

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ida Hude

**Kombinacija rituksimaba i visokih doza
klorambucila u liječenju limfoma malih limfocita
/ kronične limfocitne leukemije**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2011.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ida Hude

**Kombinacija rituksimaba i visokih doza
klorambucila u liječenju limfoma malih limfocita
/ kronične limfocitne leukemije**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2011.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti
Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom prof. dr. sc. Igora Aurera i predan je na
ocjenu u akademskoj godini 2010./2011.

Mentor rada: prof dr.sc Igor Aurer

Popis kratica

AIHA – autoimuna hemolitička anemija

ASH – eng. *American Society of Hematology*, Američko društvo za hematologiju

B2M – β 2-mikroglobulin

CAP – kemoterapijski protokol: ciklofosamid, doksorubicin, cisplatina

CHOP – kemoterapijski protokol: ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, prednizon

COP – kemoterapijski protokol: ciklofosamid, vinkristin, prednizon

DLBCL – eng. *diffuse large B-cell lymphoma*, difuzni B-velikostanični limfom

FC – kemoterapijski protokol: fludarabin, ciklofosamid

FCR – kemoterapijski protokol: fludarabin, ciklofosamid, rituksimab

FISH – fluorescentna *in-situ* hibridizacija

FL – folikularni limfom

ITP – imunotrombocitopenija

KLL / LML – kronična limfocitna leukemija / limfom malih limfocita

KR – kompletna remisija

MRB – minimalna rezidualna bolest

NA – eng. non-available, nije dostupno

nPR – nodularna parcijalna remisija

NR – eng. *non-reactor*, onaj koji ne reagira na terapiju, refraktoran

OS – eng. *overall survival*, ukupno preživljenje

PFS – eng. *progression free survival*, preživljenje bez progresije bolesti

PR – parcijalna remisija

SZO – svjetska zdravstvena organizacija

TTM – eng. *Total Tumor Mass*, ukupna tumorska masa

1. SAŽETAK.....	V
2. SUMMARY.....	VI
3. UVOD.....	1
3.1. Kronična limfocitna leukemija	1
3.1.1 Definicija	1
3.1.2. Epidemiologija.....	2
3.1.3. Etiologija.....	2
3.1.4. Obilježja neoplastičnog klona.....	2
3.1.5. Klinička slika	3
3.1.6. Dijagnostika i klinička klasifikacija	4
3.1.7. Prognoza	6
3.1.8. Liječenje	7
3.2. Klorambucil	10
3.2.1. Definicija.....	10
3.2.2. Mehanizmi djelovanja	11
3.2.3. Klorambucil i kronična limfocitna leukemija / limfom malih limfocita	12
3.3. Rituksimab	14
3.3.1. Definicija	14
3.3.2. Mehanizmi djelovanja	15
3.3.2.1. Citotoksičnost ovisna o komplementu (CDC)	15
3.3.2.2. Apoptoza	15
3.3.2.3. Povećanje kemosenzitivnosti	16

3.3.2.4. „Vakcinacijski“ učinak	16
3.3.3. Rituksimab i kronična limfocitna leukemija / limfom malih limfocita	17
4. HIPOTEZA.....	19
5. CILJEVI.....	20
6. BOLESNICI I METODE.....	21
6.1. Dizajn istraživanja	21
6.2. Liječenje.....	21
6.3. Bolesnici i metode	21
6.4. Statistička analiza	22
7. REZULTATI.....	23
7.1. Značajke bolesnika i bolesti.....	23
7.2. Terapija i ishod	24
7.3. Korelacija između poznatih prognostičkih faktora.....	28
7.4. Utjecaj kliničkog stadija na PFS	30
7.5. Utjecaj poznatih prognostičkih faktora na PFS	31
7.6. Utjecaj dobi na toksičnost terapije.....	32
8. RASPRAVA.....	33
8.1. Osvrt na bolesnike i rezultate liječenja	33
8.2. Prognostički faktori i njihov utjecaj na PFS	34
8.3. Toksičnost terapije i utjecaj dobi.....	36
9. ZAKLJUČCI.....	38
10. ZAHVALE.....	39
11. LITERATURA.....	40
12. ŽIVOTOPIS.....	48

Kombinacija rituksimaba i visokih doza klorambucila u liječenju limfoma malih limfocita / kronične limfocitne leukemije

Autor: Ida Hude

Kronična limfocitna leukemija / limfom malih stanica (KLL) najčešća je leukemija odraslih osoba bijele rase. Radi se tipično o bolesti starije dobi s medijanom pojavljivanja od 69 godina. Klinički tijek bolesti vrlo je varijabilan, a prognoza ovisi o kliničkom stadiju u doba dijagnoze i drugim definiranim prognostičkim faktorima. Ne postoji općeprihvaćen način terapijskog pristupa KLL, a bolest je neizlječiva. Usprkos intenzivnoj promociji fludarabinskih kombinacija kao temelja liječenja, visoke doze klorambucila i dalje su najdjelotvornija monokemoterapija ove bolesti. Radi se o terapiji prihvatljive toksičnosti, kratkog trajanja i vrlo prihvatljive cijene što je čini povoljnom podlogom za dodatak nisko toksične ciljane terapije poput rituksimaba. Rituksimab je monoklonsko protutijelo usmjereno protiv CD20 antigena na površini B-limfocita. Kombinacija rituksimaba i klorambucila već je duže vrijeme u rutinskoj kliničkoj upotrebi. Cilj ovog rada je ispitati njenu učinkovitost. U istraživanje je uključeno 25 bolesnika liječenih u KBC-u Zagreb. Medijan dobi ispitanika bio je 67 godina. Kao terapiju su dobivali kontinuirane visoke doze klorambucila (10 – 20mg, medijan 18mg) i rituksimab (700-800 mg) predviđen u 8 ciklusa. KR je postignuta kod 12 pacijenata (48%), PR kod 7 pacijenata (28%), 2 su pacijenta bila refraktorna na terapiju (8%), a kod 4 terapija nije bila završena u trenutku istraživanja. Nakon medijana praćenja živućih pacijenata od 15 mjeseci, preživljavanje bez progresije bolesti (PFS) iznosi 72%, a sveukupno preživljavanje (OS) 92%. PFS pacijenata s Binet stadijem C i Rai stadijima 3 i 4 statistički se značajno razlikuju od PFS pacijenata s povoljnim stadijima (26% naprama 86%, $p = 0,047$). Utjecaj TTM stadija i ostalih prognostički faktora na PFS nije se pokazao statistički značajan ($p > 0,05$), kao što ni korelacija među ispitivani faktorima nije dokazana. Ozbiljna toksičnost na terapiju (gradus 3 i 4) pojavila se kod 7 pacijenata, od kojih 6 pripada skupini ≥ 65 godina. Međutim, utjecaj dobi na toksičnost nije statistički potvrđen. Najčešća zabilježena ozbiljna nuspojava bila je leukopenija. Kombinacija kontinuiranih visokih doza klorambucila i rituksimaba pokazala se kao vrlo uspješna terapija u prvoj liniji liječenja KLL-a, dovodeći do visokog ukupnog odgovora. Terapija ne dovodi do neočekivane toksičnosti i dobro je podnošljiva. Potrebno je daljnje praćenje i uključivanje novih bolesnika u istraživanje kako bi se dobili relevantniji podaci, usporedivi s drugim većim studijama.

Ključne riječi: Kronična limfocitna leukemija, klorambucil, rituksimab

Combination of rituximab and high-dose chlorambucil in therapy of small lymphocyte lymphoma / chronic lymphocytic leukemia

Author: Ida Hude

Chronic lymphocytic leukemia / small lymphocyte lymphoma (CLL) is the most common leukemia among adult Caucasians. It is typically a disease of the elderly, with a median age of onset of 69 years. Clinical course of the disease is variable and the prognosis depends on the clinical stage at the time of diagnosis and other established prognostic factors. No treatment strategies for CLL are generally accepted and the disease remains incurable. Despite the intensive promotion of fludarabin-based protocols as the fundamental treatment of CLL, high dose chlorambucil remains the most efficient monochemotherapy for these patients. Low toxicity, short treatment duration and favorable cost make this therapy a convenient platform for addition of non-toxic targeted drugs, like rituximab. Rituximab is a monoclonal antibody aimed at the CD20-antigen on the surface of B-lymphocytes. Combination of rituximab and chlorambucil has been in routine clinical use for some time. The aim of this research is to assess its effectiveness. Twenty-five patients treated at KBC-Zagreb were included in this study. Median age was 67 years. Patients had received high-dose chlorambucil (10-20mg, median 18mg) continuously and 700-800 mg of rituximab. Eight cycles were planned. CR was achieved in 12 patients (48%), PR in 7 (28%), 2 patients were refractory to therapy (8%) and in 4 treatment is still ongoing. After median follow-up of 15 months of survivors, progression-free survival (PFS) is 72% and overall survival (OS) 92%. Patients with Binet stage C and Rai stages 3 and 4 have a statistically significant lower PFS than patients with favorable stages (26% vs, 86%, $p = 0,047$). The effect of TTM stage as well as other prognostic factors on PFS was not statistically significant ($p > 0,05$). Likewise, correlation between assessed prognostic factors hasn't been proven. Serious toxicity occurred in 7 patients, 6 of whom were ≥ 65 years. However, correlation between age and toxicity wasn't statistically significant. The most common serious AE was leukopenia. Combination of rituximab and continuous high-dose chlorambucil is a very effective front-line treatment of CLL, leading to high overall response. Therapy does not cause unexpected toxicity and is well tolerated. To obtain more relevant results for comparison with larger studies, further follow-up and inclusion of new patients is needed.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, chlorambucil, rituximab

3.1. Kronična limfocitna leukemija / limfom malih limfocita

3.1.1. Definicija

Kronična limfocitna leukemija / limfom malih stanica (KLL/LML, odnosno CLL/SLL, eng. chronic lymphocytic leukemia / small lymphocyte lymphoma) je tumor malih naizgled zrelih B limfocita koji uz pan-B biljege izražavaju i CD5 i CD23. Tumorsko tkivo sastoji se od monomorfnih malih, okruglih do blago nepravilnih B-limfocita, uz prisutnost ponešto prolimfocita i paraimunoblasta koji tvore proliferacijske centre. Za dijagnozu leukemičnog oblika bolesti, potrebna je da se u krvi nalazi najmanje 5×10^9 klonalnih limfocita/L (*Muller-Hermelink HK et al, 2008*), iako se prema preporukama Međunarodne radne skupine za kroničnu limfocitnu leukemiju (The International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia, IWCLL), dijagnoza može postaviti i u bolesnika s manjim brojem klonalnih B limfocita, ako je bolest traje duže od 3 mjeseca, a radi se o citopeničnim bolesnicima ili bolesnicima s izraženim simptomima bolesti (*Hallek M et al, 2008a*). Dok su prema klasifikaciji SZO KLL i LML, odnosno CLL i SLL ista bolest, ima i autora koji dijagnozu SLL koriste samo za ne-leukemični oblik bolesti s infiltracijom solidnih organa, obično limfnih čvorova i slezene, morfološki i imunofenotipski identičnim stanicama kao u KLL. Kronična limfocitna leukemija kategorizira se kao neoplazma zrelih B-limfocita (*Jaffe ES et al, 2008*). Prema međunarodnoj klasifikaciji bolesti, MKB-10, šifra ove bolesti glasi C91.1, a limfoma malih limfocita C83.0.

3.1.2. Epidemiologija.

Kronična limfocitna leukemija je najčešća leukemija odraslih u zapadnim zemljama, s incidencijom od 2-6 bolesnika na 100 000 stanovnika godišnje. KLL je tipično bolest starije dobi s medijanom pojavljivanja u dobi od 69 godina (*Eichhorst B et al, 2010*), međutim danas je broj dijagnoza i u mlađoj dobi u porastu (*de Lima M et al, 1998*). Muškarci oboljevaju češće nego žene, u omjeru 1,5-2 : 1. Prevalencija bolesti različita je u različitim geografskim područjima. Najčešća je u osoba bijele rase, rjeđa u crnaca, dok je u Azijata vrlo rijetka. Niska pojavnost bolesti među Azijatima zadržava se i nakon migracija što govori u prilog genetskoj predispoziciji za razvoj bolesti.

3.1.3. Etiologija.

Točan uzrok kronične limfocitne leukemije danas nije poznat. Poznati leukemogeni čimbenici poput zračenja, kemoterapije i slične genotoksične tvari, kao niti prehrana, pušenje, autoimune bolesti ili virusne infekcije, ne povećavaju učestalost nastanka bolesti. S druge strane, učestalost nastanka KLL jako je povezana s nasljednim čimbenicima. Dokazana je povećana učestalost kronične limfocitne leukemije i subkliničke monoklonalne B-limfocitne ekspanzije među rođacima oboljelih od KLL (*Rawstron AC et al, 2008*). Opisan je i fenomen genetske anticipacije, tj. u svakoj slijedećoj generaciji nasljedno uvjetovana KLL se pojavljuje u sve mlađoj životnoj dobi (*Yuille MR et al, 2000*).

3.1.4. Obilježja neoplastičnog klona.

Kako je već spomenuto, KLL stanice su predominantno mali, zreli limfociti uz varijabilan udio drugih limfocitnih morfoloških varijanti (veliki limfociti, limfo-plazma, prolimfociti, zarezani limfociti itd.) (*Jakšić B, 2008*). Imunofenotip KLL stanica jest CD5,

CD19, CD79a, CD23, CD43. Površinski IgM je uglavnom slabo izražen, kao i CD20. CD10 i ciklin D1 su negativni. Citogenetski, u oko 20% slučajeva nalazi se trisomija 12, delecija 13q14 u oko 50%, a delecije 11q22-23 u 20% slučajeva. Molekularnim tehnikama mogu se definirati dva različita tipa bolesti: oko 45% slučajeva nema mutirane varijabilne dijelove gena za teški lanac imunoglobulina, dok je u 55% slučajeva prisutna somatska hipermutacija IgVH. Donedavno se smatralo da prvi oblik odgovara tumoru djevičanskih B limfocita, a drugi neoplazmi B stanica koje su prošle germinativni centar (*Aurer I et al, 2007*), no danas je općenito prihvaćeno da su sve KLL postgerminativnog podrijetla. U drugom je tipu slabije izraženo signaliziranje preko B-receptora, slabije je izražena proliferacija, a samim time je i prognoza bolesti bolja. Nemutiranost IgVH gena (N-KLL) povezana je s izražajem važne signalne molekule ZAP-70 koja se pak povezuje s lošijom prognozom bolesti, kao i aktivacijski biljeg CD38, molekula koja pruža dodatne signale te se također uzima kao loš prognostički faktor (*Jakšić B, 2008*). Karakteristike neoplastičnog klona uglavnom su stabilne i bitno se ne mijenjaju tijekom razvoja bolesti, ali u nekim slučajevima može doći do tzv. transformacije ili evolucije karakteristika samog klona što se naziva Richterovim sindromom. Richterov sindrom je pojava visokomalignog limfocitnog limfoma tijekom KLL.

3.1.5. Klinička slika.

Kod otprilike 50% pacijenata oboljelih od kronične limfocitne leukemije, prva se sumnja na postojanje bolesti postavlja tijekom kliničke obrade radi nekog nevezanog problema, a pritom se pronalazi izolirana periferna limfocitoza bez drugih simptoma bolesti (*Rozman C, Montserrat E, 1995*). Simptomi koji dovode bolesnika liječniku mogu biti posljedica infekcija, autoimune hemolitičke anemije, rjeđe imunotrombocitopenije te tumorskog povećanja limfnih čvorova ili slezene (*Aurer I et al, 2007*). Pri fizikalnom pregledu često se otkriva simetrično zahvaćanje svih regija povećanim limfnih čvorovima koji su

bezbolni, uglavnom srednje tvrde konzistencije. Lokaliziran, asimetričan nalaz limfadenopatije nije tipičan za KLL. Konstitucijski simptomi (umor i B-simptomi) prisutni su kod 15% pacijenata pri postavljanju dijagnoze, s time da su noćno znojenje, gubitak na težini i umor znatno češći nego vrućice povezane s bolešću (*Pangalis GA et al, 2002*). Infekcije kao posljedice imunosupresije čest su i značajan problem kod KLL: u početku predominiraju bakterijske infekcije kao posljedica hipogamaglobulinemije, a s progresijom bolesti, uz produbljivanje hipogamaglobulinemije i razvoj znatnijeg deficita stanične imunosti, javljaju se i teže virusne te gljivične infekcije.

3.1.6. Dijagnostika i klinička klasifikacija.

Opseg dijagnostičkih postupaka u bolesnika sa sumnjom na KLL može biti različit, od onog minimalnog s jedne, do optimalnog i istraživačkog s druge strane. Uobičajeni dijagnostički postupak uključuje fizikalni pregled, hematološke i biokemijske laboratorijske pretrage, morfološku analizu periferne krvi/koštane srži te imunofenotipizaciju, citogenetsku i molekularnu analizu (kariotipizacija, FISH), različite metode oslikavanja i ostalo prema indikacijama. Prema Međunarodnoj skupini za kroničnu limfocitnu leukemiju (The International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia, IWCLL) iz 2008., za dijagnozu kronične limfocitne leukemije nužno je zadovoljiti sljedeće kriterije: broj limfocita u perifernoj krvi iznosi $>5 \times 10^9/L$, uvjetno i manje ako se radi o kroničnom povišenju apsolutnog broja limfocita s morfološkim karakteristikama KLL stanica (navedeno ranije); morfologija odgovara malim zrelim limfocitima bez vidljive jezgrice; imunofenotipizacijom se nalazi pozitivnost na jedan ili više B-staničnih markera (CD19, CD20 ili CD23), pozitivnost CD5 i negativni drugi pan-T-stanični biljezi, odnos kappa/lambda potvrđuje monoklonalnost, a površinski Ig je niske gustoće; atipične stanice (na primjer, prolimfociti) čine ispod 55% i/ili $<15 \times 10^9/L$; trajanje limfocitoze nije određeno, ali mora biti kronična;

prema ovim kriterijima biopsija koštane srži nije nužna za postavljanje dijagnoze, ali je još uvijek preporučljiva pretraga za određivanje uzorka i opsega zahvaćenosti koštane srži bolešću te razjašnjavanje etiologije eventualnih citopenija (*Hallek M et al, 2008a*). Opseg svih dijagnostičkih postupaka koji se provode za cilj ima, uz definiranje točne dijagnoze, omogućiti preciznu klasifikaciju s obzirom na tip bolesti i veličinu tumorske mase, a samim time i određivanje kliničkog stadija te prognoze bolesti. U kliničkoj je upotrebi više klasifikacija. Među najstarijima je ona nastala 1975. prema Raiu i suradnicima, jednostavna i lako primjenjiva klasifikacija koja pruža djelotvornu prognostičku diskriminaciju među pojedinim skupinama. Stadiji su označeni brojevima od 0 do 4, a definiraju se redom: limfocitoza, limfocitoza + limfadenopatija, limfocitoza ± limfadenopatija + palpabilna splenomegalija, limfocitoza ± limfadenopatija ± palpabilna splenomegalija + anemija (Hb < 100 g/l) zbog smanjenog stvaranja eritrocita (ne AIHA) i na kraju limfocitoza ± limfadenopatija ± palpabilna splenomegalija ± anemija (Hb < 100 g/l) zbog smanjenog stvaranja eritrocita (ne AIHA) + trombocitopenija < 100 x 10⁹/l zbog smanjenog stvaranja trombocita (ne ITP) (*Rai KR et al, 1975*). Ova je klasifikacija pretežno kvalitativna, bez kvantifikacije pojedinih parametara, slično kao i Binetova klasifikacija iz 1981. koja je definirana kako slijedi: **A** – limfadenopatija u < 4 periferne regije, **B** – limfadenopatija u > 3 periferne regije, **C** - anemija ili trombocitopenija (Hb < 100 g/l ili Trc < 100 x 10⁹/l) zbog smanjenog stvaranja (ne AIHA ili ITP) (*Binet JL et al, 1981*). S druge strane, kao pretežno kvantitativna klinička klasifikacija koristi se TTM-klasifikacija gdje je TTM definirana kao

$$\mathbf{TTM} = \text{promjer najvećeg limfnog čvora u cm} + \text{slezena pod lijevim rebrenim rukom u cm} + \sqrt{(\text{broj limfocita} / 10^9)},$$

s time da **TTM** < **9** predstavlja malu tumorsku masu, **TTM** ≥ **9** veliku tumorsku masu, a podvostručenje tumorske mase znači da je TTM dva puta veći od prethodnog (*Jakšić B, Vitale B, 1981*).

3.1.7. Prognoza.

Tijek kronične limfocitne leukemije je vrlo varijabilan. Dokazano je da preživljenje korelira s kliničkim stadijem u doba dijagnoze. Pacijenti se prema tome mogu klasificirati u tri skupine, one niskog, srednjeg i visokog rizika, s medijanom preživljenja redom >10 godina, 7 do 9 godina odnosno 2 godine. Nadalje, procjena rizika može se pobliže definirati koristeći se i drugim nepovoljnim prognostičkim faktorima, kao što su podvostručenja broja limfocita u razdoblju kraćem od 12 mjeseci, atipična morfologija, povišene vrijednosti serumskog β_2 -mikroglobulina, visoke vrijednosti solubilnog CD23, povišene vrijednosti serumske timidin-kinaze, povišene vrijednosti serumskog LDH te delecije ili mutacije gena *p53* (gen tumorsupresor) (Yee KWL, O'Brien SM, 2008). Više je studija pokazalo kako visoka razina i/ili gustoća izraženosti CD38 na klonalnim limfocitima predstavlja nepovoljan prognostički znak (Damle RN et al, 1999; Hamblin TJ et al, 2002; Ibrahim S et al, 2001). CD38 ekspresija korelira sa statusom mutiranosti IgVH gena, no ipak ne može koristiti kao surogatni marker IgVH statusa. Nadalje, status izraženosti CD38 može značajno varirati tijekom bolesti (Hamblin TJ et al, 2002). Što se samih IgVH gena tiče, u ranijem je tekstu navedeno kako je dokazana razlika u preživljenju između pacijenata s nemutiranim IgVH genima i onih sa somatskim IgVH hipermutacijama (Damle RN et al, 1999). No zbog složenosti i skupoće pretrage, ova molekularno genetska analiza ne koristi se u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Zato se danas kao dostupan surogatni biljeg IgVH statusa koristi izražaj molekule ZAP-70 (Crespo M et al, 2003). Kromosomske se abnormalnosti kod KLL susreću razmjerno često. Prema Dohneru i suradnicima, medijan preživljenja za pacijente s 17p-, 11q-, trisomijom 12, normalnim kariotipom i 13q- redom iznosi 32, 79, 114, 111 i 133 mjeseci. U multivarijantnoj analizi, pokazano je da su 17p- i 11q- udruženi s kraćim ukupnim preživljenjem (Dohner H et al, 2000).

3.1.8. Liječenje.

Liječenje kronične limfocitne leukemije uključuje antineoplastično liječenje te potpurnu terapiju kojom se suzbijaju hematološke, imunološke, metaboličke i druge komplikacije. Antineoplastičko liječenje za cilj ima smanjiti te po mogućnosti i eliminirati tumor iz organizma, čime bi se omogućilo normalno funkcioniranje zahvaćenih tkiva. Za sada ne postoje dokazi da bi se liječenje trebalo započeti u ranoj fazi neuznapredovale i stabilne bolesti. Nekoliko studija provedenih u različitim europskim centrima (French Cooperative Group on CLL, Cancer and Leukemia Group B, Spanish Group Pethema, Medical Research Council, MRC iz Ujedinjenog kraljevstva) slažu se oko zaključka da se upotrebom alkilirajućih agensa kod pacijenata u ranom stadiju bolesti (Rai 0, Binet A) ne produžuje preživljenje (*Dighiero G et al, 1998; Shustik C et al, 1988; Montserrat E et al, 1991; Catovsky D et al, 1991*). Ti su rezultati dodatno potvrđeni i meta-analizom (*CLL Trialists' Collaborative Group, 1999*). Bi li imalo smisla inicijalno liječiti pacijente sa stabilnom bolešću, po mogućnosti s ne-alkilirajućim agensima, pitanje je za daljnje rasprave znanstvene zajednice. U kliničkoj se praksi uglavnom smatra kako je vrijeme za početak liječenja onda kada je zadovoljen jedan od sljedećih kriterija: a) velika tumorska masa (TTM >9), b) brz porast tumorske mase (vrijeme podvostručenja kraće od 12 mjeseci), c) supresija normalne hematopoeze (anemija, trombocitopenija) ili d) pojava B-simptoma. Indikacije za početak liječenja prema smjernicama Halleka i suradnika (The International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia, IWCLL), uključuju: a) progresivno zatajenje funkcije koštane srži u smislu razvoja ili pogoršanja anemije i/ili trombocitopenije, b) pojavu masivne (>10cm) ili progresivne ili simptomatske limfadenopatije, c) pojavu masivne (>10cm) ili progresivne ili simptomatske organomegalije, d) progresivnu limfocitozu, odnosno povećanje broja limfocita za $\geq 50\%$ u 2 mjeseca ili podvostručenje limfocitoze u razdoblju kraćem od 6 mjeseci, e) konstitucionalne znakove (B-simptome) uz isključenje prisutnosti sistemske infekcije, te

posljednje f) razvoj autoimune hemolitičke anemije i trombocitopenije (*Hallek M et al, 2008*). Ovakvi kriteriji svojom definicijom obuhvaćaju većinu pacijenata sa stadijima Binet B i C kao i dio onih sa stadijem A uz naznake progresije bolesti. Kod pacijenata kod kojih se razvije autoimuna hemolitička anemija ili imuna trombocitopenična purpura uz Binet stadij A, liječenje nije nužno započeti antileukemičnim agensima, već može biti dovoljna terapija autoimunih zbivanja. Hiperviskoznost krvi kao posljedica izrazito velikog broja cirkulirajućih leukocita je vrlo rijetka pojava u KLL te neki autori smatraju da samo izrazita leukocitoza bez progresivne komponente nije indikacija za početak terapije (*Oscier D et al, 2004*). Prije početka terapije, trebalo bi uzeti u obzir: 1) osobitosti pacijenta (dob, komorbiditet itd), 2) osobitosti bolesti (težina simptoma, prisutnost nepovoljnih prognostičkih faktora itd.), 3) osobitosti terapije (stupanj i trajanje prethodnog odgovora na terapiju, nuspojave, kontraindikacije) i 4) farmakoekonomske značajke.

Cheson i suradnici su predložili sljedeće kriterije procjene odgovora na terapiju: kompletna remisija (KR) znači potpuni izostanak simptoma, nestanak limfadenopatije i organomegalije, broj neutrofila $\geq 1,5 \times 10^9/L$, limfocita $< 4 \times 10^9/L$, trombocita $> 100 \times 10^9/L$, hemoglobin (netransfundirani) $> 11g/dL$, normocelularna koštana srž s $< 30\%$ limfocita i bez intersticijskih i nodularnih infiltrata; uvjeti za nodularnu parcijalnu remisiju (nPR) razlikuju se od onih za kompletnu jedino prema nalazu biopsije koštane srži u kojoj se nalaze nodularni infiltrati tumorskih stanica; kriteriji za parcijalnu remisiju su smanjenje limfadenopatije i organomegalije za $\geq 50\%$, broj neutrofila $\geq 1,5 \times 10^9/L$ ili povećanje za $\geq 50\%$ od početnih vrijednosti, limfocitoza reducirana za $\geq 50\%$ od početne vrijednosti, trombociti $> 100 \times 10^9/L$ ili povećani za $\geq 50\%$ od početnih nalaza te hemoglobin $> 11g/dL$ ili povećan za $\geq 50\%$ od početnog (*Cheson BD et al, 1996*). Od objave ovih korisnih kriterija 1996., u kliničku su praksu uvedene nove metode naprednije tehnologije kojima se može osjetljivije određivati minimalna rezidualna bolest – MRB. Metode poput višebojne protočne citometrije i

kvantitativnog PCR-a danas imaju mogućnost detekcije i samo jedne klonske stanice na 10.000 leukocita. Tehnike detekcije MRB prošle su kritičku evaluaciju i danas su sasvim standardizirane (*Rawstron AC et al, 2007*). Iako se smatra da izostanak minimalne rezidualne bolesti ima vrlo snažnu pozitivnu prognostičku vrijednost, tek će buduće prospektivne studije pokazati ima li smisla tretirati pacijente u kompletnoj remisiji s MRB u svrhu eradikacije iste, odnosno može li se tako postići zaista značajna i dugoročna dobrobit za pacijenta.

Ne postoji općeprihvaćen način terapijskog pristupa kroničnoj limfocitnoj leukemiji / limfomu malih limfocita i to zbog izrazite heterogenosti u prezentaciji bolesti te njenog varijabilnog tijeka. Kako je medijan preživljenja relativno dug u odnosu na neke druge hematološke neoplazme i solidne tumore, a bolest je još uvijek neizlječiva, većina pacijenata tijekom života dobije više različitih linija terapije. Kako je već naglašeno, pojavnost ove bolesti najveća je u srednjoj i starijoj životnoj dobi, a zbog često pridruženih komorbiditeta, mogućnost agresivnijeg liječenja je ograničena. Kemoterapija predstavlja osnovni način liječenja kronične limfocitne leukemije. Može se davati kao monoterapija ili kombinacija kemoterapeutika. Kao monoterapija najčešće se koriste alkilirajući agensi, prije svega klorambucil kao jedan od najstarijih i najučinkovitijih lijekova u terapiji ove bolesti. Prema preglednoj analizi Kimby i suradnika, koja je uključivala preko 40 vrijednih znanstvenih članaka, uključujući randomizirane kliničke pokuse, meta-analize, nekoliko prospektivnih te jednu retrospektivnu studiju, kao inicijalna terapija pacijenata sa simptomatskom bolešću preporučuje se upravo klorambucil (*Kimby E et al, 2001*). Ovaj lijek dovodi do povlačenja tumora i simptomatskog olakšanja u velike većine slučajeva progresivne bolesti. Odgovor na terapiju je dugotrajan, ali se potpuno izlječenje ne postiže. Nema suglasnost o optimalnoj dozi i planu terapije klorambucilom. Drugi alkilirajući agensi, poput ciklofosfamida, češće se koriste u kombiniranim shemama (CHOP, COP, CAP) i kao takvi su učinkovitiji od standardnih, ali ne i od visokih doza klorambucila (*Jakšić B, 2008*). Kao druga vrsta

monoterapije, koriste se analozi purina, prije svega fludarabin. Kombinacije citostatika koje sadrže fludarabin, u pravilu su učinkovitije od monoterapije, posebno FC-kombinacija (fludarabin + ciklofosfamid) (*O'Brien SM et al, 2001a*). Fludarabin je zacijelo najistraživaniji purinski analog, vrlo je učinkovit, ali i toksičan. Uzrokuje značajnu T-imunosupresiju. Iz tog se razloga preporuča provoditi profilaksu infekcija kotrimoksazolom tijekom liječenja fludarabinskim kombinacijama. Uz citostatike, u terapijske se sheme često uključuju i kortikosteroidi. Kortikosteroidi nisu naročito efikasni u liječenju KLL u užem smislu, ali pokazuju povoljno djelovanje kad se radi o limfomskom obliku bolesti (*Aurer I et al, 2007*).

Uz kemoterapiju, danas se sve više nade polaže u djelovanje imunoterapije. Razvoj monoklonalnih antitijela čiji je mehanizam djelovanja različit od standardne kemoterapije unio je novo svjetlo u terapiju limfoproliferativnih bolesti. Za KLL se u upotrebi nalaze rituksimab i alemtuzumab. Rituksimab se koristi i kao monoterapija, ali dokazano bolji učinak ima kao dodatak drugim kemoterapijskim shemama te se često koristi i istražuje, primjerice u FCR-shemi (*O'Brien SM et al, 2005*). Od ostalih modaliteta terapije, koriste se kemoradioterapija te autologna ili alogena transplantacija koštane srži uglavnom kod mlađih pacijenata u relapsu, s promjenjivim rezultatima (*Kimby E et al, 2001*).

3.2. Klorambucil

3.2.1. Definicija.

Klorambucil (poznat pod imenom Leukeran®, GlaxoSmithKline) predstavlja jedan od najstarijih citostatika u liječenju hematoloških i drugih neoplazmi. Sintetiziran je 1953. godine, a svoj nastanak duguje Everettu i suradnicima. Radi se o aromatskom derivatu mekloretamina, strukturno bliskom melfalanu, a predstavlja bifunkcionalan alkilirajući agens tipa dušičnog iperita. Kemijska formula ovog spoja glasi $C_{14}H_{19}Cl_2NO_2$ (*Cancer Care*

Ontario, 2011) U liječenju kronične limfocitne leukemije, klorambucil se koristi više od 50 godina.

3.2.2. Mehanizmi djelovanja.

Usprkos pola stoljeća dugoj upotrebi, egzaktni mehanizam djelovanja klorambucila i dalje nije potpuno jasan. Studije na modelima proliferativnog tumora pokazale su kako se klorambucil u stanicama veže na različite strukture, membranu, RNK, proteine i DNK. Kao i za druge alkilirajuće agense, za klorambucil se smatra da je neovisan o fazi staničnog ciklusa. Reaktivni radikali etilenimonija zaslužni su za DNK alkilaciju, zbog čega dolazi do prekida kao i ukriženja lanaca, rezultirajući smetnjama u DNK replikaciji i transkripciji RNK. Ispostavilo se da je upravo ukriženje lanaca DNK osnovni mehanizam protutumorskog djelovanja u navedenim proliferativnim modelima. Nadalje, na istim se modelima uočilo više mehanizama koji pridonose razvoju rezistencije na klorambucil, a to su mogućnost popravka DNA, pojačan metabolizam lijeka te „detoksikacija klorambucila“ praćena povišenim razinama aktivnosti glutaciona (GSH) i glutation S-transferaze (GST). S druge strane, tipične KLL stanice ne proliferiraju kao u navedenim modelima te se postavlja pitanje je li DNK-ukriženje i u ovoj bolesti najvažniji antitumorski mehanizam djelovanja klorambucila. Dokazano je kako klorambucil inducira apoptozu KLL stanica, a taj efekt čini se korelira s kliničkim učinkom. Prema tome, moguće je da alkilacija ciljeva različitih od same DNK, a koji također dovode do apoptoze, doprinosi aktivnosti klorambucila. Postoje podaci koji sugeriraju da alteracije gena koji kontroliraju ulazak u apoptotički proces, poput p53, mdm-2, bcl-2 i bax, mogu uzrokovati rezistenciju na lijek. Gubitak divljeg tipa p53 gena putem mutacije ili delecije uočen je kod 10 do 15% pacijenata s kroničnom limfocitnom leukemijom/limfomom malih limfocita, a doima se da postoji snažna korelacija između tog

gubitka i slabog kliničkog odgovora na primjenu klorambucila. Indukcija apoptoze klorambucilom uglavnom je praćena porastom ekspresije p53 i mdm-2, međutim ovaj porast se ne uočava kod pacijenata s prisutnom p53 mutacijom što ukazuje na mogućnost da visoke koncentracije klorambucila potiču staničnu smrt putem mehanizama neovisnih o p53 (*Begleiter A et al, 1996.*). Klorambucil se u kliničkoj praksi primjenjuje i kao imunosupresiv. Njegovo imunosupresivno djelovanje temelji se na supresiji limfocita.

3.2.3. Klorambucil i kronična limfocitna leukemija / limfom malih limfocita.

Rane studije koje su opisivale kliničko djelovanje klorambucila u liječenju kronične limfocitne leukemije koristile su niske doze navedenog lijeka, s ili bez kortikosteroida. Odgovor na terapiju (zbroj kompletnih i parcijalnih remisija) varirao je u rasponu od 45 do 86%. U niti jednoj od navedenih studija nije dokazana prednost dodatka kortikosteroida klorambucilu u smislu preživljenja bez progresije niti ukupnog preživljenja (*Han T et al, 1973*). Slično, u studijama nije dokazana razlika u ishodu terapije ovisno o korištenju kontinuirane ili intermitentne terapije. Četiri randomizirane studije koje su usporedile klorambucil i COP (ciklofosfamid, vinkristin, prednizon) u 630 pacijenata (*Catovsky D et al, 1991; French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukaemia, 1990; Montserrat E A et al, 1985; Raphael B, 1991*), prikazale su rezultate prema kojima COP dovodi do bržeg odgovora te veće stope odgovora na terapiju, međutim ne razlikuje se od klorambucila u preživljenju bez progresije niti ukupnom preživljenju. Meta-analiza 2022 pacijenata iz 10 studija usporedila je kombiniranu terapiju i klorambucil (s ili bez kortikosteroida), dokazavši identično petogodišnje preživljenje od 48% u obje terapijske grupe (*CLL trialists' collaborative group, 1999*). Šest od 10 studija uključivalo i antraciklin, a analiza ove

podgrupe također nije pokazala prednost u preživljenju nad klorambucilom. Brojne studije su ocijenjivale ulogu visokih doza klorambucila. Dvije tisuće sedamdeset i devet pacijenata randomizirano je u skupine koje su dobivale ili visoke doze klorambucila (15mg dnevno) ili intermitentnu terapiju (75mg svaka četiri tjedna) s kortikosteroidom. Pacijenti na kontinuiranoj terapiji visokim dozama klorambucila pokazali su višu stopu odgovora (70% naprama 30%) i dulji medijan preživljenja (6 godina naprama 3 godine, $p < 0.01$) (*Jakšić B, Brugliatelli M, 1988*). Kasnija studija randomizirala je 228 bolesnika u skupinu koja je dobivala fiksnu dozu od 15mg klorambucila dnevno, do kompletne remisije, razvoja toksičnosti trećeg stupnja ili maksimuma trajanja liječenja od 6 mjeseci. Nakon ovakve induksijske faze uslijedila je terapija održavanja klorambucilom u dozi od 5 do 15mg, ovisno o hematološkoj tolerabilnosti pojedinca. Druga skupina je liječenja CHOP protokolom (ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin, prednison) u dozama preporučenim od *French Cooperative Group on CLL*. (*French Cooperative Group on CLL, 1989*) i to u 6 ciklusa indukcije praćene s narednih 6 ciklusa terapije održavanja u intervalima od 3 mjeseca. Visoke doze klorambucila rezultirale su višom stopom odgovora (89% naprama 75%) te dužim medijanom preživljenja (68 mjeseci naprama 47 mjeseci uz CHOP) nakon medijana praćenja od 37 mjeseci (*Jakšić B et al, 1997*). Rezultati studija s kontinuiranim visokim dozama klorambucila nisu uključeni u meta-analizu navedenu prethodno zbog slabe usporedivosti s ostalim studijama treće faze, temeljene na različitim kriterijima procjene odgovora na terapiju. U prilog uspješnosti terapije kontinuiranim visokim dozama klorambucila u odnosu na intermitentnu primjenu, govore i rezultati hematologa Kliničkog bolničkog centra Zagreb, prikazani na ASH-u 2009. (*Bašić-Kinda S et al, 2009*), koji između ostalog pokazuju veću efikasnost i nižu toksičnost kontinuiranih visokih doza.

3.3. Rituksimab

3.3.1. Definicija.

Rituksimab (u Europi poznat pod tvorničkim imenom Mabthera®, Hoffmann-La Roche AG) je IgG1 kapa monoklonsko protutijelo usmjereno protiv CD20 antigena, molekule koja se nalazi isključivo na površini B-limfocita. Građen je od ljudske konstantne regije (Fc) i mišje varijabilne regije (Fv) što mu daje optimalna farmakokinetička svojstva (*Cvetkovic RS, Perry CM, 2006*). Budući da CD20 normalno ne cirkulira slobodno u plazmi, ne odbacuje se niti internalizira, kao i da nije podložan regulaciji, predstavlja odličnu metu za ciljanu terapiju. Nije izražen na matičnim stanicama, ranim limfoblastima i zrelim plazma stanicama. Fiziološka uloga CD20 molekule nije poznata, ali smatra se da je važna za razvoj i diferencijaciju B-limfocita. Od 1997. godine kada je odobren u SAD za liječenje CD20 pozitivnih indolentnih limfoma u relapsu, njegova primjena se iz godine u godinu širom svijeta povećavala, a spektar kliničkih indikacija proširen je i na druge tipove B-staničnog limfoma. Rituksimab smanjuje broj CD20 stanica različitim mehanizmima: citotoksičnošću ovisnom o protutijelima (ADCC), citotoksičnošću posredovanom komplementom (CDC), indukcijom apoptoze, a pojačava i citotoksičnu aktivnost nekih lijekova (povećanje kemosenzitivnosti) i radioterapije. Relativna važnost svakog od njih još se uvijek istražuje. Novija istraživanja upućuju na to da rituksimab ima ulogu i u pasivnoj imunizaciji posredovanoj protutijelom (*Lim SH et al, 2010*).

3.3.2. Mehanizmi djelovanja rituksimaba.

3.3.2.1. Citotoksičnost ovisna o komplementu (CDC).

Rituksimab aktivira kaskadu komplementa, vežući C1q (*Reff ME et al, 1994*). Ključna uloga komplementa u eliminaciji tumorskih stanica pokazana je „in vitro“ te „in vivo“ na miševima kojima je onemogućena aktivacija komplementa. (*Golaj J et al, 2001, 2006*). Nadalje, u bolesnika s KLL-om liječenih rituksimabom pokazana je aktivacija sustava komplementa neposredno nakon infuzije rituksimaba, što može objasniti i nuspojave vezane uz infuziju (*van der Kolk LE et al, 2001*). Skroman klinički odgovor na rituksimab, posebice kod KLL-a, pokušao se objasniti ekspresijom molekula koje inhibiraju komplement poput CD55 i CD59 te je pokazano da se njihovom blokadom pojačava osjetljivost na komplement (*Golaj J et al, 2001*). Liza svježe izoliranih tumorskih stanica posredovana komplementom, za razliku od uništavanja tumorskih stanica rituksimabom putem ADCC-a i apoptoze, ponajprije ovisi o tipu limfoma: najjača je kod FL, umjerena kod DLBCL-a i limfoma plaštenih stanica, a najslabija kod KLL što korelira s različitim stopom odgovora na monoterapiju rituksimabom kod navedenih tipova limfoma (*Manches O et al, 2003*). Navedeni utjecaj CDC-a ponajprije ovisi o stupnju ekspresije CD20 na različitim tipovima NHL-a, koji je najslabiji upravo kod KLL-a (*Golaj J et al, 2001; van Meerten T et al, 2006*).

3.3.2.2. Apoptoza.

Na različitim staničnim linijama pokazano je da rituksimab vezanjem za CD20 receptor može izravno uzrokovati apoptozu, neovisno o komplementu i ADCC-u (*Byrd JC et al, 2002*). Međutim, izravni apoptoski učinak rituksimaba je skroman i vrlo varijabilan, ovisno o vrsti stanične linije na koju se primjenjuje (*Stanglmaier M et al, 2004*). Ipak, većina studija koja je ispitala rituksimabom uzrokovanu apoptozu sugerira mitohondrijski put

apoptoze koji završava aktivacijom kaspaze-9 i efektorske kaspaze-3 (*Shan D et al, 2000*). Unutarstanični putevi kojima rituksimab dovodi do apoptoze vrlo su heterogeni, međusobno isprepleteni i nepotpuno definirani. K tome, neki istraživači su eksperimentalno pokazali da rituksimab i neka druga anti-CD20 protutijela uzrokuju apoptozu i mehanizmima neovisnim o mitohondrijima i kaspazama (*Stanglmaier M et al, 2004*).

3.3.2.3. **Povećanje kemosenzitivnosti.**

Većina citostatika uzrokuje apoptozu oštećujući genom stanice što dovodi do aktivacije p53 gena i posljedične aktivacije unutarnjeg, ali i vanjskog puta apoptoze (*Jin Z, El-Deiry WS, 2005*). „In vitro“ studijama pokazano je da rituksimab može pojačati citotoksično djelovanje nekih kemoterapeutika često korištenih u terapiji limfoma kao što su doksorubicin, fludarabin i cisplatina (*Glennie MJ et al, 2007; Alas S et al, 2000*). Molekularni mehanizmi kojima rituksimab dovodi do povećanja osjetljivosti na apoptozu izazvanu kemoterapijskim agensima uključuju različite molekule.

3.3.2.4. **„Vakcinacijski“ učinak.**

Postoje intrigantni novi podaci koji sugeriraju mogućnost da CD20-protutijela induciraju protutumorski imuni odgovor, odnosno imaju učinak sličan cijepljenju. Ova bi činjenica mogla objasniti izuzetno duge remisije kod nekih pacijenata nakon liječenja ovim protutijelom (*Hilchey SP et al, 2009*). Dokazano je da stanice limfomske stanične linije prekrivene rituksimabom omogućuju „cross-priming“ tumorskih antigena putem humanih dendritičkih stanica i izazivaju odgovor CD8 T-limfocita in vitro (*Selenko N et al, 2001*). Dokaz ovog načela nalazimo u kliničkoj studiji koja je pokazala kako terapija rituksimabom kod pacijenata s folikularnim limfomom inducira idiotipski specifičan odgovor T-limfocita (*Hilchey SP et al, 2009*). U novije vrijeme, Abés i suradnici su pokazali kako anti-CD20

protutijelo u modelu mišjeg limfoma s ekspresijom CD20 u imunokompetentnih miševa, inducira zaštitu putem imunološkog odgovora posredovanog T-limfocitima (Abés R et al, 2010).

3.3.3. Rituksimab i kronična limfocitna leukemija / limfom malih limfocita.

Obzirom na činjenicu da većina pacijenata s kroničnim limfocitnom leukemijom/limfomom malih limfocita na svojim malignim stanicama ima izražen antigen CD20, ovo kimerično antiCD20 protutijelo našlo je svoj put primjene u ovoj bolesti. Monoterapija rituksimabom nije dovoljno učinkovita. U bolesnika u relapsu postignuta stopa odgovora iznosila je oko 20%, i to isključivo parcijalnih remisija (Hillmen P, 2004). Nešto bolji rezultati postignuti su u bolesnika kod kojih je rituksimab primijenjen kao prva linija terapije. Primjenom rituksimaba 3x tjedno u standardnoj dozi od 375mg/m² u 33 bolesnika, postignut je odgovor 45% (3% KR, 42%PR) (Byrd JC et al, 2001). Proporcionalno povećanje odgovora postignuto je postupnim povećanjem doze rituksimaba, a da pritom nije došlo do povećanja toksičnosti (O'Brien SM et al, 2001). Tako je pri maksimalnoj dozi od 2250mg/m² odgovor iznosio 75%, ali bez postizanja kompletnih remisija. Za razliku od monoterapije, rituksimab u kombinaciji s citostaticima rutinski korištenim u terapiji CLL/SLL pokazao se znatno učinkovitijim. Retrospektivna analiza CALGB grupe pokazala je produljenje preživljenja bez progresije bolesti i ukupnog preživljenja dodatkom rituksimaba fludarabinu u usporedbi sa samim fludarabinom (Byrd JC et al, 2005). Prema postojećim podacima iz literature, randomizirani klinički pokusi koji istražuju kombiniranu primjenu fludarabina, ciklofosfamida i rituksimaba (FCR-shema) za sada prezentiraju najvišu stopu odgovora (Wierda W et al, 2005). Ipak, zbog postojeće toksičnosti i agresivnosti ovakve terapije, njena primjena nije opravdana kod pacijenata starije životne dobi, uz komorbiditet ili lošije opće

stanje. Iz tog se razloga sve više istražuju kombinacije rituksimaba s manje toksičnim, ali ne i manje uspješnim kemoterapijskim protokolima. Tako su Hillmen i suradnici istražili sigurnost i efikasnost dodavanja rituksimaba klorambucilu u prvoj liniji terapije te usporedbom vlastitih rezultata s rezultatima UK LRF CLL4 studije (samo klorambucil) pokazali kako je ukupna stopa odgovora 17,3% viša nego li u navedenoj studiji, i to bez značajne toksičnosti (*Hillmen P et al, 2009*).

4. HIPOTEZA

U uvodu je raspravljeno kako je dodatak rituksimaba FC-shemi (fludarabin + ciklofosfamid) pokazao nedvojbeno poboljšanje ishoda liječenja, bilo da se radi o prvoj liniji terapije ili pak o relapsu ili refraktornoj kroničnoj limfocitnoj leukemiji/limfomu malih stanica (*Hallek M et al, 2008b; Robak T et al, 2010*). Ipak, s obzirom na dob, komorbiditet i opći status pacijenata, klorambucil ostaje prvi izbor u terapiji većine. Visoke doze klorambucila i dalje su najdjelotvornija kemoterapija ove bolesti, dokazano su učinkovite, čak i učinkovitije od popularne FC-sheme. Kontinuirana primjena visokih doza ima dokazanu prednost pred intermitentnom (*Jakšič B, Brugliatelli M, 1988*). Prihvatljive je toksičnosti, kraćeg trajanja terapije i vrlo prihvatljive cijene, posebno u usporedbi s mnogo skupljim novijim kemoterapeutcima, poput fludarabina. Ovakve karakteristike klorambucila čine ga vrlo povoljnom podlogom za dodatak nisko toksične ciljane terapije poput rituksimaba. Dosadašnji rezultati primjene rituksimaba u terapiji indolentnih limfoproliferativnih bolesti vrlo su obećavajući, pogotovo u kombiniranim protokolima.

Zbog toga se na Zavodu za hematologiju Klinike za unutrašnje bolesti KBC Zagreb već nekoliko godina bolesnici s KLL rutinski liječe kombinacijom rituksimaba i visokih doza klorambucila s ciljem povećanja učinkovitosti liječenja kronične limfocitne leukemije / limfoma malih limfocita, a bez povećanja toksičnosti u odnosu na liječenje samo klorambucilom.

5. CILJEVI

Cilj ovog rada je utvrditi rezultate dodavanja monoklonskog CD20-protutijela rituksimaba kemoterapiji kontinuiranim visokim dozama klorambucila u prvoj liniji terapije pacijenata s kroničnom limfocitnom leukemijom / limfomom malih limfocita. U literaturi nema podataka o navedenoj kombinaciji koja se već neko vrijeme koristi u kliničkoj praksi. Stoga bi rezultati ovog rada prije svega bi trebali imati praktičnu primjenu u svakodnevnom radu. Uz to, potvrda hipoteze mogla bi biti temelj za upotrebu ove kombinacije i u drugim centrima. Ukoliko bi se kombinacija rituksimaba i klorambucila u ovom obliku doista pokazala uspješnom, to bi omogućilo liječenje bolesnika s KLL učinkovito, a manje toksičnom terapijom od one danas najpopularnije u svijetu, FCR protokola.

6.1. Dizajn istraživanja.

Ovo istraživanje temelji se na retrospektivnom pregledu i analizi bolničkih podataka pacijenata liječenih pod dijagnozom kronične limfocitne leukemije / limfoma malih limfocita. Istraživanje je provedeno u Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb, a u sklopu projekta «Dijagnostika i liječenje limfoma».

6.2. Liječenje.

Svi ispitanici su liječeni i praćeni u Dnevnoj bolnici Zavoda za hematologiju. Primali su kontinuirane visoke doze klorambucila, odnosno 10 do 20mg klorambucila na dan ordiniranih putem tableta za peroralnu upotrebu, koje su uzimali svakodnevno u određenom razdoblju. Također su primali rituksimab, predviđeno 8 ciklusa, u dozi od 700 ili 800mg po ciklusu uz standardnu premedikaciju paracetamolom, antihistaminikom, kalcijem i po potrebi glukokortikoidom . Terapija je provedena s ili bez dodatka glukokortikoida. Ostala suportivna terapija provedena je u skladu s pravilima medicinske struke.

6.3. Bolesnici i metode.

U studiju su uključeni svi pacijenti oboljeli od KLL/LML koji su liječeni kombinacijom rituksimaba i kontinuiranih visokih doza klorambucila u prvoj liniji. Podaci su prikupljeni iz arhive Dnevne bolnice Zavoda za hematologiju i Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb. Iz medicinske dokumentacije su prikupljeni podaci o značajkama bolesnika i karakteristikama bolesti, razlozima za početak terapije, laboratorijskim pokazateljima (broj leukocita, broj limfocita, hemoglobin, trombociti, LDH, β 2-mikroglobulin, albumin, IgG), podaci o zahvaćenosti perifernih limfnih regija te imunofenotipskim, citogenetskim i

patohistološkim pokazateljima. Ovi su podaci korišteni u svrhu klasificiranja bolesnika u kliničke stadije te analizu utjecaja poznatih nepovoljnih prognostičkih faktora na preživljenje. Nadalje, prikupljani su podaci o tijeku i trajanju terapije, toksičnosti te evaluaciji odgovora na terapiju. Toksičnost je kategorizirana prema *Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0* (CTCAE). Prikupljeni su i podaci o praćenju bolesnika od svršetka terapije do dana zadnje kontrole.

6.4. Statistička analiza.

Promatrani ishodi su odgovor na liječenje te preživljenje (OS), preživljenje bez progresije bolesti (PFS) i preživljenje bez potrebe za daljnjim liječenjem. OS (engl. *overall survival*, sveukupno preživljenje) se računa od dana početka terapije do dana smrti ili do zadnje kontrole. PFS (engl. *progression free survival*, preživljenje bez progresije) se računa od datuma početka terapije do progresije bolesti ili do zadnje kontrole. Preživljenje bez potrebe za daljnjim liječenjem računa se od dana početka prve linije terapije do dana početka slijedeće terapije, smrti ili zadnje kontrole. Za usporedbu značajki bolesnika koristio se Pearsonov χ^2 test. Trajanje najboljeg odgovora i preživljenje bolesnika prikazano je Kaplan-Meierovom metodom (Kaplan E, Meier P, 1958). Za usporedbu preživljenja između pojedinih skupina i podskupina, upotrebljavao se log-rank test. Od opisnih varijabli (deskriptora) korišten je medijan i raspon. Statistička analiza je učinjena upotrebom licenciranog statističkog programa *SPSS 15.0 for Windows*.

7. REZULTATI

7.1. Značajke bolesnika i bolesti

Pregledom dostupne medicinske dokumentacije, u istraživanje je uključeno 25 pacijenata. Demografske značajke svih 25 bolesnika i razlozi za početak terapije prikazani su u Tablici 1. Razlozi za početak terapije podijeljeni su u 4 skupine: progresija bolesti (vrijeme udvostručenja limfocita kraće od 12 mjeseci), velika tumorska masa (VTM, odnosno TTM ≥ 9), supresija normalne hematopoeze te pojava B-simptoma.

Tablica 1. Značajke bolesnika i razlozi za početak terapije

Broj pacijenata		25
	Broj muškaraca (%)	16 (64)
	Broj žena (%)	9 (36)
Dob u vrijeme dijagnoze	Raspon 41 – 80 god.	Medijan 67 god.
Trajanje bolesti od dijagnoze do početka terapije	Raspon 0 – 47 mjeseci	Medijan 10 mjeseci
Razlog za početak terapije¹		Broj pacijenata (%)
	Progresija	13 (52)
	Velika tumorska masa (VTM) (TTM ≥ 9)	16 (64)
	B-simptomi	4 (16)
	Supresija normalne hematopoeze	6 (24)

¹ kod nekih pacijenata postojao je više od jednog razloga za početak terapije

Analizirane su i značajke bolesti. Bolesnici su klasificirani u skupine prema kliničkim stadijima, kako slijedi u Tablici 2. U istoj su tablici prikazani i podaci koji se tiču poznatih prognostičkih faktora. Što se tiče palpabilnih perifernih limfnih regija, kod 17 bolesnika je bila prisutna limfadenopatija i/ili splenomegalija, s time da je raspon veličine palpabilnih limfnih čvorova od 2 do 5 cm, a slezene 0,5 do 20 cm ispod lijevog rebrenog luka.

Tablica 2. Klinički stadiji i prognostički faktori

Klasifikacija u stadije		Broj pacijenata
Rai	0-2	20
	3-4	5
Binet	A-B	20
	C	5
TTM	< 9	9
	≥ 9	16
Nalazi prognostičkih faktora		Broj (%)
povišen LDH		10 (45) ¹
povišen β₂-mikroglobulin		15 (71) ²
CD38-antigen ≥ 30%		9 (36)

¹ – za troje bolesnika nedostaje nalaz

² – za četvero bolesnika nedostaje nalaz

7.2. Terapija i ishod

Svi su bolesnici liječeni kontinuiranim visokim dozama klorambucila i rituksimabom koji je bio predviđen u 8 ciklusa. Po svršetku terapije visokim dozama klorambucila, kod većine je nastavljena terapija niskim dozama klorambucila, ovisno o potrebi i odluci ordinarijusa. Ta se terapija mogla nastaviti i nakon posljednjeg ciklusa rituksimaba te

evaluacije odgovora i kao takva nije smatrana terapijskim neuspjehom. Kod nekih se pacijenata simultano ordinirala i terapija kortikosteroidima. Pojednosti vezane uz terapiju prikazane su u Tablici 3.

Tablica 3. Terapija

Visoke doze klorambucila	Raspon i medijan
doza	12 - 20mg, medijan 18mg
trajanje	16 – 136 dana, medijan 41 dan
Niske doze klorambucila	Broj pacijenata (%)
DA	21 (84)
NE	4 (16)
Kortikosteroidi	Broj pacijenata (%)
DA	18 (72)
NE	7 (28)
Rituksimab	Broj pacijenata (%)
Predviđenih 8 ciklusa	20 (80)
Manje od 8 ciklusa	5 (20) ¹

¹ – kod troje bolesnika je terapija u tijeku

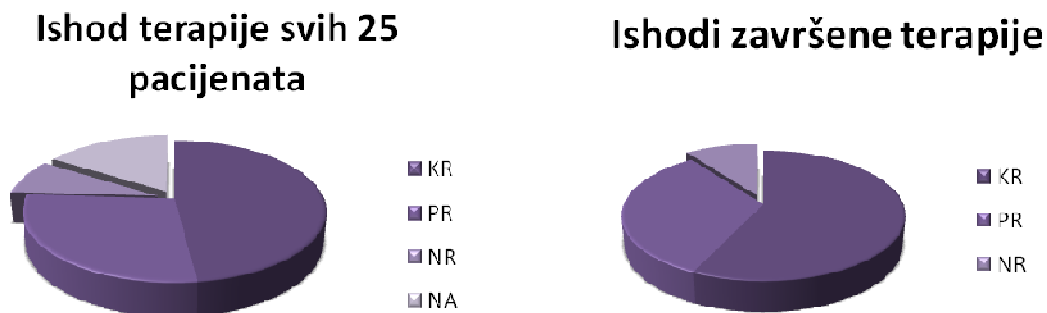
Jedan je pacijent isključen iz analize toksičnosti terapije zbog nedostatka točnih podataka. Osam pacijenata (32%) je podnijelo terapiju bez nuspojava. Ostalih 16 pacijenata (66%) podijeljeni su u dvije skupine, ovisno o ozbiljnosti toksičnosti terapije. Kako je ranije

navedeno, toksičnost je gradirana prema CTCAE. Prema tome, gradus 1 i 2 svrstavani su u skupinu blage, a gradus 3 i 4 ozbiljne toksičnosti. Ozbiljna se toksičnost pojavila u 8 slučajeva kod 7 pacijenata, a prikazana je u Tablici 4. Od nuspojava nižeg stupnja, najčešće su uočene alergijske kožne reakcije u vidu osipa, svrbeža i mjestimične ekfolijacije kože (kod 4 pacijenta, odnosno 17%), trombocitopenija gradus 2 u 2 slučaja (8%), epizoda sinuitisa u 2 slučaja (8%) te mučnina također kod 2 pacijenta (8%).

Tablica 4. Ozbiljna toksičnost na terapiju

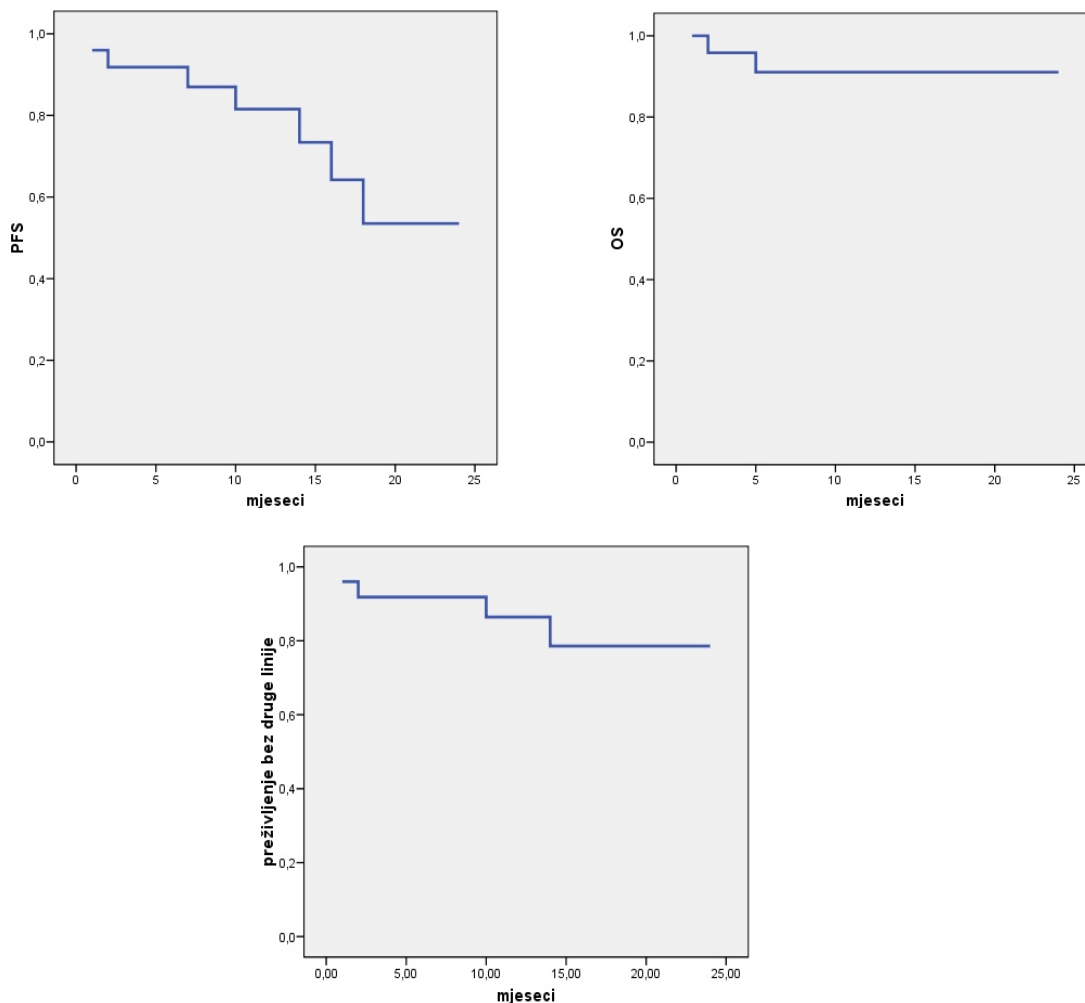
TOKSIČNOST gradus 3 i 4	Broj (%)
leukopenija/neutropenija	6 (25)
anemija	1 (4)
kardijalna dekompenzacija	1 (4)

Navedenom terapijom postignuta je kompletna remisija (KR) u 12 pacijenata (48%), parcijalna remisija (PR) u 7 pacijenata (28%), 2 su pacijenta bila refraktorna na terapiju (NR, 8%), a za 4 pacijenta (16%) nisu bili dostupni podaci o ishodu u trenutku nastajanja ovog rada (NA). Izbacimo li iz računice potonja 4 pacijenta, ukupan odgovor na terapiju iznosi 90% (57% KR i 33% PR). Ovi su rezultati prikazani na Slici 1. Od pacijenata s postignutom kompletnom remisijom, jedan je kasnije doživio relaps bolesti, a iz skupine pacijenata s parcijalnom remisijom, relaps je doživjelo njih 4.



Slika 1. Grafički prikaz ishoda terapije

Nakon medijana praćenja od 15 mjeseci za živeće pacijente, preživljenje bez progresije (PFS) iznosi 73%, a ukupno preživljenje (OS) 92%. Četiri pacijenta (18%) razvila su potrebu za drugom linijom terapije tijekom ukupnog praćenja. Preživljenje bez progresije (PFS), ukupno preživljenje (OS) i preživljenje bez potrebe za drugom linijom terapije prikazani su na Slici 2.



Slika 2. Grafički prikaz preživljenja bez progresije, ukupnog preživljenja i preživljenja bez potrebe za drugom linijom terapije

7.3. Korelacija između poznatih prognostičkih faktora

Ispitala sam postoji li korelacija između poznatih prognostičkih faktora, odnosno jesu li frekvencije njihova pojavljivanja značajno veće u određenim skupinama bolesnika. Kao nepovoljni prognostički faktori uzeti su visoki klinički stadij, ekspresija CD38, povišena razina serumskog LDH i povišena razina β 2-mikroglobulina. Zbog malog broja bolesnika, pri svrstavanju u kliničke stadije podijeljeni su u dvije skupine, skupinu nižeg i višeg stadija. Tako su pacijenti s Binetovim stadijima A i B svrstani u grupu nižeg, a C višeg stadija.

Sukladno tome, pacijenti koji su pripadali stadijima 0, 1 i 2 prema Raiu, svrstani su u grupu nižeg, a 3 i 4 višeg stadija. Prema TTM vrijednosti, niži stadij je <9 , a visoki ≥ 9 . Podjela u skupine je prikazana u Tablici 2. Visoki klinički stadiji prema Binetu, Raiu i TTM uspoređivani su međusobno te s ostalim prognostičkim faktorima (ekspresijom CD38, razinom LDH i razinom $\beta 2$ -mikroglobulina). Ovisno o ekspresiji CD38, pacijenti su podijeljeni u 2 skupine, one s niskom ekspresijom te one s visokom ($<30\%$, $\geq 30\%$). Prema razini LDH, pacijenti su svrstani u skupinu normalnog i povišenog LDH (>241 U/L) u serumu. Što se tiče $\beta 2$ -mikroglobulina, pacijenti su također podijeljeni u skupine normalne i povišene serumske razine ($>2,5$ mg/L). CD38, LDH i $\beta 2$ -mikroglobulin također su uspoređeni međusobno. Stadiji Binet C i Rai 3 i 4 su isti. Visoki TTM se približio, međutim ne korelira značajno s Binet i Rai stadijem ($p = 0,065$). Ostale ispitane korelacije nisu dosegle statističku značajnost, a rezultati su navedeni u Tablici 5.

Tablica 5. Korelacije poznatih prognostičkih faktora

		Binet C	TTM ≥ 9	Rai 3,4	CD38 $\geq 30\%$	LDH povišen¹	B2M povišen²
Binet C	<i>Pearsonova korelacija</i>		,375	1,000(**)	,042	,280	,038
	p		,065	,000	,843	,207	,869
	<i>broj pacijenata</i>		25	25	25	22	21
TTM ≥ 9	<i>Pearsonova korelacija</i>	,375		,375	-,132	-,069	,091
	p	,065		,065	,530	,760	,694
	<i>broj pacijenata</i>	25		25	25	22	21
Rai 3,4	<i>Pearsonova korelacija</i>	1,000(**)	,375		,042	,280	,038
	p	,000	,065		,843	,207	,869
	<i>broj pacijenata</i>	25	25		25	22	21
CD38 $\geq 30\%$	<i>Pearsonova korelacija</i>	,042	-,132	,042		-,036	-,155
	p	,843	,530	,843		,875	,502
	<i>broj pacijenata</i>	25	25	25		22	21
LDH povišen¹	<i>Pearsonova korelacija</i>	,280	-,069	,280	-,036		-,286
	p	,207	,760	,207	,875		,236
	<i>broj pacijenata</i>	22	22	22	22		19
B2M povišen²	<i>Pearsonova korelacija</i>	,038	,091	,038	-,155	-,286	
	p	,869	,694	,869	,502	,236	
	<i>broj pacijenata</i>	21	21	21	21	19	

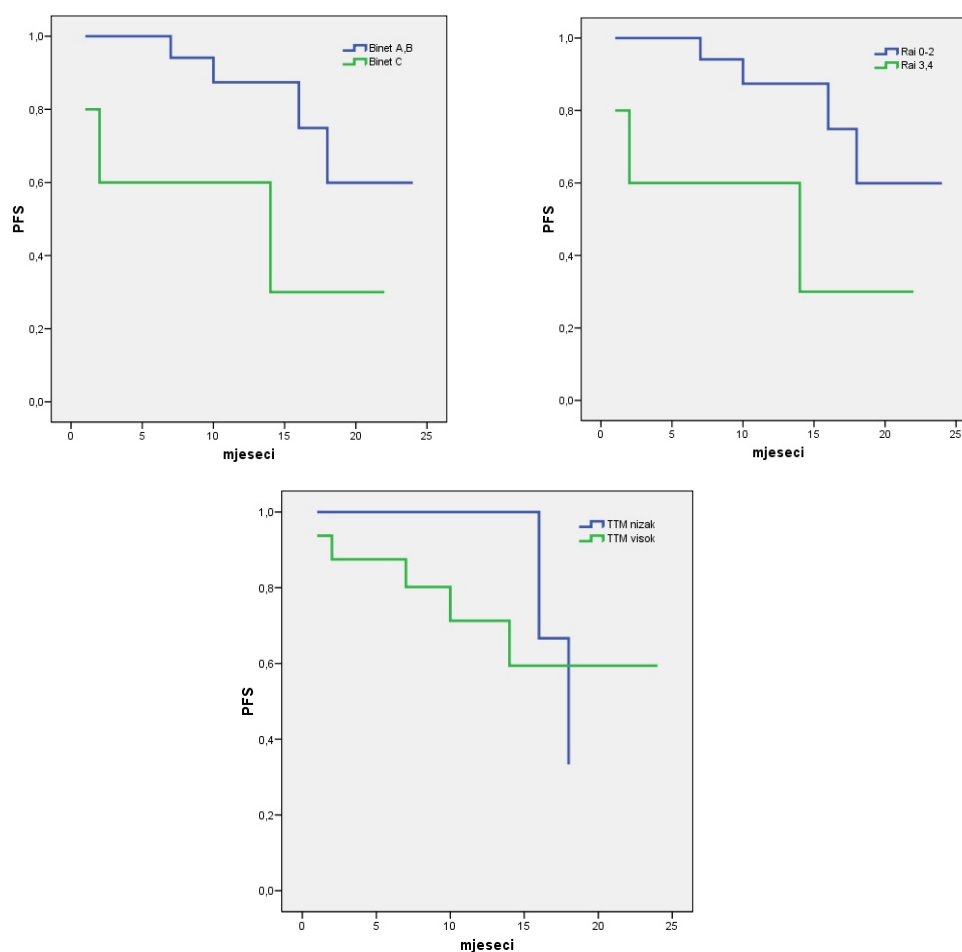
¹ – kod 3 pacijenta nedostaje nalaz LDH

² – kod 4 pacijenta nedostaje nalaz $\beta 2$ -mikroglobulina

7.4. Utjecaj kliničkog stadija na PFS

Sljedeći postupak bio je ispitati kako klinički stadij utječe na preživljenje bez progresije bolesti. Klinički su stadiji definirani i podijeljeni kako je navedeno iznad.

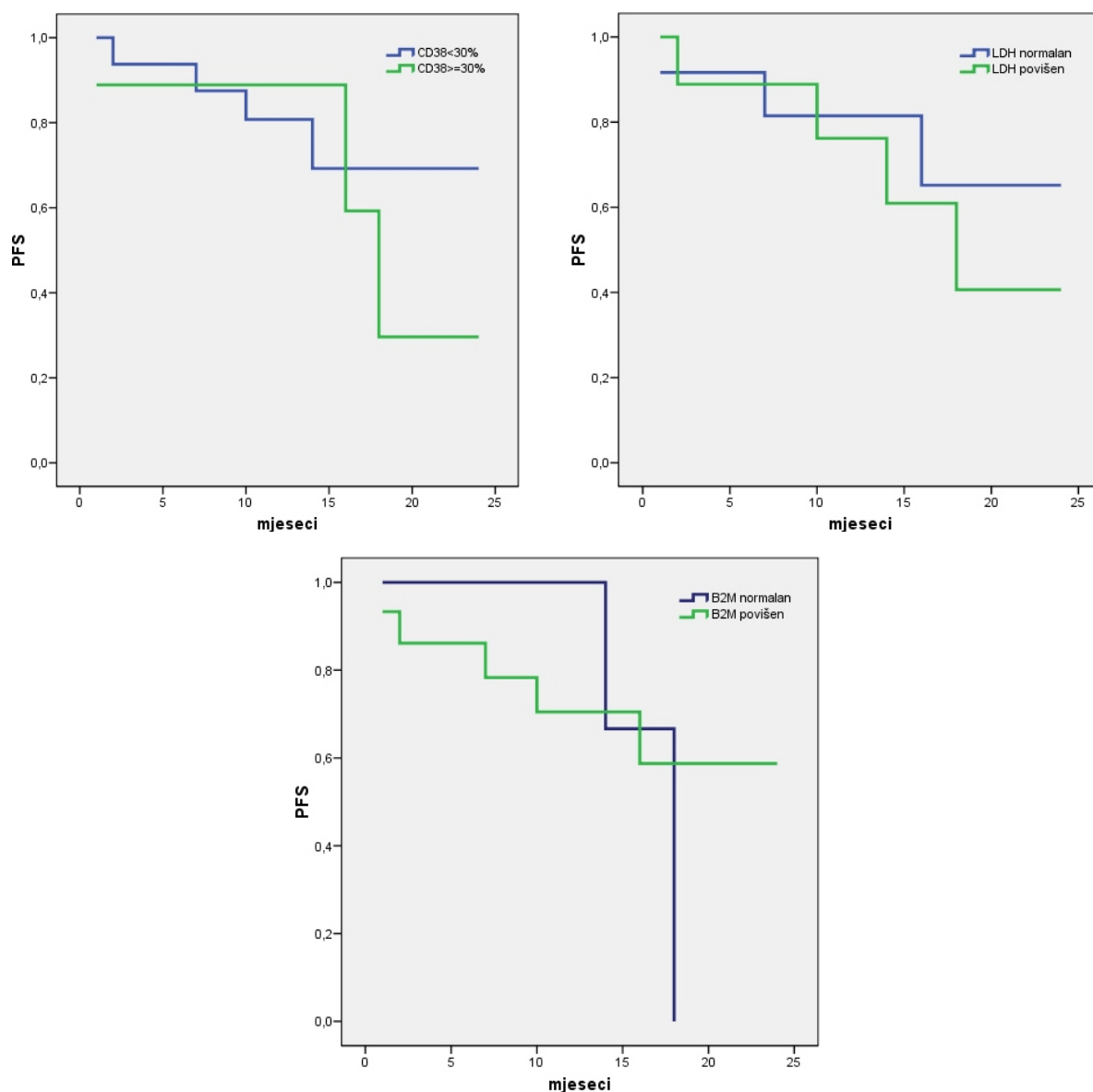
Nakon medijana praćenja od 15 mjeseci, PFS u pacijenata s nepovoljnim Binet stadijem (stadij C) iznosi 26%, dok je PFS za niže stadije 86%. Razlika ovih dvaju rezultata je statistički značajna, $p=0,047$. Identični rezultat pokazuje analiza utjecaja povoljnog naprama nepovoljnog stadija prema Raiu (86% vs 26%, $p = 0,047$) na PFS. Što se TTM tiče, razlika u preživljenju između skupina male i velike tumorske mase nije dosegla statističku značajnost (100% vs 60%, $p = 0,626$). Grafički prikaz ove analize naznačen je na Slici 3.



Slika 3. Preživljenje bez progresije ovisno o kliničkim stadijima

7.5. Utjecaj poznatih prognostičkih faktora na PFS

Za analizu utjecaja poznatih nepovoljnih prognostičkih faktora na preživljenje bez progresije uzeti su ekspresija CD38 na klonalnim stanicama, razina LDH te razina β 2-mikroglobulina u serumu (Tablica 2). Usporedbom PFS ovih skupina, statistički značajna razlika nije dosegnuta (za sva tri slučaja je $p > 0,05$). Slika 4. prikazuje krivulje preživljenja bez progresije za skupine definirane prema prognostičkim faktorima.



Slika 4. PFS skupina ovisno o prognostičkom faktoru (podaci o razini B2M nedostaju za 4 pacijenta, a o LDH za troje te su ti pacijenti isključeni iz prikazanog izračuna)

7.6. Utjecaj dobi na toksičnost terapije

Radi potrebe ispitivanja utjecaja dobi na toksičnost terapije, pacijenti su podijeljeni u dvije dobne skupine, mlade od 65 i one u starosti od 65 ili više godina. Nakon što je jedan bolesnik isključen iz analize zbog nedostatka podataka o toksičnosti terapije, skupinu starijih čini 15 bolesnika, a mlađih 9. Ispitivan je odnos dobi i pojave toksičnosti uopće te dobi i pojave ozbiljne toksičnosti (gradus 3 i 4). Udio toksičnosti uopće veći je u mlađoj dobnoj skupini (7 od 9 bolesnika, 78%), međutim bez statističke značajnosti u odnosu na stariju dobnu skupinu ($p = 0,562$). S druge strane, prevalencija ozbiljne toksičnosti 3,63 puta je veća u skupini starijih bolesnika (6 od 15 bolesnika, 40%) nego kod mlađih (1 od 9 bolesnika, 11%), međutim također bez statističke značajnosti ($p = 0,158$).

8.1. Osvrt na bolesnike i rezultate liječenja

Ovo istraživanje učinjeno je na uzorku od 25 bolesnika liječenih u Kliničkom bolničkom centru Zagreb pod dijagnozom kronične limfocitne leukemije / limfoma malih limfocita. U uvodu je spomenuto kako je medijan dobi pojave ove bolesti 69 godina (*Eichhorst B et al, 2010*). Obzirom na medijan dobi bolesnika od 67 godina, ovaj je uzorak relativno blizak stvarnom stanju u populaciji, za razliku od uzoraka brojnih drugih istraživanja koja uključuju značajno mlađe pacijente (CLL-8 61 god., LRF CLL4 65 god, njemački CLL-4 59 god.). Ukupni odgovor na terapiju iznosi 90%, od toga je kompletna remisija (KR) postignuta u 57% bolesnika, a parcijalna remisija (PR) u 33%, uključujući samo pacijente koji su završili s predviđenom terapijom u trenutku nastajanja ovog istraživanja. Usporedimo li ove rezultate s rezultatima studije koja ispituje učinak visokih doza klorambucila (*Jakšić B et al, 1997*), ukupni odgovor na terapiju je minimalno bolji (90% naprama 89%). Ipak, valja istaknuti veliku razliku u veličini ispitivanog uzorka (25 naprama 228 bolesnika). U studiji Hillmena i suradnika (*Hillmen P et al, 2009*) koja ispituje učinak rituksimaba u kombinaciji s klorambucilom u intermitentnim ciklusima, a uključuje 50 pacijenata, rezultati pokazuju ukupni odgovor na terapiju od 84%. U navedenoj je studiji kompletnu remisiju i nodularnu parcijalnu remisiju postiglo 26% bolesnika, a parcijalnu remisiju njih 58%. Ovakav udio kompletnih remisija značajno je lošiji od rezultata ovog istraživanja (26% naprama 57%). Takav rezultat govori u prilog prednosti kontinuirane terapije klorambucilom u odnosu na intermitentnu, posebno kao podlozi za ciljanu terapiju. Što se tiče usporedbe s rezultatima FCR-protokola, prema studiji njemačke istraživačke skupine, ukupan odgovor na terapiju FCR protokolom iznosi 95% (*Hallek M et al, 2008b*), što ga čini superiornijim nad svim dosadašnjim istraživanjima, pa tako i ovim. Međutim, navedena studija uključivala je mlađe

pacijente (medijan dobi 61 god.), a jedan od uključnih kriterija bio je i dobra tjelesna kondicija. Njihovi se dobri rezultati, prema tome, djelomično mogu zahvaliti i uključnim kriterijima. Zbog toga eventualna prednost navedenog protokola kod starijih pacijenata, posebno lošije tjelesne kondicije i s komorbiditetima, gubi na težini.

Nakon medijana praćenja od 15 mjeseci za živeće pacijente, preživljenje bez progresije (PFS) iznosi 73%, a ukupno preživljenje (OS) 92%. Četiri pacijenta (18%) razvila su potrebu za drugom linijom terapije. Rezultati rada Bašić-Kinde i suradnika koji prikazuje učinak liječenja monoterapijom klorambucilom, pokazali su medijan PFS od 15 mjeseci (*Bašić-Kinda S et al, 2009*). Kako je navedeno istraživanje provedeno u istom centru na istoj populaciji bolesnika, rezultati su mogu usporediti s ovim istraživanjem, a tada je jasno kako je PFS nakon 15 mjeseci bolji za bolesnike liječene dodatkom rituksimaba klorambucilu nego samo klorambucilom (72% naprama 50%). Općenito, dobiveni preliminarni rezultati vrlo su obećavajući, no ipak su zbog kratkog medijana praćenja za sada slabo usporedivi s drugim poznatim studijama.

8.2. Prognostički faktori i njihov utjecaj na PFS

Brojne su studije dokazale kako preživljenje korelira s kliničkim stadijem u doba dijagnoze kronične limfocitne leukemije. Postavlja se pitanje postoji li korelacija između kliničkih stadija i ostalih prognostičkih faktora. U ovom je istraživanju jedan od ciljeva provjeriti i kako klinički stadij utječe na preživljenje bez progresije bolesti u ispitivanoj skupini bolesnika. U podjeli bolesnika prema kliničkim stadijima, korištene su klasifikacije prema Binetu (*Binet JL et al, 1981*), prema Raiu (*Rai KR et al, 1975*) i TTM klasifikacija (*Jakšić B, Vitale B, 1981*). Zbog malog broja, bolesnici su podijeljeni u dvije skupine unutar pojedine klasifikacije. Tako su kao nepovoljni stadiji uzeti stadij C prema Binetu, prema Raiu stadiji 3 i 4 te prema TTM-klasifikaciji vrijednost $TTM \geq 9$.

Procjena rizika može se pobliže definirati koristeći i druge nepovoljne prognostičke faktore, kao što su podvostručenja broja limfocita u razdoblju kraćem od 12 mjeseci, atipična morfologija, povišene vrijednosti serumskog β_2 -mikroglobulina, visoke vrijednosti solubilnog CD23, povišene vrijednosti serumske timidin-kinaze, povišene vrijednosti serumskog LDH te delecije ili mutacije gena *p53* (gen tumor-supresor) (Yee KWL, O'Brien SM, 2008). Više je studija pokazalo kako visoka razina i/ili gustoća izraženosti CD38 na klonalnim limfocitima predstavlja nepovoljan prognostički znak (Damle RN et al, 1999; Hamblin TJ et al, 2002; Ibrahim S et al, 2001). U uvodu je opisana vrijednost IgVH statusa kao nepovoljnog prognostičkog faktora. Danas se kao dostupan surogatni biljeg IgVH statusa koristi izražaj molekule ZAP-70 (Crespo M, 2003). Od navedenih nepovoljnih prognostičkih faktora izabrana su 3 obzirom na dostupnost podataka. Ispitivana je međusobna korelacija, korelacija s kliničkim stadijima te utjecaj ekspresije CD38, razine LDH i razine β_2 -mikroglobulina na PFS. Bolesnici su ponovo podijeljeni u povoljnu i nepovoljnu skupinu, ovisno o vrijednosti prognostičkog faktora.

Ispitivanje korelacije između odabranih nepovoljnih prognostičkih faktora pokazalo se statistički beznačajno, ne računajući korelaciju između visokih Binet i Rai stadija. Naime, obzirom na pojednostavljenje u po 2 skupine, definirane skupine identične su za obje klasifikacije. Obzirom na mali broj bolesnika, iz izostanka korelacije ostalih ispitivanih parametara teško je donijeti bilo kakav utemeljen zaključak.

Nakon medijana praćenja od 15 mjeseci, PFS u pacijenata s nepovoljnim Binet stadijem iznosi 26%, dok je PFS za niže stadije 86%. Razlika ovih dvaju rezultata je statistički značajna, $p=0,047$. Identičan rezultat pokazuje analiza utjecaja povoljnog naprama nepovoljnog stadija prema Raiu (86% vs 26%, $p = 0,047$) na PFS, što je i logično obzirom da s navedenom podjelom u dvije skupine stadiji prema Raiu i Binetu 100% koreliraju. Ovi rezultati u skladu su s očekivanjima i potvrđuju vrijednost Binetove i Raieve klasifikacije kao

kvalitetnog prognostičkog faktora. Pokazana je i razlika PFS ovisno o povoljnom, tj. nepovoljnom TTM stadiju (100% vs 60%), međutim ta razlika nije dosegla statističku značajnost ($p = 0,626$). Sudeći prema tome, TTM klasifikacija nije naročito vrijedan grupni prognostički faktor kada se radi o malim uzorcima, posebno u istraživanju ovakvog tipa. Kako je velika tumorska masa ($TTM \geq 9$) jedan od kriterija za početak terapije, a potreba za terapijom uvjet za uključivanje u ovo istraživanje, dolazi do nepravilne raspodjele bolesnika u skupine (16 bolesnika s $TTM \geq 9$ i 9 s $TTM < 9$). Uzimajući to u obzir, pretpostavilo bi se da većina bolesnika ima vrlo lošu prognozu, no ipak rezultati PFS govore suprotno. Otvoreno je pitanje kakav bi rezultat bio nakon dužeg medijana praćenja.

Suprotno pretpostavci, pokazalo se kako je PFS za medijan praćenja od 15 mjeseci bolji u nepovoljnim prognostičkim skupinama s obzirom na CD38 i $\beta 2$ -mikroglobulin, premda statistički beznačajno. Ovakav paradoksalan rezultat vjerojatno je posljedica malog broja bolesnika, ali i kratkog medijana praćenja i kao takav nema veće značenje. Utjecaj povišene razine LDH na preživljenje bez progresije u skladu je s očekivanjima, no također se nije pokazao kao statistički značajan.

8.3. Toksičnost terapije i utjecaj dobi

Ozbiljna toksičnost tijekom terapije (gradus 3 i 4) zabilježena je u 8 slučajeva kod 7 bolesnika (33% slučajeva, 29% bolesnika) što čini terapiju vrlo podnošljivom. Leukopenija se ističe kao najčešća ozbiljna nuspojava terapije, što je očekivano i u skladu sa svim dosadašnjim studijama. Usporedba rezultata ovog istraživanja s rezultatima Hillmena i suradnika (*Hillmen P et al, 2009*) potvrđuje tezu kako je kontinuirana primjena klorambucila uz rituksimab superiornija terapija nad dodatkom rituksimaba protokolu intermitentnim dozama klorambucila, što se tiče pojave toksičnosti (33% naprama 50% slučajeva). Ovakav rezultat vjerojatno proizlazi iz utjecaja toksičnosti klorambucila u kontinuiranoj naprama

intermitentnoj primjeni. Isto tako, dobiveni rezultati su znatno bolji i u odnosu na zabilježenu toksičnost u studiji FCR-protokola gdje je ozbiljna toksičnost zabilježena u 62% pacijenata (*Hallek M et al, 2008b*). Ovakvi rezultati potvrđuju opravdanost davanja kombinacije rituksimaba i visokih doza klorambucila kao nisko toksične terapije, posebno za bolesnike starije dobi i lošije tjelesne kondicije.

Postavilo se pitanje utječe li starija životna dob na pojavu toksičnosti ove terapije. Rezultati su pokazali da je 6 osoba s evidentiranom ozbiljnom toksičnošću pripadalo dobnoj skupini ≥ 65 godina, a 1 bolesnik mlađoj. Ovakav rezultat podržava kliničko opažanje o trendu porasta toksičnosti s dobi bolesnika. Iz tablice kontingencije dobivenih podataka računa se kako je prevalencija toksičnosti u starijoj dobnoj skupini 3,63 puta veća nego u mlađoj, međutim navedeni rezultat nije dokazao značaj u statističkoj analizi ($p = 0,158$). Razlozi za to mogli bi biti premalen broj bolesnika zbog čega se utjecaj dobi na toksičnost ne može statistički potvrditi, ali nije isključena niti mogućnost da u stvarnosti uopće ne postoji korelacija između učestalije pojave ozbiljne toksičnosti i starije životne dobi.

- Kombinacija visokih doza klorambucila u kontinuiranoj primjeni i monoklonskog anti-CD20 protutijela rituksimaba pokazala se kao vrlo uspješna terapija u prvoj liniji liječenja bolesnika s kroničnom limfocitnom leukemijom / limfomom malih limfocita, dovodeći do visokog ukupnog odgovora
- Iako kratkog medijana praćenja, preživljenje bez progresije više je, nego u usporedivoj studiji monoterapije klorambucilom, s istom populacijom bolesnika
- Medijan dobi proučavanih pacijenata viši je nego u drugim velikim studijama i kao takav bolje prezentira stvarno stanje u populaciji bolesnika u kojoj se KLL javlja
- Binet C stadij i Rai stadiji 3 i 4 su nepovoljni prognostički faktori sa značajnim utjecajem na PFS
- Navedena terapijska shema ne dovodi do neočekivane toksičnosti i u istraživanju se pokazala kao dobro podnošljiva
- Starija životna dob ne utječe značajno na razvoj ozbiljne toksičnosti
- Rezultati ovog istraživanja potvrđuju početnu hipotezu i kao takvi imaju vrijednost u kliničkoj praksi te kao temelj za daljnja istraživanja
- Potrebno je daljnje praćenje i uključivanje novih bolesnika u studiju kako bi se dobili relevantniji podaci, usporedivi s velikim europskim i svjetskim studijama

10. ZAHVALE

Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc Igoru Aureru na predloženoj temi, stručnoj pomoći i savjetima tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem svim kolegama i prijateljima koji su pomogli u nastanku ovog rada te svojoj obitelji na bezuvjetnoj potpori i podršci.

Ovaj rad posvećujem svom prerano preminulome djedu, gospodinu Ivanu Balintu, koji je oduvijek bio moja moralna vertikala te svojom osobom i mudročću oplemenio moj život i zauvijek obilježio buduće djelovanje.

Hvala ti, dida.

1. Abés R, Gelize E, Fridman WH, Teillaud JL (2001) Long-lasting antitumor protection by anti-CD20 antibody through cellular immune response. *Blood* 116(6): 926-934.
2. Alas S, Bonavida B, Emmanouillides S (2000) Potentiation of fludarabine cytotoxicity on non-Hodgkin's lymphoma by pentoxifyline and rituximab. *Anticancer Res* 20: 2961-2966.
3. Aurer I, Radman I, Sertić D, Mikulić M, Labar B (2007) Zloćudni tumori limfocita. U: Labar B, Hauptmann E, *Hematologija*, Zagreb: Školska knjiga, 243-300
4. Bašić-Kinda S, Aurer I, Dujmović D, Radman I, Sertić D, Dubravčić K, Gjadrov-Kuvezdić K, Batinić D, Sučić M, Labar B (2009) Continuous High-Dose Chlorambucil in Previously Untreated Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia – Single Center Experience. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 114: Abstract 2372.
5. Begleiter A, Mowat M, Israels LG, Johnston JB (1996) Chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia: mechanism of action. *Leuk Lymphoma* 23: 187-201.
6. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tehernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Bdabbes S, Gremy F (1981) A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multi variant survival analysis. *Cancer* 48: 198.
7. Byrd JC, Murphy T, Howard RS, Lucas MS, Goodrich A, Park K, Pearson M, Waselenko JK, Ling G, Grever MR, Grillo-Lopez AJ, Rosenberg J, Kunkel L, Flinn IW (2001) Rituximab using a thrice weekly dosing schedule in B-cell chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma demonstrates clinical activity and acceptable toxicity. *J Clin Oncol* 19: 2153-2164.
8. Byrd JC, Kitada S, Flinn IW, Aron JL, Pearson M, Lucas D, Reed JC (2002) The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood* 99: 1038-1043.
9. Byrd JC, Rai K, Peterson BL, Appelbaum FR, Morrison VA, Kolitz JE, Shepherd L, Hines JD, Schiffer CA, Larson RA (2005) Addition of rituximab to fludarabine may

- prolong progression-free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: an updated retrospective comparative analysis of CALGB 9712 and CALGB9011. *Blood* 105(1): 49-53.
10. Cancer Care Ontario (2011) Chlorambucil – Drug Monograph, preuzeto s <http://www.cancercare.on.ca/cms/One.aspx?portalId=1377&pageId=10760> 10. svibnja 2011.
 11. Catovsky D, Richards S, Fooks J, Hamblin T (1991) CLL trials in the United Kingdom - The Medical Research Council CLL Trials 1,2,3. *Leuk Lymphoma* 5 (suppl): 105-107.
 12. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR (1996) National Cancer Institute Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 87: 4990-4997.
 13. CLL Trialists' Collaborative Group (1999) Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomised trials. *J Natl Cancer Inst* 91: 861-868.
 14. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marce S, Lopez-Guillermo A, Campo E, Montserrat E (2003) ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 328: 1764-1775.
 15. Cvetkovic RS, Perry CM (2006) Rituximab - a review of its use in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* 66: 791-820.
 16. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N (1999) Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94: 1840-1847.
 17. de Lima M, O'Brien S, Lerner S, Keating MJ (1998) Chronic lymphocytic leukemia in the young patient. *Semin Oncol* 25(1): 107-116.
 18. Dighiero G, Maloum K, Desablens B, Cazin B, Navarro M, Leblay R, Leporrier M, Jaubert J, Lepeu G, Dreyfus B, Binet JL, Travade P (1998) Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic. *N Engl J Med* 338: 1506-1514.
 19. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P (2000) Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343: 1910-1916.

20. Eichhorst B, Hallek M, Dreyling M (2010) Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol 21 (Suppl 5)*: 162-164.
21. French Cooperative Group on CLL (1989) Long-term results of the CHOP regimen in stage C chronic lymphocytic leukemia. *B J Haematol 73*: 334.
22. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukaemia (1990) A randomized clinical trial of chlorambucil versus COP in stage A chronic lymphocytic leukaemia. *Blood 75*: 1422-1425.
23. Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP (2007) Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol 44*: 3823-3837.
24. Golaj J, Lazzari M, Facchineti V, Bernasconi S, Borleri G, Barbui T, Rambaldi A, Introna M (2001) CD20 levels determinate the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood 98*: 3383-3389.
25. Golay J, Cittera E, Di Gaetano N, Mnaganini M, Mosca M, Nebuloni M, van Roojen N, Vago L, Introna M (2006) The role of complement in the therapeutic activity of rituximab in a murine B lymphoma model homing in lymph nodes. *Haematologica 91*: 176-183.
26. **a)** Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ (2008) Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) updating the National Cancer Institute-Working Group (NCI-WG) 1996 guidelines. *Blood 111*: 5446-5456.
27. **b)** Hallek M, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, Hensel M, Hopfinger G, Hess G, von Gruenhagen U, Bergmann MA (2008) Immunochemotherapy with Fludarabine, Cyclophosphamide and Rituximab Versus Fludarabine and Cyclophosphamide Improves Response Rates and Progression-Free Survival of Previously Untreated Patients with Advanced Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood (ASH annual meeting abstracts) 112*: Abstract 325.
28. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG (2002) CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are

- independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD 38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 99: 1023-1029.
29. Han T, Ezdinli EZ, Shimaoka K, Desai DV (1973) Chlorambucil vs. combined chlorambucil-corticosteroid therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 31: 502-508.
 30. Harris N, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC (1994) A revised Europe-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84: 1361-1392.
 31. Hilchey SP, Hyrien O, Mosmann TR, Livingstone AM, Friedberg JW, Young F, Fisher RI, Kelleher RJ Jr, Bankert RB, Bernstein SH (2009) Rituximab immunotherapy results in the induction of a lymphoma idiotype-specific T-cell response in patients with follicular lymphoma: support for a “vaccinal effect” of rituximab. *Blood* 113(16): 3809-3812.
 32. Hillmen, P (2004) Advancing therapy for chronic lymphocytic leukemia - the role of rituximab. *Semin Oncol* 31 (Suppl 2): 22-26.
 33. Hillmen P, Gribben JG, Fallows GA, Milligan DW, Sayala HA, Moreton P, Oscier D, Dearden CE, Kennedy DB, Pettitt AR, Nathwani A, Cohen D, Gregory WM, Rawstron AC, Hayward CRW, Pocock C (2009) An Open Label Phase II Study to Investigate the safety and Efficacy of Rituximab Plus Chlorambucil in Previously Untreated Patients with CD20-Positive B-Cell Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL). *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 114: Abstract 3428.
 34. Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, Lerner S, Kantarjian HM, Albitar M (2001) CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 98: 181-186.
 35. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Campo E, Pileri SA, Swerdlow SH (2008) Introduction and overview of the classification of the lymphoid neoplasms. U: Swerdlow SH et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, Lyon: International Agency for Research on Cancer, 158-166.
 36. Jakšić B, Vitale B (1981) Total tumor mass score (TTM): a new parameter in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 49: 405.

37. Jakšič B, Brugiatelli M (1988) High dose continuous chlorambucil vs intermittent chlorambucil plus prednisone for treatment of B-CLL--IGCI CLL-01 trial. *Nouv Rev Fr Hematol* 30: 437-442.
38. Jakšič B, Brugiatelli M, Krc I, Losonczy H, Holowiecki J, Planinc-Peraica A, Kušec R, Morabito F, Iacopino P, Lutz D (1997) High dose chlorambucil versus Binet's modified cyclophosphamide, doxorubicin, vincristin and prednisone in the treatment of advanced B-cell chronic lymphocytic leukemia. Results of an international multicenter randomized trial. *Cancer* 79: 2107-2114.
39. Jakšič B (2008) Sindrom kronične limfocitne leukemije. U: Vrhovac B et al. *Interna Medicina*, Zagreb: Naklada Lijevak, 1006-1012.
40. Jin Z, El-Deiry WS (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4: 139-163.
41. Kaplan E, Meier P (1958) Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Associ* 53: 457-480.
42. Kimby E, Brandt L, Nygren P, Glimelius B; SBU-group, Swedish Council of Technology Assessment in Health Care (2001) A systematic overview of chemotherapy effects in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Acta Oncol* 40: 223-230.
43. Lim SH, Beers SA, French RR, Johnson PWM, Glennie MJ, Cragg MS (2010) Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. *Haematologica* 95(1): 135-143.
44. Manches O, Lui G, Chaperot L, Gressin R, Molens JP, Jacob MC, Sotto JJ, Leroux D, Bensa JC, Plumas J (2003) In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 101: 949-954.
45. Montserrat E, Alcalá A, Parody R, Domingo A, García-Conde J, Bueno J, Sanz MA, Giralt M, Rubio D (1985) Treatment of chronic lymphocytic leukemia in advanced stages. A randomized trial comparing chlorambucil plus prednisone versus cyclophosphamide, vincristine and prednisone. *Cancer* 56: 2369-2375.
46. Montserrat E, Fontanillas M, Estape J, for the Spanish PETHEMA Group (1991) Chronic lymphocytic leukemia treatment: an interim report of PETHEMA trials. *Leuk Lymphoma* 5: 89-92.
47. Muller-Hermelink HK, Montserrat E, Catovsky D, Campo E, Harris NL, Stein H (2008) Chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. U: Swerdlov

- SH et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, Lyon: International Agency for Research on Cancer, 180-182.
48. O'Brien SM, Kantarjian HM, Cortes J, Beran M, Koller CA, Giles FJ, Lerner S, Keating MJ (2001) Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 19: 1414–1420.
 49. O'Brien SM, Kantarjian HM, Thomas DA, Giles FJ, Freireich EJ, Cortes J, Lerner S, Keating MJ (2001) Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 19: 2165 - 2170.
 50. O'Brien S, Wierda WG, Faderl S, Ferrajoli A, Bueso-Ramos CE, Browning M, Kantarjian HM, Keating MJ (2005) FCR-3 as frontline therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood (ASH annual meeting abstracts)*106, 2005: 2117.
 51. Oscier D, Fegan C, Hillmen P, Illidge T, Johnson S, Maguire P, Matutes E, Milligan D; Guidelines Working Group of the UK CLL Forum. British Committee for Standards in Haematology (2004) Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 125: 294-317.
 52. Pangalis GA, Vassilakopoulos TP, Dimopoulou MN, Siakantaris MP, Kontopidou FN, Angelopoulou MK (2002) B-chronic lymphocytic leukemia: practical aspects. *Hematol Oncol* 20: 103, 146.
 53. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, levy RN, Pasternack BS (1975) Clinical staging of chronic lymphocytic. *Blood* 46: 419.
 54. Raphael B, Andersen JW, Silber R, Oken M, Moore D, Bennet J (1991) Comparison of chlorambucil and prednisone versus cyclophosphamide, vincristine and prednisone as an initial treatment for chronic lymphocytic leukemia: a long term follow up of an Eastern Cooperative Oncology group randomised clinical trial. *J Clin Oncol* 9: 770-776.
 55. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, Böttcher S, Ghia P, Zehnder JL, Lozanski G, Colomer D, Moreno C, Geuna M, Evans PA, Natkunam Y, Coutre SE, Avery ED, Rassenti LZ, Kipps TJ, Caligaris-Cappio F, Kneba M, Byrd JC, Hallek MJ, Montserrat E, Hillmen P (2007) International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 21: 956-964.

56. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ, Kwok M, Fenton JA, Plummer M, de Tute R, Owen RG, Richards SJ, Jack AS, Hillmen P (2008) Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*: 575-583.
57. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, Newman RA, Hanna N, Anderson DR (1994) Depletion of B-cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 12: 177-186.
58. Robak T, Dmoszynska A, Solal-Céligny P, Warzocha K, Loscertales J, Catalano J, Afanasiev BV, Larratt L, Geisler CH, Montillo M, Zyuzgin I, Ganly PS, Dartigeas C, Rosta A, Maurer J, Mendila M, Saville MW, Valente N, Wenger MK, Moiseev SI (2010) Rituximab Plus Fludarabin and Cyclophosphamide Prolongs Progression-Free Survival Compared With Fludarabine and Cyclophosphamide Alone in Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol* 28 (10): 1756-65.
59. Rozman C, Montserrat E (1995) Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 333: 1052-1057.
60. Selenko N, Maidic O, Draxier S, Berer A, Jäger U, Knapp W, Stöckl J (2001) CD20 antibody (C2B8)-induced apoptosis of lymphoma cells promotes phagocytosis by dendritic cells and cross-priming of CD8+ cytotoxic T cells. *Leukemia* 15(10): 1619-1626.
61. Shan D, Ledbetter JA., Press OW (2000) Signaling events involved in anti- CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol Immunother* 48: 673-683.
62. Shustik C, Mick R, Silver R, Sawitsky A, Rai K, Shapiro L (1988) Treatment of early chronic lymphocytic leukemia: intermittent chlorambucil versus observation. *Hematol Oncol* 6: 7-12.
63. Stanglmaier M, Ries S, Hallek M (2004) Rituximab and alemtuzumab induce a nonclassic, caspase-independent apoptotic pathway in B-lymphoid cell lines and in chronic lymphocytic leukemia cells. *Ann Hematol* 83: 634-645.
64. van der Kolk LE, Grillo-Lopez AJ, Baars JW, Hach CE, van Oers MH (2001) Complement activation plays a key role in the side effects of rituximab treatment. *Br J Haematol* 115: 807-811.
65. van Meerten T, van Rijn RS, Hol S, Hagenbeek A, Ebelin SB (2006) Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts

complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res* 12: 4027-4035.

66. Wierda W, O'Brien S, Wen S, Faderl S, Garcia-Manero G, Thomas D, Do KA, Cortes J, Koller C, Beran M, Ferrajoli A, Giles F, Lerner S, Albitar M, Kantarjian H, Keating M (2005) Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*: 4070-4078.
67. Yee KWL, O'Brien SM. "Chronic Lymphocytic Leukemia: Diagnosis and Treatment." U: Rajkumar SV et al. *Neoplastic hematology and Medical Oncology*, Rochester: Mayo Foundation for Medical Education and Research, 116-133.
68. Yuille MR, Matutes E, Marossy A, Hilditch B, Catovsky D, Houlston RS (2000) Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *Br J Haematol* 109 (4): 794-799.

12. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu 14. svibnja 1986. godine. Osnovnu školu pohađala sam u Samoboru, nakon čega sam upisala V. gimnaziju u Zagrebu. Nakon položene mature, 2005. godine upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Dobitnica sam Dekanove nagrade za najbolju studenticu 3. godine, akademske godine 2007./2008.

Bavim se športskim plesom, prvakinja sam i viceprvakinja Republike Hrvatske u Kombinaciji 10 plesova i Standardnim plesovima te članica nacionalne reprezentacije s iskustvom na europskim i svjetskim prvenstvima.