na 17900 g (13000 rpm); ukloniti supernatant i ponoviti prethodni korak još jednom; talog u potpunosti osušiti, rastvoriti u 25 µl Hi-Di formamida i celokupnu količinu naneti u bunarić na mikrotitarskoj ploči za sekvenciranje.

Rezultati sekvenciranja su analizirani programom Sequencing Analysis v.5.2 [<http://www.appliedbiosystems.com>].

3.14 ANALIZA EKSPRESIJE *SLC28A3* GENA

Ekspresija *SLC28A3* gena je merena metodom kvantitativnog RT-PCR (*quantitative RT-PCR*, qRT-PCR), koja omogućava kvantifikaciju RT-PCR produkta u toku svakog RT-PCR ciklusa, tj. u realnom vremenu (*real-time* RT-PCR).

Ekspresija *SLC28A3* je praćena na 7500 Real-time PCR aparatu (Applied Biosystems), upotrebom TaqMan Gene Expression eseja (Applied Biosystems). Kao endogena kontrola je korišćen gen *GAPDH* (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza). Gene Expression esej, prajmeri i probe korišćeni u ovim eksperimentima su navedeni u Tabeli 6.

Tabela 6. Gene Expression esej, prajmeri i probe korišćeni u qRT-PCR eksperimentima merenja ekspresije *SLC28A3* gena

<i>SLC28A3</i>	
TaqMan Gene Expression Assay Hs00910439_m1 (Applied Biosystems)	
<i>GAPDH</i>	
GAPDH-F	5' - GAAGGTGAAGGTCGGAGT - 3'
GAPDH-R	5' - GAAGATGGTGATGGGATTTTC - 3'
GAPDH-P	5' - 6-FAM - CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC - TAMRA - 3'

Napomena:

- GAPDH-F i GAPDH-R su *forward* i *reverse* prajmeri korišćeni za amplifikaciju *GAPDH* gena
- GAPDH-P je oligo-nukleotidna proba komplementarna sekvenci u okviru target regiona; na 5' kraju je obeležena fluorescentnom, reporterskom bojom (FAM), a na 3' kraju "kvenčerom" (TAMRA)

Reakciona smeša qRT-PCR reakcije za *SLC28A3* gen finalnog volumena 10 µl je sadržala sledeće komponente: 50 ng cDNK, 1 x TaqMan Universal PCR Master Mix II (Applied Biosystems) i 1 x TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems). Reakciona smeša qRT-PCR reakcije za *GAPDH* gen finalnog volumena 10 µl je sadržala sledeće komponente: 50 ng cDNK, 1 x TaqMan Universal PCR Master Mix II (Applied Biosystems), 3 pmol *forward* prajmera, 3 pmol *reverse* prajmera i 2 pmol TaqMan probe.

Temperaturni profil qRT-PCR reakcija je bio:

1. 2 min/50°C
2. 10 min/95°C
3. 40 ciklusa:
 - 30 sek/95°C
 - 1 min/60°C

Sve qRT-PCR reakcije su rađene u duplikatu. Obrada rezultata je izvršena primenom komparativnog ddCt metoda, a kao kalibrator je korišćena HL60 ćelijska linija.

3.15 INTERFAZNA FLUORESCENTNA *IN SITU* HIBRIDIZACIJA (iFISH)

Priprema preparata periferne krvi pacijenata sa HLL-om, kao i iFISH analiza, sprovedene su u laboratoriji za citogenetiku, Klinike za hematologiju Kliničkog Centra Srbije.

Protokol za iFISH, podrazumeva sledeće korake:

- Denaturaciju, prilikom koje dolazi do denaturisanja DNK molekula određene genske sekvence koja je označena kao FISH proba, i ciljne DNK uzorka. Ovaj proces se izvodi na temperaturi od 75°C;
- Hibridizaciju, u kojoj DNK proba hibridizuje sa ciljnom, odnosno tumorskom DNK sekvencom;
- Ispiranje, tokom koga se uklanja višak probe koja se nije vezala za ciljnu DNK i
- Analizu interfaznih jedara na fluorescentnom mikroskopu

3.15.1 Priprema preparata

Uzorci periferne krvi pacijenata sa dijagnozom hronične limfocitne leukemije, prikupljeni su u epruvete sa heparinom. Za svaku epruvetu, uzeto je po 5ml periferne krvi. Svaki uzorak krvi je sipan u Falkonovu epruvetu, u koju je prethodno stavljeno 6ml RPMI 1640 medijuma (Sigma). Čelije su lagano resuspendovane, a potom je u svaku epruvetu sa uzorkom dodato po 0.2ml rastvora kolcemida (10 µg/ml kolcemida u HBSS). Nakon 25 min, epruvete su centrifugirane 10 min na 1100 rpm. Nakon uklanjanja supernatanta, u uzorke je dodavano po 6 ml hipotoničnog rastvora (0.075 M KCl). 30 min kasnije, u uzorke sa hipotonijom je dodato po 1 ml fiksativa (Carnoy-ev fiksativ, metanol:sirćetna kiselina = 3:1, vol:vol). Epruvete su centrifugirane 20 min na 1100 rpm, a potom je uklonjen supernatant i na preostali talog dodato 6 ml fiksativa.

Ovako pripremljeni uzorci su čuvani na +8C°.

3.15.2 Analiza interfazne fluorescentne *in situ* hibridizacije (iFISH)

Preparati periferne krvi su analizirani primenom interfaznog FISH-a uz korišćenje CLL FISH panela (Vysis, Downers Grove). CLL Set 1 sadrži SpectrumOrange LSI p53 probu koja pokriva lokus 17p13.1, i SpectrumGreen, LSI ATM probu, za 11q22.3 region. CLL Set 2 čine SpectrumOrange D13S319 proba (lokus - 13q14.3) i SpectrumGreen CEP 12 proba koja pokriva D12Z3 alpha satelitne sekvence, locirane u okviru centromernog regiona hromozoma 12.

FISH procedura je sprovedena prema instrukcijama proizvođača. Simultana denaturacija i hibridizacija DNK pacijenta i DNK probe, izvedena je u HyBrite instrumentu (Vysis, Inc.), pod sledećim uslovima:

- Denaturacija na 75°C u trajanju od 1 min,
- Hibridizacija na 37°C u trajanju od 12 - 18 h.

Signali proba su analizirani na fluorescentnom mikroskopu korišćenjem specifičnih filtera. Analizirano je najmanje 200 interfaznih nukleusa za svaku probu po pacijentu, primenom Axiophot 2 fluorescentnog mikroskopa (Carl Zeiss). Granice za

pozitivan nalaz citogenetskih aberacija određene su analizom preparata zdravih kontrolnih preparata i iznosile su:

1. Aberacije tipa gubitka hromozomskog materijala (delecije) utvrđene u >10% pregledanih nukleusa;
2. Aberacije u vidu trizomija, utvrđene u >10% pregledanih nukleusa.

Ove granice su određivane u odnosu na srednju vrednost ($X \pm 2SD$) koja je dobijena za svaku pojedinačnu probu i analizirana na preparatima periferne krvi zdravih donora.

3.16 SKORIRANJE PACIJENATA PREMA PROGNOŠTIČKIM MODELIMA CLL-IPI, PRS I MDACC 2011

3.16.1 CLL-IPI

U cilju stratifikovanja pacijenata prema prognostičkom modelu CLL-IPI, 1 poen je dodeljivan pacijentima starijim od 65 godina i pacijentima koji su bili u Rai I–IV ili Bine B ili C stadijumima; 2 poena su dodeljivana pacijentima sa koncentracijom serumskog $\beta 2m > 3.5$ mg/L i pacijentima sa nemutiranim *IGHV*, dok su 4 poena zavredili pacijenti sa detektovanom mutacijom *TP53* i/ili *del17p*. Sabiranjem poena od pojedinačnih varijabli dobijana je vrednost skora. Pacijenti sa vrednošću CLL-IPI skora ≤ 1 su klasifikovani u grupu niskog rizika, sa skorom 2-3 u grupu srednjeg rizika, skor 4-6 je definisao grupu visokog rizika, dok su pacijenti sa skorom 7-10 bili u grupi vrlo-visokog rizika (38). Vrednost skora je procenjena kod 38 pacijenata koji su imali kompletne neophodne podatke.

3.16.2 PRS

PRS je određen tako što je svakoj od četiri varijable od kojih je sačinjen skor dodeljena vrednost na sledeći način: 1 poen za Rai stadijum I–II i 2 poena za $ALC \geq 10 \times 10^9/L$, povišen $\beta 2m$ i nemutiran *IGHV* (37). S obzirom da pacijenti u Rai stadijumu

III i IV, kao i oni sa nekompletnim podacima nisu mogli biti skorirani prema PRS, ukupno 28 pacijenata je kategorisano prema ovom skor, i to u grupu niskog (skor 0-2), srednjeg (skor 3-5) i visokog rizika (skor 6-7).

3.16.3 MDACC 2011

Vrednost MDACC 2011 skora izračunata je kod 42/57 pacijenta sa kompletnim podacima pomoću originalne formule iz rada Virde i saradnika: $[I(\text{broj zahvaćenih limfonodalnih regija} = 3) \times 7.370 + I(\text{FISH} = \text{del11q}) \times 9.312 + I(\text{FISH} = \text{del17p}) \times 11.285 + (\text{prečnik najvećeg ln na vratu u cm}) \times 4.172 + (\text{LDH}/100) \times I([\text{IGHV geni} = \text{mutirani}] \times 5.000 + (\text{LDH}/100) \times I([\text{IGHV geni} = \text{nemutirani}] \times 1.065)] + 35.467$. Indikator (I) je jednak 1 ako je tvrdnja u zagradama tačna i 0 ako je netačna (35).

3.17 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Dobijeni eksperimentalni rezultati su obrađeni statističkim testovima i prikazani u tabelama i graficima, uz propratnu diskusiju.

Rezultati koji se odnose na kategorijske varijable su predstavljeni kao apsolutni brojevi i u procentima. Od deskriptivnih statističkih parametara za prikaz kontinualnih varijabli su korišćeni: raspon vrednosti promenljivih (minimum, maksimum), medijana vrednosti, interkvartilni opseg i 95% interval poverenja (*Confidence Interval*, CI).

Normalnost raspodele je proveravana Kolmogorov-Smirnovim testom.

Za istraživanje jačine veze između dve neprekidne promenljive korišćen je metod Spirmanove korelacije rangova.

Za ispitivanje veze između kategorijskih varijabli korišćeni su Hi-kvadrat test nezavisnosti (χ^2 - test) i Fišerov test.

Od statističkih testova za poređenje grupa korišćen je Man-Vitnijev test (Test sume rangova).

Za ocenu sposobnosti testa da pravilno klasifikuje ispitanike korišćena je ROC (*receiver operating characteristic*) analiza.

Usklađenost genotipova *CYP2B6* gena sa Hardy-Vajnbergovom ravnotežom je proverena χ^2 testom, a analiza haplotipova je urađena pomoću Arlequin softvera (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>).

Za analizu i grafički prikaz dužine preživljavanja (TTFT, PFS, OS) korišćena je Kaplan-Majerova metoda, kao i Log Rank test za poređenje preživljavanja među ispitivanim grupama.

Za identifikaciju prediktora TTFT i OS je korišćen univarijantni i multivarijantni Koksov hazardni regresioni model, a rezultati su prikazani kao hazardni odnos (*Hazard Ratio*, HR) sa odgovarajućim 95% CI. Uticaj kliničkih i genetičkih varijabli na terapijski odgovor ispitivan je univarijantnom i multivarijantnom logističkom regresionom analizom, a rezultati su prikazani kao količnik verovatnoće (*Odds Ratio*, OR) sa odgovarajućim 95% CI.

Svi statistički testovi su posmatrani na nivou značajnosti nulte hipoteze od $p < 0.05$. Statistička analiza je rađena primenom SigmaStat 3.5 i SigmaPlot 11.0 statističkih paketa, kao i SPSS statističkim softverom (SPSS 21.0, SPSS).

4 REZULTATI

4.1 ASOCIJACIJA IZMEĐU EKSPRESIJE *SLC28A3* GENA I PRISUSTVA *CYP2B6*6* ALELA SA ISHODOM LEČENJA PACIJENATA FC PROTOKOLOM

4.1.1 Opšti podaci o kohorti, lečenju i ishodu lečenja

U ovom delu istraživanja učestvovalo je 44 pacijenta sa HLL-om koji su dijagnostikovani i lečeni na Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije u periodu od 2003. do 2018. godine. Grupa je definisana kada je iz osnovne kohorte od 57 pacijenata isključeno njih 13, na način kako je opisano u odeljku 3.1.3. Kao što je rečeno, od 13 pacijenata isključenih u svrhu farmakogenetičke analize, njih 11 je imalo nefunkcionalan *TP53*, bilo kao posledicu mutacije ili del17p, dok za dva pacijenta nije bila dostupna informacija o odgovoru na terapiju. Imajući u vidu da je gubitak funkcije *TP53* gena jedan od glavnih uzroka rezistencije na konvencionalnu hemioterapiju, prvenstveno FC protokol, isključivanjem pacijenata sa mutacijom i/ili delecijom *TP53* otklonjena je mogućnost da su ove aberacije uticale na ishod lečenja pacijenata u kohorti. Osnovne karakteristike pacijenata na dijagnozi i pred započinjanje primene FC sumirane su u Tabeli 7.

Tabela 7. Kliničke i biološke karakteristike HLL pacijenata

	na dijagnozi	na započinjanju FC
Broj pacijenata	44	44
Pol (muški/ženski), br.	33/11	33/11
Starosna dob (godine), medijana (opseg)	56.5 (38-75)	57.5 (39-76)
Le [$\times 10^9/l$], (n=43/n=37) ^a , medijana (opseg)	47.1 (7.1-570)	120 (7.1-570)
Ly [$\times 10^9/l$], (n=39/n=34) ^a , medijana (opseg)	39.1 (2.7-558.6)	114.7 (2.7- 558.6)
$\beta 2$-mikroglobulin [mg/l] (n=32/ n=25) ^a , medijana (opseg)	3.97 (0.2-11.5)	4.57 (0.2-11.5)
LDH [U/l], (n=38/n=27) ^a , medijana (opseg)	382.5 (81-1042)	441 (81-1032)
Bine stadijum (n=43/n=39) ^a , br.(%)		
A	12 (27.9%)	3 (7,7%)
B	22 (51,2%)	22 (56,4%)
C	9 (20,9%)	14 (35,9%)
CD38 status (n=36) ^a , br.(%)		
pozitivan (≥ 30 %)	9 (25%)	-
negativan (< 30 %)	27 (75%)	-
Hromozomske aberacije (n=44) ^a , br.(%)		
delecija 11q22-q23	-	9 (20.4%)
trizomija 12	-	5 (11.4%)
delecija 13q14 ^b	-	7 (15.9%)
bez aberacija	-	23 (52.3%)
IGHV status (n=43) ^a , br.(%)		
mutiran	7 (16.3%)	7 (16.3%)
nemutiran	36 (83.7%)	36 (83.7%)

Napomena:

n je broj pacijenata kod kojih je evidentiran dati klinički parametar

^a broj pacijenata kod kojih su bile dostupne vrednosti navedenih parametara na dijagnozi/na započinjanju FC

^b delecija 13q14 kao jedina hromozomska aberacija detektovana FISH metodom

U finalnoj kohorti je bilo 33 muškarca i 11 žena (M:F=3:1). Najveći broj pacijenata (22, 51.2%) je na prezentaciji bio u B kliničkom stadijumu po Bineu, dok je njih 12 (27.9%) bilo u A, a 9 (20.9%) u stadijumu C. Kada su u pitanju laboratorijski parametri, medijana broja leukocita na dijagnozi je iznosila $47.1 \times 10^9/L$ (opseg $7.1-570 \times 10^9/L$), medijana broja limfocita $39.1 \times 10^9/L$ (opseg $2.7-558.6 \times 10^9/L$), medijana serumskog $\beta 2$ -mikroglobulina 3.97 mg/L (opseg, 0.2-11.5 mg/L) i LDH 382.5 U/L (opseg 81-1042 U/L). Za 36/44 pacijenta je bila dostupna informacija o statusu markera CD38 koji je bio pozitivan (*cut-off* vrednost 30%) kod 9 (25%) pacijenata, a negativan kod 27 (75%). Mutacioni status *IGHV* je bio poznat za 43 pacijenta, sa predominacijom nosilaca nemutiranog *IGHV* u odnosu na mutirani (36 (83.7%) vs 7 (16.3%)). Citogenetička analiza posredstvom FISH metode, rađena pre započinjanja prve terapije, pokazala je da najveći broj pacijenta, njih 23 (52,3%), nije imao nijednu od karakterističnih aberacija koje se detektuju ovom metodom u rutinskoj praksi (del13q, trizomija 12, del11q i del17p), 7 (15.9%) je imalo del13q, 5 (11.4%) trizomiju 12 i 9 (20.4%) del11q. Vrednosti laboratorijskih parametara i Bine stadijum pre započinjanja FC terapije su takođe dati u Tabeli 7.

Većina pacijenata iz kohorte (36, 81.8%) lečena je FC protokolom u prvoj terapijskoj liniji, 4 pacijenta (9.1%) je primilo FC u drugoj, a 4 (9.1%) u trećoj, odnosno četvrtoj terapijskoj liniji. Medijana kumulativne doze fludarabina po pacijentu iznosila je $450 \text{mg}/\text{m}^2$ (opseg $100-450 \text{mg}/\text{m}^2$), dok je medijana kumulativne doze ciklofosfamida bila $4500 \text{mg}/\text{m}^2$ (opseg $900-4500 \text{mg}/\text{m}^2$). Pacijenti su primili do 6 ciklusa FC (medijana 6, opseg 2-6). Medijana vremena do prve terapije (TTFT) iznosila je 6.5 meseci (opseg 1-71 mesec).

Kada je u pitanju odgovor na FC, kod 18 pacijenata (40.9%) je postignuta CR, kod isto toliko PR, kod 5 pacijenata (11.4%) je verifikovana SD, a kod 3 (6.8%) bolest je progredirala (PD) na primenjeno lečenje. PFS (podaci dostupni za 39 pacijenata) je bilo u rasponu od 3 do 90 meseci (medijana 29 meseci); 4 pacijanta su u trenutku sprovođenja istraživanja bili još uvek u remisiji. Medijana OS je iznosila 73 meseca (opseg 15-142 meseca).

4.1.2 Povezanost prisustva alela *CYP2B6**6 i ishoda lečenja

Detekcija *CYP2B6**6 varijantnog alela je izvršena PCR amplifikacijom i direktnim sekvenciranjem egzona 4 i egzona 5 *CYP2B6* gena. Genotipovi dva SNP koji definišu ovaj alel (c.516G>T i c.785A>G) su određeni kod sva 44 pacijenta u kohorti i potvrđeno je da su u skladu sa Hardy-Vajnbergovim ekvilibrijumom. Nukleotidna zamena na poziciji c.516G>T je detektovana kod 24 pacijenta (54.6%), i to kod jednog pacijenta u homozigotnom, a kod ostala 23 pacijenta u heterozogotnom stanju. Isti rezultat je dobijen i za nukleotidnu zamenu c.785A>G.

Određivanje *CYP2B6* alelotipa učinjeno je pomoću Arlequin softvera. S obzirom da je ustanovljeno da su u našoj kohorti ispitivani SNP bili u potpunoj neravnoteži vezanosti ($D=1$, $r^2=1$), samo dva haplotipa su označena kao najverovatniji: G₅₁₆A₇₈₅ (koji je dalje interpretiran kao *wild type* alel *CYP2B6**1) i T₅₁₆G₇₈₅ (dalje interpretiran kao varijantni alel *CYP2B6**6). Na osnovu toga je zaključeno da su u ispitivanoj grupi pacijenata učestalosti haplotipskih kombinacija *1/*1, *1/*6 i *6/*6 bile 45.4%, 52.3%, odnosno 2.3%.

U daljoj analizi, 23 pacijenta kod kojih je detektovano prisustvo *1/*6 haplotipske kombinacije i 1 pacijent kod kojeg je detektovano prisustvo *6/*6 haplotipske kombinacije su grupisani kao nosioci bar jednog *CYP2B6**6 varijantnog alela.

Sledeći korak je bio da se grupe *1/*1 i *6 nosilaca uporede u cilju utvrđivanja eventualnih razlika u pogledu kliničkih i bioloških karakteristika kao što su starosna dob, pol, vrednosti parametara krvne slike, Bine stadijum, nivoi serumskog β 2-mikroglobulina i LDH, ekspresija CD38, hromozomske abnormalnosti i *IGHV* mutacioni status. Ustanovljeno je da između ove dve grupe pacijenata nije bilo statistički značajnih razlika u pogledu gore navedenih kliničko-bioloških karakteristika, kako na dijagnozi, tako i prilikom započinjanja lečenja FC protokolom. Takođe, nije zapažena razlika u vremenu do prve terapije između dve ispitivane grupe.

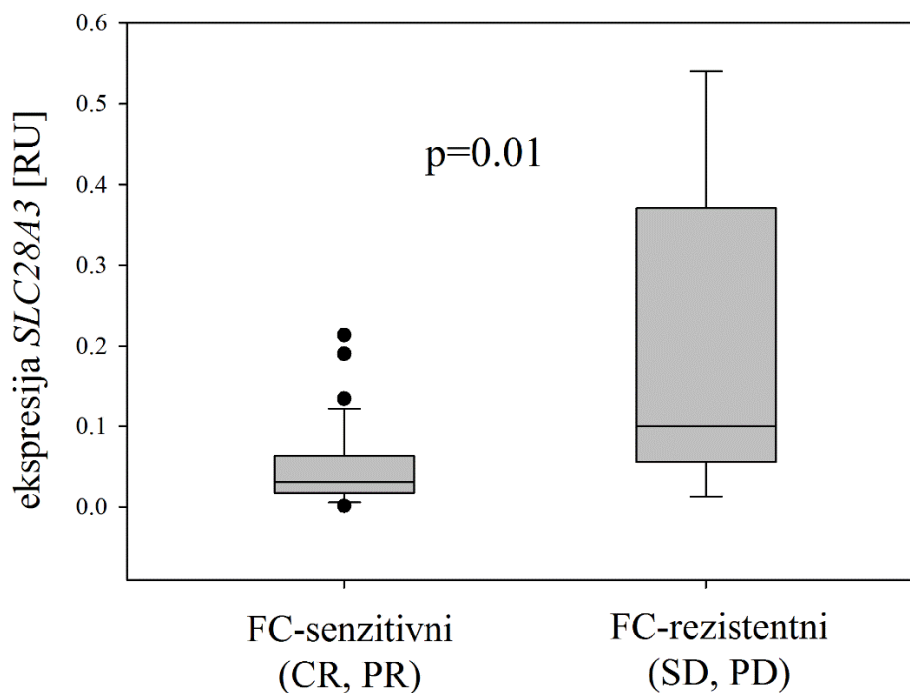
Sa aspekta efikasnosti FC protokola, nije detektovana statistički značajna povezanost između prisustva alela *CYP2B6**6 i postizanja odgovora na terapiju. Pored toga, nije uočena ni asocijacija između alela *CYP2B6**6 i broja primenjenih ciklusa FC terapije, kao ni veza ovog alela sa trajanjem PFS i OS.

4.1.3 Povezanost ekspresije *SLC28A3* i ishoda lečenja

Ekspresija *SLC28A3* je merena u mononuklearnim ćelijama izolovanim iz uzoraka periferne krvi HLL pacijenata uzetih pre započinjanja terapije FC protokolom. Ekspresija je merena qRT-PCR metodom, korišćenjem TaqMan tehnike. Relativni nivo ekspresije je određen primenom ddCt metode, gde je kao kalibrator korišćena HL-60 ćelijska linija. Nivo ekspresije izražen je u relativnim jedinicama (*relative units*, RU).

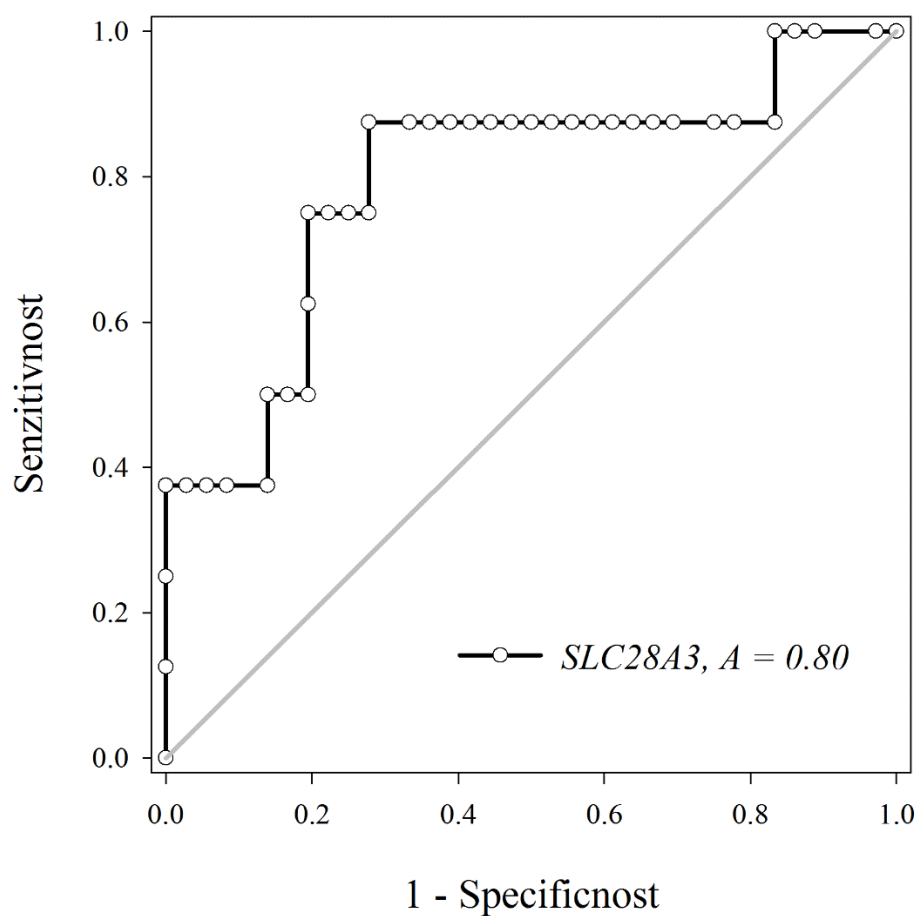
Na osnovu medijane vrednosti relativne ekspresije *SLC28A3* ukupnog uzorka HLL pacijenata (0.0375 RU), kohorta je podeljena na dve grupe u cilju poređenja bazičnih kliničko-bioloških osobina između grupe koja je imala nisku i grupe koja je imala visoku ekspresiju ovog gena. Nijedan od ispitivanih parametara (starosna dob, pol, vrednosti parametara krvne slike, Bine stadijum, nivoi serumskog β 2-mikroglobulina i LDH, ekspresija CD38, hromozomske abnormalnosti i *IGHV* mutacioni status) nije pokazao značajnu povezanost sa nivoom ekspresije gena *SLC28A3*, što je ukazalo na to da su dve grupe (sa nižom i sa višom ekspresijom) bile slične u pogledu bazičnih kliničko-bioloških osobina, kako na dijagnozi, tako i na započinjanju terapije FC protokolom. Pored toga, nije pokazana povezanost nivoa ekspresije *SLC28A3* sa specifičnim *CYP2B6* alelotipom.

qRT-PCR analizom je detektovan značajno viši nivo ekspresije iRNK *SLC28A3* gena kod pacijenata koji nisu imali zadovoljavajući odgovor na terapiju FC protokolom, odnosno koji su za ishod lečenja imali stabilnu bolest (SD) ili progresiju (PD) (FC-rezistentni), u poređenju sa FC-senzitivnim pacijentima kod kojih je postignuta parcijalna (PR) ili kompletna remisija (CR) (Man-Vitnjev test; $p=0.01$) (Slika 6).



Slika 6. Relativna ekspresija iRNK *SLC28A3* gena u mononuklearnim ćelijama pacijenata koji su odgovorili (CR, PR) i pacijenata koji nisu odgovorili na FC (SD, PD). Medijana ekspresije *SLC28A3* među pacijentima koji su odgovorili na FC (FC-senzitivni) je 0.0305 RU, a interkvartilni opseg 0.0175 – 0.0638 RU. Medijana ekspresije *SLC28A3* među pacijentima koji nisu odgovorili na FC (FC-rezistentni) je 0.100 RU, a interkvartilni opseg 0.0553 – 0.370 RU. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane.

ROC analiza je potvrdila da je nivo ekspresije *SLC28A3* gena pre primene FC dobar prediktor odgovora na terapiju. Ovom analizom je pokazano da *cut-off* vrednost od 0.0460 RU najbolje diskriminiše pacijente koji će odgovoriti od onih koji neće odgovoriti na terapiju FC (A= 0.7951; pozitivna prediktivna vrednost=0.7590; negativna prediktivna vrednost=0.8525) (Slika 7).



Slika 7. ROC analiza ekspresije *SLC28A3* gena u odnosu na odgovor pacijenata na terapiju FC.

Cut-off = 0.0460 RU; senzitivnost = 0.8750 (95% CI=0.4735-0.9968); specifičnost = 0.7222 (95% CI=0.5481-0.8580); A = 0.7951 (95% CI = 0.6031-0.9872); p=0.009697; A = površina ispod ROC krive.

S druge strane, u našoj kohorti nije uočena povezanost nivoa ekspresije *SLC28A3* gena pre terapije sa brojem primenjenih ciklusa FC protokola, kao ni sa preživljavanjem bez progresije i ukupnim preživljavanjem.

4.1.4 Prediktori odgovora na FC

Univarijantna analiza je pokazala da su jedini statistički značajni prediktori odgovora na FC linija terapije u kojoj je FC primenjen i nivo ekspresije *SLC28A3* pre terapije. Naime, pacijenti koji su FC primili u drugoj ili kasnijim terapijskim linijama,

kao i pacijenti koji su imali visok nivo ekspresije *SLC28A3*, imali su značajno manje izgleda da odgovore na terapiju FC protokolom od pacijenata koji su FC primili kao prvu terapijsku liniju i onih kod kojih je detektovan nizak nivo ekspresije *SLC28A3* (Fišerov test; OR= 8; 95% CI=1.42-45.23; p=0.026 za liniju terapije i OR=9.8; 95% CI=1.09-88.23; p=0.046 za ekspresiju gena *SLC28A3*). U multivarijantnoj analizi kontrolisanoj za strosnu dob, Bine stadijum i prisustvo delecije 11q22-q23, jedino je nivo ekspresije *SLC28A3* pokazao trend ka ispoljavanju nezavisne povezanosti sa odgovorom na FC, ali bez dostizanja statističke značajnosti (logistička regresija; OR=8.77; 95% CI=0.76-101.49; p=0.082) (Tabela 8).

Tabela 8. Analiza varijabli udruženih sa nepostizanjem odgovora na terapiju FC

Varijable *	Univarijantna analiza			Multivarijantna analiza		
	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
Starosna dob (>57.5 vs ≤57.5)	0.54	0.11-2.59	0.698	0.96	0.83-1.09	0.505
Pol (M vs Ž)	1.0	0.17-5.87	1			
Binet stadijum (B+C vs A)	0.32	0.02-4.26	0.403	1.16	0.07-20.08	0.920
CD38 status (pozitivan vs negativan)	0.7	0.12-4.18	1			
Delecija 11q22-q23 (pozitivni vs negativni)	1.38	0.23-8.36	0.659	1.34	0.45-3.96	0.597
IGHV mutacioni status (nemutirani vs mutirani)	1.2	0.12-11.87	1			
Linija terapije (≥II vs I)	8.0	1.42-45.23	0.026	5.17	0.43-62.64	0.197
CYP2B6 (*6 vs */*1)	3.0	0.53-16.9	0.259			
SLC28A3 ekspresija (visoka vs niska)	9.8	1.09-88.23	0.046	8.77	0.76-101.49	0.082

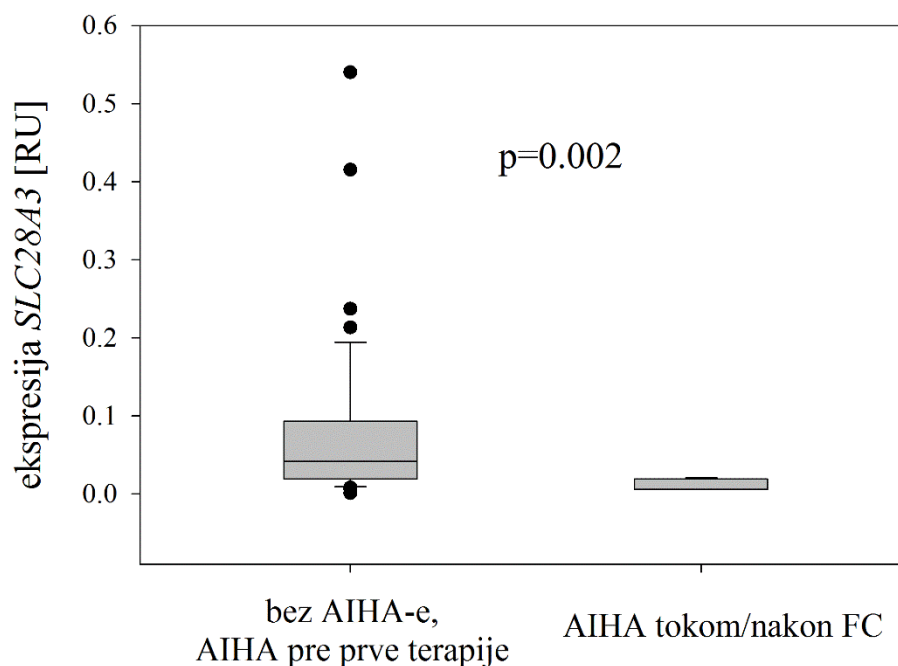
Napomena: druga kategorija u zagradi se smatra referentnom

4.1.5 Rizik od nastanka autoimune hemolizne anemije (AIHA) i Rihterovog sindroma (RS) u odnosu na nivo ekspresije *SLC28A3* gena

Cilj ovog dela istraživanja je bio da se ispita rizik od pojave AIHA-e i RS u periodu nakon započinjanja primene FC protokola u odnosu na ekspresiju *SLC28A3* gena, odnosno da li udruženost ekspresije *SLC28A3* sa dejstvom fludarabina postoji i u sferi komplikacija, a ne samo željenih efekata ove terapije.

Inicijalno je ispitano da li postoji udruženost defektnog *TP53* gena (mutacija i/ili delecija) sa pojavom AIHA-e i RS. Pokazano je da su se i AIHA i RS kod naših pacijenata javljali sa podjednakom učestalošću kako u grupi pacijenata sa *wild type TP53*, tako i u grupi sa mutiranim/deletiranim *TP53* genom (Fišerov test $p=1.0$ za AIHA i RS). Iz tog razloga smo povezanost ekspresije *SLC28A3* sa pojavom AIHA-e tokom/nakon primene FC, kao i sa nastankom RS ispitali na osnovnoj kohorti.

Kod 13 od 55 pacijenata (23.6%), za koliko je bilo podataka o ovom događaju, tokom bolesti je došlo do razvoja autoimmune hemolizne anemije (AIHA). Kod 6 pacijenata (46.1% pacijenata sa hemolizom, odnosno 10.9% ukupnog broja pacijenata) AIHA se javila u periodu pre započinjanja lečenja, dok je kod njih 7 (53.9% pacijenata sa hemolizom, odnosno 12.7% ukupnog broja pacijenata) AIHA je nastupila tokom ili nakon sprovedenog lečenja. Od 7 pacijenata kod kojih se hemoliza ispoljila u toku ili nakon terapije, svi su lečeni FC protokolom. Kod 5 od ovih 7 pacijenata došlo je do pojave hemolize tokom terapije, i to kod 3 pacijenta u toku retreatmana FC protokolom, a kod 2 tokom lečenja FC terapijom u prvoj liniji. Kod ostala 2 pacijenata hemoliza se ispoljila 17 i 28 meseci nakon započinjanja lečenja FC protokolom u prvoj liniji terapije, tokom asimptomatske faze bolesti u prvoj remisiji. Ispitano je da li postoji asocijacija između razvoja hemolizne anemije u toku i nakon terapije FC protokolom i nivoa ekspresije *SLC28A3* gena pre započinjanja terapije. Rezultati su pokazali da je u našoj kohorti ekspresija *SLC28A3* gena bila statistički značajno niža kod pacijenata kod kojih je došlo do razvoja hemolizne anemije u toku ili nakon terapije FC protokolom, u odnosu na pacijente koji nisu imali hemolizu ili je do nje došlo pre prve terapijske linije (Man-Vitnjev test; $p=0.002$) (Slika 8).



Slika 8. Relativna ekspresija iRNK *SLC28A3* gena u mononuklearnim ćelijama pacijenata bez AIHA-e ili kod kojih je AIHA nastala u periodu pre prve terapije u odnosu na pacijente kod kojih je došlo do razvoja AIHA-e tokom ili nakon primene FC. Medijana ekspresije *SLC28A3* među pacijentima kod kojih nije došlo do hemolize, ili se ona razvila pre prve terapijske linije je 0.0420 RU, a interkvartilni opseg 0.0190 – 0.0930 RU. Medijana ekspresije *SLC28A3* među pacijentima kod kojih je došlo do razvoja hemolize u toku ili nakon terapije FC je 0.006 RU, a interkvartilni opseg 0.006 – 0.0190 RU. Horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane.

U osnovnoj kohorti od 57 pacijenata registrovano je 5 pacijenata (8.8%) kod kojih se bolest komplikovala histopatološki dokazanom transformacijom u difuzni B krupnoćelijski limfom, odnosno Rihterov sindrom. Medijana vremena od dijagnoze HLL do nastanka RS je iznosila 70 meseci (opseg 50-123 meseca). Svi pacijenti kod kojih se bolest transformisala prethodno su lečeni FC protokolom. Medijana vremena od započinjanja prvog FC protokola do razvoja RS bila je 46 meseca (opseg 33-122 meseca), dok je preživljavanje nakon uspostavljanja dijagnoze RS bilo izuzetno kratko (medijana 5 meseci, opseg 0-42). Učinjena je analiza nivoa ekspresije iRNK *SLC28A3* gena u odnosu na pojavu RS i utvrđeno je da ne postoji veza između ove dve karakteristike u našoj kohorti (Man-Vitnijev test; $p=0.412$).

4.2 ZNAČAJ PROGNOŠTIČKIH MODELA INTERNACIONALNOG PROGNOŠTIČKOG INDEKSA ZA HRONIČNU LIMFOCITNU LEUKEMIJU (CLL-IPI), SKORA RIZIKA OD PROGRESIJE (PRS) I SKORA MD ANDERSON CENTRA ZA KANCER 2011 (MDACC 2011) U PREDIKCIJI TTFT, PFS I OS

4.2.1 Deskripcija kohorte

U ovom delu istraživanja analizirana je osnovna kohorta od 57 pacijenata sa hroničnom limfocitnom leukemijom. Medijana starosne dobi na dijagnozi je bila 56 godina (opseg 38-75). Od ukupno 57 pacijenata koji su sačinjavali kohortu, 41 su bili muškog, a 16 ženskog pola (M:F=2.6:1). Medijana vrednosti komorbiditetnog indeksa CIRS (*Cumulative Illness Rating Scale*) bila je 0 (opseg 0-7). Svi pacijenti su bili lečeni nakon medijane TTFT od 5.5 meseci (opseg 0-71). Svi su bili lečeni hemioterapijskim protokolom FC, i to većina (47/57, 82%) u prvoj terapijskoj liniji. Ostali pacijenti (10/57, 18%) su u prvoj liniji lečeni sledećim terapijskim modalitetima: hlorambucil (4 pacijenta), ciklofosamid, vinkristin i prednizon (CVP) (4 pacijenta), alemtuzumab (1 pacijent) i splenektomija (1 pacijent). Ukupan odgovor nakon prve terapijske linije u celoj grupi bio je 79%. Kompletnu remisiju je postiglo 41% pacijenata, parcijalnu remisiju 36%, dok 21% pacijenata nije odgovorilo ispoljivši stabilnu (12%) ili progresivnu bolest (9%). Nakon prve terapijske linije kod 48 pacijenata (84%) je u nekom trenutku došlo do progresije bolesti, 7 pacijenata (12%) je ostalo u prvoj remisiji do poslednje kontrole ili smrti nepovezane sa HLL-om, dok su 2 pacijenta (4%) izgubljena u praćenju nakon završetka lečenja.

Nakon medijane praćenja od 71.5 meseci (opseg 4-142), trećina (18 pacijenata, 32%) su još uvek bili živi, dok je njih 38 (68%) umrlo. Medijana ukupnog preživljavanja je bila 77 meseci (95%CI 69-85 meseci). Detalji karakteristika kohorte su dati u Tabeli 9.

Tabela 9. Kliničke i biološke karakteristike pacijenata u osnovnoj kohorti

	n (%)	Medijana (Q1, Q3)^a
Starost (godine)		56.5 (52.2-65.7)
< 50	9 (16.1)	
50-65	33 (58.9)	
> 65	14 (24.6)	
Pol		
muški	41 (71.9)	
ženski	16 (28.1)	
ALC (x10⁹/L)		38.9 (16.1-83.9)
< 10	5 (10.4)	
≥ 10	43 (89.6)	
Hemoglobin (g/L)		128 (114.5-144.5)
≤ 100	7 (14.0)	
> 100	43 (86.0)	
Broj trombocita (x10⁹/L)		174.5 (112-226.3)
≤ 100	10 (20.0)	
> 100	40 (80.0)	
β2-mikroglobulin (mg/L)	39 (68.4)	3.98 (2.78-4.86)
LDH (IU/L)	47 (82.5)	383 (315-592)
Limfni čvor najvećeg promera (cm)		
< 5	41 (77.4)	
≥ 5	12 (22.6)	
Rai		
0	5 (9.1)	
1-2	38 (69.1)	
3-4	12 (21.8)	
Bine stadijum		
A	18 (32.7)	
B/C	37 (67.3)	
HLL score^b		
3	1 (2.0)	
4	10 (20.4)	
5	38 (77.6)	

	n (%)	Medijana (Q1, Q3) ^a
CD38 status		
Pozitivan ($\geq 30\%$)	19 (36.5)	
Negativan ($< 30\%$)	33 (63.5)	
Tip infiltracije		
nodularna/intersticijalna	16 (32.0)	40 (40-58)
difuzna	34 (68.0)	80 (80-90)
IGHV status		
mutiran	11 (19.6)	
nemutiran	45 (80.4)	
Hromozomske aberacije		
del13q/trizomija12/normalan	44 (77.2)	
del11q	10 (17.5)	
del17p	3 (5.3)	
TP53 status		
wild type	48 (84.2)	
mutiran	9 (15.8)	

Napomena:

n (%) je broj (proporcija) pacijenata kod kojih je evidentiran dati klinički parameter

^a Q1= kvartil 1; Q3:=kvartil 3; ^b Matutes/Moro HLL skor

4.2.2 Stratifikacija pacijenata prema prognostičkim modelima

Pacijenti su skorirani prema prognostičkim modelima CLL-IPI i PRS pomoću odgovarajućih scoring sistema, dok je vrednost MDACC 2011 skora računata iz originalne formule date u radu Virde i saradnika, kao što je opisano u odeljku 3.16.3. S obzirom na činjenicu da prema CLL-IPI skoru nije bilo pacijenata koji su niskog rizika, kao i da je bilo samo 2 pacijenta sa niskim rizikom prema PRS skoru, kohorta je za potrebe analize TTFT i OS podeljena na dve grupe. Prema CLL-IPI skoru podela je bila na grupu sa srednjim rizikom i grupu sa visokim i vrlo visokim rizikom, dok je prema PRS skoru definisana grupa sa niskim i srednjim rizikom naspram grupe sa visokim rizikom. Što se tiče skora MDACC 2011, kohorta je dihotomizirana prema medijani vrednosti ovog skora koja je iznosila 53.6 (opseg 14.2-75). Raspodele pacijenata po grupama rizika prema svim ispitivanim skorovima date su u Tabeli 10.

Tabela 10. Skoriranje pacijenata prema prognostičkim modelima CLL-IPI, PRS i MDACC 2011

Procena rizika	n (%)	GzA^a
CLL-IPI		
nizak	/	
Srednji	15 (39.5)	15 (39.5)
Visok	20 (52.6)	23 (60.5)
Vrlo visok	3 (7.9)	
PRS		
Nizak	2 (7.1)	11 (39.3)
Srednji	9 (32.1)	
Visok	17 (60.7)	17 (60.7)
MDACC 2011		
≤ medijane ^b	21 (50.0)	
> medijane	21 (50.0)	

Napomena:

n (%) je broj (proporcija) pacijenata u odgovarajućim grupama rizika

^a grupisanje za Kaplan-Majer analizu TTFT i OS

^b medijana vrednosi skora MDACC 2011 bila je 53.6

4.2.3 Predikcija TTFT pomoću skorova CLL-IPI, PRS i MDACC 2011

Visoke vrednosti skorova CLL-IPI i PRS, kao i vrednosti MDACC 2011 skora preko 53.6 pokazali su se kao značajni prediktori kraćeg TTFT u univarijantnoj analizi. Povećanje rizika za 1 poen prema skorovima CLL-IPI i PRS povećavali su rizik od započinjanja lečenja za približno 1.4 puta (univarijantni Koksov hazardni regresioni model: HR 1.385; 95%CI 1.121-1.710; p=0.002 za CLL-IPI i HR 1.414; 95%CI 1.060-1.888; p=0.019 za PRS). MDACC 2011 je identifikovan kao najsnažniji prediktor TTFT (univarijantni Koksov hazardni regresioni model: HR 1.046; 95%CI 1.020-1.073; p<0.001). Navedeni rezultati su sumirani u Tabeli 11.

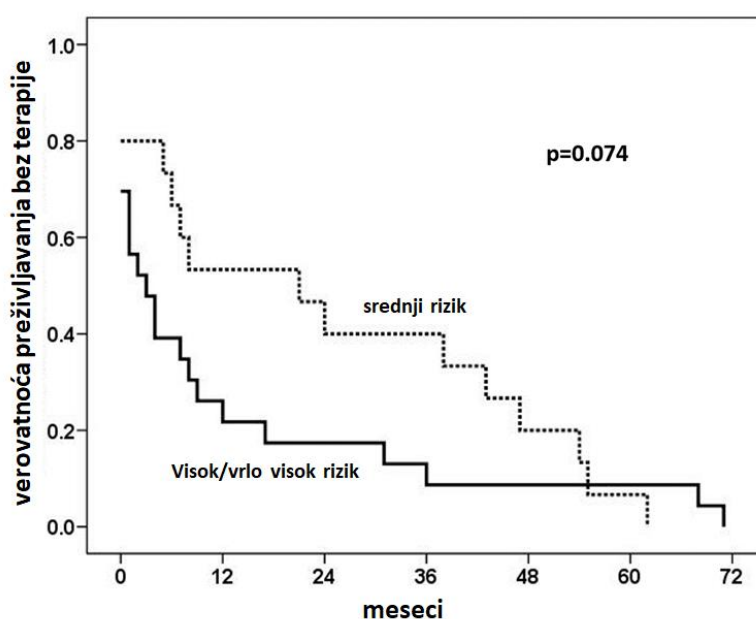
Tabela 11. Koksova regresiona analiza vremena do prve terapije (TTFT)

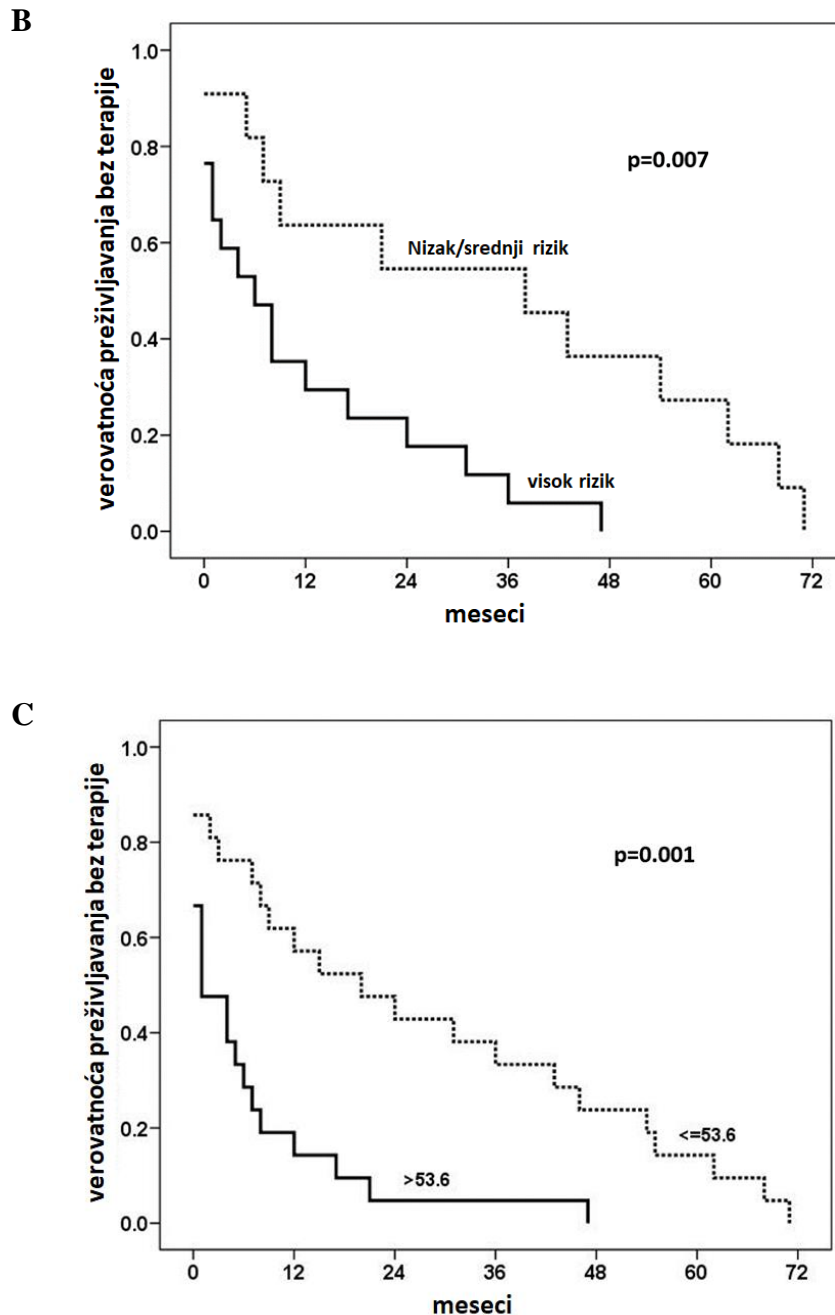
	Univarijantna analiza			Multivarijantna analiza		
	p	HR	95%CI	p	HR	95%CI
CLL-IPI	0.002	1.385	1.121-1.710	0.018	1.493	1.071-2.083
PRS	0.019	1.414	1.060-1.888	/	/	/
MDACC 2011	<0.001	1.046	1.020-1.073	0.001	1.051	1.019-1.083

Sposobnost predviđanja TTFT pomoću ova tri prognostička modela je takođe testirana Kaplan-Majerovom metodom. Za potrebe ove analize, pacijenti su grupisani u dve kategorije rizika prema svakom od ispitivanih prognostičkih modela, kao što je opisano u Tabeli 10: CLL-IPI – intermedijerni *vs* visok/veoma visok (nije bilo pacijenata u grupi niskog rizika); PRS – nizak/intermedijeran *vs* visok; MDACC 2011 – pacijenti su dihotomizovani prema medijani vrednosti skora (53.6).

Pokazano je da su medijane TTFT u grupama višeg rizika prema CLL-IPI skoru 3 meseca, prema PRS 6 meseci i prema MDACC 2011 1 mesec, dok su u grupama nižeg rizika 21 mesec (CLL-IPI), 38 meseci (PRS) i 20 meseci (MDACC 2011). Ova analiza je potvrdila snažnu povezanost vrednosti PRS i MDACC 2011 skora sa vremenom preživljavanja bez terapije ($p=0.007$ za PRS i $p=0.001$ za MDACC 2011), dok je CLL-IPI pokazao tendenciju ka postojanju veze sa TTFT, ali nije dostignuta statistička značajnost ($p=0.074$) (Slika 9).

A





Slika 9. Analiza vremena do prve terapije (TTFT) kod pacijenata stratifikovanih prema skorovima CLL-IPI, PRS i MDACC 2011.

A. CLL-IPI: medijana TTFT u grupi intermedijernog rizika je 21 mesec; medijana TTFT u grupi visokog/vrlo visokog rizika je 3 meseca; B. PRS: medijana TTFT u grupi niskog/intermedijernog rizika je 38 meseci; medijana TTFT u grupi visokorizičnih pacijenata je 6 meseci; C. MDACC 2011: medijana TTFT kod pacijenata sa MDACC 2011 skorom ≤ 53.6 je 20 meseci; dok je medijana TTFT kod pacijenata sa MDACC 2011 skorom > 53.6 je 1 mesec.

Potom je urađena multivarijantna analiza u kojoj su analizirana sva tri prognostička modela. Pokazano je da su MDACC 2011 i CLL-IPI zadržali statističku značajnost u pogledu predikcije TTFT, s tim da je prognostička moć modela MDACC 2011 i u multivarijantnoj analizi ostala superiorna (multivarijantni Koksov hazardni regresioni model: HR 1.051; 95%CI 1.019-1.083; p=0.001 za MDACC 2011 i HR 1.493; 95%CI 1.071-2.083; p=0.018 za CLL-IPI). Sa druge strane PRS nije zadržao statističku značajnost na ovom nivou statističke analize (Tabela 11).

4.2.4. Predikcija OS pomoću skorova CLL-IPI, PRS i MDACC 2011

Sva tri prognostička modela koja su predmet ovog istraživanja uključena su i u analizu ukupnog preživljavanja. CLL-IPI je jedini među njima koji je pokazao statističku značajnost u pogledu prognoze ukupnog preživljavanja, kako u univarijantnoj (univarijantni Koksov hazardni regresioni model: HR 1.405; 95%CI 1.110-1.778; p=0.005), tako i u multivarijantnoj analizi (multivarijantni Koksov hazardni regresioni model: HR 1.657; 95%CI 1.113-2.468; p=0.013). PRS je ispoljio graničnu značajnost u univarijantnoj analizi (univarijantni Koksov hazardni regresioni model: HR 1.473; 95%CI 0.997-2.177; p=0.052), dok MDACC 2011 nije bio značajan. Ni PRS ni MDACC 2011 nisu pokazali značajnost sa aspekta predikcije OS u multivarijantnoj analizi. Rezultati analize prikazani su sumarno u Tabeli 12.

Tabela 12. Koksova regresiona analiza ukupnog preživljavanja (OS)

	Univarijantna analiza			Multivarijantna analiza		
	p	HR	95%CI	p	HR	95%CI
CLL-IPI	0.005	1.405	1.110-1.778	0.013	1.657	1.113-2.468
PRS	0.052	1.473	0.997-2.177	/	/	/
MDACC 2011	0.167	1.019	0.992-1.047	/	/	/

4.2.5 Predikcija PFS pomoću skorova CLL-IPI, PRS i MDACC 2011

Prognostički modeli su ispitani i u kontekstu preživljavanja bez progresije. Univarijantna analiza pokazala je da je CLL-IPI značajan prediktor PFS (univarijantni Koksov hazardni regresioni model: HR 1.347, 95%CI 1.020-1.778, $p=0.036$). Ovom analizom je pokazano da nema razlike u preživljavanju bez progresije između pacijenata sa nižim vrednostima PRS i MDACC 2011, u odnosu na pacijente koji su prema ovim prognostičkim modelima bili u grupama većeg rizika (univarijantni Koksov hazardni regresioni model: $p=0.146$ za PRS i $p=0.519$ za MDACC 2011). Ova analiza se odnosi na PFS nakon prve terapijske linije koja je, kao što je već rečeno, kod 47 pacijenata (82%) bila predstavljena FC protokolom, dok je u ostalim slučajevima to bio hlorambucil (4 pacijenta), CVP (4 pacijenta), alemtuzumab (1 pacijent) i splenektomija (1 pacijent).

4.3 POVEZANOST PROGNOŠTIČKIH MODELA CLL-IPI, PRS I MDACC2011 SA TERAPIJSKIM ODGOVOROM I NIVOOM EKSPRESIJE *SLC28A3* GENA

Pored značaja za anticipiranje TTFT, OS i PFS, ispitivali smo i prediktivnu vrednost prognostičkih modela CLL-IPI, PRS i MDACC 2011 u kontekstu odgovora na terapiju. U obzir su uzeti svi pacijenti koji su skorirani prema navedenim prognostičkim modelima, dok je njihov prediktivni značaj ispitivan u odnosu na prvu liniju terapije. U našoj kohorti nije dokazano da postoji razlika u odgovoru na terapiju (CR/PR vs SD/PD) kod pacijenata u grupama nižeg rizika u odnosu na pacijente u grupama višeg rizika prema prognostičkim modelima CLL-IPI (Fišerov test; $p=1.0$), PRS (Fišerov test; $p=0.619$) ili MDACC 2011 (Fišerov test; $p=0.277$).

Takođe, kada smo uporedili nivo ekspresije *SLC28A3* u različitim grupama rizika prema sva tri ispitivana prognostička modela (Tabela 10), nismo ustanovili da postoji značajna razlika (Man-Vitnijev test; $p=0.363$ za poređenje ekspresije *SLC28A3* između grupe nižeg i višeg rizika po CLL-IPI skor; $p=0.397$ za razliku u ekspresiji prema PRS i $p=0.824$ za MDACC 2011).

Važno je napomenuti da su pacijenti skorirani prema bilo kom od navedena tri prognostička u prvoj liniji terapije predominantno lečeni protokolom FC (35/38 pacijenata skoriranih prema CLL-IPI, 92%; 27/28 prema PRS, 96% i 36/42 prema MDACC 2011, 86%).

Kada smo uzeli u razmatranje samo pacijente koji su u prvoj liniji primali FC i ispitali uticaj vrednosti svakog od tri skora (grupe nižeg rizika *vs* grupe višeg rizika) na odgovor na terapiju FC protokolom u prvoj liniji, takođe nije pokazano da skorovi imaju prediktivnu vrednost u odnosu na ovu vrstu hemioterapije (Fišerov test; $p=1.0$ za CLL-IPI, $p=0.277$ za PRS i $p=0.402$ za MDACC 2011). Isto tako, nije postojala statistički značajna razlika u ekspresiji *SLC28A3* u grupama nižeg i višeg rizika prema sva tri ispitivana skora (Man-Vitnjev test; $p=0.195$ među grupama srednjeg i visokog/vrlo visokog rizika prema CLL-IPI skor; $p=0.156$ među grupama niskog/srednjeg i visokog rizika prema PRS i $p=0.409$ između grupe pacijenata sa vrednošću MDACC 2011 ≤ 53.6 i grupe sa skorom > 53.6).

5 DISKUSIJA

Izrazita heterogenost kliničkog toka hronične limfocitne leukemije (HLL) predstavlja jednu od njenih glavnih karakteristika. Ona je višeznačna, imajući u vidu da se odnosi na različite periode u trajanju bolesti. U današnje vreme, na samoj dijagnozi čak do 85% pacijenata su bez simptoma, odnosno u ranom kliničkom stadijumu, i ne zahtevaju lečenje prema aktuelnim međunarodnim preporukama (145). Prema nekim izvorima čak do 40% ovih pacijenata ostaju u ranoj fazi bolesti i umiru iz drugog razloga dostižući svoj puni životni vek. Ipak, većina njih pre ili kasnije razvije znake simptomatske bolesti i postaje predmet specifičnog hematološkog lečenja. Decenijama unazad se čine naponi da se predvidi priroda toka hronične limfocitne leukemije kod svakog individualnog pacijenta, i na taj način pokuša sprečiti napredovanje bolesti dok je ona još u ranoj fazi. U tu svrhu, pacijenti se stratifikuju shodno određenim kliničkim i biološkim karakteristikama i kod onih kod kojih se oceni da postoji visok rizik od progresije bolesti, u različitim epohama lečenja HLL-a primenjivana je različita terapija sa ciljem usporavanja ovog procesa i, konačno, produžetka ukupnog preživljavanja. Ovakvi pokušaji su činjeni od devedesetih godina prošlog veka do danas u sklopu tzv. ranih intervencionih studija koje su do sada za rezultat imale samo produžavanje vremena preživljavanja bez događaja (*event-free survival*, EFS), pri čemu događaj podrazumeva progresiju bolesti ili smrtni ishod (146-151). Ove studije su placebo-kontrolisane, a trenutno je aktivna studija Nemačke kooperativne grupe CLL12, u kojoj se kod asimptomatskih pacijenata srednjeg i visokog rizika bolesti primenjuje ibrutinib, ali za sada nema informacija o uticaju na ukupno preživljavanje (152). Osim ranih intervencionih studija, predviđanje progresije bolesti, odnosno vremena do prve terapije korisno je radi donošenja odluke o učestalosti kontrolnih pregleda tokom perioda praćenja, kao i zarad što sveobuhvatnijeg informisanja pacijenta o prirodi njegove bolesti (145).

Kada dođe do razvoja simptomatske hronične limfocitne leukemije i pacijent ispuni kriterijume za lečenje date od strane Međunarodne radne grupe za HLL, postavlja se ključno pitanje: koju terapiju primeniti? Odluka o modalitetu lečenja donosi se na

osnovu različitih faktora među kojima su jedni vezani za pacijenta (starosna dob, ECOG performans status, prisustvo komorbiditeta, stanje bubrežne funkcije), drugi za biologiju bolesti (različiti klinički, biohumoralni i molekularno-genetički markeri), a treći za terapiju (npr. pacijenti koji su rano relapsirali nakon imunohemioterapije kandidati su za nove ciljane lekove), o čemu je bilo dosta reči u uvodu rada. Svi ovi faktori se mogu svrstati u grupu prediktivnih biomarkera.

Najznačajniji prediktivni biomarker je status gena *TP53* i on je jedini koji, kao odlika malignog klona, ulazi u sve predložene algoritme terapijskog odlučivanja (90, 96). Njegov uticaj, kako na odgovor na konvencionalnu imunohemioterapiju, tako i na ukupnu prognozu pacijenata sa HLL-om nedvosmisleno je utvrđen i validiran u brojnim studijama (68).

Drugi važan biološki prediktivni marker vezan za maligni klon, odnosno za samu bolest, predstavlja mutacioni status *IGHV* gena. Međutim, iako je u nekim studijama utvrđeno da on, pored prognostičkog, nosi i prediktivni značaj u odnosu na standardnu imunohemioterapiju, još uvek nije deo međunarodnih preporuka kao marker na osnovu koga se bira modalitet lečenja (73, 74, 90, 94, 95).

U našoj studiji je broj pacijenata sa mutiranim i/ili deletiranim *TP53* iznosio 19.3% što je nešto više u odnosu na podatke iz literature (do 10% pacijenata pred započinjanje terapije), dok je odnos pacijenata sa nemutiranim i mutiranim *IGHV* bio 4:1, što je značajno veći udeo nemutiranih u odnosu na opštu HLL populaciju (31, 35, 38, 59, 153, 154). Ovi podaci oslikavaju u proseku biološki agresivniju prirodu bolesti kod pacijenata u našoj kohorti u odnosu na opštu HLL populaciju, što uzrokuje veći procenat pacijenata u intermedijernom i uznapredovalom stadijumu, kraće vreme do prve terapije i kraću medijanu ukupnog preživljavanja u odnosu na opštu HLL populaciju (2). Kao posledica svih ovih karakteristika razumljiv je i podatak da su svi pacijenti u kohorti lečeni, i da je značajan broj njih (dve trećine) nakon medijane praćenja od 6 godina završio smrtnim ishodom.

Osim navedenih bioloških prediktivnih markera, kada se donosi odluka o vrsti specifične hematološke terapije koja će biti primenjena kod svakog pacijenta, u obzir se uzima i njegova starosna dob, performans status, odnosno opšte stanje, prisustvo komorbiditeta i funkciju vitalnih organa. Ovi faktori reflektuju individualni biološki potencijal i igraju važnu ulogu pri donošenju odluke koliko intenzivnu terapiju treba

primeniti kod pojedinih pacijenata i kakav toksični profil lekova koje upotrebljavamo smatramo da pacijent može da podnese. Medijana starosne dobi na dijagnozi pacijenata u našoj kohorti je bila 56 godina (opseg 38-75), dok je medijana vrednosti komorbiditetnog indeksa CIRS (*Cumulative Illness Ratio Score*) iznosila 0 (opseg 0-7). Ovi podaci govore o značajnom biološkom potencijalu naših ispitanika, imajući u vidu da je medijana starosne dobi HLL pacijenta prema podacima iz literature oko 70 godina, dok se srednja vrednost CIRS-a u literaturi u različitim kohortama kreće od 2 (studija u kojoj je ispitivana razlika u primeni intenzivnih imunohemioterapijskih protokola u kojoj je kriterijum za uključenje bila vrednost $CIRS < 7$) do 8 ili više kada su u pitanju kohorte starijih pacijenata, što zavisi od prirode studije i njenih ciljeva (2, 97, 155). Dakle, pacijenti su u našoj kohorti u proseku bili mlađi i sa manje pridruženih bolesti što je i rezultiralo time da svi oni u nekom trenutku, a većina u prvoj liniji terapije, budu lečeni intenzivnijim terapijskim pristupom, odnosno protokolom FC.

Pored navedenih kliničkih parametara koji imaju ulogu prediktivnih markera na način na koji smo prethodno opisali, još jedna karakteristika vezana za pacijenta može predstavljati ključan prediktivni biomarker na osnovu koga se odlučuje o vrsti antileukemijske terapije. Ta karakteristika se odnosi na promene u farmakogenima (somatske i germinativne mutacije, aberantna ekspresija) koje dovode do poremećene farmakokinetike i farmakodinamike lekova od interesa i odlučujuće utiču na njihov efekat. Kao što je ranije rečeno, u hroničnoj limfocitnoj leukemiji uticaj farmakogena i njihovih produkata na efekat lečenja nije dovoljno ispitan.

U okviru ovog istraživanja, ispitivana su dva farmakogenetička markera kod pacijenata sa hroničnom limfocitnom leukemijom koji su lečeni kombinacijom fludarabina i ciklofosfamida: alel *CYP2B6**6, koji kodira varijantu enzima *CYP2B6* ključnog u metabolizmu ciklofosfamida, i nivo ekspresije gena *SLC28A3* koji kodira hCNT3, jedan od proteina koji su zaduženi za transport fludarabina i drugih purinskih i pirimidinskih nukleozida i njihovih derivata u ćeliju (105, 129). Cilj rada je bio da se ispita njihova povezanost sa odgovorom na terapiju FC protokolom kod pacijenata sa HLL. S obzirom da je status p53 od ranije poznat kao glavna determinanta efikasnosti terapije hemioterapijskom kombinacijom FC, u studiju su uključeni samo pacijenti koji su u momentu započinjanja lečenja FC protokolom imali funkcionalan *TP53* gen.

Alel *CYP2B6**6 detektovan je kod 54.6% pacijenata u našoj kohorti (od čega kod 52.3% pacijenata u heterozigotnom, a kod 2.3% u homozigotnom stanju), što je češće nego što se očekuje u opštoj populaciji belaca (120, 124). Ovakva učestalost alela *CYP2B6**6 može biti posledica relativno malog broja pacijenata u ispitivanoj kohorti. Sa druge strane, visoka incidence *CYP2B6**6 može upućivati na eventualnu povećanu sklonost ka razvoju hronične limfocitne leukemije kod osoba koje su nosioci ovog alela, tim pre što su određeni polimorfizmi nukleotidne sekvence i specifični haplotipovi gena *CYP2B6*, povezani sa sniženom enzimskom aktivnošću *CYP2B6*, već označeni kao faktori rizika za nastanak nekih solidnih tumora i hematoloških maligniteta (156-160).

Značaj farmakogenetike *CYP2B6* za ishod lečenja nije detaljnije ispitivan kada je u pitanju hronična limfocitna leukemija. Jedino istraživanje u kom je ispitivana prediktivna vrednost alela *CYP2B6**6 sprovedeno je od strane Džonsona i saradnika na pacijentima iz studije LRF CLL4 u kojoj je vršeno poređenje efikasnosti FC protokola u odnosu na monoterapiju fludarabinom, odnosno monoterapiju hlorambucilom (22, 129). Autori su pokazali da je prisustvo alela *CYP2B6**6 nezavisan prediktor slabijeg odgovora na FC, odnosno da nosioci *6 alela imaju manju šansu da postignu kompletnu remisiju nakon FC, kao i da imaju manje neželjenih događaja koji su posledica toksičnosti FC terapije u poređenju sa nosiocima *1/*1. Iz ovog rezultata je zaključeno da je kod pacijenata koji su nosioci bar jednog *6 alela efikasnost ciklofosfamida bila snižena, verovatno kao posledica njegove smanjene aktivacije usled snižene aktivnosti *CYP2B6* koji dominantno utiče na njegovo metabolisanje do citotoksičnih produkata. Pored toga, autori su uočili trend ka kraćem trajanju preživljavanja bez progresije bolesti (PFS) kod nosilaca *6 alela, iako bez dostizanja statističke značajnosti. Kao i u studiji Džonsona i saradnika, i u našoj studiji se nosioci alela *6 i *1/*1 nisu razlikovali u pogledu osnovnih kliničkih i bioloških karakteristika, kao i primenjene terapije. Međutim, nismo mogli da potvrdimo ostale rezultate opisane studije. U našoj kohorti nije potvrđena asocijacija između prisustva alela *CYP2B6**6 i odgovora na terapiju. Takođe, nije utvrđena veza između alela *6 i preživljavanja bez progresije i ukupnog preživljavanja. Moguće je da je uzrok neslaganja rezultata naše studije sa rezultatima Džonsona i saradnika značajna razlika u veličini kohorte između dve studije, imajući u vidu da su ove dve kohorte bile slične u pogledu odnosa polova i primenjenih doza

citostatika, što su karakteristike za koje je ranije opisano da utiču na farmakokinetiku ciklofosfamida (161-165).

Drugi deo našeg farmakogenetičkog ispitivanja kod pacijenata sa HLL-om odnosi se na ekspresiju gena *SLC28A3* koji kodira protein iz familije humanih koncentrativnih nukleozidnih transportera, hCNT3, jedan od odgovornih za preuzimanje fludarabina od strane ćelija. Snižena intracelularna akumulacija fludarabina je jedan od ranije predloženih mehanizama rezistencije na ovaj citostatik, a u nekoliko studija je pokazano da *SLC28A3* ispoljava vezu sa odgovorom na terapiju fludarabinom (104, 105). Naime, u ovim studijama je utvrđeno da pacijenti sa HLL-om koji eksprimiraju visok nivo *SLC28A3* iRNK imaju manju šansu da postignu kompletnu remisiju i imaju kraće preživljavanje bez progresije nakon lečenja fludarabinom u monoterapiji u odnosu na pacijente sa niskim nivoima iRNK ovog gena (105). Nadalje, kvantifikacijom hCNT3 proteina u zahvaćenim tkivima HLL pacijenata (limfni čvorovi, slezina, jetra ili koštana srž) bioptiranim pre otpočinjanja lečenja došlo se do saznanja da su viši nivoi hCNT3 povezani sa kraćim PFS i trendom ka slabijem terapijskom odgovoru kod pacijenata koji su lečeni fludarabinom (166).

Rezultati našeg rada pokazuju da ekspresija *SLC28A3* na sličan način utiče na odgovor na lečenje kombinacijom FC. Utvrđeno je da je nivo iRNK *SLC28A3* gena, meren u uzorcima koji su prikupljeni pre započinjanja primene FC protokola, značajan prediktor odgovora na ovu terapiju. Naime, u našoj kohorti je postojala je skoro 10 puta veća verovatnoća da pacijenti kod kojih je *SLC28A3* bio visoko eksprimiran ne odgovore na terapiju FC protokolom u odnosu na pacijente koji su imali nisku ekspresiju ovog gena (OR=9.8; p=0.046). U univarijantnoj analizi, ekspresija *SLC28A3* i linija terapije u kojoj je FC primenjen su jedine varijable koje su bile povezane sa odgovorom na lečenje. U multivarijantnoj analizi kontrolisanoj za starosnu dob, Bine stadijum, deleciju 11q i liniju terapije u kojoj je primenjen FC, samo je visoka ekspresija *SLC28A3* pokazala trend ka nepostizanju odgovora na FC, ali bez dostizanja statističke značajnosti (OR=8.77; p=0.082). Treba napomenuti da nije uočena asocijacija ekspresije *SLC28A3* sa bilo kojim od kliničkih parametara i molekularnih prognostičkih biomarkera, tako da dve grupe pacijenata (sa nižom i onih sa višom ekspresijom) nisu bile značajno različite po pitanju osnovnih kliničko-laboratorijskih i molekularno-genetičkih karakteristika. Ipak, za razliku od prethodnih studija, u našoj

kohorti nismo detektovali povezanost između nivoa ekspresije *SLC28A3* i dužine preživljavanja bez progresije (PFS) i ukupnog preživljavanja (OS). Činjenica da se korelacija između ekspresije *SLC28A3* i odgovora na FC protokol nije odrazila i na razlike u PFS i OS između slučajeva sa niskom i sa visokom ekspresijom ukazuje na to da je efekat *SLC28A3* kratkotrajan i ograničen samo na period primene leka.

Naizgled paradoksalna veza između visokih nivoa hCNT3 proteina i rezistencije na fludarabin umesto očekivanog potenciranja njegovog efekta donekle je razjašnjena otkrićem da hCNT3 nije lokalizovan u plazmamembrani HLL ćelija, već u citosolu i intraćelijskim membranama, kao i da u ovim ćelijama nema detektabilnog nukleozidnog transporta posredovanog hCNT3 proteinom (105, 106). Uzevši ovo u obzir, Meki i saradnici su predložili tri moguća objašnjenja ovakve veze ekspresije hCNT3 sa odgovorom na terapiju fludarabinom: 1) visoka ekspresija hCNT3 je samo biološki marker subpopulacije HLL ćelija koje su rezistentne na fludarabin; 2) povećana ekspresija gena za hCNT3 je u korelaciji sa ekspresijom drugih gena koji su medijatori rezistencije na fludarabin i 3) povećana ekspresija gena za hCNT3 može dovesti do njegovog nagomilavanja u membranama ćelijskih organela, prvenstveno mitohondrijalnim, što može direktno uticati na toksičnost fludarabina (105). Zanimljiv je podatak da ATRA (*all-trans*-retinočna kiselina), koja se koristi u lečenju akutne promijelocitne leukemije, indukuje translokaciju prisutnog hCNT3 proteina u plazmamembranu u MEC1 ćelijskoj liniji i primarnim HLL ćelijama putem mehanizma zavisnog od transformišućeg faktora rasta $\beta 1$, dovodeći do povećanog transporta fludarabina posredstvom hCNT3 i povećane senzitivnosti na ovaj lek (167, 168). Imajući u vidu navedene tvrdnje, ATRA se može razmotriti kao dodatak terapiji baziranoj na purinskim analogima u cilju prevazilaženja rezistencije na fludarabin putem jačanja kapaciteta HLL ćelija da preuzimaju ovaj lek. Pokušaj da se na ovaj način prevaziđe rezistencija na fludarabin imao bi utemeljenje samo u slučaju da postoji funkcionalan *TP53*, čime bi se isključio glavni danas poznati mehanizam rezistencije na standardnu hemioterapiju, uključujući i purinske analoge.

Kao što je već rečeno, među najznačajnijim komplikacijama kliničkog toka hronične limfocitne leukemije su autoimuna hemolizna anemija (AIHA) i Rihterov sindrom (RS). Njihov nastanak se kod nekih autora povezuje sa primenom fludarabina, odnosno kombinacija koje se su zasnovane na ovom citostatiku (20, 27). U ovom radu

smo pokazali da je snižena ekspresija *SLC28A3*, pored toga što je udružena sa snažnijim terapijskim efektom fludarabina, povezana i sa češćim nastankom autoimune hemolizne anemije tokom ili nakon primene terapije FC protokolom. Medijana relativne ekspresije iRNK *SLC28A3* gena u našoj kohorti je bila 7 puta veća kod pacijenata koji nisu ispoljili AIHA-u ili su je ispoljili u periodu pre lečenja, u odnosu na pacijente kod kojih se ova komplikacija javila tokom ili nakon primene FC (0.042 RU vs 0.006 RU; $p=0.002$). Nismo pronašli podatke u literaturi koji povezuju farmakogenetiku sa nastankom autoimune hemolizne anemije za koju postoji sumnja da je povezana sa primenom određene terapije, u ovom slučaju fludarabina. Na osnovu naših rezultata može se pretpostaviti da je kod pacijenata sa povišenom ekspresijom *SLC28A3* razlog manje učestalosti AIHA-e nastale po primeni fludarabina umanjeno sveukupno dejstvo ovog leka koje, sa druge strane, dovodi i do slabijeg terapijskog efekta. Imajući u vidu da je primarni predloženi mehanizam nastanka AIHA-e provocirane fludarabinom deplecija određenih subsetova regulatornih T ćelija, da bi se razjasnila veza između ekspresije gena za hCNT3 i pojave AIHA-e nakon primene fludarabina, bilo bi poželjno izmeriti ekspresiju u svim mononuklearnim ćelijama posebno, naročito u različitim subsetovima limfocita (21).

U našoj kohorti kod 5 pacijenata je došlo do razvoja Rihterovog sindroma, i to u svim slučajevima nakon prethodnog lečenja FC protokolom. Ipak, nismo dokazali povezanost između ekspresije *SLC28A3* i nastanka RS u našoj studiji. Iako je u jednom istraživanju pokazano da pacijenti koji su lečeni kombinacijom purinskog analoga i alkilirajućeg agensa imaju 3 puta veći rizik od razvoja RS, ovaj nalaz nije potvrđen u drugim studijama, te se ne može sa sigurnošću reći da je prethodna primena FC jedan od faktora nastanka RS (22, 27, 28). U prilog odsustva ove veze posredno mogu govoriti i rezultati naše studije.

Predviđanje kliničkog toka hronične limfocitne leukemije jedan je od glavnih izazova sa kojim se srećemo u svakodnevnoj kliničkoj praksi, i predstavlja jedan od osnova personalizovanog terapijskog pristupa. Osnovne kliničke, biološke i molekularno-genetičke karakteristike svakog individualnog pacijenta koriste se u različitim kombinacijama u cilju anticipacije progresije bolesti što je preciznije moguće. Sa tom svrhom u poslednje vreme je razvijeno nekoliko prognostičkih modela, u prvom

redu za predviđanje vremena do prve terapije (TTFT) i ukupnog preživljavanja (OS) (34-38, 76).

U ovom delu našeg istraživanja analizirane su varijable koje ulaze u sastav prognostičkih modela CLL-IPI, PRS i MDACC 2011 i ispitivana prognostička vrednost navedenih skorova u pogledu TTFT i OS.

Naši rezultati su potvrdili prediktivnu vrednost sva tri ispitivana prognostička modela u pogledu TTFT, s tim da se kao najsnažniji prediktor izdvojio MDACC 2011. Pacijenti koji su imali vrednost MDACC 2011 skora preko 53.6, koliko je iznosila medijana vrednosti skora, lečeni su u proseku mesec dana nakon postavljanja dijagnoze, dok su oni sa skorom ≤ 53.6 bili u asimptomatskoj fazi bolesti, bez indikacije za lečenjem, skoro dve godine od dijagnoze. Potrebno je naglasiti da su pacijenti u našoj kohorti ispoljili u proseku agresivniji tok bolesti u odnosu na pacijente u kohortama iz literature koje su do sada bile predmet sličnih analiza. Ova agresivnost se ogleda u činjenici da su naši pacijenti bili pretežno u grupi srednjeg i visokog rizika prema skorovima CLL-IPI i PRS. Takođe, medijana vrednosti MDACC 2011 skora od 53.6 je značajno viša u odnosu na originalnu MDACC kohortu i druge grupe pacijenata u kojima je ovaj skor validiran (35, 42, 169). Pokazatelj biološki agresivnije prirode naše kohorte je i procenat pacijenata sa nemutiranim *IGHV* od 80%, što je značajno više nego u opštoj HLL populaciji gde se kreće između 45% i 65% (35, 38, 59, 153, 154). Stoga nije iznenađujuće što su naši pacijenti ispunili kriterijume za lečenje u proseku 5.5 meseci po postavljanju dijagnoze, a većina njih završila smrtnim ishodom tokom šestogodišnjeg praćenja. I pored svega navedenog, sva tri analizirana prognostička modela (CLL-IPI, PRS i MDACC 2011) su bili dobri prediktori kraćeg TTFT u grupama visokorizičnih pacijenata u odnosu na grupe nižeg rizika (3 vs 21 mesec za CLL-IPI, $p=0.074$; 6 vs 38 meseci za PRS, $p=0.007$ i 1 vs 20 meseci za MDACC 2011, $p=0.001$). Multivarijantna analiza je pokazala da je MDACC 2011 najsnažniji prediktor vremena do prve terapije.

Pregledom literature se može utvrditi da je ovo druga studija u kojoj su, između ostalih, poređeni skorovi CLL-IPI i MDACC 2011 u pogledu TTFT. Prvi put je to nedavno uradio Molika sa saradnicima koji je poređio 5 različitih prognostičkih modela prema njihovoj moći da predvide TTFT (170). U ovoj studiji pokazana je blaga prednost PRS u odnosu na ostala 4 ispitivana modela u studiji, među kojima su bili i

CLL-IPI i MDACC 2011. Kada posmatramo samo ova dva poslednja, rezultati navedene studije daju prednost MDACC 2011 skoru u predikciji TTFT, što je u skladu sa našim rezultatima (170). Ova studija je takođe jasno pokazala da su prognostički modeli definisani i kliničko-laboratorijskim i molekularno-genetičkim parametrima precizniji u predikciji TTFT nego oni koji se sastoje od varijabli koje reflektuju samo opterećenje tumorskom masom, kao što je MDACC 2007 (77, 171). Prilikom poređenja CLL-IPI, PRS i MDACC 2011 u pogledu predikcije TTFT treba imati u vidu da je CLL-IPI primarno osmišljen i dizajniran sa ciljem predikcije ukupnog preživljavanja, dok su druga dva prognostička modela razvijena radi procene vremena do prve terapije (35, 37, 38). Iako su PRS i MDACC 2011 konstruisani i validirani u grupama asimptomatskih pacijenata u ranom stadijumu bolesti, naši rezultati pokazuju da se oni jednako mogu koristiti i među pacijentima sa agresivnijim profilom HLL.

Po pitanju ukupnog preživljavanja, pokazano je da je u našoj kohorti CLL-IPI značajan prediktor kako u univarijantnoj, tako i u multivarijantnoj analizi. PRS je ispoljio graničnu značajnost samo u univarijantnoj analizi, dok se MDACC 2011 nije pokazao značajnim u pogledu predikcije OS. Kao što je već rečeno, PRS i MDACC 2011 nisu originalno konstruisani u svrhu predviđanja OS, za razliku od CLL-IPI skora (35, 37, 38). Međutim, imajući u vidu činjenicu da su kao elementi sva tri skora prisutne slične kliničke i molekularno-genetičke varijable, postavlja se pitanje da li se i PRS i MDACC 2011 mogu koristiti za procenu ukupnog preživljavanja. Da bismo mogli da damo odgovor na ovo pitanje, moramo uzeti u obzir da su MDACC 2011 i PRS razvijeni u kohortama asimptomatskih pacijenata, bez indikacije za terapiju, dok je CLL-IPI proizvod meta-analize na oko 3500 pacijenata iz 9 prospektivnih kliničkih studija, od kojih je 8 kao kriterijum za uključenje imalo aktivnu, odnosno simptomatsku bolest (38). Ukoliko bliže sagledamo varijable skorova PRS i MDACC 2011, videćemo da 3 od 4 varijable PRS skora (stadijum, ALC i $\beta 2m$) i 5 od 6 varijabli MDACC 2011 skora (del11q, del17p, LDH, broj zahvaćenih limfonodalnih regija i prečnik najvećeg vratnog limfnog čvora) mogu evoluirati od perioda asimptomatske bolesti do momenta kada se steknu indikacije za započinjanje lečenja. S obzirom da je MDACC 2011 nastao iz kompleksnog matematičkog modela razvijenog na parametrima asimptomatskih pacijenata, a imajući u vidu i rezultate naše studije, možemo pretpostaviti da je MDACC 2011 ipak neupotrebljiv za predikciju ukupnog preživljavanja. Sa druge

strane, PRS je pokazao graničnu značajnost u predviđanju OS, što nam daje osnov za pretpostavku da, u donekle izmenjenoj strukturi (npr. uključivanje pacijenata sa uznapredovalim stadijumom, podizanje *cut-off* vrednosti za ALC) i na većem broju pacijenata, ima elemenata da PRS bude ispitan i u pogledu ukupnog preživljavanja.

Već je bilo reči u ovom odeljku o svrsi anticipacije vremena do prve terapije. Raniji pokušaji lečenja asimptomatskih pacijenata u ranom stadijumu doneli su samo produžen interval bez događaja bez uticaja na preživljavanje, što je obeshrabilo istraživače da nastave ispitivanja u tom pravcu (146-151, 172). Međutim, razvoj novih ciljanih lekova i njihov dokazan efekat kod pacijenata sa visokorizičnim karakteristikama, nametnuo je potrebe da se ponovo razmotri ovakav terapijski pristup pacijentima visokog, pa čak i intermedijernog rizika u ranom stadijumu bolesti u cilju sprečavanja klonalne evolucije i, konačno, produžavanja asimptomatske faze bolesti i ukupnog preživljavanja (173). Razvoj novih lekova prati i razvoj različitih prognostičkih modela koji imaju za cilj da što precizije stratifikuju pacijente prema riziku od progresije, među kojima su i skorovi koje smo ispitivali u našem radu. Napredak u oba ova aspekta koja se tiču praćenja i lečenja HLL pacijenata predstavlja dobru osnovu za dizajniranje kvalitetnih ranih intervencionih studija (152). Ukoliko se pokaže da se ovakvim terapijskim pristupom može produžiti preživljavanje u hroničnoj limfocitnoj leukemiji, predikcija vremena do prve terapije će biti od velike važnosti u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

Pored prognostičkog značaja skorova CLL-IPI, PRS i MDACC 2011, u ovom radu ispitana je i njihova prediktivna vrednost. Najpre je analizirana povezanost vrednosti sva tri skora sa preživljavanjem bez progresije (PFS) nakon prve linije terapije. Analizom su obuhvaćeni svi pacijenti iz kohorte, nezavisno od terapije koja je primenjena u prvoj liniji, s tim da treba imati na umu da je 82% pacijenata u prvoj liniji lečeno FC protokolom. Rezultati su pokazali da je CLL-IPI dobar prediktor dužine trajanja odgovora na terapiju ($p=0.036$), dok PRS i MDACC 2011 nisu bili značajni. Iako terapija u prvoj liniji nije bila uniformna, naši rezultati su saglasni sa oskudnim podacima iz literature, s tim da je značaj CLL-IPI skora u drugim studijama bio analiziran kod pacijenata koji su primali isključivo imunoheмотerapiju, ali u većini slučajeva na bazi purinskih analoga (174). Druga dva prognostička modela do sada nisu ispitivana u pogledu predikcije PFS, kao ni OS.

Kada je u pitanju sposobnost predikcije odgovora na terapiju, nijedan od tri ispitivana prognostička modela nije pokazao značajnost, kako prilikom analize na celoj osnovnoj kohorti, tako i kada su u obzir uzeti samo pacijenti koji su u prvoj liniji terapije primali FC.

U literaturi nema podataka o eventualnom značaju prognostičkih modela u predikciji odgovora na terapiju. Od svih konstituenata ispitivanih prognostičkih modela, prema literaturnim podacima samo je mutacija/delecija *TP53* gena snažno povezana sa hemorefraktarnošću, dok za ostale varijable ne postoje čvrsti dokazi u tom kontekstu (88, 175-178). Sa druge strane, naši rezultati su pokazali da ne postoji povezanost nivoa rizika prema ispitivanim prognostičkim modelima sa ekspresijom *SLC28A3* koja je, pak, ispoljila značajnu asocijaciju sa odgovorom na FC terapiju. Naime, pokazano je da nema statistički značajne razlike u ekspresiji *SLC28A3* u grupama nižeg i višeg rizika prema CLL-IPI, PRS i MDACC 2011 prognostičkim modelima. Pri interpretaciji ovog nalazi treba imati u vidu činjenicu da se u slučaju varijabli koje čine navedene skorove, izuzev starosne dobi pacijenta, radi o parametrima koji reflektuju biologiju malignog klona i aktivnost same bolesti, dok je ekspresija *SLC28A3* farmakogenetički marker za koji u literaturi ne postoji podatak da je povezan sa patogenezom hronične limfocitne leukemije i njenim kliničkim tokom pre primene terapije.

U ovom istraživanju potvrđena je prognostička vrednost skorova CLL-IPI, PRS i MDACC 2011 u pogledu predikcije vremena do prve terapije, a u slučaju CLL-IPI skora i ukupnog preživljavanja. PRS je u kontekstu ukupnog preživljavanja ispoljio graničnu značajnost što bi mogla biti osnova za njegovo dalje ispitivanje u ovom pravcu. Sa druge strane, nije dokazana prediktivna vrednost prognostičkih modela, izuzev CLL-IPI skora, u pogledu predikcije vremena bez progresije nakon primene hemioterapije. Sudeći po rezultatima ove studije, ekspresija *SLC28A3* ima visok potencijal kao prediktivni biomarker u lečenju hronične limfocitne leukemije terapijama zasnovanim na fludarabinu, s obzirom da je pokazana njena snažna povezanost sa odgovorom na FC protokol. Odsustvo povezanosti prognostičkih skorova sa ekspresijom *SLC28A3* ukazuje na to da ovi rizikofaktori odražavaju potpuno različite aspekte bolesti i njenog lečenja. U našoj studiji, ekspresija *SLC28A3* se pokazala kao

striktno prediktivni marker, čiji je efekat bio ograničen na terapijski odgovor i nije se dalje odrazio na preživljavanje. Validacija na većim kohortama i standardizacija metoda merenja ekspresije *SLC28A3* su neophodne kako bi se potvrdila prediktivna moć ovog molekularnog markera i njegova primenljivost za stratifikaciju pacijenata u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

6 ZAKLJUČCI

1. Prisustvo *CYP2B6**6 varijantnog alela nije povezano sa odgovorom na terapiju fludarabinom i ciklofosamidom (FC), kao ni sa vremenom do progresije bolesti niti sa ukupnim preživljavanjem.
2. Ekspresija iRNK *SLC28A3* gena u mononuklearnim ćelijama izolovanim iz uzoraka periferne krvi pacijenata uzetih pre započinjanja lečenja FC protokolom je bila statistički značajno veća kod pacijenata koji nisu odgovorili na terapiju (za ishod lečenja su imali stabilnu bolest ili progresiju) u odnosu na pacijente koji su odgovorili na terapiju (postignuta parcijalna ili kompletna remisija).

Ekspresija *SLC28A3* je dobar prediktor odgovora na terapiju FC. Pacijenti sa niskom ekspresijom *SLC28A3* pre započinjanja lečenja su imali 9.8 puta veću šansu da odgovore na terapiju FC u odnosu na pacijente sa visokom ekspresijom.

Nivo ekspresije *SLC28A3* nije bio povezan sa preživljavanjem bez progresije i ukupnim preživljavanjem, što znači da je efekat ekspresije *SLC28A3* kratkotrajan i ograničen samo na vreme primene FC.

3. Utvrđeno je da je kod pacijenata kod kojih je došlo do razvoja autoimune hemolizne anemije (AIHA) tokom ili nakon primene terapije FC medijana nivoa relativne ekspresije *SLC28A3* bila 7 puta niža u odnosu na pacijente koji nisu imali AIHA ili su je razvili u periodu pre primene hemioterapije.
4. Nije uočena povezanost nivoa ekspresije *SLC28A3* pre primene FC protokola sa razvojem Rihterovog sindroma nakon lečenja.

5. Potvrđena je prognostička vrednost prognostičkih modela CLL-IPI, PRS i MDACC 2011 u pogledu predikcije vremena do prve terapije (TTFT), s tim da je MDACC 2011 potvrđen kao najsnažniji prediktor TTFT.

CLL-IPI je jedini prediktor ukupnog preživljavanja (OS) potvrđen u univarijantnoj i multivarijantnoj analizi. PRS je pokazao graničnu statističku značajnost u pogledu predikcije OS, dok MDACC 2011 nije bio značajan.

6. Pokazano je da CLL-IPI jedini ima prediktivnu snagu u pogledu predviđanja vremena do progresije bolesti (PFS) nakon primene hemioterapije u prvoj liniji. PRS i MDACC 2011 nisu bili značajni kao prediktori PFS.
7. Utvrđeno je da ne postoji povezanost nivoa rizika procenjenog prognostičkim modelima CLL-IPI, PRS i MDACC 2011 sa nivoom ekspresije *SLC28A3* pre započinjanja lečenja, kako unutar cele osnovne kohorte, tako i u grupi u kojoj su bili samo pacijenti koji su primali FC u prvoj liniji terapije.

7 LITERATURA

1. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 1995;333(16):1052-7. Epub 1995/10/19. doi: 10.1056/NEJM199510193331606. PubMed PMID: 7675049.
2. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol.* 2017;92(9):946-65. Epub 2017/08/08. doi: 10.1002/ajh.24826. PubMed PMID: 28782884.
3. Noone AM, Cronin KA, Altekruse SF, Howlader N, Lewis DR, Petkov VI, et al. Cancer Incidence and Survival Trends by Subtype Using Data from the Surveillance Epidemiology and End Results Program, 1992-2013. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2017;26(4):632-41. Epub 2016/12/14. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-16-0520. PubMed PMID: 27956436; PubMed Central PMCID: PMC5380602.
4. Strati P, Jain N, O'Brien S. Chronic Lymphocytic Leukemia: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2018;93(5):651-64. Epub 2018/05/08. doi: 10.1016/j.mayocp.2018.03.002. PubMed PMID: 29728204.
5. Hallek M, Shanafelt TD, Eichhorst B. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet.* 2018;391(10129):1524-37. Epub 2018/02/27. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30422-7. PubMed PMID: 29477250.
6. Slager SL, Benavente Y, Blair A, Vermeulen R, Cerhan JR, Costantini AS, et al. Medical history, lifestyle, family history, and occupational risk factors for chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2014;2014(48):41-51. Epub 2014/09/01. doi: 10.1093/jncimonographs/igu001. PubMed PMID: 25174025; PubMed Central PMCID: PMC4155456.
7. Radivoyevitch T, Sachs RK, Gale RP, Smith MR, Hill BT. Ionizing radiation exposures in treatments of solid neoplasms are not associated with subsequent

-
- increased risks of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2016;43:9-12. Epub 2016/02/29. doi: 10.1016/j.leukres.2016.02.008. PubMed PMID: 26922774.
8. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature.* 2015;526(7574):525-30. Epub 2015/10/16. doi: 10.1038/nature15395. PubMed PMID: 26466571; PubMed Central PMCID: PMC4815041.
 9. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood.* 2018;131(25):2745-60. Epub 2018/03/16. doi: 10.1182/blood-2017-09-806398. PubMed PMID: 29540348.
 10. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol.* 1997;108(4):378-82. Epub 1997/10/10. PubMed PMID: 9322589.
 11. Palumbo GA, Parrinello N, Fargione G, Cardillo K, Chiarenza A, Berretta S, et al. CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2009;33(9):1212-6. Epub 2009/02/24. doi: 10.1016/j.leukres.2009.01.017. PubMed PMID: 19230971.
 12. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood.* 1996;87(12):4990-7. PubMed PMID: 8652811.
 13. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood.* 2008;111(12):5446-56. Epub 2008/01/25. doi: 10.1182/blood-2007-06-093906. PubMed PMID: 18216293; PubMed Central PMCID: PMC4815041.
 14. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms.
-

- Blood. 2016;127(20):2375-90. Epub 2016/03/17. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569. PubMed PMID: 26980727; PubMed Central PMCID: PMC4874220.
15. Dungarwalla M, Matutes E, Dearden CE. Prolymphocytic leukaemia of B- and T-cell subtype: a state-of-the-art paper. *Eur J Haematol.* 2008;80(6):469-76. Epub 2008/03/12. doi: 10.1111/j.1600-0609.2008.01069.x. PubMed PMID: 18331594.
 16. Diehl LF, Ketchum LH. Autoimmune disease and chronic lymphocytic leukemia: autoimmune hemolytic anemia, pure red cell aplasia, and autoimmune thrombocytopenia. *Semin Oncol.* 1998;25(1):80-97. Epub 1998/03/03. PubMed PMID: 9482530.
 17. Hodgson K, Ferrer G, Pereira A, Moreno C, Montserrat E. Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukaemia: diagnosis and treatment. *Br J Haematol.* 2011;154(1):14-22. Epub 2011/05/04. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08707.x. PubMed PMID: 21534942.
 18. Di Raimondo F, Giustolisi R, Cacciola E, O'Brien S, Kantarjian H, Robertson LB, et al. Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia patients treated with fludarabine. *Leuk Lymphoma.* 1993;11(1-2):63-8. Epub 1993/09/01. doi: 10.3109/10428199309054731. PubMed PMID: 8220155.
 19. Myint H, Copplestone JA, Orchard J, Craig V, Curtis D, Prentice AG, et al. Fludarabine-related autoimmune haemolytic anaemia in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 1995;91(2):341-4. Epub 1995/10/01. PubMed PMID: 8547072.
 20. Weiss RB, Freiman J, Kweder SL, Diehl LF, Byrd JC. Hemolytic anemia after fludarabine therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 1998;16(5):1885-9. Epub 1998/05/20. doi: 10.1200/JCO.1998.16.5.1885. PubMed PMID: 9586905.
 21. D'Arena G, Cascavilla N. Chronic lymphocytic leukemia-associated autoimmune hemolytic anemia. *Leuk Lymphoma.* 2007;48(6):1072-80. Epub 2007/06/20. doi: 10.1080/10428190701344923. PubMed PMID: 17577769.
 22. Catovsky D, Richards S, Matutes E, Oscier D, Dyer M, Bezares RF, et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial.

-
- Lancet. 2007;370(9583):230-9. Epub 2007/07/31. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61125-8. PubMed PMID: 17658394.
23. Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G, Pasold R, Hensel M, Steinbrecher C, et al. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006;107(3):885-91. Epub 2005/10/13. doi: 10.1182/blood-2005-06-2395. PubMed PMID: 16219797.
24. Jain N, Keating MJ. Richter transformation of CLL. *Expert Rev Hematol*. 2016;9(8):793-801. Epub 2016/06/29. doi: 10.1080/17474086.2016.1199948. PubMed PMID: 27351634.
25. Vitale C, Ferrajoli A. Richter Syndrome in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2016;11(1):43-51. Epub 2016/02/03. doi: 10.1007/s11899-016-0300-y. PubMed PMID: 26830086.
26. Chigrinova E, Rinaldi A, Kwee I, Rossi D, Rancoita PM, Strefford JC, et al. Two main genetic pathways lead to the transformation of chronic lymphocytic leukemia to Richter syndrome. *Blood*. 2013;122(15):2673-82. Epub 2013/09/06. doi: 10.1182/blood-2013-03-489518. PubMed PMID: 24004666.
27. Parikh SA, Rabe KG, Call TG, Zent CS, Habermann TM, Ding W, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (Richter syndrome) in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL): a cohort study of newly diagnosed patients. *Br J Haematol*. 2013;162(6):774-82. Epub 2013/07/12. doi: 10.1111/bjh.12458. PubMed PMID: 23841899; PubMed Central PMCID: PMC4098845.
28. Solh M, Rai KR, Peterson BL, Kolitz JE, Appelbaum FR, Tallman MS, et al. The impact of initial fludarabine therapy on transformation to Richter syndrome or prolymphocytic leukemia in patients with chronic lymphocytic leukemia: analysis of an intergroup trial (CALGB 9011). *Leuk Lymphoma*. 2013;54(2):252-4. Epub 2012/08/18. doi: 10.3109/10428194.2012.710327. PubMed PMID: 22897733; PubMed Central PMCID: PMC4098845.
29. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219-34. Epub 1975/08/01. PubMed PMID: 1139039.
-

-
30. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981;48(1):198-206. Epub 1981/07/01. PubMed PMID: 7237385.
 31. Gaidano G, Rossi D. The mutational landscape of chronic lymphocytic leukemia and its impact on prognosis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2017;2017(1):329-37. Epub 2017/12/10. doi: 10.1182/asheducation-2017.1.329. PubMed PMID: 29222275; PubMed Central PMCID: PMC6142556 consulted for, received honoraria from, and has been affiliated with the speakers' bureaus for AbbVie, Gilead, Janssen, Roche, Morphosys, and Amgen. D.R. has received research funding and honoraria from AbbVie, Gilead, Janssen, and Roche.
 32. Ballman KV. Biomarker: Predictive or Prognostic? *J Clin Oncol*. 2015;33(33):3968-71. Epub 2015/09/24. doi: 10.1200/JCO.2015.63.3651. PubMed PMID: 26392104.
 33. Minden M. Is It Time to Redefine Prognostic and Predictive in Oncology? *J Clin Oncol*. 2016;34(14):1702-3. Epub 2016/03/16. doi: 10.1200/JCO.2015.66.3815. PubMed PMID: 26976412.
 34. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, Faderl S, Ferrajoli A, Do KA, et al. Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007;109(11):4679-85. Epub 2007/02/15. doi: 10.1182/blood-2005-12-051458. PubMed PMID: 17299097.
 35. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, Faderl S, Ferrajoli A, Do KA, et al. Multivariable model for time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29(31):4088-95. Epub 2011/10/05. doi: 10.1200/JCO.2010.33.9002. PubMed PMID: 21969505; PubMed Central PMCID: PMC4876352.
 36. Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD, Eichhorst BF, Bergmann MA, Elter T, et al. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;124(1):49-62. Epub 2014/05/07. doi: 10.1182/blood-2014-02-556399. PubMed PMID: 24797299; PubMed Central PMCID: PMC4260976.
-

-
37. Gentile M, Shanafelt TD, Cutrona G, Molica S, Tripepi G, Alvarez I, et al. A progression-risk score to predict treatment-free survival for early stage chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia*. 2016;30(6):1440-3. Epub 2015/12/10. doi: 10.1038/leu.2015.333. PubMed PMID: 26648537.
 38. International CLLIPIwg. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2016;17(6):779-90. Epub 2016/05/18. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30029-8. PubMed PMID: 27185642.
 39. Matthews C, Catherwood MA, Morris TC, Kettle PJ, Drake MB, Gilmore WS, et al. Serum TK levels in CLL identify Binet stage A patients within biologically defined prognostic subgroups most likely to undergo disease progression. *Eur J Haematol*. 2006;77(4):309-17. Epub 2006/07/22. doi: 10.1111/j.1600-0609.2006.00707.x. PubMed PMID: 16856923.
 40. Sarfati M, Chevret S, Chastang C, Biron G, Stryckmans P, Delespesse G, et al. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1996;88(11):4259-64. Epub 1996/12/01. PubMed PMID: 8943862.
 41. Qin S, Fan L, Liang J, Gale R, Miao Y, Wu Y, et al. Definition of disease-progression risk stratification in untreated chronic lymphocytic leukemia using combined clinical, molecular and virological variables. *Hematol Oncol*. 2018;36(4):656-62. Epub 2018/06/15. doi: 10.1002/hon.2520. PubMed PMID: 29901220.
 42. Molica S, Giannarelli D, Levato L, Mirabelli R, Gentile M, Lentini M, et al. A prognostic algorithm including a modified version of MD Anderson Cancer Center (MDACC) score predicts time to first treatment of patients with clinical monoclonal lymphocytosis (cMBL)/Rai stage 0 chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Int J Hematol*. 2014;100(3):290-5. Epub 2014/07/30. doi: 10.1007/s12185-014-1634-7. PubMed PMID: 25064370.
 43. Tsimberidou AM, O'Brien S, Khouri I, Giles FJ, Kantarjian HM, Champlin R, et al. Clinical outcomes and prognostic factors in patients with Richter's syndrome treated with chemotherapy or chemoimmunotherapy with or without stem-cell
-

- transplantation. *J Clin Oncol*. 2006;24(15):2343-51. Epub 2006/05/20. doi: 10.1200/JCO.2005.05.0187. PubMed PMID: 16710033.
44. Jain P, O'Brien S. Richter's transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology (Williston Park)*. 2012;26(12):1146-52. Epub 2013/02/19. PubMed PMID: 23413591.
 45. Simonsson B, Wibell L, Nilsson K. Beta 2-microglobulin in chronic lymphocytic leukaemia. *Scand J Haematol*. 1980;24(2):174-80. Epub 1980/02/01. PubMed PMID: 6154964.
 46. Keating MJ. Chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 1999;26(5 Suppl 14):107-14. Epub 1999/11/24. PubMed PMID: 10561025.
 47. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, Busch R, Senekowitsch R, Stern S, et al. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma*. 1996;22(5-6):439-47. Epub 1996/08/01. doi: 10.3109/10428199609054782. PubMed PMID: 8882957.
 48. Pratt G, Thomas P, Marden N, Alexander D, Davis Z, Hussey D, et al. Evaluation of serum markers in the LRF CLL4 trial: beta2-microglobulin but not serum free light chains, is an independent marker of overall survival. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(10):2342-50. Epub 2016/01/07. doi: 10.3109/10428194.2015.1137291. PubMed PMID: 26732125.
 49. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, Wierda WG, Grever MR, Byrd JC, et al. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;112(5):1923-30. Epub 2008/06/26. doi: 10.1182/blood-2007-05-092882. PubMed PMID: 18577710; PubMed Central PMCID: PMC2518894.
 50. Liu Y, Wang Y, Yang J, Bi Y, Wang H. ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia: A meta-analysis. *Clin Chim Acta*. 2018;483:82-8. Epub 2018/04/24. doi: 10.1016/j.cca.2018.04.026. PubMed PMID: 29680229.
 51. Bulian P, Shanafelt TD, Fegan C, Zucchetto A, Cro L, Nuckel H, et al. CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2014;32(9):897-904. Epub 2014/02/12. doi:

-
- 10.1200/JCO.2013.50.8515. PubMed PMID: 24516016; PubMed Central PMCID: PMC4876311.
52. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2003;348(18):1764-75. Epub 2003/05/02. doi: 10.1056/NEJMoa023143. PubMed PMID: 12724482.
53. Krober A, Bloehdorn J, Hafner S, Buhler A, Seiler T, Kienle D, et al. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2006;24(6):969-75. Epub 2006/01/19. doi: 10.1200/JCO.2005.03.7184. PubMed PMID: 16418492.
54. Krober A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Bruckle E, Lichter P, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002;100(4):1410-6. Epub 2002/08/01. PubMed PMID: 12149225.
55. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, et al. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev.* 2008;88(3):841-86. Epub 2008/07/16. doi: 10.1152/physrev.00035.2007. PubMed PMID: 18626062.
56. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood.* 2002;99(3):1023-9. Epub 2002/01/25. PubMed PMID: 11807008.
57. Thunberg U, Johnson A, Roos G, Thorn I, Tobin G, Sallstrom J, et al. CD38 expression is a poor predictor for VH gene mutational status and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2001;97(6):1892-4. Epub 2001/03/27. PubMed PMID: 11263438.
58. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999;94(6):1840-7. Epub 1999/09/09. PubMed PMID: 10477712.
-

-
59. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1848-54. Epub 1999/09/09. PubMed PMID: 10477713.
 60. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343(26):1910-6. Epub 2001/01/03. doi: 10.1056/NEJM200012283432602. PubMed PMID: 11136261.
 61. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-9. Epub 2002/11/16. doi: 10.1073/pnas.242606799. PubMed PMID: 12434020; PubMed Central PMCID: PMCPMC137750.
 62. Rossi D, Rasi S, Spina V, Bruscaggin A, Monti S, Ciardullo C, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(8):1403-12. Epub 2012/12/18. doi: 10.1182/blood-2012-09-458265. PubMed PMID: 23243274; PubMed Central PMCID: PMCPMC3578955.
 63. Strati P, Abruzzo LV, Wierda WG, O'Brien S, Ferrajoli A, Keating MJ. Second cancers and Richter transformation are the leading causes of death in patients with trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015;15(7):420-7. Epub 2015/03/25. doi: 10.1016/j.clml.2015.02.001. PubMed PMID: 25800543; PubMed Central PMCID: PMCPMC4874253.
 64. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376(9747):1164-74. Epub 2010/10/05. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61381-5. PubMed PMID: 20888994.
 65. Badoux XC, Keating MJ, Wang X, O'Brien SM, Ferrajoli A, Faderl S, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab chemoimmunotherapy is highly effective treatment for relapsed patients with CLL. *Blood*. 2011;117(11):3016-24.
-

- Epub 2011/01/20. doi: 10.1182/blood-2010-08-304683. PubMed PMID: 21245487; PubMed Central PMCID: PMCPMC4123386.
66. Brown JR, Hillmen P, O'Brien S, Barrientos JC, Reddy NM, Coutre SE, et al. Extended follow-up and impact of high-risk prognostic factors from the phase 3 RESONATE study in patients with previously treated CLL/SLL. *Leukemia*. 2018;32(1):83-91. Epub 2017/06/09. doi: 10.1038/leu.2017.175. PubMed PMID: 28592889; PubMed Central PMCID: PMCPMC5770586.
 67. Lozano-Santos C, Garcia-Vela JA, Perez-Sanz N, Nova-Gurumeta S, Fernandez-Cuevas B, Gomez-Lozano N, et al. Biallelic ATM alterations detected at diagnosis identify a subset of treatment-naive chronic lymphocytic leukemia patients with reduced overall survival similar to patients with p53 deletion. *Leuk Lymphoma*. 2017;58(4):859-65. Epub 2016/08/09. doi: 10.1080/10428194.2016.1213829. PubMed PMID: 27499002.
 68. Buccheri V, Barreto WG, Fogliatto LM, Capra M, Marchiani M, Rocha V. Prognostic and therapeutic stratification in CLL: focus on 17p deletion and p53 mutation. *Ann Hematol*. 2018;97(12):2269-78. Epub 2018/10/14. doi: 10.1007/s00277-018-3503-6. PubMed PMID: 30315344.
 69. Condoluci A, Rossi D. Genetic mutations in chronic lymphocytic leukemia: impact on clinical treatment. *Expert Rev Hematol*. 2019. Epub 2019/01/29. doi: 10.1080/17474086.2019.1575130. PubMed PMID: 30686074.
 70. Edelmann J, Gribben JG. Managing Patients With TP53-Deficient Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of oncology practice*. 2017;13(6):371-7. doi: 10.1200/JOP.2017.023291. PubMed PMID: 28605616.
 71. Agathangelidis A, Rosenquist R, Davi F, Ghia P, Belessi C, Hadzidimitriou A, et al. Immunoglobulin Gene Analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Methods Mol Biol*. 2019;1881:51-62. Epub 2018/10/24. doi: 10.1007/978-1-4939-8876-1_5. PubMed PMID: 30350197.
 72. Sutton LA, Hadzidimitriou A, Baliakas P, Agathangelidis A, Langerak AW, Stilgenbauer S, et al. Immunoglobulin genes in chronic lymphocytic leukemia: key to understanding the disease and improving risk stratification. *Haematologica*. 2017;102(6):968-71. Epub 2017/06/02. doi: 10.3324/haematol.2017.165605. PubMed PMID: 28566340; PubMed Central PMCID: PMCPMC5451327.

-
73. Fischer K, Bahlo J, Fink AM, Goede V, Herling CD, Cramer P, et al. Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood*. 2016;127(2):208-15. Epub 2015/10/22. doi: 10.1182/blood-2015-06-651125. PubMed PMID: 26486789.
 74. Rossi D, Terzi-di-Bergamo L, De Paoli L, Cerri M, Ghilardi G, Chiarenza A, et al. Molecular prediction of durable remission after first-line fludarabine-cyclophosphamide-rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015;126(16):1921-4. Epub 2015/08/16. doi: 10.1182/blood-2015-05-647925. PubMed PMID: 26276669; PubMed Central PMCID: PMC4743433.
 75. Puiggros A, Collado R, Calasanz MJ, Ortega M, Ruiz-Xiville N, Rivas-Delgado A, et al. Patients with chronic lymphocytic leukemia and complex karyotype show an adverse outcome even in absence of TP53/ATM FISH deletions. *Oncotarget*. 2017;8(33):54297-303. Epub 2017/09/15. doi: 10.18632/oncotarget.17350. PubMed PMID: 28903342; PubMed Central PMCID: PMC5589581.
 76. Delgado J, Doubek M, Baumann T, Kotaskova J, Molica S, Mozas P, et al. Chronic lymphocytic leukemia: A prognostic model comprising only two biomarkers (IGHV mutational status and FISH cytogenetics) separates patients with different outcome and simplifies the CLL-IPI. *Am J Hematol*. 2017;92(4):375-80. Epub 2017/01/26. doi: 10.1002/ajh.24660. PubMed PMID: 28120419.
 77. Munoz-Novas C, Poza-Santaella M, Gonzalez-Gascon YMI, Hernandez-Sanchez M, Rodriguez-Vicente AE, Infante MS, et al. The International Prognostic Index for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia Has the Higher Value in Predicting Overall Outcome Compared with the Barcelona-Brno Biomarkers Only Prognostic Model and the MD Anderson Cancer Center Prognostic Index. *Biomed Res Int*. 2018;2018:9506979. Epub 2018/05/08. doi: 10.1155/2018/9506979. PubMed PMID: 29736400; PubMed Central PMCID: PMC5874971.
 78. Gentile M, Shanafelt TD, Mauro FR, Laurenti L, Rossi D, Molica S, et al. Comparison between the CLL-IPI and the Barcelona-Brno prognostic model: Analysis of 1299 newly diagnosed cases. *Am J Hematol*. 2018;93(2):E35-E7. Epub 2017/11/04. doi: 10.1002/ajh.24960. PubMed PMID: 29098721.
-

-
79. Molica S, Shanafelt TD, Giannarelli D, Gentile M, Mirabelli R, Cutrona G, et al. The chronic lymphocytic leukemia international prognostic index predicts time to first treatment in early CLL: Independent validation in a prospective cohort of early stage patients. *Am J Hematol.* 2016;91(11):1090-5. Epub 2016/10/21. doi: 10.1002/ajh.24493. PubMed PMID: 27465919; PubMed Central PMCID: PMC5072993.
 80. Flinn IW, Byrd JC, Morrison C, Jamison J, Diehl LF, Murphy T, et al. Fludarabine and cyclophosphamide with filgrastim support in patients with previously untreated indolent lymphoid malignancies. *Blood.* 2000;96(1):71-5. Epub 2000/07/13. PubMed PMID: 10891432.
 81. O'Brien SM, Kantarjian HM, Cortes J, Beran M, Koller CA, Giles FJ, et al. Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2001;19(5):1414-20. Epub 2001/03/07. doi: 10.1200/JCO.2001.19.5.1414. PubMed PMID: 11230486.
 82. Hallek M, Schmitt B, Wilhelm M, Busch R, Krober A, Fostitsch HP, et al. Fludarabine plus cyclophosphamide is an efficient treatment for advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL): results of a phase II study of the German CLL Study Group. *Br J Haematol.* 2001;114(2):342-8. Epub 2001/09/01. PubMed PMID: 11529853.
 83. Bauer K, Rancea M, Roloff V, Elter T, Hallek M, Engert A, et al. Rituximab, ofatumumab and other monoclonal anti-CD20 antibodies for chronic lymphocytic leukaemia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;11:CD008079. Epub 2012/11/16. doi: 10.1002/14651858.CD008079.pub2. PubMed PMID: 23152253.
 84. Arnason JE, Brown JR. Targeting B Cell Signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Oncol Rep.* 2017;19(9):61. Epub 2017/07/30. doi: 10.1007/s11912-017-0620-7. PubMed PMID: 28755313.
 85. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015;26 Suppl 5:v78-84. Epub 2015/09/01. doi: 10.1093/annonc/mdv303. PubMed PMID: 26314781.
 86. Parikh SA, Strati P, Tsang M, West CP, Shanafelt TD. Should IGHV status and FISH testing be performed in all CLL patients at diagnosis? A systematic review
-

- and meta-analysis. *Blood*. 2016;127(14):1752-60. Epub 2016/02/05. doi: 10.1182/blood-2015-10-620864. PubMed PMID: 26841802.
87. Jain N, O'Brien S. Initial treatment of CLL: integrating biology and functional status. *Blood*. 2015;126(4):463-70. Epub 2015/06/13. doi: 10.1182/blood-2015-04-585067. PubMed PMID: 26065656; PubMed Central PMCID: PMC4624441.
88. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Habe S, Winkler D, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(29):4473-9. Epub 2010/08/11. doi: 10.1200/JCO.2009.27.8762. PubMed PMID: 20697090.
89. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Dohner K, et al. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood*. 2014;123(21):3247-54. Epub 2014/03/22. doi: 10.1182/blood-2014-01-546150. PubMed PMID: 24652989.
90. Committee EG. Appendix 4: Chronic lymphocytic leukaemia: eUpdate published online 27 June 2017 (www.esmo.org/Guidelines/Haematological-Malignancies). *Ann Oncol*. 2017;28(suppl_4):iv149-iv52. Epub 2017/09/09. doi: 10.1093/annonc/mdx242. PubMed PMID: 28881925.
91. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2014;370(11):997-1007. Epub 2014/01/24. doi: 10.1056/NEJMoa1315226. PubMed PMID: 24450857; PubMed Central PMCID: PMC4161365.
92. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Burger JA, Blum KA, Coleman M, et al. Three-year follow-up of treatment-naïve and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. *Blood*. 2015;125(16):2497-506. Epub 2015/02/24. doi: 10.1182/blood-2014-10-606038. PubMed PMID: 25700432; PubMed Central PMCID: PMC4400288.
93. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(4):311-22. Epub 2015/12/08. doi: 10.1056/NEJMoa1513257. PubMed PMID: 26639348.
94. Thompson PA, Tam CS, O'Brien SM, Wierda WG, Stingo F, Plunkett W, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term

- disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016;127(3):303-9. Epub 2015/10/24. doi: 10.1182/blood-2015-09-667675. PubMed PMID: 26492934; PubMed Central PMCID: PMC4760129.
95. O'Brien S, Furman RR, Coutre S, Flinn IW, Burger JA, Blum K, et al. Single-agent ibrutinib in treatment-naive and relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: a 5-year experience. *Blood*. 2018;131(17):1910-9. Epub 2018/02/14. doi: 10.1182/blood-2017-10-810044. PubMed PMID: 29437592; PubMed Central PMCID: PMC5921964.
96. Wierda WG, Byrd JC, Abramson JS, Bilgrami SF, Bociiek G, Brander D, et al. NCCN Guidelines Insights: Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma, Version 2.2019. *J Natl Compr Canc Netw*. 2019;17(1):12-20. Epub 2019/01/20. doi: 10.6004/jnccn.2019.0002. PubMed PMID: 30659125.
97. Eichhorst B, Fink AM, Bahlo J, Busch R, Kovacs G, Maurer C, et al. First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(7):928-42. Epub 2016/05/25. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30051-1. PubMed PMID: 27216274.
98. Goede V, Cramer P, Busch R, Bergmann M, Stauch M, Hopfinger G, et al. Interactions between comorbidity and treatment of chronic lymphocytic leukemia: results of German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group trials. *Haematologica*. 2014;99(6):1095-100. Epub 2014/03/04. doi: 10.3324/haematol.2013.096792. PubMed PMID: 24584349; PubMed Central PMCID: PMC4040914.
99. Relling MV, Evans WE. Pharmacogenomics in the clinic. *Nature*. 2015;526(7573):343-50. Epub 2015/10/16. doi: 10.1038/nature15817. PubMed PMID: 26469045; PubMed Central PMCID: PMC4711261.
100. Alving AS, Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science*. 1956;124(3220):484-5. Epub 1956/09/14. PubMed PMID: 13360274.
101. Dunnenberger HM, Crews KR, Hoffman JM, Caudle KE, Broeckel U, Howard SC, et al. Preemptive clinical pharmacogenetics implementation: current programs

- in five US medical centers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015;55:89-106. Epub 2014/10/09. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010814-124835. PubMed PMID: 25292429; PubMed Central PMCID: PMC4607278.
102. Zenz T, Habe S, Denzel T, Mohr J, Winkler D, Buhler A, et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood.* 2009;114(13):2589-97. Epub 2009/08/01. doi: 10.1182/blood-2009-05-224071. PubMed PMID: 19643983.
103. Johnson GG, Carr DF, Pirmohamed M, Pettitt AR. Pharmacogenetics in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: what does the future hold? *Pharmacogenomics.* 2014;15(7):897-900. Epub 2014/06/24. doi: 10.2217/pgs.14.60. PubMed PMID: 24956241.
104. Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia.* 2001;15(6):875-90. Epub 2001/06/22. PubMed PMID: 11417472.
105. Mackey JR, Galmarini CM, Graham KA, Joy AA, Delmer A, Dabbagh L, et al. Quantitative analysis of nucleoside transporter and metabolism gene expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL): identification of fludarabine-sensitive and -insensitive populations. *Blood.* 2005;105(2):767-74. Epub 2004/09/30. doi: 10.1182/blood-2004-03-1046. PubMed PMID: 15454483.
106. Molina-Arcas M, Bellosillo B, Casado FJ, Montserrat E, Gil J, Colomer D, et al. Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2003;101(6):2328-34. Epub 2002/11/02. doi: 10.1182/blood-2002-07-2236. PubMed PMID: 12411296.
107. Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch.* 2004;447(5):735-43. Epub 2003/07/03. doi: 10.1007/s00424-003-1103-2. PubMed PMID: 12838422.
108. Young JD. The SLC28 (CNT) and SLC29 (ENT) nucleoside transporter families: a 30-year collaborative odyssey. *Biochem Soc Trans.* 2016;44(3):869-76. Epub 2016/06/11. doi: 10.1042/BST20160038. PubMed PMID: 27284054.

-
109. Molina-Arcas M, Casado FJ, Pastor-Anglada M. Nucleoside transporter proteins. *Curr Vasc Pharmacol*. 2009;7(4):426-34. Epub 2009/06/03. PubMed PMID: 19485885.
 110. Shryock JC, Belardinelli L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol*. 1997;79(12A):2-10. Epub 1997/06/19. PubMed PMID: 9223356.
 111. Musa H, Dobrzynski H, Berry Z, Abidi F, Cass CE, Young JD, et al. Immunocytochemical demonstration of the equilibrative nucleoside transporter rENT1 in rat sinoatrial node. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(3):305-9. Epub 2002/02/19. doi: 10.1177/002215540205000302. PubMed PMID: 11850433.
 112. Gray JH, Owen RP, Giacomini KM. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch*. 2004;447(5):728-34. Epub 2003/07/12. doi: 10.1007/s00424-003-1107-y. PubMed PMID: 12856181.
 113. Ritzel MW, Ng AM, Yao SY, Graham K, Loewen SK, Smith KM, et al. Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *J Biol Chem*. 2001;276(4):2914-27. Epub 2000/10/18. doi: 10.1074/jbc.M007746200. PubMed PMID: 11032837.
 114. Plagemann PG, Aran JM. Characterization of Na⁽⁺⁾-dependent, active nucleoside transport in rat and mouse peritoneal macrophages, a mouse macrophage cell line and normal rat kidney cells. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1028(3):289-98. Epub 1990/10/19. PubMed PMID: 2223800.
 115. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6(11):638-47. Epub 2009/09/30. doi: 10.1038/nrclinonc.2009.146. PubMed PMID: 19786984.
 116. Jones RJ, Barber JP, Vala MS, Collector MI, Kaufmann SH, Ludeman SM, et al. Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood*. 1995;85(10):2742-6. Epub 1995/05/15. PubMed PMID: 7742535.
 117. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation.
-

-
- Pharmacol Ther. 2013;138(1):103-41. Epub 2013/01/22. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.007. PubMed PMID: 23333322.
118. Mittal B, Tulsyan S, Kumar S, Mittal RD, Agarwal G. Cytochrome P450 in Cancer Susceptibility and Treatment. *Adv Clin Chem.* 2015;71:77-139. Epub 2015/09/29. doi: 10.1016/bs.acc.2015.06.003. PubMed PMID: 26411412.
119. Chang TK, Weber GF, Crespi CL, Waxman DJ. Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Res.* 1993;53(23):5629-37. Epub 1993/12/01. PubMed PMID: 8242617.
120. Zanger UM, Klein K. Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance. *Frontiers in genetics.* 2013;4:24. doi: 10.3389/fgene.2013.00024. PubMed PMID: 23467454; PubMed Central PMCID: PMC3588594.
121. Desta Z, Saussele T, Ward B, Blievernicht J, Li L, Klein K, et al. Impact of CYP2B6 polymorphism on hepatic efavirenz metabolism in vitro. *Pharmacogenomics.* 2007;8(6):547-58. Epub 2007/06/15. doi: 10.2217/14622416.8.6.547. PubMed PMID: 17559344.
122. Hofmann MH, Blievernicht JK, Klein K, Saussele T, Schaeffeler E, Schwab M, et al. Aberrant splicing caused by single nucleotide polymorphism c.516G>T [Q172H], a marker of CYP2B6*6, is responsible for decreased expression and activity of CYP2B6 in liver. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;325(1):284-92. Epub 2008/01/04. doi: 10.1124/jpet.107.133306. PubMed PMID: 18171905.
123. Tsuchiya K, Gatanaga H, Tachikawa N, Teruya K, Kikuchi Y, Yoshino M, et al. Homozygous CYP2B6 *6 (Q172H and K262R) correlates with high plasma efavirenz concentrations in HIV-1 patients treated with standard efavirenz-containing regimens. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;319(4):1322-6. Epub 2004/06/15. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.05.116. PubMed PMID: 15194512.
124. Lang T, Klein K, Fischer J, Nussler AK, Neuhaus P, Hofmann U, et al. Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics.* 2001;11(5):399-415. Epub 2001/07/27. PubMed PMID: 11470993.
-

-
125. Zhang H, Sridar C, Kenaan C, Amunugama H, Ballou DP, Hollenberg PF. Polymorphic variants of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6.4-CYP2B6.9) exhibit altered rates of metabolism for bupropion and efavirenz: a charge-reversal mutation in the K139E variant (CYP2B6.8) impairs formation of a functional cytochrome p450-reductase complex. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;338(3):803-9. Epub 2011/06/11. doi: 10.1124/jpet.111.183111. PubMed PMID: 21659470; PubMed Central PMCID: PMC3164347.
 126. Ariyoshi N, Ohara M, Kaneko M, Afuso S, Kumamoto T, Nakamura H, et al. Q172H replacement overcomes effects on the metabolism of cyclophosphamide and efavirenz caused by CYP2B6 variant with Arg262. *Drug Metab Dispos*. 2011;39(11):2045-8. Epub 2011/08/09. doi: 10.1124/dmd.111.039586. PubMed PMID: 21821736.
 127. Xu C, Ogburn ET, Guo Y, Desta Z. Effects of the CYP2B6*6 allele on catalytic properties and inhibition of CYP2B6 in vitro: implication for the mechanism of reduced efavirenz metabolism and other CYP2B6 substrates in vivo. *Drug Metab Dispos*. 2012;40(4):717-25. Epub 2012/01/11. doi: 10.1124/dmd.111.042416. PubMed PMID: 22232427; PubMed Central PMCID: PMC3310426.
 128. Xie HJ, Yasar U, Lundgren S, Griskevicius L, Terelius Y, Hassan M, et al. Role of polymorphic human CYP2B6 in cyclophosphamide bioactivation. *Pharmacogenomics J*. 2003;3(1):53-61. Epub 2003/03/12. doi: 10.1038/sj.tpj.6500157. PubMed PMID: 12629583.
 129. Johnson GG, Lin K, Cox TF, Oates M, Sibson DR, Eccles R, et al. CYP2B6*6 is an independent determinant of inferior response to fludarabine plus cyclophosphamide in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;122(26):4253-8. Epub 2013/10/17. doi: 10.1182/blood-2013-07-516666. PubMed PMID: 24128861.
 130. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*. 1994;8(10):1640-5. Epub 1994/10/01. PubMed PMID: 7523797.
-

-
131. Dopsaj V. Organizacija hematološke laboratorije. Automatizacija u hematološkim laboratorijama. U: Petrović M, urednik. Laboratorijska hematologija. Beograd: Grafika Jureš; 2002. str. 29-45.
 132. Labar B. Osnovne tehnike u laboratorijskoj hematologiji. U: Labar B et al, urednici. Hematologija. Zagreb: Školska knjiga; 1998; str. 237-250.
 133. Rodwel VW. Kinetičke osobine enzima. U: Harper et al, urednici. Pregled fiziološke hemije. Beograd: Savremena administracija; 1982; str. 89-90.
 134. European Leukemia Net - WP-10, Consensual recommendations on preanalytical precautions for the immunophenotyping of leukemia and lymphoproliferative disorders. 2005a.
 135. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document H43-A2 – Clinical Flow Cytometric Analysis of Neoplastic Hematolymphoid Cells; Approved Guideline – [Second Edition 2007].
 136. European Leukemia Net - WP-10, Consensual European immunophenotyping panels for leukemia. 2005b.
 137. European Leukemia Net - WP-10, Antibody combinations and flow cytometry. 2007.
 138. Bene MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia*. 2011;25(4):567-74. Epub 2011/01/22. doi: 10.1038/leu.2010.312. PubMed PMID: 21252983.
 139. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Eds.): WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC: Lyon 2008.
 140. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, Trbusek M, Rossi D, Kater AP, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2012;26(7):1458-61. Epub 2012/02/03. doi: 10.1038/leu.2012.25. PubMed PMID: 22297721.
 141. Malcikova J, Tausch E, Rossi D, Sutton LA, Soussi T, Zenz T, et al. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia-update on methodological approaches and results interpretation. *Leukemia*.
-

-
- 2018;32(5):1070-80. doi: 10.1038/s41375-017-0007-7. PubMed PMID: 29467486; PubMed Central PMCID: PMC5940638.
142. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stilgenbauer S, Stevenson F, et al. ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2007;21(1):1-3. Epub 2006/12/15. doi: 10.1038/sj.leu.2404457. PubMed PMID: 17167526.
143. Rosenquist R, Ghia P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Agathangelidis A, Baliakas P, et al. Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: updated ERIC recommendations. *Leukemia*. 2017;31(7):1477-81. Epub 2017/04/26. doi: 10.1038/leu.2017.125. PubMed PMID: 28439111; PubMed Central PMCID: PMC5508071.
144. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Cloning, A Laboratory Manual*, Second edition ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
145. Baliakas P, Mattsson M, Stamatopoulos K, Rosenquist R. Prognostic indices in chronic lymphocytic leukaemia: where do we stand how do we proceed? *J Intern Med*. 2016;279(4):347-57. Epub 2015/12/29. doi: 10.1111/joim.12455. PubMed PMID: 26709197.
146. Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dempster S, Hallek M, Adorf D, et al. Interferon-alpha 2b (IFN alpha) for early-phase chronic lymphocytic leukaemia with high risk for disease progression: results of a randomized multicentre study. *Br J Haematol*. 1996;94(2):362-9. Epub 1996/08/01. PubMed PMID: 8759897.
147. Dighiero G, Maloum K, Desablens B, Cazin B, Navarro M, Leblay R, et al. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 1998;338(21):1506-14. Epub 1998/05/21. doi: 10.1056/NEJM199805213382104. PubMed PMID: 9593789.
148. Hoehstetter MA, Busch R, Eichhorst B, Buhler A, Winkler D, Eckart MJ, et al. Early, risk-adapted treatment with fludarabine in Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: results of the CLL1 trial of the German CLL study group. *Leukemia*. 2017;31(12):2833-7. Epub 2017/08/15. doi: 10.1038/leu.2017.246. PubMed PMID: 28804126.
-

-
149. Zent CS, Call TG, Shanafelt TD, Tschumper RC, Jelinek DF, Bowen DA, et al. Early treatment of high-risk chronic lymphocytic leukemia with alemtuzumab and rituximab. *Cancer*. 2008;113(8):2110-8. Epub 2008/09/02. doi: 10.1002/cncr.23824. PubMed PMID: 18759253; PubMed Central PMCID: PMCPMC2849723.
 150. Zent CS, Call TG, Bowen DA, Conte MJ, LaPlant BR, Witzig TE, et al. Early treatment of high risk chronic lymphocytic leukemia with alemtuzumab, rituximab and poly-(1-6)-beta-glucotriosyl-(1-3)- beta-glucopyranose beta-glucan is well tolerated and achieves high complete remission rates. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(8):2373-8. Epub 2015/02/14. doi: 10.3109/10428194.2015.1016932. PubMed PMID: 25676035; PubMed Central PMCID: PMCPMC4573786.
 151. Ferrajoli A, Keating MJ, O'Brien S, Cortes J, Thomas DA. Experience with rituximab immunotherapy as an early intervention in patients with Rai stage 0 to II chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2011;117(14):3182-6. Epub 2011/01/20. doi: 10.1002/cncr.25853. PubMed PMID: 21246526; PubMed Central PMCID: PMCPMC4401466.
 152. Langerbeins P, Bahlo J, Rhein C, Cramer P, Pflug N, Fischer K, et al. The CLL12 trial protocol: a placebo-controlled double-blind Phase III study of ibrutinib in the treatment of early-stage chronic lymphocytic leukemia patients with risk of early disease progression. *Future Oncol*. 2015;11(13):1895-903. Epub 2015/07/15. doi: 10.2217/fon.15.95. PubMed PMID: 26161926.
 153. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Rossi D, Minga E, Villamor N, et al. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2015;29(2):329-36. Epub 2014/06/20. doi: 10.1038/leu.2014.196. PubMed PMID: 24943832.
 154. Shanafelt TD, Rabe KG, Kay NE, Zent CS, Jelinek DF, Reinalda MS, et al. Age at diagnosis and the utility of prognostic testing in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2010;116(20):4777-87. Epub 2010/06/26. doi: 10.1002/cncr.25292. PubMed PMID: 20578179; PubMed Central PMCID: PMCPMC3902481.
 155. Gordon MJ, Churnetski M, Alqahtani H, Rivera X, Kittai A, Amrock SM, et al. Comorbidities predict inferior outcomes in chronic lymphocytic leukemia treated
-

- with ibrutinib. *Cancer*. 2018;124(15):3192-200. Epub 2018/05/26. doi: 10.1002/cncr.31554. PubMed PMID: 29797667.
156. Justenhoven C, Pentimalli D, Rabstein S, Harth V, Lotz A, Pesch B, et al. CYP2B6*6 is associated with increased breast cancer risk. *Int J Cancer*. 2014;134(2):426-30. Epub 2013/07/05. doi: 10.1002/ijc.28356. PubMed PMID: 23824676; PubMed Central PMCID: PMC3883876.
157. Berkoz M, Yalin S. Association of CYP2B6 G15631T polymorphism with acute leukemia susceptibility. *Leuk Res*. 2009;33(7):919-23. Epub 2009/01/16. doi: 10.1016/j.leukres.2008.11.014. PubMed PMID: 19144407.
158. Yuan ZH, Liu Q, Zhang Y, Liu HX, Zhao J, Zhu P. CYP2B6 gene single nucleotide polymorphisms and leukemia susceptibility. *Ann Hematol*. 2011;90(3):293-9. Epub 2010/09/30. doi: 10.1007/s00277-010-1085-z. PubMed PMID: 20878158.
159. Daraki A, Zachaki S, Koromila T, Diamantopoulou P, Pantelias GE, Sambani C, et al. The G(5)(1)(6)T CYP2B6 germline polymorphism affects the risk of acute myeloid leukemia and is associated with specific chromosomal abnormalities. *PLoS One*. 2014;9(2):e88879. Epub 2014/03/04. doi: 10.1371/journal.pone.0088879. PubMed PMID: 24586425; PubMed Central PMCID: PMC3933334.
160. Daraki A, Kakosaiou K, Zachaki S, Sambani C, Aleporou-Marinou V, Kollia P, et al. Polymorphisms and haplotypes of the CYP2B6 detoxification gene in the predisposition of Acute Myeloid Leukemia (AML) and induction of its cytogenetic abnormalities. *Cancer Genet*. 2016;209(11):525-33. Epub 2016/11/21. doi: 10.1016/j.cancergen.2016.10.004. PubMed PMID: 27865701.
161. Gandhi M, Aweeka F, Greenblatt RM, Blaschke TF. Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:499-523. Epub 2004/01/28. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121453. PubMed PMID: 14744256.
162. Lamba V, Lamba J, Yasuda K, Strom S, Davila J, Hancock ML, et al. Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression. *J Pharmacol*

- Exp Ther. 2003;307(3):906-22. Epub 2003/10/11. doi: 10.1124/jpet.103.054866. PubMed PMID: 14551287.
163. Ren S, Kalthorn TF, McDonald GB, Anasetti C, Appelbaum FR, Slattery JT. Pharmacokinetics of cyclophosphamide and its metabolites in bone marrow transplantation patients. *Clin Pharmacol Ther.* 1998;64(3):289-301. Epub 1998/10/03. doi: 10.1016/S0009-9236(98)90178-3. PubMed PMID: 9757153.
164. Chang TK, Yu L, Maurel P, Waxman DJ. Enhanced cyclophosphamide and ifosfamide activation in primary human hepatocyte cultures: response to cytochrome P-450 inducers and autoinduction by oxazaphosphorines. *Cancer Res.* 1997;57(10):1946-54. Epub 1997/05/15. PubMed PMID: 9157990.
165. McCune JS, Salinger DH, Vicini P, Oglesby C, Blough DK, Park JR. Population pharmacokinetics of cyclophosphamide and metabolites in children with neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Pharmacol.* 2009;49(1):88-102. Epub 2008/10/18. doi: 10.1177/0091270008325928. PubMed PMID: 18927240; PubMed Central PMCID: PMCPMC2652687.
166. Tsang RY, Santos C, Ghosh S, Dabbagh L, King K, Young J, et al. Immunohistochemistry for human concentrative nucleoside transporter 3 protein predicts fludarabine sensitivity in chronic lymphocytic leukemia. *Mod Pathol.* 2008;21(11):1387-93. Epub 2008/07/08. doi: 10.1038/modpathol.2008.110. PubMed PMID: 18604194.
167. Fernandez-Calotti P, Pastor-Anglada M. All-trans-retinoic acid promotes trafficking of human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) to the plasma membrane by a TGF-beta1-mediated mechanism. *J Biol Chem.* 2010;285(18):13589-98. Epub 2010/02/23. doi: 10.1074/jbc.M109.055673. PubMed PMID: 20172853; PubMed Central PMCID: PMCPMC2859520.
168. Fernandez-Calotti PX, Lopez-Guerra M, Colomer D, Pastor-Anglada M. Enhancement of fludarabine sensitivity by all-trans-retinoic acid in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica.* 2012;97(6):943-51. Epub 2011/12/20. doi: 10.3324/haematol.2011.051557. PubMed PMID: 22180426; PubMed Central PMCID: PMCPMC3366664.
169. Molica S, Giannarelli D, Gentile M, Cutrona G, Di Renzo N, Di Raimondo F, et al. External validation on a prospective basis of a nomogram for predicting the

- time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2013;119(6):1177-85. Epub 2012/12/12. doi: 10.1002/cncr.27900. PubMed PMID: 23224939.
170. Molica S, Giannarelli D, Levato L, Mirabelli R, Gentile M, Morabito F. Assessing time to first treatment in early chronic lymphocytic leukemia (CLL): a comparative performance analysis of five prognostic models with inclusion of CLL-international prognostic index (CLL-IPI). *Leuk Lymphoma*. 2017;58(7):1736-9. Epub 2016/11/24. doi: 10.1080/10428194.2016.1257791. PubMed PMID: 27875912.
171. Gentile M, Shanafelt TD, Rossi D, Laurenti L, Mauro FR, Molica S, et al. Validation of the CLL-IPI and comparison with the MDACC prognostic index in newly diagnosed patients. *Blood*. 2016;128(16):2093-5. Epub 2016/08/24. doi: 10.1182/blood-2016-07-728261. PubMed PMID: 27549308; PubMed Central PMCID: PMC5524531.
172. Marjanovic G. The use of inexpensive broad spectrum lower toxicity therapeutics in chronic lymphocytic leukemia. *J BUON*. 2017;22(2):288-94. Epub 2017/05/24. PubMed PMID: 28534346.
173. Badar T, Burger JA, Wierda WG, O'Brien S. Ibrutinib: a paradigm shift in management of CLL. *Expert Rev Hematol*. 2014;7(6):705-17. Epub 2014/11/13. doi: 10.1586/17474086.2014.977862. PubMed PMID: 25387837; PubMed Central PMCID: PMC4811630.
174. Gentile M, Shanafelt TD, Mauro FR, Reda G, Rossi D, Laurenti L, et al. Predictive value of the CLL-IPI in CLL patients receiving chemo-immunotherapy as first-line treatment. *Eur J Haematol*. 2018. Epub 2018/07/25. doi: 10.1111/ejh.13149. PubMed PMID: 30039576.
175. Gonzalez D, Martinez P, Wade R, Hockley S, Oscier D, Matutes E, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol*. 2011;29(16):2223-9. Epub 2011/04/13. doi: 10.1200/JCO.2010.32.0838. PubMed PMID: 21483000.
176. Dohner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine

- analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*. 1995;85(6):1580-9. Epub 1995/03/15. PubMed PMID: 7888675.
177. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res*. 2009;15(3):995-1004. Epub 2009/02/04. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1630. PubMed PMID: 19188171.
178. Martinelli S, Cuneo A, Formigaro L, Cavallari M, Lista E, Quaglia FM, et al. Identifying High-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia: A Pathogenesis-Oriented Appraisal of Prognostic and Predictive Factors in Patients Treated with Chemotherapy with or without Immunotherapy. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2016;8(1):e2016047. Epub 2016/11/23. doi: 10.4084/MJHID.2016.047. PubMed PMID: 27872727; PubMed Central PMCID: PMC5111525.

BIOGRAFIJA

Vojin Vuković je rođen 26. juna 1983. godine u Podgorici, Crna Gora. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Podgorici. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 2002. godine, a diplomirao 2009. sa prosječnom ocjenom 9,20. Tokom studiranja boravio je oktobra 2006. godine na razmjeni studenata na odjeljenju gastroenterologije Univerzitetske bolnice u Kijevu, Ukrajina.

Radno iskustvo po završetku obaveznog pripravničkog staža sticao je kao klinički ljekar-volonter na odjeljenju hematologije Kliničko-bolničkog centra Bežanijska kosa od avgusta 2010. do maja 2011., a potom u istom svojstvu i na Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije. Od jula do decembra 2012. radi u Domu zdravlja Zemun na poslovima ljekara opšte prakse. Od decembra 2012. je ponovo na Klinici za hematologiju KCS, prvo u svojstvu saradnika na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije broj III41004 pod vođstvom naučnog savjetnika, dr Sonje Pavlović, do februara 2015. kada postaje stalni zaposlenik Klinike za hematologiju. Iste godine u oktobru upisao je specijalizaciju iz interne medicine. Od 2011. je na doktorskim studijama, smjer molekularna medicina.

Vojin Vuković je autor i koautor većeg broja publikacija i apstrakata. Učestvovao je na brojnim domaćim i međunarodnim hematološkim sastancima. Imao je nekoliko poster i oralnih prezentacija na kongresima u zemlji i inostranstvu, od kojih 4 kao dobitnik granta. Istraživač je u nekoliko kliničkih studija iz oblasti hronične limfocitne leukemije, limfoma i multiplog mijeloma. Član je Srpske limfomske grupe i Evropske asocijacije hematologa.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Vojin Vuković

broj upisa MM-06/11

Izjavljujem

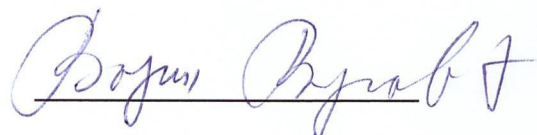
da je doktorska disertacija pod naslovom

Uticaj ekspresije gena za humani koncentrativni nukleozidni transporter 3 i prisustva alela CYP2B6*6 na odgovor na terapiju fludarabinom i ciklofosfamidom kod bolesnika sa hroničnom limfocitnom leukemijom

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 02.04.2019.


Vojin Vuković

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Vojin Vuković

Broj upisa MM-06/11

Studijski program molekularna medicina

Naslov rada: Uticaj ekspresije gena za humani koncentrativni nukleozidni transporter 3 i prisustva alela CYP2B6*6 na odgovor na terapiju fludarabinom i ciklofosfamidom kod bolesnika sa hroničnom limfocitnom leukemijom

Mentor Prof. dr Biljana Mihaljević

Potpisani Dr Vojin Vuković


izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 02.04.2019.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Uticaj ekspresije gena za humani koncentrativni nukleozidni transporter 3 i prisustva alela CYP2B6*6 na odgovor na terapiju fludarabinom i ciklofosfamidom kod bolesnika sa hroničnom limfocitnom leukemijom

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 02.04.2019.

