

Kritériá minimálnej reziduálnej choroby pri chronickej lymfocytovej leukémii

MUDr. Juliana Holasová^{1,2}, MUDr. Alexander Wild¹, RNDr. Soňa Ölvecká¹, Mgr. Mariana Jacková¹

¹Hematologické oddelenie, FNŠP F. D. Roosevelta, Banská Bystrica

²Lekárska fakulta SZU, Bratislava

U väčšiny pacientov s chronickou lymfocytovou leukémiou (CLL) môže byť dosiahnutá hlboká remisia a dlhodobé prežitie bez ochorenia pomocou chemoimunoterapie prvej línie, ako je kombinácia fludarabínu, cyklofosfamidu a rituximabu. Menej intenzívne režimy, ako sú obinutuzumab a chlorambucil, nemajú potenciál dosiahnuť hlbokú remisiu.

Klinickým vyšetrením pacienta nie je možné zachytiť reziduálnu chorobu, ktorá po liečbe pretrváva. Metódy založené na viacfarebnej prietokovej cytometrii a polymerázovej reťazovej reakcii (PCR) dokážu detegovať minimálnu reziduálnu chorobu (MRD) na citlivosť 0,010 % (10^{-4}). Hladina MRD po liečbe u pacientov s chronickou lymfocytovou leukémiou je nezávislým prediktorom výsledku liečby. Vzhľadom na rastúci počet nových molekúl v liečbe CLL by sa mohlo MRD použiť ako prognostický marker prežívania do progresia (PFS) a celkového prežívania (OS). Tým by sa skrátil čas potrebný na posúdenie ich účinnosti v dlhodobom sledovaní pacientov.

Kľúčové slová: chronická lymfocytová leukémia, minimálna reziduálna choroba, prežívanie do progresie, celkové prežívanie

Minimal residual disease – its importance in patients with chronic lymphocytic leukemia

In most patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL), profound remission and long-term disease-free survival can be achieved with first-line chemoimmunotherapy, such as a combination of fludarabine, cyclophosphamide and rituximab. Less intensive regimens such as obinutuzumab and chlorambucil do not have the potential to achieve deep remission.

By clinical examination of the patient, it is not possible to capture the residual disease that persists after the treatment. Methods based on multicolored flow cytometry and polymerase chain reaction are able to detect a minimum residual disease (MRD) at 0.010% (10^{-4}). MRD after treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia is an independent predictor of the outcome of treatment. Due to the increasing number of new molecules in CLL treatment, MRD could be used as a prognostic marker of progression free survival (PFS) and overall survival (OS). This would shorten the time needed to assess their effectiveness in long-term follow-up.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, minimal residual disease, progression free survival (PFS), overall survival

Onkológia (Bratisl.), 2018;13(2):134-138

Úvod

Chronická lymfocytová leukémia (CLL) je lymfoproliferatívna neoplázia, ktorá je najčastejšou leukémiou v západných krajinách s incidenciou 2 – 4,5/100 000 obyvateľov/rok. Vo vekovej kategórii nad 70 rokov sa udáva incidencia 50/100 000 obyvateľov/rok (1). Liečba ochorenia sa odporúča iba u pacientov s aktívnym a symptomatickým ochorením.

Zavedením nových chemoimunoterapeutických kombinácií za posledné desaťročie sa účinnosť liečby pacientov s CLL výrazne zlepšila. Medián prežívania do progresie (PFS) sa pohybuje od 3,5 do 6,7 roka po prvej línii terapie, zatiaľ čo medián celkového prežívania OS pre pacientov s pokročilými štádiami (Binet C alebo Rai IV) je približne 6,5 roka. Transplantácia alogénnych krvotvorných kmeňových buniek zostáva jedinou kuratívnu liečebnou terapiou a je odporúčaná pre pacientov s veľmi

vysokým rizikom a/alebo refraktérnym ochorením (2, 3).

Význam minimálnej reziduálnej choroby

Mnohým pacientom, ktorí dosiahnu kompletnú remisiu, zostávajú reziduálne CLL bunky v kostnej dreni, ktoré nie je možné detegovať rutinnými vyšetreniami. Expanzia týchto reziduálnych CLL buniek môže viesť k relapsu ochorenia. Minimálna reziduálna choroba (MRD) nedetegovateľná na klinickej a morfolologickej úrovni môže byť teraz spoľahlivo detegovateľná na úroveň jednej CLL bunky na 10^{-4} leukocytov 0,010 %. Kvalita kompletnej remisie by mala byť posudzovaná podľa MRD negativity. Za posledné dve desaťročia došlo k zlepšeniu MRD detekcie a MRD negativity sa stala žiaducim a dosiahnuteľným cieľom liečby CLL (2, 3).

Liečba chronickej lymfocytovej leukémie chemoimunoterapiou, ako je fludarabín, cyklofosfamid, rituximab (FCR) má vysokú mieru odpovede s predĺženou dobou prežitia do progresie (PFS) a celkovým prežívaním (OS) (3, 4). Určenie účinnejšej liečby použitím PFS a OS vyžaduje klinické štúdie vrátane veľmi veľkého počtu pacientov a dlhodobého sledovania. Detekcia minimálneho reziduálneho ochorenia (MRD) nad 0,010 % (10^{-4}) je nezávislým prediktorom PFS a OS u pacientov s CLL liečených chemoterapiou (5). Aj keď sú tu nové terapie, ako je liečba inhibítorom proteinkinázy (ibrutinib), ktorá môže viesť k predĺženiu doby prežívania bez dosiahnutia MRD negativity, zostáva zistiť skutočnú prognostickú hodnotu dosiahnutia MRD-negatívneho stavu s inými terapiami než chemoimunoterapiou (napr. FCR). Použitie MRD na hodnotenie efektívnosti liečby by umožnilo stanovenie účinnosti nových liečebných postupov bez potreby dlhodobého pozorovania pacientov (3).

MRD je objektívna miera stavu choroby definovaná počtom zostávajúcich leukemických buniek v periférnej krvi alebo v kostnej dreni po liečbe. Podľa súčasných medzinárodných definícií MRD negativita sa rovná kvantitatívnej detekcii menej ako jednej CLL bunky v 10 000 leukocyty (úroveň MRD 10^{-4}). V súčasnosti nie sú k dispozícii žiadne údaje na podporu úrovne MRD nižšej ako 10^{-4} (2).

MRD možno hodnotiť z periférnej krvi alebo kostnej drene. Odporúča sa najskôr vyšetriť MRD v periférnej krvi. Ak je prítomná MRD negativita v periférnej krvi, odporúča sa ju potvrdiť z kostnej drene. Meranie MRD by sa malo uskutočniť pri konečnom posúdení efektu liečby (približne tri mesiace po ukončení liečby), aby plne reprezentovali účinok liečby.

Hoci hodnotenie MRD stále nie je široko štandardizované, v súčasnosti existujú dve analytické metódy schopné posúdiť stav MRD. Neexistujú žiadne konkrétne odporúčania týkajúce sa výberu metódy, ktorú použiť na stanovenie MRD.

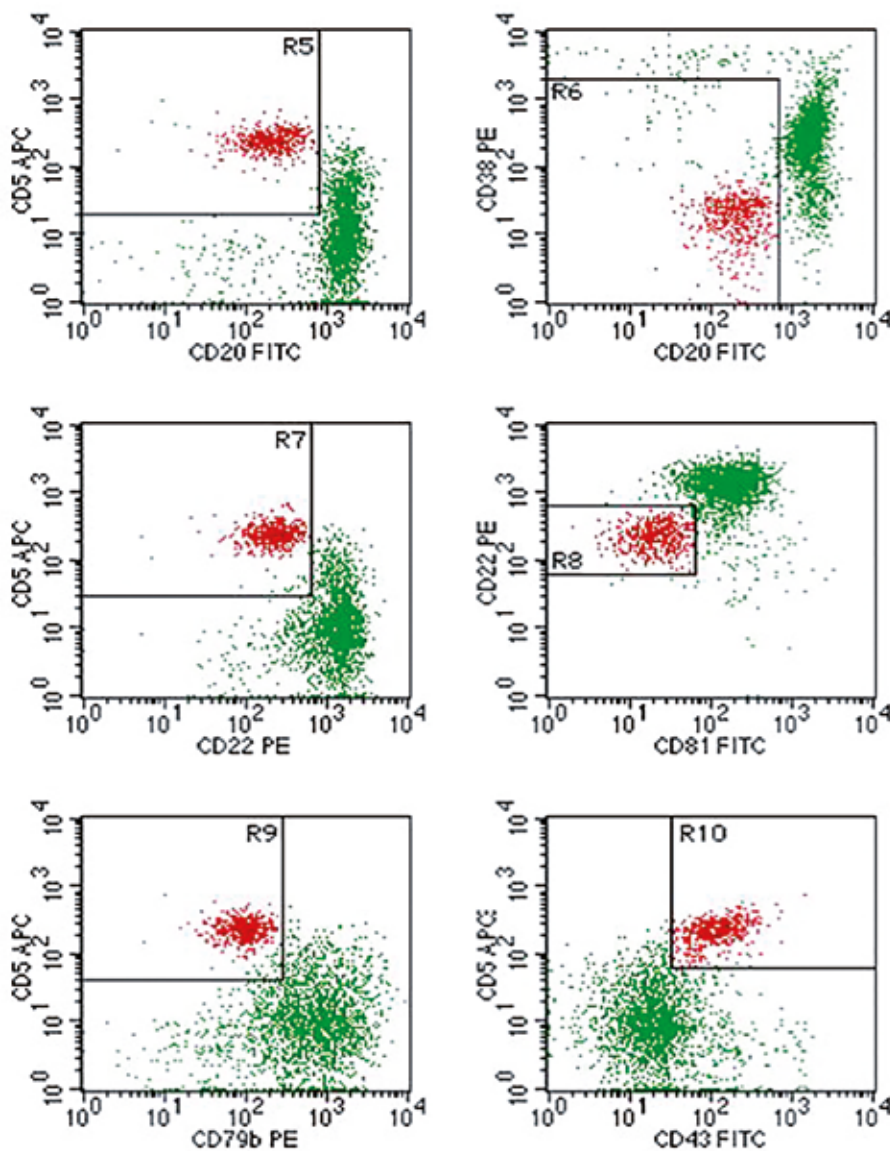
Kvantitatívna PCR v reálnom čase (RQ-PCR)

Každý leukemický B bunkový klon nesie unikátnu IGHV-IGHD-IGHJ predstavu, ktorú možno zosilniť pomocou PCR primérov. Kvantitatívne stanovenie alela špecifického oligonukleotidového imunoglobulínu ťažkého reťazca pomocou PCR je náročné, pretože vyžaduje dodržanie postupnosti každého klonšpecifického preskupenia s citlivosťou v rozmedzí 10^{-4} až 10^{-5} . Keďže špecifické priméry sa týkajú jednej reorganizovanej sekvencie IgH génu, existuje určité riziko straty cieľového génu v dôsledku prebiehajúcich preskupení v oblasti IgH, čo môže viesť k zníženiu citlivosti metódy. Aby sa minimalizovali falošne negatívne merania MRD, mali by sa použiť dva Ig PCR ciele, ako sú oligoklonálne klony v čase diagnózy. Veľkou výhodou tejto metódy je, že vzorky nemusia byť čerstvé a môžu byť odoslané do centra na analýzu.

Štvorfarebná alebo viacfarebná prietoková cytometria

CLL bunky vykazujú charakteristický unikátny fenotyp, preto môže byť malé množstvo leukemických buniek de-

Obrázok 1. Hodnotenie MRD pomocou viacfarebnej prietokovej cytometrie



Rawstron AC, et al. *Leukemia* 2016;30:929-936;
Rawstron AC, et al. *Leukemia* 2013;27:142-149;
Rawstron AC, et al. *Leukemia* 2007;21:956-964.

tegované použitím prietokovej cytometrie na požadovanú úroveň citlivosti 10^{-4} . Citlivosť MRD závisí predovšetkým od dostupnosti dostatočného počtu leukocytov vo vzorke. Hlavnou výhodou tejto metódy je, že je jednoduchšia a rýchlejšia, pretože nevyžaduje konštrukciu klonovo špecifických primérov. Používa široko dostupnú technológiu, a preto je to veľmi použiteľná metóda. Nevýhoda je, že vzorky musia byť čerstvé (48 hodín). V mnohých prípadoch môže byť ťažké zaistiť vhodnú manipuláciu a prepravu do centrálnych laboratórií.

Európska výskumná iniciatíva pre CLL (ERIC) stanovila 4-farebnú a 6-farebnú panely na stanovenie MRD. Vyšetrenie sa môže vykonávať z periférnej krvi a aj z kostnej drene. V súčasnosti je

možnosť využiť 8- alebo 10-farebných prietokových panelov, čo vedie k zlepšeniu citlivosti a účinnosti. Rawstron štandardizoval a identifikoval markery na hodnotenie MRD (obrázok 1) so špecifikáciou komponentu nezávislou na prístroji a použitých činidiel na jednotlivých pracoviskách. Medzi tieto markery patria CD19, CD20, CD5, CD43, CD79b a CD 81 (tabuľka 1). Existovali počiatočné obavy, že strata expresie CD20 spôsobená rituximabom by zhoršila výsledok, pretože expresia CD20 stlmená na CLL bunkách v porovnaní s normálnymi B lymfocytmi je špecifickým diferenciačným znakom CLL buniek. Avšak vďaka normálnej deplécii B-buniek rituximabom to v praxi neovplyvňuje výsledok vyšetrenia.

Paralelná analýza sekvenovania pomocou testu ClonoSEQ ukázala dobrú zhodu s výsledkami prietokovej cytometrie na úrovni 0,010 % (10^{-4}). Použitie obidvoch metód umožňuje kvantifikáciu reziduálnej choroby a optimalizáciu liečby pacientov s CLL (2 – 3).

Klinické údaje používajúce MRD analýzu

MRD koreluje s PFS a OS v štúdiách, ktoré využívali rôzne liečby a MRD analýzu.

Hodnotenie MRD po kombinovanej chemoterapii a chemoimunoterapii v liečbe prvej línie

V tabuľke 2 sú zhrnuté štúdie liečených pacientov kombinovanou chemoterapiou alebo chemoimunoterapiou, kde MRD analýza bola zrealizovaná s citlivosťou 10^{-4} .

V štúdií German CLL Study Group (GCLLSG) CLL8, hladina MRD v krvi a v kostnej dreni hodnotená po liečbe súvisela s PFS a OS, nezávisle od charakteristiky pacienta pred liečbou a od druhu liečby. Avšak pravdepodobnosť dosiahnutia negatívnej MRD bola nižšia u pacientov s vysokorizikovými biolo-

Tabuľka 1. Cieľové hodnoty pre markery použité v analýze CLL MRD (3)

Antigén	Typická expresia pri CLL ^a	Kontrolná populácia (normálna periférna krv)		Minimálna relatívna intenzita fluorescencie ^b
		Positívna	Negatívna	
CD 5	pozitívna (> 20 %)	CD3+ T bunky	CD19+B bunky	> 30
CD 20	slabá	CD19+ B bunky	CD3+ T bunky	> 10
CD 43	pozitívna (>20 %)	CD3+ T bunky	CD20+ B bunky	> 15
CD 79b	slabá	CD20+ B bunky	CD3+ T bunky	> 15
CD 81	slabá	CD3+ T bunky	Granulocyty	> 12

^aPre „typický expresný vzor“ znamená „pozitívny“ percentuálny podiel buniek pozitívnych v porovnaní s kontrolou a „slabá“ znamená aspoň 20 % zníženie intenzity fluorescencie vzhľadom na strednú expresiu pozorovanú s referenčnou populáciou polyklonálnych B buniek s použitím tej istej protilátky.

^bMinimálna relatívna intenzita fluorescencie môže poskytnúť separáciu buniek CLL z normálnych B buniek v 95 % prípadov. Výhodou relatívnej intenzity fluorescencie je dosiahnutie úrovne, pri ktorej 99 % prípadov má optimálnu separáciu buniek CLL z normálnych buniek.

gickými znakmi a u pacientov liečených fludarabínom a cyklofosfamidom (FC) v porovnaní s fludarabínom, cyklofosfamidom a rituximabom (FCR). Napriek tomu bolo dosiahnutie MRD-negatívneho stavu nezávislým prediktorom PFS po liečbe kombinovanou chemoterapiou a chemoimunoterapiou (6).

Hodnotenie MRD po 2. línie liečby a po liečbe vysokorizikových pacientov

V tabuľke 3 sú zhrnuté štúdie hodnotiace klinické výsledky pomocou MRD stavu u relabovaných/refraktérnych alebo vysokorizikových pacientov.

MRD negatívna remisia bola spojená s lepším PFS po liečbe FCR, u pacientov s deléciou TP53 liečených alemtuzumabom a vysokodávkovaným metylprednizolónom a pri monoterapii alemtuzumabom nezávisle od kategórie klinickej odpovede (6).

Najnovšie výsledky

Jednou z posledných štúdií, ktoré hodnotili význam MRD v korelácii s PFS a OS, bola štúdia Kwoka. Išlo o retrospektívnu štúdiu, v ktorej hodnotil 18-ročné prežívanie pacientov s CLL na základe hodnotenia MRD v kostnej dreni do 6 mesiacov po liečbe. MRD bola hod-

Tabuľka 2. Klinický význam MRD analýzy stanovenej metódou s minimálnou citlivosťou 10^{-4} po 1. línií kombinovanou chemoterapiou alebo chemoimunoterapiou (6)

Štúdia	Liečba	Počet pacientov (% MRD negatívnych)	Spôsob vyšetrenia MRD	PFS (Prežívanie do progresie)	P hodnota	OS (Celkové prežívanie)	P hodnota
Bosch et al. 2008 (8)	FCM	18 (14 %)	10^{-4} .FLC KD	MRD- pozitívna CR < MRD negatívny CR	.2	neuveďené	NA
Lamanna et al. 2009 (9)	F→C→R	23 (52 %)	10^{-5} .PCR	35 mesiacov vs NR	.007	neuveďené	NA
Maloum et al. 2009 (10)	FC	21 (64 %)	10^{-2} a 10^{-4} .FLC PK	DFS, medián/HR neuvedené	< .001	bez rozdielu	NS
Bottcher et al. 2012 (11)	FC alebo FCR	290	10^{-2} a 10^{-4} .FLC PK	14,41 a 69 mesiacov pre $\geq 10^{-2}$ vs $\geq 10^{-4}$ vs * < 10^{-2} , < 10^{-4}	< .001	signifikantne nižšie pre $\geq 10^{-2}$ vs 10^{-2}	< .001
Fischer et al. 2012 (12)	BR	45 (58 %)	10^{-4} .FLC PK	12 mesiacov, 32 mesiacov a NR pre $\geq 10^{-2}$ vs $\geq 10^{-4}$ vs < 10^{-2} , < 10^{-4} *	< .001	23,2 mesiaca pre $\geq 10^{-2}$ vs NR pre 10^{-2}	neuveďené
Abrisqueta et al. 2013 (13)	R-FCM	63 (56 %)	10^{-4} .FLC KD	4 roky; 86 % vs 60 %*	.03	neuveďené	neuveďené
Strati et al. 2014 (14)	FCR	161 (43%)	10^{-4} .FLC KD	HR 0.1 (medián NR)*	.03	HR 0.6 (median NR) *	.02
Goede et al. 2014 (15)	Obinutuzumab +Clb	133 (20 %) v KD 231 (38 %) v PK	10^{-4} .FLC PK/KD	19,4 mesiaca vs NR*	< .001	nehodnotené	NA
Kwok et al. 2014 (16)	fludarové režimy	57 (42 %)	10^{-4} .FLC KD	5 rokov; 81 % vs 16 %*	< .001	10 rokov; 53 % vs 24 %*	< .001

Vysvetlivky:

BR – bendamustín a rituximab; Clb – chlorambucil; DFS – disease-free survival, prežívanie bez choroby; DFS; F – fludarabín; FCM – fludarabín, cyklofosfamid a mitoxantron; F→C→R – sekvenčný fludarabín, vysokodávkovaný cyklofosfamid a rituximab; FLC – flow cytometry – prietoková cytometria; PCR – polymerase chain reaction – polymerázová reťazová reakcia; HR – hazard ratio – riziko, NA – not applicable, neaplikovateľné, NS – not significant – nesignifikantné, PK – periférna krv, KD – kostná dreň, NR – not reached, nedosiahnutý, Not reported – nehodnotené

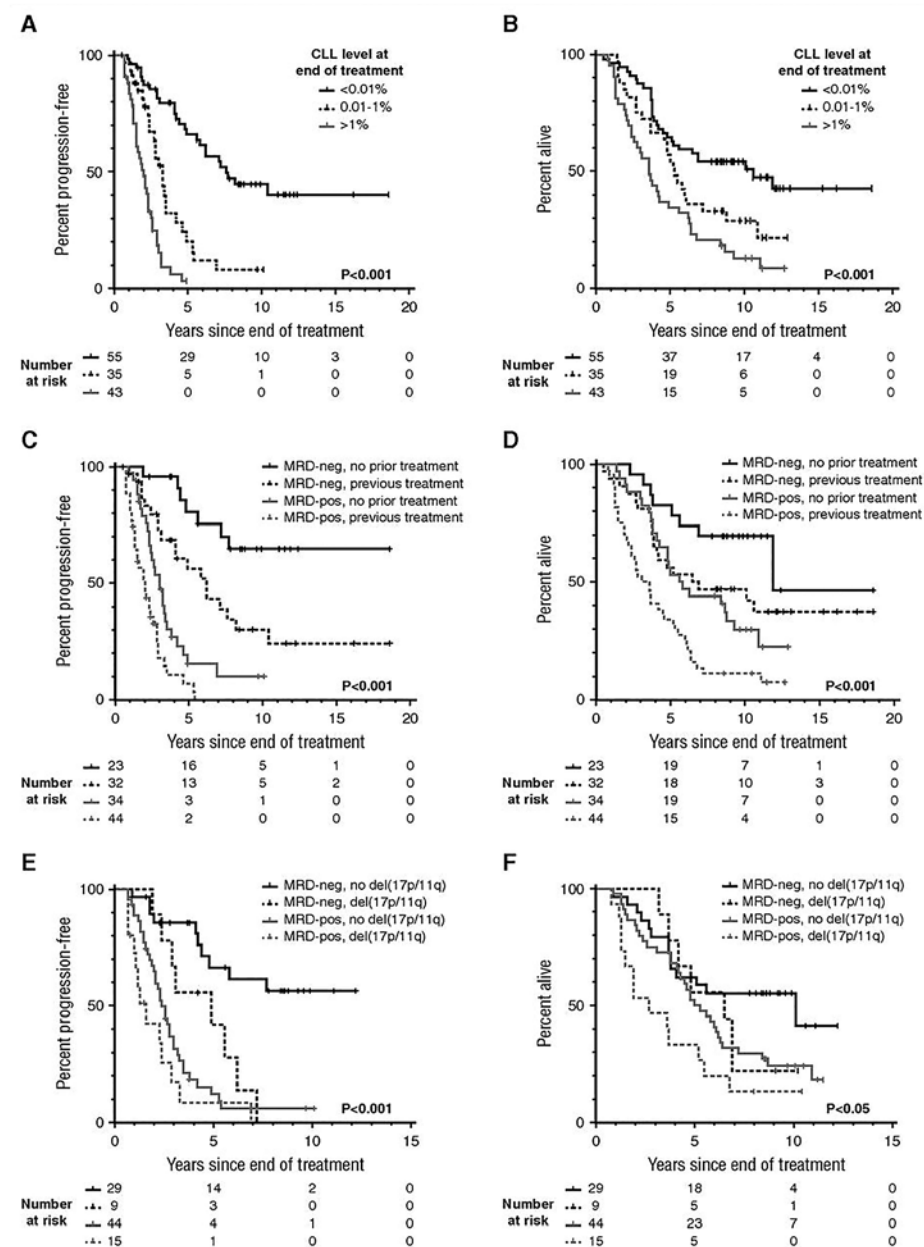
*MRD vykazuje prognostický význam nezávisle od klinickej odpovede a východiskových prognostických znakov

Tabuľka 3. Výsledky MRD v korelácii s PFS a OS u pacientov s CLL liečených pre relaps/refraktérne alebo vysokorizikové ochorenie (6)

Štúdia	Liečba	Počet pacientov (% MRD negatívnych)	Spôsob vyšetrenia MRD	PFS (Prežívanie do progresie)	P hodnota	OS (Celkové prežívanie)	P hodnota
Wieda et al. 2015 (17)	FCR	32 (38 %)	10 ⁻⁵ .PCR KD	27 vs 44 mesiacov	NS	nehodnotené	NA
Moreton et al. 2005 (18)	alemtuzumab	34 (53 %)	10 ⁻⁵ .FLC KD	20 mesiacov vs NR	<.001	41 mesiacov vs NR	<.001
Pettit et al. 2012 (19)	alemtuzumab + HDMP	25 (36 %)	10 ⁻⁴ .FLC KD	medián 24 vs 10 mesiacov	.009	nehodnotené	NA

Vysvetlivky: HDMP – vysokodávkovaný metylprednizolón, NA – not applicable, neaplikovateľné, NS – not significant, nesignifikantné, KD – kostná dreň

Obrázok 2. Prítomnosť reziduálnej choroby na konci liečby predpovedá dlhodobé PFS a OS nezávisle od predchádzajúcej liečby a cytogenetiky (7)



Poznámky: Hladina MRD po liečbe bola získaná počas 6 mesiacov po ukončení liečby multiparametrovou prietokovou cytometriou so senzitivitou 10⁻⁴ (0,01 %). Pacient bol považovaný za MRD-negatívneho, ak hladina MRD bola pod úrovňou detekcie (tj < 0,01 %). Je zobrazená log rank P hodnota a P < 0,05 je považovaná za štatisticky významnú (A). Prežitie bez progresie (PFS) podľa úrovne detegovateľnej choroby na konci liečby (B), celkové prežitie (OS) podľa úrovne detegovateľnej choroby na konci liečby (C). PFS podľa predchádzajúcej liečby a stavu MRD na konci liečby (D), OS podľa predchádzajúcej liečby a stavu MRD na konci liečby (E), PFS podľa del (17p) alebo del (11q) a stavu MRD na konci liečby (F), OS podľa del (17p) alebo del (11q) a stavu MRD na konci liečby (E-F). Cytogenetické aberácie boli hodnotené fluorescenčnou in situ hybridizáciou. Rovnováha pacientov s del (17p) a del (11q) bola v porovnaní s MRD-negatívnymi a MRD-pozitívnymi skupinami porovnateľná. V skupine MRD negatívnych del (17p/11q) malo 3 z 9 pacientov (33 %) del (17p), zatiaľ čo 6 z 9 pacientov (67 %) malo del (11q). V skupine MRD pozitívnych del (17p/11q) malo 6 z 15 pacientov (40 %) del (17p), zatiaľ čo 9 z 15 pacientov (60 %) malo del (11q). MRD-neg – MRD-negatívna; MRD-pos – MRD-pozitívna

notená prietokovou cytometriou podľa medzinárodných odporúčaní. Pacienti museli dosiahnuť minimálne parciálnu remisiu a boli liečení rôznymi režimami v rokoch 1996 až 2007.

Zistil, že MRD negativita koreluje s PFS a OS nezávisle od typu a línie liečby, ako aj od známych prognostických faktorov, zahŕňajúc aj nepriaznivú genetiku. Najväčší vplyv dosiahnutej MRD negativity bol u pacientov po prvej línii liečby s 10-ročným PFS u 65 % vs 10 % a 10-ročným OS 70 % vs 30 % pre MRD negatívnych pacientov v porovnaní s MRD pozitívnymi pacientmi. Do štúdie bolo zaradených 133 pacientov, z ktorých 67 dostalo kombinovanú liečbu CHT alebo CHIT (chemoterapie alebo chemoimunoterapie), 31 dostalo monoterapiu, 7 podstúpilo autológnu transplantáciu kmeňových krvotvorných buniek a 28 bolo liečených bez CHT, väčšinou monoklonálnou protilátkou.

Päťdesiatpäť (41 %) pacientov dosiahlo MRD negativitu zahŕňajúc 46 pacientov s CR a 9 pacientov s PR. Všetci pacienti s MRD negatívnou PR mali morfológicky kostnú dreň bez infiltrácie, ale s reziduálnou lymfadenopatiou.

V porovnaní s pacientmi liečenými v relapse, 10-ročné PFS bolo 30 % vs 0 % a 10-ročné OS bolo 47 % vs 11 % pre MRD negatívnych pacientov v porovnaní s MRD pozitívnymi pacientmi. Nakoniec, u pacientov s del (17p) alebo del (11q), dosiahnutie MRD negativity čiastočne prekonalo zlú prognózu spojenú s ich cytogenetickou aberáciou, čo naznačuje, že zacielenie na MRD môže byť potenciálne cenné pre túto skupinu pacientov.

Výsledky tejto štúdie preukázali dlhodobý prínos dosiahnutej MRD negativity bez ohľadu na typ liečby a podporujú použitie MRD ako prognostického ukazovateľa pre dlhodobé PFS a ako možný terapeutický cieľ v liečbe pacientov s CLL (obrázok 2) (7).

Záver

Existujúce paradigmy liečby CLL prechádzajú značnými zmenami. Hlbokú remisiu možno dosiahnuť u veľkého počtu pacientov po prvej línii liečby. Racionálne použitie nových terapií pravdepodobne ďalej zvýši počet pacientov dosahujúcich takúto remisiu. Dostupnosť citlivých a špecifických metód na kvantifikáciu reziduálnej choroby môže individualizovať liečbu v budúcnosti. Pacientom, ktorí dosiahnu MRD-negativitu, sa môže deeskalovať liečba, zatiaľ čo tým, ktorí nedosiahnu negatívnu MRD remisiu, by sa mohlo pokračovať konsolidáciou alebo udržiavacou liečbou s cieľom dosiahnuť MRD negatívny stav. Aby bolo možné monitorovať MRD, musí existovať špecifická metóda detekcie. Zatiaľ čo viacfarebná FLC je súčasťou normy, citlivejšie metódy, ako napríklad IGHV-HTS, môžu nakoniec preukázať vyššiu prediktívnu silu, toto však bude potrebné určiť prospektívne.

Status MRD možno použiť ako nezávislý prognostický ukazovateľ u pacientov liečených chemoimunoterapiou. Avšak prínos MRD negativity pri iných terapiách, napr. pri liečbe bez chemoterapie zostáva nejasný (6, 7).

Literatúra

- Hrubíško M. Chronická lymfocytová leukémia-úvod. *Onkología*. 2014; 9(1):29-33.
- EMA. Guideline on the use of MRD guideline in CLL 2014. studies.http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/12/WC500179047.pdf (accessed 3 February 2015)
- Rawstron AC et al., A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia:an European Research Initiative on CLL study, *Leukemia* 2016;30:929-936.
- Hallek M et al. International Group of Investigators; German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010;376(9747):1164-1174.
- Böttcher S, et al. Minimal residual Disease Quantification Is an Independent Predictor of Progression-free and Overall Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Multivariate analysis from the Randomized GCLLSG CLL8 Trial, *J Clin Oncol*. 2012;30(9):980-8.
- Thompson PA et al. Eliminating minimal residual disease as a therapeutic end point: working toward cure for patients with CLL. *Blood*. 2016;127(3):279-286.
- Kwok M, et al. Minimal residual disease is an independent predictor for 10-year survival in CLL. *Blood*. 2016;128(24):2770-2773.
- Bosch F, Ferrer A, Villamor N, et al. Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia: high response rate and disease eradication. *Clin Cancer Res*. 2008;14(1):155-161.
- Lamanna N, Jurcic JG, Noy A, et al. Sequential therapy with fludarabine, high-dose cyclophosphamide and rituximab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia produces high-quality response: molecular remissions predict for durable complete responses. *J Clin Oncol*. 2009;27(4):491-497.
- Maloum K, Settegrana C, Chapiro E, et al. IGHV gene mutational status and LPL/ADAM29 gene expression as clinical outcome predictors in CLL patients in remission following treatment with oral fludarabine plus cyclophosphamide. *Ann Hematol*. 2009;88(12):1215-1221.
- Böttcher S, Hallek M, Ritgen M, Kneba M. The role of minimal residual disease measurements in the therapy for CLL: is it ready for prime time? *Hematol Oncol Clin North Am*. 2013;27(2):267-288.
- Fisher K, Cramer P, Busch R, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicentre phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 2012(26):3209-3216.
- Abrisqueta P, Villamor N, Terol MJ, et al. Rituximab maintenance after first-line therapy with rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (R-FCM) for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;122(24):3951-3959.
- Strati P, Keating MJ, O'Brien SM, et al. Eradication of bone marrow minimal residual disease may prompt early treatment discontinuation in CLL. *Blood*. 2014;123(24):3727-3732.
- Goede V, Fisher K, Busch R, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med*. 2014;370(12):1101-1110.
- Kwok M, Rawstron A, Varghese A, et al. Independent prognostic significance of minimal residual disease status in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet*. 2014;383(special issue):S66
- Wierda W, O'Brien S, Wen S, et al. Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23(18):4070-4078.
- Moreton P, Kennedy B, Lucas G, et al. Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. *J Clin Oncol*. 2005;23(13):2971-2979.
- Pettitt AR, Jackson R, Carruthers S, et al. Alemtuzumab in combination with methylprednisolone is a highly effective induction regimen for patients with chronic lymphocytic leukemia and deletion of TP53: final results of the national cancer research institute CLL206 trial. *J Clin Oncol*. 2012;30(14):1647-1655.

MUDr. Juliana Holasová

Hematologické oddelenie, FN s P. F. D. Roosevelta
Nám. L. Svobodu 1, 975 17 Banská Bystrica
jholasova@nspbb.sk