

UNIVERSITATEA “OVIDIUS” DIN CONSTANȚA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ
DOMENIUL MEDICINĂ
ANUL UNIVERSITAR 2024-2025

TEZĂ DE DOCTORAT

**Limfomul limfocitic cu celulă B –
corelații clinico-biologice,
imunohistochimice și bio-moleculare**

Conducător de doctorat

Prof. Univ. Academician Dr. Mariana Așchie

Comisia de îndrumare științifică și academică

Conf.Univ. Dr. Mădălina Boșoteanu

CS I Dr. Anca Florentina-Mitroi

CS I Dr. Georgeta-Camelia Cozaru

Doctorand

Dr. Andreea-Georgiana Stoica

CUPRINS

Abrevieri utilizate în text	9
Introducere	12
I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Epidemiologia limfomului limfocit B/leucemiei limfoide cronice	14
1.1 <i>Etiologia SLL/LLC.....</i>	<i>14</i>
1.2 <i>Incidența și prevalența la nivel global și național</i>	<i>14</i>
2. Fiziopatogenia limfomului limfocit B/leucemiei limfoide cronice	15
2.1 <i>Originea celulară și heterogenitatea biologică</i>	<i>15</i>
2.2 <i>Receptorul celulei B</i>	<i>16</i>
2.3 <i>Anomaliile genetice</i>	<i>16</i>
2.3.1 <i>Anomaliile cromozomiale</i>	<i>16</i>
2.3.2 <i>Mutațiile genice</i>	<i>18</i>
2.3.3 <i>Micro-ARN-urile</i>	<i>18</i>
2.4 <i>Căi de semnalizare aberante</i>	<i>19</i>
2.4.1 <i>Semnalul BCR autonom și antigen independent</i>	<i>19</i>
2.4.2 <i>Suprareglarea protooncogenei BCL1</i>	<i>19</i>
2.4.3 <i>Răspunsul anormal la deteriorarea ADN-ului</i>	<i>19</i>
2.5 <i>Micromediul tumoral</i>	<i>20</i>
3. Diagnosticul limfomului limfocitic B/leucemiei limfoide cronice	22
3.1 <i>Manifestările clinice</i>	<i>22</i>
3.2 <i>Investigațiile de laborator</i>	<i>23</i>
3.3 <i>Diagnosticul histopatologic și imunohistochimic al limfomului limfocitic B</i>	<i>24</i>
3.3.1 <i>Examenul histopatologic</i>	<i>24</i>
3.3.2 <i>Testele imunohistochimice</i>	<i>25</i>
4. Stadializarea limfomului limfocitic B/leucemiei limfoide cronice	28
5. Markerii prognostici și predictivi în limfomul limfocitic B/leucemia limfoidă cronică	31
6. Diagnosticul diferențial al SLL/LLC cu alte limfoproliferări B.....	33
7. Tratamentul și răspunsul la tratament în limfomul limfocitic B/leucemia limfoidă cronică	35

II. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Metodologia cercetării	46
1.1 Scopul și obiectivele cercetării	46
1.2 Metode și material de lucru	48
1.2.1 Designul studiului și selecția pacienților	48
1.2.2 Colectarea datelor clinice și paraclinice	49
1.2.3 Examenul histopatologic și imunohistochimic – evaluarea expresiei p53 IHC	54
1.2.4 Determinarea statusului genei TP53 prin tehnica FISH	56
1.3 Considerații etice și juridice pentru respectarea normelor de bioetică și deontologie	59
1.4 Limitări ale studiului	59
1.5 Analiza statistică și interpretarea datelor	59
2. Rezultate obținute	60
2.1 Caracterizarea și corelațiile clinico-biologice în lotul de studiu	60
2.2 Caracterizarea histopatologică și imunohistochimică a cazurilor	100
2.3 Evaluarea statusului genei TP53 prin FISH, în lotul de studiu	113
2.4 Caz particular de SLL – afectare extranodală	122
3. Discuții	126
4. Concluzii	136
5. Originalitatea tezei de doctorat	138
6. Aplicabilitatea practică și validarea rezultatelor obținute	139
7. Lista de publicații	141
8. Anexe	142
III. Bibliografie	161

Introducere

Limfomul limfocitic cu celulă B (B-SLL) este forma tisulară (predominant ganglionară) a leucemiei limfoide cronice B (B-CLL), un neoplasm al limfocitului B matur dar inert din punct de vedere imunologic. Cele două entități sunt malignități indolente și sunt considerate ca fiind aceeași boală dar cu manifestări diferite, conform ultimei clasificări a Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) a tumorilor hematopoietice și țesuturilor limfoide și a Grupului Internațional de Lucru pentru B-CLL [1,2]. Localizările primare sunt reprezentate de sângele periferic, splină, nodulii limfatici și măduva hematogenă. Limfocitele B maligne din B-CLL și B-SLL au trăsături patologice și imunofenotipice identice. Termenul de B-CLL se utilizează atunci când boala se prezintă ca afectare primară a sângelui periferic (acumularea limfocitelor B monoclonale $>5 \times 10^9/L$) iar termenul de B-SLL este folosit când procesul limfoproliferativ este limitat la nivelul țesutului limfoid, în principal ganglionar.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Etiologia și epidemiologia limfomului limfocitic B/leucemiei limfoide cronice

1.1. Etiologia limfomului limfocitic B/leucemiei limfoide cronice

Etiologia exactă a SLL/LLC nu este cunoscută. Factorii genetici par a fi principalii factori în dezvoltarea acestei afecțiuni mai mult decât factorii de mediu. Un număr limitat de factori de risc corespund cauzelor ocupaționale cum ar fi expunerea la chimicale, radiații și tutun. Un risc crescut pentru dezvoltarea SLL/LLC a fost raportat în cazul muncitorilor din industria cauciucului și al celor cu expunere la benzen. Aceste asocieri nu au fost însă demonstrate.

1.2. Incidența și prevalența la nivel global și național

CLL/SLL este cea mai frecventă formă de limfoproliferare cronică a adultului în țările Vestice, reprezentând aproximativ 25-35% din formele de leucemie din Statele Unite (US) [3]. În Europa, incidența bolii este de 4.2:100 000/an și crește la >30:100 000/an la vârsta de >80 ani [4]. În apoximativ 10% din cazuri boala se prezintă ca afectare nodală primară asemenea limfomului non-Hodgkin; această situație reprezintă 5% din toate cazurile de limfom non-Hodgkin.

Boala este diagnosticată la persoane cu vârste cuprinse între 50-70 ani, cu o vârstă medie la diagnostic de 70 ani. Deși incidența crește proporțional cu vârsta, boala poate fi diagnosticată și la adulții tineri (30-39 ani) [5,6].

2. Fiziopatogenia limfomului limfocit B/leucemiei limfoide cronice

SLL/LLC derivă din limfocitul B matur cu fenotip CD5+, dar prezintă o heterogenitate intrinsecă care reflectă diferențe de ontogenie, program epigenetic și expunere antigenică. Limfocitul B este incompetent din punct de vedere funcțional, arestat în calea de diferențiere. Ca urmare a analizelor de expresie genică și metilare genomică au fost delimitate trei subgrupuri epigenetice și anume – celule naive (naive-like cell, n-CLL), intermediar (i-CLL)

și celule cu memorie (memory-like, m-CLL) care au corespondențe legate de statutul de mutație hipersomatică la nivelul regiunii variabile a lanțului greu de imunoglobulină (IGHV) – IGHV nemutant (U-IGHV) și IGHV mutant (M-IGHV) și de evoluția clinică. Aceste subgrupuri susțin existența unor traiectorii de transformare diferite (naive vs memory) ce pot explica de ce unele clone sunt predominant anergice iar altele sunt proliferative și chemotactice [7-9].

3. Diagnosticul limfomului limfocitic B/leucemiei limfoide cronice

LLC/SLL are un debut insidious. Majoritatea pacienților nu prezintă simptomatologie în stadiile incipiente de boală. Diagnosticul este pus întâmplător ca urmare a unei hemograme efectuate de rutină unde se evidențiază o valoare crescută a numărului absolut de limfocite sau ca urmare a descoperirii unor adenopatii nedureroase.

Investigațiile paraclinice sunt efectuate atât în vederea stabilirii diagnosticului cât și pentru evaluarea prognosticului deoarece managementul fiecărui pacient depinde de stadiul bolii, de prezența factorilor nefavorabili și de prezența criteriilor de boală activă.

În cazul CLL suspiciunea clinică se ridică atunci când hemograma evidențiază prezența leucocitozei cu limfocitoză absolută. Valoarea limfocitelor este necesar să fie $>5000/\text{microL}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$). Pe frotiul de sânge periferic limfocitele sunt mici, aparent mature, citoplasmă puțină, bazofilă, nucleu dens, cromatină condensată, fără nucleoli vizibili; pot fi evidențiate umbrele nucleare Gumprecht, caracteristice (limfocite maligne fragile).

În cazul pacienților cu SLL, valoare limfocitelor poate fi normală sau foarte puțin crescută; prin definiție, pacienții cu SLL au un număr absolut de limfocite $<5000/\text{microL}$ ($5 \times 10^9/\text{L}$) în momentul diagnosticului [1]. Diagnosticul necesită confirmare histopatologică din biopsia de ganglion.

Stadializarea și încadrarea în grupe de risc pentru pacienții cu CLL se face cu sistemul Rai respectiv Binet iar pentru pacienții cu diagnostic de SLL se folosește stadializarea Ann Arbor modificată Lugano.

4. Markeri prognostici și predictivi în limfomul limfocitic B/leucemia limfoidă cronică

Markerii prognostici și predictivi sunt variabile măsurabile care se asociază cu evoluția și răspunsul bolii. Unii markeri pot fi cu rol atât prognostic cât și predictiv.

Markerii prognostici se asociază cu evoluția clinică (ex. supraviețuire fără progresie de boală, supraviețuire globală) indiferent de tipul de tratament. Acești markeri sunt indicatori ai activității bolii, ai distribuției acesteia, ai ratei de creștere.

Principalii markeri cu uz clinic sunt reprezentați de:

- stadializarea clinică
- mutațiile TP53 și del(17p)
- statusul mutațional al regiunii variabile a lanțului greu de imunoglobulină (IGHV)
- timpul de dublare al limfocitelor
- beta2microglobulina
- Del(11q), del(13q), trisomia 12

Utilitatea clinică a altor marker prognostici (CD38, ZAP-70, mutațiile NOTCH1, BIRC3, SF3B1) este încă neclară.

Markerii predictivi aduc informații referitoare la răspunsul la o anumită terapie și astfel au rol în alegerea tratamentului.

5. Tratamentul și răspunsul la tratament în limfomul limfocitic B/leucemia limfoidă cronică

O trăsătură a CLL/SLL este aceea că nu toți pacienții necesită tratament în momentul diagnosticului. Pacienții asimptomatici, diagnosticați în stadii limitate de boală, Rai 0-II, Binet A/B sau Ann Arbor I/II sunt eligibili pentru perioada de urmărire, watch and wait, dat fiind faptul că boala are o evoluție în general indolentă iar trialurile clinice cu abordare terapeutică precoce nu au demonstrat avantaje în ceea ce privește supraviețuirea, fie că s-a utilizat chimioterapia sau terapiile țintite [2].

Tratamentul este indicat pacienților cu boală activă, conform ghidurilor Grupului Internațional de lucru pentru leucemia limfoidă cronică (iwCLL) [2]. Termenul de boală activă este definit de progresia insuficienței medulare evidențiată de agravarea anemiei sau

trombocitopeniei, progresia adenopatiilor sau a splenomegaliei, limfocitoza progresivă cu o creștere >50% în două luni sau timpul de dublare al limfocitelor <6 luni, complicații autoimune cu răspuns deficitar la corticoterapie, afectare extranodală funcțională sau simptomatică, prezența simptomelor B legate de boală (scădere ponderală involuntară $\geq 10\%$ în ultimele 6 luni, ECOG ≥ 2 , febră neinfecțioasă, transpirații nocturne în afara infecției). O valoare a hemoglobinei < 11 g/dL sau a trombocitelor $< 100 \times 10^9/L$ reprezintă de obicei indicație de inițiere a tratamentului. Numărul absolut de limfocite nu este singur un criteriu de inițiere a tratamentului în absența simptomelor și a afectării medulare [2]. Cu toate acestea, o valoare a leucocitelor >200,000/mm³ poate servi ca indicație terapeutică din cauza riscului crescut pentru sindromul de hipervâscozitate (ex. accidente ischemice tranzitorii).

În cazul pacienților care sunt eligibili pentru inițierea tratamentului specific, o serie de factori influențează decizia terapeutică și alegerea agenților terapeutici: vârsta, statusul de performanță și comorbiditățile, prezența mutațiilor în gena TP53 sau a del(17p), statusul mutațional IGHV, preferința pacientului și scopul terapeutic.

Pentru pacienții cu stadii limitate de boală și asimptomatici, standardul este reprezentat de observare și urmărire clinică și paraclinică. Această abordare are la bază o serie de studii clinice randomizate și meta-analize care au demonstrat că nu există beneficii clinice care să impună necesitatea de tratament și un trial randomizat dublu-orb placebo-controlat privind ibrutinib versus observație care a evidențiat o creștere a toxicităților și o supraviețuire globală similară [10-13].

În cazul pacienților diagnosticați cu SLL localizat, cu afectarea unei singure arii ganglionare și asimptomatici se recomandă de asemenea urmărirea și observarea decât terapie sistemică sau radioterapie (RT). Datele cu privire la radioterapie au la bază studii retrospective, pe serii mici de pacienți [14].

Pentru toți pacienții eligibili pentru tratament este indicată și încurajată includerea în trialuri clinice. Atunci când această variantă nu este disponibilă, tratamentul este ales conform protocoalelor naționale și internaționale (NCCN, ESMO) [15,16]. Dată fiind disponibilitatea pentru o serie de agenți terapeutici specifici, cu diferite mecanisme de acțiune și toxicități, alegerea este influențată atât de factori dependenți de boală cât și de profilul pacientului (comorbidități, comedicație, preferința pacientului, disponibilitate și estimarea aderenței la tratament). Din punct de vedere al riscului genetic, evaluările necesare înaintea oricărei linii de tratament cuprind statusul mutațional TP53 și del(17p) și de asemenea statusul mutațional IGHV, dacă nu este cunoscut [17,18].

Din punct de vedere al primei linii de tratament strategiile terapeutice sunt reprezentate de terapia continuă cu inhibitor de Bruton tirozin kinază (BTKi) – Ibrutinib, Acalabrutinib, Zanubrutinib, până la progresie, terapie cu durată limitată cu inhibitor de BCL2 (BCL2i)– Venetoclax - în combinație cu anticorp monoclonal anti CD20 – Obinituzumab, pentru 12 cicluri sau 3 cicluri de Ibrutinib monoterapie urmată de ibrutinib-venetoclax fie pentru 12 cicluri [16].

Chimioimunoterapia (CIT) cu durată limitată cum ar fi regimul fludarabină-ciclofosamidă-rituximab (FCR) poate fi luată în considerare doar în cazul pacienților cu un profil genetic favorabil definit de IGHV mutant și fără anomalii ale genei TP53 și adițional un kariotip non-complex definit de prezența a mai puțin de 5 aberații cromozomiale și dacă terapiile țintite nu sunt rambursate [16, 19]. Supraviețuirea fără progresie de boală (PFS) este mai scăzută în cazul chimioimunoterapiei comparativ cu terapiile țintite, dar acest lucru nu a fost demonstrat și pentru supraviețuirea globală (OS) în majoritatea studiilor [20,21].

Deși chimioterapia este o opțiune pentru pacienții fit, tineri, cu profil genetic favorabil, prima opțiune terapeutică trebuie să fie reprezentată de terapiile țintite, date fiind rezultatele superioare privind supraviețuirea fără progresie de boală și supraviețuirea globală. În momentul alegerii opțiunii terapeutice între terapie fixă, ibrutinib-venetoclax sau venetoclax-obinituzumab, sau terapie continuă cu BTKi, este preferată terapia fixă deoarece se asociază cu toxicități reduse și reluarea tratamentului este posibilă în momentul recăderii, cu limitarea selecției clonale și reducerea reacțiilor adverse, în special pentru pacienții cu risc genetic favorabil la care se aduce un beneficiu adițional cu privire la PFS [22,23,24].

Pacienții cu anomalii ale TP53 (muații/deleție) au indicație de inițiere a terapiei cu BTKi dat fiind faptul că datele raportate privind PFS sugerează că durata bolii controlate este mai lungă cu terapiile continue.

În ceea ce privește tratamentul bolii recăzute/refractare, chimioterapia nu trebuie să fie administrată deoarece se asociază cu rate scăzute a PFS și OS [25,26]. În cazul recăderilor după CIT sau recăderi tardive după regimuri cu durată fixă bazate pe venetoclax sunt disponibile două opțiuni terapeutice și anume, terapie cu durată fixă venetoclax-rituximab sau terapie continuă cu BTKi.

În ciuda faptului că CLL și SLL sunt considerate identități similare iar ghidurile recomandă un management și o abordare similară a acestora, sunt puține date raportate despre managementul real-world al SLL dat fiind că această entitate reprezintă doar 10-15% din cazurile de CLL/SLL. Deasemena această categorie de pacienți a fost exclusă din majoritatea trialurilor clinice conduse pentru CLL dar în mod contrar acești pacienți au fost incluși în

trialuri pentru limfoame non-Hodgkin indolente (NHLi) cum ar fi limfomul folicular, ceea ce a dus la incertitudini în privința managementului SLL.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Metodologia cercetării

1.1 Scopul și obiectivele cercetării

Am ales această temă de cercetare deoarece limfomul limfocitic B, deși se identifică ca fiind aceeași boală ca leucemia limfoidă cronică, există puține date și studii cu privire la caracteristicile și managementul limfomului limfocitic pur.

Totodată, deși ghidurile naționale și internaționale recomandă tratarea în mod similar al afecțiunii, fie că se prezintă ca B-SLL fie ca B-CLL, [150, 151, 152, 153] studiile real-world indică faptul că majoritatea pacienților cu B-SLL primesc tratamente și sunt abordați conform protocoalelor asociate limfoamelor non-Hodgkin indolente (iNHL) [154-156]. Acest lucru are la bază și faptul că pacienții cu B-SLL au fost excluși din trialurile clinice pentru LLC dar în schimb au fost înrolați în trialuri pentru iNHL. Astfel, în perioada 1999-2020, din 56 de trialuri clinice citate în ghidurile de tratament NCCN, pacienții cu B-SLL au fost incluși în doar 38% din studiile țintite LLC dar în schimb au fost înrolați în 16 trialuri non-LLC, pentru diferite subtipuri de iNHL [157]. Excluderea pacienților cu B-SLL din trialurile pentru B-CLL determină o subevaluare și un management suboptimal al acestora dat fiind că rezultatele pacienților cu prezentare leucemică sunt extrapolate la cei cu prezentare nodală, unde evoluția, răspunsul la tratament, profilul de risc pot fi diferite. De asemenea este cunoscut faptul că pacienții cu B-CLL care prezintă deleția brațului scurt al cromozomului 17, (del17p), au prognostic negativ, o scurtare semnificativă a supraviețuirii fără progresie de boală și a supraviețuirii globale și rezistență la chimioterapie [158] dar evaluarea acesteia nu se practică de rutină și în cazul B-SLL.

În cadrul tezei se va evalua prezența *del17p*, expresia imunohistochimică a p53 și se va urmări stabilirea relației între acești markeri și parametrii clinici și biologici cu valoare prognostică, impactul asupra deciziei terapeutice, a răspunsului la tratament și evaluarea posibilității includerii pacienților în trialuri clinice pentru creșterea supraviețuirii și a calității vieții.

Scopul cercetării

Prezentul studiu își propune să evalueze, prin analiză clinico-morfologică completată de studii imunohistochimice și moleculare, validarea unor markeri cu valoare de diagnostic și prognostic în limfomul limfocitar B nodal, în vederea îmbunătățirii stratificării riscului și personalizării managementului clinic.

Obiectivele cercetării

1. Obiectivul primar

Descrierea și corelarea caracteristicilor clinico-biologice și morfologice ale pacienților cu SLL cu profilul IHC și molecular (p53 IHC, del(17p)), și relația lor cu rezultatele clinice.

2. Obiective secundare

2.1 Evaluarea rolului IHC p53 (model de expresie și intensitate) și integrarea sa într-un algoritm practic de prognostic

2.2 Determinarea implicațiilor prognostice și terapeutice ale profilului IHC/molecular (p53 IHC și del(17p)), separat și în combinație, asupra TTFT și PFS

2.3 Identificarea și validarea factorilor independenți asociați cu TTFT și PFS și formularea de recomandări pentru personalizarea managementului, pe baza analizelor multivariate.

1.2 Designul studiului și selecția pacienților

Studiul a fost unul prospectiv observațional, realizat pe un lot de 46 de pacienți care au fost diagnosticați cu limfom limfocitic cu celulă B în cadrul serviciului de Anatomie Patologică al Spitalul Clinic Județean Constanța și tratați în cadrul secției Medicală II - Hematologie și Medicală I. Studiul s-a desfășurat în perioada 01.01.2017-31.12.2022. Înrolarea pacienților s-a încheiat la 31.12.2022 iar urmărirea acestora s-a realizat până la 31.12.2024.

Studiul de hibridizare fluorescentă in situ (FISH) și analiza imunohistochimică s-au efectuat în cadrul Centrului de Cercetare Dezvoltare pentru Studiul Morfologic și Genetic în Patologia Malignă (CEDMOG) al Universității Ovidius Constanța.

Studiul s-a efectuat cu consimțământul informat și asumat al pacienților respectiv cu aprobarea Comisiei de Etică.

Criterii de includere

- vârsta peste 18 ani
- pacienți diagnosticați cu B-SLL pe baza examenului histopatologic și imunohistochimic și tratați în cadrul Compartimentului de Hematologie
- material biologic adecvat: blocuri FFPE
- dosar clinic complet minim: date demografice, stadializare, analize, tratamente, urmărire
- numărul limfocitelor clonale din sângele periferic mai mic de 5000/mm³ sau mai mic de 10000/mm³ în absența demonstrării clonalității

Criterii de excludere

- vârsta mai mică de 18 ani
- pacienți diagnosticați cu alte tipuri de limfoame cu celule B

refuzarea semnării consimțământului informat

1.3 Colectarea datelor

Datele au fost colectate prospectiv, din momentul primei vizite și ulterior pe tot parcursul evoluției pacienților cu crearea bazei de date de studiu.

Examenul clinic a constat în evaluarea statusului general al pacientului cu scopul de a calcula statusul de performanță conform Grupului Oncologic de Cooperare Estic (ECOG), prezența adenopatiilor externe, localizarea și dimensiunile acestora, prezența hepatomegaliei, a splenomegaliei, prezența semnelor B de boală.

Investigațiile biologice și biochimice au avut în vedere

- valorile hemogramei (hemoglobină, leucocite cu formula leucocitară, trombocite)
- evaluarea funcției hepatice prin valorile transaminazelor
- markeri hepatici virali (VHB, VHC) și serologia HIV
- evaluarea funcției renale (creatinină, acid uric, uree)
- LDH-ul seric
- probe inflamatorii - VSH seric
- beta-2-microglobulina serică
- test Coombs, bilirubină, reticulocite

- sideremie, feritină, vitamina B12, acid folic

Dat fiind faptul că pacienții cu SLL se prezintă cu boală nodală, imagistica s-a efectuat prin CT gât-torace-abdomen-pelvis și a avut ca scop identificarea tuturor localizărilor nodale, a celor extranodale și cunatificarea adenopatiilor. Ținând cont de faptul că SLL este o afecțiune cu aviditate scăzută, pacienții nu au fost evaluați prin PET/CT.

Fiecare pacient a fost încadrat într-un stadiu de boală conform clasificării Ann-Arbor/Lugano.

Decizia terapeutică – urmărire (watch and wait), chimioterapie, anticorpi monoclonali în monoterapie sau în asociere cu chimioterapia, inhibitori de bruton-kinază, radioterapie, intervenție chirurgicală.

Monitorizarea pacienților cu vizite periodice, conform protocolului și evaluarea răspunsului la tratament: răspuns complet, răspuns parțial, boală stabilă, progresie de boală. Urmărirea pacienților s-a realizat din momentul diagnosticului până la sfârșitul perioadei de studiu, conform protocolului.

1.4 Examenul histopatologic și imunohistochimic

S-a efectuat evaluarea expresiei p53 pe țesuturile FFPE deoarece este o metodă rapidă pentru testare și poate ajuta la identificarea pacienților cu risc crescut (anomalii TP53). S-a folosit anticorpus p53, clona DO-07, izotip IgG2b,Kappa, cu pozitivare nucleară (anticorp p53 Zeta care reacționează atât cu forma mutantă a p53 cât și cu forma de tip wild type). Am folosit o abordare pattern-based: wild-type = colorare nucleară variabilă la 1–50% din celulele tumorale; overexpression = colorare nucleară intensă, difuză, la >50% din celulele tumorale; null = absență completă a semnalului în celulele tumorale cu control intern pozitiv. Clasificarea a urmat recomandările utilizate în practica de diagnostic a limfoamelor B mature; „overexpression” și „null” au fost considerate pattern-uri anormale („mutant-like”).

1.5 Determinarea statusului genei TP53 prin tehnica FISH

Evaluarea *del17p13.1* s-a efectuat prin tehnica de hibridizare fluorescentă in situ folosind sonda specifică de locus pentru deleția genei TP53 (figura nr.3) (CytoCell for P53 gene deletions - TP53 - LPS 037, Oxford Gene Technology IP Limited, UK)., pe secțiunile de țesut incluse în parafină. Analiza probelor s-a realizat cu microscopul cu fluorescență.

1.6 Analiza statistică și interpretarea datelor

Datele experimentale au fost prelucrate pe calculatorul personal cu ajutorul programului Microsoft Excel și al programului de prelucrare statistică *MedCalc Software* (licență personală). Procedurile utilizate au fost: statistici descriptive (pentru caracterizarea variabilelor categoricale și variabilelor numerice discrete/ continue definite la nivelul bazei de date), Grafice, Teste statistice parametrice (Testul-t pentru compararea mediei a două eșantioane independente), Teste statistice neparametrice (testul χ^2 al asociației, al legăturii, dintre două variabile categoricale, cu determinarea în anumite situații a raportului de risc/șansă OR și a riscului relativ Rr). În cazul variabilelor continue, pentru verificarea îndeplinirii condiției de normalitate a fost utilizat testul Shapiro-Wilk (datorită dimensiunilor mici a eșantioanelor $n < 50$). Nivelul de semnificație ales a fost $\alpha = 0.05$ pentru toate testele utilizate.

2 Rezultate obținute

În momentul diagnosticului, vârsta medie a fost de 65 ani, cu o vârstă minimă de 36 ani și o vârstă maximă de 77 ani. Lotul de studiu a cuprins un număr de 16 femei (34,78%) și 30 de bărbați (65,2%).

Se remarcă incidența mai scăzută a diagnosticului de B-SLL în cazul sexului feminin comparativ cu sexul masculin.

Din punct de vedere al statusului de performanță (ECOG), lotul studiat a cuprins 21 pacienți (63%) cu ECOG 0-1 și 17 pacienți (37%) cu ECOG ≥ 2 .

În funcție de stadiul Ann-Arbor la diagnostic, lotul de studiu a cuprins 2 pacienți în stadiul I (4.3%), 16 pacienți în stadiul II (34.8%), 23 de pacienți în stadiul III (50%) și 5 pacienți în stadiul IV (10.9%).

În lotul studiat, 18 pacienți (39.10%) au fost diagnosticați în stadii limitate de boală I/II și 28 de pacienți (60.87%) au fost diagnosticați în stadii avansate III/IV, ceea ce evidențiază faptul că majoritatea pacienților au fost diagnosticați în stadii avansate de boală. Analiza cazurilor a evidențiat că în momentul diagnosticului 12 pacienți (26.1%) au prezentat semne generală de boală (scădere ponderală involuntară în ultimele 6 luni, transpirații profuze sau febră neinfecțioasă) și 34 dintre aceștia (73.9%) nu au prezentat semne B. Prezența semnelor generale de boală în momentul diagnosticului se corelează cu stadiul bolii. Astfel că la pacienții aflați în stadii avansate au asociat și semne generale de boală – 8 pacienți cu stadiul III au

prezentat la diagnostic semne B și 4 pacienți diagnosticați în stadiul IV au prezentat semne B. În stadiile limitate nici un pacient nu a asociat semne B la diagnostic, chi-squared 14.79, df=3, p=0.002.

În momentul diagnosticului, în lotul studiat, 20 de pacienți (43,47%) s-au prezentat cu dimensiuni normale ale splinei și 26 de pacienți (56,52%) au asociat splenomegalie de grade variabile. Din punct de vedere al splenomegaliei se poate observa faptul că aceasta a fost prezentă la 25 de pacienți (89,28%) din subgrupul cu boală avansată spre deosebire de subgrupul pacienților cu boală limitată unde doar un singur pacient a asociat prezența splenomegaliei la diagnostic astfel că se poate stabili o asociere între prezența splenomegaliei și stadiul bolii (Chi-Square =30,5, df=1, p<0,0001, semnificativ statistic).

Hepatomegalia a fost prezentă, în momentul diagnosticului, la 22 dintre pacienți (47,82%) în timp ce 24 dintre pacienți (52,17%) nu au prezentat hepatomegalie.

În funcție de scorul de prognostic internațional, lotul de studiu a cuprins 9 pacienți (19,6%) care se încadrează în grupa de risc scăzut (IPI 0-1), 12 pacienți (26,1%) în grupa de risc intermediar-scăzut (IPI 2), 20 de pacienți (43,5%) în grupa de risc intermediar-crescut (IPI 3) și 5 pacienți (10,9%) în grupa de risc crescut (IPI 4).

Majoritatea pacienților cu stadii limitate de boală la diagnostic prezintă un status de performanță ECOG de 0 sau 1, 38,89% respectiv 55,56% și doar un număr mic de pacienți au prezentat un ECOG ≥ 2 , 5,56%. În schimb, în stadiile avansate de boală majoritatea pacienților au prezentat un ECOG ≥ 2 , 57,14%. ECOG 0 au prezentat doar 10,71% dintre pacienți și ECOG 1, 32,14% dintre pacienți. Există o asociere semnificativ statistică între ECOG și stadiul bolii, cu o valoare a p<0,0013, Fisher exact p=0,0004.

În lotul studiat, au fost identificați 16 pacienți (34,78%) care au prezentat la diagnostic adenopatii cu dimensiuni <5cm și 30 de pacienți (65,21%) care au prezentat adenopatii cu dimensiuni > 5cm. În stadiile limitate de boală 77,78% dintre pacienți (14) au avut adenopatii <5cm și doar 22,22% (4) au avut adenopatii >5cm; în stadiile III/IV majoritatea pacienților au asociat prezența de adenopatii >5cm (26 de pacienți, 92,86%). Acest lucru evidențiază o diferență semnificativă statistic cu o valoare a p<0,0001 Chi-squared=23,57, df=1, Fisher exact p=0,000001.

Din punct de vedere al comorbidităților, 9 pacienți (19,6%) au prezentat un scor de 0-1, 22 de pacienți (47,8%) au prezentat un scor de 2-3 și 15 pacienți (32,6%) un scor ≥ 4 . În stadiile limitate de boală majoritatea pacienților au prezentat un scor de comorbidități ≤ 3 spre deosebire de pacienții cu stadii avansate de boală care au avut un scor de comorbiditate ≥ 4 .

În lotul studiat, 28 de pacienți (60.86%) au prezentat anemie în momentul diagnosticului, dintre care, 21 (75%) au avut o valoare a hemoglobinei mai mică de 10g/dl. Valoarea minimă înregistrată a fost de 5g/dl cu o valoare maximă de 16,2g/dl. Valoarea medie a fost de 10,74g/dl, cu o deviație standard de 2,54 (Shapiro-Wilk test $W=0,98$).

În stadiile avansate III/IV se regăsește un procent mai mare de pacienți cu valoare a hemoglobinei mai mică de 10g/dl (60,7%) comparativ cu stadiile I/II unde 83,3% din pacienți au avut o valoare a hemoglobinei mai mare de 10g/dl. Astfel că valoarea hemoglobinei este un factor de prognostic negativ în diagnosticul și evoluția cazurilor având semnificație statistică $p=0,0001 < \alpha = 0,05$, $r=0,64$, 95% CI= -0,78 – 0,42. Există o asociere negativă semnificativă și destul de puternică între cele două variabile, stadiul avansat de boală și prezența anemiei. Dintre pacienții care s-au prezentat cu anemie în momentul diagnosticului (60.86%), 15 au avut anemie legată de boală - 8 (28.6%) au avut ca și cauză anemia hemolitică autoimună (AHAI), 7 (25%) au prezentat anemie secundară hipersplenismului și 13 (46.4%) au avut anemie de alte cauze.

Din punct de vedere al distribuției în funcție de stadiul bolii și valoarea beta2microglobulinei la diagnostic se poate observa, conform datelor din grafic, că pacienții în stadiile I/II (94,44%) au avut o valoare a beta2microglobulinei $<3,5\text{mg/L}$ spre deosebire de cei din stadiile III/IV care au avut o valoare $>3,5\text{mg/L}$ (78,57%). Astfel se poate stabili că beta2microglobulina este un factor de prognostic negativ, cu valoare semnificativă statistic $\text{Chi-squared}=22,85$, $\text{df}=1$, $p<0,0001$. β_2 -microglobulina discriminează semnificativ între pacienții cu stadii Ann-Arbor I/II și cei cu stadii III/IV, cu o arie sub curbă (AUC) de 0,876 (95% CI: 0,78–0,95; $p < 0,001$). Pragul optim determinat prin criteriul lui Youden a fost 3,5 mg/L, corespunzător unei sensibilități de 85% și specificități de 80%.

În lotul studiat, cei mai mulți pacienți au prezentat o valoare crescută a LDH-ului (58,7%) la diagnostic iar în ceea ce privește distribuția în funcție de stadiul bolii se poate observa că în stadiile incipiente majoritatea pacienților au avut o valoare normală LDH-ului (77,78%) spre deosebire de cei în stadii avansate, care au avut o valoare crescută a LDH-ului (82,14%) ($\text{chi-squared}=15,87$, $\text{df}=1$, $p<0,0001$; Fisher exact $p<0,0001$). Dintre pacienții care s-au prezentat la diagnostic cu adenopatii $< 5\text{cm}$, 12 (75%) au prezentat valori normale ale LDH-ului seric și 4 (25%) au prezentat valori crescute. Dintre pacienții care au avut adenopatii $>5\text{cm}$, 7 (23.33%) au asociat valori normale ale LDH-ului seric și 23 (76.66) au asociat valori crescute, $\text{chi-squared } 11.24$, $\text{df } 1$, $p=0.0008$, fisher exact $p=0.001$.

În funcție de dimensiunea adenopatiilor la momentul diagnosticului, majoritatea pacienților cu adenopatii $<5\text{ cm}$ au asociat valori normale ale beta2microglobulinei serice, 13

pacienți (81.25%), și doar 3 pacienți (18.75%) au avut valori crescute. În cazul pacienților cu adenopatii >5cm, 20 dintre aceștia (66.66%) au asociat valori crescute și 10 (33.33%) au avut valori normale ale beta2microglobulinei serice, chi-squared 9.3, df 1, p=0.002, fisher exact p=0.004. Beta2-microglobulina discriminează semnificativ între pacienții cu adenopatii>5cm și cei cu adenopatii <5cm, cu o arie sub curbă (AUC) de 0,807 (95% CI: 0.664 - 0.909; p < 0,001). Pragul optim determinat prin criteriul lui Youden a fost >3.2 mg/L, corespunzător unei sensibilități de 80% și specificități de 81.25%.

În funcție de abordarea terapeutică în momentul diagnosticului 12 pacienți (26.1%) nu au necesitat tratament (abordare tip watch and wait) iar restul de 34 (73.91%) au necesitat inițierea terapiei - 20 dintre pacienți (43.5%) au primit tratament bazat pe anticorp monoclonal (mAb) asociat chimioterapiei (CIT), 9 pacienți (19.6%) au primit chimoterapie și 5 pacienți (10.9%) au primit inhibitori de brutontirozinază (BTKi). Din cei 34 de pacienți care au necesitat inițierea tratamentului, 15 (44.1%) au obținut un răspuns complet și 19 (55.9 %) au fost non-responsivi. În cazul pacienților care au necesitat inițierea tratamentului, răspunsul la tratament a variat în funcție de tipul terapiei: în grupul pacienților care au beneficiat de chimioterapie 2 au obținut răspuns complet vs 7 cu non-răspuns complet; dintre pacienții care au primit anticorp monoclonal în asociere cu chimioterapie, 8 au obținut un răspuns complet vs 12 cu non-răspuns complet iar în cazul celor 5 pacienți care au beneficiat de terapie țintită (BTKi) aceștia au obținut un răspuns complet la tratament. Există asociere semnificativă între tipul de tratament și obținerea răspunsului complet, chisquared 8.22, df 2, p=0.01.

Cazurile clinice incluse în studiu (n=46) au fost exclusiv cazuri de SLL nodal confirmate pe biopsie ganglionară, definite prin ștergerea difuză a arhitecturii și prezența obligatorie a centrelor de proliferare (pseudofoliculi) la examenul hematoxină eozină. Nici o biopsie nu a fost clasificată ca limfocitoză monoclonală B nodală (CLL/SLL-like proliferation/in situ) care este definită de infiltrate tisulare limitate, cu arhitectură păstrată și fără centre de proliferare. Colorarea IHC p53 a fost evaluată pe câmpuri reprezentative, evitând necroza și artefactele. Supraexpresia p53 a fost definită ca semnal nuclear intens (2–3+) în ≥40% dintre celulele tumorale, ne-restrâns la centrele de proliferare. Patternul „null” a fost definit ca lipsa colorării în celulele tumorale în prezența unui control intern adecvat. Cazurile cu pozitivitate mozaică, slabă/moderată sub acest prag au fost considerate p53 „wild-type” și nu au fost încadrate ca supraexpresie.

În funcție de tipul expresiei imunohistochimice a lui p53, conform datelor din grafic, se observă că 26 de pacienți (56.5%) au avut o expresie de tip wild-type (normală), 11 pacienți (23.9%) au avut o expresie de tip nul și 9 pacienți (19.6%) au avut o expresie de tip

overexpression. Răspunsul pacienților la tratament diferă în funcție de tipul expresiei IHC a lui p53. Astfel, în cazul pacienților cu expresie aberantă (nul/overexpression), 3 au obținut răspuns complet și 17 non-răspuns complet. Dintre pacienții cu expresie de tip wild type, 12 au obținut răspuns complet, și 2 non-răspuns complet. Chi-squared 16.21, df 1, $p=0.0001$.

În lotul de studiu, testarea pentru del(17p) a evidențiat prezența acesteia la 14 pacienți (30.43%). Restul de 32 de pacienți (69.56%) nu au asociat prezența del(17p). Pacienții care au necesitat inițierea tratamentului (73.91%) au avut răspuns diferit în funcție de prezența sau absența del(17p). În rândul pacienților la care a fost identificată prezența del(17p), doar 3 (20%) au obținut răspuns complet vs 12 (80%) cu non-răspuns complet. Pacienții care nu au avut del(17p), 12 (63.15%) dintre ai au obținut un răspuns complet și 7 (36.84%) non-răspuns complet, chi-squared 6.147, df 1, $p=0.013$. Toți pacienții care au asociat prezența del(17p) au avut o expresie imunohistochimică a lui p53 de tip aberant. În cazul pacienților care nu au avut del(17p) identificată FISH, 26 au avut o expresie a p53 de tip wild type și 5 au avut o expresie de tip aberant, chi-squared 28.306, df 1, $p<0.0001$.

În analiza Cox multivariată ($N=46$; 34 evenimente), atât p53 IHC aberant cât și del(17p) s-au asociat independent cu TTFT mai scurt ($\Delta-2LL=34,09$; df=2; $p<0,0001$). Ajustat reciproc, p53 IHC aberant a avut HR 3,23 (IC95% 1,10–9,49; $P=0,033$), iar del(17p) prezent HR 5,75 (IC95% 1,70–19,40; $P=0,0049$). C-index 0,742 (IC95% 0,695–0,788).

Ambele variabile sunt predictorii independenți ai inițierii rapide a tratamentului. del(17p) rămâne un semnal foarte puternic; p53 IHC aberant adaugă risc în plus, captând probabil și cazuri cu mutații TP53 fără deleție. Rezultatul este coerent cu analizele univariate: mediane foarte scurte la del(17p)+ și/sau p53 aberant.

3 Concluzii

În cazul limfomului limfocitic B, prezentarea clinică și evoluția sunt dependente de încărcătura tumorală. Adenopatiile mari (≥ 5 cm) și splenomegalia s-au concentrat în cazurile cu boală avansată și s-au asociat cu necesar mai timpuriu de tratament și PFS mai scurtă. Stadiul Ann Arbor/Lugano rămâne relevant deoarece boala în stadii avansate a avut o evoluție net inferioară față de stadiile limitate, susținând utilizarea sistematică a stadializării și a imagisticii complete la diagnostic și totodată în urmărirea răspunsului la tratament.

B2M reprezintă un marker seric cu valoare clinică pentru stratificarea pacienților cu limfom, putând discrimina eficient între stadiile incipiente și cele avansate ale bolii.

LDH – ul seric crescut deși nu este criteriu de inițiere a tratamentului el este un indicator al bolii biologic active și poate ridica suspiciunea de transformare sau de „tumor burden” crescut.

Anomaliile TP53 domină prognosticul negativ deoarece atât del(17p), cât și p53 IHC aberant (nul/supraexpresie) au identificat pacienți cu TTFT și PFS mult mai scurte. Practic, orice semnal TP53 trebuie tratat ca risc înalt.

Toți pacienții cu del(17p) au avut p53 IHC aberant, iar o parte dintre cei fără deleție au prezentat tot pattern aberant ceea ce sugerează cazuri cu mutații TP53 fără deleție. În centre cu acces limitat la NGS, combinarea FISH 17p + p53 IHC este un instrument de triere util pentru evitarea chimioterapiei la pacienții cu risc înalt.

Răspunsul terapeutic reflectă biologia bolii astfel că răspunsurile complete au fost mult mai frecvente la pacienții cu p53 wild-type și fără del(17p). În schimb, pacienții cu disrupție TP53 au răspuns slab la chemo(-imuno)terapie, ceea ce susține alegerea terapiilor țintite ca strategie de primă intenție în acest subgrup de pacienți.

Ponderea mai mare de utilizare a chimioterapiei singură sau asociată anticorpilor monoclonali reflectă modul în care SLL este adesea manageriat ca iNHL deși standardul terapeutic actual constă în regimuri fără chimioterapie pentru majoritatea pacienților.

4 Originalitatea tezei

Teza se remarcă prin faptul că:

- Este primul studiu prospectiv din România dedicat SLL care integrează sistematic evaluarea clinică, paraclinică și imagistică (stadializare completă conform practicii curente) într-o cohortă consecventă.
- Elementul său distinctiv este componenta translațională prin prisma faptului că în contextul accesului limitat la NGS, s-a urmărit implementarea și utilizarea standardizată p53 IHC (pattern-based) ca marker surogat al alterărilor TP53 (mutații), evaluată în paralel cu FISH pentru del(17p) pe țesut FFPE. Această combinație permite identificarea precoce a pacienților cu risc înalt, evită inițierea neadecvată a chimioterapiei la cazurile suspecte cu anomalii TP53 și ghidează orientarea către terapii țintite.
- Lucrarea propune un flux diagnostic practic p53 IHC și FISH TP53 ușor de implementat în centre cu resurse limitate, și standardizează evaluarea inițială prin includerea consistentă a parametrilor clinici și de „tumor burden”.
- Prin această abordare integrată și aplicabilă în practica clinică, teza aduce o contribuție originală la îngrijirea pacientului cu SLL în România și oferă un model replicabil la nivel instituțional și de rețea.

LISTA DE PUBLICAȚII

1. Andreea-Georgiana STOICA, Miruna CRISTIAN, Mariana ASCHIE et al, 17p13.1 Deletion in Small B-cell Lymphocytic Lymphomas: A Prognostic Factor and Diagnostic Approach, Documenta Haematologica - Revista Romana de Hematologie | 2025, Vol. 3, Nr. 1, <https://doi.org/10.59854/dhrrh.2025.3.1.11>
2. Stoica AG, Tica I, Ciocodei SL, Mitroi AF, et al. Primary Pulmonary Small B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma – Case Presentation. ARS Medica Tomitana. 2020;26(2):80–84. doi:10.2478/arism-2020-0016, <https://doi.org/10.2478/arism-2020-0016>
3. MARIANA ASCHIE, ANDREEA GEORGIANA STOICA et al, Synchronous Association of Two Types of Indolent Lymphomas, REV.CHIM.(Bucharest) 69 No. 12 2018, 3653-3655, <https://doi.org/10.37358/RC.18.12.6812>

Bibliografie

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016; 127(20): 2375–90.
2. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018; 131(25): 2745–60.
3. Rebecca L Siegel , Tyler B Kratzer et al, Cancer statistics, 2025, *CA Cancer J Clin* 2025 Jan-Feb;75(1):10-45. doi: 10.3322/caac.21871.
4. Societatea Română de Hematologie (SRH), Ghid de diagnostic si tratament în leucemia limfocitară cronică / limfomul cu celulă mica.
5. Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer*. 2011 Nov;105(11):1684-92. Epub 2011 Nov 01. doi: 10.1038/bjc.2011.450.
6. Hernández JA, Land KJ, McKenna RW, Leukemias, myeloma, and other lymphoreticular neoplasms. *Cancer*. 1995; 75 (1Suppl) :38. doi: 10.1002/10970142(19950101)75:1+<381::ad-cncr2820751320>3.0.co;2-b.
7. Rosenquist R, Davi F, Ghia P, et al. Chromatin dynamics in CLL: a matter of balance. *Blood*. 2025;145:2403–15. <https://doi.org/10.1182/blood.2024028201>.
8. Poppova L, et al. Memory B-cell like chronic lymphocytic leukaemia is associated with specific methylation profile of WNT5A promoter and undetectable expression of WNT5A gene. *Haematologica*. 2022;107:2758–70. doi: 10.1080/15592294.2022.2050004.
9. Ghia P. In CLL, epigenetics also points to the BCR. *Blood*. 2021;137:2863–5. <https://doi.org/10.1182/blood.2020010036>.
10. Hoehstetter MA, Busch R et al, Early, risk-adapted treatment with fludarabine in Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: results of the CLL1 trial of the German CLL study group. *Leukemia*. 2017;31(12):2833.
11. Herling CD, Cymbalista F et al, Early treatment with FCR versus watch and wait in patients with stage Binet A high-risk chronic lymphocytic leukemia (CLL): a randomized phase 3 trial , *Leukemia*. 2020, doi: 10.1038/s41375-020-0747-7
12. Langerbeins P, Zhang C, Robrecht S et al, The CLL12 trial: ibrutinib vs placebo in treatment-naïve, early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2022;139(2):177. doi: 10.1182/blood.2021010845.

13. Langerbeins P, Robrecht S, Nieper P et al, Ibrutinib in Early-Stage Chronic Lymphocytic Leukemia: The Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind, Phase III CLL12 Trial. *J Clin Oncol.* 2025;43(4):392 doi: 10.1200/JCO.24.00975.
14. Morrison WH, Hoppe RT, Weiss LM, Picozzi VJ Jr, Horning SJ, Small lymphocytic lymphoma. *J Clin Oncol.* 1989;7(5):598.
15. NCCN Clinical Practice Guideline in oncology, Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma, Version 3.2025.
16. Eichhorst B., Robak T., Montserrat E., Ghia P., Niemann C.U., Kater A.P., Gregor M., Cymbalista F., Buske C., Hillmen P., et al. Chronic Lymphocytic Leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2021;32:23–33. doi: 10.1016/j.annonc.2020.09.019.
17. Desikan S.P., Venugopal S., Ferrajoli A. BTK inhibitor selection for chronic lymphocytic leukemia: Which drug for which patient? *Expert Rev. Hematol.* 2022;15:403–409. doi: 10.1080/17474086.2022.2074393.
18. Hus I., Puła B., Robak T. PI3K inhibitors for the treatment of chronic lymphocytic leukemia: Current status and future perspectives. *Cancers.* 2022;14:1571. doi: 10.3390/cancers14061571.
19. Furstenau M, Thus YJ, Robrecht S, et al. High karyotypic complexity is an independent prognostic factor in patients with CLL treated with venetoclax combinations. *Blood.* 2023;142(5):446-459.
20. Al-Sawaf O, Zhang C, Jin HY, et al. Transcriptomic profiles and 5-year results from the randomized CLL14 study of venetoclax plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Commun.* 2023;14(1):2147.
21. Eichhorst B, Niemann CU, Kater AP, et al. First-line venetoclax combinations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2023;388(19): 1739-1754.
22. Al O, Zhang C, Jin HY et al, Transcriptomic profiles and 5-year results from the randomized CLL14 study of venetoclax plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Commun.* 2023;14(1):2147 doi: 10.1038/s41467-023-37648-w.
23. Tam CS, Allan JN, Siddiqi T, et al. Fixed-duration ibrutinib plus venetoclax for first-line treatment of CLL: primary analysis of the CAPTIVATE FD cohort. *Blood.* 2022;139(22):3278-3289.
24. Niemann C, Munir T, Moreno C, et al. Residual disease kinetics among patients with high-risk factors treated with first-line fixedduration ibrutinib plus venetoclax (IbrpVen) versus chlorambucil plus obinutuzumab (ClbpO): the glow study. *Blood.* 2022;140:228230.

25. Munir T, Brown JR, O'Brien S, et al. Final analysis from RESONATE: up to six years of follow-up on ibrutinib in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma. *Am J Hematol.* 2019;94(12):1353-1363.
26. Seymour JF, Kipps TJ, Eichhorst BF, et al. Enduring undetectable MRD and updated outcomes in relapsed/refractory CLL after fixed-duration venetoclax-rituximab. *Blood.* 2022;140(8):839-850.